PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com
PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

---

**Studijní program:** B4131 Zemědělství

**Studijní obor:** Agroekologie

**Katedra:** Katedra biologických disciplín

**Vedoucí katedry:** doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

## Epikatechin v druzích rodu *Reynoutria*

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

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

RNDr. Božena Šerá, Ph.D.

**Autor:** Jana Krejčová

2006

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com
PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu citované literatury.

Souhlasím, aby práce byla uložena na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích v knihovně Zemědělské fakulty a zpřístupněna ke studijním účelům.

……

V Českých Budějovicích dne 14.4.2006

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com
PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com

Poděkování patří především konzultantům RNDr. Naděždě Vrchotové, CSc., a RNDr. Boženě Šeré, Ph.D., za cenné rady a odborné vedení při zpracování bakalářské práce, za velkou ochotu a vstřícnost a za vytvoření přátelské atmosféry na pracovišti. Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu práce Ing. Karlu Suchému, Ph.D. za formální připomínky k práci. Za vytvoření technického zázemí a za trpělivost děkuji též Ing. Ivanu Černému.

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

# OBSAH


**1. ÚVOD** 7

**2. LITERÁRNÍ PŘEHLED** 9

2.1. Zástupci rodu křídlatka (*Reynoutria*) 9

2.2. Původní výskyt a následné rozšíření rodu *Reynoutria* 9

2.3. Monitoring a následná likvidace křídlatek 12

2.4. Využití křídlatky do budoucna? 14

2.5. Rostlinné invaze 14

2.6. Alelopatie 15

2.7. Flavonoidní látky 17

2.7.1. Chemická struktura flavonoidů 17

2.7.2. Účinky a výskyt flavonoidů 18

2.8. Epikatechin 18

2.8.1. Účinky a hlavní význam epikatechinu 21

2.9. Extrakce rostlinných fenolických látek 21

**3. MATERIÁL A METODY** 23

3.1. Botanický popis 23

3.2. Lokality a odběry materiálu 25

3.2.1. Lokality 25

3.2.2. Sběr listů a květů 28

3.2.3. Sběr podzemních částí 28

3.3. Příprava extraktů 28

3.3.1. Sušenný materiál (listy, květy, podzemní části) 28

3.3.2. Čerstvý materiál – podzemní části 28

3.3.3. Čištění extraktů přes kolonky 29

3.4. Měření extraktů na HPLC 30

3.5. Testy toxicity 31

3.6. Použité chemikálie 32

3.7. Použité přístrojové vybavení a laboratorní pomůcky 32

**4. VÝSLEDKY A DISKUSE** 34

4.1. Obsah epicatechinu v různých částech křídlatek 34

4.2. Testy toxicity 39


PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com
PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com

**5. ZÁVĚR** 40

**6. LITERATURA** 41

**7. SEZNAM PŘÍLOH** 46

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

# 1. ÚVOD

Problém invazních druhů rychle se šířících na našem území je stále více diskutovaným tématem. Je to především proto, že tyto druhy vytlačují původní vegetaci ze stanoviště a tím snižují biodiverzitu v daném území. Z velmi nebezpečných druhů rostlin lze jmenovat např. bolševník velkolepý (*Heracleum mantegazzianum*), křídlatky (*Reynoutria sp.*) a netýkavky (*Impatiens sp.*).

Na území České republiky se vyskytuje několik druhů křídlatek, z nichž dvě jsou zde nepůvodní (Mandák a kol., 2004). Zpočátku k nám byly křídlatky dováženy jako okrasné a nektarodárné rostliny. První záznam o dovozu a následném pěstování křídlatky sachalinské pochází z roku 1869, výskyt křídlatky japonské se datuje o něco později, od roku 1892 (Pyšek a Tichý, 2001). Záznamy o prvním výskytu křídlatky české jsou nejasné. Je to způsobeno především tím, že její determinační znaky jsou velmi proměnlivé. Někdy může značně připomínat některého z rodičů a tedy i určení, že jde o nový druh, zde bylo složitější. Údaje v literatuře poukazují na rok 1983, kdy byla nalezena lokalita křídlatky české nedaleko lázní Běloves u Náchoda (Kára a kol., 2005), naproti tomu podle studie Mandáka a kol. (2004) byl tento druh determinován již v roce 1950 v botanické zahradě Karlovy univerzity v Praze.

Křídlatka se díky impozantnímu mohutnému vzhledu stala velmi oblíbenou parkovou a zahrádkářskou okrasnou rostlinou a rychle se rozšiřovala do všech oblastí Čech a Moravy. Jen málokdo tehdy tušil, že se z této „krásky“ později stane nebezpečný invazní nepřítel. Dnes je rozšířena prakticky po celém našem území. Její výskyt je částečně mapován a lokality likvidovány.

V Japonsku jsou křídlatky naopak velmi hojně využívány v přírodní medicíně. Především se jedná o křídlatku japonskou, která z této země pochází. Z jejích podzemních částí se připravují léčebné extrakty. V křídlatkách byly izolovány některé fenolické látky, mezi něž patří stilbeny (např. resveratrol a jeho deriváty), antrachinony, deriváty kvercetinu, katechin, ekipatechin, chlorogenová kyselina, kávová kyselina (Vrchotová a kol., 2004, 2005b), a další. Tyto biologicky aktivní látky jsou produkty sekundárního metabolismu a vyskytují se v různých částech rostliny s rozdílným množství. Vykazují antibikrobiální, fungicidní a antioxidační vlastnosti (Vrchotová a kol., 2005a).

O stilbenech a antrachinonech nalezených v křídlatkách je v literatuře již mnoho záznamů (př. Vrchotová a kol., 2004; Zhang a kol., 2005; Lee a kol., 2003; Kimura a kol.,

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com
PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

1995; atd.), avšak málo prozkoumanou skupinou látek vyskytujících se v křídlatkách stále ještě zůstávají katechiny, mezi které řadíme i epikatechin.

Epikatechin patří mezi flavonoidy, přesněji, mezi flavan-3-oly a vyskytuje se ve všech částech těla křídlatek (Vrchotová a kol., 2005a). Tento z medicínského hlediska významný antioxidant se dále nachází například také v čajovníku čínském (Chu a kol., 2006; John a kol., 2006), vinné révě (Wang a kol., 2005), jablkách (Le Bourvellec a kol., 2004) a dalším ovoci.

Hlavním cílem mé práce bylo zjistit, jak se liší obsah epikatechinu ve vztahu k různé části rostliny a k různému druhu rodu křídlatek. Z metod, kterými lze stanovit flavonoidní látky, byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), která je v tomto směru jedna z nejpoužívanějších. Dalším cílem bylo navrhnout možné způsoby omezení šíření invazních rostlin, zhodnotit účinky flavonoidních látek a jejich případného využití v zemědělství.

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

# 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 2.1. Zástupci rodu křídlatky (*Reynoutria*)

Druhy rodu křídlatky jsou původem z východní Asie. Odtud byly do Evropy dovezeny v 19. století jako okrasné rostliny. V České republice je tento rod zastoupen následujícími druhy: *R. japonica* (křídlatka japonská) a její dvě genetické varianty – *R. japonica* Houtt. var. *Japonica* (křídlatka japonská pravá) a *R. japonica* var. *compacta* Moldenke (křídlatka japonská tuhá), dále *R. sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai (křídlatka sachalinská) a hybrid mezi *R. sachalinensis* and *R. japonica* – *R.* ×*bohemica* Chrtek et Chrtková (křídlatka česká), popsaný poprvé v České republice (Mandák a kol., 2004).

Pro druhy rodu křídlatky nebyl vždy jednotný název *Reynoutria*. Během let, kdy byly podrobněji zkoumány a objevovány nové biologické poznatky o těchto druzích, se měnilo i jejich taxonomické členění. Někteří autoři řadí křídlatky mezi rod *Reynoutria* (Webb, Holub), jiní mezi rod *Fallopia* (Ronse Decrane a Akeroyd, Bailey a Stace), nebo berou v úvahu rod *Fallopia* (zahrnující *Reynoutria*) jako taxonomické synonymum rodu *Polygonum* (Zika a Jacobsen). V současné době se používá označení *Reynoutria* (Mandák a kol., 2004).

## 2.2. Původní výskyt a následné rozšíření rodu *Reynoutria*

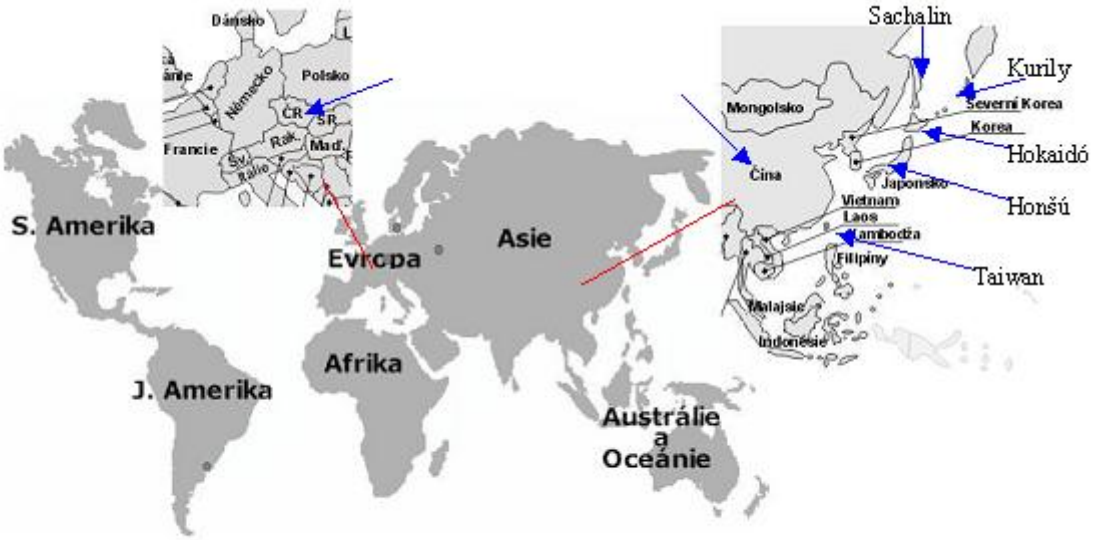
Křídlatka sachalinská je původní na ostrově Sachalin, jižních Kurilách a japonských ostrovech Hokaidó a Honšú. Křídlatka japonská zahrnuje oblast od Japonska přes Koreu a Čínu až k Taiwanu (Pyšek a Tichý, 2001). Jejich hybrid je zde v České republice původní, a odtud také dostal svůj název – křídlatka česká. Všechny výše uvedené geografické oblasti jsou znázorněny na mapě (Obr. 1.).

V našich podmínkách se křídlatky extrémně rychle šíří. Úspěšnost šíření je zajištěna především jejich způsobem reprodukce, který je odlišný od ostatních invazních druhů. Převládá vegetativní typ rozmnožování pomocí úlomků z oddenků a lodyh se schopností vytvářet rozsáhlý oddenkový systém. Generativní rozmnožování není obvykle možné kvůli nedostatku pylových zrn v některých druzích nebo neschopnosti přežití semenáčků (Mandák a kol., 2004). Podle experimentální studie vegetativního rozmnožování křídlatek (Bímová a kol., 2003) bylo zjištěno, že největší regenerační potenciál má *R.* $^{x}$*bohemica* (61%), dále *R. japonica* var. *compacta* (52%). Ostatní druhy měli již výrazně nižší regenerační potenciál (*R. japonica* var. *japonica* 39% a *R. sachalinensis* pouze 21%). Dále bylo zjištěno, že

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

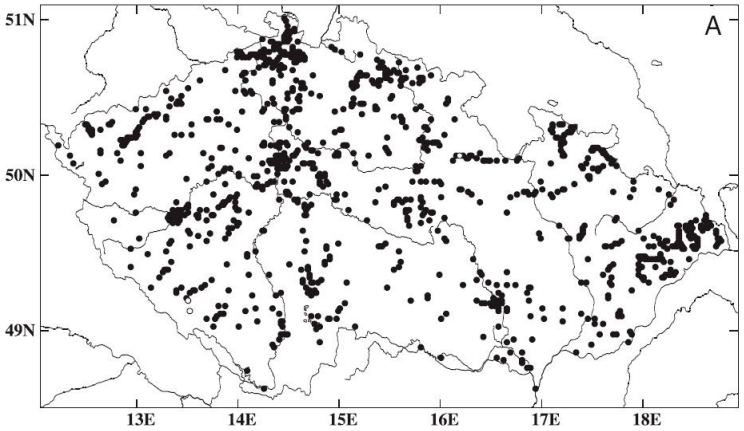
regenerace z lodyh je méně účinná než regenerace z oddenků u všech druhů, kromě křídlatky sachalinské.

Podle Obr. 2. je zřejmé, že nejvíce jsou výskytem křídlatky postiženy tyto okresy: Děčín, Karlovy Vary, Sokolov, Praha – západ, Hl.m. Praha, Plzeň – sever, Plzeň – město, Semily, Trutnov, Brno – město, Brno – venkov, Frýdek - Místek, Bruntál, Vsetín, Jeseník a Tábor. Nutno podotknout, že spousta těchto lokalit se nachází v chráněných krajinných oblastech – CHKO Beskydy, Jeseníky, České středohoří, Lužické hory, Labské pískovce, České Švýcarsko, a tedy boj s křídlatkou je zde složitější. Platí zde přísnější pravidla pro používání chemických přípravků, mechanickou likvidaci a každý krok je zde přísněji sledován a posuzován. Je zde výskyt více vzácných druhů než na jiných lokalitách, a na tyto druhy se musí brát bezpodmínečně ohled. Další studie se zabývají rozdíly ve vegetativním rozmožování na základě genotypové úrovně (Pyšek a kol., 2003) a dále je zkoumána i genetická variace mezi druhy (Mandák a kol., 2003).

