

ROSTLINNÉ FENOLY V ALLELOPATII

BOŘIVOJ KLEJDUS a VLASTIMIL KUBÁŇ

*Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
e-mail: kuban@mendelu.cz*

Došlo dne 18.II.1998

Klíčová slova: fenolické látky, rostlinný materiál, allelopatie, HPLC

Obsah

1. Úvod
2. Typy laboratorních testů (bioassay)
3. Půdní faktory
4. Biotické faktory
5. Extrakce a izolace fenolických allelochemikálií
6. Identifikace a stanovení rostlinných fenolů
7. Závěr

1. Úvod

Všechny organismy existují v úzké vazbě se svým abiotickým i biotickým prostředím. Významné jsou především takové vazby, které přímo souvisí se zajištěním výživy a rozmnožování. U autotrofních organismů (především fofolihotrofů) jsou to především vazby na abiotické prostředí, zatímco u heterotrofů (hlavně parazitů a symbiontů) pak vazby na biotické prostředí. Proces utváření takovýchto vazeb se neuskutečňuje *sua sponte*, ale na základě informací, tedy i „poznání“ parazita či symbionta nebo vzájemného rozpoznání organismů v populaci. Přenos informací se děje pomocí produkce specifických chemických sloučenin, které jsou organismem vylučovány do okolního prostředí (nadzemními i podzemními částmi rostlin, pokožkou, exkrementy atd.).

Vzájemné vztahy mezi rostlinami a mezi nimi a prostředím ovlivňují především jejich relativní stálost v biotopu. Tyto vztahy můžeme rozdělit do tří kategorií - akce, reakce a koakce a obecně je zahrnout pod pojem allelopatie (vzájemné ovlivnění)¹⁻³. Allelopatie je definována jako biochemická interakce mezi různými rostlinnými druhy (včetně půdních mikroorganismů). Jejím výrazným rysem je především účast tzv. allelopatik, chemických látek, které fungují především jako přenašeče informací. Allelopatické účinky jsou mimořádně významné pro vzájemné vztahy mezi rostlinnými druhy jak v přirozených ekosystémech, tak i v agrosystémech^{1,2}.

Příkladem vzájemného působení rostlin může být například existence tzv. mykorrhizosféry v lesních porostech, kdy většina vyšších rostlin spojuje svůj kořenový systém s různými mikroorganismy. Zatímco například houba poskytuje rostlině svými houbovými vlákny některé nerostné látky (např. fosfáty aj.), rostlina naopak zásobuje houby produkty fotosyntézy (organickými látkami, např. cukry, aminokyselinami atd.). V ně-

kterých případech může být tato symbióza volnějš (ektomykorrhiza), jindy je velmi úzká (endomykorrhiza), kdy houbová vlákna prorůstají dovnitř kořenů hostitelské rostliny nebo dokonce i několika rozdílných rostlin. Transport hmoty se pak může uskutečňovat mezi houbou a hostitelskou rostlinou nebo dokonce i mezi několika hostitelskými rostlinami prostřednictvím houby. Tím se může do značné míry eliminovat případný deficit určitých živin vlivem zhoršeného metabolismu nebo nepříznivých vlivů vnějšího prostředí na oba symbionty.

Zcela opačným příkladem může být například cizopasná rostlina *Striga hermonthica*, která parazituje na kořenové části prosa, kukuřice, čiroku a luštěnin. Rostlina produkuje až 10⁵ miniaturních semen, která mohou přežít v půdě až několik desetiletí. Vyklíčení semen je podmíněno přítomností dostatečných koncentrací specifických chemických látek (tzv. sargolaktону) v kořenových exudátech hostitelské rostliny. Teprve přítomnost sargolaktону v půdě způsobuje vyklíčení semen *Strigy* a následně i tvorbu kořenových výběžků (haustorium), kterými *Striga* proniká do kořenového systému hostitele, odčerpává mu živiny a metabolity a tím hostitele účinně oslabuje nebo likviduje. Některé rostliny naopak vylučují allelochemikálie, které v počátečních stádiích vývoje retardují klíčení semen nebo vývoj jiných rostlin ve svém blízkém okolí. Tak si pro sebe zabezpečují dostatek energie a živin.

