

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PEDAGOGICKÁ FAKULTA

Antinutriční sirné sloučeniny vřkvovitých rostlin

Jan Hůla

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Roman Kubec, PhD.
(katedra aplikované chemie, ZF JU)
2012

Anotace

V této diplomové práci bylo sledováno množství antinutričního faktoru γ -glutamyl-S-vinylcysteinu (GVC) ve vikvi narbonské (*Vicia narbonensis*) během jejího růstu. Rostliny byly sklizeny v různých fázích růstu a rozděleny na jednotlivé části. Po lyofilizaci a homogenizaci těchto částí bylo připraveno 32 extraktů, ve kterých se pomocí HPLC a metody vnitřního standardu kvantitativně stanovil obsah GVC.

Bylo sledováno množství GVC v různých vývojových fázích rostliny a ovlivnění tohoto množství klimatickými podmínkami při pěstování, zejména teplotou a množstvím srážek. Výsledná data byla porovnána s výsledky uvedenými v odborné literatuře. Nejvyšší obsah GVC z různých částí rostliny byl potvrzen v semenech vikve narbonské, a to zejména v ranějších fázích růstu. Naopak u starších rostlin byl zjištěn kvantitativní úbytek GVC. GVC nebyl překvapivě detekován v žádné jiné části rostliny (stonky, listy, lusky, kořeny).

Annotation

This diploma thesis is focused on changes in the content of γ -glutamyl-S-vinylcysteine (GVC), the anti-nutritional factor present in narbon beans (*Vicia narbonensis*). The samples were collected at different stages of growth and separated into individual parts. There were prepared 32 extracts after freeze-drying and homogenisation in which it was determined the quantity of GVC by HPLC.

The levels of GVC at different developmental stages were influenced by climatic conditions during growth, mainly by temperature and precipitation. The results obtained were compared with data published previously in the literature. The highest content of GVC was found in the seeds of narbon beans, especially at early stages of growth. Surprisingly, no GVC was detected in other parts of narbon beans (stems, leaves, beans, and roots).

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě Pedagogickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledky obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis studenta:

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Romanu Kubcovi, PhD. za cenné rady, připomínky, trpělivost a porozumění, s nímž mě při této práci vedl.

Dále děkuji všem pracovníkům katedry chemie JU ZF, kteří se podíleli na přípravě vhodných podmínek pro moji práci.

Zároveň děkuji všem ostatním, kteří se jakkoliv podíleli na dokončení této práce.

Práce byla provedena za finanční podpory Grantové agentury Jihočeské univerzity (GAJU 067/2010/Z)

Obsah

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1. Historie	2
2.2 Taxonomie	4
2.3. Pěstování	6
2.4. Hospodářský potenciál	7
2.4.1. Druhy <i>Vicia</i> a <i>Lathyrus</i> v Austrálii.....	8
2.4.2. Využití rostlin rodu <i>Vicia</i>	8
2.4.2.1. Využití rostlin rodu <i>Vicia</i> jako luskovin pěstovaných na zrna	9
2.4.2.2. <i>Vicia narbonensis</i>	9
2.5. Lidská spotřeba rostlin rodu <i>Vicia</i>	12
2.6. Toxicita vikvovitých rostlin	13
2.6.1. Toxiny ve vikvovitých rostlinách a jejich biologická aktivita	13
2.6.1.1. Kyanové glykosidy v druzích <i>Vicia</i>	15
2.6.1.2. Toxicita vicianinu a HCN	16
2.6.1.3. Kanavanin	17
2.6.1.4. Toxicita kanavaninu pro přežvýkavce	18
2.6.1.5. Biochemie β -kyanoalaninu a jeho γ -glutamyl derivátu	18
2.6.1.6. Pyrimidinové glykosidy	20
2.6.1.7. γ -Glutamyl-S-vinylcystein (GVC)	20
2.6.1.7.1. Vlastnosti γ -glutamyl-S-vinylcysteinu	21
2.6.1.7.2. Analytické stanovení GVC	21
2.6.1.7.3. Obsah sirných aminokyselin v luštěninách	22
2.6.1.7.4. GVC jako možná zásobní sloučenina pro redukovanou formu síry	23
2.6.1.8. Vicismus: intoxikace u druhů <i>Vicia</i>	23
2.6.1.9. Složení kontrolovaných vikví	24
2.6.1.10. Role nesezónních podmínek počasí v toxicitě rostlin rodu <i>Vicia</i>	24
2.6.1.11. Toxicita <i>Vicia sativa</i>	24
2.6.1.12. Toxicita <i>Vicia ervilia</i>	25
2.6.1.13. Onemocnění související s konzumací vikví	25

2.6.2. Biologické funkce sekundárních metabolitů v rostlinách rodu	
<i>Vicia</i> a jejich řízení	27
2.6.2.1. Výběr netoxických a chutných genotypů	27
2.6.2.2. Specifické vymizení semen	28
2.6.2.3. Odolnost proti hmyzu	28
2.6.2.4. Postsklizňová detoxikace	29
2.6.2.5. Kvašení	30
2.6.2.6. Detoxikace přežvýkavci	30
2.6.2.7. Experimentální modely pro biologii antinutričních faktorů	31
2.6.2.8. Rozdíly v koncentraci antinutričních faktorů v různých částech	
v průběhu životního cyklu rostliny	31
3. Experimentální část	33
3.1. Rostlinný materiál	33
3.2. Použité chemikálie a přístrojové vybavení	35
3.3. Postup extrakce GVC	36
3.4. Spektrální charakterizace GVC	37
4. Výsledky a diskuse	40
4.1. Izolace GVC ze semen vikve narbonské	40
4.2. Vývoj metody pro stanovení GVC pomocí HPLC	40
4.3. Stanovení obsahu GVC během růstu vikve narbonské	42
5. Závěr	47
6. Zdroje a použitá literatura	48

1. Úvod

Vikvovité rostliny patřily od pradávných dob k hojně využívaným plodinám, pěstovaným převážně jako krmivo pro dobytek. Hlavně v posledních desetiletích začaly být vikve oceňovány pro svou obrovskou odolnost vůči nepříznivým podmínkám prostředí i škůdcům a schopnost poskytovat velmi dobré výnosy i za velmi špatných podmínek. Mají proto nesmírný hospodářský potenciál, obzvláště v oblastech, kde se kvůli nepříznivým podmínkám nedaří úspěšně pěstovat jiné krmné plodiny.

Využití těchto plodin převážně v podobě krmiva a dokonce i jako potravy pro lidi, obzvláště v dobách hladomoru, kdy jsou lidé nuceni je využívat, však brání přítomnost celé řady sekundárních metabolitů, které buď přímo snižují příjem potravy dobytka z důvodu odporné chuti nebo sice příjem potravy téměř nenarušují, ale snižují přírůstky takto kmených zvířat. Téma sekundárních metabolitů vikvovitých rostlin se proto stalo předmětem mnoha výzkumů, převážně v Asii a Austrálii, které měly za cíl získat co nejvíce informací o chemismu sekundárních metabolitů a jejich vlivu na krmená zvířata.

Tato práce se zaměřila na konkrétního zástupce vikvovitých rostlin v podobě vikve narbonské (*Vicia narbonensis*) a jeho hlavní sirný sekundární metabolit γ -glutamyl-S-vinylcystein (GVC). Hlavním cílem pak bylo sledovat obsah GVC v různých částech rostliny v závislosti na růstové fázi a zjistit případné souvislosti tohoto obsahu s klimatickými podmínkami v době pěstování.

2. Teoretická část

2.1. Historie

Jak uvádí Zohary a Hopf (1988), vývoj vikve narbonské (*Vicia narbonensis*) jako zrniny je úzce spojen s pěstováním a domestikací fazole faba (*V. faba*). Vikev narbonskou (viz obrázek 1) je obtížné odlišit od fazole faba v archeologickém záznamu, pokud nejsou k dispozici lusky. Proto nemáme žádný jasný údaj o jejím nejranějším pěstování nebo domestikaci. Historický kontext použití rostlin rodu vikev (*Vicia*) jako luskovin se datuje do starověku, s nálezy velkých zásob *V. ervilia* datovaných do doby 7000 př. n. l. Nejstarší důkazy o pěstování fazole faba pochází z Jericha z roku 5000 př. n. l. a nejstarší nálezy na Pyrenejském poloostrově lze vysledovat do 3000 př. n. l. Velikost osiva i rostlinný habitus vikve narbonské se blíží faba fazoli, proto mohly být, i vzhledem k časté přítomnosti fazole narbonské v oblastech fazole faba, zaměněny. Zdá se tedy pravděpodobné, že byla domestikována a vyvinula se jako vedlejší plodina ve stínu faba fazole (ENNEKING A MAXTED, 1995).

Nález z Iráku datovaný na 1000 n. l. je prvním archeologickým záznamem velkosemenné varianty faba fazole. Všechny archeologické nálezy ze starověku byly varianty s malými semeny. Nicméně je známo, že velkosemenné typy byly zachyceny na keramice v Číně, datované o cca 1000 roků starší (SAXENA, ICARDA; CIT. ENNEKING, 1994).

Jediný nepochybný nález vikve narbonské byl popsán Laurent-Tackholmem v Saqqafahu v Egyptě a připsán III. Dynastii (2000 př. n. l.). Zdá se, že další semena vikve narbonské byla nalezena spolu s plevami pšenice Emmer v pyramidě Sahure v Abu Sir. Ta byla identifikována G. Schweinfurthem, ale ztratila se zničením Berlínského botanického muzea během druhé světové války. Tyto nálezy ukazují na přítomnost vikve narbonské ve starověkém Egyptě, s největší pravděpodobností jako plevel obilnin (SCHULTZE-MOTEL, 1972; CIT. ENNEKING 1994).

Botanici v době před Linnéem pěstovali jinak vzácnou vikev narbonskou na svých zahradách z důvodu zvědavosti a radosti ze studia bylin, ale žádné užitečné vlastnosti jí nebyly připisovány. Zdá se, že rostlinný materiál k dispozici většině botaniků v této době měl černá semena a nepříjemnou sirnou chuť. Camerarius

(1586) popisoval chuť osiva jako podobnou bobům. Tato charakteristika může být založena na odběru vzorků zrajících semen, která přes česnekovou chuť mají mnohem sladší a příjemnější chuť než semena sušená. Z doprovodné ilustrace může být vzorek zřetelně označen jako vikev velkosemenná var. *aegyptica* a zmiňoval se, že tato rostlina rostla nápadně hojně v některých částech jižní Itálie, poblíž Neapole a v oblasti Apulie (ENNEKING A MAXTED, 1995).

Využití pícnin a luskovin pěstovaných na zrno v evropském zemědělství získalo nový impuls v době reformace v 16. století, kdy se protestantští kněží museli obrátit k zemědělství, aby se užívali. Jako humanisté byli schopni přecházet díla římských zemědělců, jako byli Cato, Varro a Columella, a přijali setí luskovin ke zlepšení úrodnosti půdy. Proto byla široká škála nových luskovin obhajována v literatuře se zaměřením na vzdělávání zemědělců, aby přijali výnosnější zemědělskou praxi. Není tedy divu, že se objevilo velké množství nových plodin. Do konce 18. století již bylo jejich pěstování široce rozšířeno (ENNEKING A MAXTED, 1995).



I



II



III



IV

Obrázek 1. I - rostlina *V. narbonensis*; II - semena; III - lusky; IV - květy

2.2. Taxonomie

Rod *Vicia* (zařazení viz obrázek 2) zahrnuje 166 druhů jednoletých a trvalých travních luštěnin mírného a subtropického geografického rozšíření (ALLKIN ET AL, 1983; ALLKIN ET AL, 1985; CIT. ENNEKING, 1994).

říše: *Plantae*

podříše: *Tracheobionta*

nadkmen: *Spermatophyta*

kmen: *Magnoliophyta*

třída: *Magnoliopsida*

podtřída: *Rosidae*

řád: *Fabales*

čeleď: *Fabaceae*

rod: *Vicia*

podrod: *Vicia*

druh: *Vicia narbonensis* L.

Obrázek 2. Taxonomické zařazení (podle <http://plants.usda.gov>)

Uvnitř sekce *Narbonensis* se druhy rozlišují na základě barvy květu, tvaru listu a lusku. Květy vikve narbonské a vikve pilovité (*V. serratifolia*) jsou purpurové, zatímco u *V. johannis* mají bílý, někdy purpurově žilnatý základ a červené/fialové (var. *johannis*) nebo hnědé/fialové (var. *procumbens*) křídelní skvrny. Vikev pilovitá, jak název napovídá, má zoubkované listy. Vzorky s výřezy listů s více než 15 zuby mohou být konzistentně významné pro vikev pilovitou (ENNEKING A MAXTED, 1995).

Schäfer (1973) klasifikoval vikev narbonskou do pěti botanických odrůd na základě velikosti semen, barvy hilu, přítomnosti připojeného funiculu, tvaru lusku a zoubkování okraje listu (viz tabulka 1). Znaky domestikace, jako gigantismus semen a listů a nedostatek dormance semen, se vyskytují u varianty *aegyptiaca* a *narbonensis* (ENNEKING, 1994).

Taxonomické rozdělení sekce *Narbonensis* viz obrázek 3.

sekce: *Narbonensis* (Radzhi) Maxted

série: *Narbonensis* (Radzhi) Maxted

V. kalakhensis Khattab, Maxted a Bisby

V. johannis Tamamschjan in Karyagin

var. *ecirrhosa* (Popov) H. Schäfer

var. *procumbens* H. Schäfer

var. *johannis*

V. galilaea Plitm. a Zoh. v Plitm.

var. *galilaea*

var. *faboidea* (Plitm. a Zoh. v Plitm.) H. Schäfer

V. serratifolia Jacq.

V. narbonensis L.

var. *salmonia* (Mout.) H. Schäfer

var. *jordanica* H. Schäfer

var. *affinis* Kornhuber z Asch. a Schweinf.

var. *aegyptiaca* Kornhuber z Asch. a Schweinf.

var. *narbonensis*

V. hyaeniscyamus Mout.

Obrázek 3. *Vicia* L., podrod *Vicia*, sekce *Narbonensis* (Radzhi) (MAXTED, 1992, PŘEVZATO Z ENNEKING, 1994)

Tabulka 1. Charakteristiky pro identifikaci variant vikve narbonské (SCHÄFER, 1973, PŘEVZATO Z ENNEKING, 1994)

Varianta	Charakteristika
<i>aegyptiaca</i> Kcke	1-2-(-3) bazální výhonky; 1-2-(-3) květy; lusk 5-7 x 1,1-1,6 cm, svrasklý; semeno 6-11-(-13) mm; střední proužek na hilu bílý; funiculus trvalý
<i>narbonensis</i> L.	1-2-(-3) bazální výhonky; 1-2-(-3) květy; lusk 5-7 x 1,1-1,6 cm, hladký; semeno 6-8 mm; střední proužek na hilu bílý; funiculus dočasný
<i>affinis</i> Asch. a Schweinf.	2 bazální výhonky; 1-2 květy; lusk 3,5-5,5 x 0,7-1,1 cm, hladký; semeno 4,5-6,0 mm; střední proužek na hilu běžový
<i>jordanica</i> Schäf.	2-6 bazálních výhonků, bazální lístek nedělený; 1-2 květy; lusk 3,5-5,5 x 0,7-1,1 cm, hladký; semeno 4,5-6,0 mm-1,1 cm; střední proužek na hilu běžový
<i>salmonia</i> Mout.	1-2 bazální výhonky, bazální lístek vroubkovaný; 1-2 květy; lusk 3,5-5,5 x 0,7-1,1 cm, hladký; semeno 4,5-6,0 mm; střední proužek na hilu běžový

2.3. Pěstování

Bob obecný (*Vicia faba*) je dnes stále široce používán jako potravina a jako krmivo pro dobytek. Až do kolumbovských časů to byly jediné běžné boby známé v Evropě, ale od zavedení fazole (*Phaseolus*) z Ameriky jejich nutriční význam klesal. Jak dokládají Fruwirth (1921), Backer-Dillingen (1929) a Mateo-Box (1961), kromě fazole faba, hlavní vikvovité luštěniny používané na zrno, se jako krmivo pro hospodářská zvířata používá vikev setá, vikev narbonská, vikev huňatá (*V. villosa*), *V. monantha* a vikev čočková (*V. ervilia*) (ENNEKING, 1994).