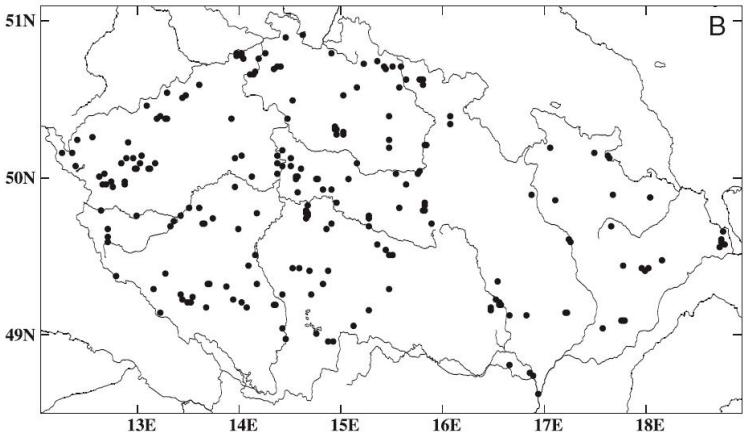



Obr. 1. Mapa výskytu rodu Reynoutria

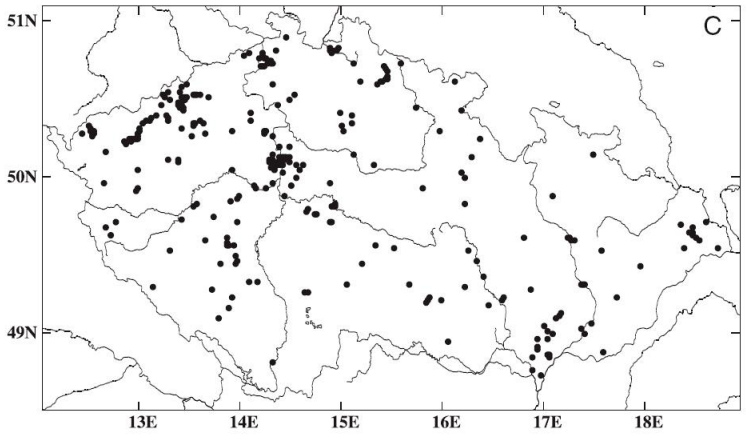
PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com




křídlatka sachalinská




křídlatka japonská




křídlatka česká

Obr. 2. Výskyt rodu Reynoutria na území ČR do roku 2000 (převzato z práce Mandák a kol., 2004)

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

## 2.3. Monitoring a následná likvidace křídlatek

Monitoring zachycuje různé proměnné složky životního prostředí v daných časových intervalech (měsíce, roky). Sledování a měření je většinou dlouhodobé a systematické (měření ukazatelů fyzikálních, chemických, biologických, atd.) a slouží pro zjišťování změn charakteristik prostředí v čase a predikce těchto charakteristik nebo jejich dalšího vývoje. Komplexně jde o několikastupňový a víceúčelový informační systém počínající standardními měřícími metodami (analýzami), přes sběr dat a jejich složité statistické a počítačové zpracování (Novotná, 2001).

Je velmi důležité abychom měli přehled o výskytu těchto invazních druhů. Slouží to k pochopení jejich ekologie a můžeme podle toho zpracovávat studie a navrhovat vhodná opatření proti dalšímu šíření.

Na Obr. 2. jsou zmapovány lokality s výskytem křídlatek pouze do roku 2000. Aktuální celorepublikový stav není v tuto chvíli k dispozici. Monitoring je sice prováděn, ale jen v některých oblastech a dosud chybí jakákoli centralizace. V chráněných krajinných oblastech je monitoring zakotven v tzv. „plánu péče“ pro dané území. Například v plánu péče o CHKO Český ráj je uvedeno mezi prioritními úkoly mapování výskytu invazních druhů, tedy i křídlatek a dále je zde popsán i postup likvidace (Anonymus, 2004a). Z právního hlediska má monitoring křídlatky provádět rostlinolékařská zpráva podle zákona č. 326/2004 o rostlinolékařské péči.

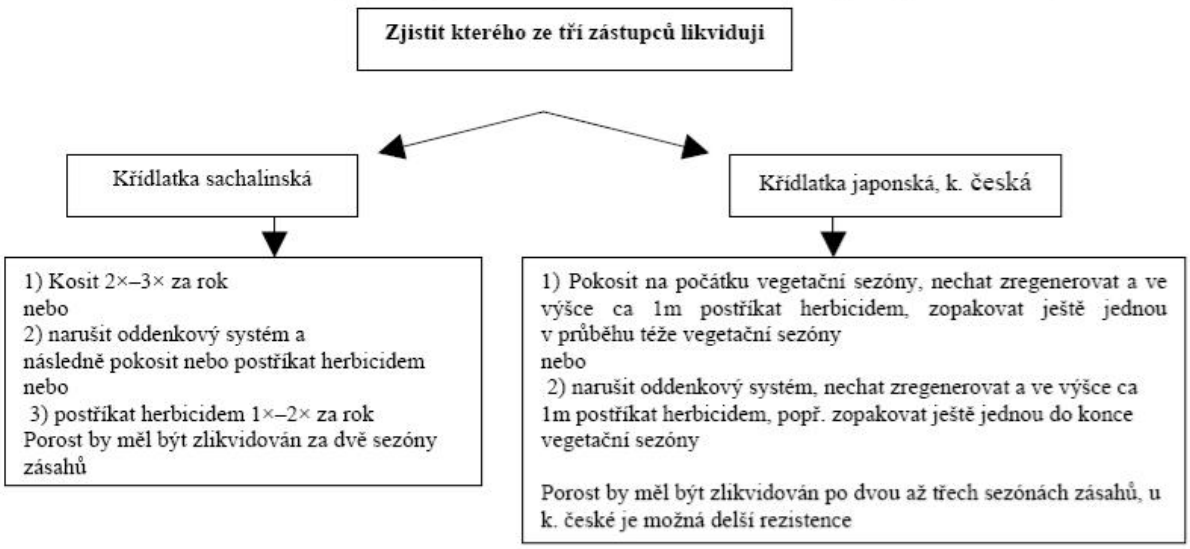
Likvidace křídlatky je velmi náročná jak finančně, tak i časově. V žádném případě to není záležitost jednorázová, ale několika let. Podle studie Bímové (2000), která se zabývala efektivností metod likvidace křídlatek, bylo nejlepších výsledků dosaženo u křídlatky sachalinské, kde k úplné likvidaci stačily pouze opakované mechanické zásahy. U křídlatky japonské bylo docíleno vysokého stupně eliminace použitím kombinované metody narušení oddenkového systému s kombinací aplikace herbicidu. Kříženec *R.* × *bohemica* se ukázal být velmi rezistentní ke všem zkoušeným typům likvidace a ani po dvou letech nebylo dosaženo uspokojivých výsledků.

Díky mohutnému oddenkovému systému křídlatek nelze z mechanických způsobů doporučit rytí nebo orbu, protože by mohlo dojít k rozsekání oddenků a k následnému namnožení. Pouze v případě kombinace mechanické a chemické likvidace je možné tyto činnosti provést. Pak je vhodné oddenky nařezat, nechat zregenerovat do výšky 50–100 cm a následně postříkat herbicidem. Účinek bývá vysoký, ale je třeba dbát zvýšené opatrnosti při pohybu strojů mimo zasaženou lokalitu (kousky lodyh a oddenků mohou zůstat přichyceny na

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

mechanizačním zařízení). K založení nového porostu křídlatek stačí kousek oddenku vážící 0,7g. Při chemické regulaci se doporučují herbicidy s obsahem glyfosátů (např. Roundup). Postřik se provádí většinou v srpnu až září. Před provedením postřiku je vhodné pokosení porostu křídlatky (červen) a následný postřik v době, kdy nově vzešlí jedinci dosahují 80 – 100 cm. Bodová aplikace Roundupu je doporučována na citlivých stanovištích. Koncentrace by v těchto případech neměla přesáhnout 50% a vhodná výška porostu by měla dosahovat 40 – 60 cm. Po první aplikaci je vhodné postřik opakovat po 2-3 týdnech. Suchá biomasa se pálí, nebo se nechá zetlít přímo na stanovišti nejlépe v igelitových pytlích. Z biologických způsobu by přicházelo okrajově v úvahu spásání, či využití některých druhů hmyzu, patogenních organismů či hub. Zde ale musí být vzata v úvahu rizika spojená s umělým rozšiřováním a množením těchto druhů (Háková a kol., 2003). Na Obr. 3. je zjednodušené schéma postupu při likvidaci křídlatek.

Ze zkušeností obyvatel obce Janovice v Moravskoslezských Beskydech byl k chemické likvidaci použit Roundup Biaktiv. Klasické metody jako kosení, vytrhávání apod. zde selhali. Z původních 70 lokalit (rok 1999) klesl stav na 48 (rok 2001) (Anonymus, 2006b).




Obr. 3. Schéma postupu při likvidaci křídlatek (převzato z Háková a kol., 2003)

Pro likvidaci křídlatky chemickou cestou jsou doporučovány tyto registrované přípravky: Bladex 50 (cyanazin 500 g/l), Casoron (dichlobenil 6,75%), Duplosan (dichlorprop-P 600 g/l), Duplosan (mecoprop-P 600 g/l), Granstar 75WG (tribenuron 75%), Harmony 75 DF (thifensulfuron 7n5%), Roundup (glyphosate 360 g/l), Roundup SG

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

(glyphosate 420 g/l), Roundup BIAKTIV (glyphosate - IPA 480 g/l), Starane 250 (fluroxypyr 250 g/l) (Šindlar a kol., 2003).

### 2.4. Využití křídlatky do budoucna

Podle literatury je možné využití křídlatky sachalinské a japonské jako hyperakumulátory v kontaminované Cd půdě. Uvádí se, že křídlatka sachalinská je schopna odčerpat z jednoho hektaru půdy za rok 1,3 kg Cd, 24 kg Pb, 322 kg Zn (Kužel, 2006).

Další možné využití je energetické. Jako nejperspektivnější se jeví křídlatka sachalinská, dosahující výnosů 50 - 60 t suché biomasy z 1 ha. Na rozdíl od přímého spalování suché hmoty, které není bez problémů, autor navrhuje výrobu bioplynu ze sklizené zelené biomasy jako technologii zcela bezodpadovou. Z 1 kg sušiny organické hmoty lze získat cca 280 - 320 l plynu (Kužel, 2006).

Ovšem při obou zmiňovaných využitích musíme mít pořád na mysli, že se jedná o velmi nebezpečný invazivní druh a tedy jakákoli práce s ním vyžaduje velkou opatrnost, dobrou informovanost a řadu již proběhlých testů a především promyslet každý krok.

V Německu byl registrován přírodní fungicidní přípravek Milsana, který obsahuje extrakt nadzemních částí křídlatky sachalinské. Milsana je především používána při ošetření houbové choroby (padlí) na okurkách. Způsoby působení při aplikování Milsany jsou sledovány v mnoha studiích (Věchet a kol., 2005; Martinková a kol., 2004; Wurms a kol., 1999; atd.).

Další oblastí využití, jak již bylo naznačeno v úvodu, je využití v přírodní medicíně. Jedná se především o využití extraktu z podzemních částí křídlatky japonské. Na našem trhu se již vyskytují potravinové doplňky, které tento extrakt obsahují. Např. Balancer Klas (při hormonální léčbě), REGRAPEX-R, Hepacept, ze zahraničních lze uvést např. Pomeratrol.

### 2.5. Rostlinné invaze

Tato oblast zájmu byla před lety pro mnohé z nás jen hodně vzdáleným tématem. Svůj podíl na tom měla jistě i tehdejší doba, kdy se o životním prostředí a dalších věcech moc nemluvilo. Lidé byli informováni jen částečně a tak pro mnohé je pojem invazní druh něčím zcela novým. V dnešní době, kdy se možnosti vyhledávání a získávání informací rozšířily i na elektronickou podobu a téměř každý má přístup k internetu a tedy i k nesčetným informacím, tak se zvyšuje i osvěta veřejnosti. Přibývá lidí, kteří již nejsou zcela lhostejní k problematice

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

invazních druhů rostlin a k životnímu prostředí všeobecně. Proto, aby mohla být pochopena podstata invazí, osvojíme si několik základních termínů a principů.

Všechny invazní druhy patří mezi druhy nepůvodní a v zájmovém území se ocitly v důsledku činnosti člověka. Migrací definujeme proces, kdy rostliny mění hranice svého rozšíření přirozenou cestou bez přispění člověka. Rozhodnout zda je určitý druh v daném území původní či ne, je velmi náročné a složité. Za původní bývá považován pouze takový druh, jehož výskyt na území nemá s činností člověka nic společného. Pokud byl nějaký druh rozšířen člověkem ještě před počátkem neolitu, řadíme takový druh také mezi původní. Nepůvodní rostliny můžeme dělit podle způsobu zavlečení na úmyslné či neúmyslné, podle míry zdomácnění (součástí nejen synantropní, ale i polopřirozené vegetace), nebo doby zavlečení. Toto hledisko je nejčastěji používáno. Rostliny zavlečené do konce středověku nazýváme archeofyty. Za neofyty považujeme ty, které se k nám dostaly až po objevení Ameriky (Pyšek a Tichý, 2001).

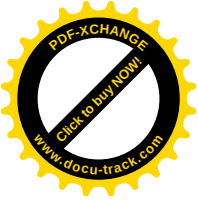
Invaze jako taková je proces, během něhož zavlečené druhy překonávají překážky a jednotlivé fáze tohoto procesu lze tudíž definovat pomocí bariér, jež se druhu podařilo překonat. Pokud rostlina překonala pomocí člověka hlavní geografickou bariéru, pak ji můžeme nazvat jako introdukovanou (zavlečenou). Za naturalizované druhy považujeme ty, které jsou bez zásahu člověka schopny v novém prostředí reprodukce. Invazní druhy jsou schopny se šířit na větší vzdálenosti, obsazovat dosažené lokality, pronikat na narušená či přirozená stanoviště a vytlačovat z nich domácí vegetaci (Pyšek a Tichý, 2001)

Na našem území je 2500 až 3000 původních druhů. Podíl zavlečených taxonů na flóře České republiky činí 33,4 %. Bylo zde identifikováno 332 archeofytů a 1046 neofytů. Většinu taxonů, celkem 892, je považována za náhodně se vyskytující, 397 za naturalizované a 90 za invazní (Pyšek a Sádlo, 2004).

### 2.6. Alelopatie

Každý jedinec se snaží zajistit si optimální podmínky pro svou existenci. Při tom dochází k interakci mezi jedinci, ostatními jedinci a prostředím.

Vzájemný vztah, kdy jedna rostlina ovlivňuje druhou se nazývá alelopatie a chemické látky, které komunikují s ostatními rostlinami a způsobují alelopatickou reakci jsou označovány jako alelochemikálie. Termín alelopatie byl vysloven Molischem v roce 1937 a je složen z řeckých slov allelon a pathos, což v překladu znamená navzájem a trpět (Chaichi a Edalati-Fard, 2005).



Za alelochemikálie jsou považovány mnohé sekundární metabolity, jako jsou fenoly, flavony, isoflavony, alkaloidy, saponiny, fytoalexiny, fytosteroly, terpeny, polyacetyleny, mastné kyseliny a další sloučeniny (Klejdus a Kubáň, 1999). Pokud jsou tyto látky produkovány mikroorganismy označují se jako antibiotika a pokud jsou produkovány vyššími rostlinami, pak mluvíme o fytoncidech (Kočárek, 2003).

