

VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS
Biomedicinos mokslų institutas (Farmacijos ir farmakologijos centras)

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

Fenofazės įtaka eterinių aliejų kaupimuisi ir susijusioms lapų epidermio struktūroms *Thymus pulegioides* fenoliniuose ir nefenoliniuose chemotipuose

Studentas: Redas Guobys

5 kursas, 2 grupė

Darbo vadovas (nuo 2023.09.26): prof. dr. Juozas Labokas _____
(*pedagoginis vardas, mokslo vardas, vardas, pavardė, parašas*)

Darbo vadovė (iki 2023.09.25): dr. Vaida Vaičiulytė _____
(*pedagoginis vardas, mokslo vardas, vardas, pavardė, parašas*)

Farmacijos ir farmakologijos centro vadovė: doc. dr. Kristina Garuolienė _____
(*pedagoginis vardas, mokslo vardas, vardas, pavardė, parašas*)

Biomedicinos mokslų instituto direktorius: prof. dr. Algirdas Edvardas Tamošiūnas:

(*pedagoginis vardas, mokslo vardas, vardas, pavardė, parašas*)

Darbo įteikimo data: _____ Registracijos Nr. _____

Studento elektroninio pašto adresas: redas.guobys@mf.stud.vu.lt

2024

Turinys

SANTRAUKA	3
SUMMARY	5
PADĖKA	7
ĮVADAS	8
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	10
LITERATūros APŽVALGA	11
1.1. Čiobrelių (<i>Thymus L.</i>) biologinė įvairovė ir cheminis polimorfizmas	11
1.2. Eterinių aliejų biosintezė, savybės, reikšmė, išgavimo būdai	12
1.3. Fenofazės įtaka eterinių aliejų kiekybinei ir kokybinei sudėčiai	16
1.4. Lapų epidermio struktūros, susijusios su eterinio aliejaus kaupimusi, fenofazės įtaka žiotelių tankiui.	17
TYRIMO METODAI.....	21
2.1. Augalinės žaliavos rinkimas.....	21
2.2. Eterinių aliejų kiekybinė analizė.....	24
2.3. Lapo epidermio struktūrų analizė	25
2.4. Duomenų statistinė analizė.....	27
TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	29
3.1. Fenofazės įtaka <i>T. pulegioides</i> eterinių aliejų kiekybinei sudėčiai.....	29
3.2. Fenofazės įtaką <i>T. pulegioides</i> žiotelių ir eterinių aliejų liaukučių tankiui bei eterinių aliejų liaukučių dydžiui.....	34
IŠVADOS	43
REKOMENDACIJOS	44
LITERATŪROS ŠALTINIAI.....	45
PRIEDAS 1.....	49

SANTRAUKA

Redo Guobio baigiamasis magistrinis darbas: **Fenofazės įtaka eterinių aliejų kaupimuisi ir susijusioms lapų epidermio struktūroms *Thymus pulegioides* fenoliniuose ir nefenoliniuose chemotipuose.**

Darbo tikslas: Nustatyti fenofazės įtaką keturbriaunio čiobrelio (*Thymus pulegioides* L.) eterinių aliejų kiekybinei sudėčiai ir su eterinių aliejų kaupimusi susijusioms lapo epidermio struktūroms.

Uždaviniai: Atlikti *Thymus pulegioides* eterinių aliejų kiekybinę analizę hidrodistiliacijos metodu, naudojant Klevengerio aparatą, ir nustatyti fenofazės įtaką *T. pulegioides* eterinių aliejų kiekybinei sudėčiai. Atlikti *T. pulegioides* lapo epidermio struktūrų analizę įspaudo metodu, naudojant optinį mikroskopą ir nustatyti fenofazės įtaką *T. pulegioides* žiotelių ir eterinių aliejų liaukučių tankiui bei eterinių aliejų liaukučių dydžiui.

Metodika: *T. pulegioides* individai buvo auginami vienodomis sąlygomis, netręšiami ir nelaistomi. Žaliava nuimama keturis kartus skirtingais *T. pulegioides* fenofazių periodais: I pjovimas – prieš žydėjimą, II pjovimas – pilno žydėjimo metu, III pjovimas – pilnai peržydėjus, IV pjovimas – atžėlę ir antrąkart sužydėję *T. pulegioides* individai. Eterinių aliejų kiekybinei analizei naudota orasausė žaliava, naudojami tik lapai ir žiedai, stiebai atskiriami nuo lapų ir žiedų ir analizei nenaudojami. Eteriniai aliejai išskirti hidrodistiliacijos metodu, naudojant Klevengerio aparatą. Lapo epidermio struktūrų analizė atlikta įspaudo metodu. Atliekant lapo epidermio struktūrų analizę įvertintas žiotelių ir eterinių aliejų liaukučių tankis 1 mm² bei eterinių aliejų liaukučių dydis (diametras) mikrometrais (μm) abejose lapo pusėse. Apskaičiuoti eterinio aliejaus kiekių vidurkiai, standartinės paklaidos, žiotelių, eterinių aliejaus liaukučių tankio ir dydžių vidurkiai, standartiniai nuokrypiai.