Fisher (1937) uvedl, že faba fazole a v menší míře vikev čočková, *V. monantha* a vikev narbonská byly opakovaně pěstovány na zrno. V některých státech, například v Německu, Rakousku, Bulharsku, Litvě a Španělsku, byly krmné vikve pěstovány jako obilí i pícnina. V jiných zemích, jako je Velká Británie, Maďarsko, Jugoslávie, Nizozemsko a Švédsko, byly vikve pěstovány jen pro použití jako zelená píce. V tehdejší Československu byly druhy *Vicia* pěstovány hlavně na zrno. Podle Hegi a Gamse (1924) se vikev narbonská a vikev pilovitá jen zřídka pěstovaly ve střední Evropě. Byly zavlečeny jako plevel se zahraničními obilninami nebo vikvemi a bylo možno je nalézt zdomácnělé v teplejších oblastech, jako je údolí horního Rýna, části Rakouska a Švýcarska. Starší zjištění bylo hlášeno na pobřeží Jadranu (Istrie) a nedaleko Basileje. Podle průzkumů Hegi a Gamse (1924) a Uphofa (1959) se vikev narbonská zřejmě také pěstovala v Etiopii jako krmivo pro dobytek a zelené hnojení, ale poslední revize etiopské flóry nemůže ověřit starší záznamy o výskytu tohoto druhu v tomto regionu (HEDBERG AND EDWARDS, 1989; ENNEKING, 1994).

Vikev narbonská se zdá být rozptýleně rozšířena ve Středomoří a severní Africe. Semena vikve narbonské byla pravděpodobně, stejně jako jiné vikve, opakovaně zavlečena se zrny, s nimiž se obchoduje, do Itálie, Pyrenejského poloostrova a severní Afriky z Turecka a Levanty, nebo byla šířena pasoucími se zvířaty a se semeny, která pojídají ptáci (Enneking a Maxted, 1995). Holm et al. (1979) dokumentovali vikev narbonskou jako plevel v Tunisku (hlavní plevel), Íránu, Libanonu (běžný plevel), Turecku (prezentován jako plevel) a Izraeli (ENNEKING, 1994).

Přesná čísla pro globální pěstování vikve narbonské jako zrniny nebo píce nejsou k dispozici, ale Mateo-Box (1961) pro Španělsko v roce 1960 provedl odhad na 7000 ha s globální produkcí obilovin přes 4600 tun. V Turecku a severním Iráku se tento druh pěstuje na omezeném rozsahu ploch v běžných podmínkách i pod umělým zavlažováním (ENNEKING A MAXTED, 1995).

2.4. Hospodářský potenciál

Celosvětové využití vikvovitých rostlin jako píce a plodin „zeleného hnojení“ je dobře zavedeno. Kromě fazole faba je využití vikví jako luskovin menšího globálního ekonomického významu, přičemž je omezeno hlavně na oblast Středomoří a jihozápadní Asie, kde se zrno používá hlavně jako osivo a semena ve stravě přežvýkavců. V Austrálii poskytly poměrně vysoké výnosy semen a nízké výrobní náklady genotypy druhů, jako jsou vikev narbonská a vikev setá, atraktivní alternativu luštěnin v zemědělství suchých oblastí a stimulovaly tak zájem o trhy s obilím. Monogastrická zvířata (včetně člověka) jsou hlavním globálním koncovým uživatelem produktů z luštěnin.

Většina druhů půd používaných při běžném pěstování je více či méně vhodná pro vikve. Středně vlhké štěrkovité hlíny jsou obecně nejvíce vhodné, ale problémem nejsou ani všechny ostatní hlinité půdy, od druhů hraničících s drobným štěrkem po druhy hraničící se ztuhlým jílem. Tyto půdy jsou nezbytné pro produkci semen vikví, protože bohaté půdy dostanou nadzemní části rostliny do nadměrné bujnosti, což může způsobit nedostatečný výtěžek semen.

Zatímco vlčí bob, hrách a fazole faba lze s úspěchem pěstovat při středním množství srážek a na lehčích písčitých půdách, luskovina vhodná pro velké plochy alkalických a často těžších půd v oblastech s méně než 350 mm srážek za rok v jihozápadní Austrálii, zahrnující části Západní Austrálie, Jižní Austrálie, Victoria a Nový Jižní Wales, chybí. Perry (1993) odhaduje, že v samotné západní Austrálii jsou 4 miliony hektarů alkalické půdy nevhodné pro pěstování bobu úzkolistého (*Lupinus angustifolius*). Tyto oblasti jsou potenciálně vhodné pro pěstování druhů *Vicia* a *Lathyrus* přizpůsobených malým množstvím srážek a alkalickým půdám (ENNEKING, 1994).

Pěstování vikví v zemědělství Středomoří prochází v současné době renesancí, což by mohlo vést k revoluci v současném zemědělství na územích, která leží ladem, a v dalších systémech obdělávání půdy. Vikve jsou víceúčelové plodiny, které je možné využít v podobě sena nebo semen, přičemž zároveň poskytují možnost „zeleného hnojení“ a pastvy (ENNEKING, 1994).

2.4.1. Druhy *Vicia* a *Lathyrus* v Austrálii

První pokusy s rostlinami rodů *Vicia* a *Lathyrus* byly provedeny v roce 1945. V této době bylo požadováno devět základních charakteristik alternativních luskovin pěstovaných na zrno:

1. Možnost sklízet tyto rostliny stávající zemědělskou mechanizací.
2. Růstové období 5–7 měsíců.
3. Tolerance k půdním roztočům *Halotidius destructor* přenášených koroptvemi, vojtěškové bleše (*Sminthurus viridis*) a imunita vůči zrnokazu hrachovému (*Bruchus pisorum*).
4. Větší tolerance k nepříznivým klimatickým podmínkám než hrách.
5. Výnosy zrna a píce přinejmenším rovnocenné hrachu.
6. Semeno zhruba o velikosti hrachu, nebo alespoň dostatečně velké, aby je ze země mohla spást ovce.
7. Reziduální půdní pokryv po letní pastvě.
8. Rovnoměrné zrání a lusky odolné vůči rozbití.
9. Schopnost snášet částečné spásání během vegetačního období (BAILEY, 1952; CIT. ENNEKING, 1994).

2.4.2. Využití rostlin rodu *Vicia*

Georg (1987a, 1987b) popsal, že vikev narbonská a vikev setá byly vybrány jako nejvhodnější vikvovité druhy pro produkci luštěnin v Austrálii v podmínkách nízkého množství srážek suššího okraje obilného pásu. To bylo připsáno jejich relativně vysokým výnosům zrn za nepříznivých podmínek. Vikev narbonská má další výhodu ve svislém habitu, který umožňuje snadné mechanické sklizení stávajícími stroji. Nebyly zjištěny žádné závažné problémy toxicity při krmení ovčí druhy *Vicia*, pokud byly použity uvážlivě jako doplňky ve spojení s jinými krmivy, a chování zvířat při příjmu potravy bylo normální (ENNEKING, 1994).

2.4.2.1. Využití rostlin rodu *Vicia* jako luskovin pěstovaných na zrno

Pro produkci semen se používá hlavně vikev setá. Semena vikve narbonské byla považována za horší než faba fazole, což je důvod pro její řídké pěstování, i když se uvádí, že její květy mají příjemnou vůni. Semena vikví jsou na proteiny bohaté krmivo a slouží především jako doplněk k jiným krmivům, ale jsou přijímána zvířaty s určitou neochotou, protože obsahují hořké látky. Koně je přijímají nejlépe. Byla doporučena detoxikace, která se používá pro vlčí bob. Vikev by neměla být použita pro krmení ve velkém množství, protože v opačném případě může mít negativní vliv na zdraví zvířat, zejména pro gravidní a mladá zvířata. Předpokládá se, že pokud jsou koně krmeni přílišným množstvím vikve, aniž by vykazali dostatek aktivity, může dojít z hůře stravitelného krmiva vikve ke kontraktálnímu poškození mozku (ENNEKING, 1994).

Laumont (1954) doporučuje krmení vikví setou a navrhl, že semena by měla být rozdrčena, promáčena a podávána hospodářským zvířatům pouze v malých množstvích. Podobně Kling (1928) doporučil, aby mohly být vikev použity podobným způsobem jako hrách, měly by být podávány v menším množství, protože jejich hořká chuť způsobuje, že nejsou zvířaty konzumovány ve velkém množství. Stejně tak Oldershaw (1931) uvedl, že pokud jsou semena vikve neprodejná, mohou být využita pro krmení dobytka a koní místo hrachu, ale ne více, než v množstvích dosahujících 12,5 % v jiných krmivech (ENNEKING, 1994).

2.4.2.2. *Vicia narbonensis*

Kansu (1961) testoval zrna vikve narbonské v trávicím procesu ovcí a zjistil, že tento druh by mohl být použit ve značných dávkách pro ovce, protože obsahuje vysoké množství stravitelných živin, a předpověděl, že tento druh bude hrát důležitou roli jako krmivo v blízké budoucnosti. Téměř o 20 let později v Austrálii Allden a Geytenbeek (1980) přinesli důkazy, které naznačují, že vikev narbonská je nevhodná pro ovce (6 měsíců staří Suffolk x Merino berani), protože její zkrmování mělo negativní vliv na růst vlny, zatímco hmotnosti sledovaných zvířat byly normální ve srovnání s ovci, které konzumují běžné plodiny v podobě vikve seté, faba fazole a ostatních luskovin pěstovaných na zrno (ENNEKING, 1994).

Naopak Mateo-Box (1961) neprokázal žádný škodlivý vliv na růst vlny dospělých Merino beranů po krmení narbonskými fazolemi jako doplňkem stravy,

kteří měli *ad libitum* zásoby sena na pastvě. Semena vikve narbonské se používala pro krmení hospodářských zvířat, především skotu, který je, jak se zdá, snáší lépe než prasata a ovce, za předpokladu určité formy zrna. To fungovalo, jestliže si zvířata zvykla na chuť, ale sirný pach semen může následně přejít do mléka (ENNEKING, 1994).

Allden a Geytenbeek (1984) podotkli, že dobytek pasoucí se na vzrostlých porostech luštěnin (např. hrachor žlutoplodý, fazole faba, bob úzkolistý, hrách setý) přibral jen v případě faba fazole, která měla velká semena a netříštivé lusky. Jejich váhový přírůstek na vlčím bobu byl přiměřený, dokud byla semena zachována. Ovce přibrala v případě krmení všemi plodinami. Tato studie ukázala, že váhové přírůstky ovcí živících se vyspělými kulturami luštěnin pravděpodobně nemají žádný vztah k přírůstkům skotu za podobných podmínek, kvůli rozdílům v chování zvířat při pastvě (ENNEKING, 1994).

Mateo-Box (1961) popisuje, že se vikev narbonská nezdá být vhodným krmivem pro drůbež, která má velké potíže s její konzumací. Částečně to bylo potvrzeno Easonem et al. (1990), kteří studovali výživovou hodnotu vikve narbonské při 5 a 10% úrovni začlenění vikve narbonské do stravy u den starých kuřat brojlerů, krmených do 21 dnů věku. Přírůstky byly srovnatelné s hrachem setým, bobem úzkolistým, sójou (*Glycine max*) a masovou moučkou ve stravě. Z chemického složení zrna vikve narbonské bylo zjištěno, že je podobné jako u hrachu použitého v experimentu, a zjištěné hodnoty souhlasily s těmi uvedenými Gomezem (1983). Výsledky ukázaly, že narbonské fazole by mohly být zahrnuty až do množství 10 % ve výživě brojlerů, aniž vykazují nějaké negativní dopady na růst, nicméně ve srovnání se sójou byl při krmení narbonských fazolí při 10 % začlenění do krmiva snížen o 4 % a živá hmotnost po 21 dnech o 2,6 %. Krmení hrachem na stejné úrovni vedlo ke snížení živé hmotnosti o 2,7 %. Ve větším měřítku experiment se 136 kuřaty smíšeného pohlaví, která byla krmena do 42 dnů věku, všechna krmená narbonskou fazolí (8 %, 14 %, 20 % zařazení do krmiva) měla nižší příjem krmiva, což vyústilo v nižší hmotnostní přírůstky (Johnson and Eason, 1990; cit. ENNEKING, 1994).

Negativní odpověď prasat na zařazení vikve narbonské do krmiva se projeví již po prvním požití, zatímco u kanavaninu (I, viz obrázek 4) je rozeznatelná až po druhém požití. To naznačuje, že nechutnost semen vikve narbonské může být

způsobena odpornou chutí (Enneking, 1994). Studie Daviese (1987), která zahrnovala krmení prasat krmivem s obsahem 35 % semen vikve narbonské po dobu dvou týdnů, zdokumentovala případné škodlivé účinky tohoto zrna. Příjem krmiva poklesl pod úroveň udržení tak, že zkouška musela být ukončena. Rozbor krve těchto prasat odhalil vysoké hladiny bilirubinu. Hladiny γ -glutamyltransferasy a aspartát-transferasy byly v normálním rozmezí, přičemž žádný významný rozdíl v krevních vzorcích odebraných z kontrolních vzorků nebyl zjištěn, i když negativní trend pro tyto dva enzymy byl zřejmý u zvířat krmených narbonskou fazolí. Při histopatologickém vyšetření byly v ledvinách nalezeny krystaly. Byly hlášeny příznaky mírné intersticiální nefritidy, střevní klky byly menší, než je obvyklé, jiné tkáně neprokázaly žádné zjevné vady. Vyšší hladiny bilirubinu naznačují, že některé krevní poruchy se objevily po delším požívání krmiva v podobě vikve narbonské, tedy že spotřeba semen vikve narbonské ovlivňuje i červené krvinky, jak je dobře zdokumentováno u fazole faba (ENNEKING, 1994).

V této souvislosti stojí za zmínku, že bylo zaznamenáno několik případů hemolýzy u psů, skotu a ovcí po požití česnekovitých rostlin (rod *Allium*). Dimethyldisulfid a dipropyldisulfid byly prokázány jako původci podobných hemolytických účinků u psů konzumujících cibuli. U disulfidů bylo také prokázáno, že ovlivňují katabolismus glukosy v červených krvinkách, čímž snižují hladinu NADPH pro redukci glutathionu (FENWICK AND HANLEY, 1985; GRUHZIT, 1931B; GRUHZIT, 1931A; CIT. ENNEKING, 1994).

Podobné účinky vykazuje i aminokyselina S-methylcysteinsulfoxid vyskytující se v brukvovitých rostlinách (čeleď Brassicaceae). Její přítomnost způsobuje vážné zdravotní komplikace jak volně žijícím přežvýkavcům, zejména srnčí zvěře, tak chovaných zvířat. Hlavní příznaky jsou nechutenství, pokles doживosti, u ovcí snížená tvorba vlny, poruchy reprodukce, poškození jater a ledvin. U citlivých druhů, hlavně srnčí zvěře, dochází až k poruchám centrální nervové soustavy, poruchám smyslů a změnám chování.

Nejzávažnější poruchou je pak hemolytická anémie. Vzniká v důsledku poškození přirozeného obranného mechanismu proti oxidaci iontů Fe^{2+} na Fe^{3+} v červených krvinkách. Důsledkem je vznik methemoglobinu, který není schopen vázat a transportovat kyslík. Takto poškozené krvinky se pak označují jako Heinz-Ehrlichova tělíska (KALAČ, MÍKA, 1997).

Pozorované příznaky při prodlouženém a klesajícím požívání potravy obsahující *V. narbonensis* mohou částečně souviset s účinky hladovění, nicméně, protože neexistují dostupné informace o metabolismu S-vinylcysteinu u monogastričních zvířat nebo v žaludku přežvýkavců, potenciální toxické účinky požití vikve narbonské nelze v budoucích studiích opomíjet (ENNEKING, 1994).

S ohledem na zjištěné krystaly v ledvinách je zajímavé, že Däbritz a Virtanen (1964, 1965) získali vyšší homolog (Cys-S-CH₂-CH₂-S-Cys) dženkolové kyseliny jako hlavní vedlejší produkt během syntézy cyklické formy S-vinylcysteinu z cysteinu a dibromethanu. Dženkolová kyselina byla poprvé izolována z dženkolových bobů (*Pithecolobium lobatum*) a je známo, že způsobuje poškození ledvin v důsledku ukládání svých krystalů v ledvinách po delším požívání těchto fazolí. Pozorování krystalů v ledvinách prasat po krmení s 35% podílem *V. narbonensis* ve stravě naznačuje, že je může tvořit analogický metabolit GVC (DAVIES, 1987; VAN VEEN AND HYMAN, 1935; ENNEKING, 1994).