Alelochemikálie jsou vylučovány především prostřenictvím výměšků podzemních částí, dále vyluhováním, vypařování, smyvem z nadzemních částí, při rozkladu rostlinných zbytků, a dalšími procesy (Ferguson a Rathinasabathi, 2003).

V současné době je alelopatie předmětem zájmů biologů, botaniků, biochemiků, zemědělců, a dalších vzhledem k možnosti využití alelochemikálií jako přirodních herbicidů, nebo jiných pesticidů (Khalid a kol., 2002).

Ve většině případů se alelopatické působení projevuje inhibičně. V některých případech byl však zaznamenán stimulační účinek. Byl proveden pokus s výluhy ze zelených a hnědých (mrtvých) listů běžných trav – ječmen myší, jílek vytrvalý, pýr plazivý a kostřava obrovská, kdy se zkoumal účinek na růst bakterií *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*. Výluhy ze zelených listů vesměs růst stimulovaly, z hnědých naopak inhibovaly (Laštůvka a Rypáček, 1986). Inhibiční účinek je zprostředkován produkcí chemických látek rostlinami s alelopatickými vlastnostmi. Vliv alelopatie se projevuje jednak zpomalením až inhibicí klíčení semen ostatních druhů rostlin nebo zpomalením až zastavením růstu a vývoje již vyklíčených rostlin. U některých druhů rostlin byl zjištěn autoinhibiční účinek, prostřednictvím kterého dochází k zabránění vyklíčení vlastních semen v dosahu matečné rostliny. Z těchto druhů lze jmenovat *Helianthus rigidus, Antennaria fallax, Aster macrophyllus, Erigeron pulchellus*, atd. (Laštůvka a Rypáček, 1986) Těmito mechanizmy si rostlina zajišťuje místo pro svou existenci. Experimentálně, v laboratorních podmínkách byla zjištěna alelopatie u celé řady druhů rostlin (viz např. rostliny uvedeny výše). V přírodě jsou poměry poněkud složitější, neboť některé chemické inhibitory mohou být v půdě inaktivovány adsorpcí na půdní koloidy (Mikulka a kol., 2006). V Tab. 1. jsou znázorněny příklady rostliny, které působí alelopaticky a jsou zde uvedeny alelochemikálie, které vylučují.

Bylo zjištěno, že při působení stresových faktorů se v těle rostliny zvyšuje obsah některých sekundárních metabolitů. Tyto metabolity díky svým fungicidním, antibakteriálním a antioxidačním vlastnostem chrání rostliny před poškozením (Vrchotová a kol., 2005c).

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

Stresové faktory mohou být způsobené jinými organismy vyvolané nadbytkem nebo nedostatkem chemických či fyzikálních činitelů (Piterková, 2004).

| Rostlina | Alelochemikálie |
|---|---|
| Datura stramonium L. | tropanové alkaloidy – hyoscyamin, skopolamin |
| Avena sativa L. | kyselina ferulová |
| Melilotus alba Desr. | kumarin |
| Medicago sativa L. | saponiny |
| Chenopodium ambrosioides L. | askaridol, alfa-terpinen, gamma-terpinen |
| Trianthema portulacastrum L. | kofein, kyselina ferulová |

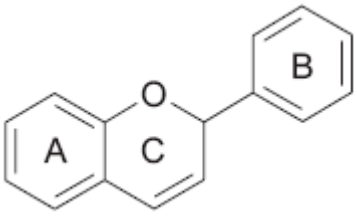
Tab. 1. Alelochemikálie produkované rostlinami (převzato z práce Khalid a kol., 2002)

## 2.7. Flavonoidní látky

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou velice rozsáhlou a různorodou skupinou rostlinných fenolů, jejichž výzkum v posledních letech značně vzrostl. V současné době je jich známo více než 4000 a stále se nacházejí další sloučeniny. Flavonoidy jsou významnou součástí antioxidačního systému, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty (železo, měď) (Dadáková, 2006).

### 2.7.1. Chemická struktura flavonoidů

Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu (Obr. 4.), tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Jedná se tedy o uspořádání $C_6 - C_3 - C_6$ (Velíšek, 1999). Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Rozeznáváme následující základní struktury flavonoidů: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavononoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny (Dadáková, 2006).




Obr. 4. Struktura flavanu

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

2.7.2. Účinky a výskyt flavonoidů

Působí jako silné antioxidanty (závislost na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosylace), významně mohou přispět při prevenci chorob majících svůj původ v oxidačním poškození biologických struktur (atheroskleróza, kardiovaskulární onemocnění), mají antikarcinogenní účinky. Vhodný způsob stravování a příjem potravin s vyšším obsahem flavonoidů by mohl pomoci při prevenci těchto chorob (Slanina a Táborská, 2004).

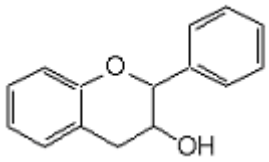
Obecně jsou přítomny ve všech rostlinách. Jejich množství a zastoupení se však liší. Ovlivňují charakteristické vlastnosti - barvu, vůni a chuť. Při zpracování rostlin se mohou dostávat do potravin. Můžeme je tedy nalézt v dřeních, čajích, šťávách, džusech, pivu, vínu, atd. (Škeříková a kol., 2004).

Jejich množství a zastoupení se však liší. Využití účinků flavonoidních látek jako např. přírodních fungicidů jsou již zmíněny v kap. 2.4.

## 2.8. Epikatechin

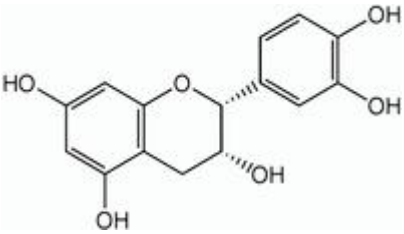
Epikatechin řadíme do již zmíněných flavonoidů, přesněji mezi flavan-3-oly (Obr. 5.), které mají na třetím uhlíku substituovanou hydroxylovou skupinu. Tyto chemické sloučeniny vznikají tzv. šikimátovou cestou (Obr. 9.).

Epikatechin (Obr. 6., 7.) spolu s katechinem, epikatechingallátem, pigalokatechinem, epigallokatechin gallátem tvoří tzv. skupinu katechinů (Obr. 8.). Katechin se od epikatechinu odlišuje pouze prostorovou izomerií (geometrická izomerie). Oba dva mají své optické izomery: (-) katechin, (+) katechin, (-) epikatechin, (+) epikatechin (Schröder, 2002). V přírodě se vyskytují (+) katechin a (-) epikatechin. V příloze 1. je ukázka spektra epikatechinu.

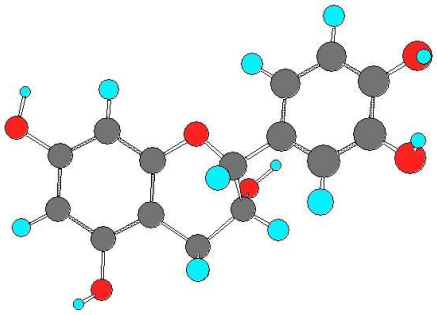



Obr. 5. Schématický vzorec flavan – 3 – olu

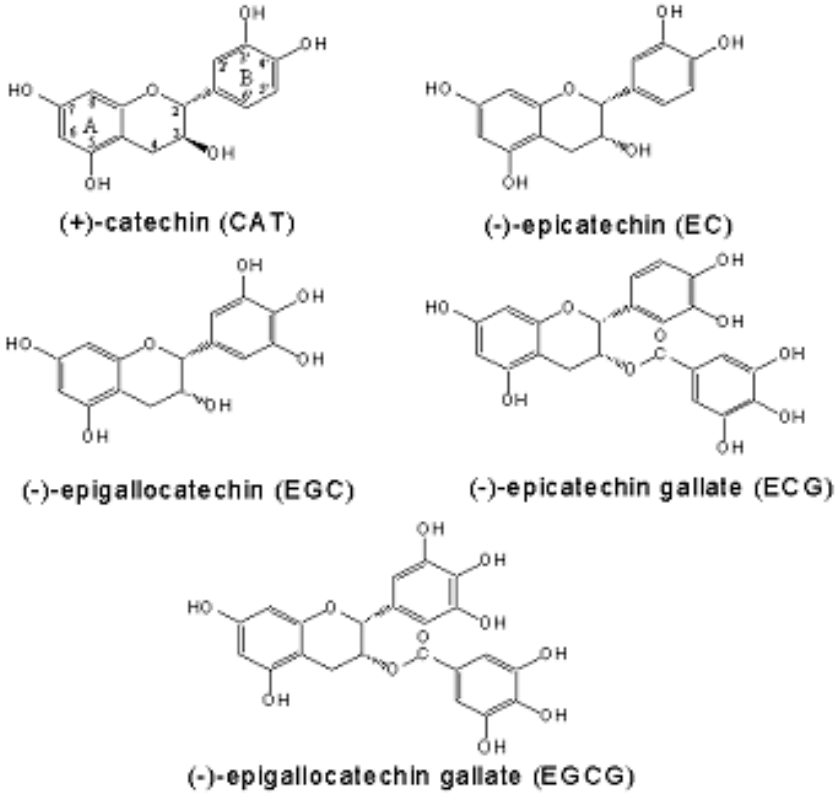
PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com




Obr. 6. Schématický vzorec epikatechinu

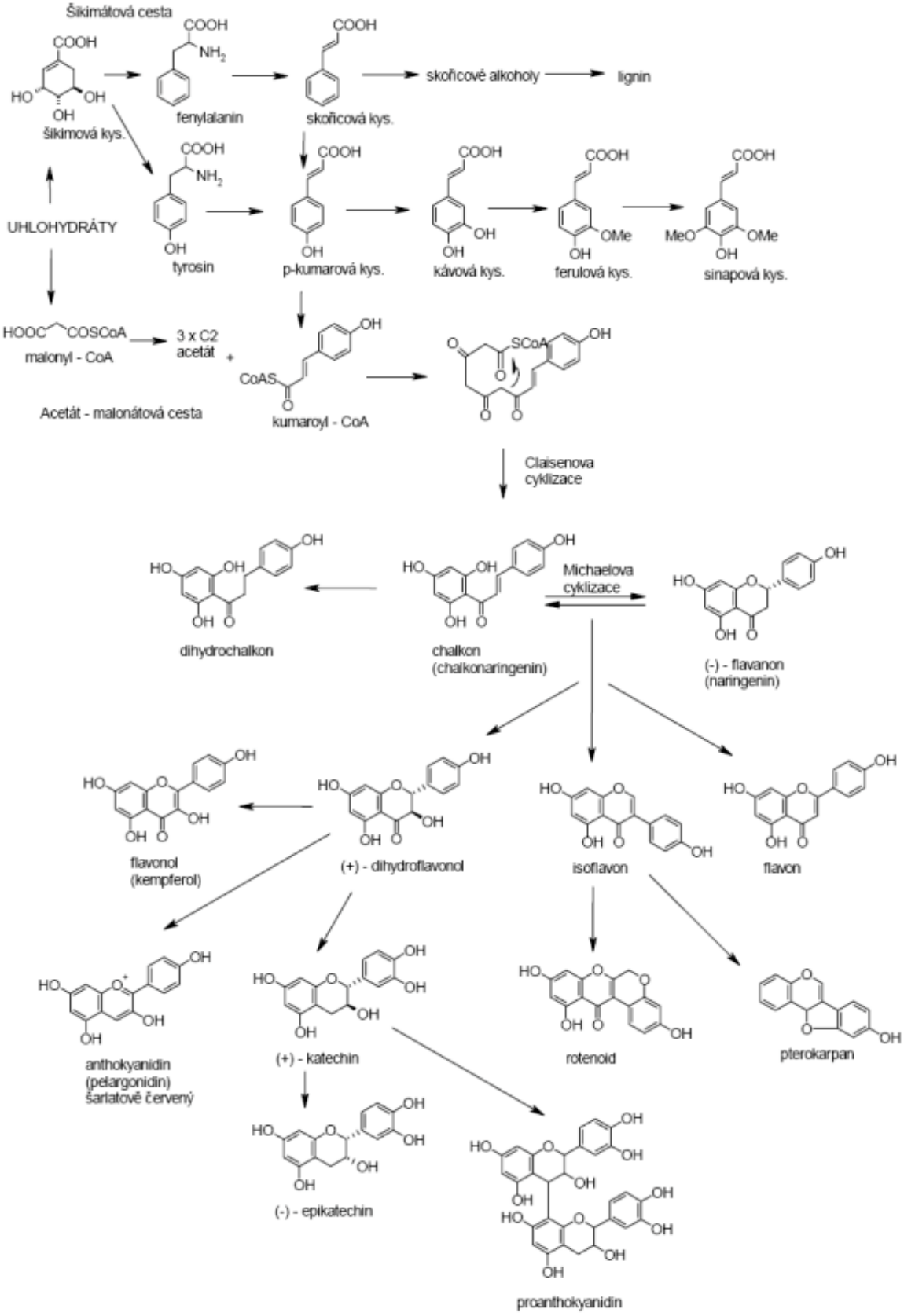


Obr. 7. Prostorový vzorec epikatechinu




Obr. 8. Strukturní vzorce katechinů

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com




Obr. 9. Šikimátova cesta vzniku rostlinných fenolických látek (převzatu z práce Hofta a kol., 2004)

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

2.8.1. Účinky a hlavní význam epikatechinu

Účinky můžeme rozdělit do dvou skupin:

- účinky na populace rostlin
- účinky na lidský organismus

Epikatechin se dostává s ostatními sekundárními metabolity do okolního prostředí a působí na klíčení a vývoj jiných druhů rostlin. Otázka, který ze sekundárních metabolitů je odpovědný za alelopatické vlastnosti křídlatek je nevyjasněná. Nemusí to být jen jedna látka. Navíc může docházet k synergickému účinku různých látek.

Na lidský organismus působí epikatechin antioxidačně, protinádorově, protizánětlivě, antimikrobiálně (Vrchotová a kol., 2005c).

2.8.2. Výskyt epikatechinu

Epikatechin je obsažen například v kakaovníku (*Theobroma cacao*) - zdroj kakaových bobů, ze kterých se vyrábí čokoláda. Podle Čopíkové (2001), bylo zjištěno množství (-)- epikatechinu v sušených kakaových bobech 1,6 – 2,75 g/100g a v pražených 0,03 – 0,05 g/100g. Zde se vyskytoval i optický isomer epikatechinu, tedy (+)- epikatechin.

Výskyt epikatechinu byl také prokázán v jablečných a vinných octech, které jsou bohatým zdrojem fenolových látek (Horáková a Jirovský, 2005). Všeobecně se vyskytuje též v pivě (slad, chmel), víně, jablkách, černém rybízu, ovoci, atd.

