

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Obor: všeobecné zemědělství

Profilace: rostlinolékařství

Katedra rostlinné výroby

Diplomová práce

Studium účinků rutinu na vybrané patogenní organismy

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jana Kalinová, Ph.D.

Autor:

Štěpánka Radová

2 006

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Studium účinků rutinu na vybrané patogenní organismy“ vypracovala samostatně a použila jsem literaturu a studijní materiály, které uvádím v seznamu použité literatury.

České Budějovice, 25. dubna 2006

Poděkování:

Poděkování patří především mé vedoucí diplomové práce Ing. Janě Kalinové, Ph.D. za metodické vedení, trpělivost a cenné rady, které mi poskytla v průběhu zpracování této diplomové práce. Dále pak RNDr. Aleně Novákové, CSc. a RNDr. Petrovi Starému

DrSc.za poskytnutí organismů potřebných pro provedení pokusů a za technické rady při zpracování grafických příloh Ing. Lukáši Leitnerovi.

OBSAH

1 Úvod	5
2 Literární přehled.....	7
2.1 Flavonoidy	7
2.1.1 Chemická charakteristika flavonoidů	7
2.1.1.1 Flavony, flavonoly	7
Rutin.....	9
Chemická charakteristika.....	9
Zdroje rutinu	10
2.1.2 Biosyntéza flavonoidů	11
Biosyntéza rutinu	13
2.1.2 Biologické vlastnosti flavonoidů	14
2.1.2.1 Vliv flavonoidů na lidský organismus	14
2.1.2.2 Role flavonoidů v rostlinách.....	15
2.1.2.2 Vliv flavonoidů na mikroorganismy.....	17
2.1.2.4 Vliv flavonoidů na hmyz	21
2.2 Pohanka setá (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.)	25
2.2.1 Botanická charakteristika.....	25
2.2.2 Význam pohanky	27
2.2.3 Flavonoidní látky v pohance seté (<i>Fagopyron esculentum</i>)	28
2.2.6 Zdravotní stav pohanky seté	29
3 Materiál a metody	33
3.1 Materiál.....	33
3.2 Metody.....	35
4 Experimentální část a výsledky	37
4.1. Vliv rutinu na klíčivost fytopatogenních hub <i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinera</i> a <i>Fusarium solani</i>	37
4. 2. Vliv kvercetinu na klíčivost fytopatogenních hub <i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i> a <i>Fusarium solani</i>	40
4.3. Vliv výluhu ze stonku a listů pohanky seté na klíčivost fytopatogenních hub <i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i> a <i>Fusarium solani</i>	43
4.4. Vliv živné půdy s obsahem rutinu na růst fytopatogenní houby <i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i> a <i>Fusarium solani</i>	46
4.5. Stanovení vlivu rutinu, kvercetinu a výluhu z listů a stonku pohanky seté na potravní preferenci mšice makové <i>Aphis fabae</i>	50
5 Diskuse	52
6 Závěr	55
7 Seznam literatury.....	56
8 Přílohy.....	64

1 Úvod

Následkem činnosti fytopatogenů dochází k celosvětovým ztrátám miliónů tun rýže, pšenice, ječmene, kukuřice a sóji. Choroby rostlin způsobují velké škody na úrodě a tím i významné ekonomické škody. Navzdory snahám snížit tyto ztráty úrody používáním agrochemikálií, se za posledních 30 let úroveň ztrát nezměnila a pohybuje se kolem 10 % (WILM, 2003). Proto je i v současné době chorobám rostlin a jejich původcům věnována velká pozornost.

Většina rostlin produkuje sekundární metabolity. Jednotlivé rostlinné buňky produkují ohromné množství těchto metabolitů. Tyto látky nejsou nutné pro buňky samotné, avšak pro rostlinu jako celek mohou být užitečné. Látky primárního metabolismu jsou nezbytné k přežití buněk a jsou produkovány všemi buňkami, kdežto sekundární metabolity jsou produkovány specializovanými buňkami. Mnoho z nich je vysoce toxických a jsou skladovány ve speciálních vezikulech nebo ve vakuolách. Na rozdíl od živočichů nejsou vylučovány z těla, mohou být reversibilně degradovány a dodány do primárního metabolismu. Ačkoliv se vedlejší rostlinné produkty vyskytují běžně, neznamená to, že každá rostlina produkuje každý produkt. Výskyt většiny produktů je omezen na určitý rostlinný druh či příbuznou skupinu rostlin. Výjimkou není ani možnost, že jsou tyto látky produkovány v určitém specifickém orgánu rostliny, častěji pak pouze v jednom typu buněk. Stejně tak se mohou látky sekundárního metabolismu generovat jen v určité fázi vývoje rostliny. Mnohé sloučeniny mají dokázaný fungicidní účinek in vitro proto se používají jako fytoochrana.

Chemická struktura sekundárních produktů je mnohem složitější než primárních. Nejvýznamnějšími jsou látky skupin alkaloidů, terpenů, taninů, fenolických látek a glykosidů. Z fenolických látek jsou to především flavonoidy, kterých je známo na 4000 druhů. Tyto látky plní řadu funkcí, mimo jiné i signalizační funkci. Jejich činnost se podobá rostlinným hormonům, ovlivňují aktivitu ostatních buněk, ovládají jejich metabolismus a koordinují vývoj celé rostliny. Dalším příkladem mohou být funkce rostlinných barviv, sloužící jako komunikační prostředek mezi rostlinou a opylovači, hrají důležitou roli v ochraně rostliny před abiotickými vlivy a chrání rostlinu před predátory či infekcí. Syntetizují se po stimulaci metabolických drah některým z procesů provázejících infekci či

poranění. Jsou detekovatelné za několik hodin po podmětu. Některé rostliny produkují kupříkladu specifické látky proti houbové infekci, které inhibují šíření mycelia houby v rostlině. Řada látek jež je vylučována, ovlivňuje existenci ostatních druhů. Mnohé látky mají antibiotický charakter, takže potlačují výskyt konkurenčních druhů v okolí a tím chrání producentovu ekologickou niku. Hmyz a ostatní živočichové se vyvíjeli paralelně s insekticidními vlastnostmi některých sekundárních metabolitů. Během evoluce se z nutnosti odbourávat tyto nebezpečné látky stala závislost na určitých rostlinných produktech, které např. startují syntézu hormonů, ačkoliv byly původně myšleny jako ochranný prostředek. Přesto existuje řada flavonoidních látek, které redukuje růst a schopnost přežívání herbivorního hmyzu na rostlinách. V případě, že by se potvrdila schopnost fytoalexinů negativně působit na fytopatogeny, dalo by se těchto poznatků účinně využít v integrované ochraně rostlin.

Cílem diplomové práce bylo zjistit, jaké účinky má flavanol rutin a jeho metabolický produkt kvercetin, které patří mezi hlavní zástupce flavonoidů v pohance seté, na vybrané fytopatogenní druhy hub: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* a *Fusarium solani* a obecně rozšířeného herbivorního škůdce mšici makovou (*Aphis fabae*). Dále pak porovnat tyto výsledky s účinku výluhu z listů a stonků pohanky sklízené v době květu, kdy je obsah flavonoidů v rostlině nejvyšší, pro ověření předpokladu existence jiných účinných látek v rostlině. Získané výsledky by měly pomoci rozšířit poznatky o vlivu sekundárních metabolitů rostlin na houbové patogeny a herbivory.

2 Literární přehled

2.1 Flavonoidy

2.1.1 Chemická charakteristika flavonoidů

Flavonoidy mají základní strukturní element, skelet 2-fenylchromanu. V závislosti na stupni oxidace centrálního pyranového kruhu (který se může otevřít a recyklovat na furanový, příp. na dihydrofuranon) se rozlišují obvykle tyto třídy:

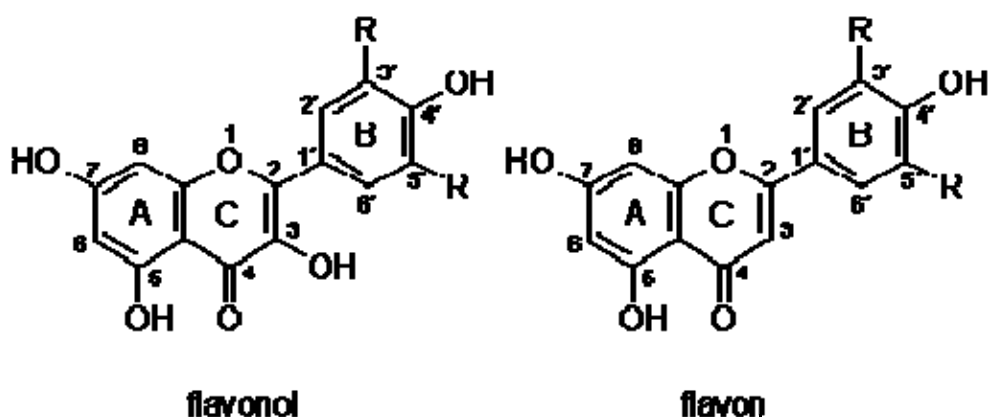
- 2-fenylbenzopyrolium, t.j. antokyany
- 2-fenylchromany
 - flavony, flavonoly a jejich dimery
 - isoflavony, isoflavanony
- 2-fenylchromany
 - flavany
 - flavan-3-oly, flavan-3, 4-dioly (příčemž oligomery a polymery, tj. proanthokyanidiny, spolu s polyestery kyseliny galové a glukózy a jejich deriváty, jsou řazeny mezi třísloviny)
- chalkony a dihydrochalkony (s otevřeným pyranovým kruhem)
- 2-benzylidenkumaronony (aurony) (MÍKA a kol., 2001).

Počet flavonoidů se odhaduje na 4000. Flavonoidy se vyskytují v kaprad'orostech (biflavonoidy), přesličkách (proantokyany) a v krytosemenných rostlinách v široké paletě. V rámci současného taxonomického systému vyšších rostlin lze podle rozšíření jednotlivých typů flavonoidů vysledovat hlavní linie evolučního vývoje a to bez podstatných výjimek. To dovoluje zvláště pro dvouděložné rostliny vyvinout poměrně sevřené fylogenetické schéma, z něhož vyplývá i značný počet charakteristik zděděných po dávných předcích (MÍKA a kol., 2001).

2.1.1.1 Flavony, flavonoly

Představují většinu známých flavonoidů, kdy v kruhu A se vyskytuje v 90 % případů substituce dvěma skupinami fenolických hydroxylů na C₅ a C₇ (obr. 1). Jsou buď volné nebo etherové, případně jedna z nich může mít glykosidickou vazbu. Třetí hydroxylová skupina (volná u chalkonů) poskytuje atom kyslíku do pyranového kruhu ostatních flavonoidů či do furanového kruhu u auronů. Kruh B bývá v 80 % případů substituován na C₄ (případně di- nebo řidčeji tri-substituované skupinami –OH nebo –OCH₃) (MÍKA a kol., 2001).

Flavony a flavonoly a jejich deriváty jsou všeobecně rozšířená přirozená barviva a zároveň poskytují užitečné informace z hlediska chemotaxonomie rostlin. Např. 6-O substituované flavonoidy jsou běžné v čeledi *Laminaceae*, *Rutaceae* a *Asteraceae*, 5-deoxyflavanoly ve *Viciaceae* a *Myrtales*, 2'-O-substituované flavonoly v čeledi *Laminaceae*, *Solanaceae* a v moučnatém exudátu na listech a květech *Primulaceae*. Takřka „univerzálními“ flavonoly jsou kempferol, kvercetin a myricetin, vyskytující se převážně jako glykosid či jako kopoligmenty doprovázející antokyany (MÍKA, 2001). Některé z nich jako například rutin se dříve používaly k barvení textilních vláken (VOTICKÝ, 1991).

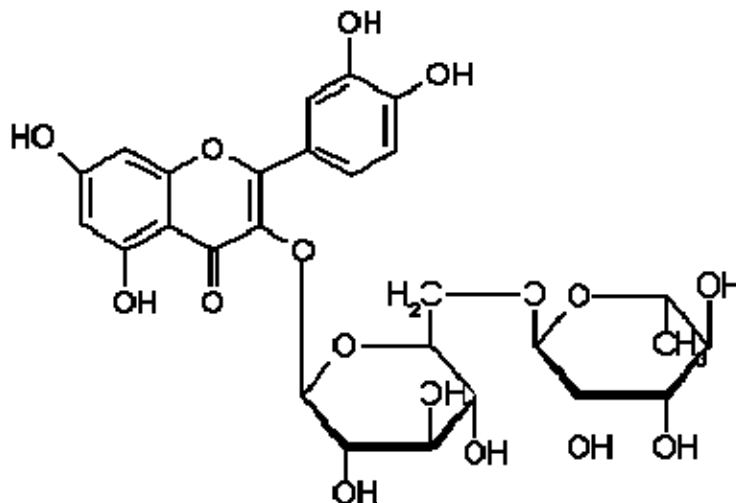


Obr. 1: Obecný vzorec flavonolu a flavonu (URBAN, 2006)

Rutin

Chemická charakteristika

Rutin (kvercetin 3-*rhamnosylglukosid*) je flavonol, který byl poprvé izolován před více než 150 roky z listů routy vonné (*Ruta graveolens*) (VOTICKÝ, 1991). Stanovením jeho struktury se zabývalo více autorů a původně se na základě jeho chemických vlastností tj. jeho rozpustnosti ve vodných roztocích alkálií předpokládalo, že je to organická kyselina, kterou nazvali kyselina rutinová. Později se ukázalo, že k tomuto omylu přispěla chemická stavba této sloučeniny, konkrétně její fenolický charakter (chemický vzorec na obr. 2) (VOTICKÝ, 1991). Jeho chemickou stavbu reprezentuje systematický název 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-(3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydropyran-2-yloxymethyl)-tetrahydropyran-2-yloxy]-chromen-4-on nebo též 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxy-3-(6- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranosyloxy)-chromen-4-on (URBAN, 2006).



Obr. 2: **Strukturní vzorec rutinu** (DADÁKOVÁ, 2006)

Cukernou složku tvoří 6-deoxy- α -manóza, triválně ramnóza a β -D-glukóza. Disacharid tvořený těmito dvěma cukernými jednotkami se nazývá rutinóza. Pro rutin ($C_{27} H_{30} O_{16} \cdot 2 H_2O$) se v lidové literatuře vyskytují i synonymní názvy jako např.: rutosid, globulariacitrin, myrtikolorin, osyritrin, soforin, violakvercitrin. Čistý rutin

krystalizuje z vody do vějířovitě uspořádaných žlutých jehliček o teplotě varu kolem 190 °C (VOTICKÝ, 1991). Je to žlutý jemně krystalický prášek, hůře rozpustný ve studené vodě. Taje při teplotě 210 °C pod nulou (MÜLLER a SCHIEBEL-SCHLOSSER, 1998).

Zdroje rutinu

Do současnosti byl rutin popsán v 77 rodech a 34 rostlinných čeledí v různých orgánech od kořene až po části květů. Jeho obsah v těchto zdrojích kolísá od několika tisícín procent (např. v listech tabáku) až po 22 % v květech jerlínu japonského (*Sophora japonica L.*) (VOTICKÝ, 1991). Z hospodářsky kulturních druhů rostlin je pro vysoký obsah rutinu využívána především pohanka setá. Další rostliny obsahující rutin jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1: **Obsah rutinu v různých druzích rostlin** (ANONYM 1)

Název rostliny	Část rostliny	Obsah rutinu v ppm
Violka rolní (<i>Viloa tricolor</i>)	květy	100 - 230
Jerlín japonský (<i>Sophora japonica L.</i>)	poupata	176 - 229
	listy	0 - 40
	plody	0 - 25
Pohanka setá (<i>Fagopyrum esculentum</i> MOENCH)	rostlina	4,3 - 68,3
	listy	11,6 - 63,7
	stonek	50,6 - 60
	květy	40
Petržel zahradní (<i>Petroselinum crispum</i>)	listy	30
Rajče jedlé (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	listy	24
Stromový tabák (<i>Nicotina glauca</i>)	listy	12 - 21
Routa vonná (<i>Ruta graveolens</i>)	rostlina	20
Violka vonná (<i>Viola odorata</i>)	květy	20
Šťovík kyselý (<i>Rumex acetosa</i>)	listy	12,8
Tabák virginský (<i>Nicotiana tabacum</i>)	listy	10
Chmel otáčivý (<i>Humulus lupulus</i>)	listy	2

2.1.2 Biosyntéza flavonoidů

V rostlinách vznikají flavonoidy kondenzací polyacetátu a aromatických aminokyselin jako je fenylalanin a tyrosin. Tyto sloučeniny vznikají v biosyntetické cestě kyseliny šikimové (obr. 3).

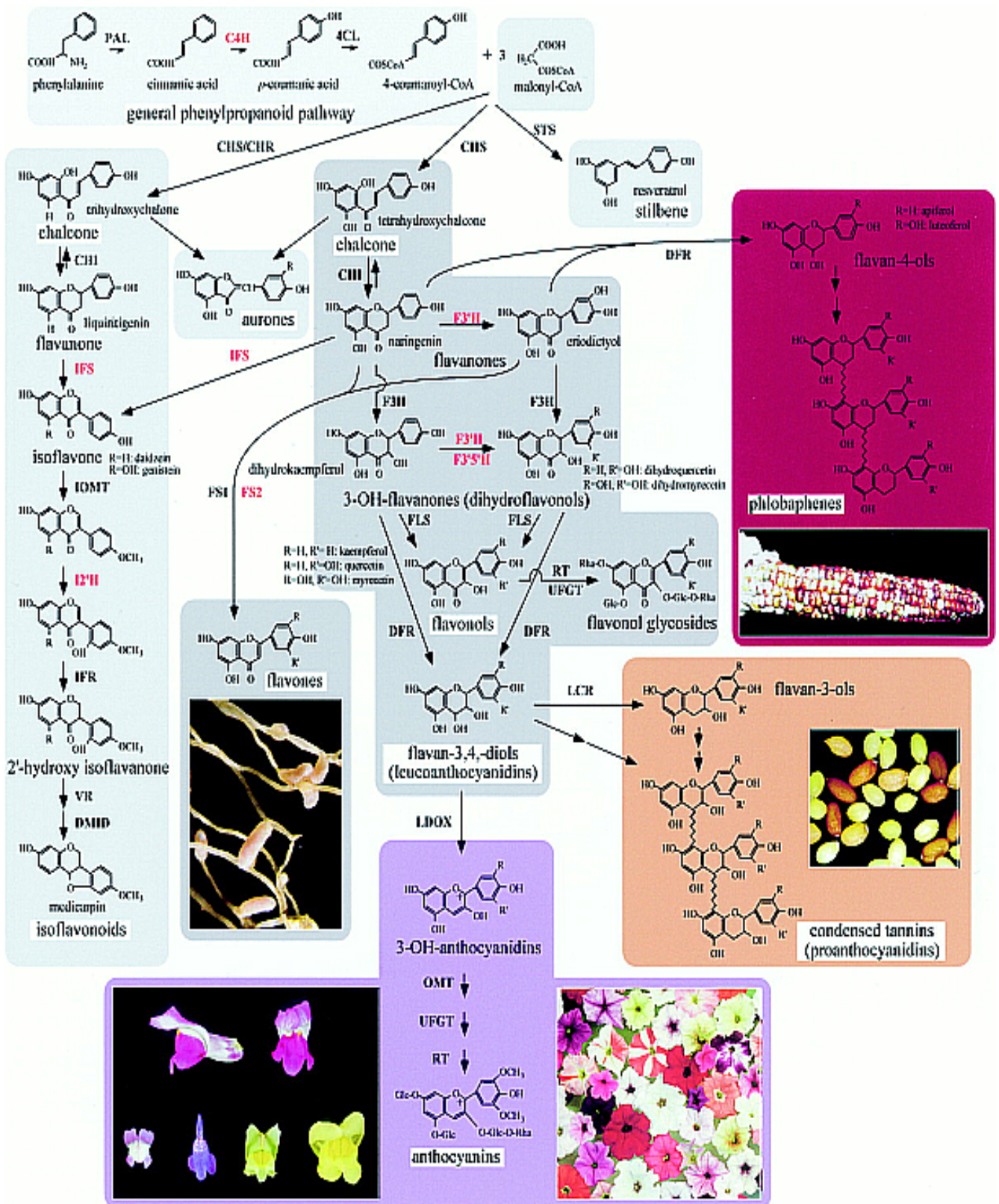
L-fenylalanin je přímým prekurzorem kyseliny skořicové a enzymem zodpovědným za konverzi je fenylalaninamoniaklyáza. Při této reakci dochází k stereospecifické eliminaci amoniaku a vzniká kyselina *trans*-skořicová.

Hydroxylaci kyseliny *trans*-skořicové vzniká kyselina *p*-kumarová (4-hydroxyskořicová). Tady se biosyntetická cesta větví a může pokračovat až k ligninu.

Další klíčovou roli sehrává enzym 4-kumaroyl-CoA-ligáza, který z kyseliny *p*-kumarové s ATP a CoA vytváří 4-kumaroyl-CoA. V další fázi reagují 3 molekuly malonyl-CoA s *p*-kumaroyl-CoA za spolupůsobení chalkonsyntázy a vzniká chalkon.