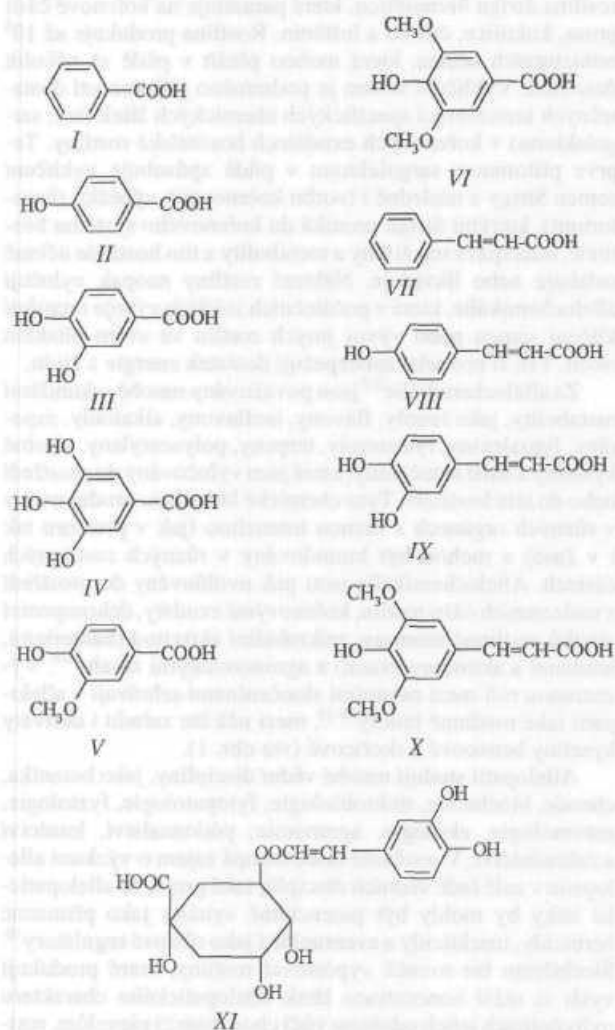
Za allelochemikálie³⁻⁵ jsou považovány mnohé sekundární metabolity, jako fenoly, flavony, isoflavony, alkaloidy, saponiny, fytoalexiny, fytosteroly, terpeny, polyacetyleny, mastné kyseliny a další sloučeniny, které jsou vylučovány do prostředí nebo do těla hostitele. Tyto chemické látky jsou produkovány v různých orgánech s různou intenzitou (jak v prostoru tak i v čase) a mohou být kumulovány v různých rostlinných částech. Allelochemikálie jsou pak uvolňovány do prostředí z nadzemních částí rostlin, kořenovými exudáty, dekompozicí zbytků rostlinné biomasy, mikrobiální aktivitou (bakteriemi, houbami a aktinomycetami) a agronomickými zásahy^{6,9}. Významnou roli mezi ostatními sloučeninami sehrávají v allelopatii také rostlinné fenoly^{10,15}, mezi něž lze zařadit i deriváty kyseliny benzoové a skořicové (viz obr. 1).

Allelopatii studují mnohé vědní disciplíny, jako botanika, chemie, biochemie, mikrobiologie, fytopatologie, fyziologie, entomologie, ekologie, agronomie, půdoznalství, lesnictví a zahradnictví. V současné době stoupá zájem o výzkum allelopatie v celé řadě vědních disciplín také proto, že allelopatické látky by mohly být potenciálně využity jako přirozené herbicidy, insekticidy a eventuelně i jako růstové regulátory¹⁶. Šlechtěním lze rovněž vypěstovat rostliny, které produkují vyšší či nižší koncentrace látek allelopatického charakteru ovlivňujících jejich odolnost vůči chorobám či plevelům, rostliny s vysokou produkcí lehce těkavých allelochemikálií působících proti hmyzům škůdcům atp.

2. Typy laboratorních testů (bioassay)

Pro sledování účinnosti a pochopení vlivů allelopatických látek v allelopatii je nutné zvolit vhodný biologický test, tzv.

bioassay. Pro volbu nevhodnějšího testu k posouzení allelopatických účinků a pro zhodnocení mechanismu snižování produkce kulturních rostlin v agrosystémech je doporučováno několik kroků, které zahrnují pozorování a měření v terénu, provádění provozních a poloprovozních pokusů, pokusů ve sklenicích nebo pokusných nádobách a konečně i laboratorní testy se semeny nebo klíčovými rostlinami. Cílem těchto testů by mělo být určení allelopatického potenciálu, stanovení celkové koncentrace allelopaticky aktivních látek, identifikace a stanovení koncentrace jednotlivých allelopatik, stanovení allelopatického potenciálu vybraných látek nebo jejich směsí, procenta návratnosti (recovery) a rovněž osudu allelopatických látek v půdě a organismech. K těmto účelům je možno použít jednak extrakty nebo výluhy z celých rostlin nebo jejich částí nebo přímo izolované chemické sloučeniny nebo jejich



Obr. 1. Deriváty kyseliny benzoové a skořicové. / kyselina benzoová, // kyselina 4-hydroxybenzoová (*p*-hydroxybenzoová), /// kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (protocatechová), *IV* kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová (gallová), *V* kyselina 3-hydroxy-4-methoxybenzoová (vanilová), *VI* kyselina 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoová (syringová), *VII* kyselina skořicová, *VIII* kyselina 4-hydroxyskořicová (*p*-kumarová), *IX* kyselina 3,4-dihydroxyskořicová (káвовá), *X* kyselina 4-hydroxy-3,5-dimethoxyskořicová (ferulová), *XI* kyselina chlorogenová

směsi. Z hlediska působení lze testy rozdělit na testy ve vodních kulturách, čistých (písek, netečný materiál...) či přesně definovaných tuhých substrátech (zeolity, půda...) a na působení plyných nebo lehce těkavých komponent.

Dalším problémem je výběr vhodného rostlinného materiálu, neboť účinky jednotlivých allelochemikálií jsou velmi různorodé. Účinky rozdílných látek stejné chemické povahy se mohou u jedné rostliny lišit podobně jako účinky jedné látky u různých rostlin. Naopak mohou být vnější projevy působení různých látek u jedné nebo i více rostlin podobné či shodné. Všechny allelochemikálie však v určitém rozmezí koncentrací fyziologicky ovlivňují (stimulují nebo inhibují) růst a vývin rostlin. Celá řada z nich má vliv na klíčení, jiné způsobují depresi transpirace rostlin nebo inhibují fosforylační mechanismus. Jiné depolarizují membránový potenciál buňky, mění strukturu a vlastnosti membrán a tím příjem živin. Některé zasahují do buněčného dělení a nebo enzymatických procesů, snižují mitotickou aktivitu a ovlivňují respiraci atd. Mechanismus jejich působení však doposud není jednoznačně znám.