Rezultatai: Siekiant eliminuoti žaliavos masės įtaką, eterinių aliejų išėiga visuose variantuose buvo perskaičiuota 100-ai gramų žaliavos. Tokiu būdu, didžiausia vidutinė eterinio aliejaus koncentracija žaliavoje buvo antro žydėjimo metu (1,1475 ml/100 g). Didžiausias vidutinis žiotelių tankis apatinėje lapo pusėje buvo žydėjimo metu (468,4 vnt./mm²), o viršutinėje pusėje – prieš žydėjimą (36,2 vnt./mm²). Didžiausias vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis apatinėje ir viršutinėje lapo pusėse buvo žydėjimo metu (apatinėje pusėje – 17,7 vnt./mm², viršutinėje – 17,8 vnt./mm²). Didžiausias vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras apatinėje

ir viršutinėje pusėje buvo prieš žydėjimo periodą (apatinėje pusėje – 58,4 μm , viršutinėje – 60,8 μm).

Išvados: *Thymus pulegioides* fenoliniuose ir nefenoliniuose chemotipuose fenofazė neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos eterinių aliejų koncentracijai 100 gramų žaliavos. *T. pulegioides* fenoliniuose ir nefenoliniuose chemotipuose fenofazė turėjo statistiškai reikšmingą įtaką žiotelių ir eterinio aliejaus liaukučių tankiui abiejose lapo pusėse bei eterinio aliejaus liaukučių diametrai apatinėje lapo pusėje, bet neturėjo įtakos liaukučių diametrai viršutinėje lapo pusėje. Ryšys tarp sukauptų eterinių aliejų kiekių ir lapų epidermio struktūrų *Thymus pulegioides* augaluose labiausiai pasireiškia žydėjimo metu, kai stebima padidėjusi eterinių aliejų koncentracija ir didžiausias eterinių aliejų liaukučių tankis abiejose lapo pusėse bei didžiausias žiotelių tankis apatinėje lapo pusėje.

SUMMARY

Final master's thesis by Redas Guobys

Title: Effects of Phenophase on Essential Oil Accumulation and Related Leaf Epidermal Structures in Phenolic and Non-Phenolic Chemotypes of *Thymus pulegioides*.

Aim of the work: To determine the effects of phenophases on the quantitative composition of essential oils of *Thymus pulegioides* L. and on the structures of leaf epidermis related to the accumulation of essential oils.

Tasks: To perform a quantitative analysis of *Thymus pulegioides* essential oils by hydrodistillation method by using Clevenger apparatus and to determine the effects of phenophase on the quantitative composition of *T. pulegioides* essential oils. To perform analysis of the epidermal structures of *T. pulegioides* leaves using the imprint method with an optical microscope and to determine the effects of phenophases on the density of *T. pulegioides* stomata and essential oil glands and the size of essential oil glands.

Methodology: *T. pulegioides* individuals were grown under the same field conditions, without fertilization or watering. The raw material was harvested four times during the different *T. pulegioides* phenophases: I cutting before flowering, II cutting during full flowering, III cutting after full flowering, IV cutting when the plants had resprouted and flowered for the second time. Air-dried raw material was used for quantitative analysis of essential oils, only leaves and flowers were used, stems were separated from leaves and flowers and were not used for analysis. Essential oils were extracted by hydrodistillation with Clevenger apparatus. Analysis of leaf epidermal structures was performed using the imprint method. During the analysis of leaf epidermal structures, the density of stomata and essential oil glands per mm² and size (diameter) of essential oil glands in micrometers, μm, on both sides of leaves were measured. Averages of essential oil amounts, standard errors, average densities of stomata and essential oil glands as well as essential oil glands size, and standard deviations were calculated.

Results: To eliminate the influence of different sample mass of raw material, the yield of essential oils in all variants was recalculated as per 100 grams of raw material. Thus, the highest average concentration of essential oil in the raw material was established during the second flowering (1.1475 ml/100 g). The highest average density of stomata on the lower side of leaves was during flowering (468.4 in 1 mm²), and on the upper side – before the flowering period (36.2 in 1 mm²). The highest average density of essential oil glands on the lower and upper sides of leaves was during flowering (17.7/mm² on the lower side and 17.8 /mm² on the upper

side). The maximum mean diameter of essential oil glands on the lower and upper sides was before the flowering period (58.4 μm on the lower side and 60.8 μm on the upper side).

Conclusions: In phenolic and non-phenolic chemotypes of *Thymus pulegioides*, the phenophase had no statistically significant effects on the concentration of essential oils per 100 grams of raw material. While it had statistically significant effects on the density of stomata and essential oil glands on both sides of leaves and the diameter of essential oil glands on the lower side of leaves but had no influence on the diameter of the glands on the upper side of leaves. The relationship between the accumulated amounts of essential oils and leaf epidermal structures in *Thymus pulegioides* is most evident during flowering, when an increased concentration of essential oils and the highest density of essential oil glands on both sides of the leaf and the highest density of stomata on the lower side of the leaf are observed.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo magistrinio darbo vadovams, dr. Vaidai Vaičiulytei, su kuria pradėjau šitą darbą, ir prof. dr. Juozui Labokui, kurio pagalba galėjau užbaigti šitą darbą, bei Gamtos tyrimo centro Botanikos instituto darbuotojams už visą suteiktą pagalbą.