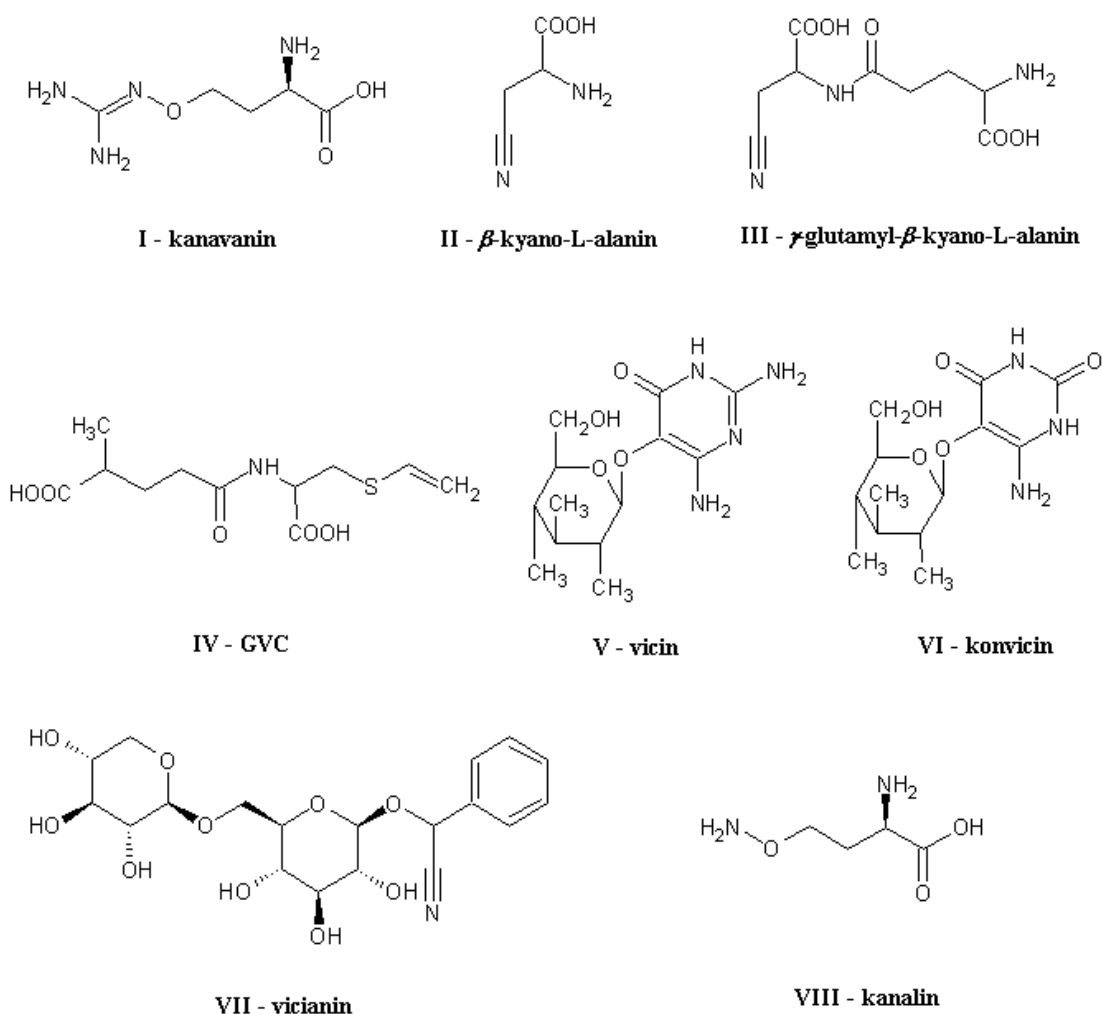
2.5. Lidská spotřeba rostlin rodu *Vicia*

Pokud jde o použití vikvovitých rostlin pro lidskou výživu, je možné, že bylo v minulosti mnoho druhů v určité době konzumováno lidmi. Protože toxicita je vždy závislá na dávce, příležitostné použití těchto rostlin pro výživu pravděpodobně nepředstavuje žádné velké nebezpečí. Více jedovatá semena také bývají méně chutná. Praxe namáčení a vyluhování semen se pravděpodobně vyvinula proto, aby byla lépe stravitelná. Jak uvádí Clémont-Mullet (1866), tento postup vyžadoval máčení osiva po několik dní a následné odkornění, prováděné zahříváním namočeného osiva. I pak bylo uváděno doporučení, že by lidé neměli jíst vikve samotné, ale měly by být používány společně s moukou z čočky nebo pšenice. Většina nízkomolekulárních toxinů v semenech rostlin *Vicia* je velmi dobře rozpustná ve vodě, a proto se mohou dobře vymývat, jakmile osemení rozpraská. Jak dokumentují Zohary a Hopf (1988), již v pozůstatcích velmi raných neolitických sídlišť byly nalezeny velké zásoby *V. ervilia*, pravděpodobně pro případ hladomoru. Nejstarší listinné důkazy jsou z 12. století z Andalusie. Další důkazy o konzumaci druhů *Vicia* uvádí Gärtner et al. (1801), Mueller (1881) a Bois (1927), který uvedl,

že zrna vikve pilovité, vikve žluté (*V. lutea*), vikve úzkolisté (*V. angustifolia*) a vikve tenkolisté (*V. tenuifolia*) (druhy, které rostly ve Francii) mohla být v období hladomoru smíchána s pšenicí a konzumována, protože byla bohatá na albuminy a sacharidy (ENNEKING, 1994).

2.6. Toxicita vikvovitých rostlin

2.6.1. Toxiny ve vikvovitých rostlinách a jejich biologická aktivita



Obrázek 4. Struktura nejvýznamnějších antinutričních sloučenin přítomných ve vikvovitých rostlinách

Semena jednotlivých druhů vikví se značně liší ve složení svých sekundárních metabolitů (obrázek 4). Zastoupení neobvyklých aminokyselin, také nazývaných neproteinogenní (popř. nebílkovinné) aminokyseliny, které lze snadno

izolovat ze semen, bylo použito pro chemotaxonomickou klasifikaci, protože umožňují rozdělení rodu do zřetelných podrodových skupin (KUPICH, 1976, BELL AND TIRIMANN, 1965; TSCHIER SCH AND HANELT, 1967, CIT. ENNEKING, 1994). Tři hlavní skupiny druhů mohou být odděleny strukturou a zastoupením jejich neproteinogenních aminokyselin a dipeptidů v semenech (BELL AND TIRIMANN, 1965; TSCHIER SCH AND HANELT, 1967; BELL, 1971, CIT. ENNEKING, 1994).

Druhy podrodu *Vicilla*, mezi nimi vikev čočkovitá (*V. ervilia*), vikev článkovaná (*V. articulata*), vikev huňatá, vikev bengálská (*V. benghalensis*) a vikev ptačí (*V. cracca*), obsahují toxický analog argininu, kanavanin (**I**). V rámci podrodu *Vicia* je jedna skupina (která zahrnuje vikev setou) charakteristická přítomností β -kyanoalaninu (**II**) a γ -glutamyl- β -kyanoalaninu (**III**). Ostatní druhy tohoto podrodu, včetně vikve narbonské, se liší přítomností dipeptidu γ -glutamyl-S-vinylcysteinu (GVC, **IV**). Potravinová luštěnina fazole faba je charakteristická přítomností vysoké hladiny vicinu (**V**) a konvicinu (**VI**) (ENNEKING, 1994).

V práci Bella a Tirimanna (1965) byly dvě z hlavních kyselých ninhydrin pozitivních sloučenin, přítomných v semenech druhů vikve narbonské, označeny jako VA₁ a VA₃. Bylo uvedeno, že látka VA₁ může být rozpadovým produktem sloučeniny VA₃ v kyselém prostředí, a byla zdokumentována peptidová povaha VA₃. Její chemická struktura byla posléze identifikována jako γ -glutamyl-S-vinylcystein (GVC). Výskyt GVC u druhů, u kterých je dokumentován obsah VA₃, dosud nebyl ověřen, ale vzhledem k taxonomicky významnému rozšíření dalších antinutričních faktorů v rodu *Vicia* lze předvídat, že tato látka je totožná s VA₃. Birch (1983) dokumentoval přítomnost VA₁ ve stoncích a listech vikve narbonské a *V. johannis*, což obdobně naznačuje, že VA₃ je přítomna v semenech *V. johannis*.

Možné kombinace známých, nutričně závažných nízkomolekulárních toxinů v semenech *Vicia* se zástupci nejvýznamnějších druhů uvedenými v závorce:

1. kanavanin (vikev čočková)
2. kanavanin a GVC (vikev huňatá, vikev bengálská)
3. GVC (vikev narbonská)
4. kyanoalanin a pyrimidinové glykosidy (vikev setá)
5. kyanoalaninové kyseliny a vicianinové a pyrimidinové glykosidy (vikev setá, *V. sativa* subsp. *nigra*)
6. pyrimidinové glykosidy (fazole faba) (tabulka 2)

(ENNEKING, 1994).

Tabulka 2. Antinutriční složky nejvýznamnějších zástupců rodu *Vicia*

kanavanin	kanavanin a GVC	GVC	kyanoalanin a pyrimidinové glykosidy	kyanoalaninové kyseliny a vicianinové a pyrimidinové glykosidy	pyrimidinové glykosidy
vikve čočková	vikve huňatá	vikve narbonská	vikve setá	vikve setá	fazole faba
	vikve bengálská				

β -Kyanoalanin (**II**) a γ -glutamyl- β -kyanoalanin (**III**) jsou primárními produkty asimilace HCN v rostlinách, a proto skupina 5 představuje podmnožinu skupiny 4 (TSCHIER SCH, 1964A; TSCHIER SCH, 1964B; FOWDEN AND BELL, 1965, HANELT AND TSCHIER SCH, 1967; CIT. ENNEKING, 1994).

2.6.1.1. Kyanové glykosidy v druzích *Vicia*

Ritthausen a Kreusler (1870) poskytli první klíč k jedné z příčin toxicity rostlin rodu *Vicia* s poznámkou, že semena vikve seté uvolňují HCN, pokud jsou navlhčena vlažnou vodou. Navrhli, že některé odrůdy vikve seté, které uvolnily vysoké hladiny HCN, by mohly být vzhledem k přítomnosti kyanových glykosidů potenciálně toxické. V důsledku toho byla pozornost výzkumníků věnována přítomnosti kyanových glykosidů v semenech rostlin rodu *Vicia* (ENNEKING, 1994).

Akbari (1965) zjistil, že obsah HCN ve vegetativních tkáních rostlin ze 100 % kvetoucích až do tvorby lusků (např. při sklizni v době běžné pro sklizeň zelené píce vikve seté) byl shledán velmi nízký u všech částí rostlin, s výjimkou semen. S rostoucím rozvojem (konec kvetení až uvolnění semen) byl nalezen zvýšený obsah HCN u všech vzorků, s obzvláště rychlým nárůstem u dříve dozrávajících druhů, což ale může být způsobeno vývinem (ENNEKING, 1994).

V tomto ohledu je sledováno vnitřní biochemicko-geografické specifické složení na základě testovaných materiálů, kdy vzorky z Balkánu a Turecka obsahovaly vicianin (**VII**), zatímco materiál z Íránu byl převážně bez HCN. Žádné paralely tohoto rozdílu ve vicianinu a morfologických znacích nebyly nalezeny.

S ohledem na vlivy životního prostředí na obsah HCN bylo zjištěno, že materiály během chladnějšího léta s více dešti měly vyšší koncentrace vicianinu než za teplejších a sušších podmínek. Environmentální rozdíl může dosahovat až poloviny obsahu HCN, nalezeného při pěstování v teplejších podmínkách (ENNEKING, 1994).

Harborne (1982) přezkoumal klasickou studii o polymorfismu vzniku kyanů u jetele plazivého (*Trifolium repens*). U distribuce kyanových genotypů jetele plazivého bylo zjištěno, že koreluje s výskytem hlemýžďů, kteří se živí tímto druhem. Distribuce kyanových genotypů vikve seté je pravděpodobně výsledkem biotického selekčního tlaku a neexistence této zvláštnosti ve většině íránských vzorků naznačuje, že v tomto konkrétním prostředí nebyl biotický selekční tlak na kyany tolik důležitý. Pokud se nekyanový charakter shoduje u volně žijících, kultivovaných a domácích íránských materiálů, pak by odrážel nepřítomnost predátorů, proti kterým jsou kyanové glykosidy účinnou strategií obrany (ENNEKING, 1994).

2.6.1.2. Toxicita vicianinu a HCN

Anderson et al. (1925) testovali toxicitu vicianinu (**VII**, viz obrázek 4) pomocí aplikace podkožních injekcí potkanům a nepozorovali žádnou toxicitu, pravděpodobně kvůli nedostatečnému uvolnění HCN touto cestou podání. Akbari (1965) se zmínil o problému toxicity způsobeném kyanovými glykosidy. Toxicita těchto látek je způsobena uvolňováním HCN, která postihuje buněčné dýchání. Smrt způsobí HCN udušením, podobně jako u otravy oxidem uhelnatým. Toto nastane, když je překročena určitá kritická mez v krvi, která leží mezi 0,5–1 mg HCN/kg tělesné hmotnosti. Dosažení této úrovně je funkcí absorpce a detoxikace. Když je rychlost absorpce vyšší než rychlost detoxikace a kritické hranice je dosaženo, pak dochází k úmrtí. Letální dávka (LD) je tedy součtem celkové výše HCN detoxikovaného a výše HCN v těle. Míra detoxikace je závislá 1. na individuální reakci, 2. na výši příjmu krmiva a 3. na rychlosti hydrolýzy kyanových glykosidů, která je závislá na bakteriální činnosti a je mnohem výraznější v plném batoru než v prázdném žaludku. Protože detoxikace HCN je závislá na metabolismu sirných aminokyselin, vyčerpání těchto látek u zvířat pasoucích se na pastvinách s vysokým obsahem kyanogenních sloučenin bylo příčinou tak zvané chronické intoxikace,

která se projevuje metabolickými poruchami, kožními lézemi, problémy se srstí a s játry (DREPPER, 1961; CITOVÁN V AKBARI, 1965; ENNEKING, 1994).

2.6.1.3. Kanavanin

Kanavanin (**I**, viz obrázek 4), který je analogem proteinogenní aminokyseliny argininu, je přítomen v mnoha druzích luštěnin. Jeho toxikologii původně studoval Tschiersch (1962) a později, s ohledem na využití této sloučeniny v nádorové chemoterapii, byla uskutečněna podrobná studie jeho farmakokinetiky a toxikologie Thomasem a Rosenthalem (1987a, b). Tschiersch (1962) uvedl možný vliv kanavaninu na ornitinový cyklus, jak dokládají změny složení aminokyselin v játrech potkanů krmených stravou s obsahem kanavaninu, ale předpokládá se, že hlavní toxicita kanavaninu by mohla být způsobena interakcí s argininem, protože bylo možné zmírnit toxické účinky kanavaninu současným podáním argininu v desetinásobně vyšší dávce (BELL, 1958; BELL, 1960; BIRDSONG *ET AL.* 1960; BELL *ET AL.* 1978; CIT. ENNEKING, 1994).

Thomas a Rosenthal (1987a) prokázali, že u potkanů vede podávání kanavaninu buď ústně nebo podkožně k vypadávání srsti, ztrátě chuti k jídlu a hubnutí. Při každodenním podávání 2 g/kg L-kanavaninu po dobu jednoho týdne byla nejvíce poškozeným orgánem slezina (ENNEKING, 1994).

Malinow *et al.* (1982) používali primátů jako modelu pro studium systémového lupus erythematoses (SLE) vyvolaného 1–2% potravní hladinou L-kanavaninsulfátu. Tento model se vyznačoval anémií, která vyplývala z výskytu protilátek na červené krvinky, kvůli snížení složek komplementu v séru, protilátkám proti jaderným antigenům, protilátkám proti zdvojení DNA a ukládání imunoglobulinu a komplementu v ledvinách a kůži (ENNEKING, 1994).

Prete (1985) také zjistil, že L-kanavanin indukuje autoimunitní reakce u myši při podání na 0,725 % stravy. Účinky na příjem krmiva nebyly zaznamenány. Byly zjištěny protilátky dvojšroubovice DNA u myši na kanavaninové stravě. Kanavanin také navodil významnou renální patologii. Toto zvýšení produkce autoprotilátek korelovalo s nárůstem histologického skóre a ukládání imunoglobulinu. Prete došel k závěru, že účinek kanavanin byla způsoben především nesprávnou funkcí B-lymfocytů. Tak může kanavanin ovlivnit funkci B-lymfocytů a může vést k

indukci protilátkami zprostředkovaných autoimunitních jevů u normálních myší (ENNEKING, 1994).