Chalkony v roztoku samovolně cyklizují na příslušné flavanony. Ze žlutě zbarveného 4,2',4',6'-tetrahydroxychalkonu vzniká stereospecifickou izomerací bezbarvý flavanon-naringenin. Z něj působením oxidoreduktáz vznikají flavony nebo různě hydroxylované flavanony, působením isoflavonsyntázy se odvíjí biosyntéza isoflavonoidů. Od naringenininu je také odvozena syntéza dihydrokempferolu, ze kterého pokračuje biosyntetická cesta dále k *cis*-flavan-3,4-diolu a působením enzymů až k antokyanidinům a proantokyaninům (PROCHÁZKA, 1998).

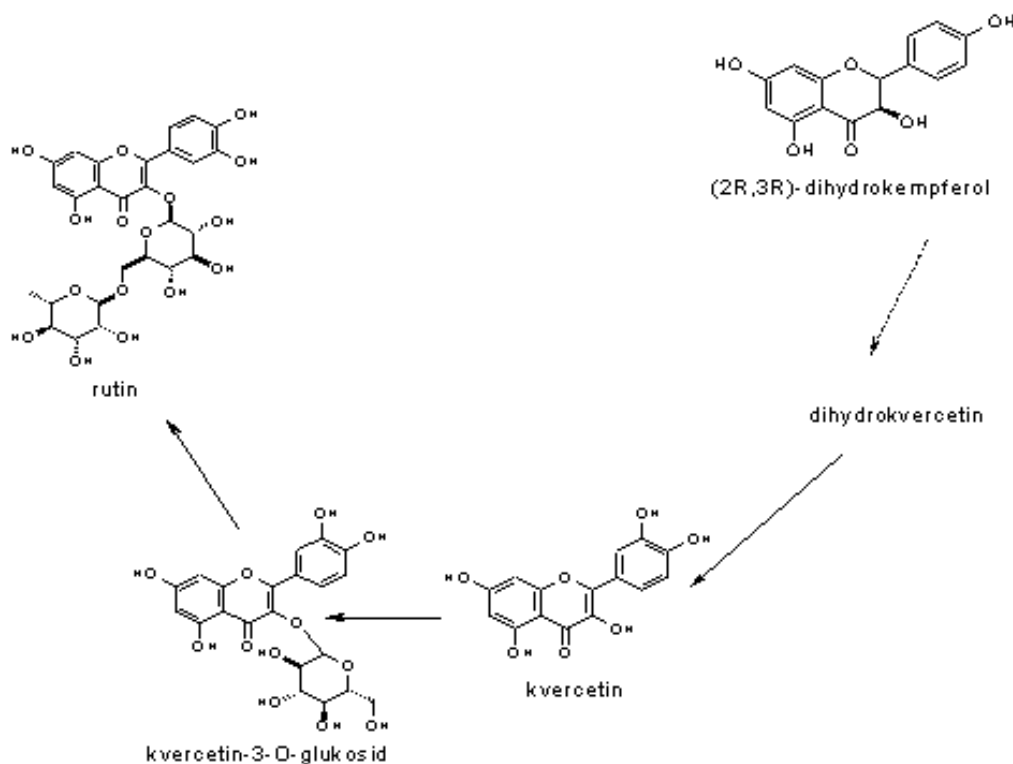
Obr. 3: Schéma biosyntézy flavonoidů (WINKEL-SHIRLEY, 2001)



Biosyntéza rutinu

(2R,3R)-dihydrokempferol a dihydrokvercetin jsou prekuzory flavonolů. Dihydrokvercetin dává vzniknout kvercetinu. Od něj potom běží syntéza až k rutinu. Meziproduktem této syntézy je kvercetin-3-O-glukosid. Kvercetin-3-O-glukosid reaguje s flavonol-3-O-glukosid-L-rhamnosyltransferázou za vzniku rutinu (obr. 4). Glykosidická vazba rutinu se snadno štěpí např. při zapaření rostlin a vzniká aglykon kvercetin (PROCHÁZKA, 1998).

Obr. 4 Biosyntéza rutinu (URBAN, 2006)



2.1.2 Biologické vlastnosti flavonoidů

2.1.2.1 Vliv flavonoidů na lidský organismus

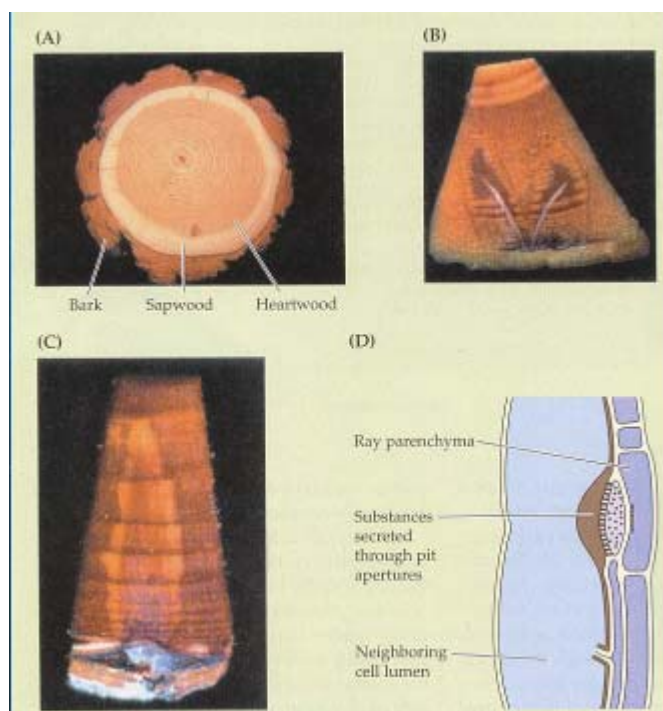
Biologické účinky fenolických látek se využívají ve fytoterapii (je zaznamenáno působení protibakteriální, protivirové, protizánětlivé, protialergické). Nejdůležitější vlastností těchto látek je však intenzivní antioxidační působení, schopnost vychytávat volné radikály a imobilizovat prooxidačně působící kovové kationty (COOK a SAMMAN, 1996). Studium přírodních antioxidantů se v poslední době velice rozšiřuje. Souvisí s hledáním nejvhodnější cesty, jak předcházet chorobám vyššího věku, které jsou spojeny s buněčným stárnutím a oxidačním poškozením (ateroskleróza, rakovina). Je prokázáno, že potrava s vysokým obsahem přírodních antioxidantů vede k výraznému snížení onemocnění srdce a cév (HERTOG, 1996). Podle některých vědců konzumace potravy s vyšším obsahem flavonoidů zvyšuje pestrost střevní mikroflóry (GERM, 2004).

Rutin vedle hesperidinu je nejdůležitější látkou skupiny tzv. vitamínu P, nazvaného též faktor permeability neboli propustnosti cév (GROMOVÁ, 1990). Paleta aplikace rutinu a jeho semisystematického derivátu v humánní medicíně je velmi pestrá. Ordinuje se při snižování patologicky zvýšené cévní i buněčné permeability (VOTICKÝ, 1991). Neboť se jeho účinek projevuje na krevních vlasečnicích, které vykazují lomivost a hrozí při sebemenším zvýšení krevního tlaku svým prasknutím nebo hrozí krvácení do mozku (GROMOVÁ, 1990). Dále má vliv na periferní krvení s antiedematickými účinky. Podává se pacientům trpícím na hemeroidy, křečové žíly a krevní podlitiny způsobené v důsledku lámavosti krevních kapilár (VOTICKÝ, 1991). Dále byl sledován vliv rutinu na vasokonstrikci cév pokožky. Rutin prodlužuje a prohlubuje působení adrenalinu a zároveň brzdí autooxidaci. (HAGELS, 1996). Také byl sledován antioxidační vliv rutinu na některé kovy jako železo, měď a zinek. Výsledky ukázaly výrazné snížení antioxidační úrovně (GAO a kol., 2002). Velmi významný je stimulační vliv rutinu na biologické využití kyseliny L-askorbové. Podle Ambroseho vyvolává nepřítomnost bioflavonoidů v dietě nadměrnou spotřebu kyseliny askorbové, která nemůže být nahrazena ani vysokými dávkami vitamínu (GROMOVÁ, 1990). Rutin inhibuje adenosindeaminázu, *in vitro* způsobuje zlomy DNA a inhibuje činnost glutathion-S-transferázy a glutathionreduktázy (URBAN, 2006).

2.1.2.2 Role flavonoidů v rostlinách

Flavonoidy jsou univerzální rostlinné pigmenty. Dosud bylo popsáno 45 mono-, di- i vyšších polymerů. Udávají barvu květům, plodům a někdy i listům. Např. žluté flavonoidy jsou chalkony, aurony, některé flavonoly; červené, modré a purpurové jsou antokyany. Pokud některé neabsorbují přímo viditelné záření, přispívají ke zbarvení jako tzv. ko-pigmenty. Tak např. flavon a falvovonol (bezbarvé) chrání jako ko-pigmenty antokyany. Některé flavonoidy udávají typickou barvu dřevnímu jádru různých stromů, podílejí se na kvalitě a trvanlivosti různých druhů dřeva (obr 5.). Toto zbarvení dřeva se někdy mylně připisuje ligninu, neboť tyto látky se špatně rozpouštějí a jsou tím ligninu podobné (MÍKA a kol., 2001).

Obr. 5: Zbarvení dřeva flavonoidy (ZAŽÍMALOVÁ, 2002)



Flavonoidy jsou všudypřítomné, jsou v kutikule i v epidermálních buňkách listů, kde chrání pletiva před poškozením UV B záření. Největší množství se nachází ve vakuolách (ONYILAGHA, 1994, MÍKA a kol., 2001, GROTEWOLD, 2004). Dřívější studie naznačily, že flavonoidy mohou hrát důležitou roli při adaptaci rostlin v drsných přírodních podmínkách, jako např. v horkých aridních podmínkách (HARBORNE a kol., 1992). Ochrana proti UV B záření je velmi důležitá u fotosyntetizujících organismů. Vlivem rostoucího poškození ozonové vrstvy se zvyšuje riziko porušení fotosyntetického aparátu

rostlin UV zářením. To vše zvyšuje citlivost rostlin k různým chorobám a odolnost proti nižším teplotám. Rutin, kvercetin, kvercitrin a ostatní flavonoidy jsou syntetizovány v závislosti na stupni ochrany rostliny proti UV záření, nemocem a predátorům. UV-B absorbující komponenty jsou akumulovány v asimilační tkáni během vývoje rostliny. Se stupňujícím obsahem ochranných látek se zlepšuje UV-B ochrana citlivých tkání a stoupá tolerance rostlin. Schopnost syntetizovat rutin se jeví jako odezva na extrémní podmínky, ve kterých se některé rostliny vyvíjely. UV B záření indukuje aktivitu genů, které urychlují metabolismus a syntézu flavonoidů. Flavonoidy mají pak schopnost „vymést“ volné radikály, které jsou vytvářeny UV B zářením (GERM, 2004).

Flavonoidy mají také roli rostlinných hormonů. Studie prokázaly inhibiční vliv na řadu jiných rostlinných enzymů jako např. malátdehydrogenázu a glutamátdehydrogenázu (URBAN, 2006).

Některé fenolické sloučeniny, mezi které jsou řazeny i flavonoidy, fungují jako tzv. alelopaticky účinné látky při konkurenci s ostatními rostlinami (PROCHÁZKA, 1998). Flavony z pýru plazivého (*Agropyron repens* L.) radikálně inhibují růst některých plodin a plevelných druhů (WESTON a kol., 1987).

Flavonoidy hrají také důležitou roli ve vztazích rostlina–hmyz, rostlina-mikroorganismy. Některé flavonoidy, jak je známo, se akumulují na povrchu listů, květů a jiných orgánů. Akumulace látek na povrchu rostliny dovoluje přímý kontakt s hmyzem, patogeny a herbivory. PETER a SHANOWER (2001) pozorovali, že chemické složky v epikutikulární voskové vrstvě jsou prvními chemosensorické stimuly, které hmyzí herbivor vnímá, když přistává na povrchu rostlin nebo začíná přijímat potravu, proto usoudili, že chemické látky z povrchu rostlin určitě působí na hmyzí chování, příjem potravy a umístění herbivora.

2.1.2.2 Vliv flavonoidů na mikroorganismy

Rostliny vlastní širokou škálu přirozených antimikrobiálních látek. K nejrozšířenějším patří fenolické látky mezi které patří i flavonoidy. Většina hub je inhibována isoflavonoidními fytoalexiny při koncentracích od 10^{-5} do $3 \cdot 10^{-4}$ M. Houby, rostoucí v koncentracích 1 až $3 \cdot 10^{-4}$ M, považujeme za tolerantní. Pro reakci hub k fytoalexinům je charakteristické, že jsou citlivější ve fázi klíčení spor než ve fázi růstu mycelia. I když existují výjimky, lze obecně říci, že houboví patogeni jsou k fytoalexinům vylučovaným jejich hostitelskými rostlinami tolerantní, zatímco nepatogeni jsou k nim citliví. Většina rostlin produkuje několik typů fytoalexinů. Je možné, že v *in situ* tyto fytoalexiny působí synergisticky a vytvářejí tak vysoce antifungální prostředí, které je mnohem účinnější než to, které je založeno pouze na aditivním účinku těchto látek (KÚDELA a kol., 1989).

Flavonoidy mají toxický vliv na houby, bakterie a viry (GRAYER a HARBOURN, 1994).

Růst několika druhů rodu *Phytophthora* inhibují některé flavonony, flavonoly, flavony a isoflavony ze sóji luštinaté (*Glycine Max*) zahrnující kumesterol, biochanin A, genistin, naringenin, isorhamnetin a kvercetin (EBEL a GRISEGACH, 1998). Kumesterol, biochanin A, genistin, naringenin a isorhamnetin byly inhibitory v koncentraci 60-120 μM a fungicidní při koncentraci 240 μM . Kvercetin, jeho 3-O- β -D-glukosidy a isokvercetin způsobily významně prodloužení intervalu růstu *P. sojae* v koncentraci 60-240 μM , ale nebyly fungicidní ani při jedné z těchto koncentrací. Další flavonoidy jako kempferol, apigenin, chrysin a rutin v tomto případě nevykázaly žádnou inhibiční aktivitu. *P. sojae* dokázala rychle hydrolyzovat všechny testované glykosidické flavonoidy a metabolizovat některé na nearomatické produkty. Metabolismus složek *Phytophthorou sojae* byl zjevný již brzy a zdál se být spojen převážně s konečky hyf. Některé složky měly zajímavý efekt na morfologii a vývoj houby. Makroskopicky se tyto změny projevovaly skromným růstem mycelia. Mikroskopicky byl tento nedostatečný růst doprovázen rozsáhlým buněčným rozpadem a průsvitností. Dalšími efekty zahrnovaly zduřování a zkrucování hyf, v některých případech způsobovalo zkrucování složité sítě a uzle. Avšak genistin a jeho konjugát byl neobvyklý v tom, že kromě zduřenin byl jeho vliv výrazný i na reprodukční schopnost. Zatímco mnoho složek inhibovalo při vyšších koncentracích rozvoj sporangia, efekty na vývoj oogonií byly o mnoho rozdílnější. Některé komponenty (genistin, kvercetin, isokvercetin a chrysin) skutečně stimulovaly utváření oogonia. Toto bylo zjevné zvláště u genistinu, kde se zvětšila hustota oogonií, což se sdružilo s prudkým poklesem růstu.

Kvercetin a jeho glykosidy způsobily znatelné žluté až hnědo-červené zbarvení oospor. Nápadná pigmentace oogonia bylo vysoce selektivní, samčí protějšky (antheridia) nebyla pigmentována vůbec. Dále byl sledován metabolismus některých složek pomocí HPLC analýzy. Ze specifických zón média byly odebrány v různých časech terčíky s *P. sojæ*. První skupina (kumesterol, biochanin A, apigenin a chrysin) se vyznačovaly relativně nízkou až žádnou metabolickou aktivitou v žádné ze zón růstu *P. sojæ*. Metabolismus ostatních složek isoflavonoidů a flavonoidů byl evidentní. To znamená, že kvercetin a jeho glykosidy jsou houbou velmi rychle degradovány, mají inhibiční vliv, ale ne fungicidní při žádné z uvedených koncentrací (RIVERA-VARGAS a kol., 1992).

Dva přirozeně působící isoflavony, genistin a biochanin A a jejich dihydroderiváty (isoflavony a isoflavany), byly testovány pro jejich účinky na myceliální růst dvou půdních hub *Rhizoctonia solani* a *Sclerotium rolfsii*. Všechny isoflavonoidy skupiny biochaninu A vykázaly vysokou antifungální aktivitu. Isoflavan genistin a další isoflavany s dvěma hydroxylovými a jednou metoxy skupinou byly fungitoxické, zatímco isoflavany se dvěma či třemi methoxy skupinami byly téměř inaktivní (WEIDENBÖRNER a kol., 1990).

Biotesty zkoumající citlivost houby *Cytospora personii* k flavonoidům obsaženým ve višni obecné *Prunus cerasus* srovnávaly myceliální růst této houby na flavonoidních glukosidech a aglykonech získaných z rezistentní višně. Kromě faktu, že flavonoidní aglykony byly toxičtější než odpovídající glukosidy, byly prokázány i reakce houby v závislosti na typu flavonoidu. *C. personii* byla citlivější k měnícím se koncentracím flavonoidních aglykonů než k měnícím se koncentracím odpovídajících glukosidů (GEIBEL, 1995).

V testech s extraktem získaným z pryskyřičných exudátů rostlin ze skupiny *Pseudognaphalium* (*Pseudognaphalium cheiranthiifolium*, *P. heterotrichum*, *P. robustum* a *P. vira vira*) se sledoval vliv na myceliální růst fytopatogenní houby *Botrytis cinerea*. Bylo testováno deset flavonů, dva flavanony a tři diterpenoidy izolované z tohoto výtažku. Extrakt redukoval růst mycelia a inhibiční aktivita čistých složek byla dokonce vyšší. Flavony s dvěma hydroxylovými skupinami na A-kruhu vykazovaly vyšší účinnost. Flavanony byly inaktivní, naopak jeden z nalezených terpenoidů prokázal viditelný inhibiční účinek na růst houby *B. cinerea* a také působil retardačně na klíčení konidií. Procento inhibice se pohybovalo mezi 13 až 21%. (COTORAS a kol., 2001).

Růst houby *Aspergillus flavus* je potlačován dimethoxyflavonem izolovaným z podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*) (TURNER a kol., 1975).

Biflavony získané z listů cypřišovce leylandova (*Cupressocyparis leylandii*) prokázaly antifungální působení na houbové patogeny jako *Alternaria alternata*, *Cladosporium oxysporum*, *Fusarium culmorum* a *F. avenaceum* (KRAUZE-BARANOWSKA a kol., 1999).

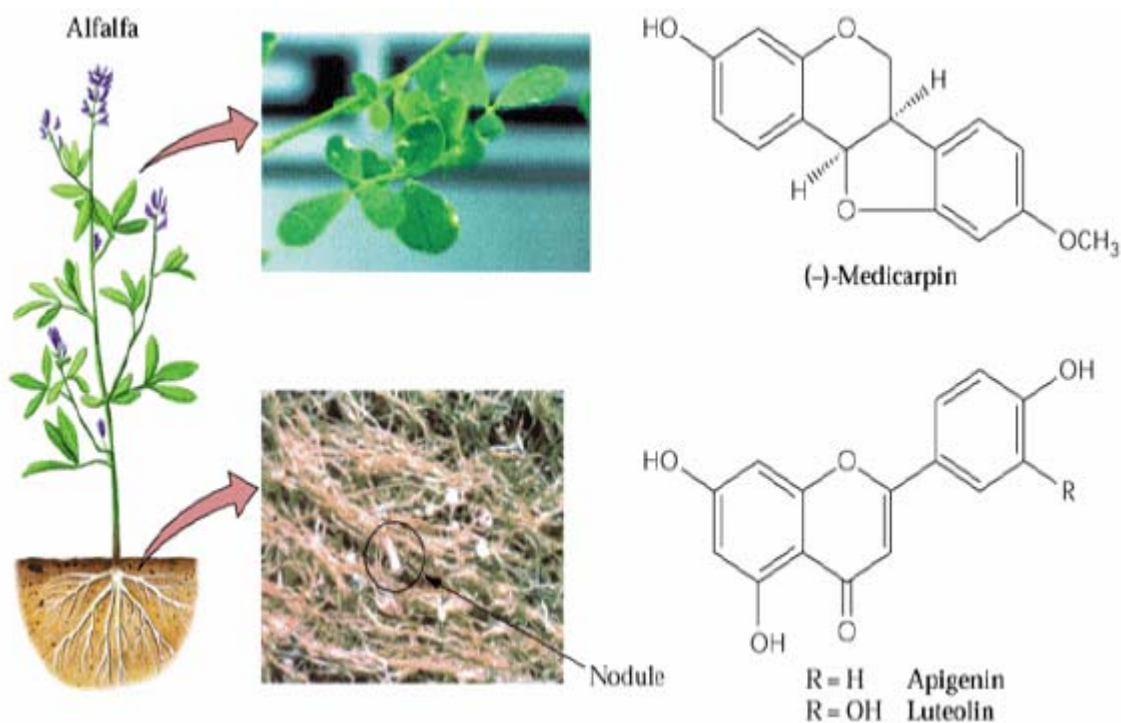
V testech se surovým extraktem ze šesti druhů rostlin z rodu *Hypericum* (*Hypericum caprifoliatum*, *H. connatum*, *H. carianum*, *H. ternum*, *H. myrianthum* a *H. polyanthemum*) a byl sledován jejich antimikrobiální vliv na sedm mikroorganismů (bakterie a houby). Nejzastoupenějšími složkami v extraktech byly látky jako taniny, flavonoidy a fenolické kyseliny. Z flavonoidů to byl především kvercetin, hyperosid, méně isokvercetin a rutin, který tvořil hlavní složku ve výluhu *H. perforatum*. Neaktivnější rostlinou byla *H. caprifoliatum*, která vykazala vliv na *Staphylococcus aureus*. Pouze extrakt z *H. polyanthemum* a *H. ternum* byl aktivní vůči *Bacillus subtilis*. Žádný ze surových extraktů neměl vliv na organismy jako *S. epidermidis*, *E. coli* a *Sacharomyces cerevisiae*. (DALL'AGNOL a kol., 2003).