ĮVADAS

Moksliniais tyrimais įrodyta, kad įvairių rūšių čiobrelių (*Thymus* spp., *Lamiaceae*) eteriniai aliejai turi antibakterinių, antigrybelinių, antimutageninių, priešvėžinių, antioksidacinių, antispazminių savybių, yra aromatingi, todėl naudojami farmacijoje, maisto pramonėje, kosmetikoje ir parfumerijoje. Čiobrelių preparatai naudingi gydant kvėpavimo sistemos ligas, virškinimo sutrikimus, burnos higienos reikmėms ir kt. (1–7). Lietuvoje gana populiarūs yra ir čiobrelių arbata, ką galime pastebėti lankydamiesi vaistinėse bei jų internetiniuose portaluose. Apie tai liudija ir gana dideli komercinių gamintojų augalinės žaliavos poreikiai. Pavyzdžiui, Švenčionių vaistažolių fabriko poreikis čiobrelių augalinei žaliavai – čiobrelių žolei – 2023 metais nurodomas 15000 kg, t. y., didžiausia paklausa lyginant su kitomis vaistažolėmis (8).

Viena žinomiausių *Thymus* genties rūšių Lietuvoje yra keturbriaunis čiobrelis (*Thymus pulegioides* L.) – gana dažnas pietinių ir rytinių rajonų sausų pievų, ganyklų, ypač kalvų ir pylimų šlaitų augalas (9). Įdomu tai, kad šios rūšies augalai pasižymi nemažu cheminiu polimorfizmu, pasireiškiančiu tam tikrų komponentų vyravimu eterinių aliejų sudėtyje. Lietuvoje yra išskirti šeši keturbriaunio čiobrelio chemotipai: linalolio, timolio, α -terpinilo acetato, geranialio/geraniolio/neralio, karvakrolio/ γ -terpineno/p-cimeno, timolio/karvakrolio/ γ -terpineno/p-cimeno (10–12), kurie gali būti grupuojami į turinčius fenolinių junginių (arba fenolinius) ir neturinčius fenolinių junginių (arba nefenolinius) (13).

Yra žinoma, kad eterinių aliejų sintezei įtakos turi temperatūra, šviesa, drėgmė, CO₂ ir ozono lygis (14–17). Apčiuopiamą poveikį jų kiekybinei ir kokybinei sudėčiai gali turėti ir fenologinė fazė, kurios metu renkama žaliava. Nustatyta, kad didžiausi eterinio aliejaus kiekiai *Thymus* genties augaluose susikaupia pirmo arba antro žydėjimo metu (18–20). Tačiau labai mažai tokių tyrimų atlikta su *T. pulegioides* individais ir ypač su skirtingais šios rūšies chemotipais.

Moksliniais tyrimais nustatyta, kad su eterinių aliejų sinteze susijusiems lapo epidermio struktūriniais požymiams, tokiems kaip žiotelių tankis, eterinių aliejų liaukų tankis ir dydis, įtakos turi CO₂ koncentracija atmosferoje, šviesos kiekis ir intensyvumas, drėgmė, temperatūra, dirvos pH (21–24). Taip pat yra duomenų, kad kai kurių rūšių eterinius aliejus kaupiančių augalų žiotelių tankis skirtingose lapo pusėse keičiasi priklausomai nuo fenofazės (25). Tačiau tokių tyrimų nėra atlikta su *Thymus pulegioides*, viena iš populiariausių Lietuvoje aromatinių augalų rūšimi.

Mokslinės žinios apie fenologinės fazės įtaką skirtingų *Thymus pulegioides* chemotipų eterinių aliejų kaupimuisi bei su tuo susijusių lapo epidermio struktūrinių požymių pokyčiams reikalingos siekiant giliau biologiškai pažinti rūšį, jos vidurūšinę įvairovę, taip pat siekiant

visapusiškiau įvertinti biologiškai aktyvių medžiagų – eterinių aliejų – kaupimosi chemotipinius dėsningumus, būdingus šiai rūšiai ir svarbius vaistinės žaliavos ruošimo požiūriu.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: Nustatyti fenofazės įtaką keturbriaunio čiobrelio (*Thymus pulegioides* L.) eterinių aliejų kiekybinei sudėčiai ir su eterinių aliejų kaupimusi susijusioms lapo epidermio struktūroms fenoliniuose ir nefenoliniuose chemotipuose.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti *Thymus pulegioides* eterinių aliejų kiekybinę analizę hidrodistiliacijos metodu, naudojant Klevengerio aparatą.
2. Nustatyti fenofazės įtaką *T. pulegioides* eterinių aliejų kiekybinei sudėčiai, atsižvelgiant į skirtingus chemotipus.
3. Atlikti *T. pulegioides* lapo epidermio struktūrų analizę įspaudos metodu, naudojant optinį mikroskopą.
4. Nustatyti fenofazės įtaką *T. pulegioides* žiotelių ir eterinių aliejų liaukučių tankiui bei eterinių aliejų liaukučių dydžiui, atsižvelgiant į skirtingus chemotipus.

LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Čiobrelių (*Thymus* L.) biologinė įvairovė ir cheminis polimorfizmas

Pagal rūšių skaičių *Thymus* yra viena iš didžiausių genčių Lamiaceae šeimoje. *Thymus* genčiai priklauso virš 200 rūšių. Rūšių skaičiumi ją pralenkia tik *Salvia*, *Hyptis*, *Scutellaria*, *Teucrium*, *Nepeta* ir *Plectranthus* gentys, kurių Lamiaceae šeimoje iš viso yra apie 220. *Thymus* gentis yra paplitusi didžiojoje Eurazijos žemyno dalyje, taip pat jos atstovų galima rasti Grenlandijos pakrantėse, Kanarų salose, Sacharos dykumos šiaurinėje dalyje, Etiopijos kalnuose (7,26). Lietuvoje natūraliai auga tik dvi *Thymus* genties rūšys: keturbriaunis čiobrelis (*Thymus pulegioides* L.) ir paprastasis čiobrelis (*Thymus serpyllum* L.) bei jų hibridas *Thymus* × *oblongifolius* Opiz (27,28).

