

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta tropického zemědělství

Katedra tropických a subtropických plodin a agrolesnictví



Mikropropagace zavinutky podvojně (*Monarda didyma* L.)

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. Dr. Ing. Eloy Fernández Cusimamani

Vypracoval:

Hana Kubincová

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Mikropropagace zavinutky podvojně (*Monarda didyma* L.)“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém soupisu literatury. Souhlasím, aby práce byla uložena v knihovně ČZU v Praze a zpřístupněna ke studijním účelům.

V Praze dne 2.5.2013

.....

Hana Kubincová

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Dr. Ing. Eloyovi Fernándezovi Cusimamanimu za odborné vedení, nepostradatelné rady, pomoc při zpracování této bakalářské práce a poskytnutí laboratoře.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janu Táborskému, PhD. za poskytnutí rostlinného materiálu.

Abstrakt

Zavinutka podvojná (*Monarda didyma* L.) je vytrvalá léčivá bylina pocházející z východní části USA. Už původní indiánští obyvatelé ji užívali jako léčivku na nejrůznější onemocnění. Hlavní účinnou látkou jsou thymochinon, thymohydrochinon a dithymochinon.

Cílem předložené práce bylo sledování vlivu růstových regulátorů při mikropropagaci zavinutky podvojně pomocí nodálních segmentů. Práce byla provedena v následujících krocích: převod rostlin do *in vitro* podmínek, namnožení materiálu, vlastní pokus mikropropagace a převod do *ex vitro* podmínek. Pro růst a vývoj výhonků byly do kultivačního MS (Murashige a Skoog, 1962) média přidány 6-benzylaminopurin (BAP) a kinetin (KIN), oba citokyniny ve třech koncentracích (0,5 mg/l, 1,0 mg/l a 1,5 mg/l) a pro indukci kořenů byly do média přidány auxiny indolyl-3-octová kyselina (IAA) a α – naftyloctová kyselina (NAA), také každý ve třech koncentracích (0,1 mg/l, 0,5 mg/l a 1,0 mg/l).

Nodální segmenty byly kultivovány v kultivačním boxu při teplotě 25/20°C den/noc, světelné periodě 16/8, během 30 dnů.

Optimální koncentrace pro indukci nadzemních částí je cytokinin BAP v koncentraci 1,0 mg/l. Nicméně v kulturách s přídavkem BAP docházelo k tvorbě kalusu. Pro indukci kořenů je nejlepší auxin NAA v koncentraci 0,1 mg/l.

Růstové regulátory, cytokininy, spíše ve vyšších koncentracích a auxiny, spíše v nižších koncentracích, hrají v kultivačních mediích pro podporu růstu a vývoje zavinutky důležitou roli.

Klíčová slova: *Monarda didyma*, mikropropagace, růstové regulátory, nodální kultura

Abstract

Crimson beebalm (*Monarda didyma* L.) is a perennial herb, eastern USA native. Original Indian inhabitants used it as a medicinal plant for various diseases. The main active ingredient is thymohydroquinone, dithymoquinone, thymoquinone.

The aim of this thesis was to study the growth effect of regulators during micropropagation of crimson beebalm using nodal segments. The work was performed in the following steps: converting the plants to *in vitro* conditions, propagation of the material, particular experiment of micropropagation and the transfer to *ex vitro* conditions. For the growth and development of shoots were used MS (Murashige and Skoog, 1962) medium added 6-benzylaminopurin (BAP) and kinetin (KIN) both cytokinins in three concentrations (0.5 mg/l, 1.0 mg/l and 1.5 mg/l) and for the induction of roots were used the medium added auxins 3-indolyl-acetic acid (IAA) and naphthalene acetic acid (NAA) each in three concentrations (0.1 mg/l, 0.5 mg/l and 1.0 mg/l).

Nodal segments were cultivated in a culture box with temperature 25/20°C day/night, light period of 16/8, during 30 days.

The optimal concentration for induction of aerial parts is cytokinin BAP in concentration 1.0 mg/l. However, in cultures with added BAP callus was formed. For induction of roots the best auxin NAA in concentration 0.1 mg/l.

Growth regulators, cytokinins in rather higher concentrations and auxins, rather in lower concentrations, have, in cultivation media for the growth support and development of crimson beebalm, an important role.

Key words: *Monarda didyma*, micropropagation, growth regulators, nodal culture

Obsah

1 Úvod	8
2 Literární rešerže	9
2.1 Zavinutka podvojná (<i>Monarda didyma</i> L.)	9
2.2 Taxonomie	10
2.2.1 Rod <i>Monarda</i>	10
2.3 Původ a rozšíření	12
2.4 Botanický a morfologický popis	13
2.5 Množení	17
2.5.1 Generativní množení	17
2.5.2 Vegetativní množení	17
2.5.3 Podmínky pro pěstování	17
2.6 Choroby	18
2.7 Využití a význam	18
2.8 Chemické složení	19
3 Cíl práce	20
4 Materiál a metody	21
4.1. Rostlinný materiál	21
4.2. Metodika	21
4.2.1. Založení vlastního pokusu mikropropagace	21
5 Výsledky a diskuze	25
6 Závěr	34
7 Použitá literatura	35
8 Přílohy	37

Seznam použitých zkratek

BAP	6-benzylaminopurin
IAA	indolyl-3- octová kyselina, zkratka z angličtiny
NAA	α – naftyloctová kyselina
MS	Murashige a Skoog (1962), kultivační medium
KIN	6-furfurylaminopurin
TQ	thymochinon
THQ	thymohydrochinon
DTQ	dithymochinon
NaClO	chlornan sodný

1 Úvod

Zavinutka podvojná (*Monarda didyma* L.) je vytrvalá léčivá bylina z čeledi hluchavkovitých (*Laminaceae*), pocházející z východní oblasti USA (McClintock a Epling, 1942). V polovině 18.století byla introdukována jako okrasná rostlina do Evropy (Small, 2006). Dorůstá výšky 70-150 cm (Gleason a Conquist, 1991). Květy jsou nejčastěji zbarveny do šarlatové až karmínové barvy (Whitten, 1981) a jsou opylovány ptáky (McClintock a Epling, 1942). U této rostliny jsou využívány nadzemní části, které obsahují léčivé látky, mimo jiné také, thymochinon, thymohydrochinon a dithymochinon s širokými léčebnými účinky (Táborský et. al, 2012). Kromě léčivého využití bývá zavinutka používána k přípravě čaje zvaného Oswego tea i chlazeného nápoje, je přidávána do jídel jako doplněk i jako náhražka šalvěje. Silice, zvaná bergamotova, je přidávána jako aromatizační přísada do parfémů (Small, 2006).

Nejlépe se rozmnožuje vegetativně pomocí podzemních oddenků, z nichž pak vyrůstají nové stonky, dále je dobře množitelná stonkovými řízků. Také je možné ji množit generativně, semeny (Small, 2006).

Další způsob množení může být pomocí mikropropagace, která je jednou z moderních metod množení rostlin, při které se z velmi malé části mateřské rostliny odvodí velký počet jedinců, zpravidla velmi malých (Pavlová, 1992). V dostupné literatuře nejsou výzkumy týkající se mikropropagace tohoto rodu.

Stanovení optimálního protokolu pro mikropropagaci (převod rostlin do *in vitro* podmínek, namnožení materiálu, vlastní pokus mikropropagace a převod do *ex vitro* podmínek) zavinutky podvojně, by mohlo pomoci při množení tohoto druhu a i nově vyšlechtěných variet.

Z výše uvedených důvodů se tato práce věnuje mikropropagaci zavinutky podvojně.

2 Literární rešerže

2.1 Zavínutka podvojná (*Monarda didyma* L.)

Zavínutka podvojná (obraz 1), jinak zvaná Oswego-tea, Bergamot nebo Crimson Beebalm (Gleason a Cronquist, 1991), je vytrvalá léčivá bylina (obraz 1), patřící do čeledi hluchavkovitých (*Laminaceae*). McClintock a Epling (1942) ji řadí do podrodu Eumonarda. Pochází z východní oblasti USA (Small, 2006). Široce rozšířená je v oblasti od New Yourku, jižně podél Apalačského pohoří, po severní Georgii. Roste ve všech nadmořských výškách, nejčastěji ale ve výšce od 1000 po 2000 m.n.m., podél říčních břehů, v průsakových oblastech i ve škarpách kolem silnic (McClintock a Epling, 1942). Častý pro tuto rostlinu je bujný růst a často se stává invazivní rostlinou, která zaplavuje zahrádky (Small 2006). Začíná obvykle kvést na začátku června, v plném květu je asi třetí týden v červenci a odkvétá přibližně třetí týden v srpnu (Egler, 1973). Užívali ji už i indiánští obyvatelé severní Ameriky, od kterých pochází její populární název „indiánská kopřiva“.

Existuje také řada zahradních odrůd, kvetoucích nejrůznějšími barvami, které vznikly křížením a šlechtěním, nejsou však tolik využívány ani k léčebným účelům ani k přípravě čaje. Jsou to odrůdy ‘*Marshall’s Delight*’ kvetoucí sytě růžově (Rausch a Lotz 2005). Je ale triploidní, tudíž je sterilní. Je tedy možné ji rozmnožovat pouze vegetativně (Small 2006). Další odrůdou je ‘*Beauty of Cobham*’, která kvete svítivě nafialověle růžově. Květy ‘*Croftway Pink*’ mají barvu lososovou, ‘*Schneewittchen*’ kvete bíle a sytě červeně kvetou odrůdy ‘*Adam*’ a ‘*Gardeview Scarlet*’ (Rausch a Lotz 2005).