V testech macerátů rostlin (*Cerasus vulgaris*, *Forsythia intermedia*, *Betula pendula*, *Codiaeum variegatum*, *Thuja occidentalis*, *Capsicum annum*, *Humulus lupulus*, *Pinus silvestris*, *Juniperus communis*, *Fragaria vesca*, *Actinidia polygama*) se sledoval vliv na 6 vybraných fytopatogenních hub. Maceráty byly testovány difúzní diskovou metodou. Hodnotil se růst *Pyrenophora teres*, *Botrytis species*, *Alternaria species*, *Sclerotinia sclerotinia*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*. Nejsilnější antifungální efekt měl macerát z mateřídoušky obecné (*Thymus serpyllum*), který vykázal inhibiční účinek 63%. Nejslabší zaznamenaný vliv měl macerát z jehličí borovice stříbrné (*Pinus silvestris*), 9% v porovnání s účinností fungicidního přípravku Folicur BT 225 EC (ÜRGEROVÁ a KOPÁNI, 2004).

Rutin a kvercetin vykazují jistou aktivitu proti některým typům virů. Tento účinek je spojen s inhibicí aktivity hyalurodinázy. U buněčných kultur byl prokázán silný protivirový vliv kvercetinu, u rutinu je tento vliv slabý (HAGELS, 1996).

Flavonoidy hrají také důležitou roli ve vzájemném soužití rostlin a hub. Příkladem jsou apigenin a luteolin, jenž sklouží jako signální molekuly pro interakci leguminózy a rhizobiální bakterie (MÍKA a kol., 2001) viz. obr. 5.

Obr. 5: Interakce flavonoidů vojtěšky a rhizobiálních bakterií (ZAŽÍMALOVÁ, 2006)



V testech s řadou mykorhizních a saprofytických hub eukalyptu *Eucalyptus globulus* stimuloval flavonol rutin dvojnásobně růst hyf houby *Pisolithus*. Přičemž odezva houby byla významná při koncentracích nižších než 1 pM. Rutin z kořenových výměšků eukalyptu je signálním flavonoidem pro *Pisolithus* a je to první flavonoid, který houba identifikuje. Gradient rutinu může přispívat jak k orientaci prodlužujících se hyf směřujících k vrcholku kořenu, čímž dochází k mykorhizní infekci, tak by mohl ovlivnit i interakce mezi houbami v rhizosféře (LAGRANGE a kol., 2005). Flavonoidy tedy stimulují růst hyf během časně interakce mezi kořeny a endomykorhizními houbami (POULIN a kol., 1993).

Už ve velmi časných stádiích interakce, ještě před jakýmkoli fyzickým kontaktem symbionta a houby, jsou vyměněny signální molekuly mezi kořeny hostitelské rostliny a endomykorhizní houbou, které stimulují klíčení spor a růst hyf (HORAN a CHILVERS, 1990).

Při studiu arbuskulárních mykorhizálních hub *Gigaspora rosea*, *G. margarita*, *Glomus mosseae* a *G. intraradices* byl sledován efekt flavonoidů chrysinu, isorhamnetinu, kempferolu, luteolinu, morinu a rutinu na presymbiotický růst, tak i na klíčení spor, délce a větvení hyf a formaci pomocných buněk a sekundárních spor. Výsledkem bylo, že specifčnost působení flavonoidů závisela na presymbiotickém stádiu hub. Rutin působil podpůrně na růst, větvení a tvorbu sekundárních spor u houby *Gigaspora margarita*. Na klíčení spor vliv neměl žádný (SCERVINO a kol., 2005).

2.1.2.4 Vliv flavonoidů na hmyz

Fenolické látky a tedy i flavonoidy hrají důležitou roli v interakcích mezi rostlinami a hmyzem. Na neadaptované jedince mají negativní vliv. Především snižují nutriční hodnotu potravy. Účinky po pozření se projevují ve středním střevě. Výsledkem oxidačních procesů byl vznik superoxidových a oxidových radikálů. Mohou být však v těla hmyzu tolerovány nebo dokonce detoxikovány. To vše záleží na síle antioxidačního účinku cytochromu P₄₅₀ monooxygenázy a enzymů esteráz, stejně tak i na pH střeva (SIMONNS, 2003).

Routa vonná (*Ruta graveolens*), jež je bohatým zdrojem rutinu a dalších fenolických látek, je tradičně užívána proti hmyzu, ačkoliv některé z jejich účinných látek podléhají v těle hmyzu involuci. V testech byla zkoumána efektivnost účinků filtrátu rostliny proti růstu a vývoji vrtule ovocné (*Ceratitis capitata* Wiedmann) a larev komára pisklavého (*Culex pipiens* L.). Vrtule ovocná je celosvětově rozšířený škůdce způsobující značné škody na mnoha plodinách, ovoci a zelenině. Výluh routy (10%) přidaný do umělé diety vrtule způsobil:

- a) 100% mortalitu vajíček
- b) opozdila se přeměna prvního instaru o dva dny a klesla produkce kukel (64%) než u kontrolního pokusu (83%) kukly z prvního instaru ošetřené filtrátem nevytvářely dospělé formy. Filtrát z routy ukázal patrný inhibiční efekt i u larev komárů. Už při koncentraci 1% a 2% vyvolal 50% a 100% úmrtnost larev (ALIOTTA a kol., 1996).

Metanolvý extrakt z listů chryzantémy *Chrysanthemum morifolium* odrůda Ramat byly extrahovány postupně hexanem, ethylacetátem a metanolem. Extrakt byl začleněn do náhradní diety larev kapustové můry (*Trichoplusia ni*). Koncentrace extraktu se pohyboval mezi 500 a 5000 ppm. Pokus ukázal, že došlo k redukci růstu larev. Hlavní izolované komponenty extraktu byly dvě chlorogenové kyseliny a 5-trihydroxyflavanon 7-O-

glukuronid v koncentracích od 100 do 1000 ppm. Tyto složky začleněné samostatně do umělé diety ve zmiňovaném množství ovlivnily nebo redukovaly růst kapustové můry (*Trichoplusia ni*) a bekyně velkohlavé (*Lymantria dispar* L.) (BENINGER a kol., 2004).

V pokusu, který se prováděl na termitu (*Coptotermes formosanus*) byla hodnocena odezva tohoto druhu na pět rostlinných flavonoidů (genistin, biochanin A, apigenin, kvercetin a glyceolin). Sledovala se plodnost, mortalita a spotřeba potravy. Apigenin se ukázal při koncentraci 50 μ g nejtoxičtější. Biochanin A byl nejefektivnější při redukcii plodnosti. Postupně byly tyto dva flavonoidy testovány orálním způsobem a pak i lokální aplikací při koncentraci 100 μ g v dávce. Významný pokles v počtu potomků byl evidentní u biochaninu A v obou případech ošetření. Vybraný test aplikovaný na termití dělníky ukázal zpočátku, že jsou termiti atrahováni k filtračnímu papíru ošetřenému biochaninem A, ale po více než 72 hodinách konzumace viditelně poklesla ve srovnání s kontrolou. Biochanin se tak jeví jako slibná fytochemikálie se schopností snižovat plodnost v primární reprodukci termitů, ale je neschopen vyvolat fagostimulační aktivitu (BOUÉ a RAINA).

U třiceti sedmi flavonoidních složek (9 flavonů, 18 flavonolů, 8 flavanonů a 2 flavanolů) byl sledován vliv na potravní výběr motýla *Mamestra configurata* Walker. Výběr byl závislý na jemných rozdílech v chemickém složení potravy. Nesubstituované flavony a flavanony měly nejsilnější odpuzující účinek ve výběrovém testu naproti 7,4'-dihydroxyflavonu a dihydroxykvercetinu, který stimuloval motýla k příjmu potravy. V nevýběrovém testu flavony redukovaly jak hmotnost larev, tak larvální a pupární vývoj. Vliv flavonoidů na příjem potravy *M. configurata* by mohl být pravděpodobně využit při introdukcii těchto látek do řepky olejky (*Brassica napus*) z divokých nebo domestikovaných příbuzných druhů čeledi brukvovitých (ONYILAGHA a kol., 2004).

Nedávné výzkumy ukázaly, že chování hmyzu je ovlivněno vzájemným ovlivněním složek obsažených v potravě. Příkladem je experiment s flavonoidy rutinem a kvercetinem, které se vyskytují v listech sóji luštinaté *Glycine max* Merrill v kombinaci s isoflavonem genistinem. Tyto složky působí synergicky a narušují příjem a ukládání potravy u larev můry *Trichoplusia ni* (SIMMONS, 2003).

ELLIGER a kol. (1980) udává, že řídce se vyskytující flavonoidy jako je 4''-hydroxymaysin z kukuřice, inhibuje vývoj šedavky kukuřičné *Heliothis zea*.

Tento flavonoid byl izolován také z citlivky stydlivé *Mimosa pudica* L., jehož přítomnost by mohla přispívat k celkové rezistenci této rostliny vůči herbivorům (SIMMONS, 2003).

Reakce hmyzu na fenolické složky v potravě jsou velmi kolísavé. Např. rutin je fagostimulantem pro motýla *Heliothis virescens* a saranče *Schistocerca albolineata*, *S.*

americana, *Melanoplus differentialis*. Jeho vliv na larvy *Helicoverpa zea*, *H. armigera*, *Spodoptera littoralis*, *S. equina* a *S. exempta* ale závisí na koncentraci. Jako stimulující působí v rozmezí mezi 10^{-4} a 10^{-5} , vyšší hodnoty se projevují útlumem příjmu potravy. Shaver a LUKEFAHR (1969) uvádí, že některé flavonoly jako např. rutin, kvercetin a isokvercetin jsou velmi toxické vůči některým druhům hmyzu (SIMMONS, 2003).

Dvojaké působení některých flavonoidů jak uvádí SIMMONS (2001) ukazuje, že látky jako kvercetin, kvercetin, rutin, myricetin, myricetrin a morin stimulují příjem potravy u mandelinky okrouhlé *Plagioderia versicolora* (Laicharing), ale inhibuje jej u brouka *Phaedon brassicae* (Baly) a *Oulema oryzae* (Kuwayama). Flavonoidy zahrnují i látky stimulující kladení vajíček (ONYILAGHA a kol., 2004). Role derivátů kvercetinu ve vztahu rostlina-hmyz je složitým komplexem, který vyvolává tzv. výběrové chování. Tento složitý děj lze ilustrovat na příkladu chování larev druhu *Yponomenta*, které se živí rostlinami obsahující rutin. Jednotlivé složky přijímané potravy jsou analyzovány neurony sensil v dutině ústní. Na základě reakce neuronů na jednotlivé komponenty je potrava přijata či zpětně vyvržena (SIMMONS, 2003).

V pokusu s larvami motýla monarchy (*Danaus plexippus*) se hodnotila potravní preference, schopnost přežívat na hostitelských a nehostitelských druzích rostlin a citlivost k chemikáliím produkovaným těmito rostlinami. K testování byly vybrány rostliny z čeledi *Asclepiadaceae*, jako hostitelské druhy. Ostatní nehostitelské druhy (*Convolvulaceae*, *Fabaceae*, *Plantaginaceae*, *Ranunculaceae*, *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*, *Compositae*, *Apocynaceae*) byly konzumovány v menším množství oproti *A. curassavica*. Odezvou larev bylo sledováno to, zda hostitelské či nehostitelské chemikálie odpuzují či stimulují příjem potravy. Bylo zpozorováno, že larvy podporovala ke konzumaci přítomnost některých látek jako: sacharóza, inositol a rutin (VICKERMAN a DE BOER, 2002).

Jiné flavonoidy působí jako atraktanty pro hmyz vyvolávající požerky listů (např. bourec morušový na moruši), jako je isokvercetin (MÍKA a kol., 2001). Kvercetin 3-glukosid obsažený v pylu slunečnice *Helianthus annuus* L. stimuluje příjem potravy larev bázlivce kukuřičného *Diabrotica virgifera*. Složky pylu, především tuky a flavonoidy by mohly posilovat účinky atraktančních stimulů (SIMMONS, 2003).

Spolu s vývojem rostlin a jejich ochranných mechanismů se vyvíjely i adaptační schopnosti hmyzu. Příjmem potravy obsahující tyto látky, je ovlivněn zdravotní stav hmyzu. Některé rostliny se mohou stát vhodnými hostiteli pro hmyz. Ten nejen že se na nich živí a rozvíjí se, ale je schopen využívat rostlinných složek jako jsou flavonoidy a zabudovávat je do svého těla (SIMMONS, 2003).

Nedávno BERNAYS a CHAPMAN (2000) dokázali, že rutin obsažený v potravě sarančat je hydrolyzován ve střevě, část je vyloučena z těla a část je absorbována a metabolizována na β -3-*O*-glukosid, který je pak zabudován do kutikuly. Zde pak slouží jako ochranný štít proti patogenům a predátorům. Takovýto hmyz využívající flavonoidů ve svůj prospěch, znesnadňuje využití biologických prostředků, jako jsou např. viry při ochraně rostlin.

Příklad využití flavonoidů hmyzem představuje druh motýla *Polyommatus icarus*, který se živí rostlinami obsahující tyto látky a který je schopen zabudovávat flavonoidy do struktury svých křídel. Z pokusů, které se prováděly na obou pohlavích, se zjistilo, že samičky zabudovávaly flavonoidy do křídel o 59% efektivněji než-li samci. BURGHARDT a kol. (2000, 2001) zjistil, že akumulace flavonoidů v menším z páru křídel samiček slouží při vizuální komunikaci s opačným pohlavím a že tyto samičky byly pro samce atraktivnější než „bezflavonoidní“ samičky (SIMMONS, 2003).

Predátoři hmyzu jsou vystavováni potencionálnímu nebezpečí chemických látek obsažených v tělech svých kořistí. Specializovaní býložravci jsou spojeni se sekundárními metabolity své hostitelské rostliny a jsou schopni rychle odbourávat, eliminovat nebo akumulovat tyto allelochemikálie. Vliv těchto látek se zkoumal v dietě kořisti všestranného dravce *Podisus maculiventris*. Byly testovány dvě rozdílná stádia larev tohoto predátora. Od třetího do čtvrtého instaru a pátý instar larev byl krměn larvami motýlů *Manduca sexta* bez diety obsahující sekundární metabolity a s dietou obsahující maximální množství těchto látek (tomatin, rutin a chlorgenové kyseliny) nalezené v hostitelské rostlině rajčete jedlého *Lycopersicon esculentum*. Přestože všechny experimenty působily u kořisti potlačení rychlosti vývoje, váhového přírůstky a tempa růstu, celkově se neprokázaly žádné negativní efekty allelochemikálií v dietě kořisti na tyto proměnné, když byla dravci dodávána potrava v nadměrném množství. Negativní vliv těchto látek se projevil v případě, kdy byl přísun kořisti omezen (WEISER a STAMP, 1998).

Další roli hrají flavonoidy při opylení květů. Flavonoidy absorbují záření v oblasti blízké UV. Toto záření vnímá pouze hmyz. Ten je zářením přitahován a zajišťuje tak efektivní opylení květů (MÍKA a kol., 2001).

Každopádně, vliv flavonoidů na hmyz je předmětem neustálého výzkumu a zůstává ještě mnoho otázek, na které nebyla dosud nalezena odpověď (SIMMONS, 2003).

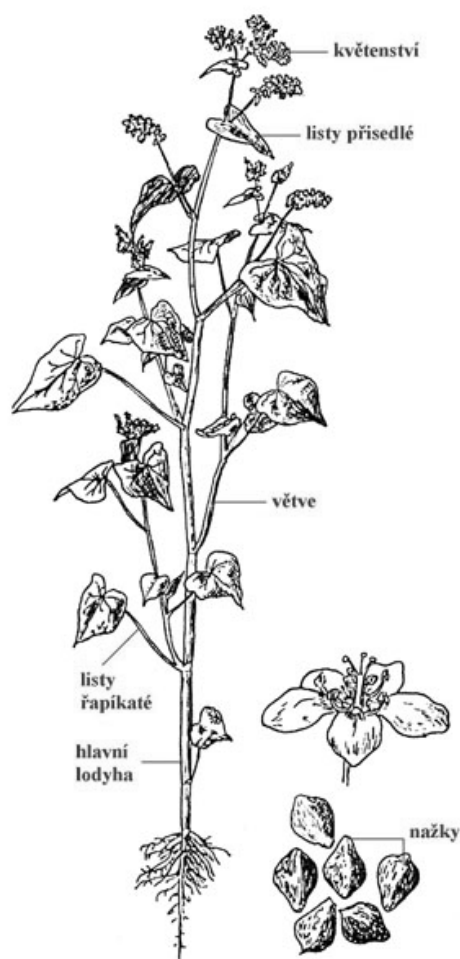
2.2 Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum* Moench.)

2.2.1 Botanická charakteristika

Pohanka se podle způsobu využití řadí k zrninám, ale botanicky je to rostlina dvouděložná a patří do čeledi rdesnovitých – *Polygoneceae* a rodu *Fagopyrum* (DE JONG, 1972). Český název je pohanka setá, *F. esculentum* Moench. (obr. 6) (PETR a HRADECKÁ, 1997).

Pohanka setá je jednoletá, cizosprašná a převážně hmyzosnubná bylina (OKROUHLÁ, 1993). Kořenový systém pohanky je křovitý. Proniká do hloubky 1 m, ale základní masa kořenů se nachází ve hloubce 0,4 m. Lodyha je asi 80–140 cm vysoká, hranatá, dutá, se slabým až silným antokyanovým zbarvením. (MICHALOVÁ, 1995). Spodní listy jsou dlouze řapíkaté, horní jsou přisedlé, šípovitého tvaru (ANONYM 2). Květy jsou drobné, bílé či narůžovělé, seskupené po 7–9 kvítcích do úžlabních hroznů nebo vrcholových chocholíků. Okvětí je pětidílné, tyčinek je 8, semeník je svrchní se třemi čnělkami (MOUDRÝ a STRAŠIL, 1999). Květy jsou různocnělečné (heterostylie)–jeden typ květu má dlouhé pylové tyčinky a krátké blizny a druhý typ má krátké pylové tyčinky a dlouhé blizny. Velmi řídké porosty kvetou 65 dní, husté 40 dní. Kvetení a následně i tvorba a zrání plodů probíhá nestejně. Zrání trvá 30–40 dnů (JAKIMENKO, 1982). Plodem je stříbřitě šedá, hnědá, až fialově černá trojboká nažka (ROBINSON, 1994). Hmotnost 1000 semen (HTS) u diploidních odrůd dosahuje 19 – 26 g, u tetraploidních 35 – 38 g (OKROUHLÁ, 1993).

Obr. 6: Pohanka setá (*Fagopyru esculentum*) (CERKAL a kol., 2006))



Pohanka vyžaduje mírné klima (MICHALOVÁ, 1995). Dobře se jí daří ve vyšších polohách s dostatkem srážek nebo v teplejších sušších polohách pod závlahou (OKROUHLÁ, 1993). Díky krátké vegetační době ji lze pěstovat i v severnějších oblastech (do 70° s.š.) s dostatečně teplým létem. Délka vegetační doby pohanky se v závislosti na době setí, nadmořské výšce, průběhu počasí a odrůdě pohybuje v rozmezí 80-120 dnů (HŘIVNA, 1996). Pro rychlé vyklíčení je však vhodné, aby byla půda do hloubky setí prohřátá na 10-12 °C (PETR a HRADECKÁ, 1997). Nesnáší těžké, chladné a slévací půdy se zásaditou půdní reakcí a vysokým obsahem volného vápníku (OKROUHLÁ, 1993).

2.2.2 Význam pohanky

Pohanka je dnes pěstována v řadě zemí především na severní polokouli (OKROUHLÁ, 1993). Roční světová produkce pohanky představuje asi 3 mil. tun při průměrných výnosech cca 1 t/ha .

Lze ji pěstovat jako hlavní tržní plodinu nebo jako druhou doplňkovou plodinu v roce (HAMR, 1999). Z hlediska pěstování je ceněna její obecná nenáročnost na pěstitelské podmínky a odolnost vůči biotickým stresům (MICHALOVÁ a HUTAŘ, 1998). Zlepšuje půdní strukturu pro následné plodiny a má vysokou krajinářsko-estetickou a ekologickou hodnotu (HONERMEIER, 1994).