Nors *Thymus* genties augalai gali augti įvairiose klimato sąlygose, bet dauguma šios genties rūšių aptinkama Viduržemio jūros regione, kuris laikomas jų kilmės centru. Jie paprastai ir auginami tenai, taip pat daugumoje kitų švelnaus vidutinio ir subtropinio klimato regionų, įskaitant Pietų ir Vidurio Europą (7). Čiobrelio genties augalai mėgsta augti saulėtose vietose, kur yra gerai drenuojamas ir kalkingas dirvožemis bei dažnai randami akmeningose vietovėse. Jie gali augti tiek smėlio kopose, tiek gipsažemėje, tiek kalkingame dirvožemyje bei pakęsti ekstremalius klimato pokyčius (temperatūros ir kritulių) (6,7,26).

Thymus genties augalai yra daugiamečiai krūmai arba puskrūmiai (retai – žolės), užaugantys iki 50 cm, kai kuriais atvejais net iki 1 m aukščio. Stiebai keturbriauniai arba apvalūs. Lapai dažniausiai, ovalūs arba lancetiški, vientisi arba dantyti, plaukuoti arba lygūs (7,29,30).

Thymus genties augalai gali daugintis ir būti auginami įvairiais būdais: sėklomis, gyvašakėmis, kero dalijimusi (31,32). Pagrindinės apdulkintojos yra bitės (*Apis mellifera*). Taip pat šiems augalams būdingas moteriškas dvinamiškumas (angl. gynodioecy), tai yra toks lyties polimorfizmas, kai toje pačioje populiacijoje auga vienalyčiai moteriški ir dvilyčiai individai. Individų nepasižyminčių moterišku dvinamiškumu žiedai yra apdulkinami greičiau nei individų pasižyminčių šituo požymiu (33,34). *Thymus* genties rūšys gali nesunkiai kryžmintis tarpusavyje, todėl aptinkama daug natūralios kilmės tarprūšinių hibridų (30).

Thymus genties augalai pasižymi cheminiu polimorfizmu, todėl pagal kaupiamų eterinių aliejų dominuojantį komponentą yra išskiriamos dvi pagrindinės chemotipų grupės: fenoliniai ir nefenoliniai. Chemotipai yra nulemti genetiškai, bet, keičiantis meteorologiniams veiksniams (temperatūrai, lietaus kiekiui, saulės šviesos trukmei), dirvožemio kokybei bei augalo sezoninio vystymosi fazei, gali keistis augaluose kaupiamų eterinių aliejų ir juos sudarančių

cheminių junginių kiekybinė sudėtis ir dominuojančių monoterpenų dalis (7,19,35). Čiobrelių genties augalų eteriniuose aliejuose yra randama apie 360 skirtingų lakiųjų komponentų, iš kurių dominuoja monoterpenai, o pastaruosiuose timolis ir karvakrolis yra dažniausiai aptinkami, bei mažesniais kiekiais aptinkamai ir seskviterpenai. Augaluose eterinis aliejus yra biosintetinamas ir kaupiamas specializuotuose liaukutėse – trichomuose (7,19,35,36). *Thymus* genties augalų eteriniai aliejai turi antibakterinių, antigrybelinių, antimutageninių, antivėžinių, antioksidacinių, antispazminių savybių, todėl yra naudojami maisto, farmacijos, kosmetikos ir parfumerijos pramonėse. Farmacijoje čiobrelių preparatai yra palčiai naudojami gydant kvėpavimo sistemos ligas, o retesniais atvejais – virškinimo sutrikimus (1–7).

T. pulegioides yra daugiametis, šliaužiantis puskrūmis, turintis keturbriaunį stiebą su plaukeliais ant briaunų. Šio augalo lapai yra kiaušinio formos, didžiausio pločio lapo mentės viduryje ir su aiškiai išreikštu lapkočiu (37,38). Šis augalas auga sausose, akmenuotose ir žvyringose dirvose, nuo žemumų iki kalnų ir dažnai apimantis didelius pievų plotus saulėtuose žemyno kalvų šlaituose. Keturbriaunis čiobrelis gali augti rūgščiame, neutraliame ir šarminiame dirvožemyje (pH nuo 5,1 iki 8,1) (38,39). Lietuvoje šis augalas yra dažnas, daugiausia paplitęs pietinių ir rytinių rajonų sausose pievose, ganyklose, kalvų ir pylimų šlaituose, pakelėse (9). *T. pulegioides* yra dažnai randamas Europoje ir Viduržemio jūros regione (2). Šios rūšies augalai pasižymi cheminiu polimorfizmu ir yra išskiriami aštuoni chemotipai: α -terpinilo acetato, fenchono, timolio/karvakrolio/ γ -terpineno/p-cimeno, timolio, karvakrolio/ γ -terpineno/p-cimeno, geranialio/geraniolio/neralio, linalolio, cis-sabineno hidrato (1,11,40). Nors centrinėje Europoje yra aptinkami visi keturbriaunio čiobrelio chemotipai, Šiaurinėje Europos dalyje dažniausiai randami fenoliniai chemotipai (timolio ir karvakrolio) (41). Remiantis literatūros duomenimis, *T. pulegioides* augalai gali sukaupti eterinio aliejaus nuo 0,28 % iki 0,60 % (eterinio aliejaus masė padalinta iš augalo žaliavos masės), jei nedžiovintas augalas ir nuo 0,60 % iki 1,31 %, jei džiovintas augalas, o Lietuvoje šios rūšies augalai sukaupia nuo 0,33 % iki 1,21 % (38,42). Lietuvoje išskiriami šeši keturbriaunio čiobrelio chemotipai: linalolio, timolio, α -terpinilo acetato, geranialio/geraniolio/neralio, karvakrolio/ γ -terpineno/p-cimeno, timolio/karvakrolio/ γ -terpineno/p-cimeno. (10–12)

