

Mendelova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta v Lednici

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Ověření pravosti označení taxonů rodu *Origanum* L.

pomocí metod GC-MC a AFLP

Vedoucí diplomové práce

Ing. Jarmila Neugebauerová, Ph.D.

Vypracovala

Bc. Lucie Hradská

Lednice 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Ověření pravosti označení taxonů rodu *Origanum* L. pomocí metod GC-MC a AFLP vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne:

.....

Poděkování

Rada bych poděkovala Ing. Neugebaurové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a informace při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat za velkou pomoc Ing. Čechové a Mrg. Raddové, Ph. D. při praktickém i odborném zpracování metody AFLP. Moje poděkování patří Ing. Kumštovi, který zpracovával metodu GC-MC. Paní Paulínové, laborantce na ústavu zelinářství a květinářství ZF MENDELU, za vedení a pomoc v laboratoři.

Velký dík patří mé rodině, především rodičům, kteří mi umožnili studovat a podporovali mě po celý čas studia. Také děkuji příteli, který to se mnou vydržel a podporoval mě. Dále chci poděkovat přátelům za jejich pomoc při zpracování, kontrole této práce i při studiu.

Obsah

1 ÚVOD	6
2 CÍL PRÁCE	7
3 LITERÁRNÍ ČÁST	8
3.1 Charakteristika rodu <i>Origanum L.</i>	8
3.2 Charakteristika druhu <i>Origanum vulgare L.</i>	13
3.2.1 Botanický popis <i>Origanum vulgare L.</i>	14
3.2.2 Využití dobromysli	16
3.3 Fenologické fáze taxonů	18
3.4 Okrasné taxony rodu <i>Origanum L.</i>	21
3.5 Pěstování dobromysli	24
3.6 Sběr a úprava rostlin	26
3.7 Origaní herba	28
3.8 Obsahové látky	29
3.9 Metody stanovení obsahových látek	34
3.9.1 Stanovení obsahu silice	34
3.9.2 Kvalitativní hodnocení silic	36
3.10 Molekulární metody vhodné pro studie genetických vztahů	38
4 MATERIÁL A METODY	43
4.1 Charakteristika pokusného stanoviště	43
4.2 Rostlinný materiál	44
4.3 Metodika	46
4.3.1 Hodnocení morfologických znaků.....	46
4.3.2 Hodnocení fenologických fází.....	46
4.3.3 Sběr, sušení a úprava vzorků	46
4.3.4 Stanovení silic v rostlinných drogách.....	47
4.3.5 Stanovení genetických profilů pomocí metody AFLP	48
5 VÝSLEDKY	58
5.1 Hodnocení morfologických znaků	58
5.1.1 Hodnocení výšky rostlin	58

5.1.2	Hodnocení délky a šířky listové čepele	59
5.1.3	Hodnocení délky květenství	60
5.1.4	Hodnocení barvy listů a květů	61
5.2	Hodnocení fenologických fází.....	63
5.3	Hodnocení stanovení obsahu silice.....	63
5.4	Hodnocení stanovení složek silic	66
5.5	Hodnocení genetických profilů pomocí metody AFLP	69
6	DISKUSE.....	72
7	ZÁVĚR.....	78
8	SOUHRN A RESUME, KLÍČOVÁ SLOVA.....	80
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	81
10	PŘÍLOHA	95

1 Úvod

Taxonomie z řeckého *taxis* = uspořádání a *nomos* = zákon. Je systém klasifikace v metodologii vědy, který vymyslel švédský biolog a lékař Carl Linnaeus (1707 - 1778). Tento je považován za zakladatele moderní taxonomie, jeho knihy představují počátek moderní botanické a zoologické nomenklatury. Vypracoval pravidla pro přidělování jmen rostlin a zvířat, jako první používal binomické názvosloví (1758). Je představitelem hierarchie rozdělení na třídu, řád, čeleď, rod a druh. Hlavním úspěchem v jeho době byla identifikace rostlin a zvířat podle proveditelného klíče (Cain, 2014).

U rodu *Origanum L.* je taxonomie poměrně komplikovaná a dodnes není úplně jasná. Za uplynulých 150 let bylo přidělených více než 300 vědeckých názvů méně než 70 uznávaným druhům, poddruhům, varietám a hybridům (Peter, 2004).

K identifikaci taxonů lze kromě morfologických znaků využít i laboratorní metody. Níže budou popsány dvě z nich.

První metoda stanovuje obsah silice v jednotlivých vzorcích pomocí **GC-MC** (Gas Chromatography Mass Spectrography), což je v překladu plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Po vyhodnocení je možné porovnat příbuznost těchto vzorků.

Tato analytická metoda propojuje vlastnosti plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie a používá se na identifikaci složitých látek (Klouda, 2003; Sommer, 2000).

Druhá metoda využívá nejnovější molekulární metodu, pomocí které lze určit rodokmen, rodičovské analýzy, genetickou rozmanitost a mnoho dalšího.

Metoda **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism) prošla dlouhou cestou vývoje a technických pokroků od svého zveřejnění v roce 1995 (Vos, *et al.*, 1995), k její dnešní podobě využívané při generování a analýze výchozích dat. AFLP se stala vhodnou metodou pro určení rostlin, zvířat, hub a bakterií, která se využívá v oblastech genetiky, evoluce a ekologie. Touto metodou ověřujeme pravost označení taxonů (Bensch, Akesson, 2005).

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce byl popis sortimentu rodu *Origanum* L. (dobromysl) kultivovaného na experimentálních plochách ZF MENDELU a vyhodnocení z hlediska morfologie, fenologických fází a obsahových látek.

Ověření pravosti označených taxonů se hodnotilo na odebraných vzorcích metodou AFLP. Z odebraných vzorků natí dobromysli se stanovilo množství silice metodou CG-MC.

Výsledky hodnocení bylo nutné odevzdat v roce 2014 a sestavit seznam identifikovaných taxonů pro potřeby založení kolekce dokladových rostlin.

3 Literární část

3.1 Charakteristika rodu *Origanum* L.

Rod *Origanum* L. z čeledi *Lamiaceae* (hluchavkovité) zahrnuje více než 40 druhů a odrůd. Z toho 20 druhů se nachází ve Středomoří a na Blízkém východě. Rod je rozšířen především v mírném pásmu a subtropích Euroasie, v celém Středomoří až po Indii. Vyskytuje se téměř po celé Evropě, Malé Asii, Sibíři a Himalájí. V oblasti mezi Tureckem a Iránem není zcela jasné, zda jeho výskyt je zde původní nebo druhotný. *Origanum* L. je považováno ze 70 % za endemický druh, tedy druh s rozšířením v určitém omezeném území, například hora nebo ostrov. Zavlečený je také do Severní Ameriky a Číny (Ietswaart, 1980).

Zástupci tohoto rodu se používají v potravinářství jako kořeninové a aromatické rostliny, které mají pozitivní účinky na lidské zdraví. Pro tuto vlastnost je tento rod využíván ve farmacii a léčitelství (Meyers, 2005).

Rod *Origanum* L. zahrnuje jak vytrvalé byliny, tak polokeře s přímými lodyhami, obvykle chlupatými a pokrytými přisedlými siličnými žlázkami. Listy jsou celokrajné, nebo jen mělce po okraji vroubkované. Květenství tvoří chocholík shlukující se do krátkých vrcholových lichoklasů nebo hlávek. Květy jsou oboupohlavné nebo jen samičí na oddělených rostlinách. Kalich je zvonkovitě trubkovitý, obvykle třináctižilný, v ústí s výrazným prstencem štětinatých chlupů. Koruna je mírně dvoupyská s horním pyskem rovným. Tyčinky jsou čtyři, lysé s téměř kulovitými prašníky. Bliznová ramena jsou mírně nestejně dlouhá. Tvrdky jsou obvejčité, hladké (Ietswaart, 1980).

Roste na výslunných stráních, ve světlých lesích, křovinách i na vyhrátých mýtinách, u lesních cest, na železničních náspech (Kresánek, Krejča, 1982). Vyskytují se od nížin až do hor (0 - 4000 m. n. m.), nejvhodnější nadmořská výška je v rozmezí 1200 - 1500 m, kde roste v otevřených jehličnatých lesích nebo v lesích smíšených, v částečném stínu. Nejčastější výskyt je na vápenatých podložích, méně často na nevápenitých půdách (Ietswaart, 1980)

Rozdělení rodu *Origanum* L.

Ietswaart (1980) popsal 38 druhů. Kvůli velké variabilitě morfologických znaků u jednotlivých druhů rodu *Origanum* L. ji rozdělil do 10 sekcí a 3 neformálních skupin. Tyto sekce lze chápat jako skupiny příbuzných druhů, které mají více společných morfologických znaků mezi sebou. V současném systému jsou sekce rozděleny podle tvaru a velikostí trichomů, braktejí, kalichů a korunních lístků. Jedná se o tyto sekce:

I. Sekce *Amaracus* Benth

Skládá se ze sedmi druhů, které mají omezený výskyt na východní oblast Středozemního moře. Tyto druhy jsou charakteristické především fialovým zbarvením listenů a jedno- či dvou- pyskými kalichy bez zubů.

1. *O. boissieri* Ietswaart - Turecko
2. *O. calcaratum* Jussieu - Řecko
3. *O. cordifolium* Vogel - Kypr
4. *O. dictamnus* L. – Řecko (Kréta)
5. *O. saccatum* Davis - Turecko
6. *O. solymicum* Davis - Turecko
7. *O. symes* Carlström - Řecko

II. Sekce *Anatolicon* Benth

Tato sekce se skládá z osmi druhů. Vyskytuje se pouze na omezených územích, jako je Řecko, Malá Asie, Libanon a Libye. Kalich je dvoupyský, pěticipý.

1. *O. akhdarensense* Ietswaart et Boulos - Libye
2. *O. cyrenaicum* Beguinot et Vaccari - Libye
3. *O. hypericifolium* Schwarz et Davis - Turecko
4. *O. libanoticum* Boissier - Libanon
5. *O. scabrum* Boissier et Heldreich - Řecko
6. *O. sipyleum* L. - Řecko
7. *O. vetteri* Briquet et Barbey – Řecko
8. *O. pampaninii* (Brullo et Furnari) Ietswaart - Libye

III. Sekce *Brevifilamentum* Ietswaart

Tato sekce obsahuje šest druhů, které se vyskytují endemicky ve východní části Turecka. Tyto druhy jsou charakterizovány dvoupyskými kalichy a tyčinkami výrazně nestejných délek. Dvě horní tyčinky jsou velmi krátké a přirůstají ke koruně.

1. *O. acutidens* Ietswaart - Turecko
2. *O. bargyli* Mouterde – Sýrie, Turecko
3. *O. brevidens* Dinsmore - Turecko
4. *O. haussknechtii* Boissier - Turecko
5. *O. leptocladum* Boissier - Turecko
6. *O. rotundifolium* Boissier – Turecko

IV. Sekce *Longitubus* Ietswaart

Existuje jen jeden druh nalezen na několika místech v pohoří Amanus, které se nachází v jižním Turecku. Je pro něj typický mírně dvoupyský kalich. Pysky na koruně jsou téměř v pravém úhlu k nitkám tyčinek.

1. *O. amanum* Post - Turecko

V. Sekce *Chilocalyx* Ietswaart

Tato sekce se skládá ze čtyř druhů, které pochází z jižní Malé Asie nebo z ostrova Kréta. Rostliny mají kalich dvoupyský, nápadně chlupatý.

1. *O. bilgeri* Davis - Turecko
2. *O. micranthum* Vogel - Turecko
3. *O. microphyllum* Vogel – Řecko (Kréta)
4. *O. minutiflorum* Schwarz et Davis - Turecko

VI. Sekce *Majorana* Bentham

Sekce se dělí na tři druhy s charakteristickými zelenými listeny a kalichy. *O. syriacum* se dále dělí na tři geograficky odlišné typy. Liší se oděním (chlupy) a tvarem listů.

1. *O. majorana* L. – Kypr, jižní Turecko, Středozeří
2. *O. onites* L. – Řecko, Sicílie (Itálie), Turecko
3. *O. syriacum* L. var. *syriacum* – Izrael, Jordán, Sýrie

var. *bevanii* Ietswaart – Kypr, Sýrie, Turecko, Libanon

VII. Sekce *Campanulicalyx* Ietswaart

Šest místních endemických druhů patří do této sekce. Kalichy těchto rostlin mají 5 téměř rovných zubů a jsou zvonkovité.

1. *O. dayi* Post – Izrael
2. *O. isthmicum* Danin – Jižní Sinaj
3. *O. ranonense* Danin – Izrael
4. *O. petraeum* Danin – Jordán
5. *O. punonense* Danin – Jordán
6. *O. jordanicum* Danin & Künne - Jordán

VIII. Sekce *Elongatispica* Ietswaart

Skládá se ze tří endemických druhů severní Afriky, které se vyznačují trubkovitými kalichy s 5 rovnými zuby.

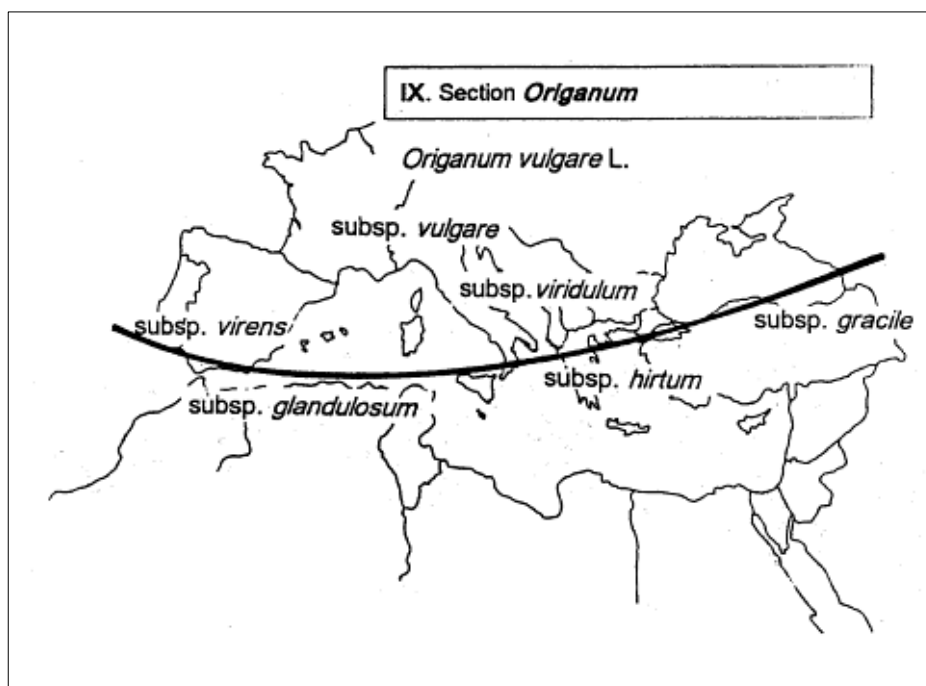
1. *O. elongatum* (Bonnet) Emberger et Maire - Maroko
2. *O. floribundum* Munby - Alžírsko
3. *O. grosii* Pau et Font Quer ex Ietswaart - Monako

IX. Sekce *Origanum*

Jedná se o specifickou sekci, která se skládá z poddruhů *O. vulgare*, s širokým výskytem v Euroasii a severní Africe. Lidská populace rozšířila tento druh také do Severní Ameriky. Šest poddruhů této sekce se liší v počtu přisedlých žláz na listu, velikostí a barvou listenů a květů. Tři poddruhy nejbohatší na silice jsou rozšířeny v nejjihnějších oblastech, v severních částech najdeme spíše druhy s nízkým obsahem silic (Obr. 1).

1. *O. vulgare* L. subsp. *vulgare* – Evropa, Irán, Indie, Čína
2. *O. vulgare* L. subsp. *glandulosum* Ietswaart - Tunisko, Alžírsko
3. *O. vulgare* L. subsp. *gracile* Ietswaart – Afghánistán, Irán, Turecko,
Ukrajina
4. *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* Ietswaart – Albánie, Chorvatsko, Řecko,
Turecko
5. *O. vulgare* L. subsp. *viridulum* Nyman – Afghánistán, Čína,
Chorvatsko, Francie, Řecko, Indie, Irán, Itálie, Pakistán

6. *O. vulgare* L. subsp. *virens* Ietswaart – Azory, Baleáry, Kanárské ostrovy, Madeira, Maroko, Portugalsko a Španělsko, (Ietswaart, 1980).



Obrázek č. 1 Zjednodušená mapa šesti subspécií *Origanum vulgare* (Kokkini, 1996)

X. Sekce *Prolaticorolla* Ietswaart

Skládá se ze tří endemických druhů na východní nebo západní části Středomořího moře. Tyto druhy jsou charakteristické hustými trny a trubkovitými kalichy.

1. *O. compactum* Bentham – Maroko, Španělsko
2. *O. ehrenbergii* Boissier - Libanon
3. *O. laevigatum* Boissier – Turecko, (Ietswaart, 1980).

Rozdělení do neformálních skupin podle Ietswarta:

- I. skupina – kalich s pěti téměř stejnými zuby, do této skupiny patří *Origanum vulgare* L.
- II. skupina – kalich nestejně laločnatý, se dvěma zvětšenými pysky a malými, listům podobnými braktejemi, do této skupiny patří *Origanum onites* L., *Origanum microphyllum* VOGEL, *Origanum majorana* L.
- III. skupina – nestejně laločnaté kalichy a velké blanité brakteje, druhy této skupiny byly dříve zařazeny do rodu *Amaracus* GLED, (Skoula, Herborne, 2002).

Hybridizace a chromozómová čísla

Hybridizace v čeledi *Labiaceae* nebyla považována za zcela obvyklou. V době Davise (1949) bylo určeno jen 7 hybridů mezi druhy rodu *Origanum*. Dnes jich je známo mnohem více. Hybridy se podobají rodičům hlavně svým habitem. Velmi často se odlišují ve velikosti, tvaru a barvě braktejí, kalichu či koruny. U hybridů mohou být tyčinky rozlišné buď normálně vyvinuté, nebo nevyvinuté. Tento fakt souvisí s produkcí pylu, která může být v malém množství nebo bez pylu. Další související fakt je neproduktivita životaschopných semen (Ietswaart, 1980).

Z mnoha výzkumů nebyly zjištěny žádné bariéry proti hybridizaci mezi jednotlivými druhy rodu *Origanum*. Hybridy se vytvářejí ze dvou druhů rostoucích vedle sebe na stanovišti.

U všech zástupců rodu *Origanum* bylo zjištěno chromozómové číslo $2n = 30$, kromě několika populací *O. vulgare* ssp. *vulgare*. Všechny porovnávané druhy musí být považovány za diploidy. Nejsou žádné důvody nevěřit správnosti čísla $2n = 32$, které je nejpravděpodobněji přisuzováno tetrasomatické aneuploidii (Ietswaart, 1980).

3.2 Charakteristika druhu *Origanum vulgare* L.

Origanum vulgare L. – dobromysl obecná. Synonyma: *Origanum creticum* Lour. Název dobromysli (původně dobrá mysl) dostala tato rostlina až na začátku 19. století, dříve se jí říkalo červená lebeda. Můžeme se setkat s dalšími názvy, jako jsou dobráček, divoká či zimní marjánka, oregano, saský balzám nebo voněkras (Tropicos.org , 2015, Kliková, Pavelková, 2000; Sochor, 2010).

Rozšíření druhu *Origanum vulgare* L.

S tímto druhem se můžeme setkat po celé Evropě, v Malé Asii, Kavkazu, Blízkém východě, Iránu, dále v nižších polohách Himalájí, v jižní Číně a Tchaj-wanu (Hrouda, 2000).

V České republice se vyskytuje hlavně na slunných stránkách, pasekách, ale i ve světlých lesích a na okraji houštin (Kliková, Pavelková, 2010). Druhotná stanoviště jsou železniční a silniční násypy, roste od nížin až do hor (Jirásek, Starý, 1986).

Rozdělení druhu *Origanum vulgare* L.

Origanum vulgare L. je v současné době považován za polymorfní druh (Ietswaart, 1980), tvořený šesti poddruhy, které lze považovat za samostatné druhy (Hejný, 1992). Tyto druhy jsou:

- 1) *O. vulgare* L. subsp. *vulgare* Mass – mírné pásmo Eurasie
- 2) *O. vulgare* L. subsp. *glandulosum* Ietswaart - Tunisko, Alžírsko
- 3) *O. vulgare* L. subsp. *gracile* Ietswaart – východní Turecko, bývalý SSSR, Pákistán
- 4) *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* Ietswaart – východní Středomoří
- 5) *O. vulgare* L. subsp. *viride* Hayek – východní Středomoří, západní Asie
- 6) *O. vulgare* L. subsp. *virens* Ietswaart – západní Středomoří (Hejný, 1992).

Na území České republiky rostou hlavně dva poddruhy:

- 1) *O. vulgare* ssp. *vulgare* Maas
- 2) *O. vulgare* ssp. *prismaticum* Gaud., (Hejný, 1992).

3.2.1 Botanický popis *Origanum vulgare* L.

Dobromysl obecná je vytrvalá bylina, vysoká od 0,25 do 0,90 m, lysá, nebo vlnatě chlupatá s dřevnatými a výběžkatými oddenky. Kořeny jsou jemné, bohatě větvené.

Lodyha je nadzemní částí rostliny, která nese listy. Lodyha s listy se označuje jako prýt. Na vzrostlém vrcholu prýtu vznikají listy v pravidelném postavení, organizace vzrostného vrcholu je u prýtu komplikovanější než u kořene. Apikální meristém prýtu určuje nejen vznik stonku, ale také listů a pupenů v jejich úžlabí (Krejčí, 2006). Lodyha u dobromysli je přímá nebo na bázi vystoupavá, čtyřhranná, v horních částech vstřícně větvená (Neugebauerová, Nečas, 2009).

Lang (2005) zaznamenal u *Origanum vulgare* L. průměrnou výšku stonků 0,56 m, stonek byl přímý nebo na bázi vystoupavý, tupě čtyřhranný, chloupkatý s chlupy zahnutými směrem dolů. Směrem nahoru byl stonek zelený až zelenohnědý s výraznými siličnými kanálky. U taxonu *Origanum vulgare* 'Aureum' byla naměřena výška 0,55 m. Další zástupce *Origanum vulgare* 'Thumbles Variety' měl průměrnou výšku stonku 0,34 m a *Origanum vulgare* 'Compactum' měl výšku 0,18 m.

Dudová (2006) porovnávala 3 zástupce taxonu *Origanum vulgare* L. U zástupce z Univerzity z Rakouska byla průměrná výška 0,63 m. U druhého vzorku ze Slovenska byla průměrná výška 0,72 m a u posledního taxonu z Velké Británie byla průměrná výška stonku 0,74 m.

Podle Dudové (2006) jsou lodyhy v horní části načervenalé až fialové, směrem k bázi jsou světle zelené až žlutohnědé. Listy na lodyze vyrůstají vstřícně. Jsou zelené až tmavě zelené barvy. Listy jsou mírně ochlupené z obou stran, výrazněji na spodní straně.

Listy jsou krátce řapíkaté, celokrajné nebo mělce vroubkované, žláznatě tečkované, tupé se třemi páry postranních žilek (Neugebauerová, Nečas, 2009). Listy se mohou lišit svou velikostí, neobvyklým tvarem, zbarvením i jinými vlastnostmi. U listů většinou popisujeme tvar, okraj čepele, barvu listu, povrch a velikost listu (Lang, 2005).

Ietswaart (1980) tvrdí, že průměrná délka listů u *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* je 25 mm a průměrná šířka je 13 mm.

Plhalová (2004) uvádí, že průměrná délka listů u *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* je 25 mm a šířka se pohybuje v rozmezí 9 až 13 mm.

Podle Langa (2005) mají listy v průměru délku 9 až 40 mm a šířku od 7 do 25 mm a délka řapíku v průměru od 2 do 14 mm.

Čepel je vejčitá, na bázi klínovitá a tupá, 10 až 40 mm dlouhá a 5 až 25 mm široká. Může být jak celokrajná tak po okraji jen mělce vroubkovaná, s výraznou žilnatinou. Řapík se směrem vzhůru zkracuje na několik milimetrů, je žlábkovitý, přitisklý a chlupatý (Hrouda, 2000).

Lichopřesleny jsou chudokvěté, nahloučené na vrcholu hlavní lodyhy horních větví do tvaru lichoklasů nebo hlávek. Vřeten květenství je hustě krátce chlupaté s obloukovitě zahnutými chlupy (Hrouda, 2000). Listeny jsou přisedlé, vejčité 4 - 5 mm široké, 1 - 2 x delší než kalich, často fialové (Neugebauerová, Nečas, 2009). Listeny jsou podobné listům, postupně se zmenšující a téměř přisedlé. Lichoklasy jsou 5 až 25 květů. Listence pod květy jsou jednotlivé, přisedlé, eliptické až obvejčité, 3 až 6 mm dlouhé, 2 až 4 mm široké. Lichoklasy jsou obvykle lysé, zelené a někdy načervenalé (zejména horní), (Hrouda, 2000).

Květ je jedním z hlavních barevných faktorů. Pozoruje se u něho doba kvetení, počet květních stonků, velikost a vzhled květů, barva květů, postavení květů nad listy, bohatost násady květů (Dudová, 2006).

Podle Dudové (2006) je průměrná výška květenství 0,15 až 0,20 m a průměrná šířka květenství je 0,24 až 0,28 m.

Květy u dobromysli jsou oboupohlavné nebo vzácně samičí se zakrnělými tyčinkami, přisedlé nebo jen s 1 až 2 mm dlouhou stopkou. Kalich je zvonkovitě trubkovitý, pravidelný, 2,5 až 4,5 mm dlouhý, pěticípý. Dále je 13 (15) žilný, s žilnatinou málo vyniklou. Kališní trubka hustě chlupatá, v ústí s velmi hustým prstencem brv. Koruna je růžová nebo růzovofialová, 4 až 7 mm dlouhá, mírně dvoupyská. Korunní trubka je krátce chlupatá, mírně z kalichu vyniklá, uvnitř dlouhá a vně roztroušená. Horní pysk je rovný, v horní části dvoulaločný, po okraji mírně navinutý a vně krátce štětinatě chlupatý. Dolní pysk je lysý, třílaločný s laloky stejně širokými. Pysk je vně štětinatě chlupatými, postranní laloky jsou vejčité a zaokrouhlené. Střední lalok je obdélníkovitý, na konci uťatý. Nitky tyčinek jsou lysé, dlouhé, zadní cca o 1/3 delší než přední. Všechny nebo alespoň delší korunní trubky jsou nápadně vyniklé. Prašníky jsou téměř kulovité, růžové, se širokým konektivem. Čnělka je růžová, z korunní trubky vyniklá a má krátká mírně nestejně dlouhá bliznová ramena. Tato jsou od sebe málo oddálena až téměř přitisklá. Podsemeníkový žláznatý val je čtyřlaločný. Laloky jsou málo zřetelné a stejně dlouhé. Tvrdky jsou podlouhlé vejcovité, 0,9 až 1,3mm dlouhé, hladké a hnědavé (Hrouda, 2000).

3.2.2 Využití dobromysli

Dobromysl je zdroj různých obsahových látek využitelných v potravinářství a farmaceutickém a chemickém průmyslu (Moravcová, 2003). Dobromysl je charakteristická širokým spektrem účinků na lidský organismus (Kresánek, Krejča, 1982).