V lidské výživě nachází pohanka hlavní uplatnění, neboť její semena se vyznačují vysokou nutriční a dietetickou hodnotou. Pohanka je vhodná pro diabetiky, pacienty trpící celiakií (nesnášenlivostí lepku) a při poruchách zažívacího ústrojí (MICHALOVÁ a HUTAŘ, 1998). Pěstování pohanky jako meziplodiny lze využít také protierozní ochraně půdy (OKROUHLÁ, 1993). Svým rychlým růstem brzy zastíňuje půdu a potlačuje tak plevely rychleji než ostatní obilniny (ŠPALDON a kol., 1963). Nažky, ale i zelené části pohanky lze využít jako krmivo. (LEIFERTOVÁ a LISÁ, 1991). Pohanka je významná medonosná plodina. (ŠMAJSTRLA a ŠMAJSTRLOVÁ, 1991). Pro obsah rutinu je pohanka sklizena začátkem kvetení jako surovina pro zpracování ve farmaceutickém průmyslu. (OKROUHLÁ, 1993).

2.2.3 Flavonoidní látky v pohance seté (*Fagopyron esculentum*)

Pohanka je bohatá na flavonoidy těchto skupin: flavonoly, flavony, flavanonol a anthokyany. Přehled flavonoidů pohanky je uveden v tabulce 2.

Tab. 2: Nejvýznamnější flavonoidy pohanky (HAGELS, 1996).

Flavonoly:	Rutin (kvercetin-3-rutinosid)	V květech <i>Fagopyrum esculentu</i> prokázán až roku 1908.
	Hyperosid (kvercetin-3-O-β-D-galaktosid), kvercitrin (kvercetin-3-O-α-L-rhamnosid).	v dozrávající rostlině, také v nezralých plodech, největší zásoba v rostlině v době květu.
	Kvercetin	jeho koncentrace stoupá v uschlých rostlinách.
	Nikotiflorin (kampferol-3-rutosid)	byl izolován z květů
Flavony:	Vitexin (apigenin-8-C-glukosid),	popsán v zárodečných listech
	Isovitexin (apigenin-6-C-glukosid)	
	Isoorientin (luteolin-8-C-glukosid)	
	Orientin (luteolin-6-C-glukosid)	v pučících květech.
Flavanonoly:	Aromadendrin, taxifolin,	ty lze izolovat z plodů.
Antokyany:	3-O-glukosid, 3-O-galaktosid a 3-O-rhamnosylgalaktosid	pigmenty květů. ale i v hypokotylu
Biflavony:	C-3/C-8- biapigenin	

Obsah flavonoidů během růstu se v jednotlivých částech rostliny mění. Výrazné snížení obsahu těchto látek v reprodukčních orgánech je od fáze tvorby puků do fáze tvorby plodů. V listech a stoncích jsou rozdíly během vegetace méně patrné, zvyšují se ve fázi květních puků s nejvyšším obsahem ve fázi kvetení, po které následuje snižování flavonoidů až do fáze tvorby plodů (tab. 3). Obsah rutinu převládá nad ostatními komponenty (kvercetin, kvercitrin). Podle výsledků rozborů květů pohanky je největší množství flavonoidů v pestících, dále v tyčinkách a nejméně v květním lůžku. Na obsah flavonoidů a jejich změnu v průběhu vegetace mají vliv především povětrnostní podmínky. Listy reagují obsahem flavonoidů v jednotlivých letech méně výrazně než květy (GROMOVÁ, 1990).

Tab. 3: **Dynamika akumulace flavonoidů v orgánech různých druhů pohanky seté** (mg/g zelené hmoty) (LAHANOV a kol., 2004)

Část rostliny	Fáze růstu rostliny				
	1. list	Tvorba pupat	Začátek kvetení	Plné kvetení	Hnědé nažky rostlině
listy	25,8	137,0	147,0	139	107,0
stonky		35,2	46,9	49,2	26,8
květy		105,0	109,0	131,0	70,4

Pohanka obsahuje průměrně 1,8 % rutinu (HŘIVNA, 1996). Rutin je v pohance obsažen především v listech a květech. (MICHALOVÁ, 1998). Ve zralých semenech je jeho obsah několikanásobně nižší než v nati (viz. tabulka 1). Obsah rutinu ovlivňují podmínky pěstování, genotyp, vývojová fáze a ročník (MICHALOVÁ a HUTAŘ, 1998). Nejvyšší koncentrace dosahuje rutin v raných fázích květu, později v době dozrávání jeho obsah klesá (PROCHÁZKA, 1990).

2.2.6 Zdravotní stav pohanky seté

Pohanka setá je považována za plodinu, které se choroby a škůdci vyhýbají. Odpověď je možné najít v genetickém potenciálu starých krajových odrůd. Jejich genetický fond tvoří velké množství ekotypů, které byly schopny adaptovat se na konkrétní klimatické podmínky. Zároveň je třeba vidět určité samovolné vyselektování ekotypů odolných proti jednotlivým chorobám a škůdcům (ŠMAJSTRLA a ŠMAJSTRLOVÁ, 1991). Odolnost proti chorobám se liší mezi odrůdami a je určena genetickými a biologickými vlastnostmi. Podle výzkumu je počet průduchů v epidermis a hustota jejich rozložení nejdůležitějšími důvody. Citlivé odrůdy mají 3-5krát více průduchů na jednom mm² ve vrchní epidermis než rezistentní odrůdy. Také přítomnost flavonoidů je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících rezistenci pohanky k houbám. Plané druhy obsahují více těchto látek a proto je jejich rezistence silnější (SHEVCHUK a SHEVCHUK, 1988).

Z chorob pohanky je největší koncentrace výskytu zaznamenána především u chorob houbových. Podle literárních zdrojů, bylo popsáno na pohance 23 druhů fytopatogenních hub. Podobné výsledky se prokázaly i v případě výskytu chorob virového původu, ačkoliv

nebyly ještě důkladně prostudovány. Výsledky analýzy ukázaly, že poškození na pohance v důsledku napadení chorobami může dosahovat 6,5–76 %. Vše záleží na druhu patogena, na půdních a klimatických podmínkách a také na genetickém založení rostliny (SHEVCHUK, 2004).

Nejčastější chorobou pohanky seté je *Botrytis cinerea* (*Fungi imperfecti*). Tato houba parazituje na širokém spektru rostlin. Její rozšíření podporuje vlhké počasí a hustý porost (ŠMAJSTRLA a ŠMAJSTRLOVÁ, 1991). Houba napadá pohanku v pokročilejších fázích růstu. Nejdříve na kořenovém krčku vznikají hnědé skvrny a klíčící rostliny zahnívají. Úhyn rostlin je velký, porosty jsou řídké. Velmi intenzivně se choroba šíří za deštivého počasí. Na starších rostlinách se objevují tmavošedé povlaky pokryté jemnou černou blankou. Napadené listy a nažky odumírají. Za suchého počasí se skvrny na listech mění na hnědé jizvy bez příznaku plísně. Choroba se šíří konidiemi, přezimuje skleróciemi-černé kaménkovité útvary. (MICHALÍKOVÁ, 1989).

V růstové fázi klíčení a vzcházení může být semeno pohanky, není-li mořené, napadené houbami, patřícími k epifytní mikroflóře a některými půdními fytopatogenními mikroorganismy. Fuzáriové vadnutí pohanky je jednou z nejnebezpečnějších chorob vůbec . (MICHALÍKOVÁ, 1989). Z původců komplexu kořenových hnilob způsobují významné výnosové ztráty houby rodu *Fusarium* (*Fungi imperfecti*), především *Fusarium oxysporum*, které způsobují vadnutí a usychání rostlin jako následek ucpání cévních svazků vláknou patogena a účinkem toxinů vylučovaných houbou a *Fusarium solani* – kořenová spála (uhnívání báze stonků a kořenů). Napadené rostliny vadnou v důsledku poškození cévních svazků, které nekrotizují. Houba *Fusarium oxysporum* Sch. velmi intenzivně fruktifikuje. Makro a mikrokonidie slouží na rozmnožování, někdy houba vytváří i chlamydospory. Tvorba sklerócií není vyloučená. Zamořená půda je hlavním zdrojem nebezpečí (MILEVOJ, 1989).

Mezi další houbové patogeny vyskytující se na pohance patří zástupci způsobující listové choroby jako houba *Phytophthora parasitica* Destr. (nebo specifická houba *Phytophthora fagopyri* Takimoto), *Perenospora fagopyri*, *Erysiphe communis*, *Ascochyta fagopyri* Br. a další (viz. tabulka 4) (BENADA a kol., 1958, MICHALÍKOVÁ, 1989).

Tab. 4: **Choroby a škůdci pohanky** (AUFHAMMER, 2000).

Škodlivý činitel	Druh	Podmínky rozšíření	Regulace
Listové choroby	<i>Alternaria</i> sp. <i>Ascochyta</i> sp. <i>Bipolaris</i> sp. <i>Cercospora</i> sp. <i>Erysiphe</i> sp. <i>Fusicladium</i> sp. <i>Peronospora</i> sp. <i>Phytophthora</i> sp. <i>Puccinia</i> sp. <i>Ramularia</i> sp. <i>Septoria</i> sp. <i>Sphacelotheca</i> sp. <i>Uromyces</i> sp. <i>Ustilago</i> sp.	Vlhkostní a teplotní podmínky příznivé pro rozvoj druhu	Šlechtění rezistentních odrůd, osevní postup, zpracování půdy, likvidace infikovaných posklizňových zbytků regulace plevelů, moření osiva, aplikace fungicidů
Choroby stonků kořenů	<i>Botrytis</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Phytophthora</i> sp. <i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Sclerotinia</i> sp.	Teplo, mokro, vysoká vlhkost vzduchu	Osevní postup, zpracování půdy, urychlení rozkladu posklizňových zbytků
Virózy	Virus okurkové mozaiky Virus tabákové mozaiky	Napadení vektory	Šlechtění rezistentních odrůd a regulace vektorů
Škodlivý hmyz	<i>Agriotes</i> sp. <i>Agrotis</i> sp. <i>Anomala</i> sp. <i>Anthotrips</i> sp. <i>Aphis</i> sp. <i>Melolontha</i> sp. <i>Myzus</i> sp. <i>Physopa</i> sp. <i>Trachea</i> sp.	Organické zbytky, hnilob, minimalizace zpracování půdy	Osevní postup, intenzivní zpracování půdy, odstranění posklizňových zbytků plevelů, aplikace insekticidů
Hádčátka	<i>Ditylenchus</i> sp. (<i>Heterodera</i> sp.)	Osevní postup s hostitelskými druhy	Odstup hostitelských druhů v osevním postupu, regulace plevelů

Za vlhkého počasí v době dozrávání nažek se objevují různé saprofytické plísňe, které zapříčiňují houby jako *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuis* F2, *Trichoderma roseum* F2, *Cladosporium herbarum* a jiné. Tyto houby působí destruktivně na vývoj semne a mohou být příčiny snížené klíčivosti (MICHALÍKOVÁ, 1989). Některé druhy rodu *Alternaria* (*Fungi imperfecti*) jsou i listové patogeny. Napadení vede k nekrotickému poškození, které může způsobit porušení růstu rostliny. Houba se nachází ve středu poškozeného místa, které je

obklopeno neporušeným barevným kruhem. Na větších skvrnách bývají dobře patrné soustředné tmavší kroužky, které jsou pro tohoto původce charakteristické. Silněji napadené listy černají a předčasně usychají (ÜGEROVÁ a KOPÁNI, 2004).

Závažnější škody na pohance způsobují také bakteriózy (MICHALÍKOVÁ, 1989). Případnými bakteriálními parazity, kteří vyvolávají slábnutí rostliny jsou *Pseudomonas solanacearum* a nekrózy *Bacterium proteamaculans*, *Gantomonas heterocea* nebo *Pseudomonas angulata*, *Pseudomonas syringae* Van Hall (SHEVCHUK, 2004).

Symptomy viróz často unikají pozornosti pěstovatelů, přestože nejsou morfologicky tak výrazné jako mykózy, způsobují redukcí prvků úrodnosti a snižují produktivitu rostlin. Z nejčastějších viróz je to virus tabákové mozaiky (*Nicotina virus*) a virus okurkové mozaiky (*Cucumis virus*) (MICHALÍKOVÁ, 1989).

Pohanka může mít i řadu škůdců, jako např. mandelinky (*Chrysomelidae*), dřepčíky (*Psilloides* spp., *Phyllotreta* spp., *Chaetocnema* spp.) a mšice (*Aphis*). V ČR lze předpokládat napadení mšicemi, především mšicí makovou (*Aphis fabae Scopoli*). Mšice vysávají konce vegetačních vrcholů, což vyvolává svinování. Při silném napadení k zastavení růstu, tvorba nažek a HTS klesá. Mšice škodí přímo i nepřímo přenosem viróz (OKROUHLÁ, 1991).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

- Houby *Alternaria alternata* (*Fungi imperfecti*) kmen Mikulov 1203, *Botrytis cinerea* kmen 1286 a *Fusarium solani* kmen 1286 byly získány ze sbírky mikroskopických hub Ústavu půdní biologie Akademie věd ČR.
- Mšice maková *Aphis fabae* (*Aphididae*) byla získány z chovu Entomologického ústavu Akademie věd ČR.
- Osivo odrůdy Pyra pohanky seté bylo získáno z OSEVA PRO s.r.o. Odrůda byla vyšlechtěna ve ŠS Oseva, Horní Moštěnice, pracoviště Stará Ves, metodou výběru z krajových odrůd z oblasti Beskyd a severovýchodního Slovenska a tvorbou syntetické populace, povolena v roce 1990, je středně raná, velmi plastická, vhodná i pro letní výsev, barva lodyhy červená, květy růžové, odolnější k poléhání, výnos semene je 1,2-2,5 t/ha, slupkatost 25-30 %, středně okřídlená semena jsou středně velká, sivé barvy, HTS je 25-28 g.
- Chemikálie: rutin (rutin trihydrát), kvercetin a PDA (potato dextrose agar) byly získány z firmy Sigma-Aldrich.

Kultivace patogenních hub

Houby byly kultivovány na živné půdě PDA standardním způsobem.

Chov mšic

Chov mšice makové byl prováděn na bobu koňském (*Vicia faba*) za stálé teploty $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Polní pokus

Pokus byl založen v roce 2005 na pokusném pozemku v areálu Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (380 m.n.m., pH 6,5). Setí bylo provedeno 16. května 2005 maloparcelkovým secím strojem pro přesný výsev Hege 80. Pohanka byla vyseta ve čtyřech opakováních na ploše po 10 m², šířka řádku byla 12,5 cm při výsevku 200 rostlin na m². Porost nebyl mechanicky ani chemicky ošetřován. V době květu bylo odebráno 30 zdravých rostlin. Odebrané rostliny sloužily pro přípravu extraktu.

Tab. 3 Průměrné roční teploty, teploty za vegetaci a suma srážek v roce 2005 v Českých Budějovicích (podle ČHMI)

duben	květen	červen	červenec	srpen	září	Roční průměr
Průměrná teplota vzduchu za vegetaci (° C)						
9,9	14,4	17,7	19	16,8	14,8	8,8
Úhrn srážek za vegetaci (mm)						
65,3	64,7	68,3	162,3	157,3	98,3	798,3

3.2 Metody

Příprava extraktu

K přípravě extraktu byly použity listy a stonky pohanky, které byly usušeny v sušárně při teplotě 40°C. Naváženému množství vzorku byla přidána destilovaná voda v poměru 1:10. Vzorek byl ponechán po 24 hodin v teplotě 21±1°C. Následovala filtrace přes papírový filtrační papír KA 1 a Millex 0,22 µm. Takto připravený extrakt byl po naředění konidiovou suspenzí nebo destilovanou vodou v poměru 1:1 použit k pokusům.

Modifikace stupnice hodnocení klíčivosti

Stupnice klíčení hub *A. alternata*, *B. cinerea* a *F. solani* byla upravena podle standardní stupnice klíčivosti používané při hodnocení entomopatogenních hub viz Grafické listy 1 a 2 v příloze.

Příprava konidiové suspenze

Konidiová suspenze se získává přelitím povrchu plně sporulující kultury destilovanou vodou, která byla nakultivována na PDA po dobu 14-21 dní a důkladně se homogenizuje. Takto přepravená suspenze se dle potřeby naředí a po opětovné homogenizaci se nanese do počítací komůrky-hematocymetru (Neubauerova vylepšená komůrka) a v předem stanoveném počítacím poli se po sedimentaci konidií stanoví titr s tím, že v jednom počítacím poli je ± 50 jednotek a rozdíl mezi poli (STDV souboru) může být max. 15 %. Hodnota titru se počítá na základě dvou opakování (horní a dolní počítací pole komůrky) a následně se suspenze adekvátním ředěním adjustuje na příslušný titr.

Standardní test klíčivosti

Cílem tohoto biotestu je zjistit podíl vitálních tj. klíčících konidií, což nám vyjadřuje procento klíčivosti, ale i jejich následný vývoj až do fáze příjmu externích živin (tvorba myceliální masy a konidiogeneze).

Pro účely testu se použije konidiová suspenze, která se adjustuje na standardní titr ($1,0 \cdot 10^6$ konidií v 1 ml suspenze). Pomocí laboratorní kličky se takto připravená suspenze konidií nanese ve formě kapek (4 kapky na sklíčko) na povrch tenké agarové vrstvy (2 % vodní agar)

na podložním sklíčku. Po zaschnutí kapek podložní sklíčko s houbou vložíme do vlhké komůrky (petriho miska s vlhkým filtračním papírem na dně). Takto připravené vzorky se umístí do plastických sáčků a inkubují v termostatu, který je vytemperován na teplotu 25 ± 1 °C. hodnocení vzorku se provádí vždy po 6 a pak 12, 24, 36 a 48 hodinách pomocí světelného mikroskopu až do plné fáze sporulace. Při vyhodnocení se hodnotí minimálně 50 konidií z každého vzorku, při čemž ke každé konidii se přiřadí příslušný index GI (0-3 v intervalu 0,5), který přesně specifikuje stupeň naklíčení a vývoj patogena. Z takto vyhodnocených vzorků se vypočítá průměrný index naklíčení se směrodatnou odchylkou.

Stanovení radiálního růstu

Cílem tohoto testu je zjistit tvar a plochu středových kultur za jednotku času.

Terčík houby o průměru 5 mm vykrojený z mateřské z mateřské kultury se položí do středu petriho misky. Živným médiem v petriho misce je PDA v kombinaci s rozpuštěným rutinem (kvercetinem) v požadovaných koncentracích (5, 2, 1, 0,5, 0,1 mM) a kontrola. Po nanesení terčíku na petriho misce se misky položí v plastických sáčcích do termostatu, který je vytemprován na teplotu 25 ± 1 °C. Hodnocení a měření průměru se provádí vždy 24, 65, 89 a 113 hodinách. Radiální průměr se měří pravítkem nejméně u 4 kultur od každé varianty. Z naměřených dat se vypočítá následně průměr.

Test potravní preference mšic

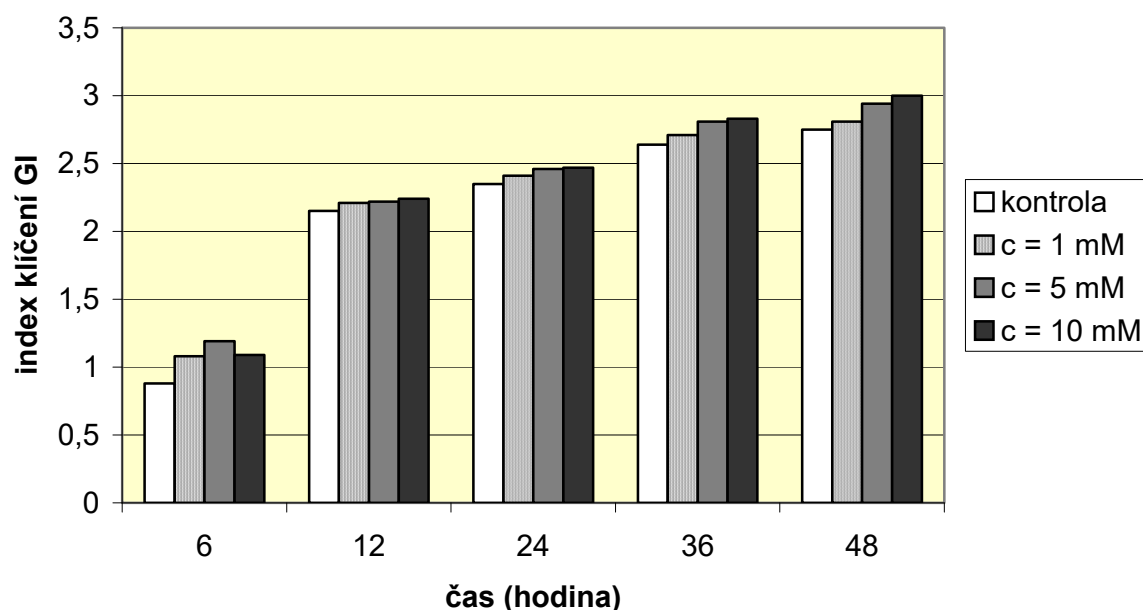
Cílem tohoto testu bylo zjistit, zda je ovlivněna potravní preference mšic (*Aphis fabae*) v závislosti na koncentraci a druhu testovaných flavonoidů, kterými byly ošetřeny hostitelské rostliny bobu setého (*Vicia faba* L.).