Ve své studii uvádí Táborský, et al. (2012) dvě odlišné populace zavínutky podvojně na dva chemotypy, chemotyp 1 a chemotyp 2, lišící se obsahem hlavních složek, kterými jsou karvakrol a thymol (příloha 2).



Obraz 1. Zavinutka podvojná

Zdroj: [picasaweb.google.com](https://www.picasaweb.google.com)

Autor: Kräuter, 2013

2.2 Taxonomie

2.2.1 Rod *Monarda*

Linnaeus (1753) popsal rod *Monarda* s pěti druhy z Kanady, Virginie a Pensylvánie. Studium rodu *Monarda* bylo poté započato kolem roku 1923 Elizabeth McClintock a Carlem Eplingem (McClintoc a Epling 1942). Rod byl pojmenován po španělském botanikovi Nicholasu de Monardes (Small, 2006). McClintock a Epling (1942) rozdělili rod na dva podrody – *Eumonarda* a *Chelyctis*. Liší se počtem chromozomů. Podrod *Eumonarda* má základní počet chromozomů (n) 18 a podrod *Chelyctis* jich má 11 (Scora, 1967). *Eumonarda* může tvořit dva, někdy i více lichopřeslenů. Patří sem *M.didyma*, *M. media*, *M. clinipodia* a variety rodu *M. fistulosa* (Scora, 1966). Celý rod je rozšířen po Severní Americe, od Skalnatých hor po atlantické pobřeží, od Kanady po Mexiko (Prather et al., 2002), od horských oblastí i ve výšce 2000 m, například v Durangu, po přímořská stanoviště podél atlantického pobřeží na jihu

Spojených států. Najdeme ho na okraji džungle ve Veracruz i v poušti Chihuahua. V Texasu přežívají tyto rostliny i na slaných půdách (Scora, 1967). Rod zahrnuje 16 čeledí (příloha 3) a mnoho poddruhů (Whitten, 1981). Většina druhů je vytrvalá, jsou však i druhy jednoleté (Prather et al., 2002). Dále existuje mnoho dalších druhů a jejich kříženců pěstovaných pro okrasné účely (Small, 2006).

V horách ve východním Tennessee a na západě Severní Karoliny rostou pouze tři druhy: *Monarda didyma* L.; *M. clinopodia*; a *M. fistulosa*. *Monarda x media* Willdenow se také vyskytuje v těchto horách, je to ale přírodní hybrid, který je výsledkem hybridizace a zpětného křížení předchozích tří druhů. Tyto tři rodičovské druhy se nápadně liší v barvě a velikosti koruny (Whitten, 1981). Například *M. clinopodia* má malé bílé květy a *M. didyma* má velké ruměnné květy. To by mohlo mít souvislost s úrovní ploidie (McClintock a Epling, 1942).

Popis některých zástupců rodu *Monarda*

Zavinutka trubkovitá (*Monarda fistulosa*) pochází z Kalifornie a Mexika. Kvete fialově a má kořenitou chuť podobnou tymiánu (Rausch a Lotz 2005). Obsahuje esenciální olej, který vykazuje antibakteriální aktivitu, potlačují růst mykoplazmat a candida hub. Také stimuluje antibiotickou citlivost mnoha gramnegativních bakterií. Pro jeho účinky je navržen jako přísada lopuchového oleje, který se užívá při léčbě kožního onemocnění zvaného Seborrhea, jehož hlavním příznakem je dysfunkce mazových žláz v různých oblastech kůže. Nejvíce jsou tímto onemocněním postižení lidé ve věku 17-24 let.

Zavinutka bodová (*Monarda punctata*) roste v oblasti Severní Ameriky od východní a střední části USA po severní Mexiko (Small 2006). Květy jsou skvrnitě a žluté. Aroma jejích listů je srovnatelné s vůní oregana (Rausch a Lotz 2005). Ve dvacátých letech se pěstovala pro extrakci thymolu a také se využívala k lékařským účelům. Výtažek z listů se přidával do nealkoholických nápojů.

Zavinutka jihohorská (*Monarda austromontana* Epling) je pomalu rostoucí jednoletka vyskytující se v Mexiku. Její chuť se podobá chuti oregana. Tato zavinutka byla po mnoho let užívána domorodým obyvatelstvem severního Mexika a jihovýchodu USA ke koření jídel a k přípravě čaje uklidňujícího žaludek.

Kříženci zavinutky podvojně (*Monarda dydima*) a zavinutky trubkovité (*Monarda fistulosa*) jsou rezistentní vůči rzím.

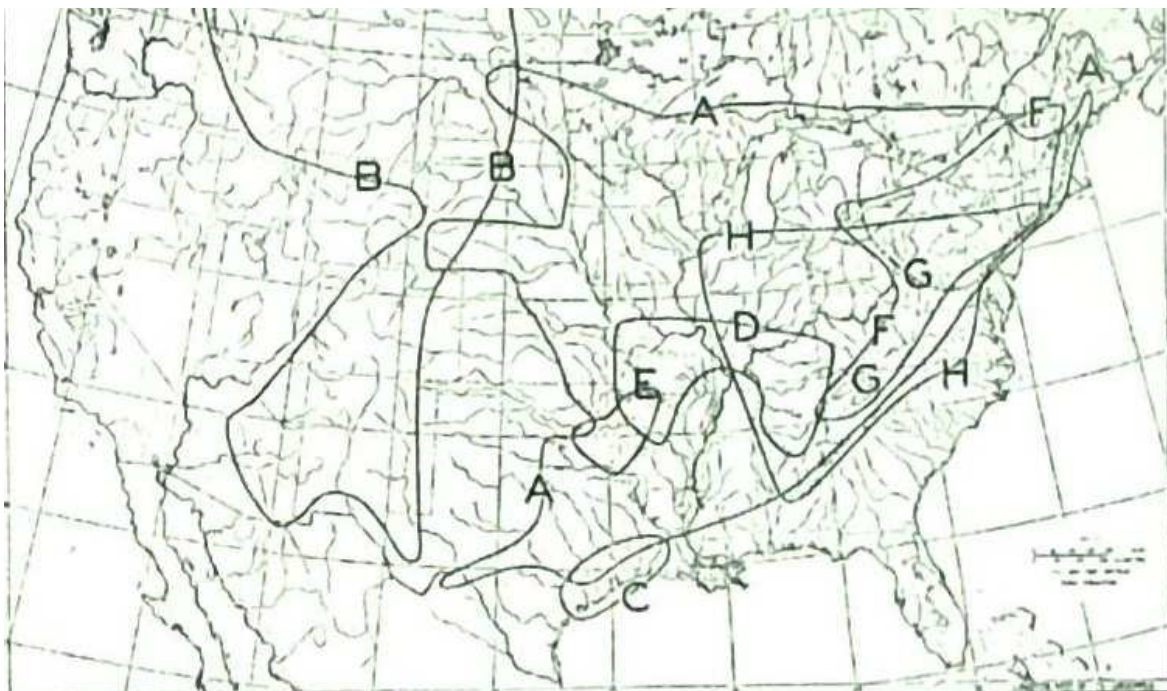
Kultivar „Marshalls Delight“ je triploidní a tudíž je sterilní. Je tedy možné ho rozmnožovat pouze vegetativně (Small, 2006).

2.3 Původ a rozšíření

Zavinutka podvojná pochází z východní oblasti USA. Nalezneme ji od státu Michigan po New York a od Severní Georgie po jižní Tennessee (obraz 2). V roce 1754 byla jako okrasná rostlina introdukována do Evropy. Pionýrští kolonisté dovezli v polovině 18. století semena zavinutky do Anglie a odtud se rozšířila dále po Evropě.

Pokusně byla pěstována i na Krymu pro silici, která se používá jako aromatizační přísada do parfémů (Small 2006).

Ve východních částech Severní Ameriky se nacházejí dvě formy zavinutky podvojně, s úzkými a se širokými listy. Obě formy je možno nalézt v New Yorku a Pensylvánii, zřídka se nachází ve státech Nové Anglie na severovýchodě USA, v Marylandu, New Jersey, Michiganu a v Ohio. Nicméně zdá se, že pouze úzkolisté formy zavinutky podvojně se vyskytují ve Virginii, Severní Karolíně a v Tennessee (McClintock a Epling 1942).



- | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| A – <i>M. fistulosa</i> | D – <i>M. bradburiana</i> | G – <i>M. media</i> |
| B – <i>M. methafolia</i> | E – <i>M. russeliana</i> | H – <i>M. clinopodia</i> |
| C – <i>M. Lindheimeri</i> | F – <i>M. didyma</i> | |

Obraz 2. Rozšíření některých druhů podrodu *Eumonarda*

Zdroj: McClintock a Epling, 1942

2.4 Botanický a morfologický popis

Zavinutka podvojná pochází z východní oblasti USA. Nejvíce se vyskytuje v oblasti od New Yourku jižně podél Apalačského pohoří po severní Georgii (Whitten, 1981). Často se vyskytuje v houštinách a podél říčních břehů. Tvoří trsy, někdy široké až 1 m v průměru. Ve volné přírodě v Severní Americe (například v jižní části provincií Ontario a Quebec) je možné nalézt i rostliny, které unikly z kultivace (Small 2006).