K stanovení allelopatického potenciálu mohou být použity rozdílné typy laboratorních metod^{17,18}. Klíčem semen je jedním z důležitých parametrů pro určení allelopatického potenciálu fenolických sloučenin³⁴. Avšak použití tohoto parametru pro vyhodnocování laboratorních testů má značné nedostatky^{18,19}, neboť interakce v tomto případě navíc zahrnují jak promotory, tak i inhibitory působících fenolických allelochemikálií. Další metoda používá semenáčků, u kterých se jako kritéria intenzity fytotoxicity fenolických látek u biologického materiálu¹⁸ používá vyhodnocení hmotnosti čerstvých výhonků a kořenů.

Řada studií využívá jako testovacího materiálu pro biometody salátu pro jeho vysokou citlivost k allelochemikáliím. Blum a Rebeck²⁰ popisují vliv kyseliny ferulové na tvorbu kořenového systému. Chou a Patrick²¹ identifikovali kyselinu másečnou, 4-hydroxymásečnou, fenyloctovou, benzoovou, *p*-hydroxybenzoovou, vanilovou, ferulovou, syringovou, *p*-kumarovou a káвовou, resorcinol, floroglucinol a salicylaldehyd v produktech dekompozice zbytků zrn žita. V produktech dekompozice zbytků žita nalezi²¹ kyselinu ferulovou, vanilovou, fenyloctovou, *p*-kumarovou, 4-hydroxybenzoovou, salicylovou a *o*-kumarovou a salicylaldehyd. Testovali allelopatický efekt těchto sloučenin na růst salátu a zjistili, že kyseliny fenyloctová, 4-fenylmásečná, salicylová, benzoová a *o*-hydroxyfenyloctová byly inhibitory růstu salátu v koncentracích 25-50 ppm, kdežto ostatní fenolické sloučeniny byly allelopaticky aktivní v koncentracích teprve od 100 ppm. Podobně Li a spol.²³ studovali interakce kyseliny *trans*-skořicové, *o*-, *m*-, *p*-kumarové a chlorogenové a vliv těchto fenolických látek na růst salátu.

Dornbos a Spencer²² popisují využití agarových desek jako biometody (bioassay) pro studium klíčení vojtěšky (*Medicago sativa*) a trávy (*Lolium multiflorum*). Vybrané allelochemikálie přidávali do kultivačního média a zjišťovali jejich vliv na průběh klíčení.

3. Půdní faktory

Pro pochopení účinků fenolických látek a sledování interakcí v eko- a agrosystémech je nutné zohlednit taktéž faktor půdy, neboť půda je velmi složitý fyzikální, chemický a biologický systém. Jednotlivé fenolické allelochemikálie, které

vstupují do půdního systému, jsou vystaveny procesům jako retence, transformace a transport³. Na vstup do půdy a působení fenolických allelochemikálií mají vliv rovněž půdní charakteristiky jako vodní režim, obsah živin, teplota, pH a obsah organické hmoty³.

Retenční procesy zpomalují pohyb allelochemikálií v prostředí. Huang a spol.²⁴ studovali retenci fenolických kyselin vanilové, syringové, ferulové, *p*-kumarové a *p*-hydroxybenzoové na hydroxolinitých a železitých sloučeninách obsažených v půdě a jílech. Fenolické kyseliny jsou známy svou adsorpcí na minerálech v jílech a na hydroxidech železa²⁴⁻²⁵. *Ortho*-substituované fenolické sloučeniny, jako kyselina salicylová a *o*-kumarová, a dihydroxy-substituované fenolické sloučeniny, jako kyselina protokatechová a kávová, se adsorbují na jílové minerály ve formě chelátů s kovy²⁶. Dalton a spol.²⁷ studovali difference v dynamice sorpce exogenně dodaných kyselin ferulové, *p*-kumarové, *p*-hydroxybenzoové a vanilové v různých typech půd. Shledávají významnou sorpci všech testovaných látek ve všech typech půd. Návratnost (recovery) těchto fenolických kyselin je různá v závislosti na typu použité půdy, půdního profilu, čase a typu funkčních skupin obsažených na aromatickém jádře fenolických sloučenin. Transformační procesy mění formy a vedou k částečné nebo kompletní degradaci.

Transportní procesy determinují rychlost s jakou se pohybují fenolické allelochemikálie v půdním prostředí. Půdní proměnné jako pH, obsah živin a organické hmoty, iontoměničové a oxidační schopnosti sehrávají důležitou roli v osudu fenolů v půdě. Inderjit a Dakshini¹⁸ ukázali na vysoce významnou úlohu kvality půdy ve vztahu k allelopatii. Allelopatický efekt fenolických sloučenin vzrůstá v půdách chudých na živiny²⁸. Stowe a Osborn²⁹ studovali vliv dusíku a fosforu na fytotoxicitu fenolických sloučenin a shledali, že fenolické sloučeniny byly účinnými inhibitory růstu především při nízkých koncentracích živin. Allelopatická aktivita kyseliny hydroxyskořicové a jejího fotochemického degradačního produktu ceratiolinu, uvolněného z *Ceratiolia ericoides*, byla zvýšena u nízkých obsahů dusíku a draslíku v půdě³⁰. Blum a spol.³¹ popisují, že koncentrace fenolických allelochemikálií byla ve vzájemném vztahu s pH půdy, vlhkostí, celkovým obsahem uhlíku a celkovým obsahem dusíku v půdě.