2.6.1.4. Toxicita kanavaninu pro přežvýkavce

Je k dispozici velmi málo informací o toxicitě kanavaninu pro přežvýkavce a většina z toho jsou důkazy nepřímé, založené na občasných otravách skotu rostlinným materiálem s vysokým obsahem kanavaninu. Účinky krmení ovcí *Canavalia ensiformis* byly studovány výzkumníky na Rowettově ústavu. Tito autoři zjistili výrazný posun směrem ke Gram-negativním bakteriím ve vzorcích tekutiny z bachoru ovcí krmených rostlinami rodu *Canavalia*. Studovali tento jev tak, že zkoumali vliv kanavaninu na izolovaných kmenech bakterií bachoru, ale nebyl nalezen konzistentní účinek této sloučeniny na Gram-pozitivní druhy. Přítomnost arginasy je předpokladem pro rozklad kanavaninu na kanalin (**VIII**), který je velmi toxický díky své schopnosti vytvářet oximy s aldehydy (např. vitaminem B₆) a ketokyselinami (CLAUGHTON AND CLAUGHTON, 1955; SHONE, 1961; DOMINGUEZ-BELLO AND STEWART, 1990; ROSENTHAL, 1991; CIT. ENNEKING, 1994).

Ačkoliv se zdá, že na rozdíl od monogastričních zvířat je adaptace přežvýkavců pravděpodobně funkcí jejich bachorové flóry, podrobnosti o detoxikaci kanavaninu vyžadují další studium, a mohou existovat okolnosti, za nichž tato látka nebo její rozpadový produkt kanalin (VII, viz obrázek 4) může mít toxické účinky na přežvýkavce (ENNEKING, 1994).

2.6.1.5. Biochemie β -kyanoalaninu a jeho γ -glutamyl derivátu

β -Kyanoalanin (**II**) a γ -glutamyl- β -kyanoalanin (**III**) jsou společně s dalšími aminokyselinami rodů *Lathyrus* (hrachor) a *Vicia* (vikev) nazývány lathyrogeny. Příjem těchto látek vyvolává u zvířat a lidí onemocnění neurolathyrismus (často označovaný jen jako lathyrismus). Tato choroba se vyskytuje až v podobě epidemií převážně v rozvojových oblastech na Indickém poloostrově. Nejvíce v obdobích hladomorů a nedostatku kvalitnější stravy, kdy lidé konzumují semena hrachoru setého. Typicky napadá centrální nervovou soustavu s projevem slabosti až ztrnutím svalů, vedoucím mnohdy až k paralýze svalstva dolních končetin (viz obrázek 5).



I



II

Obrázek 5. Postižení dolních končetin při lathyrismu.

Vzácnější formou je osteolathyrismus, porucha metabolismu pojiva, především kolagenu a elastinu, postihující šlachy, vazy a v menší míře i kosti a klouby. Ze zvířat je nejcitlivější drůbež (KALACH, MÍKA, 1997).

Neurotoxin β -kyanoalanin (II, viz obrázek 4) a jeho γ -glutamyl peptid (III, viz obrázek 4) byl nejprve izolován ze semen vikve seté a v poslední době také z jedovaté houby *Clitocybe acromelalga*. Změny v koncentraci těchto látek mezi různými kultivary vikve seté byly zdokumentovány (RESSLER, 1962; RESSLER ET AL. 1963; FUSHIYA ET AL, 1993; RESSLER ET AL., 1969; CIT. ENNEKING, 1994).

Výtažky ze sazenic vikve seté měly vysokou aktivitu γ -glutamyltransferasy, enzymu, který může katalyzovat vznik γ -glutamyl- β -kyanoalaninu z β -kyanoalaninu v přítomnosti glutathionu *in vitro*. Toxicita a metabolismus β -kyanoalaninu a jeho γ -glutamyl peptidu byly detailně studovány. Symptomy při krmení kuřat nebo injekcích s β -kyanoalaninem byly přirovnávány k těm pozorovaným při nedostatku thiaminu u holubů. Krmení potkanů stravou obsahující subakutní úroveň β -kyanoalaninu za dva měsíce ukázalo zpomalení růstu, vysokou míru úmrtnosti a vylučování cystathioninu. Ressler et al. (1967) nenalezli žádný důkaz o antagonistickém účinku β -kyanoalaninu proti vitaminu B₆, ale považovali ho za užitečnou protilátku v případě akutní otravy vickví. Podávaný β -kyanoalanin byl nalezen ve všech tkáních potkanů a koček, s výjimkou ledvin, a vyskytuje se

v podobě dipeptidu γ -glutamyl- β -kyanoalaninu a glutathionového analogu γ -glutamyl- β -kyanoalanin-glycinu. V ledvinách a moči byl nalezen volný β -kyanoalanin, který je převládající vylučovací formou toxinu (RESSLER, 1964; RESSLER, 1975; PFEFFER AND RESSLER, 1967; RESSLER ET AL., 1967; SASAOKA ET AL., 1968; RESSLER ET AL., 1967; CIT. ENNEKING, 1994).

2.6.1.6. Pyrimidinové glykosidy

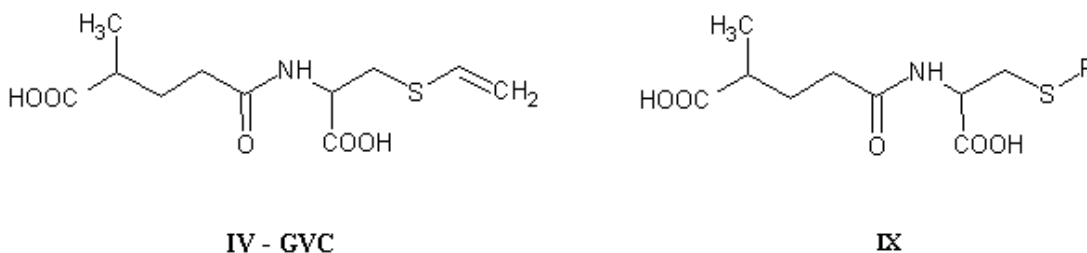
Vicin (**V**, viz obrázek 4) a konvicin (**VI**, viz obrázek 4) jsou β -glykosidy pyrimidinových sloučenin divicinu a isouramilu a jsou hydrolyzovány β -glukosidasou. Vysoká hladina vicinu je přítomna v semenech vikve seté a fazole faba (které obsahují rovněž značné množství konvicinu). Požívání jídla připraveného ze semen fazole faba může vyvolat nástup favismu, akutního hemolytického onemocnění, které postihuje jednotlivce, postrádající dostatečnou aktivitu produkce NADPH enzymem glukosa-6-P-dehydrogenasou (G-6-PD) v červených krvinkách. Několik genetických variant nedostatku tohoto enzymu, který je považován za adaptivní výhodu proti malárii, je známo na celém světě, přičemž favismus je extrémním projevem této zvláštnosti. To je zvláště převládající v některých populacích Středomoří a Jihozápadní Asie. Vicin a konvicin mohou být příčinou favismu, protože produkty jejich hydrolýzy jsou nestabilní a tvoří radikály, které mohou způsobit úbytek redukovaného glutathionu (GSH) v červených krvinkách s nedostatkem G-6-PD. Oxidovaný glutathion (GSSG) je možno regenerovat pomocí redukce NADPH. Nedostatek NADPH kvůli nedostatku G-6-PD brání doplňování GSH a předurčuje červené krvinky k oxidačnímu poškození, které může v konečném důsledku vést k hemolytické krizi (BENDICH AND CLEMENTS, 1953; BIEN ET AL. 1968; HÉRISSEY AND CHEYMOL, 1931; MAGER ET AL., 1965; MCKAY, 1992; MAGER ET AL., 1980; VUFFIAMY ET AL., 1992; BELSEY, 1973; LIN AND LING, 1962A, 1962B, 1963; MAGER ET AL., 1965; MARQUARDT, 1989; MAGER ET AL., 1980; MARQUARDT, 1989; CIT. ENNEKING, 1994).

2.6.1.7. γ -Glutamyl-S-vinylcystein (GVC)

γ -Glutamyl-S-vinylcystein (**IV**, viz obrázek 4 a 6) byl izolován a vykryštalizován z vodných ethanolových výtažků semen vikve narbonské. γ -Glutamyl-S-vinylcystein je přítomen v závislosti na genotypu a prostředí v rozmezí

0,7 až 3 % čerstvé hmoty. Tento dipeptid je fotolabilní prekurzor látek odpovědných za odporný zápach při klíčení narborské fazole. Je to užitečný chemotaxonomický znak pro rostliny *Viciae*, stejně jako významná forma ukládání síry v semenech. (ENNEKING, 1998)

V česnekovitých rostlinách (rod *Allium*) lze nalézt analogické sloučeniny (**IX**, viz obrázek 6).



Obrázek 6. Struktura GVC a jeho analogů v česneku; R = CH₃ (GSMC); CH=CHCH₃ (GSPC); CH₂CH=CH₂ (GSAC)

2.6.1.7.1. Vlastnosti γ -glutamyl-S-vinylcysteinu

Biologické experimenty ukázaly, že antinutriční faktor semen vikve narborské je extrahovatelný 30% vodným roztokem ethanolu, je tepelně stabilní, labilní v kyselém prostředí, přítomný ve frakci dělohy/embrya, a že se jeho obsah snižuje během klíčení. Biologická aktivita narborských fazolí korelovala s přítomností UV absorbujícího, ninhydrin pozitivního, kyselého peptidu (ENNEKING, 1994).

Kyselá hydrolyza se ukázala být účinná pro zvýšení chutnosti zrna, čímž se zjistilo, že přidané hodnoty se dá dosáhnout pomocí jednoduchého ošetření. Tento přístup ke zlepšení chutnosti by mohl být různorodý a efektivní nízkotechnologické metody, které využívají technologii fermentace kyseliny mléčné, mají v tomto směru velikou naději (ENNEKING, 1994).

2.6.1.7.2. Analytické stanovení GVC

Enneking (1994) popsal problémy při stanovení GVC pomocí HPLC z důvodu jeho nestability při alkalickém pH, proto dále pro kvantitativní analýzu GVC s vnitřním standardem doporučoval použití kapilární zónové elektroforézy

(CZE) s možností aplikace téměř neutrálního prostředí, a tedy zajištění vyšší stability GVC.

V roce 2011 popsali Sánchez et al. novou kolorimetrickou metodu pro stanovení GVC. Pomocí této metody s použitím jodoplatinátu a standardu GVC sestrojili kalibrační křivku. Vzhledem k rychlosti, jednoduchosti, nízkým nákladům, velké spolehlivosti a výsledkům srovnatelným s detekcí pomocí HPLC se může tato metoda ukázat jako velmi cenná pro stanovení GVC ve vzorcích. Spolehlivost dokládá i fakt, že nedocházelo k žádným interferencím jinými sloučeninami obsahujícími síru (Sánchez, 2011b).

Kvantitativní analýza S-vinylcysteinu a γ -glutamyl-S-vinylcysteinu kapilární zónovou elektroforézou ukázala lineární vztah mezi snížením příjmu krmiva a celkovým obsahem S-vinylcysteinu. Z toho lze vyvodit závěr, že izolovaný dipeptid je hlavním antinutričním faktorem přítomným v semenech vikve narbonské (ENNEKING, 1994).

Výsledky krmení ovcí ve studii Alldena a Geytenbeeka (1980) prokázaly, že ovce, které se živí vikví narbonskou, produkovaly méně vlny než kontrolní skupina, ale váhový přírůstek zůstal normální. Vzhledem k tomu, že sirné aminokyseliny jsou důležité pro růst vlny, objev analogu sirných aminokyselin, γ -glutamyl-S-vinylcysteinu, nabízí nové vodítko k objasnění biochemické podstaty tohoto problému (ENNEKING, 1994).

2.6.1.7.3. Obsah sirných aminokyselin v luštěninách

Chutnost tří linií vikve narbonské negativně korelovala s celkovým obsahem síry v semenech. Celkový obsah síry v osivu vikve bengálské (0,37 %) a vikve narbonské (0,28–0,37 %) je mnohem vyšší, než u ostatních testovaných druhů, např.: vikve seté (0,17–0,16 %), vikve huňaté (0,2 %) a hrachu setého (*Pisum sativum*) (0,18 %). Srovnávací celkové hodnoty celkového obsahu síry byly naměřené u různých kultivarů fazole faba, čočky jedlé (*Lens culinaris*) a hrachu setého. Vikev narbonská je tedy luskovina na zrno s vysokým obsahem síry vzhledem k obsahu GVC (S:11,6 %) (BHATTY ET AL., 1977; CIT. ENNEKING, 1994).

Velké rozdíly v celkovém obsahu síry mezi jednotlivými liniemi vikve narbonské naznačují, že existují genetické variace pro tuto vlastnost. Nicméně práce Hanelta et al. (1978) o úrovních sirných aminokyselin v různých liniích fazole faba

prokázala, že jsou také silně ovlivňovány faktory životního prostředí (ENNEKING, 1994).

2.6.1.7.4. GVC jako možná zásobní sloučenina pro redukovanou formu síry

Emise těkavých sirných sloučenin z rostlin, zejména pokud jsou vystaveny nadbytku sulfátu, je všeobecně známý jev, ale víme jen málo, pokud jde o jeho biologický význam a závažnost. Vzhledem k tomu, že celková koncentrace síry v semenech vikve narbonské je relativně vysoká ve srovnání s fazolí faba, může tato sloučenina sloužit jako zásobní forma pro redukovanou formu síry a zabraňuje nekontrolované emisi těkavých sirných sloučenin z rostliny. Pokud je GVC zásobní formou síry, pak enzymy nebo katalytické podmínky pro jeho remobilizaci musí být také přítomny v rostlině v určité fenologické fázi. Byla by nutná metabolická přeměna GVC na γ -glutamylcystein a poté glutathion, má-li být využit jako zdroj cysteinu. To vyvolává zajímavou hypotézu o existenci enzymu, který konvertuje S-vinylcystein na cystein a dvouuhlíkovou jednotku, například ethylen (RENNENBERG, 1991; CIT. ENNEKING, 1994).

2.6.1.8. Vicismus: intoxikace u druhů *Vicia*

Toxicita vikvovitých rostlin byla známa již od starověku. Columella, Plinius, Galen a Dioscorides si byli jasně vědomi toxických účinků vikve čočkové. Spotřebě *V. faba* se vyhýbali egyptští kněží. Pythagoras, matematik a filozof, který pravděpodobně trpěl favismem, zakázal svým stoupencům jíst fazole nebo se dokonce přiblížit k jejich poli. I u jiných druhů *Vicia* (vikev setá, vikev huňatá, vikev drsnoplodá, vikev bengálská atd.) bylo hlášeno způsobování otravy u lidí a zvířat. Kobert (1906) razil pro takové otravy termín vicismus, na rozdíl od termínu favismus. V novější literatuře intoxikace druhy *Vicia*, způsobené především vikví huňatou a vikví bengálskou, byly označovány jako toxikózy vikví nebo k nim přidružená onemocnění (GERARDE, 1636; BECKER-DILLINGEN, 1929; HANELT, 1972; PANCIERA ET AL., 1966; PANCIERA ET AL, 1992; CIT. ENNEKING, 1994).

Zdá se, že vedle favismu existují tři další typy intoxikací rostlinami *Vicia*: 1. otrava HCN, 2. nekyanová otrava vikví setou, 3. otravy druhy obsahující kanavanin (toxikózy vikví) (ENNEKING, 1994).

2.6.1.9. Složení kontrolovaných vikví

Dostupné důkazy naznačují, že většina plevelných vikví nalezených v evropských vzorcích byla kanavaninového typu. Semena kyanových genotypů vikve seté a vikve úzkolisté jsou také poměrně častá a představují druhý zdroj potenciální toxicity u obilovinných vzorků (ENNEKING, 1994).

Pokud jde o toxicitu druhů *Vicia* obsahujících kanavanin a těch, které obsahují vicianin, jsou zde největší obavy, protože využití semen *Vicia* jako zásoby krmiva je obvykle na základě zkušeností s nekyanovými kultivary vikve seté, tudíž se vyšší toxicita neočekává. Vikev čočková a vikev článkovaná (*V. articulata*), které obě obsahují kanavanin, jsou běžným krmivem přežvýkavců v oblasti Středomoří, ale zdá se, že hladina kanavaninu v materiálu semen pěstovaných luskovin *Vicia* je mnohem nižší než v píci nebo plevelových genotypech (ENNEKING, 1994).