Sušená nať je součástí mnoha směsí čajů podporující vykašlávání, trávení, působí proti bolesti zubů a uklidňuje (Valíček, 2005). Silice mají antibakteriální, fungicidní a repelentní vlastnosti. Jsou známé i antioxidační účinky. Méně známé je však to, že by se těhotné ženy, měly dobromysli vyhýbat (Baričevič, Bartol, 2002; Davis, 2005).

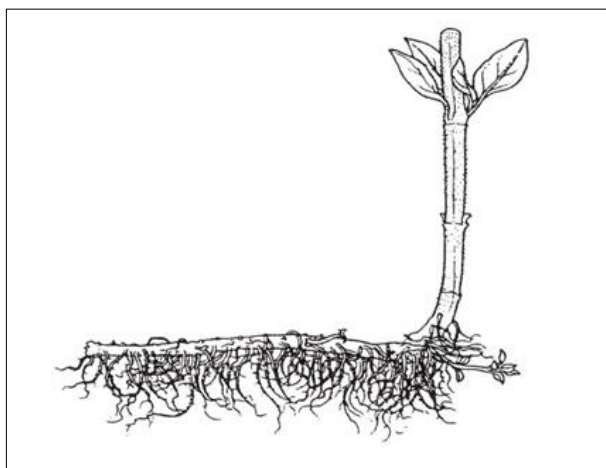
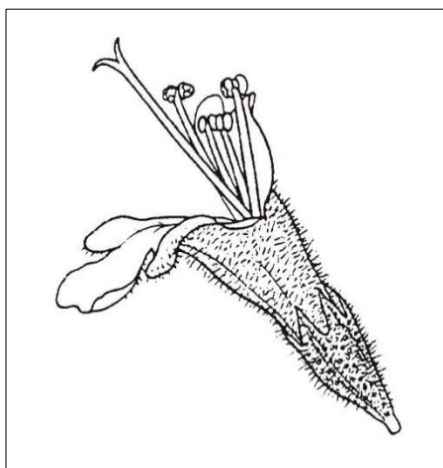
Ve farmacii má několik vlastností jako jsou expektorans, aromatikum, stomachikum, spazmolytikum, mírně antiseptikum a diuretikum, nervinum, balneologikum (Lang, 2005; Kresánek, Krejča, 1982).

Kosmetický průmysl využívá dobromysl pro její zajímavé aroma při výrobě parfémů. V nízkých koncentracích se přidává do široké škály přípravků na péči o tělo a pokožku (Štiasna, 2013).

Využití dobromysli v okrasném zahradnictví je pestré. Hodí se do trvalkových záhonů, skalek a na okraje cest a chodníků. Používá se v aranžování, jako výplňový materiál (Lang, 2005).

Mezi takzvané kvetoucí trvalky patří i dobromysl, která přináší krásné barevné kontrasty v sesazovaných kompozicích. Většinou vyžaduje plné slunce, některé snášejí nebo přímo vyžadují polostín. Při hodnocení květů je doporučováno pozorovat dobu kvetení, počet květních stonků, velikost a vzhled květů, barvu květů, postavení květů na květenství, počet pupat na stonku, pevnost stonků pod květem a bohatost násady květů.

Barva květů či květenství je velmi důležitá vlastnost dobromysli. Odstín je proměnlivý v závislosti na fázi kvetení. Barva květu je velice subjektivní vlastnost, kterou určíme pomocí „palety barev“ (Židková, 2001). Nejdůležitější jsou barvy spektrální, které vznikají rozložením slunečního paprsku. Paprsky jsou uspořádány podle vlnových délek v tomto pořadí: červená, oranžová, žlutá, zelená, modrá a fialová. Jednotlivé barvy nejsou od sebe odděleny, ale přecházejí jedna v druhou prostřednictvím barevných odstínů (Lang, 2005).



Obrázek č. 2 *Origanum vulgare* L. – květ a báze lodyhy s oddenkem (Smrčinová, 2000)



Obrázek č. 3 *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* (Smrčinová, 2000)

3.3 Fenologické fáze taxonů

V průběhu roku trvalky přecházejí jednotlivými růstovými fázemi, nazývají se fenologické fáze. Trvalky jimi prochází každoročně bez větších změn. Délka a trvání jednotlivých fenologických fází je závislá na průběhu počasí v daném roce. K nejdůležitějším fenologickým fázím trvalek patří rašení, vegetativní růst, kvetení a ukončení vegetace (Machovec, Jakábová, 2006).

Rašení

Rašení je vnitřní projev začátku růstu a vývoje trvalky po ukončení vegetačního klidu. Při rašení dochází k začátku růstu nových výhonů v obnovovacích meristémech. Doba rašení ovlivňuje genetická výbava rostliny a průběh počasí v příslušném roce. Lze je rozdělit podle doby rašení na rašící koncem zimy a v předjaří, rašící na jaře a rašící pozdě na jaře až počátkem léta (Machovec, Jakábová, 2006).

Lang (2005) uvádí začátek vegetace dobromysli v roce 2004 v období 15. až 21. března Podle Dudové (2006) byl zaznamenán začátek vegetace v období 17. až 24. dubna 2005.

Vegetační růst

Vegetační růst je spojen s vytvářením zelené hmoty u rostliny, tedy s růstem nových výhonů, tvorbou nových listů a celkovým zvětšením listové hmoty na rostlině (Lang, 2005).

Růst představuje přeměnu sacharidů, aminokyselin a anorganických iontů v nové struktury, včetně enzymů (Procházka, 1998).

Jednotlivé části těla rostliny tvoří harmonický celek - integritu. Na jeho vzniku se výrazně podílejí rostlinné hormony. Hlavním projevem integrity jsou růstové korelace, tj. růstové vztahy mezi jednotlivými částmi těla rostliny (Procházka, 1998).

Výsledkem růstu je morfologické utvoření nadzemní části trvalek, které se projeví určitým charakterem růstu, dosažením dědičně dané velikosti a dynamikou růstu (Machovec, Jakábová, 2006)

Podle Langa (2005) doba vegetace dobromysli byl v roce 2005 od 12. týdne do 42. týdne. Dudová (2006) uvádí dobu vegetace od 16. do 44. týdne.

Kvetení

Kvetení je jednou z nejdůležitějších fází života okrasných rostlin. Tvorba květů je spojena s přechodem z vegetativní do reprodukční fáze a představuje nejvýznamnější vývojovou změnu. Tento nový morfogenetický program znamená pro monokarpické rostliny, většinou byliny, i zahájení sledu dějů, které končí tvorbou plodů a zánikem rostliny (Procházka, 1998).

V této fázi projde rostlina zakládáním květů, počátkem kvetení, plným kvetením a odkvétáním (Lang, 2005).

Trvalky lze rozdělit podle cyklu kvetení na kvetoucí na jaře, začátkem léta, v pozdním létě a kvetoucí na podzim (Lang, 2005).

Délka kvetení je určena časovou osou od prvního rozkvetlého až po poslední odkvetlý květ v květenství. Doba kvetení je v rozmezí 10 až 30 dnů podle druhu (Lang, 2005). Lze zaznamenat začátek kvetení (rozkvétání), období plného květu (od začátku plného kvetení 1/3 květů), dokvétání (v době, kdy jsou 2/3 květů odkvetené) a ukončení kvetení (Machovec, Jakábová, 2006).

I když je délka kvetení u každého taxonu geneticky fixována, může se celková doba kvetení podstatně lišit za jednotlivé roky. Kvetení je významnou mírou ovlivněno počasím. Teplé a suché počasí podstatně zkracuje dobu kvetení, naopak chladné a deštivé počasí může způsobit špatné a opožděné kvetení některých taxonů (Machovec, Jakábová, 2006).

Fotoperiodická regulace kvetení je nejběžnější vývojovou regulací přechodu bylin z vegetativní do reproduktivní fáze. Představuje výraznou adaptaci k sezonnímu klimatu. Rostliny rozlišujeme na fotoperiodicky citlivé, tj. takové, které pro indukci kvetení vyžadují určitou délku fotoperiody, a bez fotoperiodického požadavku, tzv. rostliny neutrální. Fotoperiodicky citlivé rostliny dělíme dále na dvě základní kategorie: rostliny krátkodenní a dlouhodenní (Procházka, 1998).

Nedostatek vody ve fázi kvetení zvyšuje hladinu silic a tím zlepšuje kvalitu obsahových látek (Hoppe, 2013).

Lang (2005) zaznamenal začátek kvetení dobromysli v době 29. června až 9. července. Doba plného kvetení bylo od 9. do 20. července. Dudová (2006) uvádí začátek kvetení od 20. června do 22. července, fáze plného kvetení proběhla od 27. června do 7. srpna.

Konec vegetace

Konec vegetace nastává dvojnásobným způsobem. Buď odumírá nadzemní část rostliny, nebo se zatáhne do půdy. K odumírání nadzemních částí dochází přirozeně nástupem období chladu v našich zeměpisných šířkách. Není geneticky dáno. Zatímco zatahování rostlin je podmíněno geneticky, kdy v místě původu přichází období sucha.

V širším slova smyslu může být odpočinek, tzv. dormance, definována jako dočasné zastavení viditelných projevů růstu a tím rostlina odolá nízkým teplotám během zimy (Procházka, 1998).

Stárnutí – senescence

Víceleté rostliny prožívají fázi mládí (juvility) a fázi dospělosti, kdy přechází do adultního stavu. Rostliny přirozeně stárnou a tento proces vede nakonec k odumírání buněk, pletiv, orgánů a celých rostlin. Jejich ontogeneze stejně jako u všech mnohobuněčných organizmů končí smrtí.

U vytrvalých bylin odumírá každoročně v podmínkách mírného pásma celá nadzemní část rostliny, kořeny však přežívají a dávají vznik novým pupenům (Procházka, 1998).

Lang (2005) zaznamenal konec vegetace dobromysli 12. října, zatímco Dudová (2006) zaznamenala konec vegetace až 1. listopadu.

3.4 Okrasné taxony rodu *Origanum* L.

Origanum vulgare 'Compactum'

Otužilá trvalka kompaktního růstu s maximální výškou 0,18 m. Kvete od června do srpna fialovo-růžovou barvou (Pereny, 2010). Lodyha je čtyřhranná, na bázi dřevnatějící, uvnitř trsu přímá a po obvodu vystoupavá, nebo poléhavá schopna zakořenit. Listy vyrůstají na lodyze vstřícně, tvar listů je vejčitý, zakončený tupou špičkou, okraj je vroubkovaný. Listy jsou tmavě zelené a z obou stran chlupaté, po celé délce lodyhy. Žilnatina je na spodní straně listů výrazná. Na ní jsou siličnaté kanálky (Lang, 2005).

Květ je asi 5 mm dlouhý. Brakteje jsou dlouhé 4 mm, obvejčité až vejčité. Kalich je zelený s fialovými špičkami, palisty jsou také fialové. Květy mají příjemnou vůni a lákají motýly (Lang, 2003).

Tento nízký kultivar je vhodný do nádob, na pěstování na záhonech a skalkách. Vhodné jsou na slunné stanoviště, toleruje sušší, dobře propustné půdy (Konečný, 2015).

Origanum vulgare 'Aureum'

Vytrvalá, průměrně 0,55 m vysoká bylina, na spodu dřevnatějící. Lodyha je zelená nebo načervenalá, na vrchu světle žlutá, přímá nebo v dolní části vystoupavá. Listy na lodyze vyrůstají vstřícně. Listy jsou vejčité, až široce vejčité, zakončené tupou špičkou. Okraj listů je vroubkovaný, žlutě lemovaný. Listový řapík je zbarven převážně světle zeleně, směrem ke špičce plynule přechází ve žlutou, či zlatožlutou barvu. Mladé rostliny

jsou celé žluté, starší jsou světle zelené se žlutým lemováním. Žilnatina je zpeřená, vystouplá a je možné pozorovat siličné kanálky (Lang, 2005).

Barva květu je bílá, velikost kolem 6 mm. Kalich je zelený. Brakteje jsou světle zelené a přechází ve fialovou barvu. Brakteje jsou 5 – 6 mm dlouhé (Lang, 2005).

Tato odrůda toleruje suché stanoviště, je vhodná na pěstování na záhonech i v nádobách. Je atraktivní pro motýly. (Perennials, 2015a).

Origanum vulgare 'Variegatum' (syn. *Origanum vulgare* 'Country Cream')

Rostlina dorůstá do výšky 0,30 m. Na bázi dřevnatí, lodyha je přímá, na okraji vystoupavá, světle zelené barvy, chlupatá. Listy vyrůstají vstřícně, jsou vejčité, zakončeny tupou špičkou, na okraji zubaté. Na jaře jsou listy ve špičce bílé. Po okraji se rozbíhá bíložluté panašování, které přechází v tmavě zelenou barvu směrem ke středu listu. Žilnatina je výrazná, zvláště ve spodní části listu. Na ní jsou siličnaté kanálky. Po celé délce rostliny jsou listy mírně chlupaté (Lang, 2005).

Květy jsou světle růžové a objevují se v červnu až srpnu. Semena tvoří od srpna do října (Paghat, 2015). Délka květu je asi 5 mm. Z pyskatého květu mírně vyčnívají tyčinky a čnělky. Brakteje jsou zelené barvy, o délce 4 – 5 mm. Kalich je zelený (Lang, 2005). Odrůda je vhodná na slunná stanoviště, vytváří nízké trsovité porosty (Shootgardening, 2015)

Origanum vulgare 'Thumble's Variety'

Výška rostliny průměrně kolem 0,30 m. Lodyha na bázi dřevnatí, je přímá nebo vystoupavá, mírně rozpraskaná, světle zelená. Na lodyze jsou zřetelné siličné kanálky. Lodyha je obloukovitě chloupkatá, je tupě čtyřhranná, ve vrchní třetině nafialovělá.

Listy jsou světle zelené, směrem ke špičce žlutavé. Mladé listy jsou citrónově žluté. Okraj je žlutě lemován a celokrajný. Tvar listu je vejčitý, zakončený tupou špičkou. U řapíku bývá asymetrický. Zesponu jsou listy chlupaté s výraznější žilnatinou.

Kvete bílou barvou. Velikost květu je 5 mm. Tyčinky a čnělky nápadně vyčnívají z pyskaté koruny. Kalich je světle zelený. Brakteje jsou převážně zelené, 3 – 5 mm dlouhé, vejčité až obvejčité (Lang, 2005).

Pro tuto odrůdu jsou vhodná suchá a slunná stanoviště. Je atraktivní pro motýly (Perennial, 2015b).

Origanum vulgare 'Aureum Crispum'

Otužilá trvalka vysoká do 0,45 m. Listy jsou zlatozelené, drobné, okrouhlé a kadeřavé. Listy jsou řídké ochlupené a aromatické (Brickell, 2000). Kvete od června do září růžovými květy s fialovými palisty (Štiasna, 2013). Tento kultivar roste pomalu. Vhodný do skalek, nádob i na záhony (Morningsunherbfarm, 2008). Snese plné slunce, ale vyžaduje lehké, propustné a vápenité půdy (Gardenersworld, 2015).

Origanum hirsutum Kuntze (basionym: *Thymus hirsutus* M. Bieb.)

Vytrvalá bylina, výšky průměrně kolem 0,80 m. Lodyha je vzpřímená se středně hustým olistěním. Je tupě čtyřhranná, na bázi silně dřevnatí. Má barvu žlutozelenou až zelenou. Nese výrazné chloupky a siličné kanálky (Dudová, 2006).

Listy jsou 10 – 25 mm dlouhé, vstřícné, vejčité, celokrajné (Štiasná, 2013). Jsou zelené až tmavě zelené barvy. Čepel listů je eliptická nebo vejčitá. Okraje listů jsou mírně zoubkované. Žilnatina je vystouplá, ochlupená, se siličnými kanálky (Dudová, 2006).

Květy mohou být od bílé až fialovočervené. Kvete od července do srpna (Štiasná, 2013). Brakteje jsou 5 – 6 mm dlouhé, zelené s fialovočervenými špičkami. Tvar je vejčitý (Dudová, 2006).

Origanum vulgare 'Diabolo'

Vytrvalá bylina trsovitě rostoucí. Tato odrůda se odlišuje od ostatních dobromyslí plazivým růstem. Výška se pohybuje do 0,40 m. Bylinné stonky se větví až v horní části a nesou drobné, zelené a celokrajné lístky. Rozkvétá bílo-růžovými jemnými květy v koncových květenstvích ploše kulovitého tvaru. Kvete od července do září (Zahradnictví-flos, 2015). Je vhodná pro pěstování v nádobách, kde vytváří převis. Dále je možné vysazovat do skalek a bylinkových záhonů. Vhodné je slunné stanoviště a propustná hlinitopísčité půda (Krucich, 2009).

3.5 Pěstování dobromysli

Origanum L. se pěstuje jako vytrvalá kultura. Porosty se zakládají na 5 - 6 roků (Neugebauerová, 2006). Hoppe (2013) tvrdí, že životnost porostu je 6 až 7 let, ale průzkum v Německu prokázal, že ideální životnost je 4 až 5 let, která vede k optimální výtěžnosti.

Kultura dobromysli je pěstovaná na živných, mělkých až středně hlubokých půdách nejlépe hlinitých, zařazujeme ji do druhé tratě. Vyžaduje zásobní hnojení chlévskou mrvou v dávce 30 - 40 t /ha. Spotřeba živin je 100 kg/ha N, 80 kg/ha P₂O₆ a 100 kg/ha K₂O. Dusík je nutné rozdělit na počátek vegetace a po každé sklizni (Neugebauerová, 2006). Hoppe (2013) uvádí, že tato kultura potřebuje organické hnojení aplikované před pěstováním. Dále doporučuje dodávat 100 kg/ha N, 60 kg/ha P₂O₆ a 100 kg/ha K₂O. Dusík je vhodné rozdělit na dvě dávky; na začátku vegetace a po každé sklizni. Aplikace dusíku během rašení způsobuje poškození kultury. Vysoké dávky živin nepříznivě ovlivňují vůni.

Dobromysl snáší velmi dobře suché slunečné stanoviště. Lze ji úspěšně pěstovat i na skalce. Tato rostlina je poměrně choulostivá na mráz. Na zimu je vhodné přihnout zemí, můžeme použít také chvojí (Ottová, 2015).

Pěstování je možné z přímého výsevu na pozemek koncem dubna nebo vysévat do pařeniště v březnu až dubnu. Je možné pěstovat i z předpěstované sadby z únorového výsevu při teplotě 16 °C. Sadbu vysazujeme na trvalé stanoviště v květnu až červnu do sponu 0,5 x 0,3 m (Neugebauerová, *et al*, 2009). Hoppe (2013) tvrdí, že předpěstovanou sadbu připravíme výsevem na konci března a udržujeme ji v teplotách 15 až 18 °C. Koncem dubna a na začátku května je sadba 10 - 12 cm vysoká a je možné ji vysadit. Spon výsadby na pole je 0,5 x 0,2 - 0,3 m. Počet rostlina je 50 000 až 60 000 na hektar.

Obchodní osivo pramení ze směsí, hmotnost tisíce semen (HTS) je 0,1 - 0,2 g. Z 1 g osiva získáme 1000 - 1200 rostlin (Neugebauerová, *et al*, 2009). Klíčivost semen by měla být 4 až 5 letá, za normálních podmínek je 60 %, čerstvá semena klíčí ze 75 %, ale mohou dosáhnout 80 až 85 % klíčivost (Hoppe, 2013)

Jemná semena dobromysli se mohou smíchat s pískem nebo s moukou pro dosažení rovnoměrnějšího výsevu. Vyséváme při 20 °C pod sklo a semena nezasypáváme. Vzchází za 10 až 20 dnů na světle. Mitáček (2010) tvrdí, že osivo klíčí na světle, ale vzchází až za jeden měsíc po výsevu. Výsevy jsou náchylné na padání klíčících rostlin, proto je nepřeléváme (McVicar, 2005). Hoppe (2013) uvádí, že osivo je nutné vyset do hloubky 0,5

až 1 cm, k čemu slouží secí botky s přítlačnými válečky. Půda by měla být dostatečně vlhká. Spon výsadby se doporučuje 0,5 x 0,2 – 0,3 m pro optimální výnos a regulaci plevelů. Na pole se vysazují do sponu 0,5 - 0,6 x 0,2 m (Kokoška, 2003).

Další možností rozmnožování rostlin je dělení trsů v podzimním nebo jarním termínu. Dále to je řízkování nebo použití *in vitro* kultury (Neugebauerová, *et al*, 2009).

Dobromysl vyžaduje okopávku a pletí. Protože je i v přírodě statnou bylinou, není tolik citlivá na konkurenci plevelů. Zejména když uvážíme, že rychle odnožuje do stran a tvoří relativně rychle trsy (Hejný, 1992). Před výsadbou by měl být pozemek zbaven řádně plevelů, zvláště vytrvalých druhů (Lang, 2005). Lze použít herbicid s účinnými látkami lenacil (na začátku vegetace) a ve druhém roce pěstování pak terbacil. Možná je i aplikace herbicidů s účinnými látkami oxadiazon a neburon (Neugebauerová, 1997).

Sklízíme od počátku kvetení do plného květu na počátku července. Od druhého roku jsou možné dvě sklizně. Druhá sklizeň většinou bývá koncem srpna nebo začátkem září (Neugebauerová, 1997).

Výnos z dobromysli v prvním roce se pohybuje okolo 0,75 t/ha , ve druhém roce může být výnos až 4,0 t/ha. Destilací lze získat 2 kg silice z 1 tuny čerstvé hmoty (Neugebauerová, *et al*, 2009).

Nejčastěji napadají rostliny houbové choroby. Jednou z nich je alternáriová skvrnitost – *Alternaria*. Symptomy tohoto onemocnění jsou hnědé skvrny na listech, v pravidelných kruzích se vyskytují černé konidie. Listy mohou v důsledku napadení červenat a zesychat. Nemoc se přenáší osivem a z odumřelého rostlinného materiálu. Houba může přezimovat až 2 roky v zemi. Vývoj houby je rychlejší ve vlhkém prostředí a při kolísání teplot mezi dnem a nocí. Preventivní opatření je vhodné, nejlépe odstraněním napadených listů, likvidací posklizňových zbytků, použití odolných odrůd, střídání plodin na stanovišti a snížení hnojení dusíkem. Patogen přežívá ve formě pyknid, které mají životnost dva až čtyři roky (Meyer, *et al*, 2010).

Dalším houbovým onemocněním je černá skvrnitost, kterou způsobuje houba *Phoma exigue* var. *exigua*. Napadení se projevuje vadnutím výhonů, které nakonec odumírají. Listy nekrotizují, na spodu se objevují černé plodnice houby. Výskyt je v jarním a podzimním období, v letních měsících je minimální. Preventivní opatření je odstranění a likvidaci napadených rostlinných zbytků, použití zdravého osiva a zdravých matečních

rostlin, větrání a zavlažování během dne. V první fázi zhnědne kořenový krček. Na kořenech jsou hnědé skvrny. Při extrémním napadení odumírají kořeny, postupně i listy. Růst je celkově zakrslý. Preventivní opatření je vybírání zdravých mladých rostlin, likvidace napadených rostlin, provzdušněná půda a snížení hnojení dusíkem (Meyer, *et al*, 2010).

Houbovým chorobám celkově prospívá vlhké prostředí. Houbová onemocnění způsobují hnilobu listů a kořenů. Rostliny hniající ze středu jsou pravděpodobně napadeny houbou *Botrytis sp.* Takové rostliny je nutné zlikvidovat, aby nedocházelo k šíření choroby (Caroll, 2015).

Další houbou je často se vyskytující rez *Puccinia ruebsamenii* P. Magn., která deformuje výhony, a rez máťová *Puccinia menthae* Pers. způsobující zakrslost výhonů. Listy mají na spodní straně oranžovožluté nebo hnědé puchýřky (Plantvillage, 2015). Dále je to houbový patogen *Lophiostoma origani* Kunze, která žije na lodyhách (Blažek, *et al*, 1956).

Škůdci, kteří napadají dobromysl, jsou plodomorka *Asphondylia hornigi* Wachtl, mšice *Aphis nepetae* Kal., která způsobuje deformaci listů. Dále vlnovník *Eriophyes origani* Nel., pidikřístek polní *Eupteryx atropunctata* Goeze a sviluška chmelová *Tetranychus urticae*, která způsobuje hnědnutí a deformaci listů (Hoppe, 2013).

3.6 Sběr a úprava rostlin

Sbírají se jen rostliny vyvinuté, nepoškozené a čisté. Sběr probíhá v době nejvyššího obsahu účinných látek (Suchý, 1994). Sběr natě dobromysli se sklízí od začátku kvetení až do plného květu v červenci až srpnu. Odřezávají se asi 30 cm dlouhé kvetoucí a olistěné stonky silně maximálně do 5 mm. Výška řezu od země není určena, měla by se provádět v místě hustě olistěné lodyhy. Ke sklizni využíváme zahradnické nože a nůžky (Neubauer, Klimeš, 1986). Od druhého roku je možný i druhý sběr, který provádíme na konci srpna až začátkem září. V prvním roce je výnos čerstvé hmoty 3 t/ha, v druhém roce do 15 t/ha, sušením se ztrácí asi 75 % objemu, to znamená sesychací poměr 4 : 1 (Neugebauerová, 1997). Kresánek a Krejča (1982) uvádí sesychací poměr 4 - 5 : 1. Podle Karlové (1999) byl sesychací poměr 3,15 – 4,01 : 1.

Při sběru rostlin z volné přírody je nutné dodržovat určitá pravidla. Je zakázáno sbírat rostliny v chráněných oblastech. Sběr z volné přírody je namáhavý a vyžaduje mnoho lidské práce bez možnosti použití mechanizace (Lang, 2005).

Nejčastější posklizňovou úpravou je sušení. Sušení je proces odebrání vody z materiálu, omezení nebo úplné zastavení rozkladných procesů. Při správném sušení se uchovávají všechny obsahové látky ve stejném množství a rovněž v původním přirozeném vzhledu. Dobře usušené drogy je možné lehce přepravovat a skladovat (Suchý, 1994). Sušení může probíhat přirozeně nebo pomocí teplého vzduchu proudícího v sušárně o teplotě do 35 °C. V důsledku nesprávného sušení může dojít ke ztrátě vonných látek a ke změně barvy.

Po sušení následuje další úprava - mletí. Takto připravený materiál skladujeme v hermeticky uzavřených nádobách a bráníme přístupu světla a tepla (Mäkinen, Pääkkönen, 2002). Relativní vzdušná vlhkost skladovacích prostorů se má pohybovat kolem 65 %, teplota by měla být v rozmezí 5 až 15 °C (Suchý, 1994).

Je také možné dobromysl používat v čerstvém stavu, pokud máme k dispozici vlastní porost.

Další metodou úpravy je mražení. Tento způsob zabezpečuje čerstvý stav až po dobu několika měsíců. Bohužel pro využití dobromysli za účelem nařového koření je tato metoda nevhodná (Valíček, 2005).

Dobromysl se běžně využívá v potravinářství jako koření. Můžeme ho najít pod obchodním názvem oregano (Korbel in Dudová, 2006). Oregano je směs druhů aromatického koření, tj. více rodů a více druhů pod souhrnným názvem (Hejtný, 1992). Nejedná se jen o dobromysl obecnou.