4. Biotické faktory

Hustota porostu, růstová stádia, mikrobiální aspekty a stáří rostlin patří mezi biotické faktory podlejších se na aktivitě fenolických sloučenin³. Whitehead a spol.³² ukázali, že koncentrace fenolických sloučenin v půdě je významným faktorem pro růst a diferenciaci rostlin. Weidenhamer a spol.³³ demonstrovali, že pokles fytotoxicity vzrůstá s hustotou porostu (plant denzity), poněvadž při vyšší hustotě přijímá každá rostlina menší množství každé potenciální allelochemikálie. Gallet a Lebreton³⁴ uvádějí, že pouze jedna až tři minoritní fenolické sloučeniny, získané ze zeleného listí, byly také nalezeny v hnědém listí. Dokazují, že kyselina protokatechová a *p*-kumarová byly zastoupeny v hnědém listí ze 20-30 % z původního obsahu v zeleném listí, a že *p*-hydroxyacetofenu bylo v hnědém listí pouze 5 % oproti původnímu obsahu v zeleném listí a *p*-hydroxybenzaldehyd a catechol z hnědého listí dokonce úplně vymizely.

Mikroorganismy jsou všeobecně zapojeny do allelopatie^{3, 18}. Houby *Pullularia fermentans* degradují rutin na floroglucinol, na kyselinu protokatechovou a na kyselinu 2-protokatechuylofloroglucinol-karboxylovou³⁵. Mikroorganismy *Rhodotorula rubra* a *Cephalosporium curtipes* metabolizují kyselinu ferulovou na kyselinu vanilovou, pak na kyselinu protokatechovou a v konečné fázi na kyselinu P-keto-adipovou. Metabolity z mnoha mikroorganismů sehrávají důležitou roli ve fytotoxicitě rozložených zbytků rostlinných orgánů³⁶. Gallet a spol.³⁴ popisují vymizení *p*-hydroxyacetofenu u smrku a kyseliny kávové u borůvek. Tento efekt připisují působení specifických mikroorganismů.

5. Extrakce a izolace fenolických allelochemikálií

Většina fenolických sloučenin, identifikovaných jako allelochemikálie, byla extrahována z rostlinného materiálu. Určité sloučeniny obsažené v rostlinných částech mohou vykazovat inhibiční efekt v druhových testech, ale ve výluzech a exudátech z rostlin tento efekt nevykazují. K potvrzení aktivních fenolických látek v allelopatii je vhodné shromáždit data o koncentraci bioaktivních fenolických sloučenin v médiu (které jsou uvolňovány do prostředí), údaje o časovém působení, o statické a dynamické účinnosti fenolických sloučenin, existenci aditivních (synergických) nebo parciálních antagonistických aktivit fenolických sloučenin i dalších látek.

Metody extrakce a izolace fenolických látek z rostlinného materiálu jsou založeny převážně na aciditě karboxylových a hydroxylových skupin vázaných na aromatické jádro. U různých matric pevných vzorků, jako jsou půda a rostliny, bývá v první fázi prováděná účinná a rychlá ultrasonifikace, prostá extrakce kapalinou, někdy pouze digesce rozpouštědlem nebo soustavou rozpouštědel, v nichž jsou analyty dobře rozpustné. Torri a spol.³⁷ srovnávali použití konvenčního sonifikátoru s homogénizátorem pro extrakci fenolických sloučenin z čerstvého listí *Acomostylis rossi* a *Ouratla luceus*. Dokazují, že větší výtěžnost měla homogénizační technika.

V poslední době se stále více využívá kombinace separačních a obohacovacích technik, které zajišťují prekoncentraci sledovaných analytů a případně i odstranění nežádoucích komponent z analyzovaného materiálu. Pevné místo v této oblasti zaujímá extrakce tuhým sorbentem (Solid Phase Extraction - SPE)³⁸. Glowniak a spol.³⁹ popisují přečištění rostlinného extraktu a izolaci fenolických kyselin na SPE kolonkách plněných sorbenty s oktadecylovými a kvarterními amoniiovými skupinami. Buiarelli a spol.⁴⁰ provedli srovnání SPE techniky (kvarternární amin v kombinaci s oktadecylovým sorbentem) s klasickou extrakcí diethyletherem a extrakcí diethyletherem v kombinaci s PEG. Nejlepší výtěžnost dávala SPE technika. V poslední době se stále více využívá nových typů sorbentů. Pocerull a spol.⁴¹ použili kombinace Carpack s poly(styren-divinylbenzenovým) sorbentem, kde využívají sorbce aromatického jádra fenolických sloučenin na tento kopolymer. Klejdas a spol.⁴² provedli srovnání řady SPE sorbentů. Mezi nejvhodnější se jeví polymerní sorbenty. Verotta a Peterlongo⁴³ použili pro izolaci fenolických látek extrakci tekutinou (oxidem uhličitým) v nadkritickém stavu (Supercritical Fluid Extraction - SFE).