1.2. Eterinių aliejų biosintezė, savybės, reikšmė, išgavimo būdai

Dažniausiai eteriniai aliejai yra specifinio kvapo, bespalviai, aliejaus konsistencijos, lakiųjų organinių junginių mišiniai. Vis tik, eterinių aliejų spalvos spektras gali apimti nuo geltonos

iki tamsiai rudos, su visais tarpiniais atspalviais, išskyrus ramunėlių eterinius aliejus, kurie atrodo mėlynai violetiniai. Eteriniai aliejai dažniausiai yra lengvesni už vandenį bei yra hidrofobiniai – blogai tirpsta vandenyje, bet gerai tirpsta riebaluose, alkoholiuose ir daugumoje kitų organinių skysčių (43). Terpenoidų ir fenilpropanoidų dariniai yra pagrindiniai eterinių aliejų komponentai. Daugumos augalų eteriniuose aliejuose terpenoidai sudaro apie 80% (44).

Terpenodai, kaip antriniai metabolitai, susidaro mevalono rūgšties biosintezės kelyje. Šitame kelyje geranilo pirofosfatas (GPP) yra monoterpenų pirmtakas, o farnezilpirofosfatas (FPP) – seskviterpenų pirmtakas. Monoterpenų biosintezė pagrindinai vyksta augalų ląstelių plastidėse, o seskviterpenų – citoplazminėje matricoje (citozolyje) (45).

Augalai sintetina eterinius aliejus tam, kad mažintų abiotinį stresą, alelopatijai, apsaugai nuo žolėdžių ir mikrobinių patogenų, taip pat apdulkintojų ir sėklų platintojų pritraukimui. Tiesioginis apsauginis eterinių aliejų poveikis yra daugiausia atbaidantis ir (arba) mažinantis virškinamumą, augimą ir dauginimąsi. Prie šito poveikio prisideda seskviterpenai. Alelopatinis eterinių aliejų poveikis leidžia juos sintetintiems augalams daryti įtaką kitų savo bendrijos augalų augimui, išlikimui, vystymuisi ir dauginimuisi. Už šį poveikį pagrindinai atsakingi monoterpenai. Eterinių aliejų sintezei įtakos turi temperatūra, šviesa, drėgmė, CO₂ ir ozono lygis. Izoprenas ir monoterpenai didina bendrą fotosintezės šiluminę toleranciją, apsaugo fotosintezės aparatą ir padeda palaikyti fotosintezės aktyvumą esant aukštai temperatūrai (virš 40 °C) (14–17).

Didžioji dalis eterinių aliejų, taip pat tie, kurie yra sintetinami *Thymus* genties augaluose, turi antimikrobinių savybių (antibakterinių, antivirusinių, antigrybelinių). Todėl jie yra naudojami farmacijoje ir maisto pramonėje (skoniui, aromatui ir konservavimui). Eteriniai aliejai yra plačiai naudojami burnos skysčių ir dantų pastos gamyboje. Farmacijoje iš eterinių aliejų gaminami preparatai yra plačiai naudojami gydant įvairias infekcines kvėpavimo takų, virškinimo ir šalinimo sistemų, odos ligas. Jie taip pat pasižymi antioksidaciniu poveikiu bei gali neutralizuoti laisvuosius radikalus. Nuo senovės laikų eteriniai aliejai dėl aromatinių savybių yra naudojami kosmetikos ir parfumerijos pramonėje (17,46–49).

Eterinius aliejus galima išskirti iš augalų įvairiais distiliavimo metodais: distiliacija garais, hidrodifuzija, hidrodistiliacija, distiliacija susmulkinant (43,50).

Distiliavimas garais vyksta tam pritaikytame aparate, kuriame tiriamojo augalo žaliava padedama ant viduje esančių specialių grotelių ir garai, tiksliai reguliuojant jų kiekį, leidžiami iš garų generatoriaus iš apačios augalinei žaliai. Eteriniais aliejais užpildyti garai teka per kolonėlę ir kondensuojami prieš dekantavimą ir surinkimą į Florencijos kolbą. Eteriniai aliejai,

kurie yra lengvesni (dažniausiai) arba sunkesni už vandenį, sudaro dvi nesimaišančias frakcijas, kurios lengvai atskiriamos. Šio metodo principas yra tas, kad bendras garų slėgis yra lygus aplinkos slėgiui esant maždaug 100 °C, todėl lakieji komponentai, kurių virimo temperatūra svyruoja nuo 150 iki 300 °C, gali būti išgarinami esant vandens temperatūrai. Naudojant šį metodą, dėl aukštos temperatūros ir drėgmės eterinio aliejaus kvapas gali pakisti, nes kai kurie lakieji junginiai nugaruoja (43).