Tato směs je používána v několika světových kuchyních (italská, francouzská či španělská). Je vhodná na dochucení jídel s rajčaty, vhodná do těstovin, masa a ryb. Čerstvé listy jsou velmi chutné ke kozímu sýru (McVicar, 2005). Velmi často je součástí jiných kořenících směsí například v kari nebo v chilli (Lang, 2005).

Vyhláška MZe č. 331/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, pro koření, jedlou sůl, dehydratované výrobky a ochucovadla a hořčici, je koření označeno jako oregano, což je

suchá směs listů a části květů bez stonků a větviček. Měla by mít hnědozelenou, šedou až olivově zelenou barvu. Vůně by měla být výrazná a chuť výrazně kořenitá.

Vyhláška také upravuje fyzikální a chemické požadavky na jakost koření. Vlhkost by měla být nejvýše 12 % hmotnosti, celkový popel by měl být nejvýše 10 % hmotnosti a popel nerozpustný v kyselině by měl být nejvýše do 2 % hmotnosti. Obsah silice by měl být minimálně 0,5 ml/ 100 g, tj. 5 ml/kg. Organické vlastní příměsi by neměly převyšovat 16 % hmotnosti, organické cizí příměsi by měly být do 3 % hmotnosti a anorganické příměsi do 2 % hmotnosti.

Dále lze použít dobromysl v kosmetickém průmyslu. Dobromysl se zde používá jako nálev do osvěžujících koupelí. Silný nálev slouží jako vlasový kondicionér (Bremnessová, 2003). Použití je široké, další odvětví použití je při výrobě parfémů. V nízkých koncentracích se přidává do široké škály přípravků na péči o tělo a pokožku (Štiasna, 2013).

3.7 Origani herba

Dobromyslová nať je drogou nazývanou se *Origani herba*. Drogou tvoří slabě hranaté a často načervenalé lodyhy, vstřícné, celokrajné listy vejčitého tvaru. Květy jsou tmavě červené až fialové v rozvětvených chocholících. Droga má příjemnou, aromatickou vůni – kořenitou a hořkou chuť (Dudová, 2006).

Dle Českého lékopisu z roku 2009 by měla nať obsahovat minimálně 25 ml silice v kilogramu drogy. Karvakrolu a thymolu musí být v silici nejméně 60 %. Cizích příměsí může obsahovat nejvíce 2 %. Obsah vody má být maximálně 120 ml/kg. Celkový popel tvoří maximálně 15 %, popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové by měl být nejvíce 4 %. Matečné rostliny jsou *Origanum onites* a *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*.

Podle Českého farmaceutického kodexu z roku 1993 musí nať dobromysli obecné obsahovat nejméně 0,1% (V/m) silice. Droga je aromatického zápachu, chuti kořenitě nahořklé. Při zkoušce čistoty musí rostlina obsahovat nejvýše 2,0 % cizí příměsi, u stonků silnějších než 3 mm je obsah do 5 %. Ztráta sušiny by měla být maximálně 12 %, popel má tvořit maximálně 8 % a popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové by měl obsahovat maximálně 1 %.

3.8 Obsahové látky

Nejdůležitější složkou z komerčního i užitkového hlediska jsou silice (Kintzios 2004). Silice definujeme jako těkavé, intenzivně vonící směsi přírodních rostlinných látek olejovité konzistence, lipofilní, ve vodě těžko rozpustné. Zpravidla jsou bezbarvé, zvláště v čerstvém stavu. Delším uchováváním snadno oxidují, pryskyřičnatí a tmavnou. Za obvyčejné teploty jsou zpravidla tekuté, některé částečně tuhnou (Moravcová, 2003). Silice mají hustotu menší než 1. A dále se vyznačují optickou aktivitou s vysokým indexem lomu, který je dán přítomností nenasycených látek s dvojnými a trojnými vazbami (Lang, 2005).

Rod *Origanum* je charakteristický širokou škálou prchavých sekundárních metabolitů, které způsobují typickou vůni a léčivé účinky jejich zástupců. Literatura uvádí poměrně rozdílné údaje týkající se množství obsahových látek (Small, 2006).

Obsah silice v nati dobromysli je 0,15 – 0,40 %, největší zastoupení mají thymol, karvakrol a cymol, dále jsou to třísloviny, hořčiny, pryskyřice a minerální látky (Tomko, 1999).

Množství obsahových látek se výrazně liší podle oblasti pěstování dobromysli. Například plané porosty matečných rostlin nejsou jednotné v taxonomické hodnotě, ve farmacii se proto silice označují podle původu rostliny, jako je silice španělská, syrská, řecká a další. U některých zástupců mohou významné obsahové látky (thymol, karvakrol) zase zcela chybět (Starý, Jirásek, 1986).

Blažek *et al.*(1956) tvrdí, že silice z drogy obsahují až 50 % thymolu a množství tříslovin je až 8 %. Zatímco Jirásek a Starý (1986) popisují, že silice některých typů dobromysli obsahují místo thymolu a karvakrolu karyofylen, α -bisabolen, dipenten, *p*-cymol, linalool, terpineol a terpinylacetát nebo bornylacetát a další terpenické látky. Hejný (1992) uvádí, že celkové rozpětí obsahu silic je 0,15 - 0,30 %. Dále obsahuje asi 8 % tříslovin, hořčiny, organické kyseliny, bornylacetát, 82 % vitamínu C a 7,5 % karotenu. Mika (1991) popisuje, že droga obsahuje především silice v rozmezí 0,20 – 1,50 %, které jsou zastoupeny především thymolem v 16 %, dále jsou to cymol, karvakrol a další terpeny.

Obsah látek v dobromysli závisí na původu drogy, termínu sklizně aj. Například thymol a karvakrol se podílí na různých chemotypech matečné rostliny. Při hodnocení

složení silice bylo zjištěno, že obsah thymolu stoupá na podzim, zatímco množství karvakrolu naproti tomu zůstává v průběhu vegetačního období stejné (Neugebauerová, 1997). Roste-li dobromysl na plném slunci, má výraznější vůni a chuť (Palmer, 1996).

Skoula a Kamenopoulos (1996) uvádí látky obsaženy v silicích *Herba origani*: γ -terpinen, *p*-cymen, borneol, 1,8-cineol, pinen, kamfen, caryophyllene, karvakrol, thymol a terpinen-4-ol.

Látky obsažené v silici *Origanum vulgare* L. jsou methyl, 2-methylbutyrát, α -thujon, α -pinen, camphen, β -pinen, sabinen, δ -3-careen, myrcen, α -phellandren, α -terpinen, limonen, 1,8-cineol, β -phellandren, (*Z*)-ocimen, (*E*)-ocimen, γ -terpinen, *p*-cymen, terpinolen, 3-octanol, 1-octen-3-ol, α -copaen, linalool, thymylmethyleter, terpinen-4-ol, karvakrol methyl ether, β -caryophyllum, α -humulen, α -terpinol, borneol, germacren D, β -bisabolen, δ -cadinen, *cis*- α -bisabolen, γ -cadinen, β -elemol, α -farnesol, spathulenol, thymol a karvakrol (Chatalambous in Zátopková, 1998).

Velíšek (2002) uvádí, že dobromysl obecná obsahuje látky, jako jsou karvakrol, thymol, *p*-cymen, karvakryl (methyl) ether, linalool, α -pinen, bornyl-acetát a kafr.

Podle Dudové (2006) byly nejvíce obsaženy látky *p*-cymen, γ -terpinen a thymol. Obsah jednotlivých složek silic se výrazně lišil u stejných zástupců druhu *Origanum vulgare*. Například thymol u *O. vulgare* (zástupce z Velké Británie) měl nejvyšší podíl této látky, zatímco u *O. vulgare* (zástupce z Rakouska) měl obsah nejnižší.

Nyrzyńska-Wierdak (2008) popisuje, že převládající složkou dobromysli během výzkumu byly: sabinen, germacrene D, *E*-karyofylen, (*Z*)- β -ocimene a γ -terpinene. Zkoumané silice obsahují sloučeniny thymolu a karvakrolu.

Silice

U čeledi *Lamiaceae* se silice vytvářejí v žláznatých trichomech. Silice se tvoří v protoplasmě nebo rozpadem buněčných blan či hydrolýzou určitých glykosidů. Mají vlastnost prostupovat všemi pletivy nebo se koncentrují v určitých orgánech (Zátopková, 1998).

Silice se zpravidla skládají z velkého počtu chemických sloučenin. Bylo identifikováno přes 500 různých látek, při čemž až 50 jich může být obsaženo v jedné silici (Hubík, 1978). Silice jsou nejčastěji tvořeny terpeny, zejména monoterpenickými uhlovodíky, aldehydy, alkoholy, ketony, kyselinami, estery nebo seskviterpeny (uhlovodíky i kyslíkatými látkami). Vůni zpravidla podmiňují terpenické složky (Kysilka, 2006)

Silice obsažené u dobromysli se liší podle způsobu produkce a kvalitativního složení. Podle obsahu základních silic rozlišujeme tři hlavní skupiny:

- 1) Taxony „chudé“ na silice obsahující menší množství než 0,5 % (ml / 100 g sušiny), například u druhu *O. calcaratum*
- 2) Taxony s obsahem silice mezi 0,5 až 2 %, například *O. microphyllum*, které je známé jako „Krétská majoránka“
- 3) Taxony „bohaté“ na silice obsahující více než 2 %, například dva nejvíce rozšířené komerční druhy jsou *O. vulgare subsp. hirtum* (Řecké oregáno) a *O. onites* (Turecké oregáno), (Kokkini in Padulosi, 1996).

S ohledem na koncentraci silic u rodu *Origanum spp.* L. se mohou vyskytnout následující sloučeniny, například linalool, terpinen-4-ol, a sabinen-hydrát, jako silice u druhu *O. majorana*. Dále fenolové sloučeniny, karvakrol a nebo thymol, jako silice u druhu *O. vulgare subsp. hirtum* a *O. onites* (Padulosi, 1996).

Využití silice je nejvýznamnější v oblasti potravinářství a kosmetického průmyslu. Ve farmacii se používají drogy s vysokým obsahem silic, silice a z nich izolované čisté látky. Biologické účinky těchto faktorů jsou odlišné. Izolovaná silice má přednost ve využití, pokud obsahuje i jiné biologicky aktivní látky jako jsou glykosidy nebo třísloviny. Izolovaná složka silic se dále využívá ve farmacii, má-li droga nějaké nežádoucí vedlejší účinky. Silice se používá spíše k úpravě vůní v kosmetice (Moravcová, 2003). Další

důležitou vlastností silic je antioxidační aktivita (Velíšek, 2002), jejímiž nositeli jsou karvakrol a thymol (Neugebauerová, Fojtová, 2006).

Pro izolaci silic se používá několik způsobů jako je destilace, enflourace (extrakce tuky), lisování a extrakce rostlinného materiálu lehce prchavými organickými rozpouštědly. Nejběžnější a nejvíce používanou metodou je destilace vodní parou.

Destilace

Je metoda s největší výtěžností, s vysokou kapacitou. Nevýhodou je vysoká teplota asi 150 až 300 °C, která způsobuje změnu ve složení silice. Dále se silice liší pachem či vůní od silice získané extrakcí (Moravcová, 2003).

Karlová (1999) uvádí, že při stanovení kontrolních vzorků bylo prokázáno jen stopové množství silic. Obsah silic u drogy *Herba origani* byl v hodnotách 0,12 – 0,54 %.

Fenolické látky

Z velkého počtu přírodních látek jsou z hlediska antioxidační zajímavé fenolické látky. Mezi ně patří například flavonoidy, hydroxyskořicová kyselina, třísloviny a alkaloidy (Spilková, 1997).

Důležitou a rozsáhlou skupinu rostlinných fenolických látek tvoří flavonoidy. Pro antioxidační aktivitu flavonoidů je prvořadý počet hydroxylových skupin v molekule a jejich poloha. Dvě hydroxylové skupiny v poloze C-3' a C-4' zajišťují antioxidační aktivitu. Přítomnost dalších hydroxylových skupin v kruhu B zvyšuje aktivitu (Velíšek, 2002). Čeleď *Lamiaceae* obsahuje flavonoidy volné nebo glykosidicky vázané, oba typy se nacházejí u dobromysli (Skoula, Harborne, 2002).

Výzkum z roku 2009 byl zaměřen na celkový obsah fenolických látek u okrasných taxonů rodu *Origanum* L. Výsledky byly vyjádřeny v gramech ekvivalentu kyseliny gallové (gallic acid equivalents - GAE) ve 100 g sušiny. Mezi zkoumanými taxony měl nejvyšší celkový obsah fenolických látek zástupce *Origanum vulgare* 'Compactum', a to 6,38 – 9,13 g GAE/100 g sušiny. Nejnižší obsah měl taxon *Origanum vulgare* 'Album' s hodnotou 4,80 g GAE/ 100 g sušiny. *Origanum vulgare* 'Thumble's Variety' obsahovala 5,62 g GAE/100 g sušiny (Neugebauerová, *et al.*, 2009). Další výzkum, který se zaměřil na extrakty z kořeninových rostlin, zaznamenal, že dobromysl obsahuje 10,17 (\pm 0,01) g GAE/100 g sušiny (Shan, *et al.*, 2005).

Neugebauerová *et al.* (2009) uvádí, že nejnižší celkový obsah fenolických látek v sušené dobromysli byl zjištěn u taxonu *Origanum vulgare* 'Album' s hodnotou 4,80 g GAE/100 g. Nejvyšší obsah TPC 9,13 g GAE/100 g byl zjištěn u *Origanum vulgare* 'Compactum'.

Podle Štiasne (2013) nejvýznamnější obsah fenolických látek ukázal taxon *Origanum vulgare* 'Thumble's Variety' s obsahem 6,5882 g GAE/100 g sušiny, nejnižší obsah fenolických látek byl zjištěn u *Origanum vulgare* 'Variegatum' s hodnotou 4,4738 g GAE/100 g sušiny.

Třísloviny

Z hlediska chemického složení patří třísloviny mezi polyfenoly, které se liší rozdílnou molekulovou hmotností, nejdůležitější funkční skupinou jsou fenolové hydroxidy.

Třísloviny mají celou řadu charakteristických vlastností. Jsou rozpustné ve vodě a v ethanolu. Třísloviny mají svíravou chuť, sráží bílkoviny, erytrocyty, alkaloidy a soli těžkých kovů. Se solí železa se zbarvují v roztoku na modro a zeleno. Všeobecně to jsou látky velmi nestálé, samokondenzační. Skladováním ztrácejí drogy s obsahem tříslovin na účinnosti (Bučková, 1988).

Drogy obsahující třísloviny se používají jako adstringencia při onemocněních gastrointestinálního traktu a kožních poranění. Při léčení spálenin nebo omrzlin vytvářejí ochranou, antiseptickou membránu (Moravcová, 2003). Jako přirozené složky potravin ovlivňují žádoucí a nežádoucí chuťové vlastnosti (Velíšek, 2002).

Blažek *et al* (1956) uvádí, že silice *Herba origani* obsahuje asi 8 % tříslovin, hořčiny a jiné látky. Toto množství potvrzuje Mika (1991) a Hejný (1992).

Hořčiny

Jsou to nejedovaté, bezdušikaté látky (Korbelář, *et al*, 1970). Formulované dle chuťových receptorů. Mají odlišnou chemickou strukturu. Zástupci jsou ze skupin glykosidů či alkaloidů (Mika, 1991).

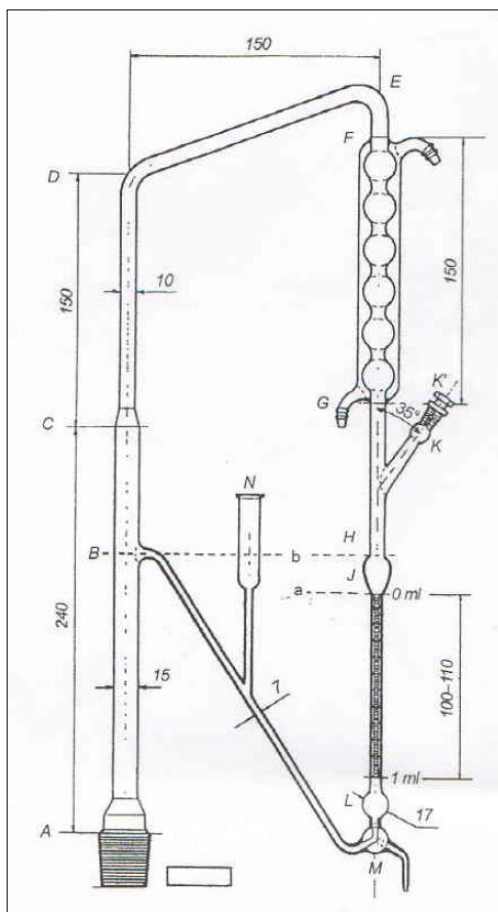
Mezi hořčiny se řadí sloučeniny obsažené v rostlinách, které jsou hořké a současně nemají žádný další nápadný farmakologický význam. Po chemické stránce patří hořčiny

mezi různé typy sloučenin, u některých dokonce není chemická struktura známa, proto se jejich koncentrace stanovuje pomocí čísla hořkosti (Moravcová, 2003). Číslo hořkosti je převrácená hodnota zředěného výluhu 1 g drogy, která ještě vyvolá zřetelně hořkou chuť (Mika, 1991).

3.9 Metody stanovení obsahových látek

3.9.1 Stanovení obsahu silice

Český lékopis (2009) stanovuje obsah silic v rostlinných drogách pomocí destilace s vodní párou na zvláštním přístroji a destilát se jímá v kalibrační trubici. Samotná silice je zachycena v xylenu, vodní fáze se automaticky vrací zpět do destilační baňky. Obsah silice se vyjadřuje v ml/kg sušiny.



Obrázek č. 4 Destilační aparatura Český lékopis (2009)

Přístroj (Obr. 4) se skládá z vhodné destilační baňky s kulatým dnem a krátkým zabroušeným hrdlem na širším okraji o vnitřním průměru 29 mm, dále z kondenzační části,

kteřá přiléhá k destilační baňce zábrusem tak, že tvoří jednolitý celek. Použité sklo má nízký koeficient roztažnosti. Zátka *K'* je odvětrávací, trubice *K* má otvor o průměru asi 1 mm, shodný s odvětrávacím otvorem zátky, širší konec trubice *K* o vnitřním průměru 10 mm je ze zabroušeného skla. Hruškovitě rozšířená část *J* o objemu 3 ml a trubice *JL* je dělena po 0,01 ml, další část je kulovitá označena jako *L* o objemu asi 2 ml. Trojcestný kohout je označen *M*, ústí trubice *B* je o 20 mm výše než horní značka dělení na trubici. Přístroj se dále skládá z vhodného tepelného zdroje umožňujícího přesné nastavení teploty a ze stojanu s kruhem pokrytým izolačním materiálem.

Použije se důkladně vyčištěný přístroj. Stanovení se provádí podle charakteru zkoumané drogy. Do destilační baňky se převede předepsané množství destilační kapaliny, přidá se několik kousků porézního porcelánu a připojí se kondenzační část. Nálévkou *N* se vlije kapalina do přístroje tak, aby její hladina dosáhla bodu *B*. Vyjme se zátka *K'* a pipetou, jejíž konec se dotýká spodní části trubice *K*, přidá se předepsané množství *xylenu R*. Zátka *K'* se uzavře. Otvor v zátce odpovídá poloze otvoru v trubici *K*. Kapalina v baňce se zahřeje k varu. Není-li jinak předepsáno, destiluje se rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min.

Určí se destilační rychlost. Během destilace se sníží pomocí trojcestného kohoutu hladina kapaliny tak, aby odpovídala poloze spodní značce (a). Kohout se uzavře a změří se čas potřebný k tomu, aby hladina dosáhla horní značky (b). Kohout se otevře a pokračuje se v destilaci, destilační rychlost se upraví vhodným zahříváním. Destilace probíhá přibližně 30 min, poté se zahřívání přeruší a po nejméně 10 min se odečte objem *xylenu* v dělené trubici.

Do baňky se převede předepsané množství drogy a pokračuje se v destilaci výše uvedeným způsobem po předepsanou dobu a předepsanou rychlostí. Pak se zahřívání ukončí a po 10 min se odečte objem kapaliny v dělené trubici, od něhož se odečte dříve zaznamenaný objem *xylenu*. Rozdíl vyjadřuje obsah silice ve zkoušené droze. Výsledek se přepočítá na obsah mililitrů na 1000 g drogy.

Má-li být silice použita pro další analytické účely, oddělí se její bezvodá část s *xylem*em následujícím způsobem. Vyjme se zátka *K'* a přidá se 0,1 ml roztoku *fluoresceinu*, *sodné soli R* (1 g/l) a 0,5 ml *vody R*. Pomocí trojcestného kohoutu se vypustí směs *xylenu* a silice do kulovité části *L* a po 5 minutách stání se vypouští pomalu tak, aby hladina klesla na úroveň kohoutu *M*. Kohoutek se točí zprava doleva tak, aby vytekla voda ze spojovací trubice *BM*. Pomocí nálevky *N* promyjeme trubicí *acetone*m *R* a malým

množstvím *toluenu R*. Kohout se otočí zprava doleva a směs xylenu a silice se vypustí do vhodné baňky.

3.9.2 Kvalitativní hodnocení silic

Mezi v současné době nejvýznamnější a zároveň nejpoužívanější metody detekování jednotlivých látek patří chromatografické metody, které jsou jak metodami separačními, tak analytickými. Základní princip chromatografických metod spočívá v rozdělování neboli separaci složek směsí, které jsou obsaženy ve vzorku (Čevela, 2014).

Chromatografické metody umožňují jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. Výsledkem kvalitativní analýzy je zde určení látek, které jsou v analyzovaném vzorku obsaženy. Výsledkem kvantitativní analýzy je zjištění, v jaké koncentraci jsou jednotlivé složky ve směsi obsaženy (Motyka, Hlaváč, 2009).

Plynová chromatografie

Kvalitativní hodnocení silic provádíme pomocí plynové chromatografie, což je separační metoda, při které se oddělují složky obsažené ve vzorku. U chromatografie se vzorky vnášejí mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek umístíme na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované (Klouda, 2003).

V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek.

Pro nutnost přeměny analytů v plyny můžeme separovat takové látky, které mají dostatečný tlak syté páry, jsou tepelně stálé a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000. Obecně může být plynová chromatografie použita k separaci plynů, většiny nedisociovatelných kapalin a pevných organických molekul a mnoha organokovových látek. Není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí (Klouda, 2003).

Hlavními částmi plynového chromatografu jsou: regulátor průtoku nosného plynu, nástřikový port, separační kolena a detektor (Obr. 5). Plynový chromatogram je připojen ke zdroji nosného plynu a k zařízení, které je schopné zpracovat signál z detektoru. Výsledný vytištěný záznam chromatografické analýzy se nazývá chromatogram (Pěnčíková, 2003).

Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon. Hojně využívaný vodík má zásadní nevýhodu – je hořlavý a explozivní. Volba nosného plynu je často určena druhem kolony a detektoru.

Čistící zařízení zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu. Zbavuje nosný plyn nežádoucích stop ostatních plynů.

Regulační systém zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu. Elektronickou regulací lze docílit stanoveného průtoku i při změnách teploty během separace.

Dávkovač slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Technika dávkování musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase. Roztoky dávkujeme injekčními stříkačkami (0,1 – 10 μ l) přes pryžové septum. Hovoříme o nástřiku vzorku (Klouda, 2003).

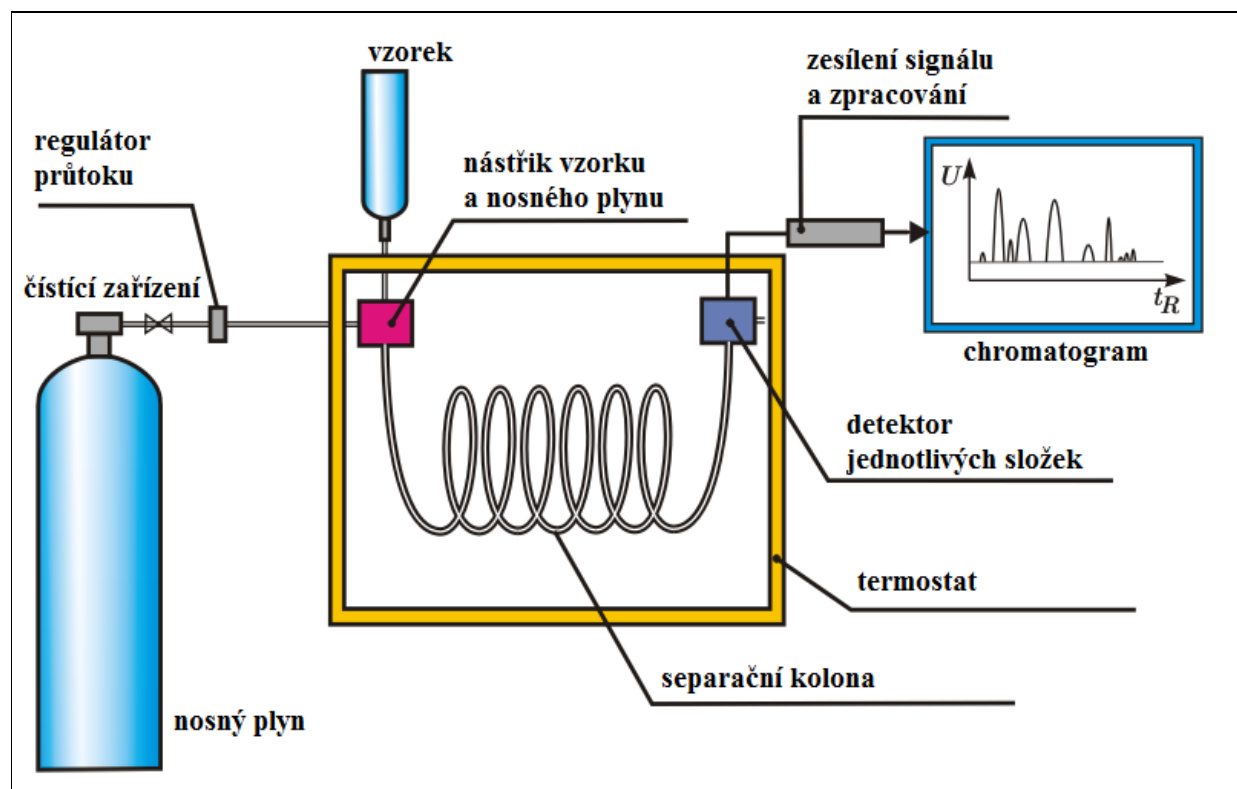
Separační kolona je nejdůležitější součástí plynového chromatografu. Současná plynová chromatografie používá hlavně kapilární kolony. Kapilární kolona je tvořena kapilárou z taveného křemene, která je z venku potažena filmem polymeru. Kapilára je umístěna na kruhovém držáku, na kterém je stočena dokola a tento držák s kolonou je upevněn uvnitř chromatografu. Vnitřní stěna kapiláry je pokryta filmem kapaliny, který představuje vlastní stacionární fázi. Právě vlastnosti chemické látky, která tvoří film (zejména polarita), zcela zásadně rozhodují o tom, jaké směsi je možno na dané koloně rozdělovat na jednotlivé složky (Kvasnicová, 2004).