Koncentrace fenolických sloučenin může být stanovena dvěma skupinami metod: 7) chemickou, která využívá redoxní reakce kovové vazby a postupy založené na specifické chemické aktivitě⁴⁴ a 2) tzv. protein-binding assay, která využívá stanovení tanninové kapacity fenolických sloučenin⁴⁵. Waterman a Mole¹⁵ porovnávali různé metody pro stanovení celkového obsahu fenolů Folinovu-Denisovu, Folinovu-Ciocalteuovu a Priceovu-Butlerovu metodu. V těchto případech mohou vznikat interference nefenolických sloučenin, což má za následek nepřesnost ve stanovení celkových koncentrací fenolických sloučenin. Van Alstyn⁴⁶ srovnává tři metody pro stanovení fenolických sloučenin: 1) Folinovu-Ciocalteuovu metodu pro sloučeniny rozpustné v 80 % methanolu, 2) Folinovu-Ciocalteuovu metodu pro sloučeniny rozpustné v 75 % methanolu a 25 % kyselině trichloroctové, 3) metodu s použitím polyvinylpyrrolidonu, který je vhodný pro navázání fenolických sloučenin. Shledává, že první z těchto tří metod dává nejreprodukovatelnější výsledky.

Pro stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin v půdě bývá použito adice fyto toxických látek a srovnání jejich koncentrace v půdě před adicí fyto toxických látek. Inderjit a Dakshini¹⁸ diskutují význam chemické prozíravosti během izolace allelochemikálií. Navrhují omezení použití organických rozpouštědel a mletí vzorků pro extrakci. Organická rozpouštědla mohou strhávat sloučeniny z organické hmoty, mikrobiálních membrán atd.⁴⁷ Mletí může mít za následek uvolnění určitých enzymů, solí, aminokyselin a dusíkatých sloučenin, které nemohou být jinak uvolňovány během přirozených podmínek¹⁸.

Pro separaci fenolických sloučenin z půdy je k dispozici řada metod. Blum a spol.⁴⁸ doporučují pro extrakci volných a reverzibilně vázaných fenolických sloučenin vodu a EDTA. Autoři⁴⁸ uvádějí, že extrakce půd EDTA a vodou dávají allelopaticky významné hodnoty volných a reverzibilně vázaných fenolických sloučenin. Kaminsky a Muller⁴⁹ navrhuji alkalickou hydrolyzu s použitím 0,5 % Ca(OH)₂ a 2 M-NaOH. Dalton a spol.⁵⁰ doporučují extrakci z neutrálního prostředí s použitím vody a Na₂EDTA o pH 7,5 jako chelatačního činidla. Tato metoda je využitelná pro potvrzení přítomnosti a odhad obsahu aktivních fenolických sloučenin v půdě. Dalton a spol.⁵¹ srovnávali rozdílné extrakční postupy z hlediska jejich schopnosti separace v návaznosti na sledování ve vodě rozpustných fenolických sloučenin z půdy. Kládou důraz na význam výběru vhodného extrakčního postupu ve vztahu k získání ekologicky relevantních výsledků.

6. Identifikace a stanovení rostlinných fenolů

Detekce a identifikace biologicky aktivních látek hraje strategickou roli v allelopatickém výzkumu. Mezi orientační techniky patří chromatografie na tenké vrstvě (TLC) popř. na koloně (CC). Pro kvalitativní a kvantitativní stanovení jednotlivých fenolických sloučenin v půdě a rostlinných extraktech či kořenových exudátech jsou s úspěchem používány⁵²⁻⁵⁴ především chromatografické a elektromigrační metody - HPLC, GC a CE (cit.⁵⁵), hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetická rezonance (NMR).

Nejčastěji se používá uspořádání s reverzní fází na alkylovaných silikagelech C18 případně styren divinylbenzenových kopolymerech s oktadecylovým řetězcem. Pro stanovení fe-

nolických sloučenin byl⁵⁵⁻⁵⁸ například s výhodou použit sorbent Hypersil BDS C18, který vykazuje vysokou selektivitu, účinnost a symetrii tvaru píků oproti běžně používaným sorbentům typu ODS C18. Pouze výjimečně se používá silikagel alkylovaný s 6 ev. 8 C v řetězci. Separace se provádí pomocí izokratické nebo gradientové eluce mobilní fází, kterou tvoří směs methanolu nebo acetonitrilu s vhodnými tlumiči (kyselina mravenčí, octová, fosforečná atd.). Detekce jednotlivých látek se provádí buď spektrofotometricky v UV oblasti (220-300 nm, jen výjimečně nad 300 nm). Identifikace jednotlivých látek spočívá v porovnání retenčních časů s časy standardů, což v mnoha případech vede k omylům. Tyto údaje někdy bývají doplněny srovnáním spekter v UV-VIS oblasti pomocí DAD detektoru a odpovídajících knihoven spekter. Stanovení obsahu allelochemikálií bylo prováděno v různých typech matrice (líšejníky, kůra stromů, půda, rostlinné extrakty atd.)⁵⁹⁻⁶⁸

V půdě byly identifikovány kyseliny *p*-hydroxybenzoová, vanilová, syringová, ferulová, *p*-kumarová, zatímco přítomnost kyseliny kávové prokázána nebyla⁵⁹. Výsledky však silně závisí na účinnosti extrakčního postupu a citlivosti detekce. V bramborách byly prokázány kyselina chlorogenová, gallová, protokatechová a kávová, přičemž největší výtěžek fenol-karboxylových kyselin byl získán při varu pod zpětným chladičem⁶⁰. Na základě sledování obsahu jednotlivých fenolických látek v kůře stromů byly prokázány sezónní vlivy, vliv odrůd a dalších faktorů na odolnost vůči infekcím *Discosporium populeum*⁶¹. Obsah fenolických sloučenin v kůře topolů umožňuje rozlišení odrůd topolů odolných či citlivých k bakteriální nákaze⁶². Sekundární metabolity, především fenolkarboxylové kyseliny, byly rovněž identifikovány v líšejnících⁶³.