Hidrodifuzija – metodas, kai sistemoje naudojant osmosinį spaudimą garai įpurškiami iš viršaus, teka per augalinę žaliavą į apačią. Garų mišinys su eteriniais aliejais yra kondensuojamas tiesiai po augalo žaliavos bandinio grotelėmis. Šis metodas gali sumažinti garų suvartojimą ir distiliavimo laiką, tuo tarpu galima gauti geresnę išėigą, palyginti su distiliavimu garais (43).

Hidrodistiliacija – tai distiliavimo garais variantas, kurį Prancūzijos farmakopėja rekomenduoja eterinių aliejų ekstrahavimui iš džiovintų prieskonių ir eterinių aliejų kokybės kontrolei laboratorijoje. Vietoj garų tiekimo hidrodistiliuojant tiriamosios augalinės žaliavos yra tiesiogiai panardintos į vandenį. Tada šis kietos medžiagos ir skystio mišinys kaitinamas iki virimo esant atmosferos slėgiui inde, kur šiluma leidžia augalų ląstelėse išskirti kvapiąsias molekules. Šie lakieji aromatiniai junginiai ir vanduo sudaro azeotropinį mišinį, kuris gali būti kartu išgarinamas esant tokiam pačiam slėgiui, o po to kondensuojamas ir atskiriamas Florencijos kolboje dėl jų nesimaišymo ir tankio skirtumo. Svarbu paminėti, kad išgauti eteriniai aliejai skiriasi nuo pradinių, dėl ilgo distiliavimo laiko (43).

Distiliacija susmulkinant (angl. maceration distillation) taikoma išgauti eterinius aliejus, kuriuose tarp lakiųjų junginių yra glikozidinės jungtys. Prieš distiliuojant, augalinės žaliavos smulkinimas yra vykdomas šiltame vandenyje, kad tos jungtys būtų suardytos. Toks distiliacijos būdas yra naudojamas išgauti eterinius aliejus iš brokolių, česnakų, svogūnų, marenikės lapų, migdolo riešutų, muskato riešutų (50).

Siekiant giliau ištirti gautus eterinius aliejus, reikalinga atskirti ir identifikuoti jų cheminius komponentus. Vienas iš efektyviausių eterinių aliejų komponentų atskyrimo metodų yra dujų chromatografija (angl. gas chromatography – GC). GC apima atskyrimo technologijas, pagrįstas lakiųjų junginių analičių adsorbcijos skirtumu, kai mobili fazė yra dujos, o stacionarioji fazė yra kieta (dujų-kietųjų medžiagų chromatografija) arba pusiau kietas skystis (dujų-skysčių chromatografija). Kadangi didžioji dauguma aromatinių medžiagų ir kvapiųjų medžiagų yra lakios, GC metodai yra tinkamiausi jų atskyrimo ir kiekybinio nustatymo metodai. Tačiau GC technologijų

naudojimas yra ribotas santykinai mažu junginių skaičiumi: analitės garų slėgis turi būti mažesnis nei 350–400 °C ir ji turi būti stabili atskyrimo temperatūroje (51).

Įprastą GC prietaisą sudaro nešančiųjų dujų tiekimo sistema (mobili fazė), injektoriaus prievadas, atskyrimo kolonėlė, detektorius ir duomenų apdorojimo įrenginys. Buvo sukurta nemažai purkštukų sistemų. Purkštuvai turi tiekti išgarintą mėginį į atskyrimo kolonėlės pradžią kuo mažesniu pradiniu pralaidumu. Dvi pagrindinės purkštukų klasės yra garinimo ir ant kolonėlės esantys purkštukai. Garinimo purkštukų temperatūra yra identiška arba aukštesnė už GC kolonėlės temperatūrą. Šiose sistemose mėginys greitai išgarinamas. Mėginius į injektorius galima įvesti švirkštu. Mėginio komponentai, kurie nėra lakūs injektoriaus temperatūroje, lieka prijungti prie purkštuko arba analitinės kolonėlės pradžioje, todėl sumažėja visos GC sistemos efektyvumas. Ant kolonėlės esantys purkštukai mėginį nuneša tiesiai į kolonėlę (51).

GC kolonėlės būna dviejų tipų – su užpildu ir kapiliarinės. Užpildytos kolonėlės paruošiamos užpildant metalines arba stiklines kolonėles mažomis dalelėmis, paprastai padengtomis plonu didelės molekulinės masės nelakaus polimero sluoksniu. Kietas pagrindas dažnai būna diatomitinė žemė, stiklo rutuliukai ir t.t. Be nelakumo, dangos medžiaga turi būti chemiškai stabili ir mažo klampumo matavimo temperatūroje, taip pat turi būti geras mėginio komponentų selektyvumas ir turi gerai drėkinti inertinių dalelių paviršių bei vidinę kolonėlės sienelę. Dėl didėjančio slėgio užpildytų kolonėlių maksimalus ilgis yra apie 3 m, o kapiliarinės kolonėlės gali siekti 60 m. Užpildytos kolonėlės pranašumai yra didesnis mėginio dydis, mažesnė kaina; tačiau kapiliarinių kolonėlių efektyvumas yra gerokai didesnis, jos tinkamesnės sudėtingiems mišiniams analizuoti (51).