Hostitelská rostlina infestována mšicemi byla zasazena do otvoru ve víčku plastického kelímku. Kelímek byl umístěn na jiný plastický kontejner naplněný do $\frac{3}{4}$ vodou. Mladé rostlinky bobu vysoké asi 3 cm byly postupně namáčeny v různých koncentracích (1, 5, 10 mM) rutinu (kvercetinu) a výluhu ze stonku a listů pohanky. Takto ošetřené rostliny byly usazeny do otvorů ve víčku, vytvořených v kruhu kolem hostitelské rostliny. Kontejnery byly uloženy do místnosti s teplotou 20 ± 2 °C. Hodnocení testu se provedlo po 12 hodinách pomocí binokulárního mikroskopu. Při hodnocení se zaznamenával počet jedinců na rostlině. Statistické zhodnocení bylo provedeno Tukey HSD testem za pomocí programu Statistika 6.0.

4 Experimentální část a výsledky

4.1 Vliv rutinu na klíčivost fytopatogenních hub *Alternaria alternata*, *Botrytis cinera* a *Fusarium solani*

GRAF 1. Vliv rutinu na klíčivost spor houby *Alternaria alternata*



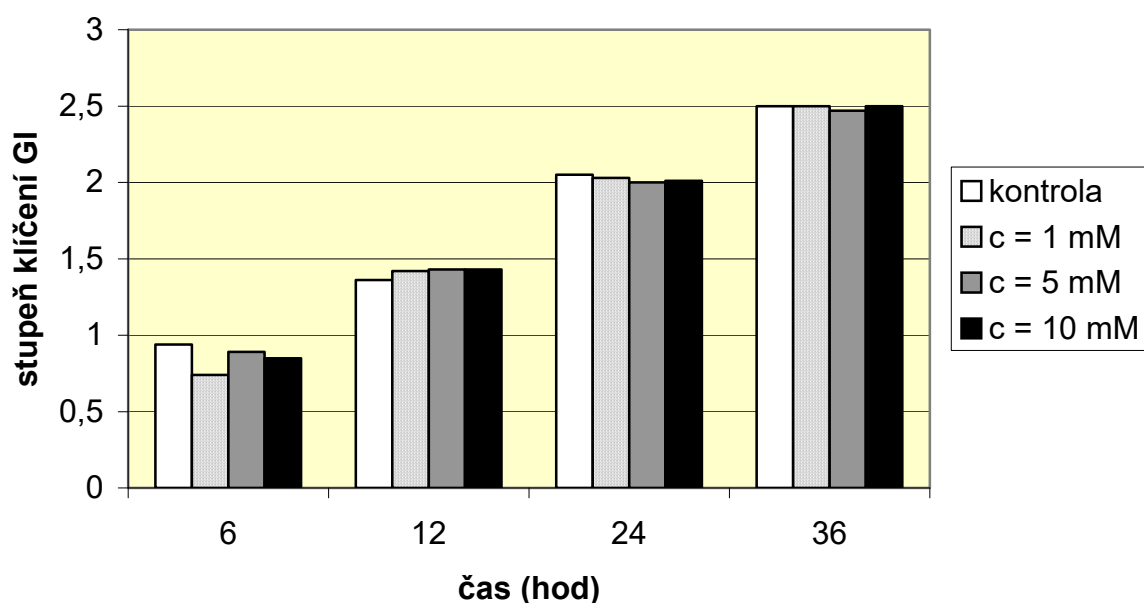
TABULKA 1. Vliv rutinu na klíčivost spor houby *Alternaria alternata* (GI \pm SD)

čas (hod)	kontrola		c = 1 mM		c = 5 mM		c = 10 mM	
6	0,88	0,51	1,08	0,34	1,19	0,34	1,09	0,37
12	2,15	0,20	2,21	0,23	2,22	0,22	2,24	0,24
24	2,35	0,24	2,41	0,16	2,46	0,26	2,47	0,13
36	2,64	0,20	2,71	0,23	2,81	0,24	2,83	0,21
48	2,75	0,24	2,81	0,24	2,94	0,17	3,00	0,00

V porovnání s kontrolní variantou (*A. alternata* bez rutinu) byl zjištěn spíše pozitivní efekt obsahu rutinu v živné půdě na klíčivost spor houby *A. alternata*. Po 6 hodinách dosahovaly vyšších hodnot indexu klíčivosti koncentrace 1 a 10 mM, nejvyšší aktivita byla zaznamenána u koncentrace 5 mM (+26,05%) oproti kontrolnímu testu. Po 12 hodinách došlo k nárůstu hodnot klíčivosti u všech koncentrací zaznamenaly nárůst. Se zvyšující se koncentrací se zvyšoval i index naklíčení u koncentrace 1 mM o 2,71%, u 5 mM o 3,15% a u 10 mM to bylo

o 4,01%. Po 24 a 36 hodinách se stav výrazně nelišil, hodnoty se stupňovaly podle zvyšující se koncentrace. Po 48 hodinách dosáhl nejrychleji stupně GI 3 pokus s koncentrací 10 mM a to 8,33% oproti kontrole.

GRAF 2. Vliv rutinu na klíčivost spor houby *Botrytis cinerea*

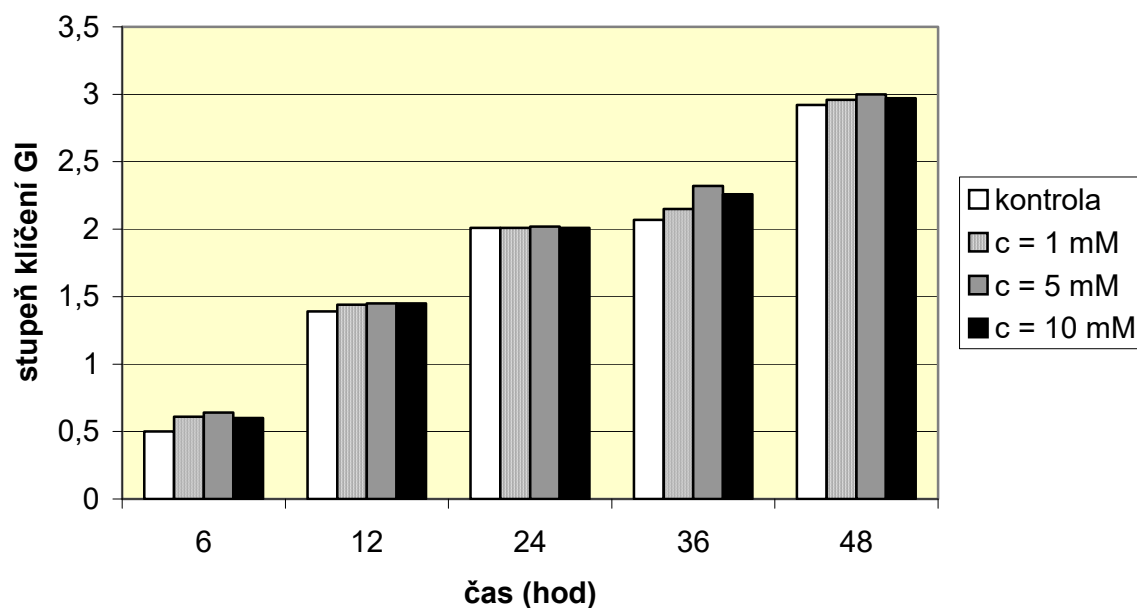


TABULKA 2. Vliv rutinu na klíčivost spor houby *Botrytis cinerea* (GI \pm SD)

čas (hod)	kontrola		c = 1 mM		c = 5 mM		c = 10 mM	
6	0,94	0,02	0,74	0,04	0,89	0,11	0,85	0,00
12	1,36	0,02	1,42	0,04	1,43	0,06	1,43	0,02
24	2,05	0,01	2,03	0,00	2,00	0,00	2,01	0,01
36	2,50	0,00	2,50	0,02	2,47	0,02	2,50	0,00

Po 6 hodinách testu se objevil v porovnání s kontrolou (*B. cinerea* bez rutinu) inhibiční vliv rutinu u všech koncentrací. Nejvýrazněji se však projevil u koncentrace 1 mM (-21,28%). Po 12 hodinách došlo k opačnému efektu, kontrola oproti ostatním koncentracím zaostávala v klíčení v průměru o 4,89%. Po 24 hodinách testu se hodnoty téměř vyrovnaly a po 36 hodinách dosáhly koncentrace 10 mM, 1 mM a kontrola společně indexu 2,5. Pokus s koncentrací 5 mM se opozdil o 1,2% oproti kontrole.

GRAF 3. Vliv rutinu na klíčivost spor houby *Fusarium solani*



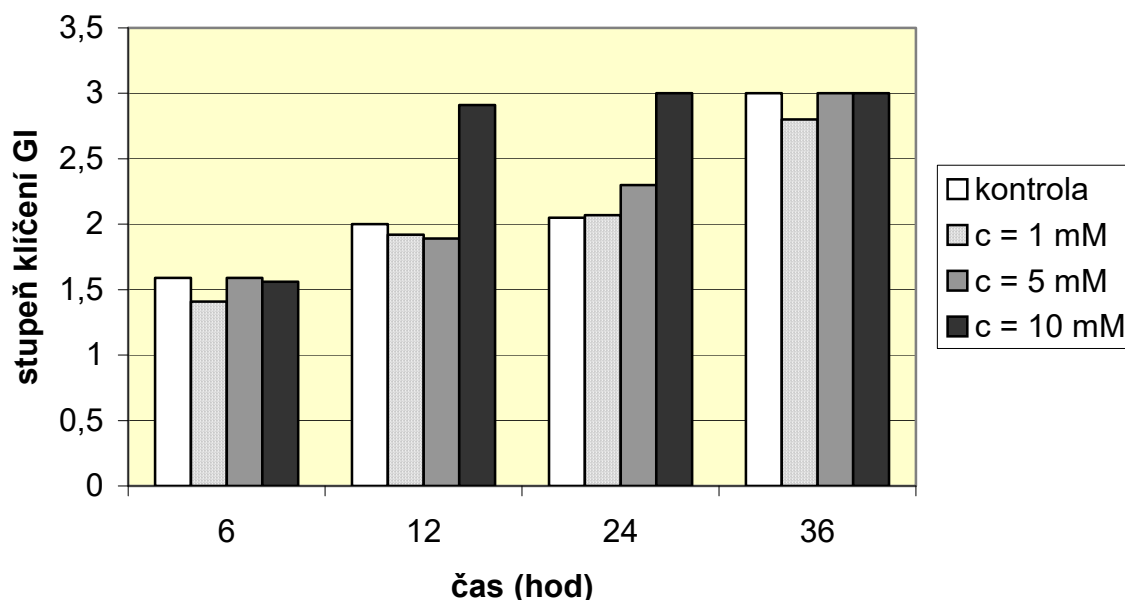
TABULKA 3. Vliv rutinu na klíčivost spor houby *Fusarium solani* (GI \pm SD)

čas (hod)	kontrola		c = 1 mM		c = 5 mM		c = 10 mM	
6	0,50	0,01	0,61	0,00	0,64	0,00	0,60	0,01
12	1,39	0,15	1,44	0,01	1,45	0,01	1,45	0,01
24	2,01	0,00	2,01	0,01	2,02	0,01	2,01	0,03
36	2,07	0,04	2,15	0,02	2,32	0,03	2,26	0,01
48	2,92	0,00	2,96	0,01	3,00	0,01	2,97	0,01

V porovnání s kontrolní variantou (*F. solani* bez rutinu) se ukázalo, že po 6 hodinách expozice spor rutinou všechny zmiňované koncentrace podporovaly klíčení. Nejviditelněji pak u pokusu 5 mM (+20,47%). Méně u koncentrací 1 a 10 mM (+17,21% a +15,83%). Po dalších 6 hodinách se rozdíl v rychlosti klíčení zvýraznil u všech testovaných koncentrací o stejnou hodnotu +4,48% oproti kontrole. Po 24 hodinách nebyl zaznamenán velký rozdíl mezi testovanými koncentracemi a kontrolou. Po 36 hodinách došlo k změnám v rychlosti klíčení především u koncentrace 5 mM (+10,58%) také u 10 mM (+8,41%) a nejméně u 1 mM (+3,72%). Po 48 hodinách dosáhl indexu GI 3 pokus s koncentrací 5 mM.

4. 2 Vliv kvercetinu na klíčivost fytopatogenních hub *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* a *Fusarium solani*

GRAF 4. Vliv kvercetinu na klíčivost spor houby *Alternaria alternata*

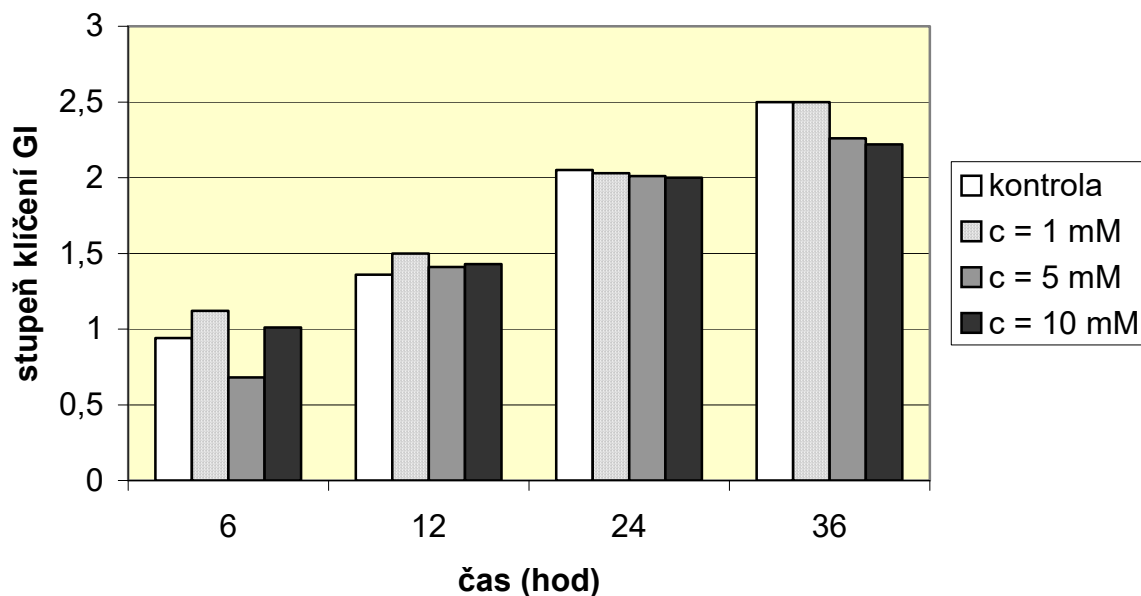


TABULKA 4. Vliv kvercetinu na klíčivost spor houby *Alternaria alternata* (GI ± SD)

čas (hod)	kontrola		c = 1 mM		c = 5 mM		c = 10 mM	
6	1,59	0,24	1,41	0,25	1,59	0,21	1,56	0,18
12	2,00	0,00	1,92	0,19	1,89	0,21	2,91	0,17
24	2,05	0,15	2,07	0,16	2,3	0,24	3,00	0,23
36	3,00	0,00	2,8	0,24	3,00	0,00	3,00	0,00

V porovnání s kontrolní variantou (*A. alternata* bez kvercetinu) byla patrná mírná inhibice klíčení u koncentrace 1 mM (-11,32%). Po 12 hodinách se projevuje u koncentrace 10 mM zvýšení indexu klíčivosti oproti kontrolnímu testu o +1,27%. Po 36 hodinách dosáhly indexu GI 3 současně koncentrace 5 a 10 mM spolu s kontrolou. Koncentrace 1 mM vykazovala o – 6,67% nižší klíčivost oproti kontrolní variantě.

GRAF 5. Vliv kvercetinu na klíčivost spor houby *Botrytis cinerea*

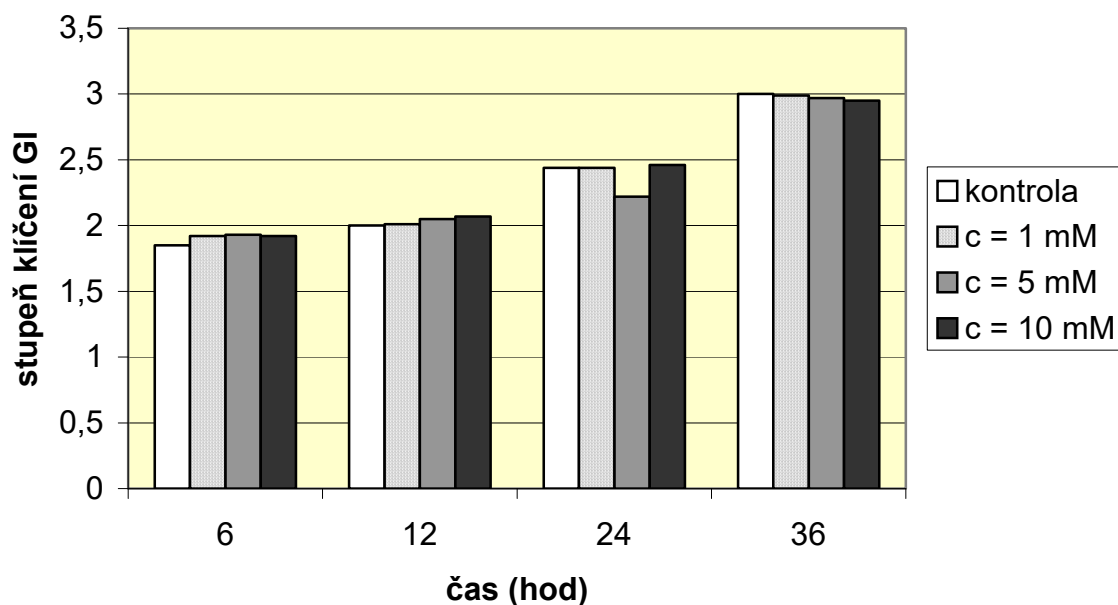


TABULKA 5. Vliv kvercetinu na klíčivost spor houby *Botrytis cinerea* (GI \pm SD)

čas (hod)	kontrola		c = 1 mM		c = 5 mM		c = 10 mM	
6	0,94	0,02	1,12	0,04	0,68	0,09	1,01	0,01
12	1,36	0,02	1,50	0,04	1,41	0,01	1,43	0,01
24	2,05	0,01	2,03	0,03	2,01	0,01	2,00	0,00
36	2,50	0,00	2,50	0,00	2,26	0,00	2,22	0,02

Z tabulky je patrné, že po prvních 6 hodinách testu hodnoty GI u různých koncentrací kvercetinu oproti kontrolní variantě kolísají. Podpurný vliv kvercetinu na klíčení konidií byl zaznamenán u koncentrací 1 mM a 10 mM (+16,07% a +6,93%), inhibice byla naopak zjištěna u 5 mM koncentrace (-38,24%). Po 12 hodinách se objevil podpurný efekt u všech koncentrací, nejvýrazněji se projevil u koncentrace 1 mM (+9,33%). Po 24 hodinách se hodnoty téměř vyrovnaly, přičemž kontrola nepatrně přesahovala hodnoty ostatních koncentrací. Posledního hodnoceného stupně klíčení dosáhly společně kontrola a 1 mM koncentrace 5 mM a 10 mM zaostávaly za kontrolním pokusem o -9,6% a -11,2%.

GRAF 6. Vliv kvercetinu na klíčivost spor houby *Fusarium solani*



T

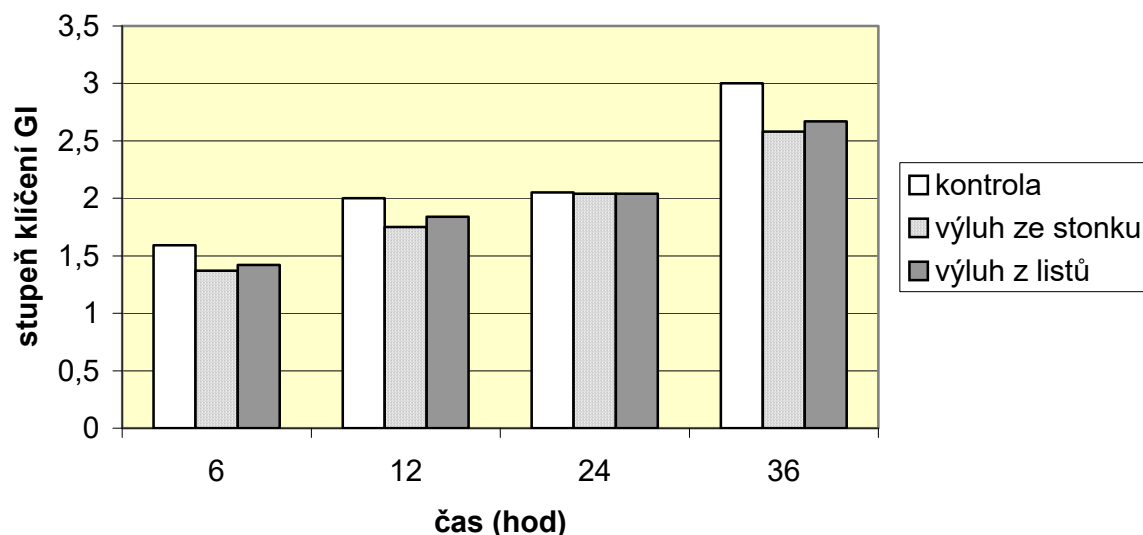
ABULKA 6. Vliv kvercetinu na klíčivost spor houby *Fusarium solani* (GI \pm SD)

čas (hod)	kontrola		c = 1 mM		c = 5 mM		c = 10 mM	
6	0,98	0,01	1,08	0,00	1,00	0,00	1,08	0,01
12	1,85	0,15	1,92	0,01	1,93	0,01	1,92	0,01
24	2,00	0,00	2,01	0,01	2,05	0,01	2,07	0,03
36	2,44	0,04	2,44	0,02	2,22	0,03	2,46	0,01
48	3,00	0,00	2,99	0,01	2,97	0,01	2,95	0,01

V prvních 6 hodinách pokusu byly zaznamenány nejvyšší hodnoty klíčení spor u koncentrací 1 a 10 mM shodně o +9,3% oproti kontrole (*F. solani* bez rutinu). Po 12 hodinách se zvýšil index klíčivosti u všech koncentrací oproti kontrole v průměru o 3,65%. Po 24 byl zjištěn pozitivní efekt, který se zvyšoval se stoupající koncentrací. U 1 mM o +0,49%, u 5 mM o +2,20% a u 10 mM o +3,38%. Po 36 hodinách byla zaznamenána inhibice klíčení především u koncentrace 5 mM (-9,18%). Po 48 hodinách dosáhla GI 3 kontrolní varianta, za ní pak s klesajícím indexem následovaly ostatní koncentrace. Pokus s koncentrací 10 mM byl opožděn o 1,67%.