Kyseliny skořicová, *p*-kumarová, kávová a ferulová spolu s dalšími sloučeninami byly identifikovány jako meziprodukty při dozrávání papriky *Capsicum annum*⁶⁴. Fenolkarboxylové kyseliny byly identifikovány v buněčných stěnách po digesci mikrovlnnou energií⁶⁵. Vanilin, kyselina vanilová, 4-hydroxybenzoová a 4-hydroxybenzaldehyd a další sloučeniny byly separovány a identifikovány HPLC a metoda je použitelná pro sledování vlivu odrůd, agronomických postupů a postupů zpracování na kvalitu vanilky⁶⁶. Kyseliny gallová, chlorogenová, 4-hydroxybenzoová, *p*-kumarová, ferulová a vanilová byly nalezeny v deseti různých druzích sóji *Glycine max* a jejich obsah lze použít k identifikaci druhů⁶⁷. Obsah kyseliny 4-hydroxybenzoové a 4-hydroxyfenyloctové byl stanoven ve slámě a produktech její dekompozice LC s elektrochemickou detekcí⁶⁸.

Cenné informace o chemické struktuře studovaných metabolitů můžeme získat on-line a off-line spektrálními technikami⁵⁴. Mezi off-line techniky patří spektrofotometrické metody v ultrafialové a viditelné (UV-VIS) nebo infračervené oblasti (IR), hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetická rezonance (¹H-NMR, ¹³C-NMR). On-line techniky zahrnují GC, HPLC a CE ve spojení s diode array detekcí (UV-VIS DAD) nebo detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie LC/MS, LC/MS/MS, GC/MS a v nejspodnější řadě i kombinací LC s nukleární magnetickou rezonancí LC/NMR. Nejnovější uvedení tandemu LC/NMR představuje účinný doplněk k LC/UV/MS technikám. Především vyřešení potřebných rozhraní pro spojení těchto technik s HPLC a CE nám poskytne během jedné analýzy dostatek informací o struktuře identifikovaných metabolitů.

7. Závěr

Rostlinné fenolické sloučeniny jsou jednou z významných skupin sekundárních metabolitů podléjících se podstatnou rolí v allelopatii. Navíc je prokázána i genotypová odlišnost v produkci allelochemikálií a jejich odlišná účinnost na různé druhy a různé genotypy téhož druhu^{66,68}. Allelochemikálie plní také úlohu informační nebo jsou fyziologickou součástí obrany či útoku rostliny (látky ochranného charakteru) při biotických vztazích rostlin s jinými organismy, mezi různými druhy rostlin (allelochemický efekt - allomony, kairomony, depresanta) nebo uvnitř druhu (interspecifický chemický efekt - autotoxiny, adaptivní autoinhibitory a feromony). Některé jsou pro rostlinu životně důležité, např. fytohormony, jiné se jeví jako skutečné odpadní produkty.

Působení allelochemikálií je podmíněno řadou jejich fyzikálních a chemických vlastností. Účinky rostlinných extraktů nebo izolovaných látek na rostliny, fytopatogenní organismy a dokonce i vybrané druhy hmyzu⁶⁹ byly již testovány dříve, avšak účinky na respiraci, buněčné dělení, aktivitu enzymů a strukturální stavbu pletiv a buněk teprve nedávno^{73,74}. Při studiu vzájemných interakcí byly zkoumány vztahy uvnitř druhů^{16,75}, mezi rostlinami, mikroorganismy a živočichy⁷⁶, mezi stromy a jinými rostlinami a navzájem⁷⁷ i vzájemné vztahy hostitele a parazita a autotoxicita⁷⁷⁻⁷⁹. V rámci eusymbiózy byla věnována pozornost spolužití dvou druhů odlišných organismů v relativně přesně vymezeném prostoru (pletivu), dále vztahu k chemickému složení rostlinných exudátů a jejich možnému využití v praxi^{79,81}. Existují také práce, které sledují vliv těchto látek na kvalitu zemědělské produkce z hlediska stravitelnosti, příjmu a chutnosti a výživné hodnoty⁸².

V předkládané práci jsou podány možnosti uplatnění a vhodnosti nasazení biotestů (bioassay) na ověření biologické aktivity fenolických látek, vlivů půdních a biotických faktorů k pochopení účinků a interakcí fenolických sloučenin v ekosystémech. Je popsána vhodnost použití nových extrakčních technik jako jsou extrakce pevnou fází (SPE) a extrakce tekutinou v nadkritickém stavu (SFE) pro izolaci fenolických sloučenin. Nástup tandemových technik, mezi které patří LC/MS, LC/MS/MS, CE/MS a LC/NMR ve spojení s HPLC/UV-VIS a CE/UV-VIS nám umožňují přesnou identifikaci látek a poskytnou informace o struktuře těchto biologicky aktivních látek. Zájem o studium vlastností a fyziologické účinky fytochemikálií roste především proto, že by mohly být potenciálně využity jako přírodní, k životnímu prostředí šetrné pesticidy a růstové regulátory, jako přírodní léčiva (kancerostatika, antipyretika aj.) a v řadě dalších oblastí. Rostlinné fenoly sehrávají důležitou úlohu ve farmakologii, medicíně, výživě zvířat a v neposlední řadě i v oblasti rostlinné říše svými chemickými účinky.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu MŠMT ČR v rámci programu „Posílení výzkumu na vysokých školách“ reg. č. VS97014.