2.6.1.10. Role nesezónních podmínek počasí v toxicitě rostlin rodu *Vicia*

Některé z hlášených případů toxicity rostlin rodu *Vicia* jsou spojeny s nesezónními podmínkami počasí. Deštivé období je spíše ve prospěch růstu druhu *Vicia*, např. vikev ptačí, ale takové počasí také podporuje růst saprofytických hub. Wilson (1852) poznamenal, že polehlé úrody vikve (vikev setá), které nahnily na zemi, se často ukázaly být škodlivé pro koně (GÜNTHER, 1914; CIT. ENNEKING, 1994).

2.6.1.11. Toxicita *Vicia sativa*

Z hlášených případů vyplývá, že těžké fyziologické poškození, zejména u monogastričních zvířat, může být způsobeno nadměrnou konzumací semen nebo sena vikve seté. Úloha HCN není vždy jasná a tento toxin mohl být příčinou v mnoha hlášených případech. Vždy existuje také možnost výskytu jiných druhů rostlin v populacích vikve seté, takže i když je zrna považováno za čistá semena, může být přítomen ještě nějaký jiný *Vicia* genotyp (kyanový, kanavaninový typ apod.). Vikev setá var. *Blanche Fleur* je pravděpodobně jeden z nejméně toxických typů vikve seté, ale vzhledem k jeho vysokému obsahu γ -glutamyl- β -kyanoalaninu využívání jeho semen jako luštěnin bez vhodné detoxikace musí být zváženo. Toxin β -kyanoalanin požívaný orálně může mít neurotoxické účinky u mladých kuřat, u mladých potkanů způsobuje snížení růstu a zvyšuje úmrtnost. β -Kyanoalanin inhibuje cystathionasovou cestu, takže jeho přítomnost v potravě může vést k vyčerpání

cysteinu, pokud není tato sirná aminokyselina dodána z jiných zdrojů. Proto při jakémkoliv hodnocení bezpečnosti nekyanových kultivarů vikve seté k lidské spotřebě musí být brány v úvahu nepřímé toxické účinky na metabolismus sirných aminokyselin (TATE AND ENNEKING, 1992; RESSLER, 1962; CIT. ENNEKING, 1994).

2.6.1.12. Toxicita *Vicia ervilia*

Pozorované neurotoxické příznaky po požití potravy, obsahující semena vikve čočkové monogastrickými zvířaty včetně lidí, by bylo možno vysvětlit na základě zjištění Thomase a Rosenthala (1987b), kteří pozorovali vysoké koncentrace amoniaku po podání vysokých dávek *V. ervilia* potkanům (4 g/kg tělesné váhy). Časový průběh zvýšených koncentrací amoniaku byl doprovázen nervovými příznaky. Známa přítomnost L-kanavaninu v semenech vikve čočkové podporuje hypotézu, že tento analog argininu a jeho metabolity, jako kanalin, jsou další příčinné faktory toxicity tohoto druhu (ENNEKING, 1994).

2.6.1.13. Onemocnění související s konzumací vikví

Vikev huňatá je druh s dobrými adaptacemi na chlad a sucho. Na rozdíl od jiných vikví je schopna růst v písčitých půdách. Byla nejprve kultivována v Německu poblíž Magdeburgu v roce 1857 a později doporučena jako krmná plodina, což pomohlo jejímu šíření. V USA se ve velké míře pěstuje a používá se jako pastva, je sklízena jako seno a siláž, nebo je využívána jako krycí plodina (WITTMARCK, 1922; CITED BY FISCHER, 1938; HENSON AND SCHOTCH, 1968; CITED BY PANCIERA, 1978; CIT. ENNEKING, 1994).

Spotřeba osiva vikve huňaté způsobuje růstové deprese u kuřat a krůt a ve vysokých dávkách může mít za následek smrt. Spásání pastvin bohatých na vikev huňatou opakovaně způsobilo otravy dobytka (THAYER AND HELLER, 1945; ARSCOTT AND HARPER, 1964; KIENHOLZ ET AL, 1962; PANCIERA ET AL., 1966; PANCIERA, 1978; KERR AND EDWARDS, 1982; ANDERSON AND DIVERS, 1983; BURROUGHS ET AL, 1983; PEET AND GARDNER, 1986; GREEN AND KLEYNHANS, 1989; ODRIOZOLA ET AL., 1991; WOODS ET AL., 1992; JOHNSON ET AL, 1992; PANCIERA ET AL., 1992; CIT. ENNEKING, 1994). Klinické příznaky u skotu byly dermatitida, zánět spojivek s edémem víček a průjem. Tato porucha se vyskytuje sporadicky, s úmrtností kolem 50 % postižených zvířat, při nemocnosti v postižených stádech 6–8 %. Vikev chlupatá je také toxická

pro koně, což vede k systémovému granulomatóznímu zánětu. Byly zaznamenány edémy, zejména v okolí úst a očí, zánět spojivek a zrohovatění rohovky. Původce toxicity vikve chlupaté na pastvě zvířat nebyl identifikován. Burroughs et al. (1983) popsal výskyt otravy vikví u skotu v Jižní Africe. Ty byly charakterizovány těžkou dermatitidou, průjemem, vysokou nemocností a úmrtností starších krav. Podmínky byly prakticky totožné s ohnisky v Oklahomě popsané Pancierem (1978) (ANDERSON A DIVERS, 1983; CIT. ENNEKING, 1994).

Panciera navrhl, že s intoxikací vikví huňatou byly spojeny tři různé syndromy: a) akutní onemocnění a úmrtí u 5 ze 6 zvířat, která jedla semena z pytle, neklid, bolesti, křeče při manipulaci, b) poranění kůže, kašel a dušnost, celková slabost s následnou smrtí u některých zvířat po 2 týdnech, c) hrubá srst, nekrotické změny na pigmentované i nepigmentované kůži, ale jinak podobné fotosenzibilizační reakce, bolesti očí (zánět spojivek), těžké průjmy spojené s progresivním úbytkem hmotnosti a 50% úmrtnost zaznamenané u klinicky nemocného skotu ve 23 stádech USA. V některých případech také Panciera popsal ztrátu chuti k jídlu a červené pigmenty v moči. Woods et al. (1992) zaznamenali histopatologické léze u koní jako podobnosti s vikví souvisejících onemocnění a koňským systémovým granulomatózním onemocněním (SGD), které je charakterizováno generalizovaným kožním zrohováním, odrolením a vypadáním srsti a multisystémovým granulomatózním zánětem (CLAUGHTON AND CLAUGHTON, 1955, RODER, 1893; CITED BY VOLKER, 1950, CIT. ENNEKING, 1994).

Toxicita osiva vikve huňaté pro skot byla dobře popsána. Předpokládá se, že konzumace semen obsahujících 2–3 % kanavaninu může vést k akutním zdravotním problémům, zatímco případy SGD vyvolané pastvou jsou příklady chronické toxicity, v nichž mohou hrát roli nižší úrovně kanavaninu a/nebo jeho metabolitů (CLAUGHTON AND CLAUGHTON, 1955, CIT. ENNEKING, 1994).

Zdá se, že akutní toxicita semen obsahujících kanavanin pro dobytek závisí na počáteční dávce požití s prvním jídlem, jak navrhuje případy popsané Güntherem (1914) a Claughtonem a Claughtonem (1954). Příjem krmiva po první expozici bude pravděpodobně klesat, jak bylo pozorováno u prasat krmených vikví čočkovou, což je podobné u prasat krmených semeny vikve huňaté a stravou obsahující kanavanin. Počáteční vysoký příjem potravy obsahující kanavanin, který se liší podle

jednotlivých zvířat, by pak mohl vysvětlit, proč jsou některá zvířata náchylnější než jiná (JEAN-BLAIN, 1949, ENNEKING *ET AL.* 1993, CIT. ENNEKING, 1994).

Na všech hlášených případech SGD syndromu u skotu se podílí druhy obsahující kanavanin, např. vikev huňatá a vikev bengálská. Je ještě třeba určit, zda SGD případy koní, které uvedli Woods *et al.* (1992), jsou v důsledku expozice kanavaninu (nebo jiné strukturálně podobné aminokyseliny). Jak uvádí Bell *et al.* (1978), kanavanin je syntetizován řadou dalších rostlin, jako je jetel, luštěniny, tolice, apod. (ENNEKING, 1994).

Przybylska a Rymowicz-Dabrowska (1970) zjistily, že obsah kanavaninu ve vikvi huňaté dramaticky vzrostl s nástupem tvorby lusků, což naznačilo, že rostlina pak může být velmi toxická pro zvířata. Shonova studie ukazuje, že dobytek se může otrávit krmivem obsahujícím kanavanin, ale za normálních okolností omezí jejich příjem, aby zabránil intoxikaci (ENNEKING, 1994).

Všechny druhy rostlin rodu *Vicia* způsobující přidružená onemocnění mohou produkovat kanavanin. Některé příznaky intoxikace kanavaninem jako autoprotilátky, zánět ledvin a padání srsti nesou podobnost s těmi, které byly zaznamenány u těchto onemocnění (PRETE, 1985; THOMAS AND ROSENTHAL, 1987A, CIT. ENNEKING, 1994).

2.6.2. Biologické funkce sekundárních metabolitů v rostlinách rodu *Vicia* a jejich řízení

2.6.2.1. Výběr netoxických a chutných genotypů

Pro výběr netoxických a chutných genotypů je důležitý rozvoj efektivních metod pro kvantitativní detekci antinutričních faktorů. Takové metody by měly být vhodné pro testování velkého množství vzorků, jak přirozených, tak vzniklých umělou mutagenezí.

Důležitou otázkou vzniklou v souvislosti s výběrem nízkotoxinových linií je, zda genetické snížení antikrmných a antinutričních faktorů může mít negativní vliv na ekologickou zdatnost kultivarů. Podle Bella (1977), který přezkoumal ekologické funkce těchto faktorů, vývoj nejedovatých plodin by byl zcela nepraktický, pokud

snížení toxicity pro člověka nebo domácí zvířata bude provázeno stejným nebo větším snížením toxicity pro atakující hmyz, který může zničit plodiny před tím, než by mohly být sklizeny. Breider (1973) a Fenwick et al. (1990) také uvádějí opačný problém, tedy šlechtění plodin pro lepší odolnost a případy s následným zvýšením toxicity těchto kultivarů (ENNEKING, 1994).

2.6.2.2. Specifické vymizení semen

S ohledem na snížení obsahu antinutričních faktorů poskytuje poučný příklad pokus s řepkou olejnou (*Brassica napus*), který uvedl Mithen (1992). U některých kultivarů s nízkým obsahem glukosinolátů (00) v semenech byla prokázána podobná úroveň glukosinolátů v listech jako u kultivarů s vysokým obsahem glukosinolátů (0) v semenech, přičemž nebyly více náchylné vůči škůdcům a chorobám než toxičtější genotypy. Pravděpodobně tedy může být dosaženo výběru nízkotoxinových semen, zatímco příznivé ochranné účinky se udržují v jiných částech rostliny. Nicméně, Moens et al. (1992) prokázali, že citlivost sazenic řepky na slimáky je v souvislosti s nižším obsahem glukosinolátů v semenech větší, čímž vzrostou náklady na její pěstování (ENNEKING, 1994).

V současné době probíhá rozvoj kultivarů fazole faba s nulovou úrovní vicinu a konvicinu v jejich semenech a některé slibné materiály již byly získány. Zdá se, že tyto látky hrají roli v rezistenci lusků a listů k houbovým patogenům. Nicméně jejich fyziologické a biologické role při ujetí semenáčků jsou ještě otevřené a osévání semeny specifického vymizení může ovlivnit užitečné hladiny těchto látek u mladých semenáčků (DUE ET AL., 1989; RAMSAY ET AL., 1991; CITOVÁNÍ V GRIFFITHS AND RAMSAY, 1992, BJERG ET AL., 1984C, CIT. ENNEKING, 1994).

2.6.2.3. Odolnost proti hmyzu

Holt a Birch (1984) objevili souvislost mezi přítomností antinutričních faktorů a odolností vůči mšicím (mšici makové, *Aphis fabae*), kyjatce hrachové (*Acyrtosiphon pisum*), kyjatce vikvové (*Megoura viciae*) a zjistili, že nejvíce domestikované druhy byly také nejméně odolné. Ukázalo se, že β -kyanoalanin je účinný proti saranči stěhovavé (*Locusta migratoria*) (SCHLESINGER ET AL., 1976), ale byl také dokumentován jako účinný inhibitor příjmu potravy pro tři druhy kobylek (NAVON AND BERNAYS, 1978).

Biologie kanavaninu je pravděpodobně jedním z nejlépe dokumentovaných příkladů ochranné úlohy neproteinogenních aminokyselin v rostlinách. Bylo prokázáno, že kanavanin může mít toxické účinky proti širokému spektru organismů (ROSENTHAL, 1977B; ROSENTHAL, 1986; ROSENTHAL, 1991; MIERSCH ET AL., 1992; ENNEKING ET AL., 1993, CIT. ENNEKING, 1994).

Insekticidní vlastnosti těchto látek, bez ohledu k jejich edafickým, allelopathickým funkcím, a možná tolerance k suchu naznačují, že může být vhodné zaměřit se na specifické snížení těchto faktorů z osiva při zachování a posílení jejich prospěšné role v jiných částech a fenologických fázích růstu rostliny. Nejatraktivnější vlastností rostlin rodů *Vicia* a *Lathyrus* jako krmných luskovin v suchých oblastech je tolerance jednotlivých druhů a genotypů na stresové faktory, jako je sucho, chlad, dočasné zamokření, škůdci, choroby a neúrodné půdy (WRIGHT AND SRB, 1950; WEAKS AND HUNT, 1973; WEAKS, 1974; MIERSCH ET AL., 1988; MIERSCH ET AL., 1992; CIT. ENNEKING, 1994).

2.6.2.4. Postsklizňová detoxikace

Při produkci odrůd *Vicia* s nízkou hladinou toxinu (s přidanou hodnotou přes lepší chutnost, sníženou toxicitu, a proto lepší prodejnost) oproti získané výhodě z ochranných a adaptivních funkcí těchto sloučenin je nutné zjistit, zda by se genetické odstranění toxinů nebo posklizňová detoxikace (sám nákladný proces) mohla stát životaschopnou možností pro další rozvoj a využití těchto plodin. Jejich trvale udržitelný rozvoj, zejména pro chudé oblasti v zaostalých zemích, se může klonit pro posklizňové zpracování úrody, které má dlouhou tradici v mnoha částech světa a má zvláštní význam v tradičních kulturách, u kterých stále přetrvávají různé toxické nebo jinak chuťově nevhodné potraviny (ENNEKING, 1994).

Výroba potravin z jinak jedovatého nebo chuťově nevyhovujícího zrna může být důvodem dodatečných nákladů pro detoxikaci. Není pravděpodobné, že tato možnost bude životaschopná za stávajících ekonomických podmínek, ale mohou se stát atraktivnějšími v budoucnu, zejména v případě pokračování nárůstu lidské populace a tím odpovídajícího nárůstu poptávky po potravinách (ENNEKING, 1994).

2.6.2.5. Kvašení

Využívání fermentace jako nedílné součásti detoxikace potravin se široce praktikuje (OCHSE, 1931; HORSFALL, 1987; SALIH ET AL., 1991, CIT. ENNEKING, 1994). Široké spektrum fermentovaných potravin je vyráběno a konzumováno po celém světě. Potenciál pro další rozvoj fermentovaných potravin se prosazuje mezi odborníky na výživu z důvodu nutričních výhod spojených s těmito produkty. Fermentace je také účinným prostředkem pro konzervaci potravin. Fermentované potraviny mohou být připraveny v průmyslovém i domácím měřítku. Je pravda, že mnoho fermentovaných potravin se připravuje velmi jednoduchými technikami a představují technologie prostých lidí, které jsou už velmi rozšířené, což usnadňuje jejich další zdokonalení, předávání a přijímání v zaostalých zemích pro detoxikaci alternativních zdrojů potravy (YOKUTSUKA, 1991; CAMPBELL-PLATT, 1980; CAMPBELL-PLATT, 1987; REDDY AND SALUNKHE, 1989; HESSELTINE, 1983; NOUT A ROMBOUTS, 1992; CIT. ENNEKING, 1994).