Kapiliarinių kolonėlių vidinis skersmuo yra 0,2–0,53 mm, jos dažniausiai gaminamos iš lydymo silicio dioksido. Kapiliarinės kolonėlės vidinė sienelė padengta plonu polimerinės stacionarios fazės sluoksniu, kurio storis svyruoja nuo 0,1 iki 5 μm. Kolonėlės dangos stabilumas gali būti padidintas sukryžminus polimerą ir kovalentiškai surišant jį su vidinės sienelės paviršiumi. Patikima kolonėlės temperatūros kontrolė vaidina lemiamą vaidmenį atskyrimo proceso veiksmingumui. Matavimai gali būti atliekami esant pastoviai temperatūrai (izokratinio atskyrimo režimas) arba kolonėlės temperatūra gali būti padidinta pagal iš anksto nustatytą programą (temperatūros gradientas). Daugeliu atvejų nešiklio dujos yra chemiškai inertiškos dujos, neturinčios žymios adsorbcijos, tokios kaip helis, vandenilis ar azotas. Dėl didelio degumo vandenilis nenaudojamas dažnai, o helio naudojimą riboja jo kaina. GC praktikoje paprastai naudojamas azotas; tačiau ypatingiems uždaviniams spręsti tiek praktikoje, tiek GC teorijoje gali būti naudojamos ir kitos dujos (51).

Tiriamų cheminių junginių detektorius įrengiamas GC kolonėlės gale. Jis sąveikauja su tirpių medžiagų molekulėmis; sąveika paverčiama signalu, kuris siunčiamas į įrašymo ir/ar duomenų apdorojimo įrenginį. Sudaromas signalo intensyvumo ir analizės laiko grafikas (chromatograma). Pagrindiniai detektoriaus parinkimo kriterijai yra jautrumas (mažiausias aptinkamas analitės kiekis) ir selektyvumas (skirtumai tarp detektoriaus atsakymų skirtingoms tos pačios koncentracijos analitėms). Buvo sukurta nemažai detektorių, skirtų įvairioms cheminių junginių aptikimo problemoms spręsti. Dažniausiai naudojami liepsnos jonizacijos, azoto-fosforo, liepsnos fotometriniai, elektronų gaudymo, šilumos laidumo, chemiluminescenciniai detektoriai. Pastarojo dešimtmečio įvairių tipų masės spektrometrijos (angl. mass spectrometric – MS) metodai buvo sukurti ir yra naudojami su GC. Be jautrumo, pagrindinis MS sistemų privalumas yra tai, kad jos leidžia identifikuoti analites, ko negalima tiesiogiai pasiekti kitais aptikimo metodais (51).

1.3. Fenofazės įtaka eterinių aliejų kiekybinei ir kokybinei sudėčiai

Be jau anksčiau minėtų veiksnių, darančių įtaką eterinių aliejų biosintezei, dar pakankamai stiprų poveikį jų kiekybinei ir kokybinei sudėčiai turi augalo fenofazė, kurios metu žaliava yra renkama (18–20). A. R. Golparvar ir B. Bahari tirdami *Thymus vulgaris* L., užaugintų Irane, fenofazės įtaką eterinių aliejų kiekiui bei sudėčiai, nustatė, kad *T. vulgaris* didžiausi vidutiniai eterinių aliejų bei didžiausi timolio kiekiai buvo gaunami augalo žydėjimo viduryje, o mažiausi kiekiai – vegetatyvinėje fazėje, ir todėl autoriai rekomenduoja rinkti šios rūšies žaliavą žydėjimo pradžioje ir vengti rinkti augalo vegetatyvinėje fazėje (18).

Felice Senatore savo moksliniame darbe nustatinėjo žaliavos rinkimo laiko įtaką *T. pulegioides*, užaugintų pietų Italijoje, eteriniams aliejams. Pagal gautus rezultatus, buvo nustatyta, kad didžiausias eterinių aliejų kiekis šitoje rūšyje buvo pilno žydėjimo periode (1,11 g/100 g šviežiai žaliavai), monoterpeniniai angliavandeniliai santykinai gausiausi buvo prieš ankstyvąjį žydėjimą (50,3 %), deguonies turinčių monoterpenų santykinai daugiausia buvo pilno žydėjimo metu (52,4 %), bei timolio ir karvakrolio santykinai daugiausia buvo irgi pilno žydėjimo metu (43,3 %) (20).

Vaida Vaičiulytė, Rita Butkienė ir Kristina Ložienė tyrinėjo meteorologinių sąlygų ir fenofazės įtakas eteriniam aliejui bei karvakrolio ir jo pirmtakų (p-cimenas ir γ-terpinenas) kiekiui *Thymus pulegioides* karvakrolio chemotipo individuose, užaugintuose Lietuvoje. Šio tyrimo duomenys buvo renkami šešių metų laikotarpiu. Jos nustatė, kad didžiausias eterinio aliejaus

kiekis buvo po antrojo žydėjimo periodo, per sėklų brendimo periodą, o mažiausias – antrojo žydėjimo stadijoje. Karvakrolio procentiškai irgi daugiausia buvo po antrojo žydėjimo periodo, per sėklų brendimo periodą, p-cimeno procentiškai daugiausia buvo pirmo žydėjimo stadijoje, γ-terpineno procentiškai daugiausia buvo stiebo ilgėjimo stadijoje, mažiausi kiekiai buvo nustatyti antrojo žydėjimo metu (19).