LITERATURA

1. Yamamoto Y.: J. Chem. Ecol. 21, 1365 (1995).
2. Tamura S., Chang C., Suzuki A., Kumai S.: Agric. Biol. Chem. 33, 391 (1969).
3. Rice E. L.: *Allelopathy*. Academic Press, Orlando 1984.

4. Waller G. R.: *Allelochemicals. Role in Agriculture and Forestry*. ACS Symposium Serie 330. American Chemical Society, Washington 1987.
5. Inderjit, Dakshini K. M. M., Einhellig F. A.: *Allelopathy. Organisms. Processes and Applications*. ACS Symposium Series 582. American Chemical Society, Washington 1995.
6. Muller C. H.: Bull. Torrey Bot. Club 93, 332 (1966).
7. Muller C. H.: Vegetatio 18, 348 (1969).
8. Inderjit, Dakshini K. M. M.: Am. J. Bot. 79, 977 (1992).
9. Inderjit, Dakshini K. M. M.: Am. J. Bot. 81, 799 (1994).
10. Levin D. A.: Am. Nat. 105, 157 (1971).
11. Harborne J. B.: *Methods in Plant Biochemistry, I. Plant Phenolics*. Academic Press, London 1989.
12. Kuiters A. T.: Acta Bot. Neetherl. 39, 329 (1990).
13. Siqueira J. O., Nair N. G., Hammerschmidt R., Safir G. R.: Crit. Rev. Plant Sci. 10, 63 (1991).
14. Appel H. M.: J. Chem. Ecol. 19, 1521 (1993).
15. Waterman P. G., Mole S.: *Methods in Ecology. Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1994.
16. Chung I. M., Miller D. A.: Agron. J. 87, 920 (1995).
17. Leather G. R., Einhellig F. A.: *Bioassay in Study of Allelopathy, The Science of Allelopathy*. Wiley, New York 1986.
18. Inderjit, Dakshini K. M. M.: Bot. Rev. 61, 28 (1995).
19. Stowe L. G.: J. Ecol. 67, 1065 (1979).
20. Blum U., Rebbeck J.: J. Chem. Ecol. 75, 917 (1989).
21. Chou C. H., Patrick Z. A.: J. Chem. Ecol. 2, 369 (1976).
22. Dornbos D. L. Jr., Spencer G. F.: J. Chem. Ecol. 16, 339 (1990).
23. Li H. H., Inoue M., Nishimura H., Mizutani J., Tsuzuki E.: J. Chem. Ecol. 19, 1775 (1993).
24. Huang P. M., Wang M. K., Wu M. H., Hsu N. W.: Soil Sci. 123, 213 (1977).
25. Kogel I., Zech W.: Senegal Geoderma 35, 119 (1985).
26. Shindo H., Kuwatsuka S.: Soil Sci. Plant. Nutr. 21, 227 (1975).
27. Dalton B. R., Weed S. B., Blum U.: Soil Sci. Soc. Am. J. 53, 757 (1989).
28. Lehman R. H., Rice E. L.: Am. Midl. Nat. 87, 71 (1972).
29. Stowe L. G., Osborn A.: Canad. J. Bot. 58, 1149 (1980).
30. Fischer N. H., Williamson G. B., Weidenhamer J. D., Richardson D. R.: J. Chem. Ecol. 20, 1355 (1994).
31. Blum U., Gerig T. M., Worsham A. D., King L. D.: J. Chem. Ecol. 79, 2791 (1993).
32. Whitehead D. C., Dibb H., Hartley R. D.: J. Appl. Ecol. 19, 579 (1982).
33. Weidenhamer J. D., Hartnett D. C., Romeo J. T.: J. Appl. Ecol. 26, 613 (1989).
34. Gallet C., Lebreton P.: Soil Biol. Biochem. 27, 157 (1995).
35. Hattori S., Noguchi I.: Nature 184, 1145 (1959).
36. Chapman S. J., Lynch J. M.: Plant Soil 74, 457 (1983).
37. Torti S. D., Dearing M. D., Kursar T. A.: J. Chem. Ecol. 27, 117 (1995).
38. Tatarkovičová V.: Chem. Listy 87, 114 (1993).
39. Glowniak K., Zgorka G., Kozyra M.: J. Chromatogr. A 25, 730 (1996).
40. Buiarelli F., Cartoni G., Coccioli F., Levetsovitou Z.: J. Chromatogr. A 695, 229 (1995).