Ayyagari et al. (1989) srovnávali účinnost různých indických technik domácí přípravy potravin při detoxikaci *L. sativus* a údaje ukazují, že tyto metody, které zahrnují krok kvašení, byly velmi účinné a mohou být v zásadě použity i pro posklizňovou detoxikaci semen *Vicia*, což poskytuje alternativní přístup k širšímu využití těchto obilnin bez nutnosti genetického odstranění jejich nízkomolekulárních antinutričních sloučenin. Začlenění fermentačních procesů do dalších jednoduchých potravinářských technologií nabízí také dobré vyhlídky pro detoxikaci zdrojů potravy a zároveň dává flexibilitu při manipulaci s chutí, konzistencí a barvou surovin (ENNEKING, 1994).

2.6.2.6. Detoxikace přežvýkavci

Drobné luskoviny rodu *Vicia* pěstované na zrna, *V. ervilia*, vikev setá a vikev narbonská, jsou používány jako doplňková krmiva pro výživu přežvýkavců. Maximální krmné dávky vikve pro jednotlivé varianty stravy přežvýkavců, detoxikace v bachoru a účinky této stravy na konečnou jakost výrobku vyžadují další výzkumnou pozornost (ENNEKING, 1994).

Yu et al. (2001) provedli výzkum pro zařazení pražené vikve narbonské do stravy ovcí, převážně pro posouzení kvality masa. Vikve byly praženy 45 minut při 150°C. Výsledky ukázaly, že takto upravená semena mohou být do stravy

zařazena až do celkového podílu 33,5 %, aniž by došlo k nežádoucím změnám senzorických vlastností masa. Došlo pouze k zesílení jeho vůně a chuti. Důvod není zcela jasný, ale je možné, že zpracováním došlo ke změně v poměru jednotlivých složek v narbonské vikvi a v jeho důsledku také ke změně ve složení mastných kyselin svalů nebo podkožního tuku ovcí. Naopak při tomto pokusu došlo ke zvýšení denního přírůstku takto krmených ovcí.

2.6.2.7. Experimentální modely pro biologii antinutričních faktorů

Na základě dostupných poznatků o biologii antinutričních faktorů v rostlinách je pravděpodobné, že jedním z důsledků jejich genetického vyjmutí z rostlin je snížená odolnost, protože zmíněné sloučeniny plní pozitivní roli v biologii rostlin, která může být spojena s vlastnostmi, které jim umožní růst za nepříznivých podmínek (ENNEKING, 1994).

Pro studium biologie antinutričních faktorů byly označeny genotypy u mnoha druhů. Pro studium biologie kanavaninu byly vybrány španělské genotypy *V. ervilia* s širokou škálou koncentrací této látky. Jak uvádí Garcia a Ferrando (1989), v těchto výběrech byly nalezeny i nízkotoxinové genotypy. U fazole faba již byly vyšlechtěny genotypy s nízkou hladinou vicinu a konvicinu a zdá se, že genotypy s nízkou hladinou GVC lze vybrat i z australské sbírky vikve narbonské. Tyto nízkotoxinové genotypy, v kombinaci s genotypy vybranými pro vysokou úroveň toxinu, poskytují jedinečnou příležitost pro další studium ekologické biochemie druhů *Vicia* (ENNEKING, 1994).

2.6.2.8. Rozdíly v koncentraci antinutričních faktorů v různých částech v průběhu životního cyklu rostliny

Informace o relativní koncentraci jednotlivých antinutričních faktorů a dalších nízkomolekulárních toxinů v průběhu celého životního cyklu reprezentativních druhů, např. fazole faba (pyrimidinové glykosidy), vikve seté (pyrimidinové glykosidy, kyanové glykosidy, kyano-aminokyseliny), vikve čočkové (kanavanin), vikve huňaté (kanavanin, GVC) vikve narbonské (pyrimidinové glykosidy, GVC), by umožnily předpovědi a korelace aktivity toxicity pro pasoucí se zvířata vlivem různých faktorů, jako je pastva, napadení hmyzem či patogeny, chlad,

teplo, vodní stres, solný stres, edafický stres, které rovněž mohou ovlivňovat hladiny těchto látek (ENNEKING, 1994).

3. Experimentální část

3.1. Rostlinný materiál

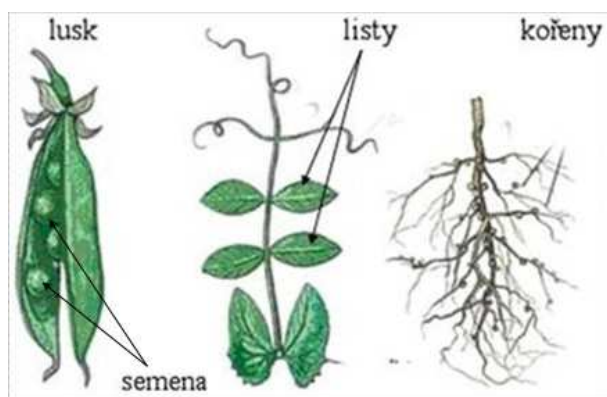
Semena vikve narbonské daroval Prof. M. E. Tate z univerzity v Adelaide v roce 2007. Byla využita k extrakci GVC a pěstování rostlin použitých pro stanovení obsahu GVC během jejich růstu. Rostliny byly pěstovány od dubna do června až července v Líšnici (okres Praha-západ, Středočeský kraj, souřadnice: 49° 52' N, 14° 20' E) za přirozených podmínek na samostatných záhonech. Klimatické podmínky při pěstování jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4. Ve dvou letech (2010 a 2011) byly provedeny vždy tři sběry po 15 rostlinách. První sběr byl proveden ještě před tvorbou lusků, druhý v období dozrávání a třetí v plné zralosti. Rostliny byly rozděleny na 6 částí: kořeny, stonky, listy, postranní stonky, lusky a semena (viz obrázek 7). Jednotlivé části byly lyofilizovány a poté homogenizovány mlýnkem.

Tabulka 3. Průměrné teploty během pěstování (informace z www.chmu.cz)

		teplota (°C)			
		duben	květen	červen	červenec
2010	měsíční průměr	8,9	12,1	17,3	20,9
	odchylka	0,8	-0,9	1,0	3,1
2011	měsíční průměr	11,3	14,1	17,7	16,9
	odchylka	3,2	1,1	1,4	-0,9
	dlouhodobý průměr (1961–1990)	8,1	13,0	16,3	17,8

Tabulka 4. Celkové srážky během pěstování (informace z www.chmu.cz)

		srážky (mm)			
		duben	květen	červen	červenec
2010	měsíční průměr	33	96	57	98
	odchylka (%)	76	137	76	136
2011	měsíční průměr	25	52	82	155
	odchylka (%)	58	75	110	215
	dlouhodobý průměr (1961–1990)	43	70	75	72



I



II

Obrázek 7. Analyzované části rostliny vikve narbonské.

3.2. Použité chemikálie a přístrojové vybavení

Octan amonný (čistota 98,5 %, Penta Chrudim), dihydrogenfosforečnan draselný (čistota 99 %, Lachema Brno), kyselina octová (čistota 99,8 %, Lach-Ner s.r.o., Neratovice), kyselina chlorovodíková (čistota 35 %, Penta Chrudim), amoniak (čistota 25–29 %, Penta Chrudim), kyselina mravenčí (čistota 98%, Lach-Ner s.r.o., Neratovice), kyselina fosforečná (čistota 85 %, Lach-Ner s.r.o., Neratovice), methanol (čistota 99,8 %, Penta Chrudim), acetonitril (čistota 99,8 %, J. T. Baker), γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilid hydrochlorid (Fischer Scientific, New Jersey), anex (Amberlite IRA-410), anex (DEAE Sephadex), anex (Dowex 1×8), katex (Amberlite IR-120, 16–50 mesh), aktivní uhlí (Fluka Chemie AG CA-9470, Buchs), ninhydrin (Lachema Brno), lyofilizátor (Christ Alpha 1-2), bodotávek (BioCote), rotační vakuová odparka (Laborota 4000 - efficient), centrifuga (SIGMA 2-15 Laborzentrifugen), mlýnek (GRINDOMIX GM 200, Retsch), pH metr (Altec A1), vysokoúčinný kapalinový chromatograf s detektorem diodového pole (HPLC/DAD) (Variant ProStar), kolona (Varian Microsorb - MV 100-5, C-18, 250 × 4,6 mm, 5 μ m).

Gradient mobilní fáze použité HPLC metody je uveden v tabulce 5. Jako tlumivý roztok byl použit 50 mM dihydrogenfosforečnan draselný, pH 3,0. Doba analýzy byla 16 minut. Měření probíhalo při vlnové délce 250 nm.

Tabulka 5. Gradient mobilní fáze při HPLC analýzách

čas (min)	tlumivý roztok (%)	acetonitril (%)	ml/min
0:00	95	5	0,9
8:00	70	30	0,9
11:00	20	80	0,9
12:00	20	80	0,9
16:00	95	5	0,9

3.3. Postup extrakce GVC

Zpočátku byla pro extrakci použita metoda podle Ennekinga et al. (1998) s určitými modifikacemi. 100 g semen bylo extrahováno 2 × 500 ml 30% vodného methanolu, zfiltrováno a výsledný žlutý roztok byl částečně odpařen na rotační vakuové odparce při 30 °C. pH roztoku bylo upraveno amoniakem na hodnotu 7,5. Rostok byl vložen do centrifugy na 12 minut při 12000 otáčkách/min. Po centrifugaci byl roztok nanesen na kolonu (17 × 3 cm) s anexem IRA-410 v acetátovém cyklu. Kolona byla následně promyta vodou a vymyta 0,5 a 1 M octanem amonným (vždy po 700 ml). Byly tedy získány dvě frakce. Po celou dobu byla přítomnost GVC kontrolována chromatografií na tenké vrstvě (TLC) s detekcí pomocí 0,2% roztoku ninhydrinu v acetonu. Obě octanové frakce obsahující GVC byly lyofilizovány. Pro dosažení větší čistoty byla část takto získaných extraktů rozpuštěna v methanolu, přidavkem aktivního uhlí byly odstraněny barevné látky a výsledný roztok byl odpařen na odparce. Část pevné látky byla rekrystalizována isopropylalkoholem, část použita pro pokusné zjištění bodu tání. K dosažení tohoto bodu však nedošlo ani při 286 °C, při 200 °C látka zuhelnatěla.

Při tomto postupu extrakce se však objevovaly problémy s rozkladem GVC, pravděpodobně v důsledku použití vyšší teploty při odpařování, proto byla pro další postupy k odstranění vody zvolena lyofilizace. Kvůli obtížím při extrakci na koloně bylo také vyzkoušeno několik iontoměničů, včetně kombinace anexu a katexu (DEAE Sephadex a IRA-410), přesto docházelo k velmi rozdílným výsledkům i při opakování totožného postupu. V několika případech navíc HPLC analýza prokázala nepřítomnost GVC i v případě, že detekce ninhydrinem byla pozitivní. Při rekrystalizaci nedošlo k přečištění GVC, vzniklé krystaly byly pravděpodobně tvořeny anorganickou solí pocházející z použitého pufru.

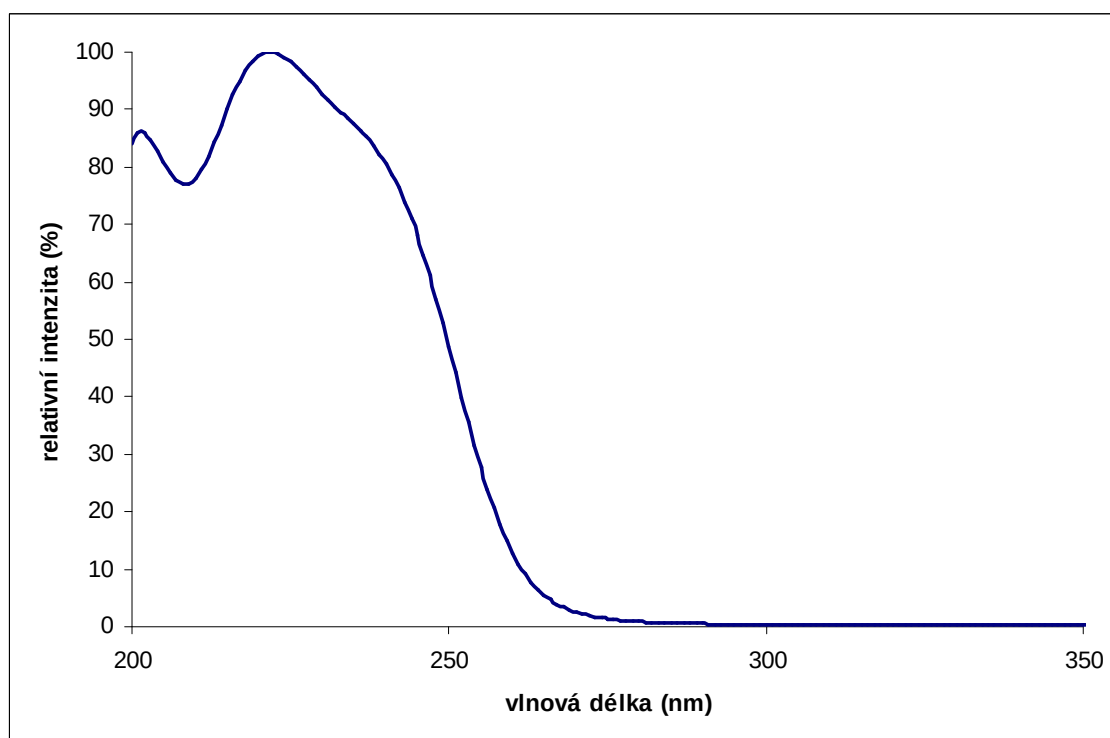
Pro získání co nejčistšího standardního vzorku GVC byla opakovaně vyzkoušena i preparativní HPLC. Tento postup se však nezdařil, pravděpodobně kvůli rozkladu GVC paprskem UV záření v detektoru.

Jako finální postup použitý pro extrakci GVC byla proto zvolena metoda podle Sáncheze et al. (2011b) s modifikacemi. 500 mg vzorku bylo extrahováno 10 ml 70% vodného methanolu s přidavkem vnitřního standardu v podobě γ -L-glutamyl-p-nitroanilid hydrochloridu, po dvaceti minutách míchání byl vzorek vložen do centrifugy na 12 minut při 12000 otáčkách/min, byla odebrána horní fáze a

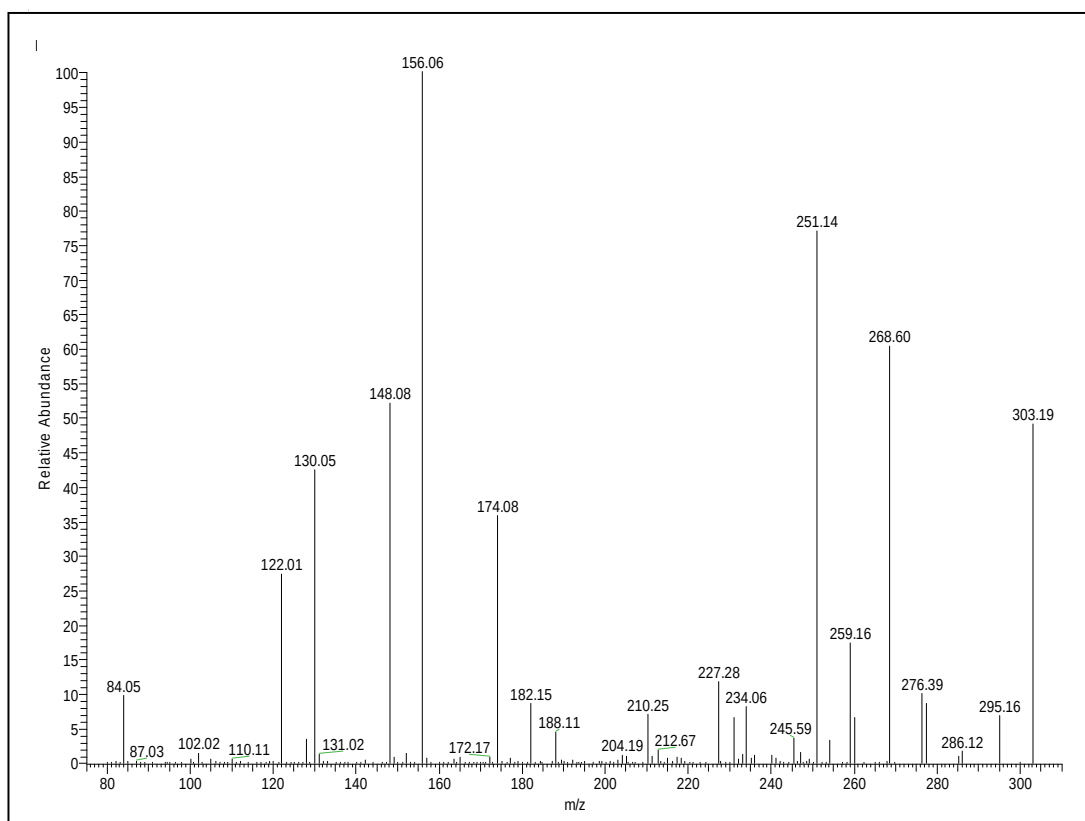
zbylá pevná část byla znovu extrahována opakováním postupu, tentokrát bez přídavku vnitřního standardu. Odebrané horní fáze byly slity a takto připravený extrakt byl použit pro kvantitativní detekci GVC pomocí HPLC. Seznam vzorků je uveden v tabulce 6.