Termostat udržuje konstantní teplotu separační kolony během analýzy nebo teplotu plynule mění podle nastaveného programu (Kvasnicová, 2004). Běžně pracujeme při teplotách 50 – 300 °C (Klouda, 2003).

Pro plynovou chromatografii existuje více různých typů **detektorů**. Volba detektoru závisí na aplikaci a na cíli analýzy. Jednotlivé typy detektorů se liší jak principem funkce a

konstrukcí tak i selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem (Kvasnicová, 2004).

Vyhodnocovací zařízení zpracovává signál z detektoru, zakresluje chromatografickou křivku a provádí její vyhodnocení (Klouda, 2003).



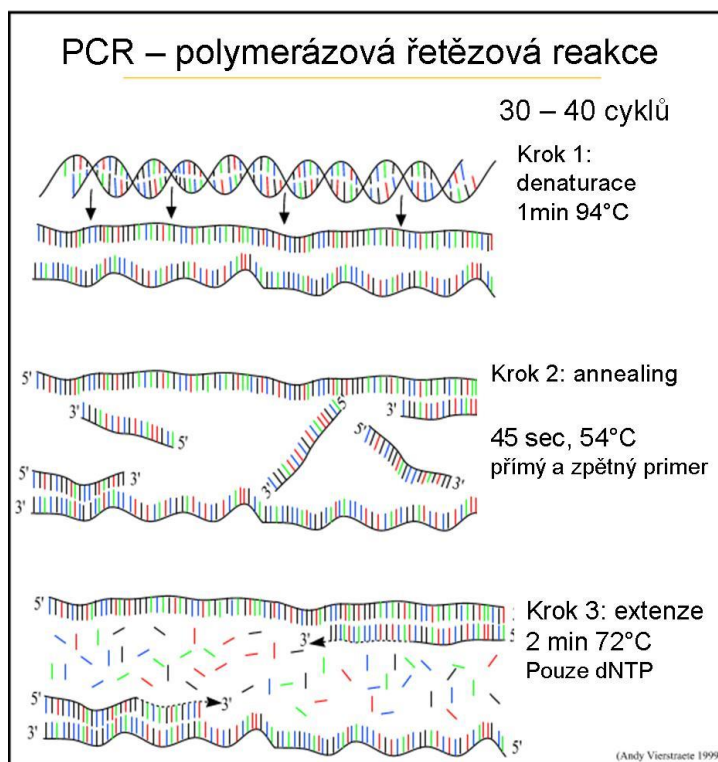
Obrázek č. 5 Popis plynové chromatografu (Jurdáková, 2008)

3.10 Molekulární metody vhodné pro studie genetických vztahů

Nejčastěji používané metody, které objasňují genetickou diverzitu a polymorfismus, jsou AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – Délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Polymorfismus náhodně amplifikované DNA) a SSR (Simple Sequence Repeats – Tandemová opakování krátkých motivů). Uvedené metody jsou založeny na principu PCR (Polymerase Chain Reaction – Polymerázová řetězová reakce), (Valpuesta, 2002; Schlötterer, 2004).

V metodě PCR je používána amplifikace specifického úseku jaderné DNA. PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky,

během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu a fragmenty DNA se množí exponenciální řadou: denaturace dvouřetězcové DNA při teplotě 94 °C, annealing (nasedání) primerů k odděleným řetězcům DNA při teplotě 30 až 65 °C a následuje syntéza nových řetězců DNA za použití DNA-polymerázy při teplotě 65 až 75 °C. Tento proces se cyklicky opakuje 30 až 50 krát (Cuřínová, 2008).



Obrázek č. 6 Princip polymerázové řetězové reakce (Vierstraete, 1999)

Metody RAPD a AFLP amplifikují fragmenty předem necharakterizované, na rozdíl od metody SSR, u které musí být amplifikované sekvence známe. Z výše uvedeného vyplývá, že metody AFLP a RAPD mohou být použity na organismy, pro které neexistují sekvenční informace (Valpuesta, 2002; Schlötterer, 2004).

AFLP a RAPD jsou rozdílné ve kvalitě údajů a genetické variabilitě. Hlavně u samosprašných plodin a inbredních linií vykazují metody AFLP a RAPD podobné zákonitosti, genetické vzdálenosti a informativnosti (Savelkoul, *et al.*, 1999; Archak, *et al.*, 2003). AFLP se vyznačuje vysokou opakovatelností, důkladností, informativností a vykazuje méně reakčních artefaktů oproti metodě RADP (Bleas, *et al.*, 1998).

RAPD - Random Amplified Polymorphis DNA

Tato metoda se používá ve fylogenezi a ke genetickému mapování. Těmito vlastnostmi se zařazuje mezi tzv. semi-kvantitativní metody (Bassam, *et al.*, 1992). RAPD je jedna z metod využívající krátkých syntetických oligonukleotidů o náhodných sekvencích (Williams, *et al.*, 1990).

SSR - Simple Sequence Repeats

Tato molekulární metoda se používá k získání DNA profilu, testování rodičovství, sestavování genetických map a pro populační genetické studie. Metodou lze analyzovat mikrosatelitní sekvence (Tautz, *et al.*, 1986). Mikrosatelity jsou často používány kvůli hypervariabilitě a kodominanci SSR (Powell, *et al.*, 1996).

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

AFLP byla zveřejněna v roce 1995. Od té doby uplynula dlouhá cesta vývoje metody a technických pokroků (Vos, *et al.*, 1995). Využíváme ji pro generování a analýzu výchozích dat. AFLP je vhodnou metodou pro určení rostlin, zvířat, hub a bakterií využívající se v oblastech genetiky, evoluce a ekologie (Bensch, Akesson, 2005). Zvláštním zájem využití AFLP je u generování dat pro fylogenetické studium (Kosman, Leonard, 2005).

AFLP má dva kroky - štípání DNA a amplifikace. Genomová DNA se rozštípe pomocí restričních enzymů (endonukleázami), (Mueller, Wolfenbarger, 1999). Jeden enzym je s průměrnou frekvencí štípání (např. *EcoRI*) a druhý s vyšší frekvencí štípání (např. *MseI* nebo *TaqI*), (Obr. 7A), (Vos, *et al.*, 1995). Na koncích fragmentů vznikají jednovláknové přesahy několika bází. Na tyto konce se vážou tzv. adaptory - krátké syntetické úseky dvouřetězcové DNA o známé sekvenci (Košnar, 2015).

Spojením adaptorů s konci restričních fragmentů zajišťuje enzym T4 DNA ligáza (Obr.7B), (Munclinger, 2015).

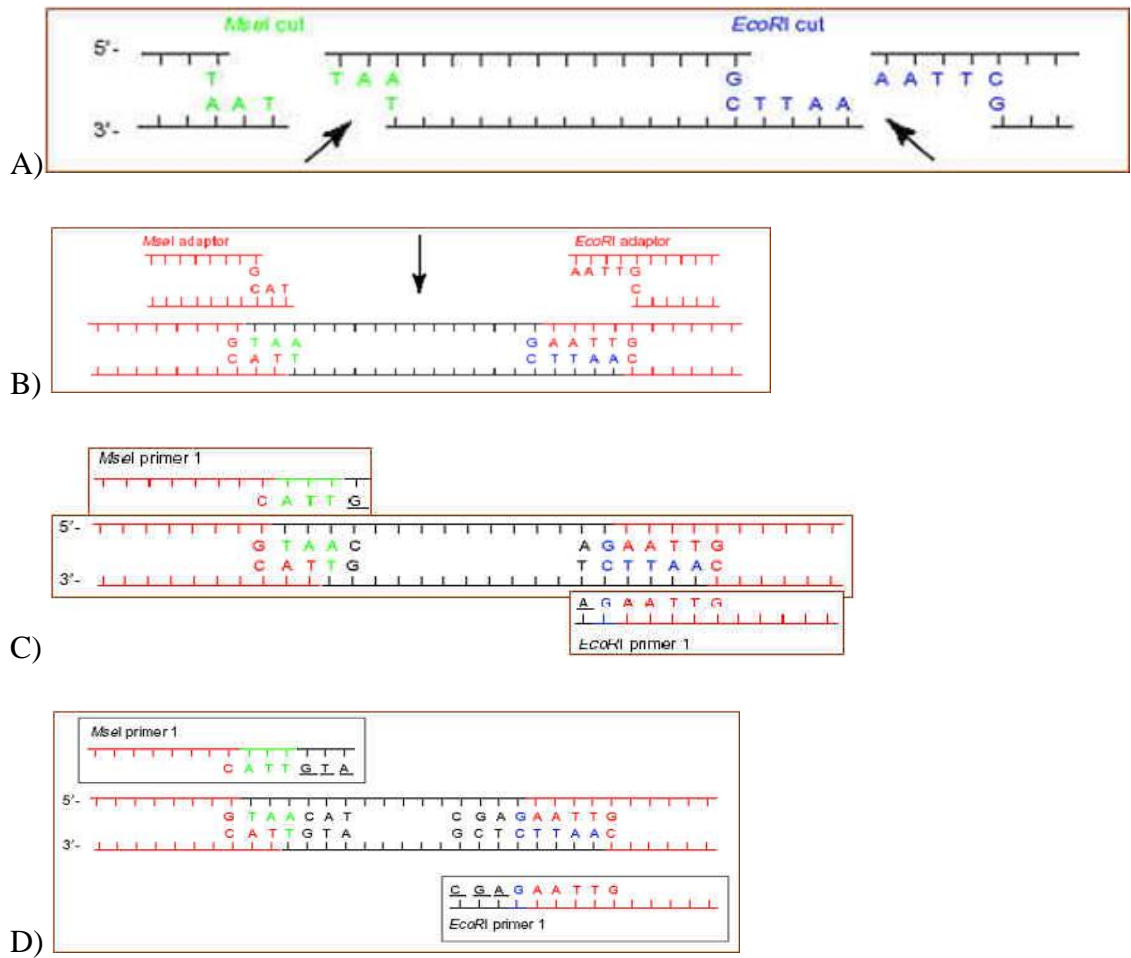
Na alikvótní část je působeno dalšími dvěma PCR amplifikacemi, tento proces probíhá za přísných podmínek, s primery specifickými k adaptorovým sekvencím, které na svém 3' konci zasahují jednou v případě neselektivní - a třemi v případě selektivní amplifikace náhodně zvolenými bázemi do neznámé sekvence restričního fragmentu. Pomocí PCR je amplifikována $\frac{1}{4}$, toto probíhá po preselektivní amplifikaci (Obr. 7C) a po

selektivní amplifikaci $1/124$ nalogovaných restričních fragmentů (Obr. 7D). Po separaci fragmentů pomocí kapilární elektroforézy může být odhaleno 40 až 200 PCR produktů. Polymorfismus AFLP zapříčiňuje mutace v restričních místech nebo vznikají mutace upravující vzdálenost mezi restričními místy (Vos, *et al.*, 1995).

Elektroforéza podskupin fragmentů vede k jedinečnému, reprodukovatelnému, profilu pro každý genotyp (Mueller, Wolfenbarger, 1999). Markery tvořící profil se nejčastěji soustřeďují v centromerických oblastech (Saliba-Colombani, 2000). Přesto jsou široce zastoupeny v celém genomu, což umožňuje hodnotit změny genomu. Tyto anonymní markery se skládají z velké části z nekódující DNA (Shirasawa, *et al.*, 2004).

Celý proces jako je štěpení DNA, ligace a preselektivní amplifikace PCR z časového hlediska je nejlépe dokončit během jednoho dne. Ale pokud je třeba tyto kroky provádět během více dní, je nutné uchovávat jednotlivé kroky v přísných podmínkách, tj. teplota – 4 °C (Clarke, Meudt, 2005).

Dne se používají různé kombinace enzymů, například *EcoRI*, *PstI*, *HindII* nebo *ApaI* kombinace s *MseI* nebo *TaqI*. Fluorescenční značení primerů a jejich detekce pomocí genetických analyzátorů podpořilo širší použití této metody (VOS, *et al.*, 1995; Vannechoutte, 1996).



Obrázek č. 7 Princip metody AFLP (Munclinger, 2015).

4 Materiál a metody

4.1 Charakteristika pokusného stanoviště

Pokusné plochy s dobromyslí byly založeny v Experimentální zahradě ZF MENDELU, viz obrázek 1 v příloze. Zahradnická fakulta se nachází v obci Lednice v povodí řeky Dyje v nadmořské výšce 171 m. Obec leží v teplé oblasti s mírnou zimou (Vachůn, 2011).

Území patří mezi geologicky mladší čtvrtohory. Půdní typ je zde nivní až degradovaná černozem a půdní druh je hlinitopísčítý, středně těžký. Matečným substrátem jsou spraše. Ornice je 0,30 – 0,35 m hluboká a humusovitá. Hladina spodní vody je v rozmezí 0,8 až 1,2 m podle půdního povrchu. Půdní reakce (pH/KCl) je neutrální až zásaditá (Krška, Nečas, 2005).

Jedná se o výrobní typ kukuřičný, kde dlouhodobý průměr ročních srážek (1991 - 2010) je 532,11 mm a průměrná roční teplota je 10,08 °C, délka slunečního svitu je průměrně 2810,33 hodin ročně. Během vegetačního období (květen-září) je průměrná teplota 16,79 °C a průměrný úhrn srážek 344,75 mm. Nejchladnější měsíc je leden s průměrnou teplotou -0,55 °C a nejteplejší měsíc je červen s teplotou v průměru 20,71 °C (Vachůn, 2011).

Průměrná roční teplota v roce 2014 byla 11,14 °C a průměrný roční úhrn srážek byl 572,40 mm. Délka slunečního svitu byla 1754,50 hodin ročně. Nejchladnější měsíc byl leden s průměrnou teplotou 1,50 °C. Nejteplejší měsíc roku byl červenec s průměrnou teplotou 21,30 °C. Během února až srpna, kdy byly rostliny dobromysli sledovány a hodnoceny, byla průměrná teplota 13,64 °C, průměrné množství srážek bylo 324,10 mm a délka slunečního svitu byla 1341,00 hodin (Vachůn, 2015), viz tabulka č. 1, podrobnější údaje uvádí tabulka 1 v příloze.

Tabulka č. 1 Meteorologické údaje v roce 2014

měsíce	průměrná denní teplota [°C]	srážky [mm]	sluneční svit [hod.]
Leden	1,5	6,3	53,8
Únor	3,2	6,3	81,2
Březen	8,1	4,0	203,1
Duben	11,6	20,6	174,0
Květen	14,6	46,2	195,3
Červen	18,8	31,4	265,3
Červenec	21,3	69,6	243,5
Srpen	17,9	146,0	178,6
Září	15,4	166,0	146,7
Říjen	11,0	30,1	96,3
Listopad	7,4	25,2	42,1
Prosinec	2,9	20,7	74,6
Průměr	11,14	572,40	1754,50

4.2 Rostlinný materiál

Hodnocený sortiment rodu *Origanum* L. obsahoval 10 položek, původ těchto rostlin je následující:

Origanum vulgare L.

a) 41-Kyrgyzstan

Původ je v Kyrgyzstanu. Semena byla získána sběrem z volně rostoucích rostlin dne 13. 09. 2009. Místo sběru je zhruba 50 km vzdálené od obce Boseri v provincii Issyk Kul v nadmořské výšce 1600 m. Botanický popis odpovídá všeobecné charakteristice druhu *Origanum vulgare*, uvedené v kapitole 3.2.

b) 43-Kyrgyzstan

Semena rostlin byly získány v Kyrgyzstánu sběrem, který se uskutečnil 14. 09. 2009 v lokalitě Jenči-Lesh v nadmořské výšce 2300 m. Základní botanický popis odpovídá kapitole 3.2.

Origanum vulgare 'Aureum'

Origanum vulgare 'Variegatum' (syn. *Origanum vulgare* 'Country Cream')

Origanum vulgare 'Thumble's Variety'

Origanum vulgare 'Aureum Crispum'

Origanum vulgare 'Compactum'

Tyto taxony pochází ze Zahradnictví v Teplé, nadmořská výška 690 m. n. m.

Origanum hirsutum Kuntze

Tento druh byl získán z Centra léčivých rostlin Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně na Kraví hoře, nadmořská výška 282 m. n. m.

Origanum vulgare 'Diabolo'

Tohoto zástupce doplnil Ing. Rehuš (Skalica, Slovensko) z vlastní sbírky.

Origanum vulgare

Dobromysl pochází z firmy Planta Naturalis v Markvarticích v nadmořské výšce 356 m. n. m. (Voda, 2008).

Sadba čtyř položek (*Origanum vulgare* 41-Kyrgyzstan, *Origanum vulgare* 43-Kyrgyzstan, *Origanum hirsutum* a *Origanum vulgare* z Planta Naturalis) byla předpěstována ve skleníku Experimentální zahrady ZF MENDELU. Ostatních 6 položek pocházelo z obchodní sítě a byly distribuovány v hrnkách, potřebné množství bylo získáno dělením této sadby, viz tabulka č. 2.

Rostliny (*Origanum vulgare* 41-Kyrgyzstan, *Origanum vulgare* 43-Kyrgyzstan, *Origanum vulgare* 'Aureum', *Origanum vulgare* 'Variegatum', *Origanum vulgare* 'Thumble's Variety', *Origanum vulgare* 'Aureum Crispum' a *Origanum hirsutum* Kuntze) byly na stanoviště vysazeny 15. 07. 2012 ve sponu 0,50 x 0,30 m, každý taxon v počtu 10 kusů. Druhý termín výsadby položek sortimentu (*Origanum vulgare* 'Compactum', *Origanum vulgare* 'Diabolo' a *Origanum vulgare* z Planta Naturalis) byl vysazen 21. 05. 2013 ve sponu 0,60 x 0,40 m a opět bylo vysazeno 10 kusů od každého taxonu.

Rostliny byly na pozemku vysazeny v pořadí tak, jak je uvedeno níže (Tab. 2). Číslo řádku v tabulce č. 2 odpovídá označení vzorků pro další hodnocení. Počet rostlin se od termínu výsadby změnil. Pravděpodobně to bylo zapříčiněno vymrznutím rostlin. Plánek výsadby je uveden v příloze jako obrázek 2.

Tabulka č. 2 Přehled taxonů rodu *Origanum* L. (aktuálně k 28. 02. 2014)

řádek	druh	kultivar	počet (ks)	původ	množení
1	<i>Origanum vulgare</i>		9	Issyk Kul, Kyrgyzstan	generativní
2	<i>Origanum vulgare</i>		9	Jenči-Lesh, Kyrgyzstan	generativní
3	<i>Origanum vulgare</i>	'Compactum'	9	Zahrada Teplá, ČR	vegetativní
4	<i>Origanum vulgare</i>	'Aureum'	10	Zahrada Teplá, ČR	vegetativní
5	<i>Origanum vulgare</i>	'Variegatum'	8	Zahrada Teplá, ČR	vegetativní
6	<i>Origanum vulgare</i>	'Thumbless Variety'	10	Zahrada Teplá, ČR	vegetativní
7	<i>Origanum vulgare</i>	'Aureum Crispum'	8	Zahrada Teplá, ČR	vegetativní
8	<i>Origanum hirsutum</i>		10	Zaharda LR, Brno, ČR	generativní
9	<i>Origanum vulgare</i>	'Diabolo'	10	Ing. Rehuš, Skalica, SR	vegetativní
10	<i>Origanum vulgare</i>		10	Planta Naturalis, ČR	generativní

4.3 Metodika

4.3.1 Hodnocení morfologických znaků

Jednotlivé rostliny byly hodnoceny během kultivace od února do srpna 2014, celkem 12 krát, tj. od rašení do sklizně. Výška porostu byla měřena kolmo na zemský povrch, ve středu trsů pomocí pravítka. Délka listů byla měřena bez řápíku a šířka listu v nejširší části. Byla zaznamenána výška květenství od nejspodnějšího větvení. Dále byla hodnocena barva listů a květů pomocí RHS Colour Chart. Z každého taxonu bylo vybráno deset kusů (stonků, listů a květenství). Zjištěné hodnoty byly zprůměrnovány.

4.3.2 Hodnocení fenologických fází

Jednotlivé fenologické fáze byly hodnoceny od února až do srpna 2014. Byla zaznamenána doba rašení, počátek kvetení a plné kvetení, které odpovídá době sklizně.

4.3.3 Sběr, sušení a úprava vzorků

Sklizeň probíhala ručně za pomoci zahradnických nůžek 0,1 až 0,15 m nad povrchem půdy. Po sklizni byly vzorky svázané lýkem a označeny. Svazky dobromysli byly sušeny přirozeným prouděním vzduchu. Váha hodnoceného materiálu byla zaznamenávána před sušením a po sušení. Po sušení byly vzorky rostlin uskladněny v papírových pytlích v laboratorních podmínkách. Poté byla droga namleta laboratorním mlýnkem typ IKA MF 10 basic, viz příloha Obrázek 54, (ILABO, Česká republika). Namletá droga (velikost částí 2 mm) byla uložena do papírových sáčků a poté se namletá droga ihned analyzovala.

Před analýzou vzorků byl stanoven obsah sušiny gravimetricky. Toto stanovení probíhalo vysušením vzorků. Teplota sušení byla 105 °C. Navážka byla 3 g nebo 5 g. v hliníkových nádobách, v kterých probíhalo sušení po dobu 4 hodin. Poté byly vzorky vytáhnuty a zakryty víčky v exsikátoru, aby nedošlo k pohlcení vlhkosti ze vzduchu. Při laboratorní teplotě probíhalo zchlazování. Po opětovném zvážení byl stanoven procentuální podíl sušiny ve vzorku. Tyto údaje jsou nutné pro stanovení obsahových látek, výsledek je vztažen na konstatní hmotnost, aby bylo možné porovnání jednotlivých vzorků mezi sebou (Zbiral, 2005).

Ztráty sušením byly vyjádřeny podle rovnice:

$$\% = (a * 100) / b$$

a ... hmotnost drogy v gramech po sušení,

b ... navážka drogy v gramech před sušením, (Škarpa, 2010).

4.3.4 Stanovení silice v rostlinných drogách

Hodnocení obsahu silice (destilací)

Stanovení objemu silice bylo provedeno v laboratoři Ústavu zelinářství a květinářství ZF MENDELU podle upravené metodiky (bez přídavku xylenu) uvedené v Českém lékopisu (2009). Metoda destilace s vodní párou byla provedena na přístroji, viz Obrázek č. 4. Bylo použito důkladně vyčištěného přístroje. Do destilační baňky o objemu 2 litry byla vložena předem namletá droga v množství 30 g a nalita destilovaná voda o objemu 400 ml. Bylo vloženo několik kousků porézního porcelánu a baňku se zábrusem jsme připojili k přístroji. Postranní trubice byla naplněna destilační vodou tak, až přetékala do baňky. Potom byla uzavřena postranní trubice vatou. Kapalina v baňce byla zahřívána do bodu varu. Během destilace byl trojcestný kohout průchozí, aby kapalina proudila přístrojem. Doba destilování byla 2 hodiny.

Po odpočítání objemu silice na stupnici byla silice vypuštěna do vialky, která byla uzavřena plastovým uzávěrem se septem. Vialky byly uskladněny v lednici při teplotě 7 °C. Celý proces destilace proběhl u každého vzorku dvakrát, pak byl stanoven průměrný objem silice z obou vzorků. Výsledky byly přepočítány na obsah silice v ml/kg v sušině.

Stanovení složení silic pomocí metody GC-MC

Vzorky uchované při 7 °C byly následně analyzovány Ing. Michalem Kumštou na Ústavu vinohradnictví a vinařství ZF MENDELU. Stanovení proběhlo na plynovém chromatografu Shimadzu GC-17A, (Korneuburg, Rakousko). 20 µl silice byl rozpustěn v 980 µl cyklohexanu. Poté byla silice zbavena vody bezvodým síranem hořečnatým. Na kolonu byl dávkován 1 µl roztoku silice a detekován za těchto podmínek:

Separace látek probíhala na koloně DB-Wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm filmu) při průtoku helia 1 ml/min a při lineární rychlosti 36 cm/s. Teplota nástřiku byla 210 °C. Teplotní rozsah kolony byl 70 až 250 °C, MS 2 až 60 min, 14 až 254 m/z a teplotního programu:

$T_1 = 60 \text{ °C}$, držena 1 min

$T_2 = 90 \text{ °C}$, 3 °C/min

$T_3 = 114 \text{ °C}$, 1,5 °C/min

$T_4 = 162 \text{ °C}$, 6 °C/min

$T_5 = 202 \text{ °C}$, 4 °C/min

$T_6 = 250 \text{ °C}$, 6 °C/min, držena 5 min

Celková doba analýzy byla 60 minut.

Identita látek, pro které byly k dispozici standardy, byla ověřena porovnáním retenčního času a hmotnostního spektra. Identifikace ostatních látek byla provedena porovnáním hmotnostního spektra s databázemi a porovnáním retenčních indexů s literárními údaji.

4.3.5 Stanovení genetických profilů pomocí metody AFLP

Stanovení genetických profilů proběhlo pod vedením Ing. Jany Čechové a Mgr. Jany Raddové na Ústavu genetiky ZF MENDELU. Vegetační vrcholy hodnocených rostlin byly odebrány ve třech termínech kvůli nedostatečné velikosti. Bylo nutné zachovat stejnou vývojovou fázi a výšku u všech rostlin. K analýze byly použity 30 až 50 mm dlouhé vrcholy rostlin, které byly jako první odebrány dne 24. 03. 2014 u vzorků č. 2, 4, 6 a 9 (Tab. 3). Druhý odběr se uskutečnil dne 04. 04. 2014, kdy byly odebrány vrcholy rostlin č.

1, 5, 7, 8, 10. Vzorek č. 3 (*Origanum vulgare* 'Compactum') byl odebrán kvůli nedostatečné velikosti až 24. 04. 2014. Všechny vzorky byly vloženy do uzavíratelných sáčků a uloženy do hlubokomrazicího boxu při teplotě – 80 °C. Třecí misky s tloučky byly uloženy v hlubokomrazicím boxu. Vzorky pletiv byly homogenizovány v misce za 2° až 3 minuty. Přibližně 100 mg pletiva bylo použito pro izolaci DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit, (Qiagen, Česká Republika).

Tabulka č. 3 Odběr vzorků pro stanovení genetických profilů

řádek	druh	Kultivar	datum odběru
1	<i>Origanum vulgare</i>		04.04.2014
2	<i>Origanum vulgare</i>		24.03.2014
3	<i>Origanum vulgare</i>	'Compactum'	24.04.2014
4	<i>Origanum vulgare</i>	'Aureum'	24.03.2014
5	<i>Origanum vulgare</i>	'Variegatum'	04.04.2014
6	<i>Origanum vulgare</i>	'Thumbless Variety'	24.03.2014
7	<i>Origanum vulgare</i>	'Aureum Crispum'	04.04.2014
8	<i>Origanum hirsutum</i>		04.04.2014
9	<i>Origanum vulgare</i>	'Diabolo'	24.03.2014
10	<i>Origanum vulgare</i>		04.04.2014

Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena podle protokolu od výrobce (Qiagen). Tato metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních kolon. První kolona filtrační zachycuje proteiny, polysacharidy, detergenty a další nečistoty. Druhá kolona vázací zachycuje DNA. Na této druhé koloně následně dochází k promývání DNA od zbytků kontaminantů. Posledním krokem je vymytí elučním roztokem do čisté zkumavky.