Kořeny:

Kořenový systém rostliny je plochý, bohatě rozvětvený a do šířky rychle se rozrůstající, brzy tvořící husté porosty (Rausch a Lotz, 2005). Tvoří plazivé vytrvalé oddenky, ze kterých na jaře rostou nové stonky (McClintock a Epling, 1942).

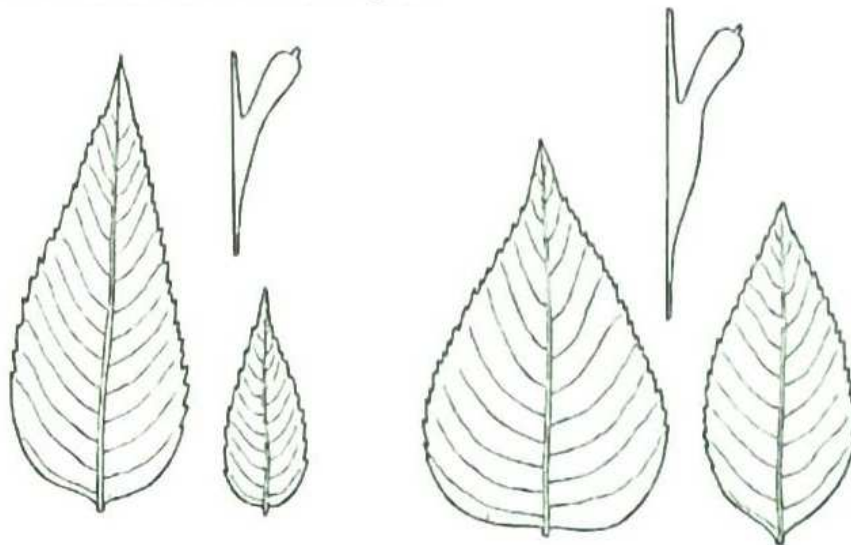
Stonek:

Stonek je vysoký asi 70-150 cm, většinou rozvětvený, může ale být i nevětvený, často na uzlinách chlupatý (Gleason a Cronquist, 1991).

Listy:

Listy zavinutky jsou tenké, vejčité nebo kosočtverečně-vejčité, až téměř kopinaté, 7-15 cm dlouhé a 2,5-6 cm široké, špičaté, na okraji pilovité, na bázi téměř zaokrouhlené (Gleason a Cronquist, 1991) s řapíky dlouhými asi 1-4 cm (McClintock a Epling, 1942). Listeny jsou kopinaté, obvykle červeně tečkované (Gleason a Cronquist, 1991). Vrchní listy a listeny mívají často červené nebo bronzové zbarvení (Small, 2006).

Byly pozorovány variační rozdíly ve velikosti a tvaru listů (obraz 3). Vyskytují se rostliny s listy širokými 3,5-8,5 cm a dlouhými 6-13,5 cm a rostliny s úzkými listy, širokými v rozmezí 3-5,5 cm a dlouhými 8-14,5 cm (McClintock a Epling, 1942).



Obraz 3. Vlevo úzkolistá forma, vpravo širokolistá forma zavinutky podvojně. Koruna ilustruje velikost obou forem.

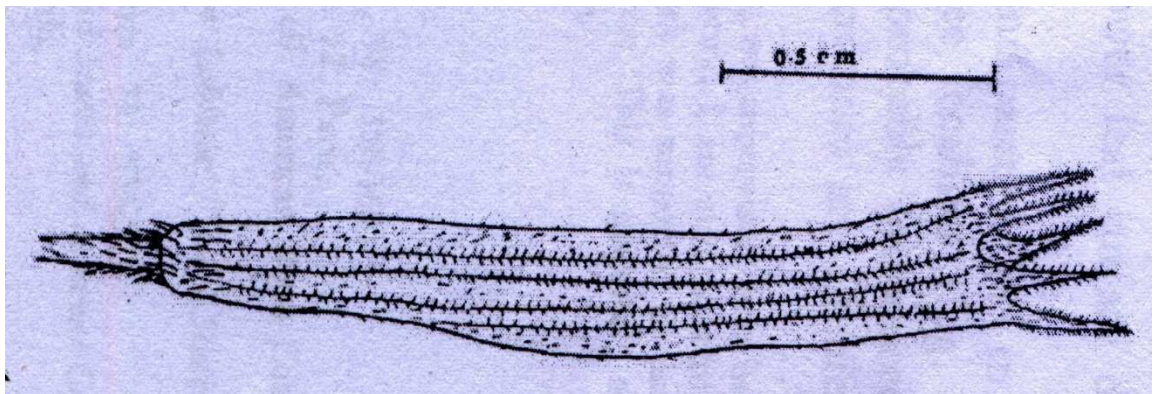
Zdroj: McClintock a Epling, 1942

Květy:

Květy (obraz 4B) jsou nevonné, opylované ptáky. Květenství tvoří lichopřeslen, většinou jen jeden hlavní, v průměru 1,5-3 cm široký. Zavínutka podvojná však může tvořit i dva lichopřesleny. Vnější listeny jsou přisedlé nebo skoro přisedlé (McClintock a Epling, 1942), úzce špičaté, vyhnuté ven (Whitten, 1981), zelené nebo zbarvené do stejné barvy jako koruna. Jsou chlupaté, se stejným druhem chlupů jako mají listy (McClintock a Epling, 1942). Kalich (obráz 4A) je velký 10-14 mm, lysý až jemně pýřitý, v jícnu téměř lysý, zuby dlouhé 1-2 mm, šídlovité, jemně pýřité, ne žláznaté, nahoře k bázi trojúhelníkovité (Gleason a Cronquist, 1991). Trubkovitá koruna se náhle rozšiřuje vzhůru (Whitten, 1981), má šarlatovou až karmínovou barvu, zřídka je sytě červeně nachová. Je 3-4 cm dlouhá a vybíhá v přímý horní pysk a páskovitý, zkroucený spodní pysk (Whitten, 1981). Horní pysk je téměř rovný, dlouhý asi polovinu korunní trubky (Gleason a Cronquist, 1991), není hustě ochlupený, na vrcholu a v ústí kalichu je lysý (Egler, 1973). Tyčinky jsou uloženy 3-6 mm hluboko (McClintock a Epling, 1942). Nitky jsou připojeny ke koruně poblíž ústí, se dvěma vrtivými prašníky, které jsou spojeny a vynikají pod horním pyskem jako čnělka. Dospělé květy rozkvétají ze středu k obvodu. V nadmořské výšce 1200 m.n.m. tato rostlina kvete mezi 30. červnem a 30. červencem (Whitten, 1981).

Byla pozorována souvislost délky koruny a šířky listů. Širokolistá forma zavínutky podvojně má korunu dlouhou v průměru 35 mm a úzkolistá v průměru 39mm. Malokvěté formy zavínutky jsou výjimečné. Velikost jejich koruny je menší než 35 mm a nemají náhlé nálevkovité rozšíření koruny vzhůru (McClintock a Epling, 1942). Kultivary mají zbarvení různorodé (Small, 2006).

Nejefektivnějším opylovačem tohoto druhu je kolibřík červenohrdlý (*Archilochus colubris*), lákán poměrně velkým množstvím sladkého nektaru v květech, který obsahuje převážně sacharózu, menší množství fruktózy, glukózy a rafinózy (McClintock a Epling, 1942).



A) Kalych zavinutky podvojn 
Zdroj: Gill, 1976



B) Kv t zavinutky podvojn 
Zdroj: www.beehappyplants.co.uk

Obraz 4. A-B: Květenství zavinutky

2.5 Množení

2.5.1 Generativní množení

Rozmnožování semeny není tak časté, ale je možné. Spíše se rozmnožuje vegetativně.

2.5.2 Vegetativní množení

Rostliny zavinutky tvoří, hlavně na podzim, plazivé podzemní oddenky rozrůstající se do šířky, z nichž na jaře rostou stonky (Small, 2006). Tímto způsobem se tato rostlina sama nejsnadněji a nejrychleji množí. Proto, chceme-li zavinutku rozmnožit, je nejlepší množit ji na jaře dělením trsů mateřských rostlin. Dělení by se ale mělo opakovat až po několika letech, aby byla znovu obnovena jejich vitalita (Garland, 1979). Oddělky by měly být sázeny o něco hlouběji, než rostla mateřská rostlina (Lima, 1986).

Také se dají tyto rostliny množit pomocí stonkových řízků. Řízky z mladých stonků, odebírané na jaře nebo v létě, mohou být úspěšně použity k propagaci (Lesli's, 1992). Za použití hormonálních stimulantů řízky v rosených záhonech zakoření za 10-14 dní.

K rozmnožování mohou být také použity výhonky s několika růstovými vrcholy, které se dají zakořenit do lehké půdy. Během prvního roku se dobře ujmou a rostliny zůstávají produktivní 5-7 let. Je doporučováno v prvním roce růstu odstříhávat květní vrcholy před tím, než rozkvetou, pro podporu vegetativního růstu (Small, 2006).