## 2.9. Extrakce rostlinných fenolických látek

Při extrakci záleží na polaritě sloučeniny. Polární látky extrahujeme z rostlinného materiálu polárními rozpouštědly (např. $H_2O$, ethanol, methanol, směs voda + alkohol). Méně polární látky extrahujeme např. dichlormethanem. Například při extrakci isoflavonoidů, které jsou málo polární, můžeme použít dimethylsulfoxid (Klejdus, 2004). Často se také používá Soxhletův extraktor.

Doba extrakce se v závislosti na použité extrakční kapalině a druhu vzorku pohybuje od několik minut až po několik dní. Účinnost extrakce závisí na zvoleném postupu, teplotě a intenzitě třepání.

Detekci hledaných látek nám umožňují přístroje jako např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, kapilární elektroforéza.

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com
PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

Extrakcí získáme celou řadu látek, které mají podobnou polaritu. Pokud chceme izolovat konkrétní látku, je třeba použít další způsoby čištění extraktu. Např. můžeme použít sorbci na tuhou fázi (SPE - Solid Phase Extraction, tenkovrstvá chromatografie). Dále je možné čištění na preparativním kapalinovém chromatografu, a pod. Na zakoncentrování a čištění slouží také extrakce metodou kapalina-kapalina. Je založena na izolaci a koncentrování cenných složek z vodných roztoků pomocí organických rozpouštědel (dichlormethan, ethylacetát, hexan, atd.) (Štulík, 2004).

SPE je extrakční postup, ve kterém se uplatňuje rovnováha mezi fází tuhou a kapalnou. Analyty, které nás zajímají ale i interferující látky jsou ve fázi kapalné. Jsou zadržovány na tuhém sorbentu, který je uložen ve speciálních SPE kolonkách nebo discích. Sorbent má větší zrnění než je tomu u kapalinové chromatografie, takže lze pracovat při nízkém podtlaku či přetlaku (Procházková, 2006).

Klejdus a Kubát (1999) se ve své práci zabývají extrakcí a izolací fenolických látek z rostlinného materiálu. Za vhodné extrakční metody považují extrakci pevnou fází (SPE) a extrakci tekutinou v nadkritickém stavu (SFE - Supercritical Fluid Extraction).

V práci Bajera a kol. (2005) bylo zkoumáno, která metoda je vhodná pro extrakci isoflavonoidů z rostlinného materiálu. Byla porovnána extrakce nadkritickou tekutinou (SFE), kde extrakčním médiem byl $CO_2$ (oxid uhličitý) a extrakce ultrazvukem. Při extrakci ultrazvukem došlo k velkému znečištění interferujících látek a extrakt musel být přečištěn přes SPE.

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

# 3. MATERIÁL A METODY

## 3.1. Botanický popis křídlatek

Křídlatka japonská - *Reynoutria japonica* /slovensky pohánkovec japonský (Obr. 10.)

Je to vytrvalá, až 3 m vysoká bylina. Lodyha přímá, dutá, obvykle červeně skvrnitá, nahoře větvená. Listy jsou světle zelené, vejčité, na vrcholu zúžené v dlouhou špičku, na bázi kolmo uťaté, listové čepele jsou až 15 cm dlouhé a 10 cm široké, chlupy na rubu listu nezřetelné, redukované na krátké papily. Květenstvím je lata mnohokvětých lichoklasů. Květy jsou malé, bílé až nazelenalé. Plodem je černá, lesklá, trojhranná nažka. Kvete začátkem července do konce října (Pyšek a Tichý, 2001).

Nejčastěji ji najdeme podél silnic, tratí, vodních toků, na ruderálních stanovištích, ale i v parcích a zahradách.

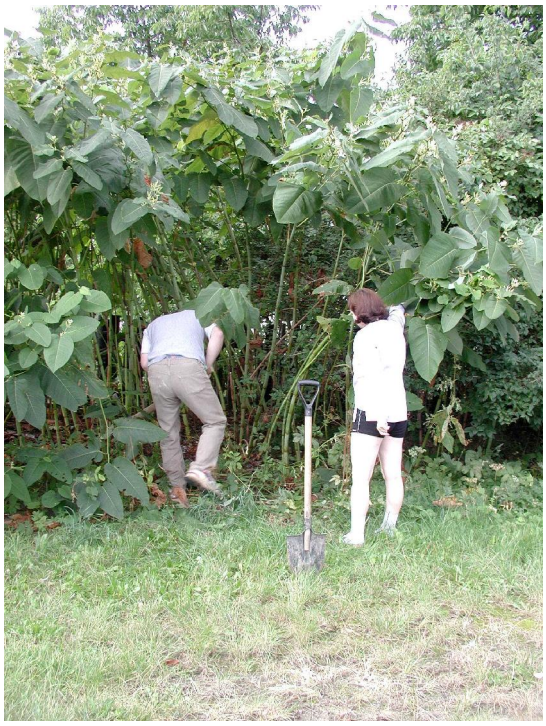
Obr. 10. Křídlatka japonská

Křídlatka sachalinská – *Reynoutria sachalinensis (F. Schmidt) Nakai* /slovensky pohánkovec sachalínský (Obr. 11.)

Tato jednoletá rostlina dorůstá výšky až 4 m, její lodyhy jsou duté, přímé, v horní části větvené. Listy podlouhle vejčité s delší špičkou, na bázi srdčité, tupý až zaokrouhlený vrchol, čepel dorůstá délky až 35 cm a šířky 20-25 cm. Na jejím rubu najdeme dlouhé chloupky, na bázi neztloustlé, které jsou jedním s důležitých rozlišovacích znaků. Drobné květy jsou zelenožlutě zbarvené a uspořádané v latách v lichoklasu. Kvete od července do října (Pyšek a tichý, 2001).

Roste především podél vodních toků, které umožňují výhodné šíření, dále obývá, tak jako předchozí druh stanoviště, která nejsou pravidelně obhospodařovaná.

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com



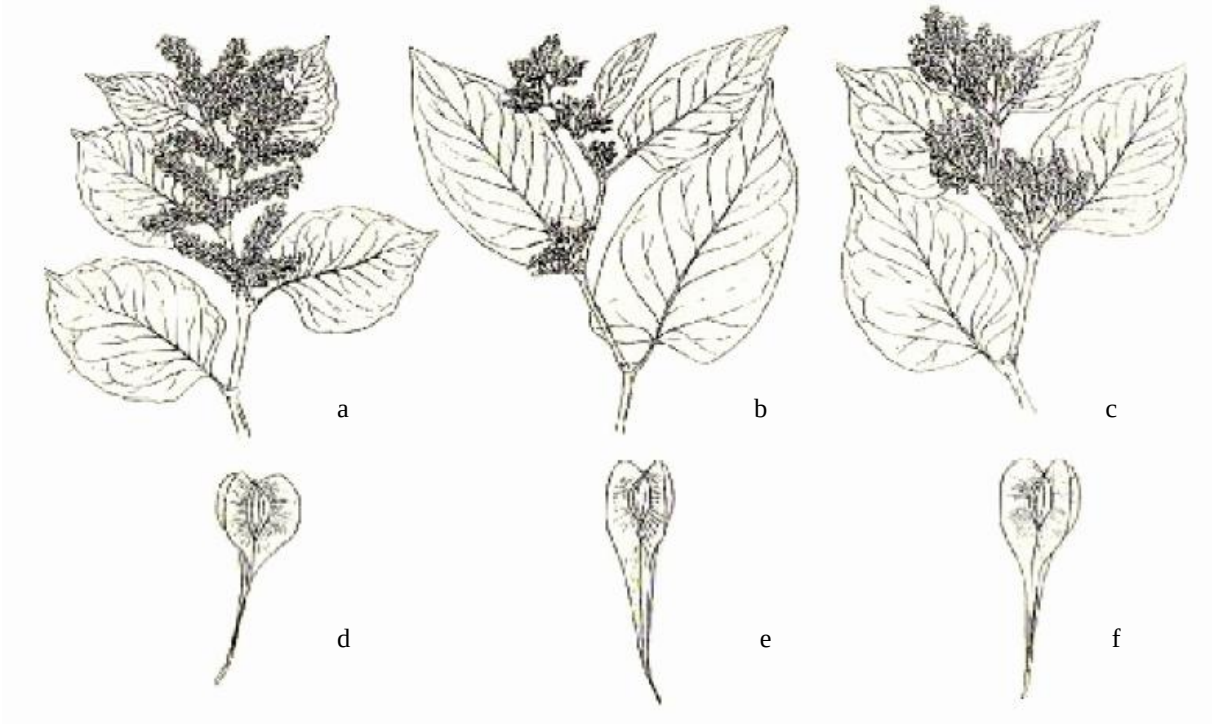
Obr. 11. Křídlatka sachalinská

Křídlatka česká - *Reynoutria* × *bohemica* /slovensky pohánkovec český (Obr. 12.)

Její determinace vyžaduje značné zkušenosti. Na rubu čepele má roztroušeně chlupy, které mají ztlustlou bázi, zřetelnou za použití lupy. Je mnohem odolnější vůči likvidaci a šíří se rychleji než rodičovské druhy (Pyšek a tichý, 2001). Na Obr. 13. jsou vidět některé determinační znaky zde popisovaných křídlatek. V příloze 2. jsou dále uvedeny determinační znaky mezi k. japonskou a sachalinskou.

Obr. 12. Křídlatka česká

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com




Obr. 13. Determinační znaky rodu Reynoutria (převzato z práce Mandák a kol., 1997)
listy a květenství: a – k. japonská, b – k. sachalinská, c – k. česká;
plody: d – k. japonská, e – k. sachalinská, f – k. česká

### 3.2. Lokality a odběry materiálu

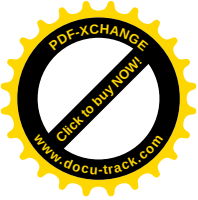
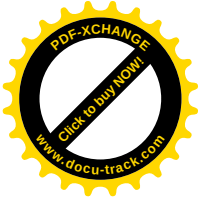
3.2.1. Lokality

*Pozemek Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v ulici Branišovská*

Pozemek se nachází v Českých Budějovicích a patří pod vedení Zemědělské fakulty Jihočeké univerzity, kde slouží pro vědecké pokusy. Nachází se na 48° 58' severní zeměpisné šířky a 14° 26' východní zeměpisné délky. Nadmořská výška je 388 m n. m. Expozice je JZZ, sklon do 3°. Klima je mírně teplé a vlhké s mírnou zimou, rovnoměrným rozdělením srážek v roce a v průměru s dostatkem srážek pro vegetaci. Roční srážkový úhrn je 550 – 700 mm.

Kultury jsou zde pěstovány ve smaltovaných nádobách o objemu 50 l ve standartním zahradnickém substrátu. Nejsou hnojeny ani nijak jinak ošetřovány, mají stejné abiotické (klimatické, edafické a topografické) i biotické podmínky (vliv člověka, mikroorganizmů, ožírání hmyzu, atd.)

Pro analýzu zde byly odebrány tyto rostlinné vzorky – kořeny a listy křídlatky japonské (září 2005), květy křídlatky sachalinské (září 2004), a listy křídlatky sachalinské, japonské a české (září 2004).

*Pozemek v areálu AV ČR na Sádkách v Českých Budějovicích*

Pozemek spadá pod správu Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR, kde slouží pro pěstování rostlinných kultur pro vědecké účely. Nachází se na 48° 58' severní zeměpisné šířky a 14° 27' východní zeměpisné délky. Nadmořská výška je shodná s předchozí lokalitou, tedy 388 m n. m. Expozice je JVV. Klima a srážkový úhrn stejný jako výše uvedené. Kontejnery s rostlinami jsou umístěny částečně na slunném a částečně na stinném místě.

Kultury jsou pěstovány v plastovém kontejneru o objemu cca 70 l ve standartním zahradnickém substrátu. Nejsou hnojeny ani nijak jinak ošetřovány, mají stejné abiotické i biotické podmínky jako v předchozím případě.

Z této lokality byly v září 2005 sebrány listy křídlatky japonské, sachalinské a české.

*Přírodní lokalita u Slavkova (Český Krumlov)*

Tato lokalita se nacházela na 48° 45' severní zeměpisné šířky a 14° 14' východní zeměpisné délky. Nadmořská výška je cca 780 m n. m.

V červnu 2005 zde byly sebrány kořeny křídlatky japonské.

Pěstované kultury na pozemku na Sádkách a Branišovské jsou odebrány z více lokalit (Tab. 2., Tab. 3.). Tím je zajištěna variabilita v rámci celého druhu. Všechny tři výše uvedené lokality jsou zobrazeny na mapě v příloze 3a, 3b.

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

| Druh | Lokalita | Datum |
|---|---|---|
| *Reynoutria japonica* | Rodvínov | září 2004 |
| | Struhařov<br>Mříč<br>Zlaté Moravce I.<br>Bratislava<br>Brno II. | říjen 2004 |
| *Reynoutria sachalinensis* | Kraskov | září 2004 |
| | Benešov | říjen 2004 |
| | Myšlín | červen 2005 |
| | Bystřice u Benešova<br>Slavkov<br>Trocnov | září 2005 |
| *Reynoutria* x *bohemica* | Kojčice<br>Kardašova Řečice | říjen 2004 |
| | Český Krumlov<br>Kolíňany<br>Nitra<br>Zlaté Moravce II.<br>Brno I. | říjen 2004 |
| | Ostrolovský Újezd | listopad 2004 |

Tab. 2. Odběry na kultivaci rostlin pro kontejnery na Sádkách

| červen 2003 | Obec | Stanoviště | Poznámka |
|---|---|---|---|
| Křídlatka japonská | Č. Budějovice | při levém břehu řeky Vltavy, blízko podniku Povodí Vltavy | hustý kompaktní porost, po povodni 2002 |
| | Slavkov | pod bytovkama | hustý kompaktní porost |
| | Č. Krumlov | při břehu řeky Vltavy, naproti restaurace U Matesa | regenerované porosty po povodni 2002 |
| Křídlatka sachalinská | Č. Budějovice | výpadovka na Č. Krumlov, vlevo u zahrádkářské kolonie | nyní systematicky ničeno |
| | Slavkov | u autobusové zastávky | hustý dlouhověký porost |
| | Trocnov | blízko železniční stanice, pěstováno jako živý plot u zahrady | hustý kompaktní porost |
| Křídlatka česká | Č. Krumlov | u ČAD a AGIP | jako plevel ve výsadbě zeleně |
| | Č. Krumlov | nad vinárnou U Báby, v trávníku | pravidelně koseno |
| | Č. Krumlov | nad vinárnou U Báby, na skalce | řídký porost v zastínění, nyní ošetřeno Roundupem |
| | Vlašim | mezi autobusovou a železniční zastávkou | hustý kompaktní porost |

Tab. 3. Odběry na kultivaci rostlin pro kontejnery na Branišovské

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

3.2.2. Sběr listů a květů

2005 – listy na Sádkách a Branišovské – ze všech kontejnerů (kde rostl stejný druh) sebrány listy, smíchány na místě, usušeny při laboratorní teplotě, rozemlety a ze sušiny připraven alkoholický extrakt. Sběr byl proveden dopoledne, kdy již není na listech rosa a zároveň ještě neprobíhají naplno asimilační procesy (fotosyntéza). Při sběru bylo suché, slunné počasí a byly sbírány jen na první pohled nepoškozené, zdravé listy.