- 1) Do mikrozkuavky s homogenizovaným vzorkem bylo napipetováno 400 µl roztoku AP1a 4 µl RNázy A.
- 2) Vodní lázeň byla nastavena na 65 °C. Rozdrcený vzorek byl přidán do mikrozkuavek a směs byla protřepaná na vortexu (třepačce).
- 3) Tato připravená směs byla inkubována 10 min při teplotě 65 °C, během inkubace bylo nutné 2 – 3 krát protřepat, aby došlo k lýzi buněk.

- 4) Poté bylo přidáno 130 μ l pufru P3. Lyzát byl protřepán a inkubován 5 minut na ledu (v mrazícím boxu – 20 °C). Během tohoto procesu došlo k vysrážení proteinů a polysacharidů.
- 5) Lyzát byl stočen a po dobu 5 minut centrifugován při 13000 rpm (revolutions per minute – otáčky za minutu). Lyzát byl přepipetován na fialovou (filtrační) kolonu. Centrifugace proběhla po dobu 2 minut při 13000 rpm. Fáze, která prošla přes kolonu, byla převedena do nové mikrozkušavky o objemu 2 ml. AE pufr byl ohřát pro následné použití při eluci DNA.
- 6) Bylo přidáno 650 μ l pufru AW. Vzorek s pufrém AW1 byl promíchan pipetováním. Směs byla převedena na bílou (vázací) kolonu (vzorek se na bílou kolonu nevejde celý, tzn. byl proveden na 2x).
- 7) Následně byla kolona centrifugována 1 minutu při 6000 g (8000 rpm). Frakce prošlá kolonou byla vylita. DNA byla zachycena na koloně. Se zbytkem roztoku (viz bod 6) byl proces zopakován.
- 8) Kolona byla přemístěna do čisté 2 ml mikrozkušavky. Dále bylo přidáno 500 μ l pufru AW2. Kolona byla centrifugována po dobu 1 minuty při 6000 g (8000 rpm). Frakce prošlá kolonou byla vylita. V této fázi došlo k promývání vzorku.
- 9) Poté bylo přidáno dalších 500 μ l pufru AW2 a opět bylo centrifugováno na dobu 2 minut při 20000 g. Kolona byla přemístěna do nové mikrozkušavky tak, aby se nedostala do kontaktu s proslou fází.
- 10) Následně bylo přidáno 50 μ l předehřátého pufru AE a inkubováno 5 min při pokojové teplotě. Centrifugace proběhla 1 minutu při 6000 g (8000 rpm).
- 11) Nakonec bylo opět přidáno 50 μ l předehřátého pufru AE a inkubováno po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Centrifugace proběhla 1 min při 6000 g (8000 rpm). Vyizolovaná DNA byla uskladněna v mrazícím boxu při teplotě - 20 °C.

Kontrola kvality izolované DNA

Bylo nutné zkontrolovat kvalitu DNA pomocí elektroforetické separace na agarózovém gelu s přísadkou 150 ml TRIS – acetátového pufru (TAE). DNA se separuje elektroforeticky na základě svého náboje a molekulární hmotnosti. Délka doby elektroforetické separace je závislá na požadované délce dráhy migrace, protékajícím elektrickým proudem, použitým elektroforetickým pufrém a na koncentraci agarózy v gelu.

Pro analýzu kvality se připravil 1 % agarózový gel a přidal se pufr. Následně byla směs rozvařena v mikrovlnné troubě, do dokonalého rozpuštění agarózy. Směs se chladila asi na 60 °C za stálého míchání. Do zchlazené směsi bylo přidáno 6 µl interkalačního barviva Gel Red® firmy Biotium a následně byla směs přelita do připravené elektroforézni vaničky s připravenými hřebeny. Ze ztuhlé agarózy byl opatrně vytažen hřeben. Do jednotlivých komůrek bylo napipetováno 15 µl DNA templátu smíchaného s 4 µl dávkovacího pufru. Do posledních dvou komůrek byl napipetován hmotnostní standard λ-DNA v dávkách 200 µg a 100 µg. Elektroforéza probíhala za standardních podmínek v TAE pufru 1 x při napětí 8 V/cm vzdálenosti mezi elektrodami. Po uplynutí 45 minut byl gel vyjmut z elektroforézy a při prosvícení transiluminátorem byl pořízen snímek.

Koncentrace DNA byla měřena na přístroji Modulus TM Single Tube Fluorometer 9200 – 000 od firmy TURNER BIOSYSTEM. Měření koncentrace DNA bylo provedeno na bázi fluorescence barviv interkalujících do dvoušroubovice DNA. K barvení vyizolované DNA bylo aplikováno barvivo Quant-i TTMPicoGreen® ds DNA Assay Kit firmy Invitrogen TM. Pomocí TE pufru (50 x) byla naředěna získaná DNA. Dále bylo naředěno i fluorescenční barvivo pufr (200 x). K 50 µl ředěné DNA bylo doplněno 50 µl ředěného fluorescenčního barviva a vzorek byl pořádně smíchán na vortexu a napipetován do skleněných kyvet. Koncentrace DNA byla vyměřena na fluorometru. Výsledná hodnota byla měřena v µg/ml, tato hodnota byla následně přepočtena na µg/µl.

AFLP

Byl připraven RE mastermix, který se skládá z 10 x NEB pufr 2 v množství 1 x, na 1 vzorek 4 µl, *EcoRI* (20000U/ml) v množství 10 U, na 1 vzorek 0,5 µl a *MseI* (10000U/ml) v množství 2 U, na 1 vzorek 0,2 µl, (Tab. 4).

Tabulka č. 4 Příprava RE mastermixu

	koncentrace	množství na 1 vzorek
10 x NEB pufr 2	1 x	4 µl
<i>EcoRI</i> (20000U/ml)	10 U	0,5 µl
<i>MseI</i> (10000U/ml)	2 U	0,2 µl

Předem jsme si vypočítali složení směsi vody a DNA tak, aby ředění DNA bylo 180 ng v reakci a aby výsledný objem byl 35,3 µl (Tab. 5). Vypočítané množství DNA s HPLC

vodou jsme napipetovali do mikrozkušavek, a poté jsme přidali pipetou 0,2 ml RE mastermixu po 4,7 μ l.

Tabulka č. 5 Příprava DNA na 180 ng vstupující do reakce

Vzorek	ng/ml	ng/ μ l	μ l DNA	μ l H ₂ O
1	145,75	14,575	12,3	23,0
2	52,78	5,278	34,1	1,2
3	80,80	8,080	22,3	13,0
4	62,04	6,204	29,0	6,3
5	51,26	5,126	35,1	0,2
6	77,06	7,706	23,4	11,9
7	218,79	21,879	8,2	27,1
8	117,25	11,725	15,4	19,9
9	51,17	5,117	35,2	0,1
10	50,55	5,055	35,6	-0,3

Restrikční reakci (celkem 40 μ l) jsme nechali probíhat při 37 °C po dobu 3 hodin. Po skončení restrikční reakce bylo možné provést inaktivaci, která spočívá v působení 65 °C po dobu 30 minut (Tab. 6).

Tabulka č. 6 Příprava ligázové reakce

k 40 μ l z Re reakce přidáme	koncentrace	na 1 vzorek
adaptor pro <i>Mse</i> I	50 pM	1,00 μ l
adaptor pro <i>Eco</i> RI	5 pM	1,00 μ l
ATP	100 mM	0,45 μ l
T4 DNA ligáza	100 U	0,25 μ l
NEB pufr 2	1x	0,50 μ l
d. i. H ₂ O		1,80 μ l

Ke každému ze vzorků bylo přidáno 5 μ l tohoto mastermixu. Celkový objem byl 45 μ l. Inkubace proběhla přes noc při teplotě 16 °C.

Produkt ligace je primární templát, který vznikl ředěním 10 krát pro pre-amplifikaci. Takto ředěný templát lze uchovat buď při 2 až 6 °C po dobu jednoho měsíce, nebo pro delší uchování jsou zvoleny teploty -15 až -25 °C.

Bylo možné zkontrolovat amplifikované produkty na gelu. Byl připraven 2 % agarózový gel. Do jednotlivých komůrek bylo napipetováno 15 μ l naamplifikovaného

vzorku. Velikost produktů byla sledována podle délkového standardu 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), (kilobase pair – jednotka délky nukleotidových kyselin, která se rovná 1000 párů bází).

Pre-amplifikace primárního templátu; k přípravě 10 x ředěného primárního templátu byl do mastermixu pro 1 reakci přidán 1,00 µl Primer *EcoRI*- Preamp (100 ng/µl), dále 1,00 µl Primer *Mse*-Preamp (100 ng/µl), 5,00 µl PCR buffer 10 x (NEB), 0,50 µl dNTPs (25mM) (Promega), 0,625 µl Taq-Polymeráza (NEB) a 31,875 µl HPLC H₂O, (Tab. 7).

Tabulka č. 7 Příprava master mixu pro pre-amplifikace primárního templátu

	koncentrace	množství
Primární templát 10 x ředěný		10,00 µl
Primer <i>EcoRI</i> - Preamp	100 ng/µl	1,00 µl
Primer <i>Mse</i> -Preamp	100 ng/µl	1,00 µl
PCR buffer	10 x	5,00 µl
dNTPs	25 mM	0,50 µl
Taq-Polymeráza	2U	0,625 µl
d. i. H ₂ O		0,625 µl
Celkový objem vzorku		50,00 µl

Amplifikační program: (94 °C, 45 sec; 52 °C, 45 sec; 7 2°C, 60 sec) 20 cyklů

Sekvence preselektivních primerů:

EcoRI + A 5'-GACTGCGTACCAATTCA

MseI + 0 5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA

Kontrola Pre-Amplifikovaných produktů byla provedena na agarózovém gelu a stanovena koncentrace DNA. Cílem této kontroly bylo odhalit případné nesprávně amplifikované vzorky. Bylo použito 10 µl vzorku na 2 % agarózový gel, do kterého bylo přidáno interkalační barvivo Gel Red® firmy Biotium. Při vyhodnocování by se měl vzorek projevit jako smír v rozmezí fragmentů o velikosti (50 – 700) pb. Neměly by být viditelné smíry o velikost 2 kb a žádná rezidua v okolí komůrek.

Koncentrace DNA byla změřena pomocí přístroje (Modulus™ Single Tube Operating Manual 9200 – 000 od firmy Turner BioSystems). Koncentrace DNA je měřena na bázi fluorescence barviv interkalujících do dvoušroubovice DNA. K barvení

vyizolované DNA byl použit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen™). Získaná DNA byla naředěna TE pufrem 50 x. Fluorescenční barvivo bylo naředěno pufrem 200 x množství odpovídajícímu celkovému počtu analyzovaných vzorků. K 50 µl ředěné DNA bylo přidáno 50 µl ředěného fluorescenčního barviva a vzorek byl důkladně promíchán na vortexu a napipetován do skleněných kyvet. Na fluorometru byla naměřena koncentrace DNA.

Na základě změřené koncentrace byl zředěn vzorek na koncentraci 2 ng/µl. Tento vzorek tzv. „sekundární templát“ byl následně použit jako templát pro selektivní amplifikaci pro konečnou AFLP analýzu.

Selektivní amplifikace – premix

K 5 µl sekundárního templátu (2 ng/µl) byl přidán značený primer 1 (*EcoRI*-A + NN) v množství 0,5 µl, primer 2 (*MseI* + NN) v množství 0,3 µl, 10 x PCR buffer v množství 1,5 µl, dNTPs (25 mM) v množství 0,12 µl, Taq-Polymeráza (NEB, 2 U/µl) v množství 1,0 µl a H₂O v množství 6,58 µl, (Tab. 8).

Tabulka č. 8 Příprava Selektivní amplifikace – premix

	koncentrace	množství
Primer 1 (<i>EcoRI</i> -A + NN)	2 pmol/µl	0,50 µl
Primer 2 (<i>MseI</i> + NN)	50 pmol/µl	0,30 µl
PCR buffer	10 x	1,50 µl
dNTPs	25 mM	0,12 µl
Taq- Polymeráza (Dynazyme II)	2 U	1,00 µl
H ₂ O		6,58 µl
20x / 50x dilution secondary template	2 ng/µl	5,00 µl
Celkový objem vzorku		15,00 µl

Primery:

EcoRI+NN:

EcoRI-ACA(FAM) : 5'-GACTGCGTACCAATTCACA – modrá

EcoRI-AGC(NED) : 5'-GACTGCGTACCAATTCAGC - žlutá

EcoRI-ACG(JOE) : 5'-GACTGCGTACCAATTCACG - zelená

MseSA+NN: 5'-GATGAGTCCTGAGTAANN-3', kde NN jsou tyto dvojkombinace: AC, AG, CC, CG.

Pro amplifikaci v termocykleru byl použit tzv. touch-down teplotní profil. Po úvodní denaturaci při 94 °C po dobu 3 minut následovalo:

10 x – 94 °C, 30 sekund, 65 až 56 °C, s poklesem 0,7 °C v každém cyklu, 30 sekund, 72 °C, 60 sekund

24 x – 94 °C, 30 sekund, 56 °C, 30 sekund, 72 °C, 60 sekund

Analýza na ABI-PRISM 310

Pro analýzu na přístroji ABI-PRISM 310 byl použit filtr F, separace proběhla v kapiláře přeplněné polymerem POP4. Velikostní standard byl použit GeneScan™ 500 ROX™ od firmy Applied Biosystems®. Po selektivní amplifikaci byly jednotlivé primerové kombinace získané pro daný vzorek smíchány v poměru: 8 µl NED (žlutá) + 2,4 µl modrá (FAM) + 4 µl zelená (JOE).

Z takto připravené směsi byly vzorky rozpipetovány po 2 µl. Ke každému vzorku bylo přidáno 12 µl formamidu a 0,5 µl GeneScan™ 500 ROX™ velikostní standard. Následovala denaturace 5 minut při 95 °C, poté byly okamžitě převedeny na led. Poté proběhla vlastní analýza na ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer firmy Applied Biosystems®.

Spektra jednotlivých položek byla získána použitím programu GeneScan® Analysis Software od firmy Applied Biosystems®. Tento program vytváří více hodnotících panelů a umožňuje překryv vzorků v daném panelu (Obr. 8). Vyhodnocení a posuzování jednotlivých fragmentů bylo poměrně přesné v celé hodnocené skupině taxonů. U dané primerové kombinace byla následně vyhodnocena přítomnost a nepřítomnost jednotlivých fragmentů u analyzovaných vzorků do formy binární matice (Tab. 19). Získané výsledky z primerových kombinací byly sloučeny do jedné binární matice. Spektra mezi každými taxony byla zhodnocena na základě Nei and Li podobnostního koeficientu, který byl vypočítán podle vzorce: $IP=N11/(2N11+N01+N10)$

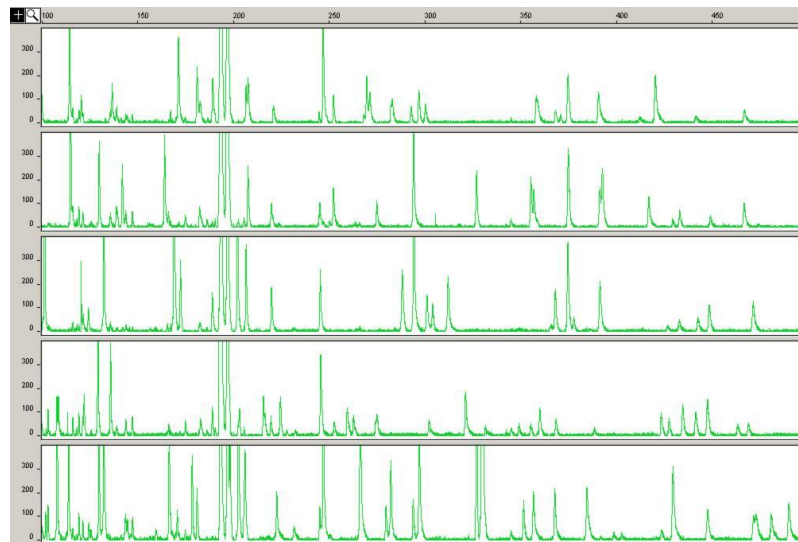
N11 ... vyjadřuje počet společných produktů

N01 ... vyjadřuje počet produktů nepřítomných v prvním vzorku, ale přítomných

v druhém z posuzovaných genotypů

N10 ... vyjadřuje počet případů opačných

Byl aplikován program TreeView verze 1.6.6. firmy Bio-Soft.net Glasgow pro výpočet koeficientů podobnosti (Pavliček, *et al.*, 1999). Na základě získaných koeficientů byl metodou UPGMA zkonstruovaný dendrogram ve stejném programu (Page, 1996)



Obrázek č. 8 Příklad zobrazení produktů AFLP na přístroji GeneScan® (IBL, 2004)

Definice:

Amplifikace – zesílení, při zmnožení DNA

dNTP – deoxynukleotidy, stavební kameny DNA

EcoRI – restrikční enzym, rozpoznává 6bp dlouhou sekvenci DNA, štěpící molekulu v určitém místě

Ligace – spojení dvou řetězců DNA s kovalentní vazbou

Ligáza – enzym spojující dva řetězce DNA a katalyzující tvorbu kovalentní vazby

MseI – restrikční enzym, který rozpoznává 4bp dlouhou sekvenci DNA a štěpí molekulu v určitém místě

Primer – úsek DNA

Taq – polymeráza – DNA dependentní DNA polymeráza izolovaná z prvotní termofilní bakterie *Thermofillus aquaticus*

Templát – jednořetězcový polyribonukleotid, používaný jako zdroj informace při řízené biologické polymeraci

Činidla:

Agaróza

Deionizovaná voda

Ligáza

Restrikční endonukleáza *EcoRI*

Restrikční endonukleáza *MseI*

RNáza A

TRIS

Barviva:

Gel Red® - Biotium

Quant-i TTPicoGreen®ds DNAAssay Kit - Invitrogen

Pufry:

TRIS – acetátový pufr (TAE)

Dávkovací pufr 6x

TE pufr

5 Výsledky

V níže uvedené kapitole bude použito označení jednotlivých druhů a kultivarů pod čísly, které jsou uvedeny v tabulce č. 9.

Tabulka č. 9 Přehled hodnocených taxonů rodu *Origanum* L.

číslo	Druh	kultivar
1	<i>Origanum vulgare</i>	
2	<i>Origanum vulgare</i>	
3	<i>Origanum vulgare</i>	'Compactum'
4	<i>Origanum vulgare</i>	'Aureum'
5	<i>Origanum vulgare</i>	'Variegatum'
6	<i>Origanum vulgare</i>	'Thumbless Variety'
7	<i>Origanum vulgare</i>	'Aureum Crispum'
8	<i>Origanum hirsutum</i>	
9	<i>Origanum vulgare</i>	'Diabolo'
10	<i>Origanum vulgare</i>	

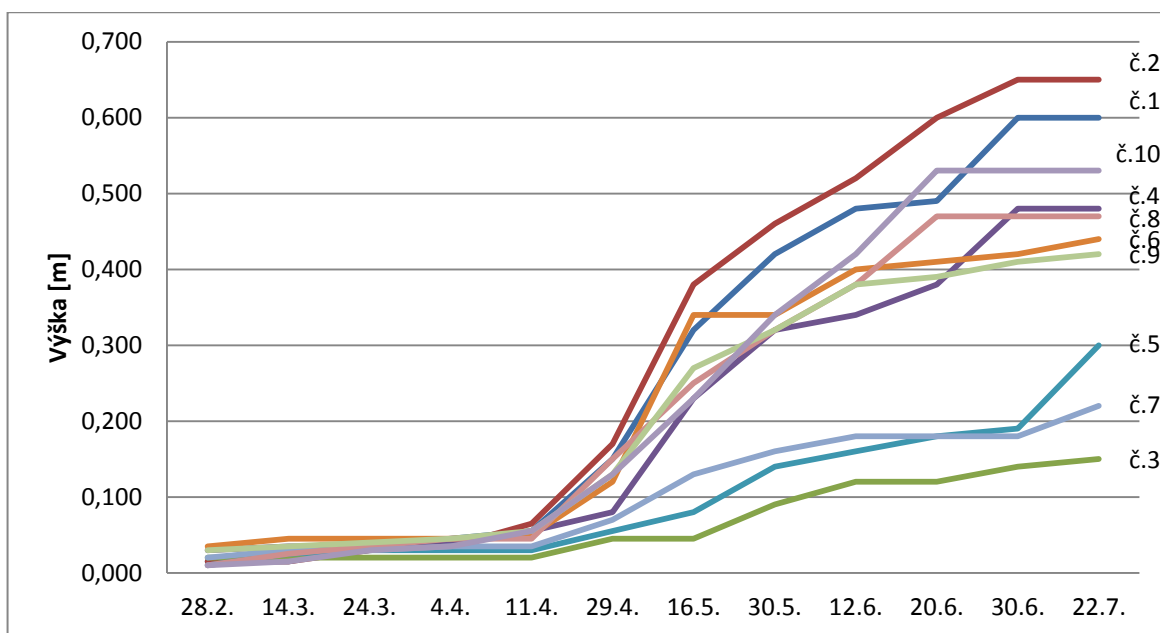
5.1 Hodnocení morfologických znaků

5.1.1 Hodnocení výšky rostlin

Naměřená průměrná výška všech zástupců se pohybovala v rozmezí 0,15 až 0,65 m, nejnižší byla zjištěna u č. 7 *Origanum vulgare* 'Aureum Crispum' s výškou 0,22 m a č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum' s výškou 0,15 m. Naopak nejvyšší taxon byl č. 2 *Origanum vulgare* původem z Kyrgyzstanu s výškou 0,65 m. Tyto rozdíly jsou patrné z grafu č. 1. Podrobněji jsou hodnoty uvedeny v tabulce č. 10.

Tabulka č. 10 Výška rostlin *Origanum* L. [m]

číslo	28.2.	14.3.	24.3.	4.4.	11.4.	29.4.	16.5.	30.5.	12.6.	20.6.	30.6.	22.7.
1	0,015	0,015	0,035	0,045	0,055	0,150	0,320	0,42	0,48	0,49	0,60	0,60
2	0,015	0,015	0,030	0,035	0,065	0,170	0,380	0,46	0,52	0,60	0,65	0,65
3	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,045	0,045	0,09	0,12	0,12	0,14	0,15
4	0,030	0,035	0,035	0,040	0,055	0,080	0,230	0,32	0,34	0,38	0,48	0,48
5	0,010	0,025	0,030	0,030	0,030	0,055	0,080	0,14	0,16	0,18	0,19	0,30
6	0,035	0,045	0,045	0,045	0,050	0,120	0,340	0,34	0,40	0,41	0,42	0,44
7	0,020	0,030	0,030	0,035	0,035	0,070	0,130	0,16	0,18	0,18	0,18	0,22
8	0,010	0,025	0,035	0,045	0,045	0,150	0,250	0,32	0,38	0,47	0,47	0,47
9	0,030	0,035	0,040	0,045	0,055	0,130	0,270	0,32	0,38	0,39	0,41	0,42
10	0,010	0,015	0,030	0,035	0,055	0,130	0,230	0,34	0,42	0,53	0,53	0,53



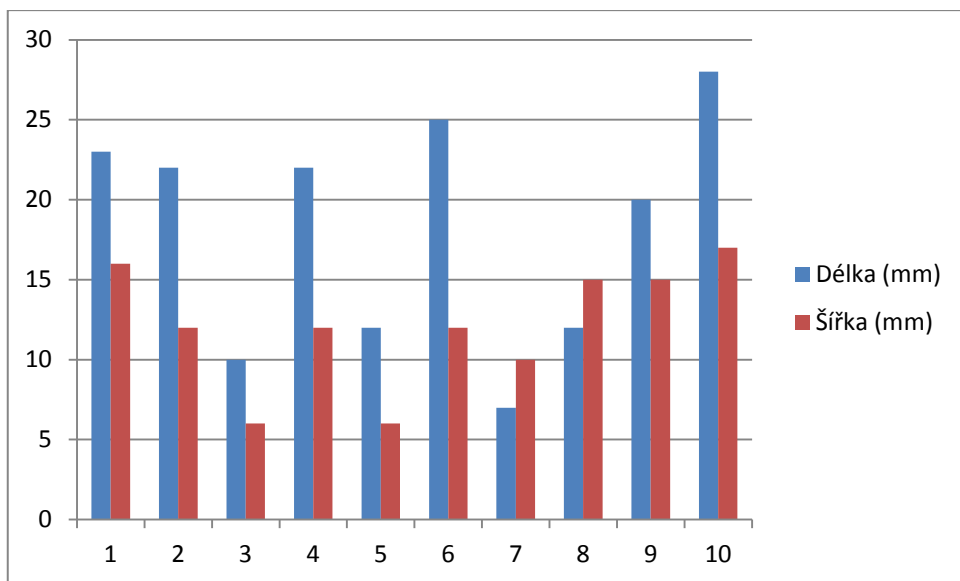
Graf č. 1 Porovnání výšky taxonů rodu *Origanum* L.

5.1.2 Hodnocení délky a šířky listové čepele

Nejdelší listovou čepel má vzorek č. 10 *Origanum vulgare* z firmy Planta Naturalis (28 mm). Nejkratší listovou čepel má vzorek č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum' s délkou 10 mm a č. 7 *Origanum vulgare* "Aureum Crispum" (7 mm). Nejširší list má vzorek č. 10 *Origanum vulgare* z firmy Planta Naturalis široký 17 mm a vzorek č. 4 *Origanum vulgare* 'Aureum' široký 16 mm. Nejužší list má vzorek č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum' (6 mm) a vzorek č. 5 *Origanum vulgare* 'Variegatum' (6 mm). Tyto údaje jsou uvedeny v tabulce č. 11 a znázorněny v grafu č. 2.