2.5.3 Podmínky pro pěstování

Zavinutka podvojná roste v trsech. Podzemní výhonky se rozšiřují od středů trsů do všech stran a brzy vyhánějí nové stonky. Je pro ně typický bujný růst. Za 3-4 roky je schopná se rozšířit o víc než jeden metr a často se stává invazivní rostlinou. Je dobré ji pěstovat v bohatých, vlhkých, lehkých, zrnitých (Page, 1980) a mírně kyselých půdách, s pH asi 5,5-6,5 (Hayward, 1983), s vysokým obsahem organické hmoty. Kořeny nerostou hluboko a zejména v horkých dnech by neměly přeschnout a v zimě, jsou-li pěstovány v těžkých půdách, mají sklony k odumírání (Page, 1980). Jednotlivé trsy by měly být

od sebe vzdáleny minimálně 25 cm, aby mezi rostlinami dostatečně proudil vzduch. K mulčování se doporučuje používat raději jehličí, nežli trávu (Small, 2006). V horkém létě jim vyhovuje mírný stín (Goode, 1984) a v suchém období je třeba rostliny dostatečně zalévat (Kublick, 1990). Nejlépe však kvetou na výsluní s vlhkou půdou, ale porostou také v suchu nebo v polostínu. Rostliny by měly být chráněny před prudkým poledním sluncem (Rausch a Lotz, 2005).

2.6 Choroby

Zavinutka je náchylná na onemocnění padlím travním, hlavně pokud je pěstována v prostorech bez dobré cirkulace vzduchu a rzemi. Při napadení rzemi je nejlepší po odkvětu rostlinu sestříhnou na 8 cm a napadené části spálit, aby nedocházelo k šíření nákazy. Mohou být použity i fungicidy. Je důležité ale pamatovat, že části rostlin ošetřené fungicidy jsou nejedlé (Small, 2006). Leslie's (1992) píše, že rod *Monarda* je náchylný k plísním. Také uvádí, že *M. fistulosa* a *M. didyma* jsou pozoruhodně rezistentní.

2.7 Využití a význam

Small (2006) uvádí, že dříve lidé užívali zavinutku jako léčivku při nachlazení a škrábání v krku. Silice z listů se užívala při infekcích průdušek, nachlazení, ženských problémech, chřipce, plynatosti, ledvinových problémech, žaludeční nevolnosti, zápalu plic a při napadení vnitřními cizopasníky. Čerstvý čaj připravený z listů se považoval za uklidňující prostředek. Indiáni z kmene Čerokiů používali zavinutku podvojnou a zavinutku trubkovitou k léčení „ženských problémů“, nachlazení, nadýmání, bolesti hlavy, koliky, horečky, nemoci srdce, slabého žaludku, poruch trávení, krvácení z nosu, hysterie a nespavosti.

V současné době je tato rostlina využívána hlavně na přípravu čaje nazývaného Eswego-tea (Prather et al., 2002). Dále Small (2006) uvádí, že je dobré smíchat listy zavinutky podvojně s jinými bylinami nebo případně při přípravě chlazeného nápoje s plátky citrónů. Mladé výhonky a čerstvé listy mají štiplavé citrusové aroma a hořkou chuť. Výtečně se hodí jako doplněk nápojů z vína, limonád, ovocných šťáv, želé i sýrů. Listy se hodí nejlépe k vepřovému a telecímu masu. Používají se také jako náhražka šalvěje do nádivek a masitých jídel. Listy pro okamžité zpracování je možné sbírat

kdykoli. K sušení se užívají listy i květy, které je vhodné sbírat v polovině léta. Nebo mohou být zamraženy. Silice získaná ze zavinutky podvojně, tzv. bergamotová silice, se přidává jako aromatizační přísada do parfémů. Rostliny pro získání silice se sklízí v plném květu. Silice se získává destilací parou, kdy se nechá přejít pára přes čerstvou nasekanou dřev a silice pak spolu s párou kondenzují (Small, 2006).

2.8 Chemické složení

Zavinutka podvojná obsahuje značné množství silice. Silice se získává destilací parou. Výtěžek z čerstvých listů bývá okolo 0,3-1,0%, ze sušených listů asi 2,7-3,1% (Small, 2006). Také obsahuje značné množství thymochinonu (TQ), u kterého byly zjištěny anti-epileptické, protizánětlivé, protinádorové, antimikrobiální, antioxidantní, hepatoprotektivní a imunomodulační účinky. Společně s TQ se v silici vyskytují i sloučeniny thymolhydrochinon (THQ) a dithymochinon (DTQ). U THQ byly zjištěny antibakteriální, protiplísňové, protizánětlivé a antioxidantní vlastnosti. DTQ vykazuje cytotoxicitu pro lidské nádorové linie. Chemotyp 2, zavinutky podvojně, vykazuje větší množství TQ a THQ než chemotyp 1, více v květních částech než v listech a stoncích (Táborský et al., 2012). Také ve své studii Táborský et.al. (2012) uvádí, že se oba chemotypy liší obsahem hlavní složky silice. Chemotyp 1 obsahuje, dle jejich studie, jako hlavní složku silice karvakrol a chemotyp 2 thymol (příloha 2.). Ale ve starší studii Scora (1967) uvádí, že thymol a karvakrol v listové silici zavinutky podvojně není (příloha 1.).

Někteří kříženci zavinutky mají vysoký obsah geraniolu, linalolu, karvakrolu, thymolu a cineolu, které se využívají zejména v parfumerii (Small, 2006).

3 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení protokolu pro mikropropagaci zavinutky podvojně (*Monarda Didyma* L.) nodální kulturou v *in vitro* podmínkách, kde byl zkoumán vliv růstových regulátorů pro růst výhonků a indukci kořenů. Pro růst výhonků byly použity cytokininy 6-benzylaminopurin a kinetin, pro indukci kořenů auxiny indolyl-3-octová kyselina a α – naftyloctová kyselina.

Cíl práce byl stanoven na základě následujících hypotéz:

- I. Cytokininy mají vliv na růst výhonů (nadzemních částí rostliny).
Cytokininy pozitivně ovlivňují dělení buněk a proliferaci buněk kalusu, přímou i nepřímou tvorbu pupenů, vývoj axilárních pupenů (Pavlová, 1992; Kováč, 1995)

- II. Auxiny mají vliv na indukci kořenů.
Auxiny indukují růst vrcholových meristémů stonku a zakládání kořenů (Pavlová, 1992; Kováč, 1995).

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

V experimentu byl použit druh zavínutky podvojně chemotyp 1, který má vyšší obsah karvakrolu v silici (Táborský et al. 2012), odebraný z demonstračních pozemků České zemědělské univerzity v Praze.

4.2 Metodika

Metodika byla provedena dle standartních stadií mikropropagace

- **Stadium 0** představuje výběr mateřské rostliny
- **Stadium I** představuje získání aseptické kultury
- **Stadium II** znamená průběh intenzivní tvorby rozmnožovacích částic
- Ve **stadiu III** probíhá příprava na převod do přirozených podmínek
- **Stadium IV** znamená převod do přirozených podmínek

4.2.1 Založení vlastního pokusu – mikropropagace

Stadium 0

Materiál byl odebírán v generativní fázi růstu, z vitálně vypadajících rostlin z demonstračních pozemků České zemědělské univerzity v Praze.

Stadium I

Odebrané části rostliny byly v laboratoři omyty od hrubých nečistot. Poté byly nařezány na jednotlivé nody, v délce v průměru asi 1,5cm a odstraněny listy nad řapíky tak, aby nebylo poškozeno paždí listů, z kterých pak vyrůstají nové výhonky. Nařezané nody byly sterilizovány ponořením na 30 sekund do 70% ethanolu, poté propláchnuty destilovanou vodou a nakonec ponořeny do 1% roztoku NaClO za promíchávání

na třepačce, a to ve dvou časových variantách 15 a 20 min. Dále následovalo založení aseptické kultury ve sterilních podmínkách flow-boxu, kde byl rostlinný materiál vyjmut ze sterilizačního roztoku a třikrát propláchnut ve sterilní destilované vodě, aby byl zbaven saponátu. Poté byly jednotlivé nody v Petriho miskách ořezány a v průměrné délce asi 1cm byly přendány do kultivačního MS media (Murashige a Skoog, 1962). Dále byl materiál kultivován v kultivačních boxech se světelnou intenzitou 300lx, s časovou periodou 18/6 h a teplotou 25/20 °C den/noc. V počáteční fázi byly časté kontaminace plísněmi, bakteriemi i viry. V případě nákazy byla provedena dekontaminace ,a to opětovnou sterilizací nebo častým pasážováním rostlinného materiálu do čerstvého media.

Nakažení **viry** se u rostlin rostoucích na MS mediu projevovalo vadnutím, kroucením a barevnými změnami listů. Někdy způsobovaly zakrslost listů a zároveň dlouhivý růst rostlin s delšími internody. Viry byly odstraněny častým pasážováním meristémů na čerstvé medium, ale ne vždy došlo k úplnému uzdravení. Nebylo provedeno určení druhu viru, což nebylo cílem předložené práce.

Při nakažení **bakteriemi** byl pozorován na mediu v okolí rostlinného materiálu sliz. Na tuto nákazu, v případě nodů, byla použita opětovná sterilizace v 70% ethanolu a 1% roztoku NaClO. Jednalo-li se o kontaminované rostliny, již vyrostlé v kultivačních boxech, byla opatrně, aby nedošlo k nakažení zdravých částí rostlin, celá rostlina vyjmuta ve sterilních podmínkách flow-boxu z Erlenmeyerovy baňky na Petriho misku, skalpelem opatrně odstraněna nakažená část rostliny a zdravá část rostliny byla dána na čerstvé MS medium.