2004 – listy a květy na Branišovské – z každého kontejneru zvlášť odebrány listy, usušeny při pokojové teplotě 48 hodin, rozemlety a připraveny jednotlivé extrakty (t.z. z každého kontejneru zvlášť extrakt).

3.2.3. Sběr podzemních částí

Nastříhané podzemní části byly rozděleny do dvou stejných homogenních částí (t.z. stejný poměr jak dužnaté, tak i dřevnaté části). Jedna část byla hned extrahována (čerstvý materiál byl před extrakcí rozstříhán na menší kousky o velikosti 1 – 2 cm). Druhá část byla sušena, rozemleta a pak extrahovaná.

**3.3. Příprava extraktů**

3.3.1. Sušený materiál (listy, květy, podzemní části)

- do zkumavky bylo naváženo 0,25 g rozemletého vzorku
- k němu byly přidány 3 ml 80% methanolu (v případě květů, listů z roku 2004, a podzemních částí z roku 2005, se jednalo o 90% methanol)
- průběžné protřepávání vzorku na třepačce po dobu 30 minut
- centrifugace při 3500 $ot.min^{-1}$ po dobu deseti minut
- odebrání supernatantu a přidání 1 ml extrakčního činidla, protřepání, odstředění a opět odebrání supernatantu
- zopakování předchozího bodu
- spojení všech supernatantů, odečet objemu
- extrakty uskladněny v mrazícím boxu při teplotě – 18°C až – 20°C

3.3.2. Čerstvý materiál – podzemní části

- rozstříhání na menší části
- sběr 30.9.2005 – 122,15g čerst. materiálu zalito 350 ml 90% MeOH (methanol)

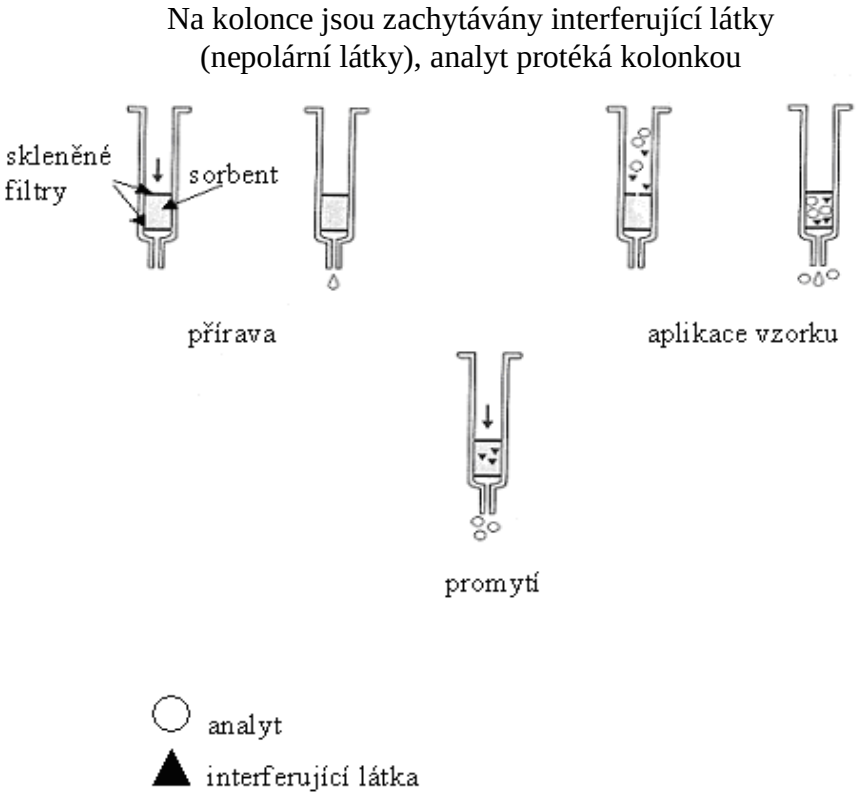
PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

- sběr 21.6.2005 – 19 g čerst. materiálu + 50ml 90% MeOH
- extrahováno po dobu 10 dní při laboratorní teplotě ve tmě
- každý den byly vzorky několikrát důkladně protřepány
- centrifugace a uložení extraktu do mrazícího boxu

3.3.3. Čištění extraktu přes kolonky

- před nanesením extraktu byla provedena aktivace SPE kolonky:
  - nanesení 5 ml 100% methanolu do kolonky
  - po protečení následovala aplikace stejného množství ale 80% methanolu
- nanesení 1 ml extraktu
- po protečení extraktu přes SPE kolonku byla kolonka promyta 2 x 1 ml 80% methanolu
- frakce, která protekla + eluát po promytí byly spojeny, protřepány a jejich objem upraven na 2 ml
- vzorky byly udržovány v mrazícím boxu do doby měření při teplotě – 18°C až – 20°C

Při této analýze byly použity SPE kolonky RP 18. Na nich byly zachyceny nepolární látky (např. chlorofyl). Schéma čištění přes kolonky je vidět na Obr. 14.




Obr. 14. Schéma čištění extraktu přes SPE kolonky

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

### 3.4. Měření extraktů na HPLC

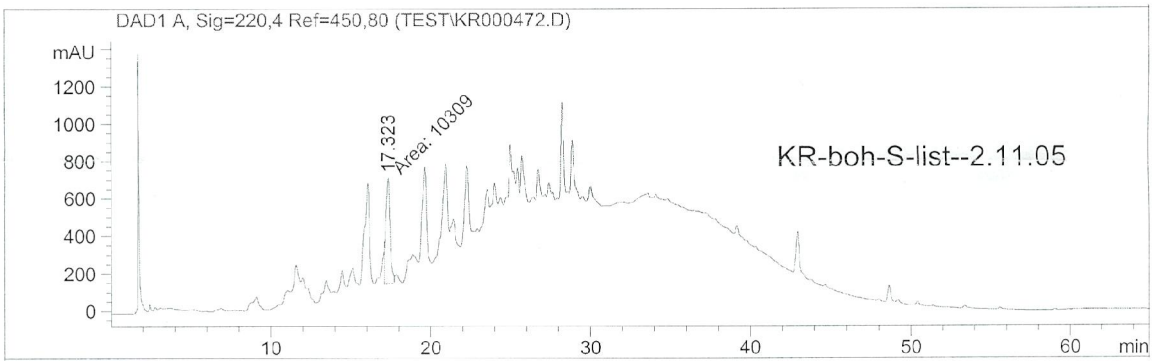
Podmínky separace:

Mobilní fáze A: 5% acetonitrilu, 0,1% ortofosforečné kyseliny, destilovaná voda. Mobilní fáze B: 80% acetonitrilu, 0,1% ortofosforečné kyseliny, destilovaná voda.

Pro měření byl použit tento gradient:

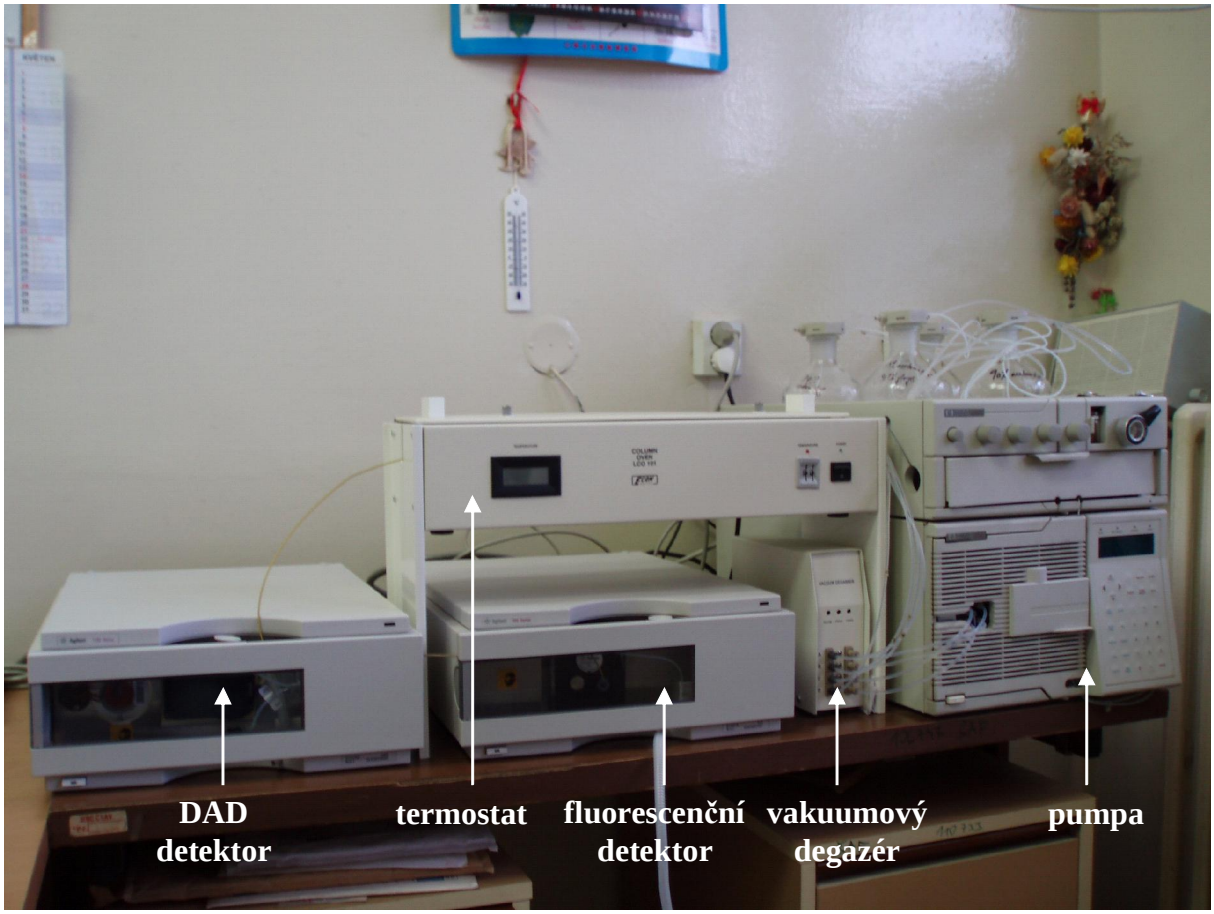
| | |
|---|---|
| 2% B – 50% B do 55. minuty<br>50% B – 90% B do 65. minuty | vlastní analýza |
| 90% B – 2% B do 70. minuty<br>10 minut při 2 % B | promývání |

Průtok byl 0,25 ml.min$^{-1}$. Dělení i s promýváním probíhalo při teplotě 25°C při zapojeném degazéru. Byla použita kolona C 18. Záznam byl proveden v celém rozsahu spektra – 190 až 600 nm. Epikatechin byl vyhodnocen při 220 nm. Koncentrace epikatechinu byla počítána podle kalibrační křivky naměřené podle čistého standardu. Ukázka chromatogramu s plochou epikatechinu je na Obr. 15. Schéma HPLC je zobrazeno na Obr. 16.




Obr. 15. Ukázka chromatogramu s identifikovaným vrcholem epikatechinu

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com




Obr. 16. Schéma HPLC

### 3.5. Testy toxicity

Cílem těchto testů bylo zjistit, jak epikatechin ovlivní klíčivost semen hořčice bílé. Aby mohl být experiment dostatečně statisticky vyhodnocen, bylo potřeba čtyř pokusů s testovaným roztokem čistého epikatechinu a dvěma kontrolami. Semena hořčice bílé byla vkládána podle šablony rovnoměrně do Petriho misek. V každé bylo 30 semen, tedy dohromady 180 semen na celý jeden experiment. Semena byla kultivována po dobu 48 hodin za stálé teploty (22°C) bez přístupu světla. Po uplynutí kultivační doby byla u každého semene změřena přesná délka kořene a hypokotylu a změřené hodnoty byly zaznamenány do připravených tabulek. Výsledeky byl statisticky vyhodnoceny (průměr, směrodatná odchylka a t-test na hladině významnosti p = 0,05).

*Postup testu:*

- 4 mg epikatechinu byly rozpuštěny v 8 ml MeOH
- do Petriho misky (průměr 9 ml) vložen filtrační papír (3 ks)
- rovnoměrně naneseny 2 ml roztoku epikatechinu, do kontrolních jen methanol
- po odpaření methanolu bylo do Petriho misky přidáno 6 ml destilované vody

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com
PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

- kultivace semen hořčice
- do každé Petriho misky bylo vloženo 30 semen
- kultivace (viz výše uvedený postup)

*Vyhodnocení testu:*

- zjištěn počet semen vyklíčených a nevyklíčených
- milimetrovým pravítkem změřena délka kořenu a hypokotylu v mm (pokud chyběl hypokotyl, ale byl znatelný kořen, u hypokotylu byla zapsána 0 a u kořene naměřená hodnota)
- pokud vůbec nevyklíčilo semeno do příslušné řádky byl zapsán křížek
- bylo též sledováno zda není přítomna na kultuře plíseň či hniloba

### 3.6. Použité chemikálie

Acetonitril – LiChrosolv (Merck)

Epikatechin (Aldrich)

85% o-fosforečná kyselina (Fluka)

Methanol – LiChrosolv (Merck)

Destilovaná voda

### 3.7. Použité přístrojové vybavení a laboratorní pomůcky

HPLC:
- Pumpa HP 1050 (Hewlett-Packard)
- Smyčka 5 µl
- DAD detektor Agilent 1100 (Hewlett-Packard)
- Termostat LCO 101 (Ecom)
- Vakuumový degazér (Ecom)
- Software – ChemStation
- Kolona Luna C 18 (2), 3 µm, rozměr kolonky 2 x 150 mm (Phenomenex)

SPE:
- Zařízení na SPE kolonky (Supelco) (příloha 4.)
- SPE kolonky LiChrolut RP 18 (40 – 63 µm), 200 mg (Merck)

Nožový mlýnek (příloha 5.)