4.3 Vliv výluhu ze stonku a listů pohanky seté na klíčivost fytopatogenních hub *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* a *Fusarium solani*

GRAF 7. Vliv výluhu na klíčivost spor houby *Alternaria alternata*

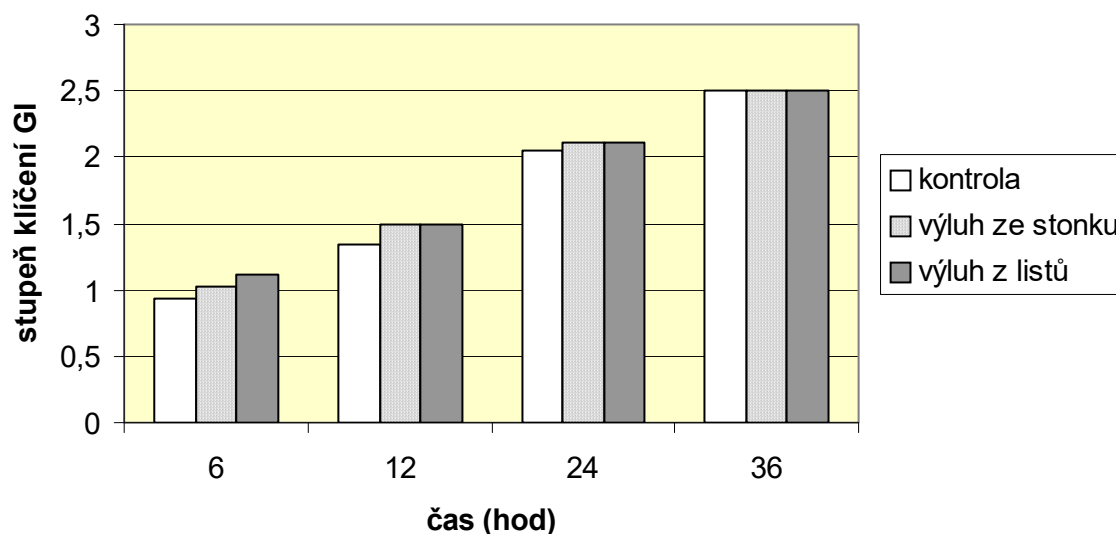


TABULKA 7. Vliv výluhu na klíčivost spor houby *Alternaria alternata* (GI \pm SD)

čas (hod)	kontrola		výluh ze stonku		výluh z listů	
6	1,59	0,24	1,37	0,22	1,42	0,22
12	2,00	0,00	1,75	0,25	1,84	0,24
24	2,05	0,15	2,04	0,13	2,04	0,00
36	3,00	0,00	2,58	0,18	2,67	0,24

Po 6 hodinách testu se oproti kontrolní variantě (*A. alternata* bez výluhu) projevila deprese v klíčení spor nejvýrazněji u varianty výluhu ze stonku (-13,84%), méně u varianty výluhu z listů (-10,69%). Tato tendence byla patrná i při kontrole po 12 hodinách, kdy výluh ze stonku viditelněji potlačoval klíčení (-12,5%) než výluh z listů (-8%). Po 24 hodinách se rozdíl mezi kontrolní variantou a výluhy vyrovnaly (-0,48%). Po 36 hodinách dosahuje GI 3 u kontrolní varianty, za ní následuje výluh z listů o -11% a o necelý půl stupeň (-14%) zaostává výluh ze stonku.

GRAF 8. Vliv výluhu na klíčivost spor houby *Botrytis cinerea*

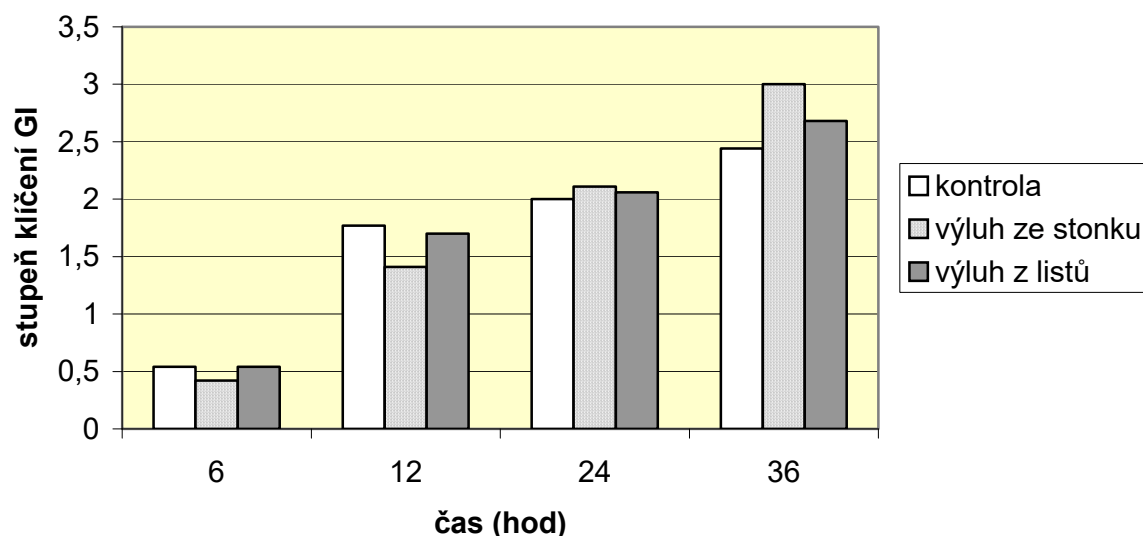


TABULKA 8. Vliv výluhu na klíčivost spor houby *Botrytis cinerea* (GI \pm SD)

čas (hod)	kontrola		výluh ze stonku		výluh z listů	
	GI	SD	GI	SD	GI	SD
6	0,94	0,02	1,02	0,01	1,11	0,01
12	1,34	0,02	1,50	0,01	1,50	0,00
24	2,05	0,01	2,11	0,01	2,11	0,01
36	2,50	0,00	2,50	0,00	2,50	0,01

Ze získaných hodnot je patrný podpůrný efekt výluhu na klíčení spor po prvních 6 hodinách testu, přičemž výluh z listů podporoval klíčení výrazněji (+15,32%) než-li výluh ze stonku (+7,84). Po 12 hodinách se hodnoty obou výluhů vyrovnaly a přesáhly index klíčení kontrolního testu o 10,67%. Po dalších 12 hodinách testu se situace nezměnila, oba výluhy podporovaly růst houby výrazněji než kontrolní pokus. Po 36 hodinách dosáhly všechny varianty společně indexu GI 2,5.

GRAF 9. Vliv výluhu na klíčivost spor houby *Fusarium solani*



TABULKA 9. Vliv výluhu na klíčivost spor houby *Fusarium solani* (GI \pm SD)

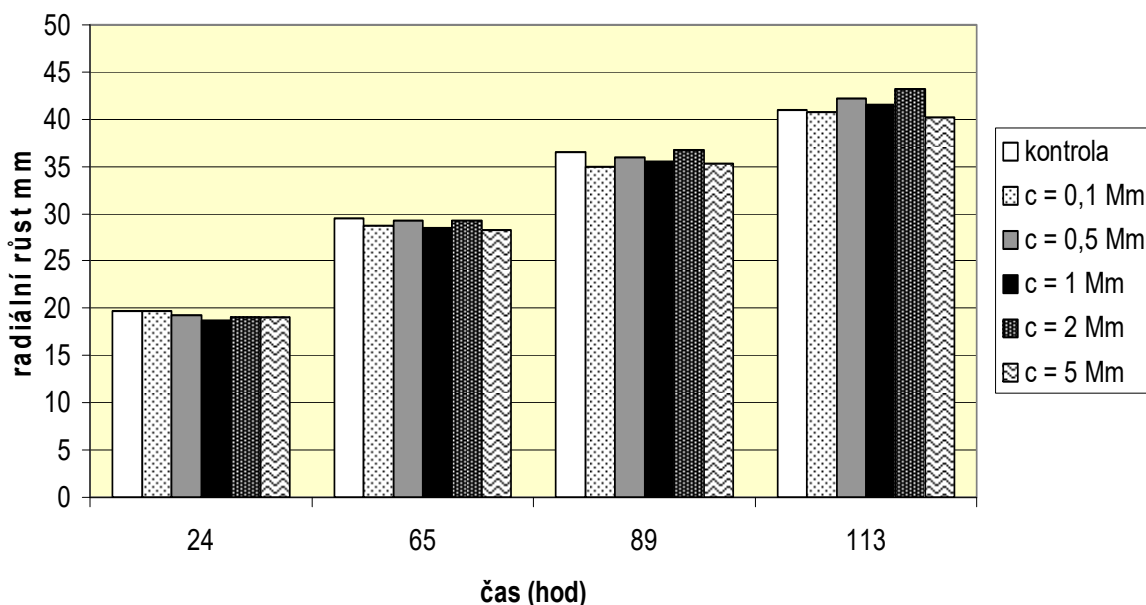
čas (hod)	kontrola		výluh ze stonku		výluh z listů	
6	0,54	0,01	0,42	0,02	0,54	0,03
12	1,77	0,13	1,41	0,01	1,70	0,04
24	2,00	0,00	2,11	0,01	2,06	0,01
36	2,44	0,04	3,00	0,00	2,68	0,01

Po 6 hodinách pokusu byl v porovnání s kontrolní variantou (*F. solani* bez výluhu) zaznamenán inhibiční efekt u varianty s 50% obsahem výluhu stonku a to o -22,22%. Tento efekt přetrvával i po dalších 6 hodinách. Mírné potlačení byl zjištěn i u varianty s výluhem z listů (-4,24%). Po 24 hodinách dochází k výrazné změně, u výluhu ze stonku je viditelný nárůst hodnot a to o +5,21% oproti kontrole. Po 36 hodinách dosahuje stupně GI 3 pokus obsahující výluh ze stonku, kontrolní variantu předstihnul o polovinu stupně (+18,67%).

4.4 Vliv živné půdy s obsahem rutinů na růst fytopatogenní houby

Alternaria alternata, *Botrytis cinerea* a *Fusarium solani*

GRAF 10. Radiální růst kultur houby *Alternaria alternata* na agarových živných půdách s přidávkem rutinů (základní živná půda – PDA)



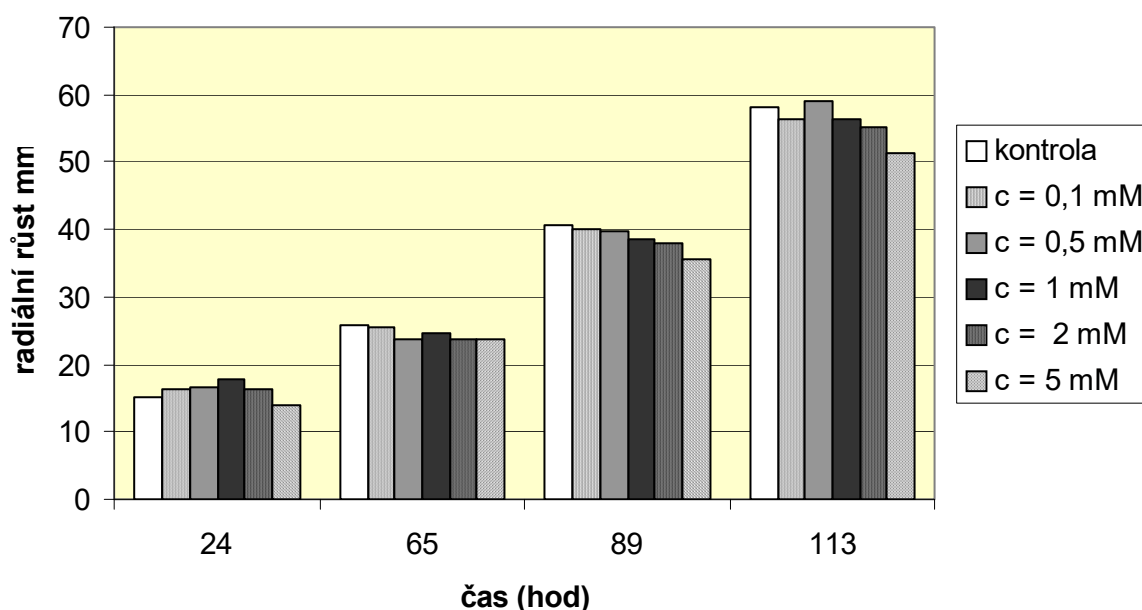
TABULKA 10. Vliv rutinů na radiální růst (v mm) houby *Alternaria alternata* na živných půdách s přidávkem rutinů (základní živná půda – PDA)

čas (hod)	kontrola	c = 0,1 mM	c = 0,5 mM	c = 1 mM	c = 2 mM	c = 5 mM
24	19,75	19,75	19,25	18,75	19,00	19,00
65	29,50	28,75	29,25	28,50	29,25	28,25
89	36,50	35,00	36,00	35,50	36,75	35,25
113	41,00	40,75	42,25	41,50	43,25	40,25

V prvních 24 hodinách v porovnání s kontrolní variantou (*A. alternata* PDA bez rutinů) byl patrný negativní vliv obsahu rutinů na růst houby, nejvíce u koncentrace 1 mM (-5,07%). Po dalších 41 hodinách se vliv rutinů výrazněji projevuje u koncentrací 0,1 mM (-2,54%), 1 mM (-3,39%) a 5 mM (-4,23%). Po 89 hodinách se objevuje u koncentrace 2 mM opačný efekt. Dochází k podpoře růstu o 0,68% oproti kontrole. Po 113 hodinách byl zjištěn podpurný vliv na růst mycelia i u koncentrací 0,5 a 1 mM. U koncentrace 2 mM je pozitivní

efekt nejpatrnější (+5,20%) tedy o 2,25 mm větší hodnota oproti kontrole. Z výsledků vyplynulo, že nejefektivněji potlačovala růst mycelia varianta s nejvyšší koncentrací 5 mM v prvních 24 a 65 hodinách částečně také koncentrace 0,1 a 1 mM, které se ale ke konci pokusu staly spíše stimulanty růstu.

GRAF 11. Radiální růst kultur houby *Botrytis cinerea* na živných půdách s přidavkem rutinu (základní živná půda – PDA)



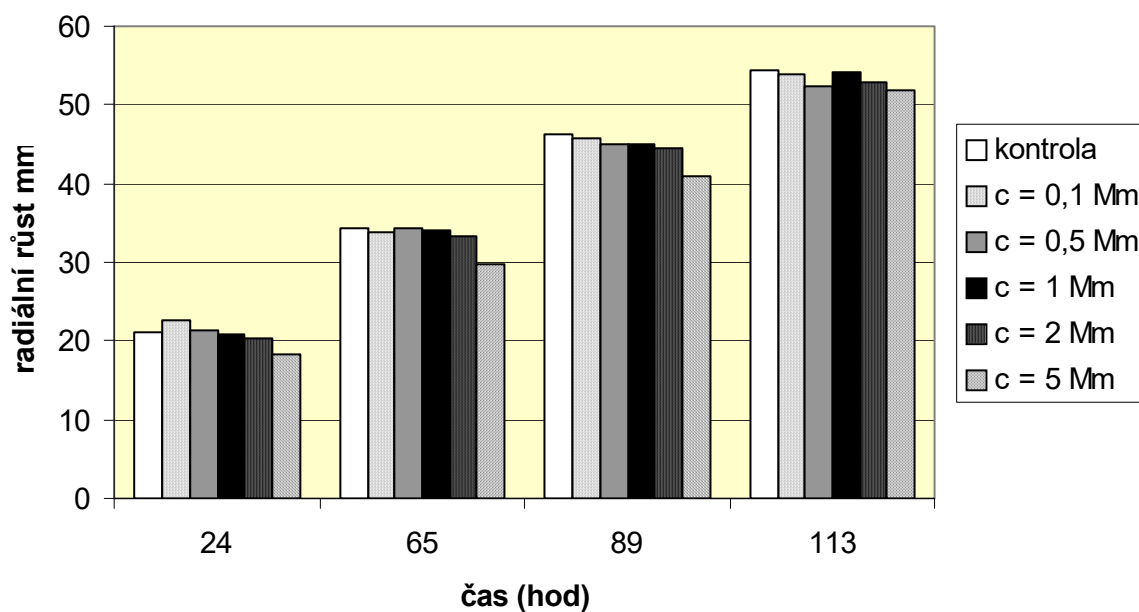
TABULKA 11. Vliv rutinu na radiální růst (v mm) houby *Botrytis cinerea* na živných půdách s přidavkem rutinu (základní živná půda – PDA)

čas (hod)	kontrola	c = 0,1 mM	c = 0,5 mM	c = 1 mM	c = 2 mM	c = 5 mM
24	15,25	16,25	16,75	17,75	16,25	14,00
65	25,75	25,50	23,75	24,75	23,75	23,75
89	40,50	40,00	39,75	38,50	38,00	35,50
113	58,25	56,25	59,00	56,25	55,25	51,25

V prvním hodnocení po 24 hodinách byl zjištěn rozdíl mezi hodnotami pozorování v porovnání s kontrolní variantou (*B. cinerea* na PDA bez rutinu). Pouze v případě koncentrace 5 mM, kde byl zjištěn inhibiční vliv na růst houby (-8,19%) o 1,25 mm. Varianta 0,5 mM a 1 mM růst podporovaly (+6,15%) a (+14,08%), což představuje 2,5 mm oproti

kontrola. Ostatní koncentrace byly na stejné růstové úrovni jako kontrola. Po 65 hodinách se objevil znatelný rozdíl v naměřených hodnotách u všech koncentrací oproti kontrolnímu variantě. Nejvýraznější potlačení růstu bylo patrné u variant koncentrací 0,5, 2 a 5 mM, shodně o 7,77% tedy o 2 mm menší průměr než-li kontrolní varianta. Nejmenší vliv vykazovala koncentrace 0,1 mM. V pozorování po 89 hodinách byl zřejmý klesající negativní vliv společně s klesajícími koncentrací rutinů v živné půdě. Nejnižších hodnot dosahoval růst u pokusu s 5 mM rutinů. V porovnání s kontrolní variantou byl průměr mycelia o 5 mm menší (-12,34%). Po 113 hodinách se ukázalo, že koncentrace 5 mM dále nejefektivněji potlačovala růst houby (-6,87%). U ostatních koncentrací byl efekt méně patrný, u koncentrace 0,5 mM byl vliv dokonce mírně podpůrný (+1,27%).