Plísně jsou na rostlinách viditelné okem. Plísně byly odstraněny opětovnou sterilizací materiálu v 70% ethanolu a 1% roztoku NaClO nebo velmi opatrným odstraněním nakažených částí rostlin ve sterilních podmínkách flow-boxu tak, aby nedošlo k rozvíření spor a nakažení zdravého materiálu. Zdravé části rostlin byly opět nařezány na jednotlivé nody, které byly dány na čerstvé medium. Zachovány byly i apikální vrcholy a dány na MS medium.

Takto získaný sterilní materiál byl namnožen na MS mediu bez růstových regulátorů pro založení vlastního pokusu. Množení materiálu bylo prováděno nodálními a apikálními segmenty. Explantáty byly množeny zhruba každé 3-4 týdny, po dobu 5-ti měsíců, na MS mediu bez růstových regulátorů. Dlouhé bylo ozdravování materiálu.

Stadium II

Po úspěšném namnožení zdravého materiálu byl zahájen vlastní pokus mikropropagace, při kterém byly použity pouze nodální segmenty o velikosti 1 cm. Nodální segmenty (explantáty) byly kultivovány v MS mediu s přidavky cytokininů (BAP a KIN) v 6-ti variantách a kontrolní varianta v čistém MS mediu bez růstových regulátorů. V každé variantě bylo kultivováno 20 segmentů.

- 1) MS, bez růstových regulátorů, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7, kontrolní medium
- 2) MS, 0,5 mg/l, BAP, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7
- 3) MS, 1,0 mg/l, BAP, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7
- 4) MS, 1,5 mg/l, BAP, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7
- 5) MS, 0,5 mg/l, Kin, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7
- 6) MS, 1,0 mg/l, Kin, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7
- 7) MS, 1,5 mg/l, Kin, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7

Nodální segmenty, asi 1cm velké, byly umístěny do 100 ml Erlenmeyerovy baňky nebo do zkumavek, kultivovány 30 dnů a poté hodnoceny. Celý experiment byl prováděn za stále stejných světelných podmínek 300lx, časovou periodou 16/8 h a teplotou 25/20 °C.

Stadium III

V tomto stadiu by mělo dojít k přípravě na převod do přirozených podmínek. Tzn. ukončení tvorby rozmnožovacích částic, podpora prodlužování internodií u pupenů a tvorby kořenů. Rostliny tvořily kořeny spontánně, nicméně byly provedeny pokusy pro indukci kořenů vlivem auxinů (IAA a NAA) také v 6-ti variantách a kontrolní varianta

v čistém MS mediu bez růstových regulátorů. V každé variantě bylo kultivováno 20 segmentů.

- 1) MS, bez růstových regulátorů, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5.7, kontrolní medium
- 2) MS, 0,1 mg/l, NAA, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7
- 3) MS, 0,5 mg/l, NAA, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7
- 4) MS, 1,0 mg/l, NAA, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7
- 5) MS, 0,1 mg/l, IAA, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7
- 6) MS, 0,5 mg/l, IAA, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7
- 7) MS, 1,0 mg/l, IAA, sacharóza - 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5,7

Stadium IV

Koření rostliny byly přendány z MS media a zasazeny do zeminy s rašelinou a umístěny do skleníku s teplotou 23,6 °C a vlhkostí 67%.

Hodnocení výsledků: Ve stadiu II byl hodnocen vliv cytokininů pomocí procenta regenerace, počtu výhonů, průměrné délky výhonů, délky nejdelšího výhonu, počtu nodů a frekvence zakořenění. Ve stadiu III, kde byl zkoumán vliv auxinů, bylo hodnoceno frekvence zakořenění v %, počet kořenů, délka nejdelšího kořene a také procento regenerace, počet výhonů, průměrná délka výhonů, délka nejdelšího výhonu a počet nodů. Poté byly výsledky zpracovány do tabulky 1 pomocí programu Microsoft Word.

5 Výsledky a diskuze

Stadium I

Sterilizace v 70% etanolu po dobu 30-ti vteřin a poté v 1% NaClO po dobu 15 minut poskytla dobrou regeneraci explantátů (90%). Sterilizace po dobu 20 minut v 1% NaClO nebyla pro explantáty vhodná, meristémy explantátů zčernaly a následně uhynuly, a proto musela být doba sterilizace zkrácena na 15 min. Explantáty negativně reagovaly na delší dobu sterilizace jak v NaClO, tak i v etanolu.

Stadium II

Výsledky tohoto stadia (vlivu cytokyninů na regeneraci výhonků) jsou shrnuty v tabulce 1.

Z výsledků uvedených v tabulce 1 lze konstatovat, že růstové regulátory mají vliv na morfogenní odpověď nodálních kultur, zejména na délku výhonků, počet nově vytvořených nodů a zakořenění.

Z hlediska tvorby výhonů jsou výsledky srovnatelné, i když nejlepších výsledků bylo dosaženo v kontrolním mediu bez růstových regulátorů. Ale na tvorbu nových nodů a délku výhonů měly sledované růstové regulátory, cytokininy, velký vliv oproti kontrole. Průměrně nejvíce nodů ($1,46 \pm 1,17$) se tvořilo u nodálních segmentů pěstovaných na MS mediu s přídavkem 1,0 mg/l BAP a rovněž i nejdelší výhony ($1,40 \pm 1,04$ cm) se tvořily v této variantě. Při nižší a vyšší variantě BAP bylo dosaženo horších výsledků (obraz 5.).

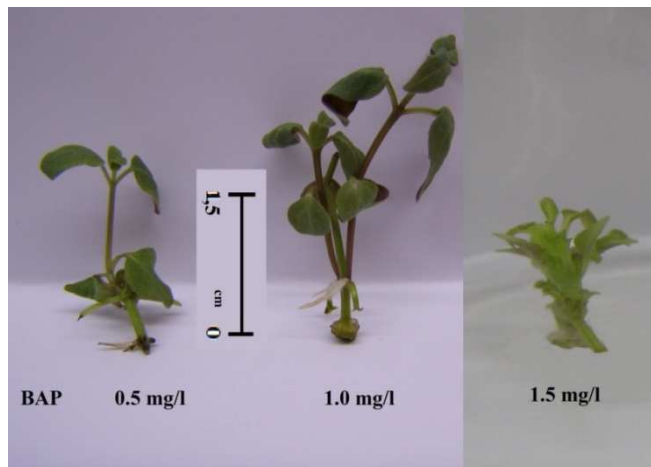
Vliv kinetinu (obraz 6.) byl také, oproti kontrole, pozitivní, hlavně ve vyšších koncentracích. Nejlepších výsledků ve všech sledovaných parametrech (počet výhonů, průměrná délka výhonu, délka nejdelšího výhonu a počet nodů) bylo dosaženo v kultivačním mediu s přídavkem 1,5 mg/l kinetinu. V porovnání vlivu BAP a kinetinu z hlediska počtu nově vzniklých nodů a průměrné délky výhonů se zdá být lepší BAP než kinetin, ale u nodálních kultur v kultivačním mediu s přídavkem BAP byla pozorována indukce kalusu, což je nežádoucí, pokud by cílem mikropropagace bylo získání uniformního materiálu, jelikož kalus (regenerace z kalusu) může vést k variabilitě

rostlinného materiálu (Pavlová, 1992). Z tohoto důvodu by bylo pro mikropropagaci zavínutky podvojně lepší do kultivačního media přidávat kinetin než BAP.

Tabulka 1. Hodnocení vlivu růstových regulátorů po 30-ti dnech kultivace

Konc. růstových regulátorů (mg/l)				Regenerace (%)	Počet výhonů (ks)	Průměrná délka výhonů (cm)	Nejdelší výhon (cm)	Počet nodů (ks)	Frekvence zakořenění (%)	Počet kořenů (ks)	Nejdelší kořen (cm)
Cytokininy		Auxiny									
BAP	Kin	IAA	NAA								
Kontr.				100	2,13±0,83	0,44±0,21	0,80	0,81±0,84	37	1,67±0,58	0,3
0,5				100	1,55±0,53	0,57±0,41	1,30	0,72±0,83	11		
1,0				100	1,90±0,57	1,40±1,04	3,60	1,46±1,17	50		
1,5				100	2,00±0,00	0,54±0,60	2,10	0,56±0,85	33		
	0,5			94	1,83±0,51	0,70±0,69	2,10	0,58±0,9	0		
	1,0			82	1,92±0,28	0,37±0,25	1,00	0,62±0,68	0		
	1,5			100	2,00±0,00	0,70±0,58	2,00	1,03±1,04	40		
		0,1		100	1,70±0,67	0,30±0,40	1,00	0,15±0,34	10	5,00±0,00	0,3
		0,5		82	1,67±0,71	0,34±0,21	0,70	0,67±0,97	0	0,00±0,00	0,0
		1,0		60	1,67±0,82	0,48±0,67	1,80	0,67±0,82	16	3,00±0,00	0,5
			0,1	75	2,26±0,70	0,42±0,40	1,70	0,73±1,08	53	,75±1,90	0,8
			0,5	40	2,25±0,50	0,50±0,28	0,90	1,13±0,85	50	4,50±0,70	0,4
			1,0	60	1,83±0,41	0,40±0,28	0,90	0,92±0,66	33	2,00±0,00	0,3

Pozn. U cytokininů byly hlavně sledovány parametry: počet výhonů, průměrná délka výhonů, délka nejdelšího výhonu a počet nodů. U auxinů byly hlavně sledovány parametry: frekvence zakořenění, počet kořenů a délka nejdelšího kořene.