Tabulka č. 11 Délka a šířka listové čepele taxonů rodu *Origanum* [mm]

číslo	druh/odrůda	délka	šířka
1	<i>Origanum vulgare</i>	23	16
2	<i>Origanum vulgare</i>	22	12
3	<i>Origanum vulgare</i> 'Compactum'	10	6
4	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum'	22	16
5	<i>Origanum vulgare</i> 'Variegatum'	12	6
6	<i>Origanum vulgare</i> 'Thumbless Variety'	25	13
7	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum Crispum'	7	10
8	<i>Origanum hirsutum</i>	12	15
9	<i>Origanum vulgare</i> 'Diabolo'	20	15
10	<i>Origanum vulgare</i>	28	17



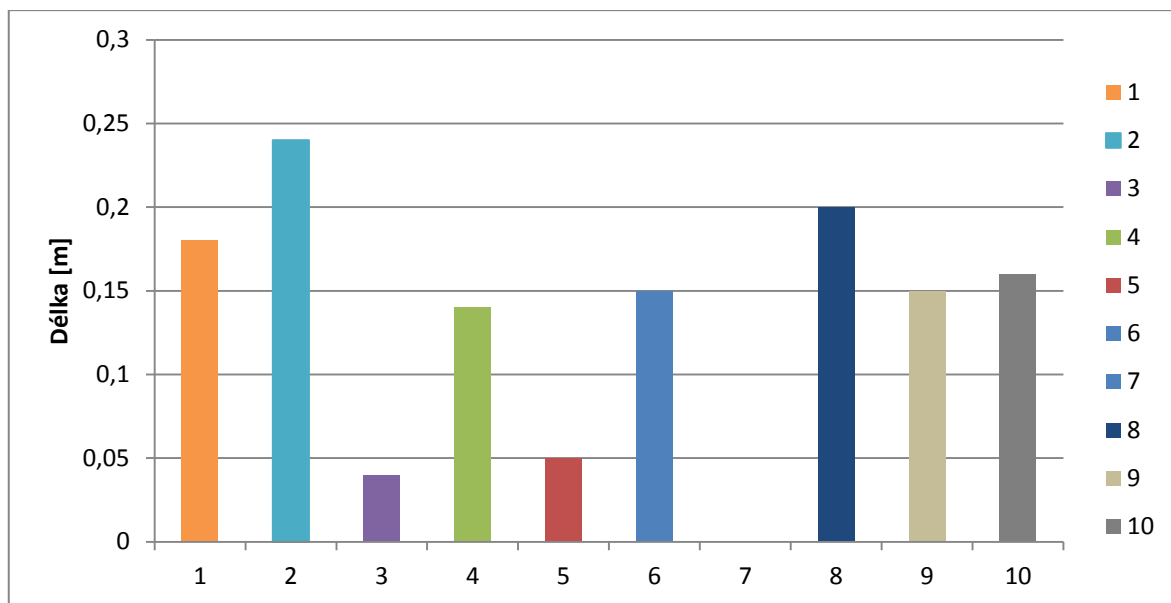
Graf č. 2 Porovnání délky a šířky listové čepele taxonů rodu *Origanum* L. [mm]

5.1.3 Hodnocení délky květenství

Nejdelší květenství má vzorek č. 2 *Origanum vulgare* (0,24 m). Nejkratší a zároveň nejmenší květenství má vzorek č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum' (0,04 m) a vzorek č. 5 *Origanum vulgare* 'Variegatum' (0,05 m). Taxon č. 7 *Origanum vulgare* 'Aureum Crispum' nenakvetl, proto u něj není výška zaznamenaná.

Tabulka č. 12 Délka květenství taxonů rodu *Origanum* L. [m]

číslo	druh/ odrůda	délka
1	<i>Origanum vulgare</i>	0,18
2	<i>Origanum vulgare</i>	0,24
3	<i>Origanum vulgare</i> 'Compactum'	0,04
4	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum'	0,14
5	<i>Origanum vulgare</i> 'Variegatum'	0,05
6	<i>Origanum vulgare</i> 'Thumbless Variety'	0,15
7	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum Crispum'	-
8	<i>Origanum hirsutum</i>	0,20
9	<i>Origanum vulgare</i> 'Diabolo'	0,15
10	<i>Origanum vulgare</i>	0,16



Graf č. 3 Délka květenství taxonů rodu *Origanum* L. [m]

5.1.4 Hodnocení barvy listů a květů

Barva listů u jednotlivých taxonů se pohybovala od zelené (137C Green) až po tmavozelenou (144A Dark green). Barva květů měla větší rozmanitost. U určovaných taxonů se objevuje bílá (N999D White), přes růžovofialovou (75C Pink Violet) a světle fialovou (76B Light Violet) až k tmavě růžovofialové (N80D Dark pink violet) barvě.

Tabulka č. 13 Barva listů a květů taxonů rodu *Origanum* L.

číslo	druh/ odrůda	list	květ
1	<i>Origanum vulgare</i>	144A Dark Green	N80D-Dark Pink Violet
2	<i>Origanum vulgare</i>	137C Green	N80D-Dark Pink Violet
3	<i>Origanum vulgare</i> 'Compactum'	137C Green	75C Pink Violet
4	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum'	144A Dark Green	75C Pink Violet
5	<i>Origanum vulgare</i> 'Variegatum'	137C Green	76B Light Violet
6	<i>Origanum vulgare</i> 'Thumbless Variety'	137C Green až 144A Dark Green	69C Light Violet
7	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum Crispum'	145A Yellow Green	-
8	<i>Origanum hirsutum</i>	137C Green / 144A Dark Green	N999D White
9	<i>Origanum vulgare</i> 'Diabolo'	137C Green / 144A Dark Green	76B Light Violet
10	<i>Origanum vulgare</i>	137C Green	76B-Light Violet

Na základě výše uvedených morfologických znaků můžeme hodnocený sortiment charakterizovat následujícím způsobem:

Origanum vulgare č. 1 je 0,60 m vysoká bylina. Délka listové čepele je 23 mm a šířka je 16 mm. Barva listů je 144A Dark Green (tmavozelená). Výška květenství je 0,18 m. Barva květenství je N80D Dark Pink Violet (tmavě růžovofialová).

Origanum vulgare č. 2 má délku 0,65 m. Délka listové čepele je 22 mm a šířka listů 12 mm. Barva listů je 137C Green (zelená). Výška květenství je 0,24 m. Barva květů v květenství je N80D Dark Pink Violet (tmavě růžovofialová).

Origanum vulgare 'Compactum' č. 3 je 0,15 m vysoká rostlina. Délka listové čepele je 10 mm a šířka v nejširší části je 6 mm. Barva listů podle RHS je 137C Green (zelená). Výška květenství je 0,04 m a jeho barva je 75C Pink Violet (růžovofialová).

Origanum vulgare 'Aureum' č. 4 má délku stonků 0,48 m. Délka listové čepele je 22 mm a šířka je 16 mm. Barva listů je 144A Dark Green (tmavozelená). Květenství má barvu 75C Pink Violet (růžovofialová), výška květenství je 0,14 m.

Origanum vulgare 'Variegatum' č. 5 s délkou stonků 0,30 m, má délku listové čepele 12 mm a šířku listů 6 mm. Barva listů je 137C Green (zelená). Květenství má barvu 76B Light Violet (světle fialová), výška květenství je 0,05 m.

Origanum vulgare 'Thumbless Variety' č. 6 je 0,44 m vysoká bylina. Délka listové čepele je 25 mm a šířka listů má průměr 13 mm. Barva listů se pohybuje mezi 137C Green (zelená) a 144A Dark Green (tmavozelená). Květenství má výšku 0,15 m a její barva je 69C Light Violet (světle fialová).

Origanum vulgare 'Aureum Crispum' č. 7 má délku 0,22 m, Délka listové čepele je 7 mm a šířka listů je 10 mm. Barva listů je 145A Yellow Green (žlutozelená). Tento druh měřený rok nezakvetl.

Origanum hirsutum č. 8 s délkou stonku 0,47 m, má listovou čepel o délce 12 mm a šířku 15 mm. Barva listů je mezi 137C Green (zelená) a 144A Dark Green (tmavozelená). Výška květenství je 0,20 m a barva je N999D White (bílá).

Origanum vulgare 'Diabolo' č. 9 stonky jsou 0,42 m dlouhé, listová čepel je dlouhá 20 mm a široké 15 mm. Barva listů je v rozmezí 173C Green (zelená) a 144A Dark Green (tmavozelená). Délka květenství je 0,15 m má barvu 76B Light Violet (světle fialová).

Origanum vulgare č. 10 je vysoké 0,53 m. Délka listové čepele je 28 mm a šířka listů je 17 mm. Barva listů je 137C Green (zelená). Květenství má velikost 0,16 m a barvu 76B-Light Violet (světle fialová).

5.2 Hodnocení fenologických fází

Doba rašení byla zaznamenána koncem měsíce února 2014, viz tabulka č. 14. Údaje o začátku kvetení se liší. Jedna z prvních rozkvetlých byla dobromysl č. 1 *Origanum vulgare* s původem z Kyrgyzstanu dne 30. 05. 2014. Nejpozději rozkvetly dobromysli č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum' a *Origanum vulgare* 'Variegatum' č. 5 dne 22. 07. 2014.

Doba sklizně se u jednotlivých taxonů liší. První se sklízela dobromysl č. 1 a č. 2 *Origanum vulgare* s původem z Kyrgyzstanu dne 12. 06. 2014 a nejpozději byla sklizena dobromysl č. 5 *Origanum vulgare* 'Variegatum' dne 18. 08. 2014. *Origanum vulgare* 'Aureum Crispum' v daném roce sledování nenakvetla. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 14.

Tabulka č. 14 Fenologické fáze taxonů rodu *Origanum* L.

číslo	druh/ odrůda	rašení	začátek kvetení	plné kvetení = sklizeň
1	<i>Origanum vulgare</i>	28.2.2014	30.5.2014	12.6.2014
2	<i>Origanum vulgare</i>	28.2.2014	12.6.2014	12.6.2014
3	<i>Origanum vulgare</i> 'Compactum'	28.2.2014	22.7.2014	22.7.2014
4	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum'	28.2.2014	20.6.2014	22.7.2014
5	<i>Origanum vulgare</i> 'Variegatum'	28.2.2014	22.7.2014	18.8.2014
6	<i>Origanum vulgare</i> 'Thumbless Variety'	28.2.2014	12.6.2014	22.7.2014
7	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum Crispum'	28.2.2014	-	18.8.2014
8	<i>Origanum hirsutum</i>	28.2.2014	30.6.2014	22.7.2014
9	<i>Origanum vulgare</i> 'Diabolo'	28.2.2014	20.6.2014	23.7.2014
10	<i>Origanum vulgare</i>	28.2.2014	12.6.2014	24.7.2014

5.3 Hodnocení stanovení obsahu silice

Vzorky byly sklizeny v plném kvetení (Tab. 14). Výjimkou byl vzorek č. 7, který byl sklizen, aniž by kvetl 18. 08. 2014. Vzorky byly zváženy před a po sušení. Doba sušení se liší u jednotlivých vzorků (Tab. 15).

Před analýzou obsahu silice byl stanoven obsah sušiny v posuzovaném materiálu pomocí sušení. Navážka byla 5 g kromě vzorku č. 3, u kterého byla navážka snižena na 3 g. Údaje bylo nutné přepočítat pro stanovení obsahových látek v suché droze k porovnání jednotlivých vzorků mezi sebou.

Podle váhy uvedené v tabulce č. 15 je možné stanovit sesychací poměr. Ten vyjadřuje poměr váhy určitého množství čerstvé suroviny k váze drogy, získané po sušení. Sesychací poměr našich vzorků je v rozmezí 3 : 1.

Tabulka č. 15 Váha před a po sušení, doba sušení a sesychací poměr

číslo	Druh	váha před (g)	váha po (g)	doba sušení (dny)	sesychací poměr
1	<i>Origanum vulgare</i>	825	255	18	3 : 1
2	<i>Origanum vulgare</i>	730	210	18	3 : 1
3	<i>Origanum vulgare</i> 'Compactum'	565	170	27	3 : 1
4	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum'	630	210	27	3 : 1
5	<i>Origanum vulgare</i> 'Variegatum'	805	245	18	3 : 1
6	<i>Origanum vulgare</i> 'Thumbless Variety'	550	165	27	3 : 1
7	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum Crispum'	535	155	18	3 : 1
8	<i>Origanum hirsutum</i>	735	210	27	3 : 1
9	<i>Origanum vulgare</i> 'Diabolo'	465	140	27	3 : 1
10	<i>Origanum vulgare</i>	670	185	27	3 : 1

Tabulka č.16 Obsah sušiny v droze [%]

číslo	miska (g)	navážka (g)	váha po sušení (g)	%
1	23,80	5	28,34	90,8
2	23,28	3	25,98	90,0
3	28,17	5	32,69	90,4
4	24,78	5	29,28	90,0
5	24,64	5	29,07	88,6
6	22,29	5	26,76	89,4
7	24,32	5	28,85	90,6
8	24,77	5	29,13	87,2
9	23,29	5	27,78	89,8
10	24,47	5	28,99	90,4

Při stanovení objemu silice pomocí destilace bylo použito 30 g drogy. Z použité drogy bylo získáno určité množství, které jsme odečetli ze stupnice. Každý vzorek jsme stanovili destilací ve dvou opakováních.

Nejvyšší množství silic bylo získáno ze vzorku č. 8 *Origanum hirsutum*, u které byla naměřena hodnota 43,33 ml/kg. Nejnižší množství silic měl vzorek č. 9 *Origanum vulgare* 'Diabolo' s obsahem 0,415 ml/kg.

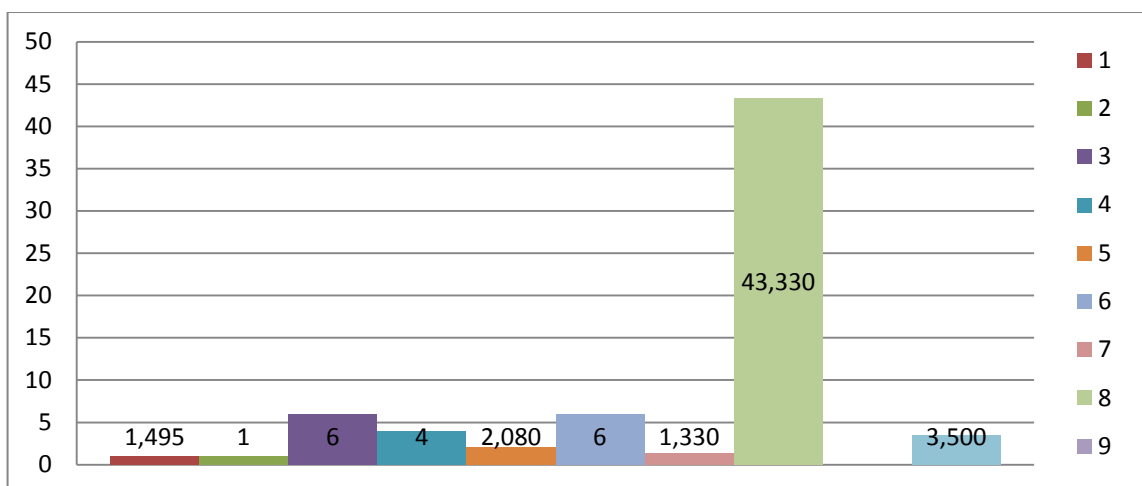
Z výsledků vyplývá, že vzorek č. 8 *Origanum hirsutum*, jako jediný splňuje podmínky ČL z roku 2009, který udává minimální množství 25ml/kg silic. Proto tento druh lze využít pro lékopisné účely.

Podle Českého farmaceutického kodexu z roku 1993 musí nať dobromysli obecné obsahovat nejméně 0,1% (V/m) silice, teda 1 ml/kg. Tyto požadavky byly splněny u 9 taxonů z 10 uvedených. Vzorek č. 9 *Origanum vulgare* 'Diabolo' tyto požadavky nesplnil, obsahoval pouze 0,415 ml/kg silice.

Podle vyhlášky MZe 419/2000 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro koření, jedlou sůl, dehydratované výrobky, ochucovadla a hořčici. Vyhláška tvrdí, že dobromysl by měla obsahovat minimálně 5 ml/kg silice, tento požadavek splňují vzorek č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum', vzorek č. 4 *Origanum vulgare* 'Aureum', vzorek č. 6 *Origanum vulgare* 'Thumbless Variety' a vzorek č. 8 *Origanum hirsutum*, proto jsou vhodné pro použití jako koření.

Tabulka č. 17 Obsah silic [ml.kg⁻¹]

číslo	1.opakování		2.opakování		průměr
	ml	ml/kg	ml	ml/kg	ml/kg
1	0,040	1,33	0,050	1,66	1,495
2	0,035	1,16	0,040	1,33	1,245
3	0,190	6,33	0,200	6,66	6,495
4	0,130	4,33	0,140	4,66	4,495
5	0,060	2,00	0,065	2,16	2,080
6	0,190	6,33	0,185	6,16	6,245
7	0,040	1,33	0,040	1,33	1,330
8	1,350	45,00	1,250	41,66	43,330
9	0,010	0,33	0,015	0,50	0,415
10	0,120	4,00	0,090	3,00	3,500



Graf č.4 Obsah silice u taxonů rodu *Origanum* L. [ml.kg⁻¹]

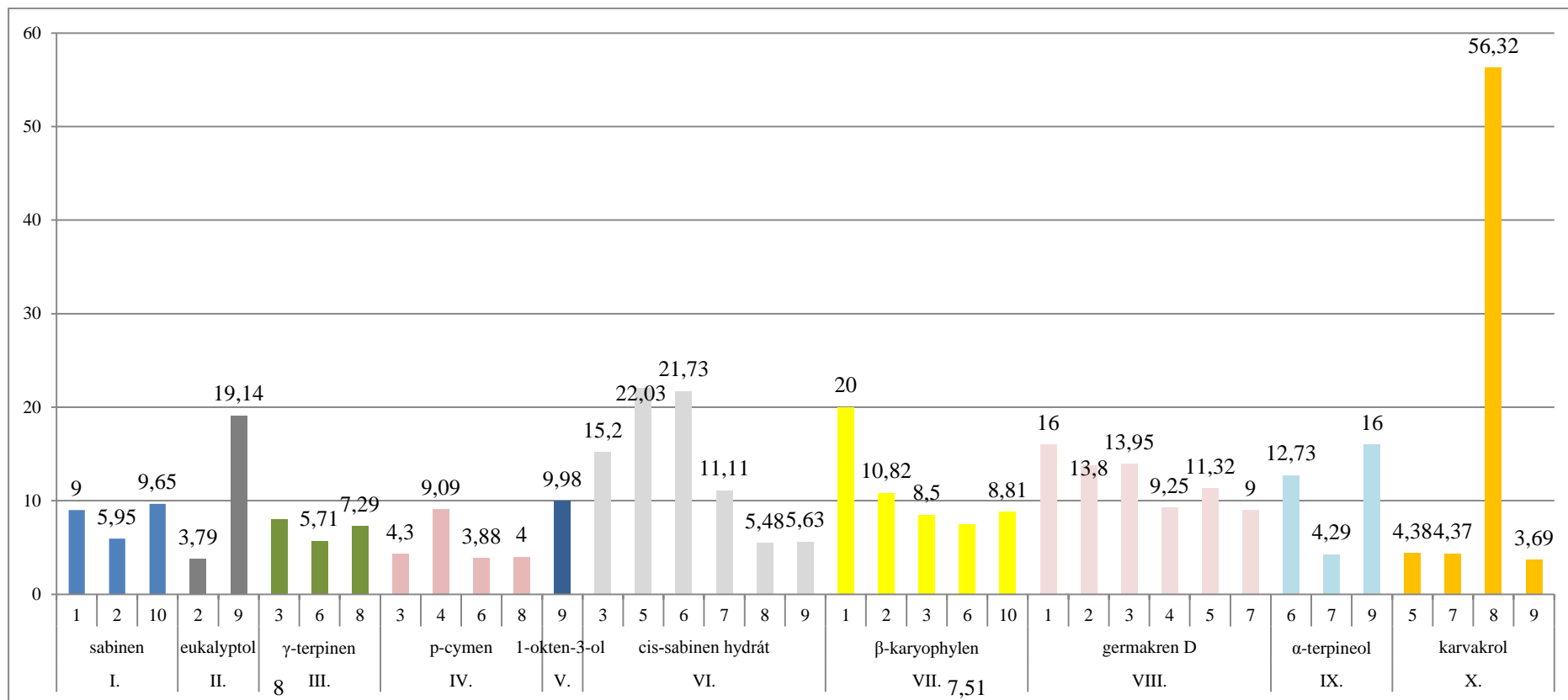
5.4 Hodnocení stanovení složek silic

Stanovení složek silic *Origanum* L bylo provedeno plynovou chromatografií. Vzorby byly do doby stanovení uchovány v lednici. Stanovení bylo provedeno vždy u jednoho vzorku z paralelního stanovení.

V hodnocených vzorcích silice byly jako majoritní složky identifikovány: sabinen, eukalyptol, γ -terpinen, p-cymen, 1-okten-3-ol, cis-sabinen hydrát, β -karyophylen, germakren D, α -terpineol a karvakrol. Na základě % zastoupení můžeme rozdělit hodnocené taxony do skupin s majoritními složkami. Obsah majoritních složek je podrobněji uveden v tabulce č. 18.

Tabulka č. 18 Obsah majoritních složek u taxonů rodu *Origanum* L. [%]

číslo	taxon	skupina	název	[%]
1	<i>Origanum vulgare</i> 41	I.	sabinen	9,21
		VII.	β -karyophylen	20,17
		VIII.	germakren D	16,33
2	<i>Origanum vulgare</i> 43	I.	sabinen	5,95
		II.	eukalyptol	3,79
		VII.	β -karyophylen	10,82
		VIII.	germakren D	13,80
3	<i>Origanum vulgare</i> 'Compactum'	III.	γ -terpinen	8,03
		IV.	p-cymen	4,3
		VI.	cis-sabinen hydrát	15,2
		VII.	β -karyophylen	8,5
		VIII.	germakren D	13,95
4	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum'	IV.	p-cymen	9,09
		VIII.	germakren D	9,25
5	<i>Origanum vulgare</i> 'Variegatum'	VI.	cis-sabinen hydrát	22,03
		VIII.	germakren D	11,32
		X.	karvakrol	4,38
6	<i>Origanum vulgare</i> 'Thumbless Variety'	III.	γ -terpinen	5,71
		IV.	p-cymen	3,88
		VI.	cis-sabinen hydrát	21,73
		VII.	β -karyophylen	7,51
		IX.	α -terpineol	12,73
7	<i>Origanum vulgare</i> 'Aureum Crispum'	VI.	cis-sabinen hydrát	11,11
		VIII.	germakren D	9,8
		IX.	α -terpineol	4,29
		X.	karvakrol	4,37
8	<i>Origanum hirsutum</i>	III.	γ -terpinen	7,29
		IV.	p-cymen	4,44
		VI.	cis-sabinen hydrát	5,48
		X.	karvakrol	56,32
9	<i>Origanum vulgare</i> 'Diabolo'	II.	eukalyptol	19,14
		V.	1-okten-3-ol	9,98
		VI.	cis-sabinen hydrát	5,63
		IX.	α -terpineol	16,33
		X.	karvakrol	3,69
10	<i>Origanum vulgare</i>	I.	sabinen	9,65
		VII.	β -karyophylen	8,81
		VIII.	germakren D	8,22

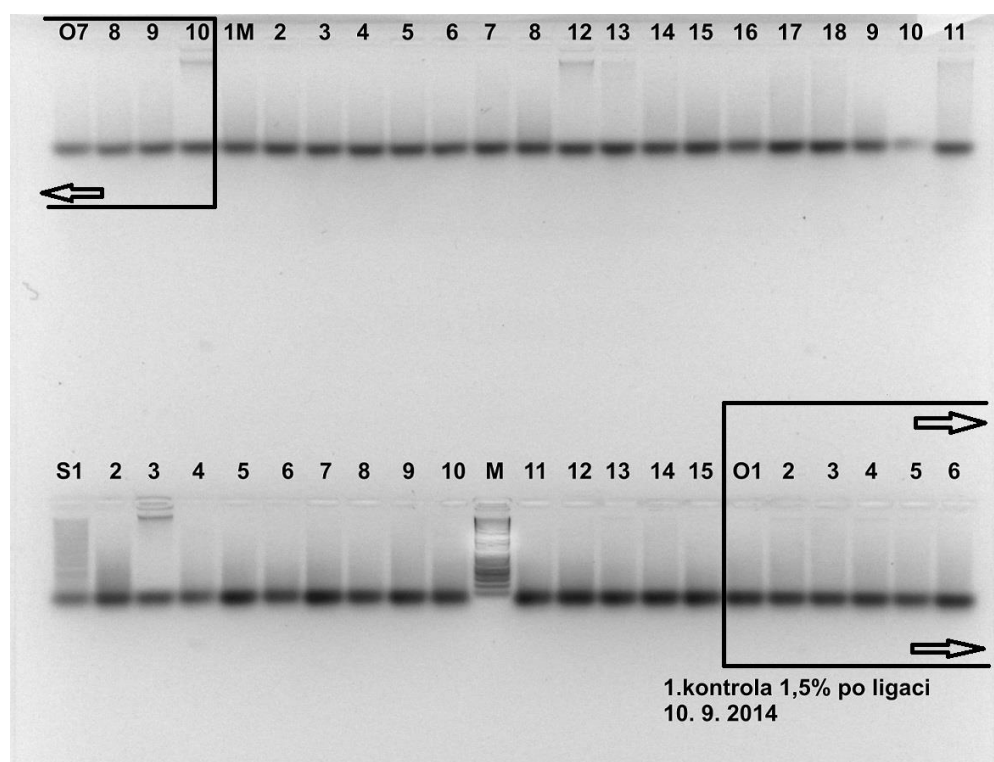


Graf č. 5 Porovnání majoritních složek silic taxonů rodu *Origanum* L. [%]

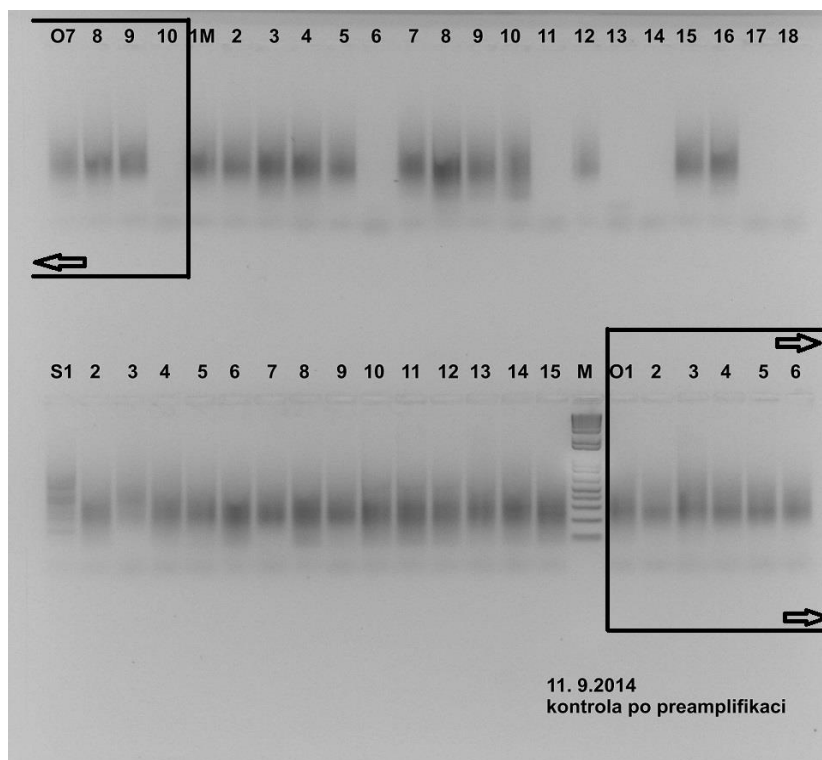
5.5 Hodnocení genetických profilů pomocí metody AFLP

Při AFLP bylo postupováno podle kroků uvedených v metodice. U vyizolované DNA byla provedena první kontrola kvality DNA (Obr. 9) pomocí elektroforetické separace na agarózovém gelu a kvantita DNA stanovená na základě měření fluorescence (Tab. 5). Na obrázku č. 8 je vidět u vzorku O10 (*Origanum vulgare*), že nedošlo k dokonalému našťipání. Vzorek označený M je standart (marker) s hodnotou 1 kbp.

Druhá kontrola po preamplifikaci (Obr. 10) znázorňuje výsledné produkty v rozmezí do 700 bp. Protože vzorek O10 (*Origanum vulgare*) nevykazoval přítomnost žádných produktů, byl dále zkušebně ředěn. Poté byl opět kontrolován na agarózovém gelu a byl získán pozitivní výsledek, obdobně jako u předchozích vzorků.