3.4. Spektrální charakterizace GVC

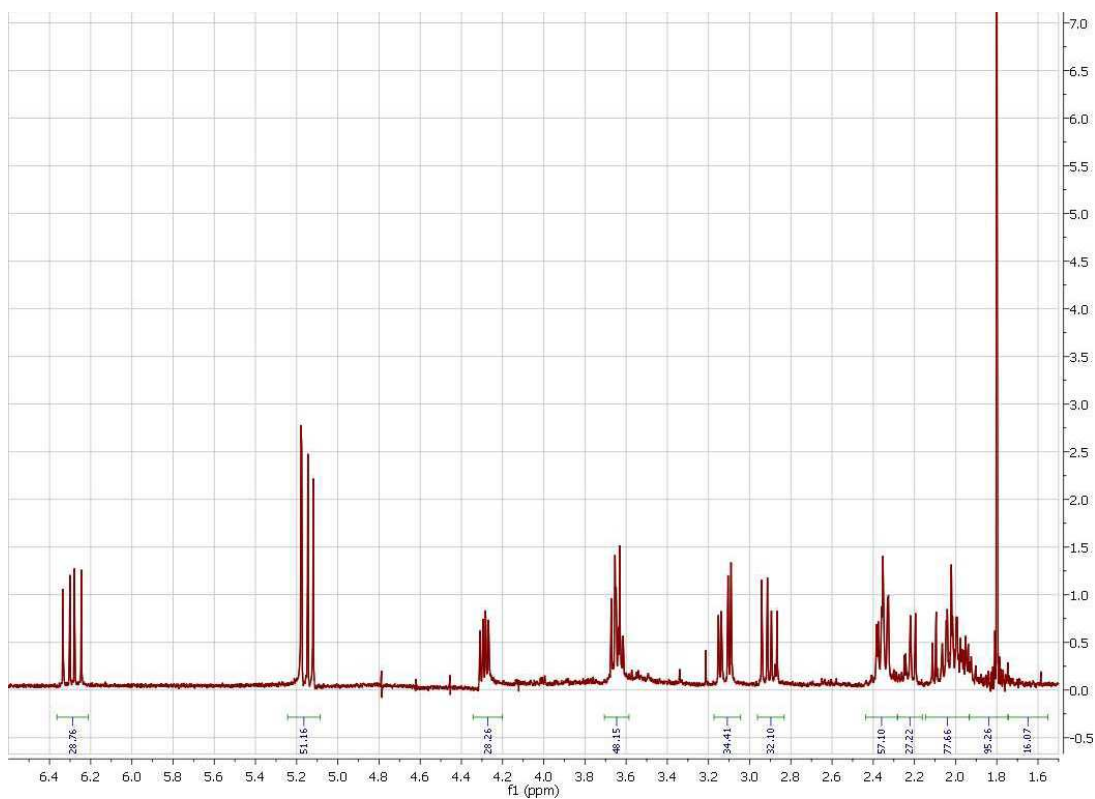
Před samotnou kvantifikací GVC v jednotlivých vzorcích byla identita této sloučeniny potvrzena pomocí několika spektrálních technik. UV, MS a NMR spektra GVC jsou uvedena na obrázcích 8, 9 a 10. Všechna tato spektra byla v souladu s publikovanými údaji (Enneking et al., 1998).



Obrázek 8. UV spektrum GVC.



Obrázek 9. ESI-MS/MS spektrum GVC.

Obrázek 10. ^1H NMR spektrum GVC.

Tabulka 6. Seznam vzorků

rok sběru	datum sběru	část rostliny	1. vzorek	2. vzorek
2010	15.6.	kořeny	1a10	1b10
		listy	2a10	2b10
		stonky	3a10	3b10
		postranní stonky	4a10	4b10
	28.6.	kořeny	5a10	5b10
		listy	6a10	6b10
		stonky	7a10	7b10
		postranní stonky	8a10	8b10
		lusky	9a10	9b10
		semena	10a10	10b10
	12.7.	kořeny	11a10	11b10
		listy	12a10	12b10
		stonky	13a10	13b10
		postranní stonky	14a10	14b10
		lusky	15a10	15b10
		semena	16a10	16b10
2011	16.6.	kořeny	1a11	1b11
		listy	2a11	2b11
		stonky	3a11	3b11
		postranní stonky	4a11	4b11
	30.6.	kořeny	5a11	5b11
		listy	6a11	6b11
		stonky	7a11	7b11
		postranní stonky	8a11	8b11
		lusky	9a11	9b11
		semena	10a11	10b11
	14.7.	kořeny	11a11	11b11
		listy	12a11	12b11
		stonky	13a11	13b11
		postranní stonky	14a11	14b11
		lusky	15a11	15b11
		semena	16a11	16b11

4. Výsledky a diskuse

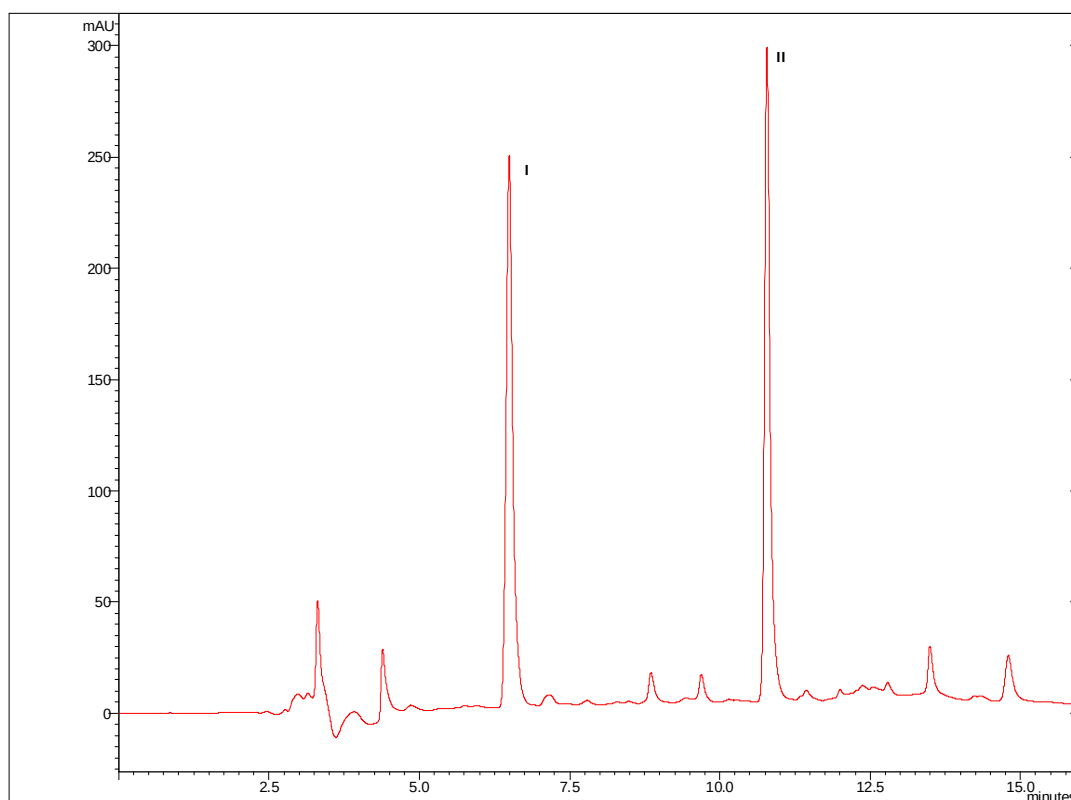
4.1. *Izolace GVC ze semen vřkve narbonské*

Pro izolaci GVC bylo použito několik postupů. Původní metoda nanášení roztoku extraktu na kolonu s několika různými ionexy nakonec nebyla ve finální fázi použita z důvodu nespolehlivých výsledků. Přesto se tímto postupem podařilo izolovat sloučeninu, jejíž struktura jako γ -glutamyl *S*-vinylcysteinu (GVC) byla jednoznačně potvrzena pomocí spektrálních metod (UV, MS a NMR). Bylo však zřejmé, že takto získaný produkt obsahoval ještě vysoké koncentrace anorganických solí z použitých pufrů. Bohužel rekrystalizace ani metoda preparativní HPLC použitá pro přečištění tohoto extraktu však nebyly úspěšné. Z tohoto důvodu nemohl být takto připravený standard GVC použit pro sestavení kalibrační křivky.

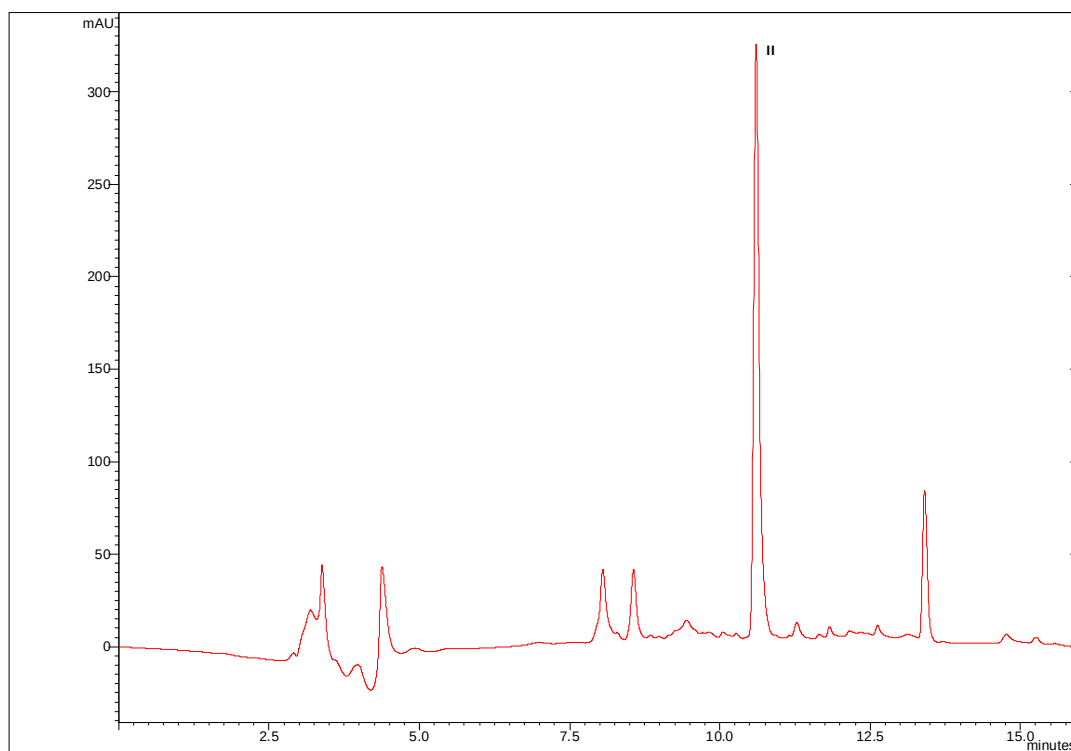
4.2. *Vývoj metody pro stanovení GVC pomocí HPLC*

Díky příznivým chromatografickým charakteristikám GVC (značná retence na C-18 koloně i vysoký absorpční koeficient umožňující UV detekci) bylo možno analyzovat tuto látku bez derivatizace.

Z důvodu obtíží při izolaci a přečištění GVC nemohla být sestavena kalibrační křivka. Kvantifikace GVC ve vzorcích proto byla provedena pouze relativně k použitému vnitřnímu standardu v podobě γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilid hydrochloridu. Absolutní hodnoty obsahu GVC ve vzorcích bude možné vypočítat, až se podaří získat dostatečně čistý standard GVC. Použité množství vnitřního standardu bylo určeno z předpokladu průměrného množství, tedy 2 %, a k navážce 500 mg bylo přidáno 10 mg vnitřního standardu. Množství GVC pak bylo určeno z plochy píku v chromatogramu vzhledem k ploše píku vnitřního standardu. Typické HPLC chromatogramy jsou uvedeny na obrázcích 11 a 12.



Obrázek 11. Chromatogram z HPLC/DAD; vzorek semen s detekcí GVC (I) a vnitřního standardu (II).



Obrázek 12. Chromatogram z HPLC/DAD; vzorek listů bez detekce GVC, detekován pouze vnitřní standard (II).

4.3. Stanovení obsahu GVC během růstu vikve narbonské

Rostliny vikve narbonské byly pěstovány na stejné lokalitě ve dvou následujících letech (2010 a 2011). Vzorky k analýze byly průběžně odebírány v intervalech 14 dnů. Byly analyzovány listy, hlavní a vedlejší stonky, lusky (pokud již byly vyvinuty), semena a kořeny. Z vypěstovaných rostlin bylo rozdělením jejich částí vytvořeno 32 vzorků. Od každého z nich byly připraveny dva extrakty pro detekci a kvantifikaci GVC na HPLC. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. Jak je vidět, významná hodnota množství GVC byla detekována pouze u semen. U těchto vzorků byly provedeny ještě další dvě doplňkové analýzy. Celkem tedy byla u všech vzorků semen provedena čtyři měření. Z výsledných hodnot byl vypočten aritmetický průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka (viz tabulka 8).

Tabulka 7. Výsledky detekce GVC pomocí HPLC; 0 = nepřítomnost GVC, + = stopové množství, ++ = významná hodnota.

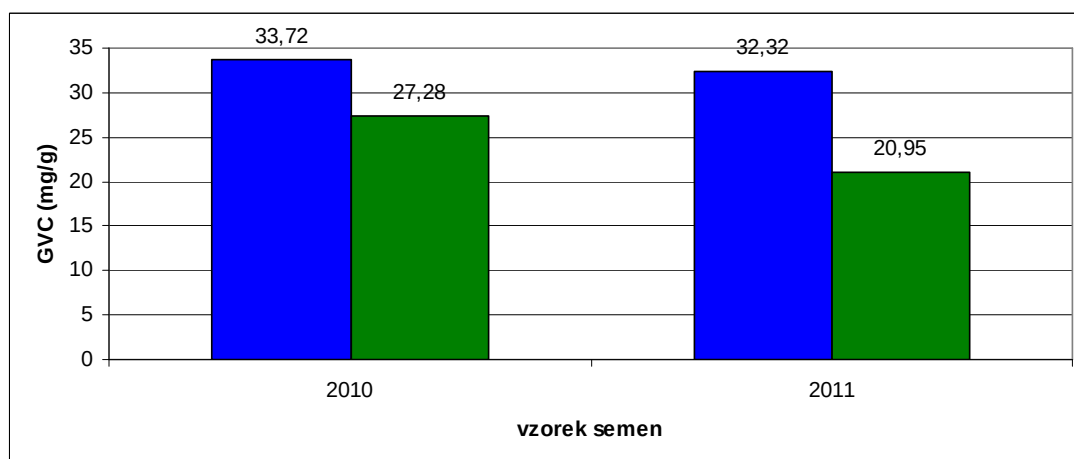
vzorek	číslo vzorku	detekce GVC	číslo vzorku	detekce GVC
kořeny 15. 6. 2010	1a10	+	1b10	+
listy 15. 6. 2010	2a10	0	2b10	0
stonky 15. 6. 2010	3a10	+	3b10	+
postranní stonky 15. 6. 2010	4a10	0	4b10	0
kořeny 28. 6. 2010	5a10	+	5b10	+
listy 28. 6. 2010	6a10	0	6b10	0
stonky 28. 6. 2010	7a10	0	7b10	0
postranní stonky 28. 6. 2010	8a10	0	8b10	0
lusky 28. 6. 2010	9a10	0	9b10	0
semena 28. 6. 2010	10a10	++	10b10	++
kořeny 12. 7. 2010	11a10	0	11b10	0
listy 12. 7. 2010	12a10	0	12b10	0
stonky 12. 7. 2010	13a10	0	13b10	0
postranní stonky 12. 7. 2010	14a10	0	14b10	0
lusky 12. 7. 2010	15a10	0	15b10	0
semena 12. 7. 2010	16a10	++	16b10	++
kořeny 16. 6. 2011	1a11	+	1b11	+

listy 16. 6. 2011	2a11	0	2b11	0
stonky 16. 6. 2011	3a11	+	3b11	+
postranní stonky 16. 6. 2011	4a11	0	4b11	0
kořeny 30. 6. 2011	5a11	0	5b11	0
listy 30. 6. 2011	6a11	0	6b11	0
stonky 30. 6. 2011	7a11	0	7b11	0
postranní stonky 30. 6. 2011	8a11	0	8b11	0
lusky 30. 6. 2011	9a11	0	9b11	0
semena 30. 6. 2011	10a11	++	10b11	++
kořeny 14. 7. 2011	11a11	0	11b11	0
listy 14. 7. 2011	12a11	0	12b11	0
stonky 14. 7. 2011	13a11	0	13b11	0
postranní stonky 14. 7. 2011	14a11	0	14b11	0
lusky 14. 7. 2011	15a11	0	15b11	0
semena 14. 7. 2011	16a11	++	16b11	++

Ze všech ostatních vzorků byla stopová množství GVC zjištěna jen u kořenů a stonků v prvním sběru v obou letech. V roce 2010 se navíc stopové množství objevilo i u kořenů v červnovém sběru.