Elektrická třepačka Shaker R5

Centrifuga T 62.2 (MLW Electronic)

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com
PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

Analytické váhy (Sartorius)

Petriho misky, milimetrové pravítko, pinzety, šablona, vialky, lžičky, mikrostříkačky, filtrační papíry (Mackerey – Nagel), kalibrační zkumavky, pipety, umělohmotné uzavíratelné nádobky, kádinky, alobal.

Semena hořčice bílé (příloha 6.)

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

# 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

## 4.1. Obsah epikatechinu v různých částech křídlatek

Dosažené výsledky jsou prezentovány v následujících tabulkách.

Tab. 4. Obsah epikatechinu v sušených listech [µg.g$^{-1}$] v roce 2005

| | Křídlatka česká | Křídlatka sachalinská | Křídlatka japonská | |
|---|---|---|---|---|
| Lokalita | Na Sádkách | Na Sádkách | Na Sádkách | Branišovská |
| | 2680 | 1700 | 1860 | 1720 |

Pozn. směsné vzorky

Tab. 5. Obsah epikatechinu v sušených listech [µg.g$^{-1}$] v roce 2004, lokalita Branišovská

| | Křídlatka česká | Křídlatka sachalinská | Křídlatka japonská |
|---|---|---|---|
| Obsah epikatechinu | 2090* | 1850** | 1300*** |
| SMODCH | 404 | 45 | 190 |
| RSD [%] | 19 | 3 | 15 |

*Průměr ze 2 kontejnerů
**Průměr ze 4 kontejnerů
***Průměr ze 3 kontejnerů
Pozn. SMODCH – směrodatná odchylka, RSD – relativní směrodatná odchylka

Tab. 6. Obsah epikatechinu v sušených listech [µg.g$^{-1}$] v roce 2002 (Vrchotová a kol., 2004)

| | Křídlatka česká | Křídlatka sachalinská | Křídlatka japonská |
|---|---|---|---|
| Lokalita* | Český Krumlov | Slavkov | Slavkov |
| | 816 | 1710 | 1390 |

*Přírodní lokalita - Slavkov, Český Krumlov
Pozn. průměrné hodnoty pěti lodyh z jedné lokality

Tab. 7. Obsah epikatechinu v nadzemních částech křídlatky sachalinské [µg.g$^{-1}$] v sušině, lokalita Branišov (rok 2004)

| | průměr | SMODCH | RSD [%] |
|---|---|---|---|
| květy | 1860 | 166 | 9 |
| listy | 1850 | 45 | 3 |

Z tabulek 4. – 6. je zřejmé, že nejméně kolísavý obsah epikatechinu byl zaznamenán u křídlatky sachalinské, která měla v roce 2005 a 2002 téměř shodný obsah epikatechinu okolo 1700 µg.g$^{-1}$ a rok 2004 se lišil jen nepatrně (8%). U hodnot křídlatky japonské a české jsou značné výkyvy, až 30% u křídlatky japonské, u křídlatky české až 70 %. U k. japonské mohl být tento výsledek způsoben rozdílnou lokalitou a kultivace v kontejnerech byly

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

zakládány v nestejný rok. Nízký obsah epikatechinu u k. české v roce 2002 (Tab. 6.) mohl být pravděpodobně způsoben několika příčinami, např. vysokou genetickou variabilitou křídlatky české. Lokalita se dále nacházela v zástinu a půda byla málo bohatá na živiny, naproti tomu rostliny pěstovány v kontejnerech mají mnohem lepší podmínky (slunné místo, živiny), a tak i tato skutečnost může mít vliv na rozlišný obsah epikatechinu v rostlinách. Další možností je, že lokalita byla ošetřena nějakým herbicidem, protože se nachází ve městě a křídlatky jsou v Českém Krumlově likvidovány. Při sběru rostlin nebyly zpozorovány žádné příznaky, které by naznačovaly, že je rostlina nějak poškozená. Herbicid ale mohl být v půdě již nějakou dobu, a působení na rostliny nemuselo být tedy hned patrné. Z toho vyplývá, že při odběru vzorků pro následné analýzy, je nutné, aby byla provedena i analýza půdy. Obsah epikatechinu v nadzemních částech křídlatky sachalinské v roce 2004 byl téměř shodný (Tab. 7.).

Tabulka 8. znázorňuje rozdílnost obsahu epikatechinu v suchých a čerstvých podzemních částech křídlatky japonské. V sušených vzorcích bylo naměřeno 1,5 x více epikatechinu než v čerstvém materiálu (vše přepočítáno na čerstvý materiál). Je to pravděpodobně způsobeno především probíhajícími biochemickými procesy při zpracování živého rostlinného materiálu, zřejmě dochází k degradaci epikatechinu. V porovnání obsahu epikatechinu v čerstvých podzemních částech k. japonské z roku 2002 (Vrchotová a kol., 2005), kdy bylo naměřeno 946 $\mu g.g^{-1}$(čerst. materiálu), se tato hodnota téměř neliší (5%) od hodnot naměřených v roce 2005 (průměr. 897,5 $\mu g.g^{-1}$). V práci Vrchotová a kol., 2005, byl stanoven obsah epikatechinu i v podzemních částech k. sachalinské, kdy byla naměřena hodnota 631 $\mu g.g^{-1}$(čerst. materiálu), a v porovnání s k. japonskou tedy nižší (33%).

Výsledky u čerstvého materiálu nebyly ovlivněny datem sběru ani lokalitou. Je zřejmé, že velmi záleží na tom jaký materiál zpracováváme (čerstvý x sušený). U listů nebyly podobné pokusy zatím provedeny. Bylo by vhodné podobné pokusy do budoucna udělat.

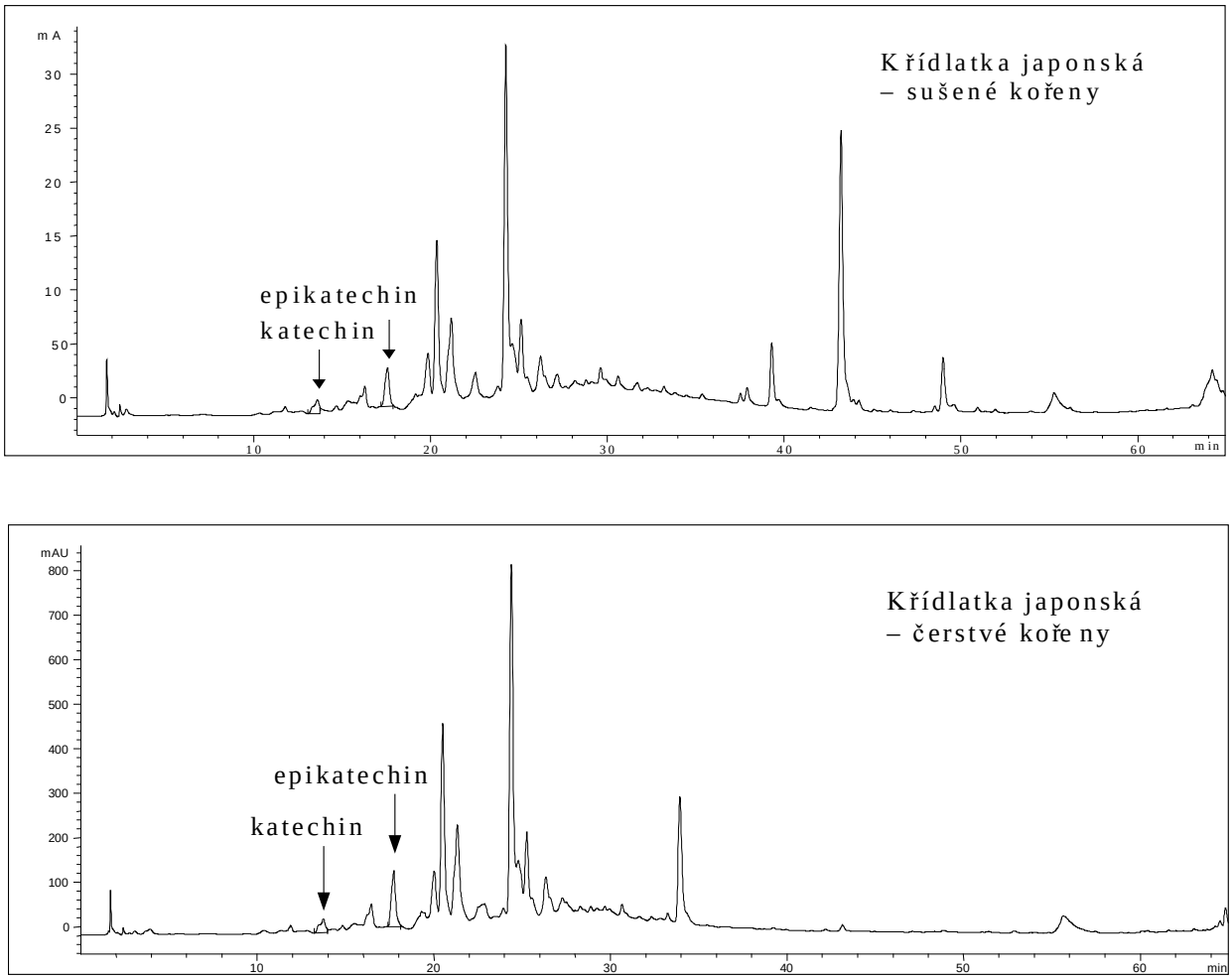
Tab. 8. Obsah epikatechinu v podzemních částech křídlatky japonské [$\mu g.g^{-1}$] čerstvého materiálu

| Podzemní části | | epikatechin [$\mu g.g^{-1}$ čerst. materiálu] | poměr čerst. / suš. |
|---|---|---|---|
| čerstvé | 21.6.2005 | 887 | |
| sušené | | 1290 | 4,17 |
| čerstvé | 30.9.2005 | 908 | |
| sušené | | 1681 | 2,42 |

Pozn. Sběr 21.6.2005 – přírodní lokalita u Slavkova
Sběr 30.9.2005 – rostliny pěstovány v kontejnerech – Branišovská

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com

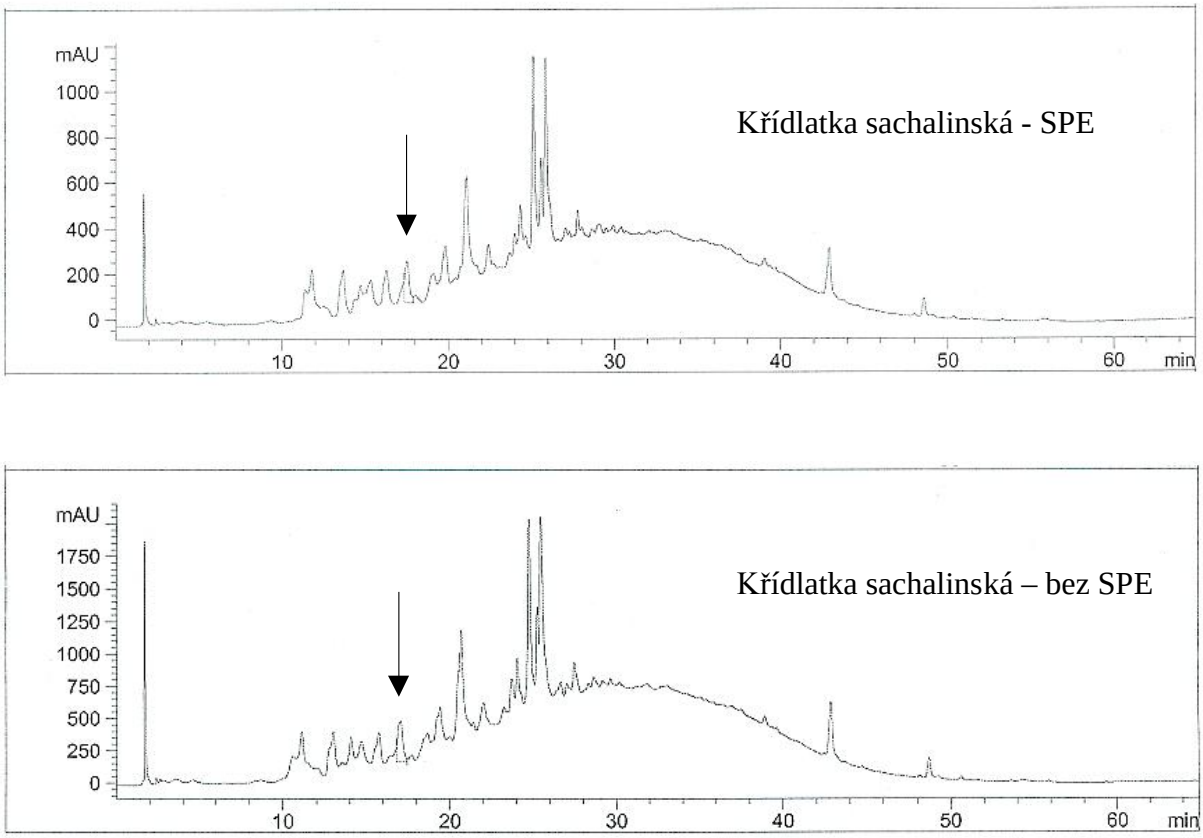
Na chromatogramech (Obr. 17.) je vidět, jak se lišil chromatografický profil a zastoupení látek v čerstvém a sušeném vzorku. Z počátku analýzy byl profil podobný, ke konci, kdy se začali oddělovat méně polární látky, byl již zaznamenán velký rozdíl. Dále je zde označen katechin, který se v křídlatkách také vyskytuje.




Obr. 17. Chromatogramy podzemních částí křídlatky japonské, šipky označují vrcholy katechinu a epikatechinu

Další otázkou bylo, zda detekci epikatechinu nezlepší přečištění extraktů přes SPE kolonky. Na chromatogramech (Obr. 18.) je ale zřejmé, že není potřeba vzorky takto upravovat a můžeme je přímo analyzovat . Spočítaná odchylka mezi nečištěnými a čištěnými vzorky je v průměru 12 % (přičemž odchylka metody je kolem 10%). Kromě toho čištění přes SPE je finančně náročné.