Obrázek č. 9 Kontrola DNA na gelu – sledované vzorky O1 až O10



Obrázek č. 10 Kontrola kvality DNA po preamplifikaci – sledované vzorky O1 až O10

Vypočítané koeficienty podobnosti (Tab. 19) u sledovaných vzorků rodu *Origanum* L. dosahovaly hodnot vzdálenosti (příbuznosti) od 0,43346 do 0,63135. Nejvyšší koeficient podobnosti 0,63135 byl naměřen mezi vzorky O2 (*Origanum vulgare* 43 – Kyrgyzstan) a O4 (*Origanum vulgare* 'Aureum'). Nejmenší koeficient podobnosti 0,43346 byl naměřen mezi vzorky O8 (*Origanum hirsutum*) a O9 (*Origanum vulgare* 'Diabolo').

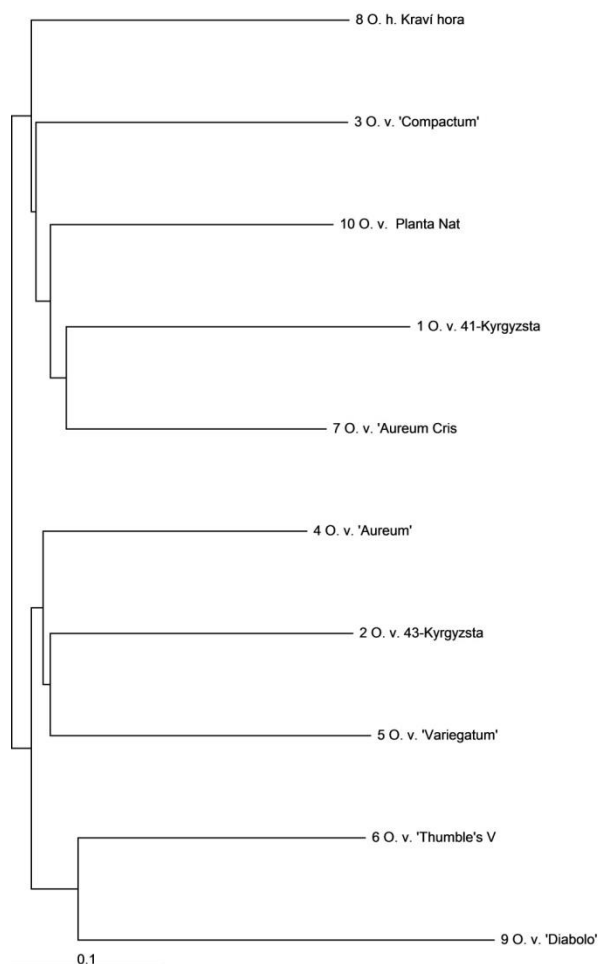
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10
O1		0,50619	0,49672	0,52085	0,50331	0,50324	0,57332	0,50945	0,43925	0,52908
O2	0,5062		0,5687	0,63135	0,58866	0,48292	0,56867	0,52311	0,48524	0,56500
O3	0,4967	0,56870		0,58432	0,56674	0,50114	0,57076	0,56671	0,44279	0,59394
O4	0,5209	0,63135	0,58432		0,60238	0,55779	0,58658	0,58297	0,48339	0,56152
O5	0,5033	0,58866	0,56674	0,60238		0,53580	0,56198	0,53397	0,45477	0,54590
O6	0,5032	0,48292	0,50114	0,55779	0,53580		0,52826	0,54016	0,51225	0,51613
O7	0,5733	0,56867	0,57076	0,58658	0,56198	0,52826		0,55000	0,44668	0,61125
O8	0,5095	0,52311	0,56671	0,58297	0,53397	0,54016	0,55000		0,43346	0,55802
O9	0,4393	0,48524	0,44279	0,48339	0,45477	0,51225	0,44668	0,43346		0,44329
O10	0,5291	0,56500	0,59394	0,56152	0,54590	0,51613	0,61125	0,55802	0,44329	

Tabulka č. 19 Koeficienty podobnosti u taxonu rodu *Origanum* L.

V dendrogramu (Obr. 11) se nachází 10 vzorků (Tab. 9). Dendrogram byl zpracován z 6/7 samostatně a 1 sada primerové kombinace byl vypracována Ing. Janou Čechovou.

Dendrogram se rozděluje na dva klastry. První klaster se dále dělí na dva subklastry. Subklaster obsahuje podskupinu vzorků O8 (*Origanum hirsutum*), O3 (*Origanum vulgare* 'Compactum'), O10 (*Origanum vulgare*), O1 (*Origanum vulgare* 41- Kyrgyzstan) a O7 (*Origanum vulgare* 'Aureum Crispum'). Vzorek O8 (*Origanum hirsutum*) je nejvzdálenější (nejodlišnější) od ostatních vzorků. Velmi podobné jsou vzorky O1 (*Origanum vulgare* 41- Kyrgyzstan) a O7 (*Origanum vulgare* 'Aureum Crispum').

Druhý subklaster obsahuje podskupinu vzorků O4 (*Origanum vulgare* 'Aureum'), O2 (*Origanum vulgare* 43-Kyrgyzstan), O5 (*Origanum vulgare* 'Variegatum'), O6 (*Origanum vulgare* 'Thumbless Variety') a O9 (*Origanum vulgare* 'Diabolo').



Obrázek č. 10 Dendrogram taxonů rodu *Origanum* L.

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce byl detailní popis sortimentu rodu *Origanum* L (dobromysl), který byl kultivován na experimentálních plochách ZF MENDELU.

Pro hodnocení jednotlivých taxonů byly použity následující morfologické znaky: výška rostlin, velikost listové čepele, výška květenství, barva listů a květů. Měřením bylo zjištěno, že nejvyšší taxon byl vzorek č. 2 *Origanum vulgare* (Kyrgyzstan) s výškou 0,65 m. Naopak nejnižší hodnotu měl vzorek č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum' s výškou 0,15 m.

Hrouda (2000) popisuje, že *Origanum vulgare* je bylina vysoká od 0,25 do 0,90 m. Podle Neugebaurové a Nečase (2009) by měla být výška dobromysli od 0,20 do 0,90 m.

Lang (2005) zaznamenal nejvyšší měřený taxon *Origanum vulgare* z firmy Planta Naturalis s průměrnou výškou 0,56 m. Nejnižší taxon s výškou 0,18 m byl *Origanum vulgare* 'Compactum'. Sortiment taxonů u tohoto autora byl odlišný, a tudíž je nutné brát zřeten na rozdílnost posuzovaných taxonů.

Podle Krulichy (2009) vzorek č. 9 *Origanum vulgare* 'Diabolo' je vhodná pro pěstování v nádobách, kde vytváří převis.

Konečný (2015) uvádí, že *Origanum vulgare* 'Compactum' je trvalka vysoká 0,10 až 0,30 m. Dále uvádí výšku 0,10 až 0,20 m u vzorku č. 4 *Origanum vulgare* 'Aureum'.

Autorka Dudová (2006) hodnotila taxony, které byly původem z jiných zemí, ale také se lišily sortimentem. Uvedla, že nejvyšší taxon byl *Origanum vulgare* původem z Velké Británie s výškou 0,74 m a nejnižší taxon byl *Origanum vulgare* z Univerzity v Rakousku s výškou 0,63 m.

Při porovnání výsledků v uvedené literatuře se hodnoty výšky rostlin shodují. Je nutné brát ohled na odlišnost použitých druhů a taxonů, který se v žádné uvedené literatuře neshodují s touto prací.

Měřením bylo zjištěno, že délka listové čepele byla v rozmezí 7 až 28 mm a šířka 6 až 17 mm. Nejdelší listovou čepel měl vzorek č. 10 *Origanum vulgare* z firmy Planta Naturalis s hodnotou 28 mm, nejkratší listovou čepel měl vzorek č. 3 *Origanum vulgare*

"Compactum" s délkou 10 mm a č. 7 *Origanum vulgare* "Aureum Crispum" s délkou 7 mm. Nejširší listovou čepel měl vzorek č. 10 *Origanum vulgare* z planta Naturalis s hodnotou 17 mm a nejužší vzorky byly č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum' a č. 5 *Origanum vulgare* 'Variegatum' s hodnotou 6 mm.

Ietswaart (1980) tvrdí, že průměrná délka listů u *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* je 25 mm a průměrná šířka je 13 mm. Hrouda (2000) uvádí, že velikost listové čepele je 10 až 40 mm dlouhá a 5 až 25 mm široká. Plhalová (2004) zjistila, že průměrná délka listů u *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* je 25 mm a šířka se pohybuje v rozmezí 9 až 13 mm. Podle Langa (2005) mají listy v průměru délku 9 až 40 mm a šířku od 7 do 25 mm a délka řapíku v průměru od 2 do 14 mm. Uvedené hodnoty se mohou lišit v závislosti, zda byly měřeny s řapíkem nebo bez řapíku.

Při porovnání výsledků s literaturou je délka a šířka listů velmi podobná. Opět je nutné zohlednit neshodnost sledovaných druhů a taxonů.

Dalším morfologickým znakem byla výška květenství dosahující rozmezí 0,04 až 0,24 m. Nejdelší květenství měl taxon č. 2 *Origanum vulgare* (Kyrgyzstan) s délkou 0,24 m. Nejkratší květenství bylo naměřeno u taxonu č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum' (0,04 m) a u taxonu č. 5 *Origanum vulgare* 'Variegatum' (0,05 m). Taxon č. 7 *Origanum vulgare* 'Aureum Crispum' nenakvetl, proto u něj není výška zaznamenána.

Podle Dudové (2006) bylo vyhodnoceno rozmezí výšky květenství u *Origanum vulgare* L. od 0,15 do 0,20 m a šířky květenství od 0,24 do 0,28 m. Autorka porovnává pouze druh *Origanum vulgare*, nehodnotila kultivary. Při srovnání je nutné k tomuto faktu přihlížet.

Výška květenství se liší s uvedenou literaturou. Tato odlišnost je kvůli použitým druhům, taxonům a podle způsobu měření. V mém případě šlo o vzdálenost od nejnižšího větvení kvetoucího stonku po jeho nejvyšší bod.

Dalším krokem sledování bylo zaznamenat fenologické fáze jednotlivých taxonů. Jednotlivé fáze byly rašení, počátek kvetení, plné kvetení, sklizeň.

Začátek rašení byl koncem února (28. 2.) 2014. Lang (2005) toto období uvádí v roce 2004 v rozmezí od 15. do 21. března, Dudová (2006) v roce 2005 zaznamenala toto období od 17. do 24. dubna. Doba začátku vegetace byla zřejmě ovlivněna průměrnou teplotou v

hodnoceném období. Průměrná teplota v únoru 2014 byla 3,20 °C, zatímco v roce 2004 získal Lang údaje z Mendelea, kdy byla průměrná teplota v únoru 1,32 °C. Dudová (2006) uvádí údaj z Mendelea z roku 2005, kdy průměrná teplota byla v únoru -2.01 °C.

Údaje o začátku kvetení byly více rozdílné. Jako první rozkvetla dobromysl č. 1 *Origanum vulgare* (Kyrgyzstan) dne 30. května 2014. Jako poslední rozkvetly dobromysli č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum' a č. 5 *Origanum vulgare* 'Variegatum' dne 22. červenec 2014.

Doba sklizně byla stanovena na fenologické období plného kvetení a je u jednotlivých taxonů odlišná. První byly sklizeny rostliny dobromysli č. 1 a č. 2 *Origanum vulgare* (Kyrgyzstan) dne 12. června 2014 a nejpozději byla sklizena dobromysl č. 5 *Origanum vulgare* 'Variegatum' dne 18. srpna 2014.

Lang (2005) zaznamenal dobu plného kvetení od 9. do 20. července 2004, Dudová (2006) uvádí od 27. června do 7. srpna 2005. Spitzer a Dittrich (2011) uvádějí dobu kvetení od VII – IX. Kocián (2015) uvádí dobu kvetení od VI do IX.

Výsledné údaje byly ovlivněny teplotou a intenzitou slunečního svitu v hodnoceném období. Podle literatury doba kvetení je od VI do IX. Údaje se shodují s literaturou, jen jsou ovlivněny vybranými druhy a taxony. Odlišnost se vyskytla u vzorku č. 1, který vykvetl velmi brzy. Bylo to asi tím, že tento druh pochází z Kyrgyzstanu, kde je úplně jiné klima.

Lang (2005) sledovat kulturu vysazenou v červnu roku 2003. Dudová (2006) sledovala stejnou kulturu o rok později. Štiasna (2013) hodnotila kulturu přesazovanou v červenci 2012. Já jsem hodnotila část kulturu přesazenou v červenci 2012 a doplněnou o další taxony v květnu 2013. Sledované kultury měly stáří od 1 do 12 let. Tento věk mohl ovlivnit jak objem silice, tak stanovení obsahu silice.

Důležitou součástí porovnání vzorků bylo měření objemu silic, které bylo stanoveno destilací. Největší objem silic 43,33 ml/kg bylo získáno ze vzorku č. 8 *Origanum hirsutum*. Nejnižší objem silic 0,415 ml/kg měl vzorek č. 9 *Origanum vulgare* 'Diabolo'.

Dle Českého lékopisu (2009) by měla nať obsahovat minimálně 25 ml silice v kilogramu drogy, dále musí pocházet z druhů *Origanum onites*, *Origanum vulgare* ssp.

hirtum nebo z jejich směsí. Vzorek č. 8 *Origanum hirsutum* splnil pouze jednu podmínku ČL (2009) a to obsah silice.

Podle Českého farmaceutického kodexu (1993) musí nat' dobromysli obecné obsahovat nejméně 0,1 % (V/m) silice, tedy 1 ml/kg. Tyto požadavky byly splněny u 9 taxonů z 10 uvedených. Vzorek č. 9 *Origanum vulgare* 'Diabolo' tyto požadavky nesplnil, obsahoval pouze 0,415 ml/kg silice.

Podle Vyhlášky MZe č. 331/1997 Sb o koření by měla dobromysl obsahovat minimálně 5 ml/kg silice, tento požadavek splňují vzorek č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum', vzorek č. 4 *Origanum vulgare* 'Aureum', vzorek č. 6 *Origanum vulgare* 'Thumbless Variety' a vzorek č. 8 *Origanum hirsutum*, proto jsou vhodné pro použití jako koření.

Lang (2005) uvádí, že obsah silice z první sklizně u druhu *Origanum vulgare* byl v rozmezí 1,20 až 4,80 ml/kg. Nejnižší obsah silice byl u vzorku *Origanum vulgare* 'Album's obsahem 1,20 ml/kg. Nejvyšší obsah měl vzorek *Origanum vulgare* 'Thumble's Variety' o obsahu 4,40 ml/kg a *Origanum vulgare* 'Gold Splash' obsahoval 4,80 ml/kg. U druhé sklizně byl naměřen nejvyšší obsah silic 3,20 ml/kg u vzorku *Origanum vulgare* L., nejnižší obsah 1,00 ml/kg měl vzorek *Origanum vulgare* 'Album'.

Podle Dudové (2006) byl obsah silic uveden u různých zástupců rodu *Origanum*. Obsah silice u *Origanum vulgare* byl v rozmezí 1,20 až 6,30 ml/kg u první sklizně, u druhé sklizně byl obsah 0,7 až 0,9 ml/kg. Nejvyšší obsah 6,3 ml/kg měl vzorek *Origanum vulgare* s původem ve Velké Británii. Nejméně silice obsahoval vzorek *Origanum vulgare* původem z Rakouska s obsahem 1,2 ml/kg.

Růžičková a Kocourková (2014) tvrdí, že nat' *Origanum vulgare* L. obsahuje silice (1 až 2 ml/kg) s hlavními složkami: thymol, karvakrol (60 až 70 ml/kg), terpinen-4-ol (46 ml/kg), α -terpinen (7 ml/kg), α -terpineol (7,6 ml/kg), sabinen, linalool.

Štiasna (2013) uvádí obsah silice v rozmezí 1,74 až 4,41 ml/kg sušiny. Nejvyšší obsah silice byl u vzorku *Origanum vulgare* 'Thumble's Variety's obsahem 4,41 ml/kg sušiny. Nejméně silic obsahoval vzorek *Origanum vulgare* 'Aureum' o obsahu 1,74 ml/kg.

Obsah silice uvedený v literatuře se u některých hodnocených vzorků velmi liší, jsou to hodnoty zjištěné jako nejnižší (0,415 ml/kg) a nejvyšší (43,33 ml/kg). Ostatní zjištěné

hodnoty odpovídají literárním údajům. Získané odlišnosti mohly být zapříčiněny – odlišnými genotypy, z vnějších faktorů pak teplotou, množstvím srážek a slunečním svitem. Rozhodující je však vliv způsobu sušení, úprava vzorků a doba jejich skladování.

Dalším měřením pomocí metody GC-MC (plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) bylo stanovení složení silice. Bylo vyselektováno 10 majoritní složek silice (Tab. 18). Jedná se o sabinen, eukalyptol, γ -terpinen, p-cymen, 1-okten-3-ol, cis-sabinen hydrát, β -karyophylen, germakren D, α -terpineol a karvakrol. Jejich poměr zastoupení u jednotlivých taxonů se liší, tyto údaje jsou uvedeny v tabulce č. 18.

Z výsledků vyplývá, že zástupci druhu *Origanum vulgare* L. taxony č. 1, č. 2 a č. 10 se liší pouze místem původu, ale obsahují stejné majoritní složky. Jedná se o sabinen, β -karyophylen a germakren D.

Vzorek č. 8 *Origanum hirsutum* je podobné svým obsahem majoritních složek (γ -terpinen, p-cymen, cis-sabinen hydrát) s taxonem č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum' a s taxonem č. 6 *Origanum vulgare* 'Thumbless Variety'.

Taxon *Origanum hirsutum* je odlišný v poměru karvakrolu (56,32 %) k jiným složkám v silici. Dudová (2006) uvádí u měřených vzorků obsah karvakrolu v rozmezí od 4,27 do 88,59 %. Nejvyšší obsah měl vzorek *Origanum creticum*. Nejbližší hodnotu obsahu karvakrolu zkoumaného vzorku č. 6 *Origanum hirsutum*, byl u Dudové (2006) *Origanum laevigatum*, u kterého bylo naměřeno rozmezí 51,37 až 52,47 %. Marcincák a Popelka (2007) tvrdí, že karvakrol tvoří 60 % aktivních složek *Origanum vulgare* L. Jahns (1879) tvrdí, že *Origanum creticum*, *Origanum macrostachyum* a *Origanum megastachyum* jsou pravděpodobně odvozené od *Origanum hirsutum* (obsah karvakrolu 60 až 85 %). Z uvedených údajů použité literatury vyplývá, že výše uvedené druhy mohou být příbuzné s *Origanum hirsutum*.

Jedním z cílů této práce bylo ověření pravosti označení taxonů pomocí metody AFLP.

Koeficienty podobnosti (Tab. 19) u sledovaných vzorků rodu *Origanum* L. dosahoval hodnot vzdálenosti od 0,43346 do 0,63135. Uvedené rozmezí je menší než 0,7. Toto naznačuje, že se geneticky nejedná o klony stejné odrůdy. Cervera (1998) popisuje, že pokud je koeficient podobnosti mezi dvěma vzorky roven, anebo vyšší než 0,9 - jedná se o klony téže odrůdy.

Nejvyšší koeficient podobnosti 0,63135 byl naměřen mezi vzorky č. 2 (*Origanum vulgare* 43 – Kyrgyzstan) a č. 4 (*Origanum vulgare* 'Aureum'). Z toho vyplývá nízká úroveň variability mezi vzorky č. 2 a č. 4. Nejmenší koeficient podobnosti 0,43346 byl naměřen mezi vzorky č. 8 (*Origanum hirsutum*) a č. 9 (*Origanum vulgare* 'Diabolo'). Toto znamená, že tyto taxony jsou nejvzdálenější od sebe a nejméně geneticky příbuzné.

7 Závěr

Na základě morfologických znaků můžeme hodnocený sortiment charakterizovat několika způsoby. Výška rostlin dobromysli byla zaznamenána v rozmezí 0,15 až 0,65 m. Tento údaj je shodný s uvedenou literaturou. Liší se pouze u vzorku č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum', který je kompaktního vzrůstu. Délka listové čepele byla v rozmezí 7 až 28 mm a šířka 6 až 17 mm. Výška květenství dosahovala rozmezí 0,04 až 0,24 m. Tyto údaje potvrzují také literární zdroje. Barva listů a květů nebyla hodnocena v žádné uvedené literatuře. Tudiž nebylo možné vytvořit odborné srovnání. Z toho vyplývá prostor pro další zkoumání tohoto morfologického znaku.

Při porovnání daných taxonů *Origanum* L. byly zjištěny rozdíly v objemu silic. Největší objem silic 43,33 ml/kg byl získán ze vzorku č. 8 *Origanum hirsutum*. Jako jediný vzorek splňuje podmínky Českého lékopisu (2009) ale neodpovídá druhu povoleného v lékopisu. Nejnižší objem silic 0,415 ml/kg měl vzorek č. 9 *Origanum vulgare* 'Diabolo'. Tento vzorek nesplňuje požadavek Českého farmaceutického kodexu (1993), dle kterého musí být objem silice v nati minimálně 1 ml/kg. Podle vyhlášky pro koření by měla dobromysl obsahovat minimálně 5 ml/kg silice, tento požadavek splňují vzorek č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum', vzorek č. 4 *Origanum vulgare* 'Aureum', vzorek č. 6 *Origanum vulgare* 'Thumbless Variety' a vzorek č. 8 *Origanum hirsutum*, proto jsou vhodné pro použití jako koření.

U sledovaných taxonů dobromysli bylo možné vypořadovat příbuzenské vztahy s ohledem na obsah majoritních složek v silicích. Například zástupce druhu *Origanum vulgare* L. taxony č. 1, č. 2 a č. 10 se liší pouze místem původu, ale obsahují stejné majoritní složky. Jedná se o sabinen, β -karyophylen a germakren D. Dále můžeme u vzorku č. 8 *Origanum hirsutum* vypořadovat odlišnost v poměru karvakrolu (56,32 %) k jiným složkám v silici. Z jiného hlediska je podobný svým obsahem majoritních složek (γ -terpinen, p-cymen, cis-sabinen hydrát) s taxonem č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum' a s taxonem č. 6 *Origanum vulgare* 'Thumbless Variety'.

Metodou AFLP byl stanoven koeficient podobnosti u sledovaných taxonů, který ukazuje genetickou vzdálenost. Tato vzdálenost určuje příbuznost jednotlivých taxonů. Nejvyšší koeficient podobnosti 0,63135 byl naměřen mezi vzorky č. 2 (*Origanum vulgare* 43 – Kyrgyzstan) a č. 4 (*Origanum vulgare* 'Aureum'). Z toho vyplývá vysoká

pravděpodobnost genetické příbuznosti. Nejmenší koeficient podobnosti 0,43346 byl naměřen mezi vzorky č. 8 (*Origanum hirsutum*) a č. 9 (*Origanum vulgare* 'Diabolo'). Toto znamená, že tyto taxony jsou nejvzdálenější od sebe a nejméně geneticky příbuzné.

AFLP je náročná metoda a při vyhodnocení této metody je nutná určitá zkušenost. Je možné, že jsou výsledky zatíženy chybou začátečníka. Hlavně jedná-li se v dendrogramu o odklony oproti očekávanému zařazení.

Pokud srovnáme jednotlivé metody GC-MC a AFLP, tak je možné potvrdit příbuzenské vztahy mezi některými taxony, které z těchto pokusů vzešly.

8 Souhrn a Resume, Klíčová slova

Cílem práce bylo ověření pravosti označení taxonů rodu *Origanum* L. Hodnocený sortiment byl kultivován na experimentálních plochách ZF MENDELU v roce 2014. Celé hodnocení výsledků práce proběhlo v témže roce.

Sortiment byl popsán z hlediska morfologie. Byly hodnoceny tyto morfologické znaky: výška rostlin, velikost listů, výška květenství, barva listů a květů. Dále byly zaznamenány údaje o fenologických fázích taxonů.

Vzorky dobromysli byly hodnoceny z hlediska množství silic destilací a silice pak byly podrobeny kvalitativnímu hodnocení metodou GC-MC. Genetická příbuznost byla hodnocena pomocí metody AFLP.

Klíčová slova: *Origanum*, AFLP, GC-MC, morfologie, taxon, silice, genetická příbuznost

The aim was to verify the authenticity marking taxa genus *Origanum* L. The sortiments were grown at the experimental plots ZF MENDELU in 2014. The analysis of the evaluation results of the work carried out was also done in the same year.

The assortments were morphological described. The morphological characters were such as: plant height, leaf size, inflorescence height, color of the leaves and flowers. Further details were recorded on phenological phases of the taxa.

Oregano samples were assessed for quantity of essential oils by distillation and the essential oils was then subjected to qualitative evaluation using the GC-MC method. The genetic relationships were evaluated using the AFLP methods.

Keywords: *Origanum*, AFLP, GC-MC, morphology, taxon, essential oils, genetic relationship

9 Seznam použité literatury

1. Archak, S., Gaikwad, A. B., Gautam, D., Rao, E. V., Swamy, K. R., Karihaloo, J. L. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome* [online]. 2003, vol. 46, issue 3, 362-369 s. [cit. 2015-03-01]. DOI: 10.1139/g03-016. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834051>
2. Baričević, D.; Bartol, T. The biological/pharmacological activity of the *Origanum* Genus in. KINTZIOS, S. E. *Oregano: the genera Origanum and Lippia*. London: Taylor & Francis, 2002.
3. Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P. M. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Ncbi.nlm.nih.gov* [online]. 1992 [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1369011>
4. Bensch, S., Akesson, M. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals?. *Molecular Ecology* [online]. 2005, vol. 14, issue 10, 109-127 s. [cit. 2015-03-01]. DOI: 10.1007/978-3-540-75957-7_5. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101761>
5. Blažek, Z., Kučera, M., Hubík, J. *Léčivé rostliny ve sběru a kultuře*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1956.
6. Blears, M. J., Gradis, S. A., Lee, H., Trevors, J. T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)* [online]. 1998, roč. 21, č. 3 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1038%2Fsj.jim.2900537>
7. Bremnessová, L. *Bylinář: zdraví, krása a radost*. 6. vyd. Praha: Fortuna Print, 2003. ISBN 80-732-1091-6.

8. Brickell, Ch. *Velká encyklopedie květin a okrasných rostlin*. 1. vyd. Martin: Euromedia Group, 2000. ISBN 80-720-2719-0.
9. Bučková, A. *Praktické cvičenia z farmakognózie - chemická časť*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislavě, 1988. ISBN 80-223-0054-3.
10. Cain, A. J. Taxonomy. *Britannica.com* [online]. 2014 [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/584695/taxonomy-ok>
11. Carroll, J. Oregano Problems – Information On Pests And Diseases Affecting Oregano Plants: Oregano Disease Problems. *Gardening know how.com* [online]. 2015 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.gardeningknowhow.com/edible/herbs/oregano/oregano-problems.htm>
12. Cervera, M.T., Cabezas, J. A., Sancha, J. C., Martinez de Toda, F., Martinez-Zapater, J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *TAG Theoretical and Applied Genetics* [online]. 1998-7-29, vol. 97, 1-2, s. 51-59 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1007/s001220050866. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s001220050866>
13. Clarke, A. C., Meudt, H.M. AFLP®1 (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM): for multi-locus genomic fingerprinting. In: *Clarkeresearch.org* [online]. 2005 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: http://clarkeresearch.org/aflp_2012-01-26/aflp.html
14. Cuřínová, P. *Využití techniky AFLP fingerprintingu ve šlechtění řepky*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích: Zemědělská fakulta, 2008. Diplomová práce.
15. Český farmaceutický kodex. X-Egem, Praha, 1993.
16. Český lékopis 2009: doplněk 2014. Praha: Grada, 2014. ISBN 9788024751931.