Tabulka 8. Výsledné hodnoty GVC u vzorků semen; n = počet měření, $X_{\text{aritm.}}$ = aritmetický průměr získaných hodnot, SD = směrodatná odchylka, RSD = relativní směrodatná odchylka.

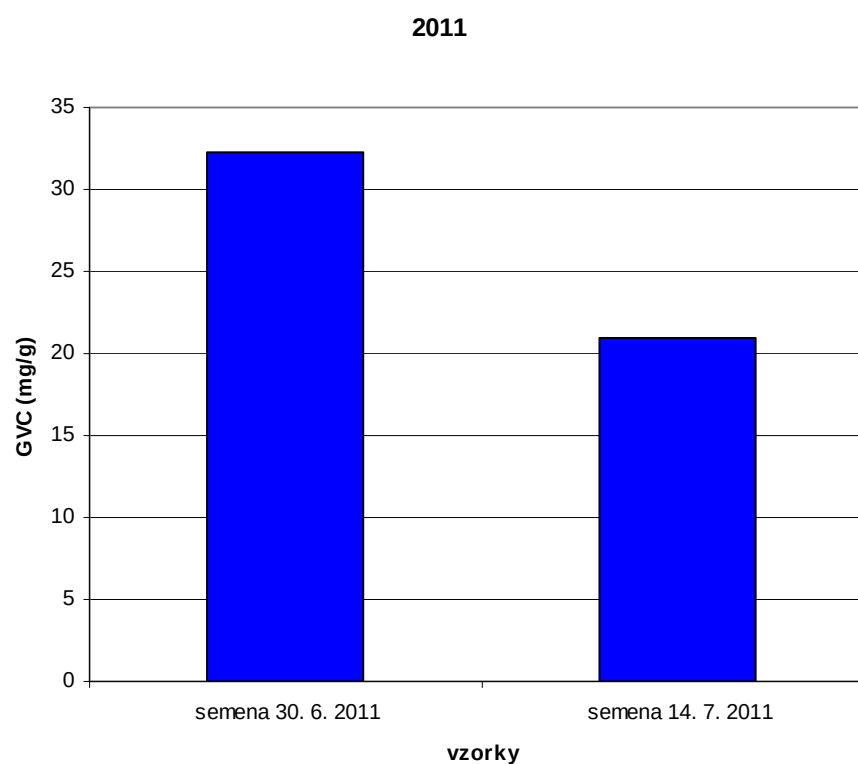
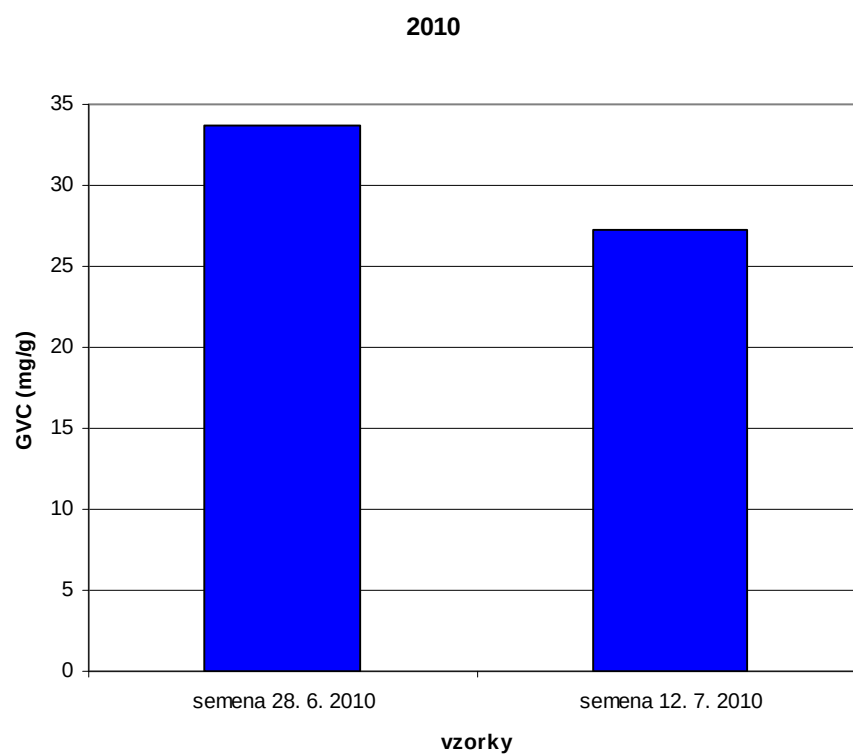
vzorek	n	$X_{\text{aritm.}}$ (mg GVC/g sušiny)	SD	RSD (%)
semena 28. 6. 2010	4	33,72	2,66	7,9
semena 12. 7. 2010	4	27,28	1,16	4,3
semena 30. 6. 2011	4	32,32	0,95	2,9
semena 14. 7. 2011	4	20,95	2,27	10,8



Obrázek 12. Grafické znázornění obsahu GVC ve vzorcích semen.

Jak je patrné z obrázku 12, množství GVC v semenech bylo v červencovém sběru vždy nižší než ve sběru červnovém. Z tabulky 7 vyplývá, že i ve vzorcích, kde se objevilo stopové množství GVC, jeho přítomnost zmizela při pozdějším sběru. Dalo by se tedy soudit, že množství GVC s ontogenetickým vývojem rostliny klesá. I Enneking (1994) uvádí, že se množství GVC snižuje během klíčení. Patrně tedy pokles pokračuje i v dalším vývoji, a protože je GVC označen jako hlavní antinutriční faktor, mohlo by se jeho množství v používaných semenech snížit už tím, že bude více sklízena později. Jinou možností by mohlo být zkrmování naklíčených semen.

Mezi červnovými a červencovými sběry v rámci jednoho roku je viditelný pokles obsahu GVC, výraznější v roce 2011 (viz obrázek 13).



Obrázek 13. Pokles množství GVC v letech 2010 a 2011.

Tento pokles je pravděpodobně způsoben přirozeným úbytkem GVC v rostlinách vikve. Roli ale zjevně hrají i klimatické podmínky během pěstování. Červnové sběry, tedy vzorky semen sklizených 28. 6. 2010 a 30. 6. 2011, jsou srovnatelné. Jak vyplývá z tabulek 3 a 4, průměrné teploty v obou letech byly téměř shodné, výraznější rozdíl je vidět pouze u množství srážek, kdy v roce 2011 spadlo o 25 mm srážek více, a byl tak mírně překonán i dlouhodobý srážkový průměr.

Obsahy GVC ve vzorcích sklizených v červenci (vzorky semen 12. 7. 2010 a semen 14. 7. 2011) se liší výrazněji. V červenci roku 2010 byly zaznamenány vyšší průměrné teploty, až o 3 °C nad dlouhodobým normálem, a zároveň byl dlouhodobý průměr překonán i v kategorii srážek, a to o 26 mm. Červenec roku 2011 byl charakteristický naopak nižšími teplotami a zároveň výrazně vyššími úhrny srážek. Dlouhodobý srážkový průměr byl překročen více než dvojnásobně. Podle dat by se dalo usoudit, že vliv kombinace nižších teplot s výraznými srážkami roku 2011 snížil množství GVC více než srážkové a teplotní podmínky v roce 2010.

Pokud srovnáme sběry v rámci jednoho roku, pak v roce 2010 došlo k menšímu poklesu množství GVC. Tato skutečnost by tedy odpovídala nadprůměrným teplotám a podprůměrným srážkám. Naopak v roce 2011 byly zaznamenány podprůměrné teploty a zároveň výrazně nadprůměrné srážky, které více než dvojnásobně překročily dlouhodobý průměr. S těmito skutečnostmi pak koreluje výraznější pokles množství GVC v semenech.

Podle těchto ukazatelů je zjevné, že i klimatické podmínky hrají významnou roli ve výsledném množství GVC v semenech vikve narbonské. Lze tedy také předpokládat, že do výsledného množství sekundárních metabolitů mohou zasahovat i další klimatické (např. doba a intenzita slunečního svitu, atd.), ale i jiné faktory, např. půdní, přítomnost rostlinných chorob, škůdců, atd.

5. Závěr

Hlavním cílem této práce bylo sledování obsahu GVC v jednotlivých částech rostliny vikve narbonské během různých fází růstu. Podařilo se:

- izolovat GVC ze semen vikve narbonské a spektrálně ho charakterizovat
- vyvinout metodu pro stanovení GVC pomocí HPLC
- určit množství GVC v různých částech rostliny

Ve vzorcích z vypěstovaných rostlin byla jasně doložena přítomnost významného množství GVC pouze v semenech. Pokud je tedy GVC považován za hlavní antinutriční sloučeninu, lze pro krmné účely použít ostatní části rostliny. Ze získaných hodnot vyplývá, že obsah GVC v semenech postupně klesá se stářím rostliny. Zjištěné hodnoty byly dále porovnány s konkrétními klimatickými podmínkami v období pěstování. Z výsledků vyplývá korelace mezi nižšími teplotami společně s vyššími srážkami a nižším obsahem GVC. V kombinaci klimatických podmínek s časovým intervalem jednoho měsíce mezi sběry tak došlo v roce 2011 k poklesu obsahu GVC o 12 mg/g, tedy cca o třetinu.

Ze zjištěných dat se při porovnání s informacemi v literatuře neshodovala jen uváděná teplotní stabilita. Tento rozpor byl přisouzen odlišným podmínkám prostředí při pěstování rostlin vikve narbonské.

Předmětem dalších studií by mělo být nalezení postupu, který by spolehlivě umožnil izolaci GVC z vikvovitých rostlin v dostatečné čistotě pro sestrojení kalibrační křivky. Již dříve byla prokázána závislost množství GVC ve vikvovitých rostlinách na genotypu, proto obsahují nejen různé druhy rodu *Vicia*, ale i odrůdy jednotlivých zástupců v různých částech různá množství GVC. Významnou roli ale bezpochyby hrají i klimatické podmínky při jejich růstu, bylo by tedy na místě provést dlouhodobé sledování pro získání většího množství dat a přesnější zjištění korelace mezi faktory prostředí při růstu rostliny a množství GVC v jejích semenech.

6. Zdroje a použitá literatura

ABD EL MONEIM, A. M.; KHAIR, M. A.; COCKS, P. S.: Growth analysis, herbage and seed yield of certain forage legume species under rainfed conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 1990B; 164: 34-41.

ABD EL MONEIM, A. M. (INTERNATIONAL CENT. AGRIC. RES. DRY AREAS (ICARDA), P.O. Box: 5466, Aleppo, Syria). Narbon vetch (*Vicia narbonensis* L.): A potential feed legume crop for dry areas in West Asia. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 1992; 169: 347-353.

ABD EL MONEIM, A. M.; KHAIR, M. A.; RIHAWI, S.: Effect of genotypes and plant maturity on forage quality of certain forage legume species under rainfed conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 1990A; 164: 85-92.

BERGER J. D.; SIDDIQUE K. H. M.; LOSS S. P.: Cool season grain legumes for Mediterranean environments: species x environment interaction in seed quality traits and anti-nutritional factors in the genus *Vicia*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1999; 50: 389-401.

BERGER J. D.; ROBERTSON L. D.; COCKS P. S.: Agricultural potential of Mediterranean grain and forage legumes: 2) Anti-nutritional factor concentrations in the genus *Vicia*; *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2003; 50: 201-212.

EASON P. J.; JOHNSON R. J.; CASTLEMAN G. H.: The effects of dietary inclusion of narbon beans (*Vicia narbonensis*) on the growth of broiler chickens; *Australian Journal of Agricultural Research*, 1990; 41: 565-71.

ENNEKING D.: The toxicity of *Vicia* species and their utilisation as grain legumes. Dissertation for the degree Doctor of Philosophy in Agricultural Science. University of Adelaide, June, 1994.

ENNEKING D.; DELAERE I. M.; TATE M. E.: γ -Glutamyl-S-ethenylcysteine: A dipeptide from *Vicia narbonensis*; *Phytochemistry*, Vol 48, No 4.; 1998; pp. 643-645.

ENNEKING D.; MAXTED, N.: Narbon bean (*Vicia narbonensis* L.). *Evolution of Crop Plants*, 2nd ed.; Smartt, J.; Simmonds, N. W., Longman: London, 1995; pp 316-321,

JAQUES S.; DIXON R. M.; HOLMES J. H. G.: Narbon beans and field peas as supplements for sheep. *Small Ruminant Research*, 1994; 15: 39-43.

KALAČ P, MÍKA V.; Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1997, s. 158-161, 166-168.

SÁNCHEZ-VIOQUE R.; GIRÓN-CALLE J.; RODRÍGUEZ-CONDE M. F.; VIOQUE J.; DE-LOS-MOZOS-PASCUAL M.; SANTANA-MÉRIDAS O.; IZQUIERDO-MELERO M. E.; ALAIZ M.: Determination of γ -glutamyl-S-ethenyl-cysteine in narbon vetch (*Vicia*

narbonensis L.) seeds by high performance liquid chromatography; Animal Feed Science and Technology, 2001a; 165: 125-130.

SÁNCHEZ-VIOQUE R.; RODRÍGUEZ-CONDE M. F.; VIOQUE J.; GIRÓN-CALLE J.; SANTANA-MÉRIDAS O.; DE-LOS-MOZOS-PASCUAL M.; IZQUIERDO-MELERO M. E.; ALAIZ M.: A colorimetric method for determination of γ -glutamyl-S-ethenyl-cysteine in narbon vetch (*Vicia narbonensis* L.) seeds; Analytical biochemistry, 2011b; 418: 180-183.

SIDDIQUE K. H. M.; LOSS S. P.; ENNEKING D.: Narbon bean (*Vicia narbonensis* L.): a promising grain legume for low rainfall areas of south-western Australia. Australian Journal of Experimental Agriculture, 1996; 36: 53-62.

YU P.; SPRAGUE M.; EGAN A. R.; CASTLEMAN G. H.; LEURY B. J.: Comparison of raw and roasted narbon beans (*Vicia narbonensis*) on performance and meat sensory attributes of lambs fed a roughage-based diet; Animal Feed Science and Technology, 2001; 92: 1-16.

internetové zdroje:

<http://plants.usda.gov> (staženo dne 9. 12. 2011)

<http://luirig.altervista.org/schedenam/fnam.php?taxon=Vicia+narbonensis> - Obrázek 1 / I (staženo dne 9. 12. 2011)

<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=VINA> - Obrázek 1 / II (staženo dne 9. 12. 2011)

http://www.cac-biodiversity.org/plants/plants_vicia1.htm - Obrázek 1 / III (staženo dne 9. 12. 2011)

<http://www.biolib.cz/en/taxonimage/id47877/> - Obrázek 1 / IV (staženo dne 9. 12. 2011)

<http://leccos.com/index.php/clanky/bobovite> - Obrázek 7 / I (staženo dne 5. 3. 2012)

http://www.guh.cz/edu/bi/biologie_rostliny/html02/foto_130.html - Obrázek 7 / II (staženo dne 5. 3. 2012)

<http://www.chmu.cz> (staženo dne 5. 3. 2012)

<http://prabirkc1.blogspot.com/2010/07/is-this-lathyrism.html> - Obrázek 5 / I (staženo dne 27. 3. 2012)

<http://www.newint.org/features/1984/01/05/update/> - Obrázek 5 / II (staženo dne 27. 3. 2012)