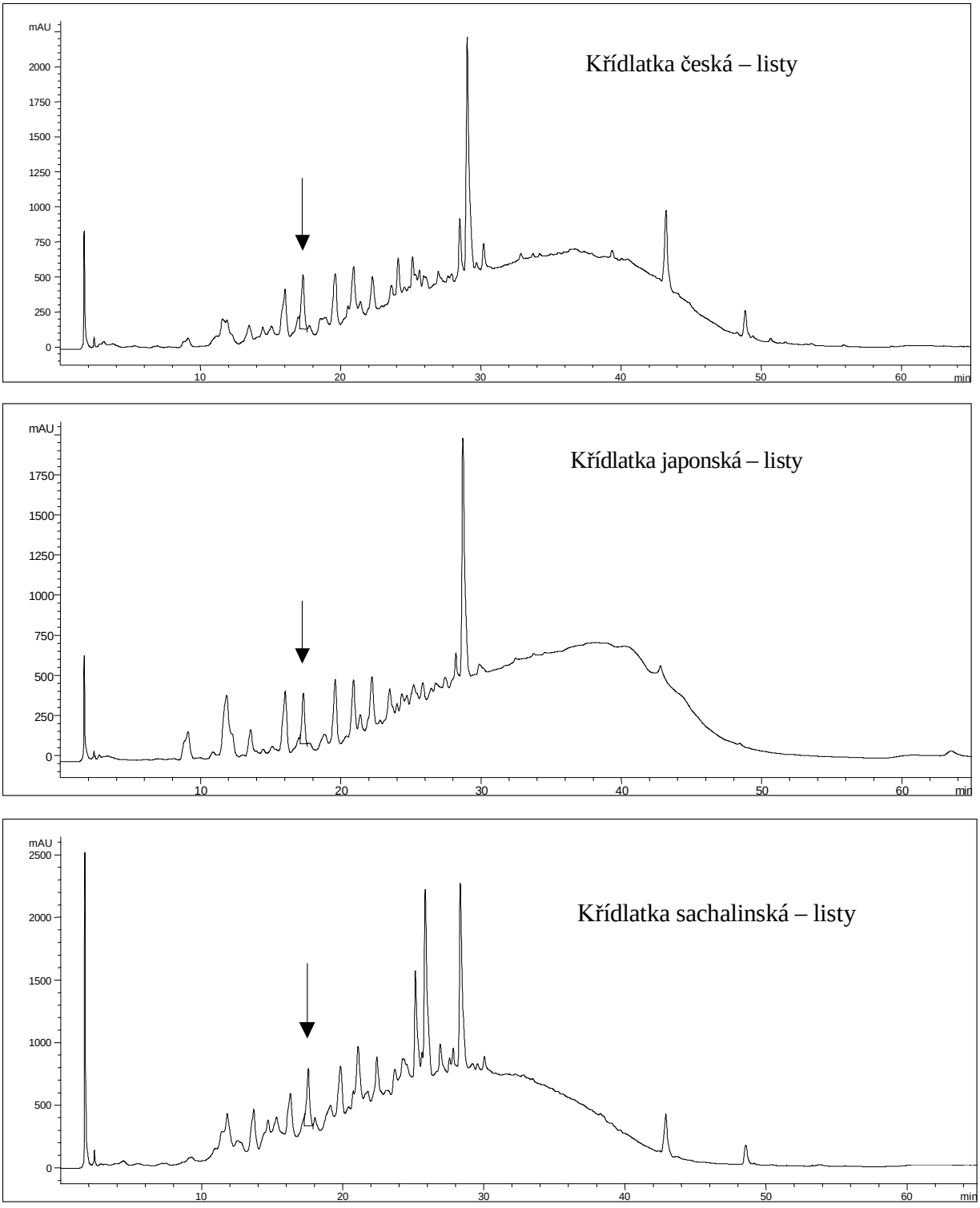
PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com




Obr. 18. Šipky označují vrchol epikatechinu, jedná se o listy z roku 2005

Při pohledu na chromatogramy na Obr. 19. je vidět, jak se liší chromatografický profil jednotlivých druhů křídlatek.

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com

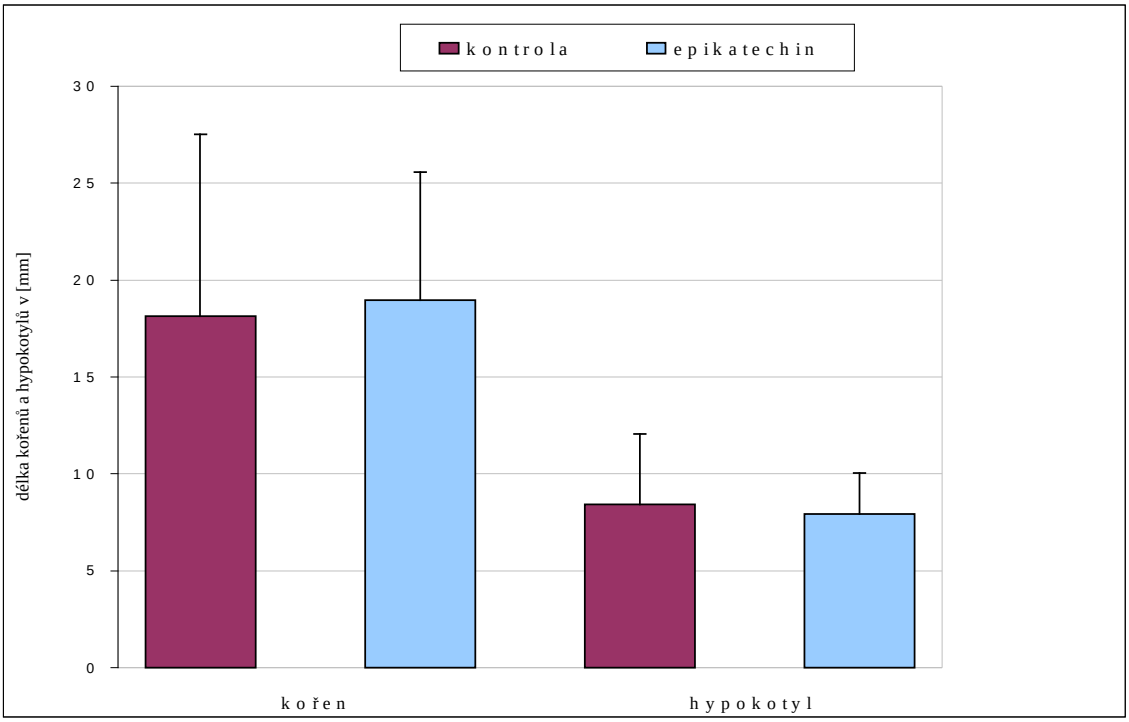



Obr. 19. Chromatogramy listů křídlatky české, japonském a sachalinské z roku 2004

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com

## 4.2. Testy toxicity

Při vyhodnocení vlivu epikatechinu na klíčivost semen hořčice bílé, se kontrola výrazně nelišila od testovaného vzorku epikatechinu ( Obr. 20.). Při testu toxicity byla použita pouze jedna koncentrace epikatechinu, a tedy nelze s jistotou říci, zda působí alelopaticky, či nikoli. K tomu by bylo zapotřebí udělat další testy s různými koncentracemi epikatechinu.




Obr. 20. Vliv epikatechinu na klíčivost semen hořčice bílé

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

# 5. ZÁVĚR

Jednotlivé druhy křídlatek a jejich části se mezi sebou lišily obsahem epikatechinu. Nejvíce ho obsahovala křídlatka česká v r. 2005, a to v listech až 2680 $\mu g.g^{-1}$ sušiny. Obsah epikatechinu byl ve všech křídlatkách variabilní (nejvíce v k. české), záleželo na lokalitě a roce odběru. V listech a květech křídlatky sachalinské se jeho obsah pohyboval kolem 1855 $\mu g.g^{-1}$ sušiny.

V čerstvých podzemních částech křídlatky japonské nebyly výsledky ovlivněny dobou sběru, ani lokalitou sběru (kontejner x přírodní lokalita). Rozdíl byl zaznamenán v případě sušených podzemních částí k. japonské. Mohl být způsoben jak pozdějším sběrem, tak i pěstebními podmínkami. Velmi výrazný rozdíl byl mezi sušeným a čerstvým vzorkem. Obsah epikatechinu v sušeném materiálu byl až 1,5x vyšší než v čerstvých kořenech. Je tedy zřejmé, že velmi záleží na zpracování extraktů. U listů nebyly podobné pokusy zatím provedeny. Bylo by vhodné podobné pokusy udělat.

Zjištěné výsledky o obsahu epikatechinu v křídlatkách nelze plnohodnotně srovnat s dalšími studiemi jiných autorů vzhledem k tomu, že data o epikatechinu v křídlatkách v odborné literatuře doposud chybí. Proto cituji pouze výsledky publikované v pracích Vrchotová a kol., (Vrchotová a kol., 2004, 2005a, 2005b), které se již tímto tématem zabývají.

Při testu toxicity byla použita pouze jedna koncentrace epikatechinu, a tedy nelze s jistotou říci, zda působí alelopaticky, či nikoli. K tomu by bylo zapotřebí udělat další testy s různými koncentracemi epikatechinu.

V literární rešerši jsou uvedeny možné způsoby likvidace a omezení šíření invazních rostlin, především křídlatek. Nové způsoby zatím nejsou známy a jsou aplikovány pouze ty již zmíněné. Při likvidaci se osvědčilo spojení mechanického (vyrýpávání kořenů) s chemickým způsobem (použití herbicidu). Z hlediska omezování šíření invazních druhů rostlin je velmi důležitá informovanost veřejnosti o této problematice a neméně důležitý je i pravidelný monitoring a prevence. Podle zákona č. 326/2004 Sb. o rostlinolékařské péči provádí monitoring rostlinolékařská správa.

Využití flavonoidních látek v zemědělství je stále ještě ne zcela probádanou oblastí. Přesto se již komerčně vyrábí přípravek na ochranu rostlin Milsana, který se vyrábí z křídlatky sachalinské (ochrana okurek před padlím). Tento přípravek nepůsobí přímo fungicidně, ale vyvolává v rostlinách obranné reakce a má tak obdobný účinek jako Benomyl (účinná pesticidní látka). Přesné chemické složení přípravku není publikováno.

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

# 6. LITERATURA

Bajer T., Adam M., Eisner A. a Ventura K. (2005): Extrakce fytoestrogenů z rostlinného materiálu a jejich stanovení. In: Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2005 & Chiranal 2005: sborník [abstraktů z konference]: Olomouc, 7. až 10. února 2005 / [editoři Aleš Gavenda, Juraj Ševčík]. 1. vyd.. Olomouc: Univerzita Palackého, 145 p.

Bímová, K., Mandák, B. a Pyšek, P. (2003): Experimental study of vegetative regeneration in four invasive *Reynoutria* taxa (Polygonaceae). Plant Ecology 166: 1 – 11 p.

Čopíková, J. (2001): Čokoláda a zdraví. Chem. Listy 95, 610 – 615 p.

Hofta, P., Dostálek a P., Basařová, G. (2004): Xanthohumol – chmelová pryskyřice nebo polyfenol? Chem. Listy 98, 825 – 830 p.

Horáková, D. a Jirovský, D. (2005): Analýza fenolických látek v ovocných octech. In: Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2005 & Chiranal 2005: sborník [abstraktů z konference]: Olomouc, 7. až 10. února 2005 / [editoři Aleš Gavenda, Juraj Ševčík]. 1. vyd.. Olomouc: Univerzita Palackého, 145 p.

Chu, K. O., Wang, C. C., Chu, C. Y., Chan, K. P., Rogers, M. S., Choy, K. W. a Pang, C. P. (2006): Pharmacokinetic studies of green tea catechins in maternal plasma and fetuses in rats. J Pharm Sci. 95(6): 1372 – 1381 p.

John, K. M., Vijayan, D., Rahul, P. R., Joshi, S. D., Kumar, R. R. a Mandal, A. K. (2006): Electrofocusing of methanolic extracts for identification of individual flavonol biomolecules in camellia species. J Agric Food Chem. 54(8): 2828 – 2831 p.

Kára, J., Strašil, Z., Hutla, P. a Usťak, L. (2005): Energetické rostliny: technologie pro pěstování a využití. Praha: Výzkumný ústav zemědělské techniky, 80 p.

Khalid, S., Ahmad, T. a Shad, R. A. (2002): Use of Allelopathy in Agriculture. Asian Journal of Plant Sciences. Volume 1 (3): 292 – 297 p.

Kimura, Y., Okuda, H. a Kubo, M. (1995): Effects of stilbenes isolated from medicinal plants on arachidonate metabolism and degranulation in human polymorphonuclear leukocytes. J Ethnopharmacol. 1995 Feb;45(2): 131 – 139 p.

Klejdus B. (2004): Separace a identifikace isoflavonoidů v rostlinném materiálu. Habilitační práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci na katedře Analytické chemie. 51 p.

Klejdus, B. a Kubáň, V. (1999): Rostlinné fenoly v allelopatii. Chem. Listy 93, 243 – 248 p.

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com
PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

Laštůvka, Z. a Rypáček, V. (1986): Koakce a kompetice vyšších rostlin. 1. vyd.. Praha: Academia, 206 p.

Le Bourvellec, C., Le Quere, J. M., Sanoner, P., Drilleau, J. F. a Guyot, S. (2004): Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by procyanidins and polyphenol oxidation products. J Agric Food Chem. 52(1): 122 – 130 p.

Lee, C. H., Kim, S. I., Lee, K. B., Yoo, Y. C., Ryu, S. Y. a Song, K. S. (2003): Neuraminidase inhibitors from *Reynoutria elliptica*. Arch Pharm Res. 26(5): 367 – 374 p.

Mandák, B., Pyšek P. a Bímová K. (2004): History of the invasion and distribution of *Reynoutria* taxa in the Czech Republic: a hybrid spreading faster than its parents. Preslia, Praha, 76: 15 – 64 p.

Mandák, B., Pyšek, P., Lysák, M., Suda, J., Krahulcová, A. a Bímová, K. (2003): Variation in DNA-ploidy Levels of Reynoutria Taxa in the Czech Republic. Ann Bot (Lond). Aug; 92(2): 265 – 72 p.

Mandák, B. a Pyšek, P. (1997): Druhy rodu Reynoutria na území České republiky. In: Zprávy Čes. Bot. Společ. – Invazní rostliny v české flóře. Praha, 45 – 57 p.

Martinková, J., Věchet, L., Šindelářová, M. a Burketová, L. (2004): Compounds of natural origin as inducers of systemic aquired resistance to powdery mildew in wheat. Acta fytotechnica et zootechnica, Vol. 7, Special Number, Proceedings of the XVI. Slovak and Czech. Plant Protection Conference organised at Slovak Agricultural University in Nitra, Slovaki. 193 – 195 p.

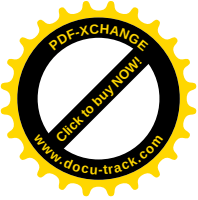
Novotná, D. (2001): Úvod do pojmosloví v ekologii krajiny. Praha: Ministerstvo životního prostředí: Enigma, 399 p.

Piterková, J. (2004): Úloha enzymů v oxidativním stresu rostlin. Olomouc. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci na katedře biochemie. Vedoucí bakalářské práce Lenka Luhová. 56 p.