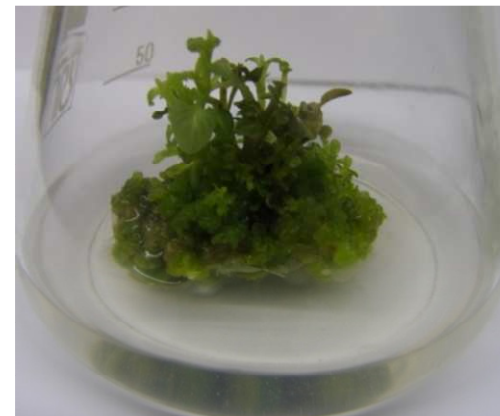
A) Vliv BAP po 30-ti dnech kultivace



B) Vliv BAP po 60-ti dnech kultivace



E) Kontrolní varianta v kultivačním mediu bez obsahu BAP. Výška 1,7 cm



C) Tvorba kalusu na variantě MS + BAP 1,0 mg/l



D) Detail indukce kalusu na mediu s obsahem BAP

Obraz 5. A-D: Regenerace rostlin z nodálních segmentů u zavinutky podvojně v kultivačním MS mediu s přidavkem BAP, E: kontrolní varianta



A) Vliv kinetinu po 30-ti dnech kultivace



B) Vliv kinetinu po 30-ti dnech kultivace



C) Kontrolní varianta v kultivačním mediu bez obsahu kinetinu.
Výška 1,7 cm

Obraz 6. A-B: Regenerace rostlin z nodálních segmentů u zavinutky podvojně v kultivačním mediu s obsahem kinetinu, C: kontrolní varianta

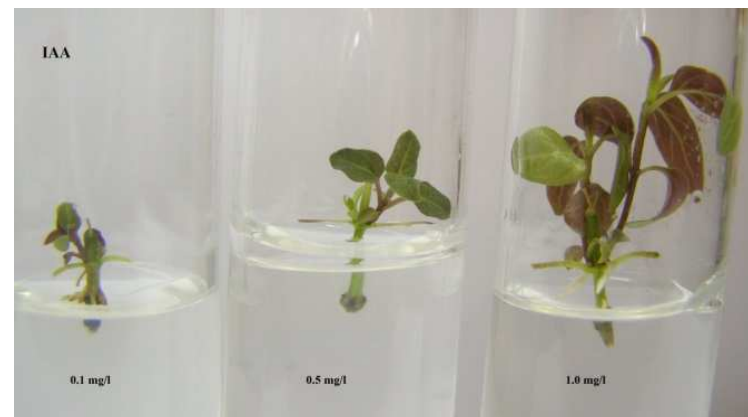
Stadium III

Výsledky tohoto stadia (vlivu citokyninů na regeneraci výhonků) jsou shrnuty v tabulce 1.

V kultivačním mediu s přídávkem BAP a kinetinu explantáty z nodálních kultur spontánně tvořily kořeny, nicméně lepších výsledků bylo dosaženo v kultivačních mediích s přídávkem auxinů, které podporují indukci kořenů. Nejvyšší frekvence zakořenění a počtu kořenů bylo dosaženo v mediu s přídávkem 0,1 mg/l NAA a to 53% a $2,75 \pm 1,90$. s vyšší koncentrací NAA byly výsledky frekvence kořenění a počet kořenů nižší (obraz 8.). Nodální kultury v mediu s přídávkem IAA (obraz 7) měly nižší frekvenci zakořenění i počet kořenů oproti kontrole. Výsledky ukazují, že pro indukci kořenů v in vitro kulturách je vhodné do media přidávat NAA než IAA, ale v nižších koncentracích.



A) Vliv kinetinu po 30-ti dnech kultivace



B) Vliv IAA po 30-ti dnech kultivace

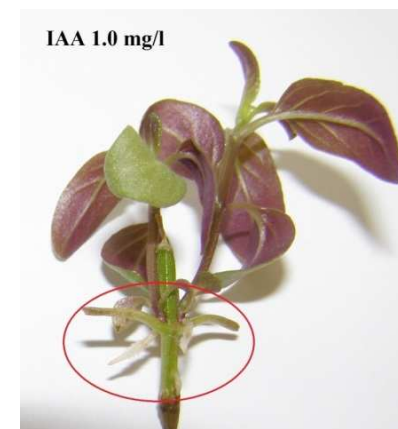


E) Kontrolní varianta v kultivačním mediu bez obsahu IAA.
Výška 1,7 cm

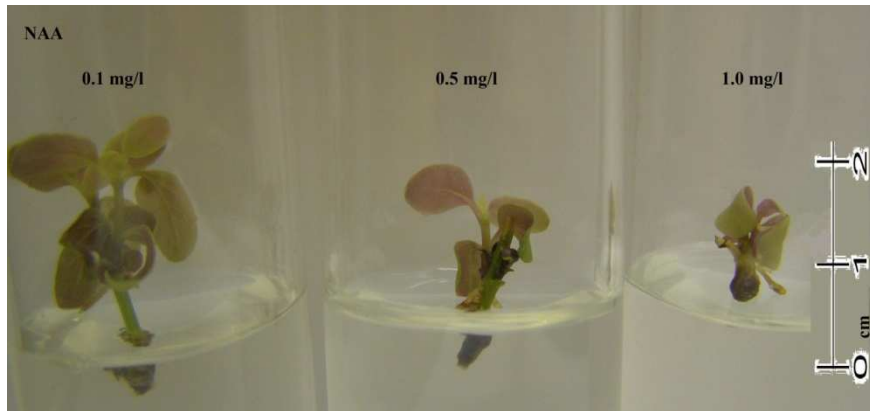
Obraz 7. A-D: Regenerace rostlin z nodálních segmentů u zavinutky podvojně v kultivačním mediu s obsahem IAA, E: kontrolní varianta



C) Detail indukce kořenů ve variantě MS + IAA 0,1 mg/l



D) Detail indukce kořenů ve variantě MS + IAA 1,0 mg/l



A) Vliv NAA po 30-ti dnech kultivace



D) Kontrolní varianta v kultivačním mediu bez obsahu NAA.
Výška 1,7 cm



B) Detail indukce kořenů ve variantě MS + NAA 0,1 mg/l

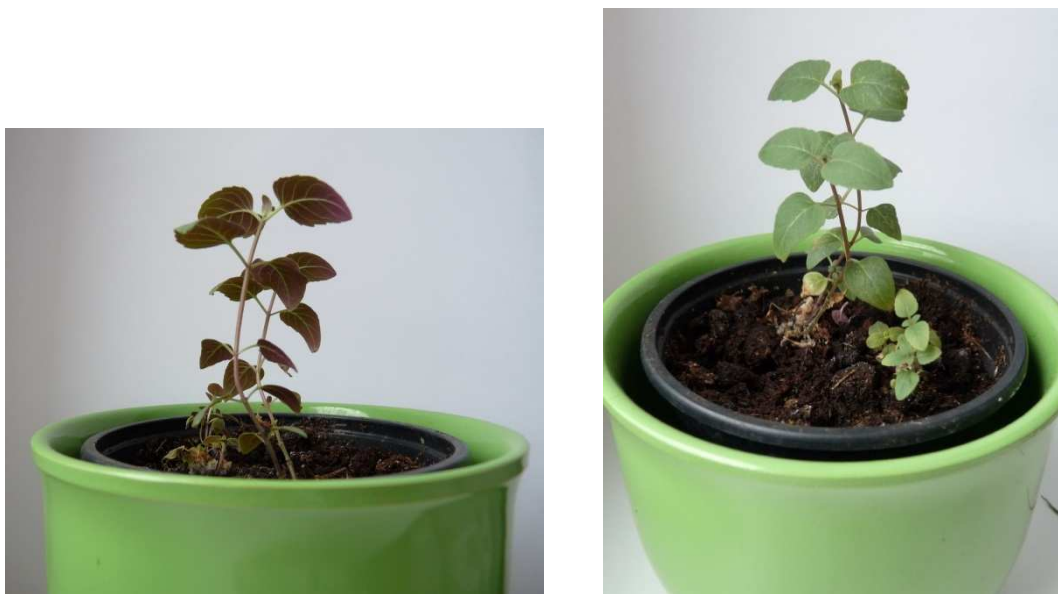


C) Detail indukce kořenů ve variantě MS + NAA 0,5 mg/l

Obraz 8. A-C: Regenerace rostlin z nodálních segmentů u zavínutky podvojně v kultivačním mediu s obsahem NAA, D: kontrolní varianta

Stadium IV

Převod do *ex vitro* podmínek byl úspěšný z 22% (obraz 9). Z celkem 36 převedených rostlin přežilo jen 8. Zde bude zapotřebí provést další důkladnější výzkum, aby se procento přežitých rostlin, převedených do *ex vitro* podmínek, zvětšilo, třeba různými koncentracemi substrátu.



Obraz 9. Úspěšné převedení do *ex vitro* podmínek po 17-ti dnech.

Dosažené výsledky (od získávání aseptické kultury až po převedení do *ex vitro* podmínek) v této práci jsou pro zavínutku podvojnou primární, protože v dostupné literatuře nejsou práce s mikropropagací tohoto druhu, ani pro rod *Monarda*, proto také výsledky nebyly diskutované s výsledky jiných autorů.