GRAF 12. Radiální růst kultur houby *Fusarium solani* na agarizovaných živných půdách s přidávkem rutinů (základní živná půda – PDA)



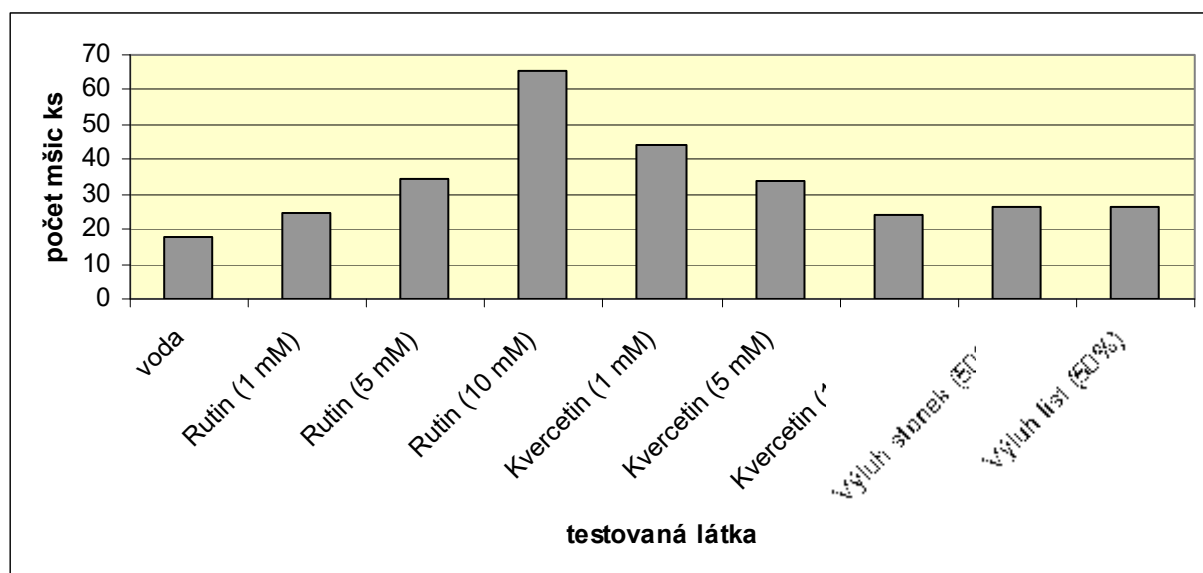
TABULKA 12. Vliv rutinu na radiální růst (v mm) houby *Fusarium solani* na živných půdách s přidavkem rutinu (základní živná půda – PDA)

čas (hod)	kontrola	c = 0,1 mM	c = 0,5 mM	c = 1 mM	c = 2 mM	c = 5 mM
24	21,00	22,75	21,25	20,75	20,25	18,25
65	34,25	33,75	34,25	34,00	33,25	29,75
89	46,25	45,75	45,00	45,00	44,50	41,00
113	54,50	54,00	52,50	54,25	53,00	51,75

Po 24 hodinách v porovnání s kontrolní variantou (*F. oxysporum* na PDA bez rutinu) vykazovaly naměřené hodnoty růstu minimální rozdíly. Pouze varianta 0,1 a 0,5 mM drobně přesahuje průměrné hodnoty kontrolního pokusu +1,17% a +7,69%. Po 65 hodinách se objevuje výrazný inhiční vliv u koncentrace 5 mM (-13,14%) což je o 4,5 mm menší průměr mycelia oproti kontrole. Koncentrace 0,5 mM dosahuje stejných hodnot jako kontrolní pokus. Po 89 hodinách se situace příliš nemění, nejvyšší koncentrace vykazuje nejvyšší inhiční efekt až o 5,25 mm (-11,35%) na rozdíl od kontroly. Po 113 hodinách je zaznamenán pokles růstu nejen u nejvyšší koncentrace 5 mM (-5,05%), ale i u koncentrací 0,5 mM (-3,67%) a 2 mM (-2,75%). U ostatních pokusů nejsou zaznamenány výraznější růstové výkyvy.

4.5 Stanovení vlivu rutinu, kvercetinu a výluhu z listů a stonku pohanky seté na potravní preferenci mšice makové *Aphis fabae*

GRAF 13. Test potravní preference mšice makové (*Aphis fabae*) na obsah látek v přijímané potravě



TABULKA 13. Test potravní preference mšice bobové (*Aphis fabae*) na obsah látek v přijímané potravě

testovaná látka	průměrný počet mšic na rostlině	SD	diference
kontrola	17,7	3	a
rutin (1 mM)	24,7	4	a
rutin (5 mM)	34,3	17	ab
rutin (10 mM)	65,3	11	c
kvercetin (1 mM)	44,3	15	b
kvercetin (5 mM)	33,7	4	ab
kvercetin (10 mM)	24,3	14	a
výluh stonků (50%)	26,3	9	a
výluh listů (50%)	26,3	5	a

Z naměřených hodnot je patrné, že obsah látek aplikovaných na rostliny bobu měly na mšice atrakční účinek. Nejvyšší počet mšic byl napočítán na rostlinách varianty s rutinem o koncentraci 10 mM, která přesahovala počet mšic na kontrolní variantě v průměru o 48 kusů (+72,9%). Druhou nejvíce preferované byly rostliny s aplikovaným roztokem 1 mM

kvercetinů s počtem 27,7 ks mšic tedy o +60% a třetí nejvíce napadená rostlina bobu byla namočena v 5 mM roztoku rutinu, zde byl počet mšic 34,3 ks tedy o 16,6 ks mšic více než na kontrolní rostlině. Stejných hodnot dosáhly varianty s obsahem výluhu ze stonků a listů (+32,7%). Mezi jednotlivými koncentracemi rutinu a kvercetinů byl průkazný rozdíl. S zvyšující se koncentrací rutinu atraktivita rostliny pro mšice narůstala u kvercetinů tomu bylo naopak.

5 Diskuse

Diplomová práce je věnována řešení účinků flavonolu rutinu, kvercetinu a výluhu z listů a stonků pohanky seté na vybrané fytopatogenní mikroorganismy *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* a obecně rozšířeného herbivorního škůdce mšice makové (*Aphis fabae*). Klíčovým aspektem při jejím řešení bylo nalézt vhodnou metodu kultivace vybraných fytopatogenních hub a modifikovat stupnici pro hodnocení klíčivosti hub pro jednotlivé druhy. V průběhu řešení se osvědčila kultivace standardním způsobem na PDA, ačkoliv vlivem dlouhodobé kultivace na tomto médiu došlo u *Botrytis cinerea* ke ztrátě schopnosti fruktifikovat. Z tohoto důvodu a pro dlouhý vývoj tohoto patogena byla v testech na klíčivost brána nejvyšší hodnota pouze GI 2,5 tedy tvorba sterilních hyf.

Stupnice pro hodnocení klíčivosti se pro jednotlivé houby příliš nelišila, pouze v případě *A. alternata* a *B. cinerea* se přihlíželo k vlastnostem spor klíčit více než jedním klíčkem. Délka vývojového cyklu *A. alternata* a *F. solani* se v obou případech pohybovala v rozmezí 36 až 42 hodin.

Test na klíčivost spor hub v suspenzi s obsahem rutinu prokázal podpůrný vliv tohoto flavonolu na klíčení všech testovaných houbových patogenů. Nejmenší rozdíly v klíčení byly zaznamenány u *Botrytis cinerea*, kde se na počátku testu projevoval mírný inhibiční efekt přídavku rutinu. Klíčení spor houby *Fusarium solani* bylo taktéž přídavkem rutinu stimulován, přičemž u koncentrace 5 mM se pozitivní vliv projevoval nejvýrazněji a to po dobu celého testu. Houba *Alternaria alternata* byla podporována přídavkem rutinu po celý průběh testu. Intenzita klíčení se zvyšovala se zvyšujícím se koncentrací rutinu v suspenzi. Podobné výsledky potvrzují některé předchozí studie, které poukazují na skutečnost, že houboví patogeni jsou k sekundárním látkám (fytoalexinům) vylučovaným jejich hostitelskými rostlinami tolerantní (KÚDELA a kol., 1989)

Druhá série pokusů zaměřených na studium vlivu rutinu v živné půdě na radiální růst hub prokázal, že na nižší koncentrace flavonolu reagují všechny fytopatogenní houby shodně, tedy rychlejším růstem. Nejvýraznější nárůst mycelia byl patrný u koncentrací 0,1 a 0,5 mM. Nejvyšší koncentrace (5 mM) naopak potlačovala rozrůstání mycelia hub. Nejvyšších hodnoty růstové deprese byly zaznamenány u *B. cinerea* (-12,01%). U ostatních testovaných hub se růstová deprese projevila v menší míře u *A. alternata* –

1,83% a u *F. solani* o -4,05%. U *B. cinerea* byla navíc zjištěna barevná změna v obvodových partiích mycelia. V místech styku houby s obohacenou živnou půdou se utvářela hnědá zóna, jejíž intenzita zabarvení korespondovala s množstvím rutinu v PDA. Čím vyšší byla koncentrace, tím sytější a znatelnější byla barevná změna. Tento efekt lze spojovat s metabolickou činností konečků hyf, které degradují rutin obsažený v živné půdě, což je doprovázeno barevnou změnou. Popsaný jev odpovídá názoru RIVERA-VARGAS a kol., (1993), že fytoalexiny vylučované hostitelskými rostlinami jsou patogeny rychle degradovány .

KRAUZE-BARANOWSKA a kol., (1999) v testech účinků biflavonů získaných z listů cypřišovce leylandova (*Cupressocyparis leylandii*) prokázaly antifungální účinky proti tomuto patogenu. Flavonoidy tedy patří mezi látky, které hrají důležitou roli v ochraně rostliny, rutin zde však zřejmě nemá významné postavení. Je zde možné předpokládat synergický účinek s jinými ochrannými látkami či existenci jiných mechanismů proti danému patogenu.

V pokusech zaměřených na studium vlivu kvercetinu na klíčení spor fytopatogenních hub se prokázalo, že kvercetin o koncentraci 5 mM působil jako depresor klíčení v testu s *B. cinerea*, jejíž klíčivost byla v porovnání s kontrolní variantou snížena o 11,2%. V případě *F. solani* byl účinek kvercetinu velmi vyrovnaný a blížil se indexu klíčení kontrolní varianty. U *A. alternata* kvercetin v koncentraci 1mM inhiboval růst konidií, naopak koncentrace 10 mM růst konidií stimulovala. Účinek této látky se během klíčení měnil z inhibičního na neutrální a z neutrálního na stimulační. Výsledky tohoto pokusu korespondují s testy prováděnými na *P. sojae*, u které byl potvrzen nízký účinek kvercetinu a jeho glykosidů na růst a vývoj tohoto fytopatogena. Dokonce byl zaznamenán jeho stimulační vliv na utváření pohlavních orgánů houby (RIVERA-VARGAS a kol., 1993).

V testech klíčivosti spor s přidavkem výluhu ze stonků a listů pohanky seté se projevovala výraznější růstová deprese pouze u pokusu s konidiami *A. alternata* s přidavkem výluhu ze stonků. Inhibiční účinek po 36 hodinách testu dosáhl 14% oproti kontrole. ŮRGEROVÁ a KOPÁNI (2004) uvádí podobný antifungální účinek v testech s výluhy různých rostlin (*Betula pendula*, *Codiaeum variegatum*, *Thuja occidentalis*, *Capsicum annum*, *Humulus lupulus*, *Pinus silvestris*, *Juniperus communis*, *Fragaria*

vesca) na růst šesti fytopatogenních hub, mezi jinými *Alternaria* species, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum* i *Botrytis* species. V našem případě *B. cinerea* nevykazovala výraznější rozdíly mezi kontrolními a testovanými variantami a u *F. solani* byl růst houby inhibován do fáze 1,5 (klíček je 2-3 krát delší než mateřská konidie) později se ale projevil jako stimulátor klíčení i růstu. Tyto výsledky však stojí v rozporu se zjištěním BARDIJANA a SHASKA (2004), kteří uvádí, že zaoráním pohankové slámy došlo k prokazatelné redukci fytopatogenní mikroflóry, zejména hub rodu *Fusarium*. To je možné vysvětlit podpůrnými účinky rutinu a dalších flavonoidů i na růst a klíčení řady mykorhizních a saprofytických hub v půdě, které při počátečním zbrždění rozvoje patogena následně obsadí ekologickou niku. pozitivní vliv rutinu a dalších flavonoidů na presymbiotický růst a délku větvení hyf arbuskulární mykorhizní houby *G. margarita* popsal SCERVINO a kol. (2005).

V testu potravní preference mšice makové (*Aphis fabae*), byly testovány účinky obou flavanonů (rutin a kvercetin) a obou výluhů z pohanky. Ze zjištěných hodnot se ukázalo, že všechna aditiva aplikovaná na hostitelskou rostlinu mšice přitahovala. Největší atrahační účinek byl zaznamenán u rostliny ošetřené 10 mM roztokem rutinu, kde počet mšic přesahoval 65 jedinců, tedy o 47,6 mšic víc oproti kontrolní variantě. Zjištěné výsledky se shodují s některými studii vlivů flavonoidních látek na příjem potravy. SIMMONS (2001) uvádí, že látky jako kvercetin rutin a některé další flavonoidy podporují příjem potravy u mandelinky okrouhlé *Plagioderia versicolora* (Laicharing). VICKERMAN a DE BOER (2002) prokázaly podpůrný vliv rutinu na konzumaci potravy larvami motýla monarchy (*Danaus plexippus*). Z toho vyplývá, že odrůdy selektované na vyšší obsah rutinu mohou být mšicemi více napadány. Některé studie ale stojí v rozporu s těmito tvrzeními. ALIOTTA a kol., (1996) zjistil v testech filtrátu routy vonné (*Ruta graveolens*), jež je bohatým zdrojem rutinu negativní účinky tohoto flavanolu na vývoj vrtule ovocné (*Ceratitis capitata* Wiedmann) a larev komára pisklavého (*Culex pipiens* L.). Účinek rutinu či kvercetinu na daného herbivora je tedy druhově závislý.

6 Závěr

- Reakce jednotlivých houbových patogenů na rutin a kvercetin byly rozdílné. Uvedené látky se liší v účinku na růst konidií a mycelia.
- V některých případech (*A. alternata*) dochází během klíčení konidií (od fáze 2, kdy dochází k sekundárnímu větvení a klíček 5-7 krát delší než mateřská konidie) k pozitivní změně účinku dané látky (kvercetinu).
- Účinek rutinu a kvercetinu je ovlivněn jejich koncentracemi v prostředí.
- Rutin není pravděpodobně rozhodující účinnou látkou v boji rostliny s *A. alternata*, *B. cinerea* a *F. solani*. Naopak významnější roli zde bude mít v případě *A. alternata*, *B. cinerea* kvercetin.
- Z výsledků je patrné přizpůsobení patogenů na látky, se kterými se běžně setkávají v rostlinách, proto jsou schopné je metabolizovat. Odolnost pohanky proti těmto chorobám je tedy způsobena jinými mechanismy.
- V rostlině pohanky (především stonku) se s největší pravděpodobností vyskytují další látky které mohou v rostlině působit jako ochrana před houbovým patogenem *A. alternata*.
- Rutin i kvercetin působily jako atraktanty pro mšici bobovou. Jejich účinek je závislý na koncentraci látky.
- Pohanka s největší pravděpodobností neobsahuje žádné ve vodě rozpustné látky, které by negativně ovlivňovaly potravní preferenci mšice bobové.

7 Seznam literatury

ALIOTTA, G., CAFIERO, G., DE FEO, V., PALUMBO A.D., STRUMIA ,S., 1996: Infusion of rue for control of purslane weed: biological and chemical aspects. *Allelopathy Journal* 3: 207-216.

ANONYM 2, 1976: *Naučný slovník zemědělský*. Díl 6 (p), SZN Praha : 588-590.

AUFHAMMER, W., 2000: *Pseudogetreidearten- Buchweizen, Reismelde und Amaranth*. Stuttgart, Ulmer. 262.

AUFHAMMER, W., KÜBLER, E., 1991: Zur Anbauwürdigkeit von Buchweizen (*Fagopyrum esculentum*). *Die Bodenkultur*, 42: 31-43.

BENADA, J. A KOL., 1958: *Zemědělská fytopatologie*, 2. díl: Choroby polních plodin, Československá akademie zemědělských věd, Praha: 218-220.

BENADA, J. A KOL., 1961: *Zemědělská fytopatologie*, 3. díl: Choroby zeleniny, Československá akademie zemědělských věd, Praha: 237-242.

BERHOW, M.A., VAUGHN S.F., 1999: *Principles and Practices of Plant Ecology*, CRC Press, USA: 423-438.

BERNAYS, E.A., CHAPMAN, R.F., 2001: Taste select responses in the polyphagous arctiid, *Grammia geneurtowards* a general pattern for caterpillars. *J. Insect Physiol*, 47: 1029-1043.

COOK, N.C., SAMMAN S., 1996: *Nutr. Biochemistry*, 7: 66-76.

COTORAS, M., GARCIA, C., LAGOS, C., FOLCH, C., MENDOZA, L., 2001: Antifungla aktivita on *Botrytis cinerea* of flavonoids and dipterpenoids isolated from the surface of *Pseudognaphalium* spp.. *Boletin De La Sociedad Chilena De Quimica*, 46, (4): 433-440.

ČAČA, Z., 1981: *Zemědělská fytopatologie*, Státní nakladatelství, Praha: 282.

DALL'AGNOLL, R., FERRAZ, A., BERNARDI, A.P., ALBRING, D., NÖR, C., SARMENTO, L., LAMB, L., HASS, M., POSER VON, G., SCHAPOVAL, E.E.S., 2003: Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, 10: 511-516.

- DE JONG, H., 1972: Review article on buckwheat. *Field Crop Abstracts*, 25: 389-396.
- EBEL, J., GRIESEBACH, H., 1988: Defense strategies of *Soybean* against the fungus *Phytophthora-Megasperma* F sp. *glycinea*-a molecular analysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 13, (1): 23-27.
- ELLIGER, C.A., CHAN, B.C., WAISS, A.C. Jr., 1980: Flavonoids as larval growth inhibitors. *Naturwissenschaften*, 67: 358-360.
- GEIBEL, M., 1995: Sensitivity of the fungus *Cytospora personii* to the flavonoids of *Prunus cerasus*. *Phytochemistry*, 38, (3): 599-601.
- GERM, M., 2004: Environmental factors stimulate synthesis of protective substances in buckwheat, 9th International Symposium on Buckwheat, Praha: 55- 57.
- GRAYER, R.J., HARBORNE, J.B., 1994: A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993. *Phytochemistry*, 37, (1): 19-42.
- GROMOVÁ, Z., 1990: Pohánka jako surovina pre farmaceutický priemysel. Pohánka siata. Banská Bystrica: 46-49.
- HAGELS, H., 1996: Analytische, pharmazeutische, phytochemische sowie inter- und intraindividuelle Untersuchungen zu Fagopyrum-Arten. Studie zur Pharmakokinetik des Rutins, Dissertation, Berlin.
- HAMR, K., 1999: Pohanka - perspektivní plodina k přímému potravinářskému využití. *Nový venkov*, 3, (3):20-23.
- HARBORNE, J., GREENHAM, J., WILLIAMS, C.A., EAGLES, J., MARKHAM, K.R., 1992: Six dihydrofuranoflavonols from the leaf surface of *Vellozia*. *Phytochemistry*, 31: 305-308.
- HERTOG, M.G.L., 1996: Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc Nutr Soc* 1996, 55: 385-397
- HONERMEIER, B., WEBERS, V., SCHNEEWEISS, R., ZECH, H., 1957: Zur Verarbeitungsqualität des Buchweizens (*Fagopyrum esculenrum* Moench) 1. Mitteilung : Ergebnisse aus deutschen Praxisanbau. *Getreide Mehl und Brot*, 51: 278-281

HORAN, D.P, CHILVERS, G.A, 1990: Chemotropism: the key to ectomycorrhizal formation?. *New Phytologist*, 116: 451-458.

HŘIVNA, L., 1996: Pěstování pohanky. *Úroda*, 44, (1): 24-25.

JAKIMENKO, A.F., 1982: Grečicha, *Kolos*: 196.

KRAUZE-BARANOWSKA, M., CISOWSKI, W., WIWRT, M., MADZIAR, B., 1999: Antifungal biflavones from *Cupressocyparis leylandii*. *Plant Medica*, 65, (6): 572.

KÚDELA, V., BARTOŠ, P., ČAČA, Z., DIRLBEK, J., FRIČ, F., LEBEDA, A., ŠEBESTA, J., ULRYCHOVÁ, M., VALÁŠKOVÁ, E., VESELÝ, D., 1989: *Obecná fytopatologie*, Academia, Praha: 238-246.

LAGRANGE, H., JAY-ALLGMAND, C., LAPEYRIE, F., 2001: Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentration. *New Phytologist*, 149, (2): 349-355.

LAHANOV, A.P., MUZALEVSKAJA, R.S., SHELEPINA, N.V., GORKOVA, I.V., 2004: Biochemical characteristics of some species of genus *Fagopyrum* Mill. *Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat*, Prague: 604–611.

LEIFEROTVÁ, I., LISÁ, M., 1991: *Pohanka zdravá a léčivá i dnes*. Art Press Service, Praha, 21 s.

MICHALÍKOVÁ, A., 1989: Potencionálne nebezpečie výskytu chorôb pohánky, Pohánka siata – významný zdroj vbiopotravin, *Sborník Výzkumný ústav lúk a pasienkov*, Banská Bystrica, Nitra: 20-26.

MICHALOVÁ, A., HUTAŘ, M., 1999: Pohanka setá. *Úroda*, 47, (11): 14-15.

MICHALOVÁ, A., 1995: Pohanka. *Farmář*, 12: 22-23.

MÍKA, V., 2001: *Flavonoidy, Fenolické látky v lučních rostlinách*, Praha: 26-28.

MILEVOJ, L., 1989: Buckwheat diseases. *Fagopyrum*, 9: 31-40.

- MOUDRÝ, J., STRAŠIL, Z., 1996: Alternativní plodiny, JCU ZF, České Budějovice: 16, 22-23.
- MÜLLER, A., SCHIEBEL-SCHLOSSER, G., 1998: Chemie der Inhaltsstoffe, Buchenweizen Botanik, Inhaltsstoffe, Analytik, Pharmakologie, Toxikologie, Klinik, Stuttgart: 27-28.
- OKROUHLÁ, M., 1993: Pěstování pohanky seté. Studijní informace, Ř. Rostl. Výr. ÚZPI, 3: 8-10, 34-37.
- ONYILAGHA, J.C., LAZORKO, J., GRUBER, M.Y., SOROKA, J.J., ERLANDSON, M.A., 2004: Effect of flavonoids on feeding preference and development of the crucifer pest *Mamestra configurata* Walker. Journal of Chemical Ecology, 30, (1): 109-124.
- PETR, J., HRADECKÁ, D., 1997: Základy pěstování pohanky a prosa, Institut výchovy a vzdělávání Mze, Praha: 5, 10, 15.
- POULIN, M.J, BEL-RHILD, R., PICHÉ, Y., CHENEVERT R., 1993: Flavonoids released by carrot (*Daucus carota*) seedlings stimulate hyphal development of vesicular mycorrhizal fungi in presence of optimal CO₂ enrichment. Journal of Chemical Ecology, 19: 2317-2327.
- PROCHÁZKA V., 1990: Možnosti získávání rutinu z pohanky. Sborník z konference Pohánka siata. Výzkumný ústav lúk a pasienkov, Banská Bystrica: 50-55.
- PROCHÁZKA, S. A KOL., 1998: Fyziologie rostlin, Academia, Praha:
- RIVERA-VARGAS, L., SCHMITTHENNER, F.A., GRAHAM, L.T., 1993: Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. Phytochemistry, 32, (4): 851-857.
- ROBINSON, R.G., 1994: The buckwheat crop in Minnesota, Agric. Exp. Stn., Univ. Minnesota, Stn. Bull, 539: 14.
- SCERVINO, J.M., PONCE, M.A., ERRA-BASSELS, R., VIERHEILIG, H., OCAMPO, J.A., GODEAS, A., 2005: Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Globus*. Mycological Research, 109: 789-794.