Pyšek, P., Brock, J. H., Bímová, K., Mandák B., Jarošík, V., Koukolíková, I., Pergl, J. a Štěpánek, J. (2003): Vegetative regeneration in invasive *Reynoutria* (Polygonaceae) taxa: the determinant of invasibility at the genotype level. American Journal of Botany. 90: 1487 – 1495 p.

Pyšek, P. a Sádlo, J. (2004): Zavlečené rostliny – jak je to u nás doma? Vesmír, 83 (2). 80 – 85 p.

Pyšek, P. a Tichý, L.(2001): Rostlinné invaze. 1. vyd.. Brno: Rezekvítek, 40 p.



Slanina, J. a Táborská, E. (2004): Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. Chem. Listy 98, 239 – 245 p.

Škeříková, V., Grynová, L. a Jandera, P. (2004): Využití coulometrického detektoru CoulArray pro analýzu přírodních antioxidantů. Chem. Listy 98, 343 – 348 p.

Štulík, K. a kol. (2004): Analytické separační metody. 1. vyd.. Praha: Karolinum, 263 p.

Velíšek, J. (1999): Chemie potravin. 3. Vyd. 1.. Tábor: OSSIS, 342 p.

Věchet, L., Martinková, J., Šindelářová, M. a L., Burketová (2005): compounds of natural origin inducing winter wheat resistance to powdery mildew ( Blumeria graminis f.sp. tritici). Plant soil environ., 51 (10): 469 – 475 p.

Vrchotová, N., Šerá, B., Tříska, J., Dadáková, E. a Kužel, S. (2004): Phenolic compounds in the leaves of *Reynoutria* Houtt. genus. In: Hoikkala A. & Soidinsalo O. (eds), Polyphenols communications 2004, XXII. International Conference on Polyphenols, 25 – 28 August, Helsinky, Finland. 811 – 812 p.

Vrchotová, N., Šerá, B. a Tříska, J. (2005a): Dominant phenolic compounds in ruderal species of *Reynoutria* and *Impatiens*. 13th EWRS Symposium, Bari – Italy, 19. – 23. June 2005, abstract No. 030, full text on CD.

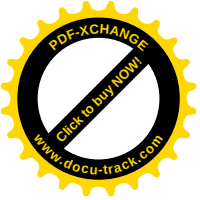
Vrchotová, N., Šerá, B., Tříska, J., Dadáková, E. a Kužel, S. (2005b): Biologically active compounds as possible cause of invasibility of knotweeds (*Reynoutria* spp.) from eastern Asia. In: Alford D.V. & Backhaus G.F. (eds), BCPC symposium proceedings No. 81, Plant protection and plant health in Europe: Introduction and spread of invasive species, Page Bros, Norwich. 289 – 290 p.

Vrchotová, N., Šerá, B. a Tříska., J. (2005c): Fenolické látky v oddencích křídlatky japonské a křídlatky sachalinské. Zprávy Čes. Bot. Společ., Praha, 40, Mater. 20: 147 – 152 p.

Wang, C. Z., Fishbein, A., Aung, H. H., Mehendale, S. R., Chang, W. T., Xie, J. T., Li, J. a Yuan, C. S. (2005): Polyphenol contents in grape-seed extracts correlate with antipica effects in cisplatin-treated rats. J Altern Complement Med. 11(6): 1059 – 65 p.

Wurms, K., Labbé, C., Benhamou, N. a Bélanger, R. R. (1999): Effects of Milsana and Benzothiadiazole on the Ultrastructure of Powdery Mildew Haustoria on Cucumber. Phytopathology 89: 728 – 736 p.

Zhang, X., Thuong, P. T., Jin, W., Su, N. D., Sok, D. E., Bae, K. a Kang S. S. (2005): Antioxidant activity of anthraquinones and flavonoids from flower of Reynoutria sachalinensis. Arch Pharm Res. 28(1): 22 – 27 p.



Anonymus. (2004a): Plán péče o Chráněnou krajinnou oblast Český ráj [online]. [cit. 24.4.2006]. <http://www.chkocr.cz/doc/planpece_cr.pdf>

Anonymus. (2006b): Likvidace křídlatky [online]. [cit. 24.4.2006]. <http://web.telecom.cz/oujanovice/wpages/obec.html>

Bímová, K. (2002): Efektivnost metod likvidace taxonů Reynoutria - komparativní studie [online]. [cit. 24.4.2006]. <http://www.volny.cz/kmoravkova/head3.htm>

Dadáková, E. (2000): Flavonoidy [online]. [cit. 20.3.2006]. <http://home.zf.jcu.cz/~dadakova/>

Ferguson, J. J. a Rathinasabathi, B. (2003): Allelopathy: how plants supress other plants [online]. [cit. 20.3.2006]. <http://edis.ifas.ufl.edu>

Heuer, H., Reinhard, N. a Kärcher, H. (2002): Problem – Neophyten [online]. [cit. 19.4.2006]. <www.bachpaten-freiburg.de/oekologi/neophyt/japan.pdf>

Háková, A. a kol. (2003): Zásady péče o nelesní biotopy v rámci soustavy NATURA 2000 [online]. [cit. 19.4.2006]. <http://www.usbe.cas.cz/people/kucera/HABIT/management.pdf>

Chaichi, M. R. a Edalati-Fard, L. (2005): Evaluation of Allelopathic Effects of Root Extracts of Soybean, Sorghum and Sunflower on Two Chickpea Cultivars (Kaka and Piroz). Journal of Agronomy [online]. [cit. 20.4.2006]. <www.ansinet.org/papers/43-JA.pdf>

Kočárek, E. (2003): Vybrané kapitoly z lékařské ekologie a parazitologie [online]. [cit. 15.4.2006]. <http://ublg.lf2.cuni.cz/VYUKA/DOC/Ekologie2003.doc>

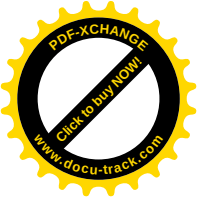
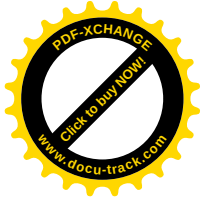
Kužel, S. (2006): Využití rostlin rodu Reynoutria k dekontaminaci půdy a možnosti jejich energetického využití [online]. [cit. 24.4.2006]. <http://stary.biom.cz/mag/19.html>

Mikulka, J., Chodová, D. a Martinková, Z. (2006): Plevele a jejich regulace [online]. [cit. 25.3.2006]. <http://www.vurv.cz/weeds/cz/druhy/03.html>

Procházková, D. (2006): Extrakce na tuhou fázi. [online]. [cit. 24.3.2006]. <http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Europe_Home/Czech_Republic/Informace_o_produktech/Chromatografie/SPE.html>

Schröder, P. (2002): Die biologische Bedeutung des Flavonoids Epicatechin im Schutz vor Peroxynitrit [online]. [cit. 24.4.2006]. <www.ulb.uni-duesseldorf.de/ diss/mathnat/2002/schroeder.pdf>

Šindlar, M. a kol. (2003): Metody regulace invazních druhů rostlin. Příloha č. 4 [online]. [cit. 19.4.2006].

<http://gis.kr-kralovehradecky.cz/file/projekty/ochrana_prirody/priloha_4.pdf>

Zákon č. 326/2004 o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů [online]. [cit. 19.4.2006]. <http://www.mvcr.cz/sbirka/2004/zakon_05.html>

Pozn.

Obrázky křídlatky japonské a sachalinské byly zapůjčeny paní Vrchotovou Naděždou. Obrázek křídlatky české byl převzat z: <http://gallery.cs.umb.edu/gallery/giantknotweed> [cit. 10.4.2006].

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com
PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

# 7. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Ukázka spektra epikatechinu

Příloha 2 – Determinační znaky křídlatky japonské a křídlatky sachalinské

Příloha 3a, 3b – Lokality sběru vzorků křídlatek

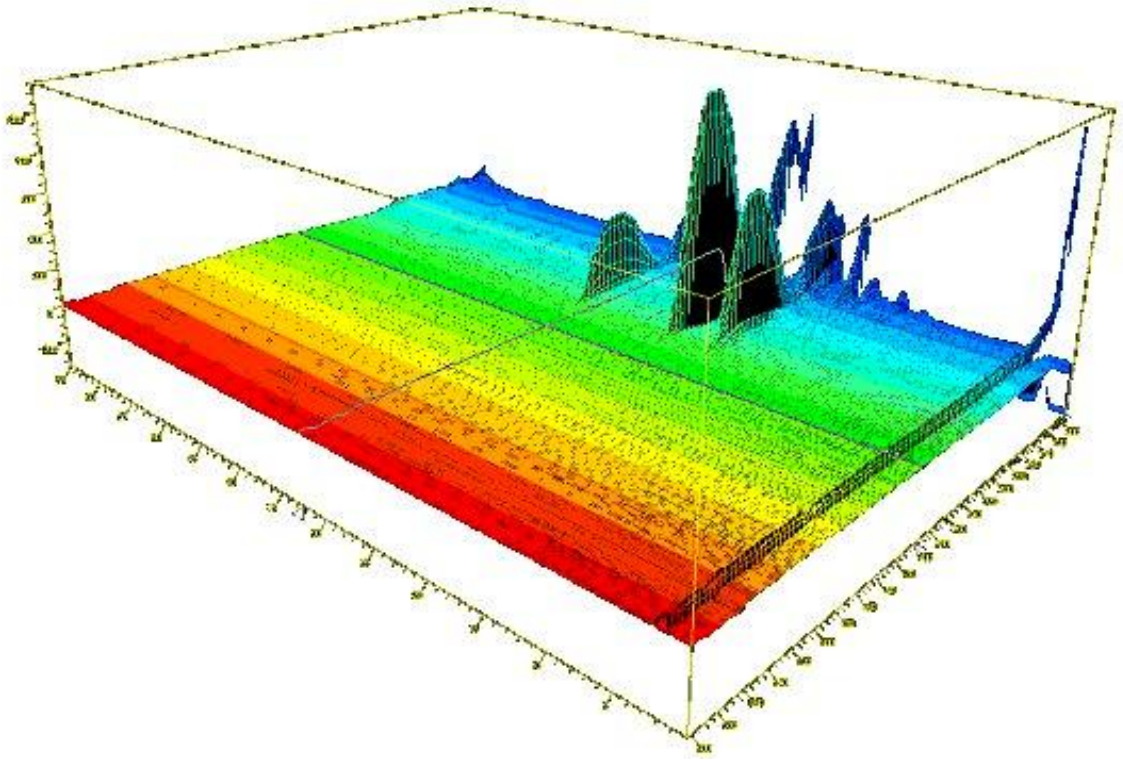
Příloha 4 – Zařízení na SPE kolonky

Příloha 5 – Nožový mlýnek

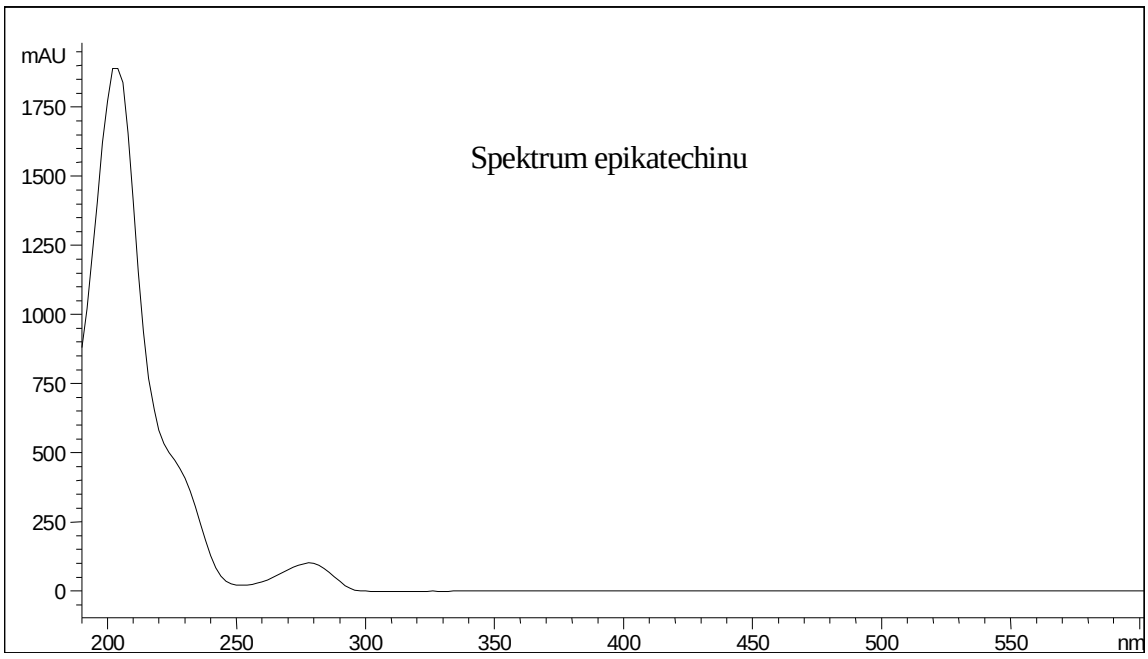
Příloha 6 – Hořčice Bílá

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com

Příloha 1 – Ukázka spektra epikatechinu



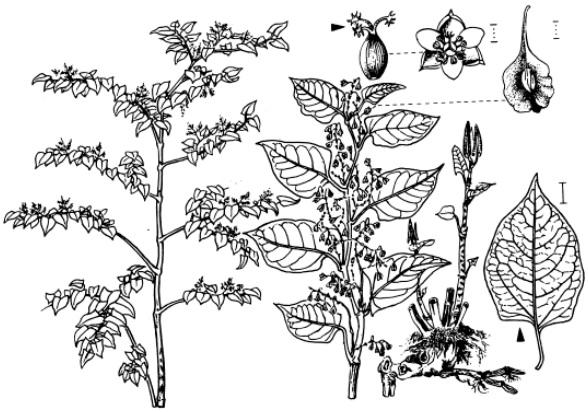
Pohled 3D




Pohled na chromatografický profil

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com

Příloha 2 – Determinační znaky křídlatky japonské a křídlatky sachalinské



Křídlatka japonská

Křídlatka sachalinská

(převzato z práce Heuer a kol., 2002)

PDF-XCHANGE Click to buy NOW! www.docu-track.com

Příloha 3a, 3b – Lokality sběru vzorků křídlatek

3a – Lokality sběru v Českých Budějovicích (označeny šipkou)

3b – Slavkov u Českého Krumlova

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com

Příloha 4 – Zařízení na SPE kolonky

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com
PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com

Příloha 5 – Nožový mlýnek

PDF-XCHANGE
Click to buy NOW!
www.docu-track.com

Příloha 6 – Hořčice Bílá

Hořčice bílá

semena hořčice bílé