17. Čevela, J. *Aromatické látky ve větvích školených v sudech typu barriq*. Mendelova univerzita v Brně: Zahradnická fakulta v Lednici, 2014. Bakalářská práce.
18. Davis, P. *Aromaterapie od A do Z*. Praha: Alternativa, 2005. 501 s.
19. Davis, P. H. *Hybridization in A taxonomic revision of the genus Origanum*. London: Leiden University Press, 1949, ISBN 90-6021-464-1.
20. Dudová, D. *Hodnocení rodu Origanum L. z hlediska obsahových látek a využití v okrasném zahradnictví*. MZLU: Zahradnická fakulta v Lednici, 2006. 96 s. Diplomová práce.
21. Gardenersworld. Origanum vulgare 'Aureum Crispum'. *Gardenersworld.com* [online]. 2015 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.gardenersworld.com/plants/origanum-vulgare-aureumcrispum/587.html>
22. Hejný, S. *Dobromysl nebo oregano*. Praha: Academie, Živa, 1992, ISSN 0044-4812.
23. Hoppe, B. *Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenbaus: Arznei- und Gewürzpflanzen L - Z*. Bernburg: Verein für Arznei- und Gewürzpflanzen Saluplanta, 2013. ISBN 978-393-5971-645.
24. Hrouda, L. *Origanum L. – dobromysl* in SLAVÍK, B. *Květena České republiky: 6*. Praha: Academia, 2000. ISBN 80-200-0306-1.
25. Hubík, J. *Obecná farmakognosie (II.díl). Sekundární metabolity*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1978.
26. IBL. *Hochauflösende AFLP- und RFLP-Analysen, RAPD's, Southern Blots mit hochreiner DNA aus allen bekannten Pflanzenmaterialien: Invisorb® Spin Plant Mini Kit*. In: *Ibl.or.at* [online]. 2004 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://www.ibl.or.at/mailling0604/files/Plant%20Mini.html>

27. Ietswaart, J.H., *A taxonomic revision of the genus Origanum*. London: Leiden University Press, 1980, ISBN 90-6021-464-1.
28. Jahns. Oleum Origani.—Oil of Origanum. *Henriettes-herb.com* [online]. 1879 [cit. 2015-04-30]. Dostupné z: http://www.henriettes-herb.com/eclectic/kings/origanum_oleu.html
29. Jirásek, V., Starý, F. *Atlas léčivých rostlin*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986, 14-543-85.
30. Jurdáková, H. Plynová chromatografia ako analytická metóda a jej využitie. In: *Gymzv.sk* [online]. 2008 [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://www.gymzv.sk/~prezentacie/provek/18/18.pdf>
31. Karlová, K. *Obsahové látky vybraných taxonů čeledi Lamiaceae a Fabaceae*. MZLU: Zahradnická fakulta v Lednici, 1999. Diplomová práce.
32. Kliková, G., Pavelková, Z. *Pěstujeme bylinky*. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-7169-839-3.
33. Klouda, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003, ISBN 80-86369-07-2.
34. Kocián, P. Dobromysl obecná. *Kvetenacr.cz* [online]. 2015 [cit. 2015-05-04]. Dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=87>
35. Kokkini, S. *Taxonomy, diversity and distribution of Origanum species in Oregano: Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*. Italy: CIHEAM, 1996. ISBN 92-9043-317-5.
36. Kokoška, L. *Spices, Aromatic and Medicinal plants of Tropics and Subtropics*. Czech University of Agriculture Prague, Institute of Tropics and Subtropics, 2003, ISBN 80-213-1108-8.

37. Konečný, P. *Origanum vulgare* 'Compactum'. *Slovenské trvalky.sk* [online]. 2015 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.slovensketrvalky.sk/produkt/origanum-vulgare-compactum>
38. Korbelař, J, Endris, Z. Krejřa, J. *Naše rostliny v lékařství. 3.*, Praha: Avicenum,[v NDR], 1970.
39. Kosman, E., Leonard, K. J. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. In: *Ncbi.nlm.nih.gov* [online]. 2005 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15660934>
40. Kořnar, J. Metody: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). In: *Botanika.bf.jcu.cz* [online]. 2015 [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/aflp.html>
41. Krejři, P. Morfologie stonku. *Mendelu.cz* [online]. 2006 [cit. 2015-03-09]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-organologie-morfologie_stonku.html
42. Kresánek, J., Krejřa, J. *Atlas léčivých rostlin a lesných plodov*. Martin: Osveta, 1982, 70-056-88.
43. Krřka, B.; Nečas T. *Tilia.zf.mendelu.cz* [online]. 2005 [cit. 2015-01-01]. Hodnocení pomologických znaků meruněk v kolekci na Zahradnické fakultě v Lednici. Dostupné z: http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/piestany_05.pdf
44. Krulich, J. *Origanum vulgare* 'Diabolo' - oregáno, dobromysl. *Garten.cz* [online]. 2009 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.garten.cz/a/cz/5640-origanum-vulgare-diabolo-oregano-dobromysl/>
45. Kvasnicová, V. Chromatografie. *Univerzita Karlova v Praze: 3. lékařská fakulta* [online]. 2004 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc

46. Kysilka, J. *Naturstuff.sweb.cz* [online]. 2006 [cit. 2015-02-25]. Silice. Dostupné z: <http://naturstuff.sweb.cz/chemdir/silice.html>
47. Lang, J. *Hodnocení kultivarů rodu Origanum L. (dobromysl) používaných v okrasném zahradnictví*. MZLU: Zahradnická fakulta v Lednici, 2005. Diplomová práce.
48. Lang, J. *Studium okrasných druhů rodu Origanum L. z hlediska obsahu účinných látek*. MZLU: Zahradnická fakulta v Lednici, 2003. Bakalářská práce.
49. Machovec, J., Jakábová, A.. *Sadovnické kvetinarstvo*. 1. vyd. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006, 209 s. ISBN 80-8069-740-x.
50. Mäkinen, S. M., Pääkkonen, K. K. *Processing, effects and use of Oregano and marjoram in foodstuffs and in food preparation in KINTZIOS, S. E. Oregano: the genera Origanum and Lippia*. London: Taylor & Francis, 2002.
51. Marcinčák, S., Popelka, P. Antioxidačný účinok skrmovanie olejového extraktu oregana na oxidačnú stabilitu hydínového mäsa. In *Bezpečnosť a kontrola potravín: Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie*. Nitra: SPU, 2007. ISBN 978-80-8069-861-4.
52. McVicar, J. *Velká kniha o bylinkách*. Praha: Euromedia Group k.s., Knižní klub, 2005, ISBN 80-242-1218-8.
53. Meudt, H. M., Clarke, A. C. Almost Forgotten or Latest Practice?: AFLP applications, analyses and advances. *Academia.edu* [online]. Plant Science Conferences, 2007 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: http://www.academia.edu/300950/Almost_Forgotten_or_Latest_Practice_AFLP_applications_analyses_and_advances

54. Meyer, U., Blum, H., Gärber, U., Hommes, M., Pude, R., Gabler, J. *Praxisleitfaden Krankheiten und Schädlinge im Arznei- und Gewürzpflanzenanbau*. Braunschweig: DPG Selbstverlag, 2010. ISBN 978-394-1261-099.
55. Meyers, M. *Oregano and Marjoram: An Herb Society of America Guide to the Genus Origanum*. *Herbsociety.org* [online]. Ohio: The Herb Society of America, 2005 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.herbsociety.org/factsheets/Oregano%20and%20Majoram.pdf>
56. Mika, K. *Fytoterapia pre lekárov 2*. Martin: Osveta, 1991, ISBN 80-217-0349-0.
57. Mitáček, T. *Pěstování léčivých a kořeninových rostlin v ekologickém zemědělství*. Olomouc: Bioinstitut, 2010. ISBN 978-80-87371-05-3.
58. Moravcová, J. *Vscht.cz* [online]. 2003 [cit. 2015-02-23]. Biologicky aktivní přírodní látky. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/lam/new/bapl2003-01.pdf>
59. Morningsunherbfarm. *Morningsun Herb Farm: Origanum vulgare 'Aureum Crispum'*. *Morningsunherbfarm.com* [online]. 2008 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: http://www.morningsunherbfarm.com/product_info.php?products_id=516&osCsid=b6hap2f3erell1ev6978ma0upg4
60. Motyka, K., Hlaváč, J. *Stručný přehled separačních metod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 978-80-244-2304-3.
61. Mueller, U. G.; Wolfenbargwer, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology* [online]. 1999, vol. 14, issue 10, 389-394 s. [cit. 2015-03-01]. DOI: 10.1016/s0169-5347(99)01659-6. Dostupné z: https://www.ufpe.br/biolumol/Artigos_Doutorado_2003_Jan/AFLPgenotyping-review.pdf
62. Munclinger, P. AFLP, amplified fragment length polymorphism. In: *Web.natur.cuni.cz* [online]. 2015 [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~muncling/GMZ/AFLP.pp>

63. Neubauer, Š., Klimeš, K. *Léčivé rostliny II – sbíráme léčivé rostliny*. Praha: Svépomoc, 1986, 30-004-86.
64. Neugebauerová, J. *Estetické hodnoty a použití rodu Origanum L. (Lamiaceae: Saturejeae) v aranžerské praxi*. Sborník referátů odborného semináře, Sušené květiny – pěstování a využití, MZLU, ZF Lednice, 1997.
65. Neugebauerová, J.; Fojtová, J. Složení silice okrasných odrůd dobromysli obecné (*Origanum vulgare L.*). *Sborník - XII. odborný seminář s mezinárodní účastí, Aktuální otázky pěstování, zpracování a využití léčivých, aromatických a kořeninových rostlin*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2006.
66. Neugebauerová, J. *Pěstování léčivých a kořeninových rostlin*. Brno: MZLU, 2006.
67. Neugebauerová, J., Nečas T. *ORIGANUM VULGARE L. – dobromysl obecná*. *Tilia.zf.mendelu.cz* [online]. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2009 [cit. 2015-01-01]. Dostupné z: http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/553/lakr/_private/data/ORIGANUM%20VULGARE.htm
68. Neugebauerová, J.; Vábková, J.; Tejklová, E. *Celkový obsah fenolických látek v okrasných kultivarech Origanum vulgare L.* Trendy a tradice, 2009. ISBN 978-80-7375-3221.
69. Nurzyńska-Wierdak, R. Herb yield and chemical composition of common oregano (*Origanum vulgare L.*) essential oil according to the plant's developmental stage. *Herbapolonica.pl* [online]. 2008 [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: http://herbapolonica.pl/magazines-files/370662-Pages%20from%20Herba_3-6.pdf
70. Ottová, Z. *Oregano neboli staročeská dobromysl: léčivé koření*. *Abecedazahrady.dama.cz* [online]. 2015 [cit. 2015-04-14]. Dostupné z:

- <http://abecedazahrady.dama.cz/clanek/oregano-neboli-staroceska-dobromysl-lecive-koreni>
71. Padulosi, S. *Oregano: Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*. Valenzano(Bari), Italy: CIHEAM, 1996. ISBN 92-9043-317-5.
 72. Page, D. M. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics.oxfordjournals.org* [online]. 1996 [cit. 2015-04-30]. Dostupné z: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/12/4/357.full.pdf+html>
 73. Paghat the Ratgirl Gardening. Tricolored Dwarf Marjoram aka, Variegated Wild Greek Oregano. *Paghat.com*[online]. 2015 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.paghat.com/marjoram.html>
 74. Palmer, J. *1001 Hints and Tips for the Garden*, London, 1996, ISBN 80-86196-03-8.
 75. Pavlíček, A., Hrdá, S., Flegr, J. Free-Tree--freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Ncbi.nlm.nih.gov* [online]. 1999 [cit. 2015-04-30]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10730897>
 76. Perennials. *Origanum vulgare 'Aureum'*. *Perennials.com* [online]. 2015A [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.perennials.com/plants/origanum-vulgare-aureum.html>
 77. Perennials. *Origanum vulgare 'Thumble's Variety'*. *Perennials.com* [online]. 2015B [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.perennials.com/plants/origanum-vulgare-thumbles-variety.html>
 78. Pereny. *Origanum – dobromysl*. *Pereny.cz* [online]. 2010 [cit. 2015-02-01]. *Origanum – dobromysl*. Dostupné z: <http://www.pereny.cz/download/PERENY-cenik.pdf>

79. Peter, K.V. *Handbook of herbs and spices*. 1. publ. Boca Raton: CRC Press, 2004. Woodhead Publishing in food science, technology, and nutrition, no. 227. ISBN 08-493-2535-8
80. Pěňčíková, H. *Analytická chemie a chemická laboratorní cvičení*. Brno: Střední průmyslová škola chemická, 2003
81. Plantvillage. Oregano: Common Pests and Diseases. *Plantvillage.com* [online]. 2015 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <https://www.plantvillage.com/en/topics/oregano/infos>
82. Plhalová, H. Hodnocení subspecií dobromysli (*Origanum L.*) z hlediska morfologie a objemu silic. MZLU: Zahradnická fakulta v Lednici, 2004. Diplomová práce.
83. Powell, W., Morgante, M., Andre, Ch., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* [online]. 1996, vol. 2, issue 3, 225-238 s. [cit. 2015-03-01]. DOI: 10.1007/bf00564200. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00564200>
84. Procházka, S. *Fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1998, ISBN 80-200-0586-2.
85. Růžičková, G., Kocourková, B. Zelené koření. In: *Pssp.cz* [online]. 2014 [cit. 2014-12-14]. Dostupné z: http://www.pssp.cz/multi_dvd/zelene-koreni.html
86. Saliba-Colombani, V. Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Ncbi.nlm.nih.gov* [online]. Genome, 2000 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10701110>
87. Savelkoul, P. H. M., Aarts, H. J. M., Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J. L. W., Schouls, L., Lenstra, J. A. Amplified Fragment-Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *Journal of Clinical*

- Microbiology*[online]. 1999 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85499/>
88. Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., Corke, H. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, vol. 53, issue 20, s. 7749-7759 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1021/jf051513y. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf051513y>
89. Shirasawa, K., Kishitani, S., Nishio, T. Conversion of AFLP markers to sequence-specific markers for closely related lines in rice by use of the rice genome sequence. *Molecular Breeding* [online]. 2004, vol. 14, issue 3, 283-292 s. [cit. 2015-03-01]. DOI: 10.1023/B:MOLB.0000047791.94870.40. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:MOLB.0000047791.94870.40>
90. Shootgardening. *Origanum vulgare* 'Country Cream' (Oregano 'Country Cream'). *Shootgardening.com* [online]. 2015 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.shootgardening.co.uk/plant/origanum-vulgare-country-cream>
91. Schlötterer, Ch. Opinion: The evolution of molecular markers — just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2004, vol. 5, issue 1, 63-69 s. [cit. 2015-03-01]. DOI: 10.1038/nrg1249. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg1249>
92. Skoula, M., Kamenopoulos, S. *Origanum dictamnus* L. and *Origanum vulgare* L. *subsp. hirtum* (Link) Ietswaart: Traditional uses and production in Greece in *Oregano: Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*. Valenzano (Bari), Italy: IRGRI, 1996. ISBN 92-904-3317-5.
93. Skoula, M., Harborne, J. *The taxonomy and chemistry of Origanum*. Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia*. London: Taylor and Francis, 2002, ISBN 04-153-6943-6.

94. Small, E. *Velká kniha koření, bylin a aromatických rostlin*. Praha: Volvox Globator, 2006.
95. Smrčinová, E. *Origanum L. – dobromysl* in SLAVÍK, B. *Květena České republiky: 6*. Praha: Academia, 2000. ISBN 80-200-0306-1.
96. Sochor, M. Dobromysl obecná (*Origanum vulgare L.*). *Botanika.borec.cz* [online]. 2010 [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: http://botanika.borec.cz/dobromysl_obecna.php
97. Sommer, L. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 8021417420.
98. Spilková, J. *Přírodní látky s antioxidačními účinky*. Naše léčivé rostliny. 1997, roč. 34, č. 3, ISSN 0323-2646.
99. Spitzer, J., Dittrich, R. *Kamenné zidky v zahradách: výběr kamene, zásady stavby, osázení rostlinami*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3606-8.
100. Suchý, V. *Farmakognosie: část všeobecná*. Bratislava: Univerzita Komenského, 1994.
101. Škarpa, P. Stanovení veškeré organické hmoty v půdě:: Pracovní postup. *Web2.mendelu.cz* [online]. 2010 [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/laborator/index.php?I=3&J=3&K=0&N=1
102. Štiasna, K. *Hodnotenie rodu Origanum L. z hľadiska obsahu silice a antioxidantov*. Mendelova univerzita v Brně: Agronomická fakulta, 2013. Diplomová práce.
103. Tautz, D., Trick, M., Dover, G. A. *Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation*. *Nature* [online]. 1986, vol. 322, issue 6080, 652-656 s. [cit. 2015-03-03]. DOI: 10.1002/0471684228.egp02920. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3748144>
104. Tomko, J. a kol. *Farmakognózia*. Martin: Osveta, 1999, ISBN 80-8063-014-3

105. Tropicos. *Origanum vulgare* L. Tropicos.org [online]. 2015 [cit. 2015-04-11].
Dostupné z: <http://tropicos.org/Name/17600223>
106. Vachůn, M. *Tilia.zf.mendelu.cz* [online]. 2011 [cit. 2015-01-01]. Přelom 19. a 20. století. Dostupné z: <http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/571/historie.html>
107. Vachůn, M. *LEDN_meteorologie_2014*. Zasláno mailem dne 02.02.2015.
Nepublikováno.
108. Valíček, P. *Koření a jeho léčivé účinky*. Benešov: Start, 2005.
109. Vaneechoutte, M. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. *Molecular Biotechnology* [online]. 1996, vol. 6, issue 2, 323-328 s. [cit. 2015-03-03]. DOI: 10.1007/978-3-642-83962-7_21. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02740768>
110. Valpuesta, V. *Fruit and vegetable biotechnology*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c2002, xi, 338 p. ISBN 08-493-1436-4.
111. Velíšek, J. *Chemie potravin 2*. Tábor: Osis, 2002. ISBN 80-86659-01-1.
112. Vierstraete, A. Genetika: Slovníček pojmů. In: *Telemedicina.med.muni.cz* [online]. 1999 [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://telemedicina.med.muni.cz/pdm/genetika/index.php?pg=kapitola-iii-1--pojmy>
113. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* [online]. 1995, vol. 23, issue 21, 4407-4414 s. [cit. 2015-03-08]. DOI: 10.1093/nar/23.21.4407. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC307397/>
114. Vyhláška č. 331/1997 Sb. *o potravinách a tabákových výrobcích, pro koření, jedlou sůl, dehydratované výrobky a ochucovadla a hořčici*. Praha: Ministerstva zemědělství,

1997. Dostupné z:
<http://foodnet.cz/soubor.php?id=14845&kontrola=3512b9e100e2e073e9b86be9b5bf6683>
115. Welsh, J., McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Ncbi.nlm.nih.gov* [online]. 1990 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC332855/>
116. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Ncbi.nlm.nih.gov* [online]. 1990 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC332606/>
117. Wolf, J. *Studium genetických vztahů v sortimentu asijských odrůd hrušní*. Mendelova univerzita v Brně: Zahradnická fakulta v Lednici, 2014. Diplomová práce.
118. Zahradnictvi-flos. *Origanum vulgare 'Diabolo'*. *Zahradnictvi-flos.cz* [online]. 2015 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.zahradnictvi-flos.cz/15528-origanum-vulgare-diabolo-dobromysl-obecna.html>
119. Zátopková, A. *Pokusné pěstování dobromysli obecná*. MZLU: Zahradnická fakulta v Lednici, 1998. Diplomová práce
120. Zbíral, J. *Analýza rostlinného materiálu: jednotné pracovní postupy*. Vyd. 2., rozš. a přeprac. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2005, 192 s. ISBN 80-865-4873-2.
121. Žídková, K. *Růstové, vzhledové a pěstitelské vlastnosti vybraných druhů trvalek*. MZLU: Zahradnická fakulta v Lednici, 2001. Diplomová práce.

10 Příloha

Seznam obrázků

Obrázek 1 Pokusná plocha s dobromyslí

Obrázek 2 Nákres pozemku s měřenými taxony a počtem rostlin

Obrázek 3 Doba rašení 28. 02. 2014 (č. 1 *Origanum vulgare*)

Obrázek 4 Odběr vzorku k AFLP 04. 04. 2014 (č. 1 *Origanum vulgare*)

Obrázek 5 Začátek kvetení 30. 05. 2014 (č. 1 *Origanum vulgare*)

Obrázek 6 Plné kvetení 12. 06. 2014 (č. 1 *Origanum vulgare*)

Obrázek 7 Doba rašení 28. 02. 2014 (č. 2 *Origanum vulgare*)

Obrázek 8 Odběr vzorku k AFLP 24. 03. 2014 (č. 2 *Origanum vulgare*)

Obrázek 9 Začátek kvetení 12. 06. 2014 (č. 2 *Origanum vulgare*)

Obrázek 10 Plné kvetení 20. 06. 2014 (č. 2 *Origanum vulgare*)

Obrázek 11 Doba rašení 28. 02. 2014 (č. 3 *Origanum vulgare*'Compactum')

Obrázek 12 Odběr vzorku k AFLP 24. 04. 2014 (č. 3 *Origanum vulgare*'Compactum')

Obrázek 13 Zakládání květenství 30. 06. 2014 (č. 3 *Origanum vulgare*'Compactum')

Obrázek 14 Plné kvetení 22. 07. 2014 (č. 3 *Origanum vulgare*'Compactum')

Obrázek 15 Doba rašení 28. 02. 2014 (č. 4 *Origanum vulgare*'Aureum')

Obrázek 16 Odběr vzorku k AFLP 24. 04. 2014 (č. 4 *Origanum vulgare*'Aureum')

Obrázek 17 Začátek kvetení 20. 06. 2014 (č. 4 *Origanum vulgare*'Aureum')

Obrázek 18 Plné kvetení 22. 07. 2014 (č. 4 *Origanum vulgare*'Aureum')

Obrázek 19 Doba rašení 28. 02. 2014 (č. 5 *Origanum vulgare*'Variegatum')

Obrázek 20 Odběr vzorku k AFLP 04. 04. 2014 (č. 5 *Origanum vulgare*'Variegatum')

Obrázek 21 Zakládání květenství 30. 06. 2014 (č. 5 *Origanum vulgare* 'Variegatum')

Obrázek 22 Plné kvetení 18. 08. 2014 (č. 5 *Origanum vulgare* 'Variegatum')

Obrázek 23 Doba rašení 28. 02. 2014 (č. 6 *Origanum vulgare* 'Thumbless Variety')

Obrázek 24 Odběr vzorku k AFLP 24. 03. 2014 (č. 6 *Origanum vulgare* 'Thumbless Variety')

Obrázek 25 Začátek kvetení 12. 06. 2014 (č. 6 *Origanum vulgare* 'Thumbless Variety')

Obrázek 26 Plné kvetení 22. 07. 2014 (č. 6 *Origanum vulgare* 'Thumbless Variety')

Obrázek 27 Doba rašení 28. 02. 2014 (č. 7 *Origanum vulgare* 'Aureum Crispum')

Obrázek 28 Odběr vzorku k AFLP 04. 04. 2014 (č. 7 *Origanum vulgare* 'Aureum Crispum')

Obrázek 29 Nekvetoucí taxon 12. 06. 2014 (č. 7 *Origanum vulgare* 'Aureum Crispum')

Obrázek 30 Doba sklizně 18. 08. 2014 (č. 7 *Origanum vulgare* 'Aureum Crispum')

Obrázek 31 Doba rašení 28. 02. 2014 (č. 8 *Origanum hirsutum*)

Obrázek 32 Odběr vzorku k AFLP 04. 04. 2014 (č. 8 *Origanum hirsutum*)

Obrázek 33 Začátek kvetení 30. 06. 2014 (č. 8 *Origanum hirsutum*)

Obrázek 34 Doba sklizně 22. 07. 2014 (č. 8 *Origanum hirsutum*)

Obrázek 35 Doba rašení 28. 02. 2014 (č. 8 *Origanum hirsutum*)

Obrázek 36 Odběr vzorku k AFLP 24. 04. 2014 (č. 9 *Origanum vulgare* 'Diabolo')

Obrázek 37 Začátek kvetení 20. 06. 2014 (č. 9 *Origanum vulgare* 'Diabolo')

Obrázek 38 Doba sklizně 22. 07. 2014 (č. 9 *Origanum vulgare* 'Diabolo')

Obrázek 39 Doba rašení 28. 02. 2014 (č. 10 *Origanum vulgare*)

Obrázek 40 Odběr vzorku k AFLP 04. 04. 2014 (č. 10 *Origanum vulgare*)

Obrázek 41 Začátek kvetení 12. 06. 2014 (č. 10 *Origanum vulgare*)

Obrázek 42 Doba sklizně 22. 07. 2014 (č. 10 *Origanum vulgare*)

- Obrázek 43 Barva květů a listů (č. 1 *Origanum vulgare*)
- Obrázek 44 Barva květů a listů (č. 2 *Origanum vulgare*)
- Obrázek 45 Barva květů a listů (č. 3 *Origanum vulgare* 'Compactum')
- Obrázek 46 Barva květů a listů (č. 4 *Origanum vulgare* 'Aureum')
- Obrázek 47 Barva květů a listů (č. 5 *Origanum vulgare* 'Variegatum')
- Obrázek 48 Barva květů a listů (č. 6 *Origanum vulgare* 'Thumbless Variety')
- Obrázek 49 Barva květů a listů (č. 7 *Origanum vulgare* 'Aureum Crispum')
- Obrázek 50 Barva květů a listů (č. 8 *Origanum hirsutum*)
- Obrázek 51 Barva květů a listů (č. 9 *Origanum vulgare* 'Diabolo')
- Obrázek 52 Barva květů a listů (č. 10 *Origanum vulgare*)
- Obrázek 53 Sušení vzorků
- Obrázek 54 Mlýnek IKA MF 10 basic
- Obrázek 55 Stanovení obsahu sušiny
- Obrázek 56 Stanovení silice - namletá droga
- Obrázek 57 Stanovení silice – vaření
- Obrázek 58 Stanovení silice – stupnice
- Obrázek 59 Odebrání vzorky k analýze AFLP
- Obrázek 60 Uložené vzorky k mražení
- Obrázek 61 Homogenizace vzorků
- Obrázek 62 Mikrozkuřavky se vzorky
- Obrázek 63 Vodní lázeň
- Obrázek 64 Vortex (třepačka)

Seznam tabulek a grafů

Tabulka 1 Meteorologické údaje za rok 2014

Tabulka 2 Příklad binární matice

Tabulka 3 Majoritní složky u taxonů rodu *Origanum* L. [%]

Graf 1 Znázornění průměrné teploty za rok 2014 [°C]

Graf 2 Znázornění průměrných srážek v roce 2014 [mm]

Graf 3 Znázornění průměrného slunečního svitu v roce 2014 [hod]