- SHAVER, T.N., LUKEFAHR, M.J., 1969: Effect of flavonoid pigments and gossypol on growth and development of the bollworm, tobacco budworm and pink bollworm. J. Econ. Entom., 62: 643
- SHEVCHUK, V., 2004: Phytopathological monitoring *Fagopyrum esculentum* Moench, 9th International Symposium on Buckwheat, Praha: 494-495.
- SHEVCHUK, V.K., SHEVCHUK, T. E., 1988: Biological signs of buckwheat conducive to its resistance to fungous diseases. *Fagopyrum*, 8: 92.
- SIMMONS, M.S.J., 2003: Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*, 64: 21-30.
- ŠMAJSTRLA, V., ŠMAJSTRLOVÁ, S., 1991: Pohánka v racionálnej výžive. Zahrádka, Bratislava: 64.
- ŠPALDOŇ, E. A KOL., 1963: Rostlinná výroba. Díl 1, SZN Praha a Slovenské vydavateľstvo pôdohospodárskej literatúry, Bratislava: 347-356.
- TURNER, R.B., LINSDEY, D.L., DAVIS, D.D., BISHOP, R.D., 1975: Isolation and identification of 5,7 dimethoxy-isoflavone, an inhibitor of *Aspergillus flavus* from peanuts. *Mycopathologia*, 57: 39.
- ÜRGEOVÁ, E., KOPÁNI, J., 2004: Vplyv sekundárných metabolitov rastlín na fytopatogenné vlákňité huby, *Nova Biotechnologica*: 71-82.
- VICKERMAN, D.B., DE BOER, G., 2002: Maintenance of narrow diet breadth in the monarch butterfly caterpillar: response to various plant species and chemicals. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 104: 255-269.
- VOTICKÝ, Z., 1991: Je pohánka vhodná pre výrobu rutínu? Sborník z konferencie Pohánka siata – významný zdroj biopotravin. Výzkumný ústav lúk a pasienkov, Banská Bystrica, Nitra: 95-100.
- WEIDENBÖRNER, M., HINDORF, H., JHA CHANDRA, H., TSOTSONOS, P., 1990: Antifungal activity of isoflavonoids in different reduced stages on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinium rolfisii*. *Phytochemistry*, 29, (3): 801-803.

WEISER, L.A., STAMP, N.E., 1998: Combined effects of allelochemicals, prey availability, and supplemental plant material on growth of generalist insect predator. *Entomologia experimentalis et Applicata*, 87: 181-189.

WESTON, L.A., BURKE, B.A., PUTNAM, A.R., 1987: Isolation, characterization and activity of phytotoxic compounds from Quackgrass (*Agropyron repens* L. Beauv). *Journal of Chemical Ecology*, 13 (3): 403-421.

WILLIAMS, C.A., HARBORNE, J., GREENHAM, J., EAGLES, J., MARKHAM K.R., 1993: Six further lipophilic flavonols from the leaf of *Vellozia stipitata*. *Phytochemistry*, 32: 731-735.

WINKEL-SHIRLEY, B., 2001: Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiol*, 126: 485-493

Internetové zdroje:

ANONYM 1: [cit. dle 6.3. 2006]

Dostupné na <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/highchem.pl> >

ANONYM 3: [cit. dle 12.4.2006]

Dostupné na <<http://www.canola-council.org/alternariacycle.aspx>>

ANONYM 4: [cit. dle 12.4.2006]

Dostupné na <<http://www.thewinedoctor.com/author/sweetnoble.shtml>>

ANONYM 5: [cit. dle 12.4.2006]

Dostupné na
<[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Fusarium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Fusarium/)>

CERKAL, R., HRSTKOVÁ, P., STŘEDA, T., 2006: Prezentace obilniny-pohanka [online]. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2006, [cit. dle 5.3. 2006].

Dostupné na <<http://old.mendelu.cz/~upsr/prezentace/obilniny/> >

ČESKÝ HYDROMETOROLOGICKÝ ÚSTAV, 2006: Dlouhodobé normály klimatických hodnot za období 1961–1990 [online]. ČHM odbor klimatologie, 2006, [cit. dle 23. 3. 2006].

Dostupné na <<http://www.chmi.cz/meteo/ok/infklim.html>>

DADÁKOVÁ, E., 2006: Rutin-strukturní vzorec [online]. České Budějovice: Jihočeská Univerzita v ČB, Zemědělská fakulta, 2006, [cit. dle 23. 2. 2006].

Dostupné na <<http://home.zf.jcu.cz/~dadakova/texty/rutin.htm>>

GODIN, C., BOIVIN, G., 2002. Guide d'identification des pucerons dans les cultures maraîchères au Québec [cit. dle 23. 4. 2006].

Dostupné na <http://res2.agr.ca/stjean/publication/web/aphidinae8_f.htm>

URBAN, J., 2006: Flavony a flavonoly [online]. Brno: Farmaceutická fakulta Brno, 2006, [cit. dle 20. 2. 2006].

Dostupné na <http://faf.vfu.cz/html/txts/flavony_noly.html>

URBAN, J., 2006: Rutin [online]. Brno: Farmaceutická fakulta Brno, 2006, [cit. dle 20. 2. 2006].

Dostupné na <<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/flavony/rutin/index.html>>

URBAN, J., 2006: Biosyntéza flavonoidů [online]. Brno: Farmaceutická fakulta Brno, 2006, [cit. dle 20. 2. 2006].

Dostupné na <http://faf.vfu.cz/html/flavonoids/biosynt_flav.html>

URBAN, J., 2006: Flavonoidy [online]. Brno: Farmaceutická fakulta Brno, 2006, [cit. dle 20. 2. 2006].

Dostupné na <<http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html#vseob>>

ZAŽÍMALOVÁ, E., 2006: Sekundární metabolismus-úvod, fenolické látky a fenylypropanoidy [online]. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2006, [cit. dle 15. 3. 2006].

Dostupné na <http://kfrserver.natur.cuni.cz/cz/edu/biochemie/Biochemie_4.pdf>

WILM, K.,H., 2005: OurFood. Database of Food and Related Science [online]. Schortens, Německo, [cit. dle 15. 3. 2006].

Dostupné na <www.ourfood.com/Phytopathology_diseases_pla.html>

8 Přílohy

Grafický list 1. Stupnice klíčivosti

- pro *Alternaria alternata*
- pro *Fusarium solani*
- pro *Botrytis cinerea*

Grafický list 2. Hodnotící stupnice standartního testu klíčivosti

Grafický list 3. Kultury fytopatogenních hub a mšice maková (*Aphis fabae*)

- Kultura *A. alternata* na PDA
- Kultura *B. cinerea* na PDA
- Kultura *F. solani* na PDA
- Mšice maková (*Aphis fabae*) na hostitelské rostlině bobu setého (*Vicia faba*)

Grafický list 4. Schéma životního cyklu

- *Alternaria alternata*
- *Botrytis cinerea*

Obrázky spor *Fusarium solani*

Grafický list 5. Mšice maková (*Aphis fabae*)

Grafický list 1. Stupnice klíčivosti *Alternaria alternata* (zvětšení 1: 40)



GI 0



GI 0,5



GI 1



GI 1



GI 2

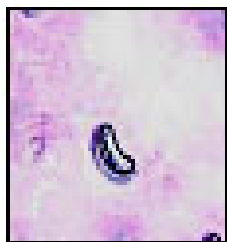


GI 2,5

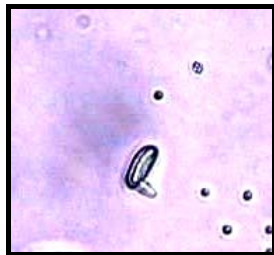


GI 3

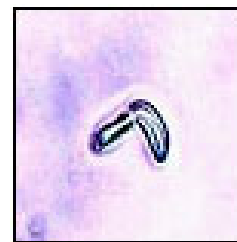
Stupnice klíčivosti *Fusarium solani* (zvětšení 1: 40)



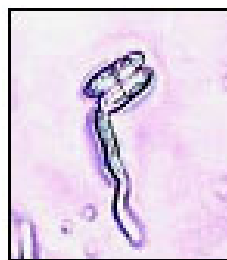
GI 0



GI 0,5



GI 1



GI 1,5

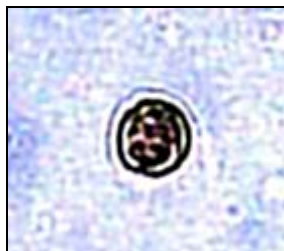


GI 2



GI 2,5

Stupnice klíčivosti *Botrytis cinerea* (zvětšení 1: 40)



GI 0



GI 0,5



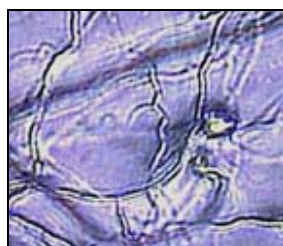
GI 1



GI 1,5



GI 2



GI 2,5

Grafický list 2. Hodnotící stupnice standartního laboratorního testu klíčivosti

Index klíčení (GI)	Charakteristika
0	na konidiích nejsou zřejmé žádné morfologické změny
0,5	konidie jsou zřetelně protáhlejší, nabobtnalé na konidii je zřetelný jeden či více klíčků v poměru přibližně 1:0,5
1	velikost klíčků na konidii je v poměru 1:1 k velikosti matečné konidie
1,5	klíček je 2-5 krát delší než matečná konidie, stejně tak i ostatní klíčky na konidii
2	sekundární větvení na jednom z klíčků, konidie je 5-7 krát delší než mateřská konidie
2,5	na hyfách jsou zjištěny konidiofory bez nových konidií nebo maximálně s jednou konidií u <i>B. cinerea</i> hodnoceno jako tvorba sterilních hyf
3	plná sporulace kultury, na hyfách jsou přítomny konidiofory se třemi a více konidiemi

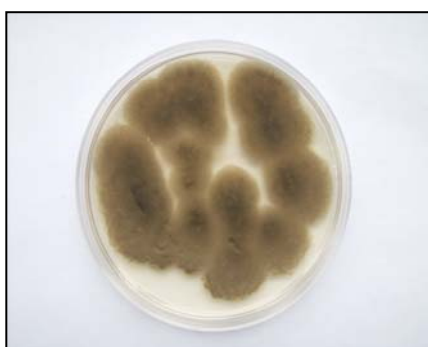
Grafický list 3. Kultury fytopatogenních hub kultivovaných na PDA a mšice maková



Fusarium solani



Botrytis cinerea

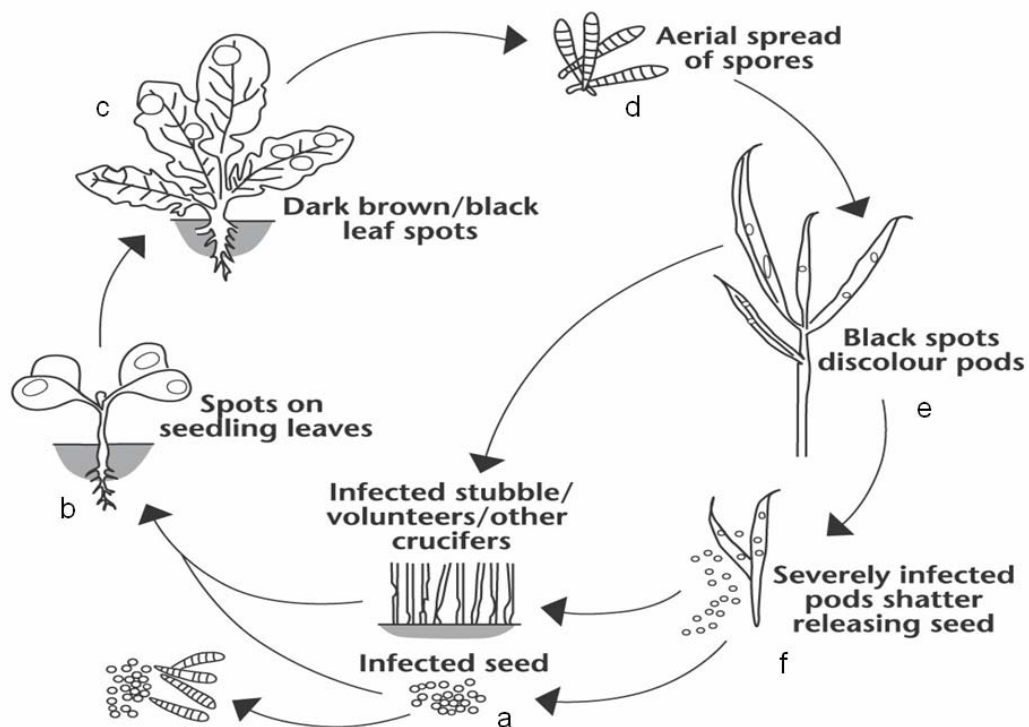


Alternaria alternata

Mšice maková (*Aphis fabae*) na hostitelské rostlině bobu setého (*Vicia faba*)

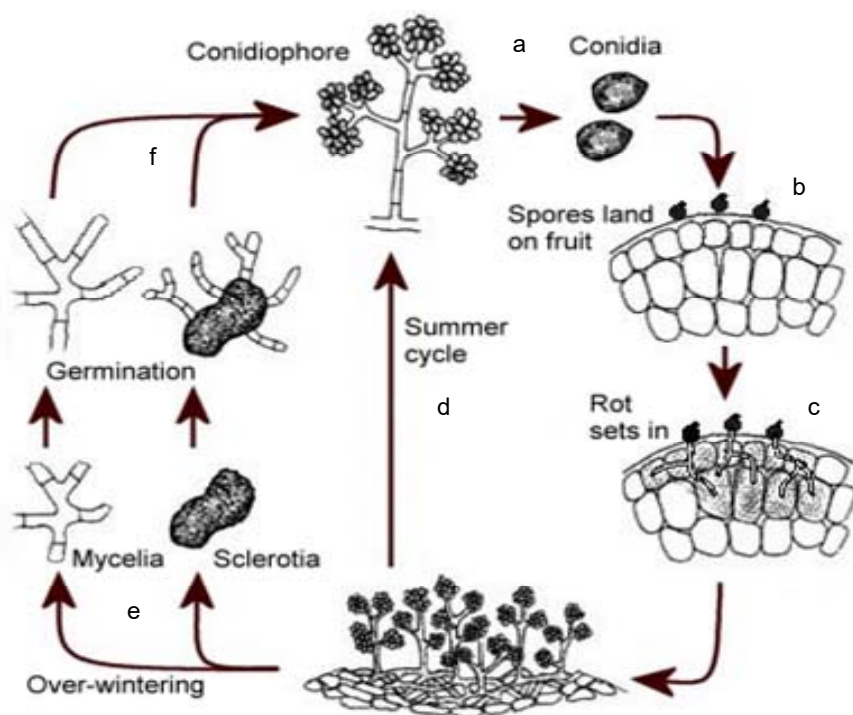


Grafický list 5. Schéma životního cyklu houby *A. Alternata* (ANONYM 3)



- a. zdrojem spor je infikované osivo, infikované strniště
- b. ve fázi semenáčku se objevují skvrny na listech
- c. v dalších fázích růstu se skvrny na listech mění v tmavé až černé, houba produkuje spory
- d. spory se šíří vzduchem a infikují šesule
- e. na plodech se vytváří tmavé skvrny
- f. většina napadených šesulí praská a infikovaná semena vypadávají ven

Schéma životního cyklu *B. cinerea* (ANONYM 4)



- a. z konidioforu se odškrcují konidie (spory)
- b. spory se dostávají na povrch rostliny
- c. klíčí a vnikají do tkání
- d. vytváří konidiofory produkující nové spory (letní cyklus)
- e. vytváří sklerócía či mycelium (zimní cyklus)
- f. na jaře z mycelia či sklerocia vyklíčí konidiofor na němž se vytváří nové spory

Spory *Fusarium solani* (ANONYM 5)



obr. 1. Makronidie *F. solani* se formují po 4-7 dnech z krátkého bohatě větveného konidioforu, jsou cylindrického tvaru často mírně zakřiveného se třemi až pěti septami

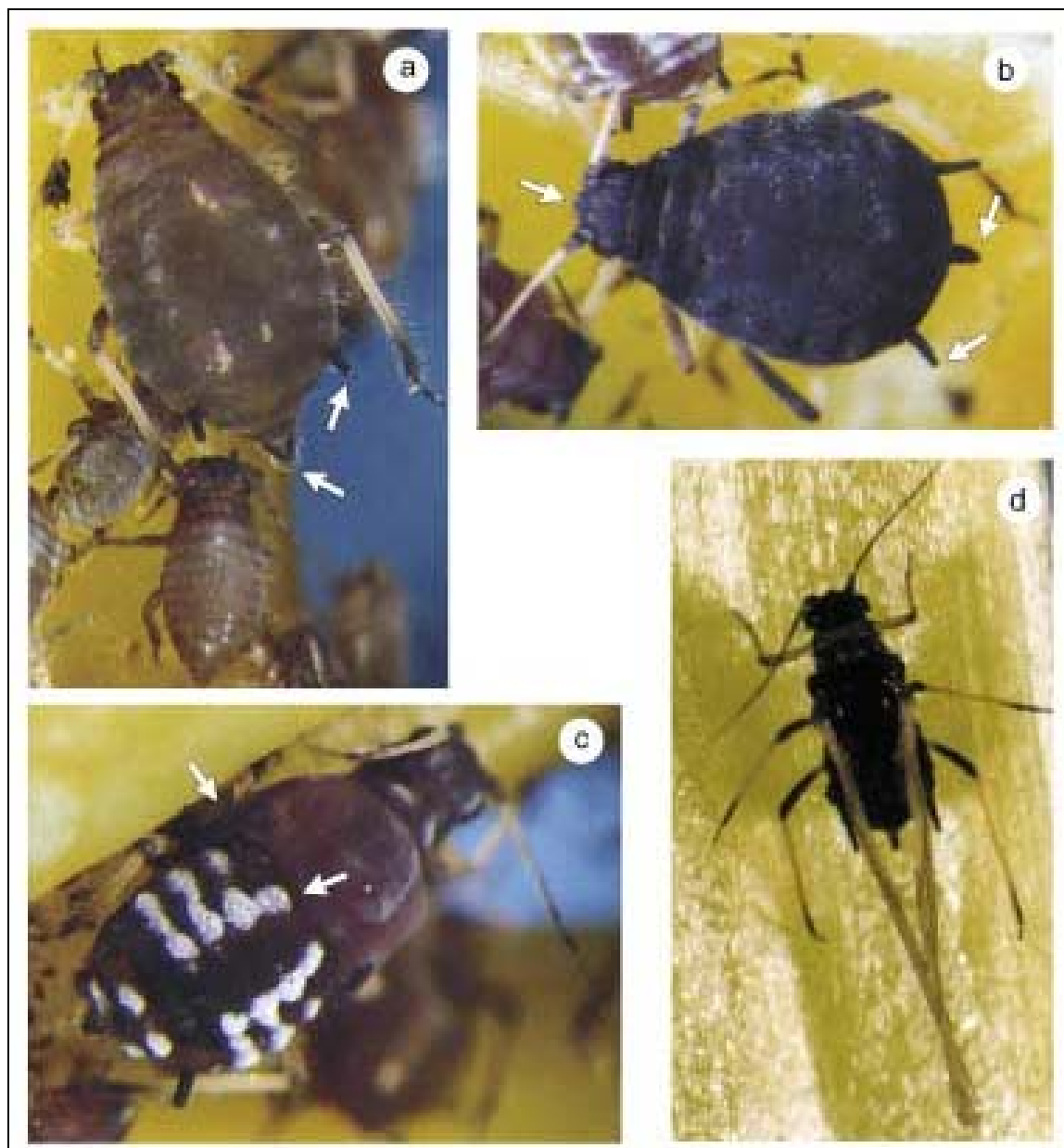


obr. 2. Mikrokonidie *F. solani* jsou cylindrické až oválné, jedno až dvoubuněčné



obr 3. Chlamydospory *F. solani* jsou hyalinní, kulovité tvořící se samostatně nebo v páru na krátkých laterálních větvích hyf.

Grafický list 6. mšice maková (*Aphis fabae*) (GODIN, C., BOIVIN, G., 2002)



- a. stará a mladá larva
- b. bezkřídlá samička
- c. larva se zárodky křídel a abdominálními znaky
- d. okřídlená samička

Veškeré dotazy a připomínky pište na mailovou adresu: stepkaradova@seznam.cz