41. Pocurull E., Calull M., Marce R., Borrull F.: *J. Chromatogr. A* 779, 105 (1996).
42. Klejdus B., Kubáň V.: Bude publikováno.
43. Verotta L., Peterlongo F.: *Phytochem. Anal.* 4, 178 (1993).
44. Hagerman A. E., Butler L. G.: *J. Chem. Ecol.* 75, 1795 (1991).
45. Mole Si, Waterman P. G.: *Oecologia* 72, 148 (1987).
46. van Alstyne K. L.: *J. Chem. Ecol.* 21, 45 (1995).
47. Schmidt S. K.: *J. Chem. Ecol.* 16, 3547 (1988).
48. Blum U., Worsham A. D., King L. D., Gerig T. M.: *J. Chem. Ecol.* 20, 314 (1994).
49. Kaminsky R., Muller W. H.: *Soil Sci.* 124, 205 (1977).
50. Dalton B. R., Blum U., Weed S. B.: *J. Chem. Ecol.* 9, 1185 (1983).
51. Dalton B. R., Weed S. B., Blum U.: *Soil Biol. Biochem.* 21, 1011 (1989).
52. Li H. H., Lajide L., Nishimura H., Hasegawa K., Mizutani J.: *Weed Res.* 38, 282 (1993).
53. Nakahisa K., Tsuzuki E., Terao H., Kosemura S.: *Jpn. J. Crop Sci.* 63, 278 (1994).
54. Hostettmann K., Wolfender J. L., Rodriguez S.: *Planta Med.* 63, 2 (1997).
55. Kubáň V., Absolínová H., Klejdus B., Smolíková M., Bartošová L.: *First World Congr. Allelopathy, Book of Abstracts, University of Cadiz, 1996, D3, 145.*
56. Bartošová L., Klejdus B., Smolíková M., Kubáň V.: *J. Allelopathy*, přijato do tisku.
57. Smolíková M., Klejdus B., Kubáň V., Bartošová L.: *J. Allelopathy*, přijato do tisku
58. Klejdus B., Rozinková E.: *7th Int. Symp. Forage Conservat. Book of Abstracts, VÚVŽ Nitra 1995, 165.*
59. Kelley W. T., Coffey D. L., Mueller T. C.: *J. Am. Offic. Anal. Chem. Int.* 77, 805 (1994).
60. Rodríguez de Sotillo D., Hadley M., Holm E. T.: *J. Food Sci.* 59, 649 (1994).
61. Baiocchi C., Marengo E., Roggero M. A., Giacosa D., Vietto L., Toccari S.: *Chromatographia* 39, 481 (1994).
62. Baiocchi C., Marengo E., Saini G., Roggero M. A., Giacosa D.: *J. Chromatogr.* 644, 259 (1993).
63. Yoshimura I., Kinoshita Y., Yamamoto Y., Huneck S., Yamada Y.: *Phytochem. Anal.* 5, 197 (1994).
64. Sakamoto S., Goda Y., Maitani T., Yamada T., Nunomura O., Ishikawa K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1141 (1994).
65. Provan G. J., Scobbiet L., Chesson A.: *J. Sci. Food Agric.* 64, 63 (1994).
66. Taylor S.: *Flavour Fragrance J.* 8, 281 (1993).
67. Ramakrishna M. B. V., Mital B. K., Gupta K. C., Sand N. K.: *J. Food Sci. Technol.* 26, 154 (1989).
68. Galletti G. C., Piccaglia R., Concialini V.: *J. Chromatogr.* 507, 439 (1990).
69. Takahashi Y.: *J. Jpn. Soc. Gras. Sci.* 38, 226 (1992).
70. Luu K. T., Matches A. G., Peters E. J.: *Agron. J.* 74, 805 (1982).
71. Hall M. H., Henderlong P. R.: *Crop Sci.* 29, 425 (1989).
72. Calera M. R., Anaza A. L., Gavilanes-Ruiz M.: *J. Chem. Ecol.* 21, 289 (1995).
73. Ben Hammouda M., Kremer R. J., Minor H. C.: *Crop Sci.* 35, 1652 (1995).
74. Smith M. T., Van Staden J.: *Environ. Exp. Bot.* 35, 113 (1995).
75. Hedge R. S., Miller D. A.: *Agron. J.* 84, 940 (1992).
76. Duhon J. S., Sharma P. K., Laxminarayana K.: *Allelopathy J.* 7, 47 (1994).
77. Quasem R. J.: *Allelopathy J.* 7, 29 (1994).
78. Tesar M. B.: *Agron. J.* 85, 256 (1993).
79. Oleszek W.: *J. Chem. Ecol.* 19, 1063 (1993).
80. Oleszek W.: *Wiad. Bot.* 36, 17 (1992).
81. Schehovic J.: *Zb. konf. „Súčasně poznatky v produkci a využití travných porastů“*, VÚTE, B. Bystrica 1992, 94.

B. Klejdus and V. Kubáň (*Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*): **Plant Phenolic Compounds in Allelopathy**

Applications and importance of bioassays for controlling of biological activity of phenolic compounds, effect of soil and biotic factors for understanding these effects and interactions of phenolic substances in ecosystems are discussed. New extraction techniques, i.e. solid phase extraction (SPE) and supercritical fluid extraction (SFE) for isolation of phenolic substances are described in comparison with classical techniques. Application of tandem (hyphenated) techniques, such as LC/MS, LC/MS/MS, CE/MS and LC/ NMR in combination with classical separation HPLC/UV-VIS and CE/UV/VIS techniques allows exact identification of natural substances and gives detailed information on structure of these biologically active substances. An enormous interest in studies of basic characteristics, physico-chemical properties and physiological activities of phytochemicals increases mainly because of their potential application as natural, nontoxic pesticides and growth regulators, as natural phytopharmaceuticals (cancerostatics, antipyretics etc.) and in other branches. Natural phenols also play an important role in pharmacology, medicine, animal feeding and in the environment by their chemical effects.