6 Závěr

Růstové regulátory mají vliv na morfogenní odpověď pěstovaných nodálních kultur v *in vitro* podmínkách.

Pro tvorbu **nadzemních částí** se jako nejlepší cytokinin projevil BAP, který ale podporuje tvorbu kalusu, což je z hlediska získání uniformní populace nežádoucí. Proto pro získání uniformní populace je lepší použití kinetinu, a to ve vyšších koncentracích.

Při **indukci kořenů** nejlepších výsledků dosáhl auxin NAA, který dosáhl nejvyšších hodnot v nejnižší koncentraci. Auxin IAA nepodpořil indukci kořenů. Při vlivu těchto auxinů docházelo i k dobré tvorbě nadzemních částí. Auxin NAA měl větší vliv na produkci nadzemních částí než IAA.

Výsledky získané v této práci bude nutné doplnit dalšími pokusy, kde do kultivačního media pro mikropropagaci zavínutky podvojně pomocí nodálních segmentů budou přidány cytokininy a auxiny dohromady, aby byl sledován vliv kombinace těchto dvou růstových regulátorů na morfogenní odpověď při mikropropagaci zavínutky nodální kulturou. Na příklad bych doporučila kombinaci koncentrací, kde bylo dosaženo nejlepších výsledků: 1,0 mg/l BAP + 0,1 a 0,5 mg/l NAA a také 1,5 KIN + 0,1 a 0,5 mg/l NAA.

7. Použitá literatura

- Egler F.E. 1973.** The Hybrid Nature of „*Monarda media* Willd“. Southern Appalachian Botanical Society, 38 (3): 209-214.
- Garland S. 1979.** The complete book of herbs and spices. New York. Viking Press. 288 pp.
- Gill L.S. 1976.** A cytosystematics study of the genus *Monarda* L. (Labiatae) in Canada. University of Benin. Nigeeria (Benin city).
- Gleason H., Cronquist A. 1991.** Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada. New York. New York Botanical Garden, 910 pp.
- Goode J. 1984.** Bee balm. Amer. Hortic. 63(6): 25
- Hayward G. 1983.** Bee balm. Horticulture 51(7): 16-19.
- Kováč J. 1995.** Explantátové kultury rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. 142 s.
- Kublick L. 1990.** The prairie herb garden. Saskatoon. Western Producer Prairie Books. 141 pp.
- Leslie's A. 1992.** *Monarda*. The Garden, 117 (1): 30-31.
- Lima P. 1986.** The Harrowsmith illustrated book of herbs. Camden East. Camden House Publishing Ltd. 175 pp.
- Linnaeus C. 1753.** Species plantarum. Vol. 1. Stockholm.
- McClintock E., Epling C. 1942.** A review of the genus *Monarda* (Labiatae). University of California Publications in Botany, 20 (2): 147-194.
- Rausch A., Lotz B. 2005.** Lexikon bylinek: pěstování, kuchyně, kosmetika, zdraví. Čestlice. Rebo, 301s.
- Page M. 1980.** The Observer's book of herbs. London. F. Warne. 184 pp.
- Pavlová L. 1992.** Kultury rostlin *in vitro*. Česká zemědělská univerzita v Praze. Agronomická fakulta. Nepublikovaná skripta.
- Prather L.A, Monfils A.K., Posto A.L., Williams R.A. 2002.** Monophyly and Phylogeny of *Monarda* (Lamiaceae): Evidence from the Internal Transcribed Spacer (ITS) Region of Nuclear Ribosomal DNA. Systematic Botany, 27 (1): 127-137.
- Scora R.W. 1966.** The nature of the inflorescence of *Monarda* (Labiatae). Torrey Botanical Society. 93 (3): 175-180.

- Scora R.W. 1967.** Study of the essential leaf oils of the genus *Monarda* (Labiatae). *American Journal of Botany*, 54 (4): 446-452.
- Small E. 2006.** Velká kniha koření, bylin a aromatických rostlin. Praha. Volvox Globator, 1021 s.
- Táborský J., Kunt M., Klouček P., Lachman J., Zelený V., Kokoška L. 2012.** Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, and Ranunculaceae families. *Central European Journal of chemistry*, 10 (6): 1899-1906.
- Whitten W.M. 1981.** Pollination Ecology of *Monarda didyma*, *M. clinopodia*, and Hybrids (Lamiaceae) in the Southern Appalachian Mountains. *American Journal of Botany*, 68 (3): 435 – 442.

8. Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1.: Procentuální složení listového oleje u některých taxonů rodu *Monarda*

Příloha 2.: Maximální obsah DTQ, THQ a TQ v analyzovaných rostlinných částech

Příloha 3.: Přehled druhů rodu *Monarda*

Příloha 1. Procentuální složení jednotlivých složek parou destilovaných vzorků listového oleje v několika taxonech rodu *Monarda*, Scora (1967)

Component No.	Tentative identification	Relative retention time range	T a x a ^a																		
			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s
1	acetone	t	0.16
2	α -pinene	0.26-0.31	0.14	0.65	3.10	1.96	2.23	0.62	5.88	2.15	2.11	0.93	2.78	2.45	2.31	t	1.57	1.73	6.58	0.25	2.14
3	camphene	0.36-0.40	0.88	2.76	0.21	0.16	0.07	2.76	0.20	0.21	0.10	t	0.20	0.21	0.33	0.22	3.60	0.06	0.25
4	β -myrcene	0.41-0.48	0.10	4.88	0.12	0.16	0.21	t	0.16	0.14
5	ketone	0.49-0.53	0.61	1.39	5.50	2.52	2.18	1.66	3.53	2.18	2.13	2.49	2.60	2.10	0.03	2.57	0.38	10.21	1.52	2.55
6	phellandrene	0.54-0.62	1.20	3.08	1.74	3.89	3.49	2.52	1.56	5.03	6.98	2.60	0.21	4.03	2.50	0.90	3.10
7	β -limonene	0.63-0.69	1.04	2.87	12.93	3.37	0.80	0.97	1.38	0.94	0.84	0.50	0.80	0.80	9.58	0.90	0.89
8	γ -terpinene	0.71-0.76	1.40	2.10	0.66	0.27	21.61	0.26	0.12	0.11	t	0.47	0.29
9	1, 8 cineole	0.78-0.86	3.25	13.83	27.36	11.53	10.83	4.07	9.05	16.15	4.78	5.38	9.42	9.96	3.73	0.08	7.33	19.73	22.88	0.85	6.14
10	p-cymene	1.00	9.23	2.18	12.24	7.54	7.70	12.42	33.16	14.37	13.15	9.92	5.56	9.76	9.45	0.57	11.28	0.69	0.65	8.59	10.38
11	3, octyl acetate	1.64-1.96	4.61	3.33	1.09	0.71	0.41	0.52	0.68	0.10	0.7ř	0.24	0.47	0.34	1.01	2.75	0.26	0.97
12	3, octanol	1.98-2.28	14.98	6.63	2.40	4.17	4.78	5.34	1.48	2.27	0.93	1.44	1.09	2.67	1.47	1.69	0.25	0.48	1.24	2.01
13	furfural	2.28-2.61	2.18	0.52	0.30	0.50	t	0.12
14	linalool	2.82-3.31	1.50	2.16	0.57	0.31	0.30	0.65	0.50	t	0.47
15	isomenthone	3.36-3.67	2.07	0.40	0.47	0.18	0.24	t	t	...	0.30	0.81	0.42	0.34
16	linalyl acetate	3.90-4.03	5.57	4.50	5.06	0.98	t	0.26	1.23	0.49	0.65	0.24	t
17	nonyl acetate	4.04-4.11	0.61	0.11	0.21
18	isopulegol	4.12-4.17	2.03	0.28	0.33	0.98	0.27

Component No.	Tentative identification	Relative retention time range	T a x a ^a																		
			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s
19	bornyl acetate	4.20-5.24	6.14	7.74	2.52	5.42	2.56	3.50	2.43	0.62	11.33	0.16	1.54	0.66	0.14	0.45	0.44	0.30	0.48	1.85
20	alcohol	5.26-6.08	2.68	3.85	4.22	0.42	0.47	3.56	0.75	0.88	0.85	0.69	0.52	0.71	0.41	0.14	0.54	6.31	0.86	0.59
21	dihydrocarveyl acetate	6.21-6.94	3.48	0.46	0.71	t	0.97	0.12	0.16	0.08	t	0.32	0.27	0.71	15.06	0.11	t
22	pulegone	7.39-7.61	4.99	1.40	1.21	0.37	0.83	8.89
23	α -terpineol	7.75-8.31	18.02	4.34	4.20	0.50	0.20	10.69	0.30	0.31	0.08	t	0.32	0.27	0.71	15.06	0.11	t
24	neral, dihydrocarveol	8.49-8.87	0.54	1.01	0.52
25	geranial, ciscarveyl acetate	9.10-9.50	5.70
26	thymol	33.8-37.5	17.52	18.46	60.38	67.26	50.29	22.04	72.04	29.97	75.03	92.11	64.67	68.18	20.10	83.37	62.69
27	carvacrol	38.2-42.1	5.28	39.09	2.43	70.24	41.69	32.76	4.66	4.66	3.16

^a *Monarda russeliana*^b *M. clinopodia*^c *M. didyma*^d *M. media*^e *M. fistulosa* var. *monillis*^f *M. fistulosa* var. *brevis*^g *M. fistulosa* (Arkansan Segregate)^h *M. fistulosa* var. *menthifolia*ⁱ *M. lindheimeri*^j *M. punctata* var. *punctata*^k *M. p.* var. *villicaulis*^l *M. p.* var. *arkansana*^m *M. p.* var. *intermedia*ⁿ *M. p.* var. *coryi*^o *M. p.* var. *fruticulosa*^p *M. p.* var. *lasiodonta*^q *M. p.* var. *maritima*^r *M. citriodora* var. *citriodora*

Příloha 2. Maximální obsah dithymochinonu (DTQ), thymohydrochinonu (THQ) a thymochinonu (TQ) v analyzovaných rostlinných částech, Táborský et.al (2012)

Family/Species (voucher specimen number)	Part of plant	NP ¹⁾	Content (mg kg ⁻¹ of dried weight)			Note
			DTQ	THQ	TQ	
<i>Laminaceae</i>						
<i>Monarda didyma</i> L., chemotyp 1 (TB-005)	Aerial part	1	128	1811	3029	major component carvacrol
<i>Monarda didyma</i> L., chemotyp 2 (TB-035)	Aerial part	1	50	2409	3425	major component thymol
	Inflorescence		58	2522	3564	
	Leaf		nd ²⁾	466	821	
	Stem		nd	nd	23	
<i>Monarda didyma</i> L. 'Pink Lace' (TB-037)	Aerial part	1	nd	587	670	
<i>Monarda media</i> Wild. (TB-072)	Aerial part	1	34	2674	2995	
<i>Monarda menthifolia</i> Graham (TB-073)	Aerial part	1	nd	835	1381	

¹⁾ number of population, ²⁾ not detected (< 1 mg kg⁻¹)

Příloha 3. Přehled druhů rodu *Monarda*

TABLE 1. Species of *Monarda* and related genera included in the analyses. The sample designation, ITS type, herbarium voucher, location of geographic origin, and GenBank accession number of the associated sequence are provided. An ITS 'type' is a set of redundant sequences (i.e. those that are identical except for missing or ambiguous sites). Each specimen indicated with a dagger (†) is the specimen chosen to represent the type in the parsimony analyses. Three unique cloned sequences were obtained from the specimen marked with an asterisk (*).

Species	Sample	ITS type	Voucher	Location	GenBank accession number
SUBGENUS MONARDA					
<i>M. bartlettii</i> Standl.		Unique	<i>G. L. Nesom 6102</i> (TEX)	MEXICO: Tamaulipas, Mpio. San Carlos	AF369191
<i>M. bradburiana</i> L. C. Beck	A	I	<i>L. A. Prather 1821</i> (MSC)	Arkansas: Garland Co.	AF369192
	B	I	<i>L. A. Prather 1886</i> (MSC)	Missouri: St. Louis Co.	AF369193
<i>M. clinopodia</i> L.	A	III†	<i>L. A. Prather 1868</i> (MSC)	Ohio: Washington Co.	AF369190
	B	II	<i>L. A. Prather 1872</i> (MSC)	West Virginia: Pendleton Co.	AF369189
<i>M. didyma</i> L.	A	I†	<i>L. A. Prather 1876</i> (MSC)	West Virginia: Preston Co.	AF369194
	B	I	<i>L. A. Prather 1871</i> (MSC)	West Virginia: Randolph Co.	AF369195
<i>M. eplingiana</i> Standl.		Unique	<i>J. Henrickson 11450</i> (LL)	MEXICO: Coahuila, Sierra del Carmen.	AF369196
<i>M. fistulosa</i> L.	A	I	<i>L. A. Prather 1837</i> (MSC)	Texas: Leon Co.	AF369197
	B	III	<i>L. A. Prather 1866</i> (MSC)	Michigan: Barry Co.	AF369198
	C	III†	<i>G. N. Jones 33772</i> (MSC)	Colorado: Boulder, Co.	AF369199
	D	III	<i>L. A. Prather 1877</i> (MSC)	West Virginia: Taylor Co.	AF369200
	E	IV†	<i>L. A. Prather 1851</i> (MSC)	Texas: Harris Co.	AF369204
<i>M. lindheimeri</i> Engelm. & A. Gray	A	IV†	<i>L. A. Prather 1851</i> (MSC)	Texas: Harris Co.	AF369204
	B	I	<i>L. A. Prather 1812</i> (MSC)	Texas: Grayson Co.	AF369201
	C	I	<i>L. A. Prather 1835</i> (MSC)	Texas: Anderson Co.	AF369202
	D	IV	<i>L. A. Prather 1846</i> (MSC)	Texas: Brazos Co.	AF369203
	E	I	<i>L. A. Prather 1812</i> (MSC)	Texas: Grayson Co.	AF369205
	F	I	<i>L. A. Prather 1848</i> (MSC)	Texas: Grimes Co.	AF369206
<i>M. pringlei</i> Fernald	A	V†	<i>I. W. Knobloch 1988</i> (MSC)	MEXICO: Nuevo Leon, Chipinque Mesa.	AF369208
	B	V	<i>G. B. Hinton 24110</i> (TEX)	MEXICO: Nuevo Leon, Cola de Caballo.	AF369207
<i>M. russelliana</i> Nutt. ex Sims	A	Unique	<i>L. A. Prather 1824</i> (MSC)	Arkansas: Sevier Co.	AF369186
	B	Unique	<i>L. A. Prather 1831</i> (MSC)	Oklahoma: McCurtain Co.	AF369187
	C	Unique	<i>L. A. Prather 1814</i> (MSC)	Texas: Fannin Co.	AF369188
<i>M. stipitatoglandulosa</i> Waterf.	A	I	<i>L. A. Prather 1823</i> (MSC)	Arkansas: Montgomery Co.	AF369209
	B	I	<i>L. A. Prather 1915</i> (MSC)	Arkansas: Perry Co.	AF369210
SUBGENUS CHEILYCTIS					
SECTION CHEILYCTIS					
<i>M. fruticulosa</i> Epling		VI	<i>L. A. Prather 1860</i> (MSC)	Texas: Jim Hogg Co.	AF369185
<i>M. punctata</i> L.	A	Unique	<i>C. L. Lundell 15109</i> (MICH)	Texas: Travis Co.	AF369183
	B	VI†	<i>L. A. Prather 1862</i> (MSC)	Texas: McMullen Co.	AF369182
	C	VI	<i>L. A. Prather 1833</i> (MSC)	Texas: Anderson Co.	AF369181
	D	VI	<i>L. A. Prather 1843</i> (MSC)	Texas: Bastrop Co.	AF369184
<i>M. viridissima</i> Correll		Unique	<i>P. A. Fryxell 4965</i> (TEX)	Texas: Lavaca Co.	AF369180
SECTION ARISTATAE					
<i>M. critiodora</i> Cerv. ex Lag.	A	Unique	<i>L. A. Prather 1813</i> (MSC)	Texas: Grayson Co.	AF369175
	B	VII	<i>L. A. Prather 1847</i> (MSC)	Texas: Brazos Co.	AF369176

TABLE 1. Continued.

Species	Sample	ITS type	Voucher	Location	GenBank accession number
<i>M. clinopodioides</i> A. Gray <i>M. pectinata</i> Nutt.*	C	VIII†	L. A. Prather 1809 (MSC)	Texas: Coryell Co.	AF369177
	D	VII	L. A. Prather 1854 (MSC)	Texas: Refugio Co.	AF369179
	E	Unique	L. A. Prather 1809 (MSC)	Texas: Coryell Co.	AF369178
	F	Unique	R. W. & J. R. Matthews 495 (MSC)	Arizona: Santa Cruz Co.	AF369170
		Unique	L. A. Prather 1802 (MSC)	Texas: Llano Co.	AF369171
		Unique*	R. Dorn 5439 (RM)	Wyoming: Goshen Co.	AF369172, AF369173, AF369174
RELATED GENERA					
<i>Blephilia ciliata</i> Raf.			K. Rathmann 2324 (MSC)	Wisconsin: Waukehsa Co.	AF369167
<i>Blephilia hirsuta</i> Benth.			L. A. Prather 1870 (MSC)	Ohio: Washington Co.	AF369168
<i>Clinopodium coccineum</i> Kuntze			J. A. Churchill 86203 (MSC)	Alabama: Baldwin Co.	AF369164
<i>Conradina etonia</i> Kral & McCartney			J. A. Churchill 91-200 (MSC)	Florida: Volusia Co.	AF369165
<i>Hesperozygis spathulata</i> Epling			P. Dusén 15165 (MSC)	BRAZIL: Paraná; Serrinha.	AF369166
<i>Monardella linoides</i> A. Gray			Wallace 638 (MSC)	California: Riverside Co.	AF369163
<i>Pycnanthemum californicum</i> Torr. ex Dur-Duq			A. S. Barclay, et al. 1513 (MSC)	California: Plumas Co.	AF369169
<i>Ziziphora hispanica</i> L.			D. Sánchez-Mata & R. Gavilán 100 (MSC)	SPAIN: Madrid, Entre Aranjuez y Valdelagua, base del cerro Cavina.	AF369162
<i>Mentha rotundifolia</i> Huds.			W. D. Stevens 1525 (MSC)	California: Trinity Co.	AF369161
<i>Thymus mastichina</i> L.			M. Ladero s.n. 16 May 1969 (MSC)	SPAIN: La Jara-Las Villuercas, Encinar aclarado de Hojaranzo.	AY029168