1.4. Lapų epidermio struktūros, susijusios su eterinio aliejaus kaupimusi, fenofazės įtaka žiotelių tankiui.

Žiotelės (angl. *stomata*) yra atsakingos už dujų apykaitą augale – per jas į audinius patenka anglies dioksidas, paimamas arba pašalinamas deguonis, garinamas vanduo. Žiotelės yra epidermyje esančios angelės, arba poros, kurių kiekvieną riboja dvi varstomosios ląstelės (angl. “guard cells”) ir dvi arba keturios pagalbinės ląstelės (52). Žiotelių sistema yra būdinga induočiams augalams, kurie skirstomi į sporinius bei sėklinius induočius. Sėkliniai induočiai savo ruožtu skirstomi į plikasėklius ir gaubtasėklius. Pastariesiems priklauso *Thymus* gentis. (53)

Žiotelės dažniausiai būna ant žalių antžeminių augalų dalių, ypač ant lapų. Jos taip pat gali susiformuoti ant stiebų, bet rečiau nei ant lapų. Kai kurių chlorofilo neturinčių sausumos augalų (*Monotropa*, *Neottia*) antžeminės dalys ir šaknys paprastai neturi žiotelių, tačiau tokią struktūrą turi šakniastiebiai. Žiotelės gali susiformuoti ir ant kai kurių panardintų vandens augalų dalių. Įvairių spalvų žiedlapiai dažnai turi žioteles, kartais nefunkcionuojančias. Vaisiai taip pat gali turėti žioteles. Žiotelių yra ant kuokelių ir vaislapynų. (53)

Žiotelės gali būti paskirstytos lapų paviršiuose šiais būdais:

- *Amfistomatinių* lapo abiejuose paviršiuose yra žiotelės. Dauguma augalų turi tokį pasiskirstymą. Yra išskiriami šio būdo potipiai:
 - *Heterostomatinis* lapas turi žioteles, kurių apatiniame paviršiuje yra daugiau nei dvigubai dažniau nei viršutiniame paviršiuje.
 - *Izostomatinis* lapas turi žioteles, kurios abiejuose paviršiuose susidaro maždaug vienodu dažniu.
- *Hipostomatinis* lapas turi žioteles tik apatiniame paviršiuje. Daugeliui medžių rūšių būdingi *hipostomatiniai* lapai, pavyzdžiui, paprastieji kaštonai (*Aesculus hippocastanum* L.) ir liepos (*Tilia europaea* L.).
- *Epistomatinis* lapas turi žioteles tik viršutiniame lapo paviršiuje. Kai kurie plūduriuojantys augalai yra epistomatiniai. (53)

Daugelio rūšių lapų žiotelių tankis yra nuo 100 iki 300 vnt./mm². Daugumos augalų apatiniame (abaksialiniame) paviršiuje yra daugiau žiotelių nei viršutiniame (adaksialiniame) paviršiuje. Stomatalinis santykis yra žiotelių kiekio adaksialiniame paviršiuje santykis su žiotelių kiekiu abaksialiniame paviršiuje. (53)

Žiotelių skaičius ploto vienetu keičiasi augant lapui. Ankstesniuose vystymosi etapuose jis paprastai būna didesnis nei vėlesniuose etapuose. Žiotelė gali padidėti ir keisti formą, didėjant lapalakščiams. (53)

Lapui subrendus, žiotelių skaičius lapo ploto vienetu gali būti nevienodas. Jį gali paveikti aplinkos veiksniai. Daugiau žiotelių ploto vienetu susidaro saulėje eksponuotuose lapuose nei šešėliuose. Drėgnoje dirvoje ir didelėje drėgmėje augančių augalų lapuose žiotelių ploto vienetu susidaro daugiau nei tų, kurie auga sauso dirvožemio sąlygomis. Žiotelių tankiui įtakos gali turėti lapų padėtis, CO₂ koncentracija atmosferoje, temperatūra, dirvos pH. (21–24)

Taip pat yra atliktas darbas su datuline paprika (*Capsicum chinense* Jacq.), kurioje buvo tiriama fenofazės įtaka žiotelių tankiui. Tyrimas parodė, kad fenofazė turėjo didelę įtaką žiotelių tankiui viršutinėje lapo pusėje, didžiausias tankis buvo prieš žydėjimo fazę, o apatinėje lapo pusėje fenofazės nepadarė didelio skirtumo žiotelių tankiui. (25)

Thymus genties augalų lapai turi žioteles abejose lapų pusėse. Šios genties rūšių lapų apatinėje pusėje visada yra daugiau žiotelių nei viršutinėje, bet žiotelių santykis skiriasi priklausomai nuo rūšies. Daugumai rūšių skirtumas tarp lapo apatinės pusės ir viršutinės pusės žiotelių tankio yra nežymus, svyruojantis nuo kelių iki penkiasdešimt procentų, bet žiotelių pasiskirstymas *Thymus pulegioides* skiriasi labiau nei kituose *Thymus* genties augaluose. Šios rūšies apatinėje lapo pusėje yra kelias dešimtis kartų daugiau žiotelių nei viršutinėje pusėje. (54)

Be žiotelių, dar viena svarbi lapo epidermio struktūra yra eterinių aliejų liaukutė, arba liaukiniai plaukeliai, arba trichomai (angl. glandular trichomes). Trichomai yra epidermio tęsinys, atsirandantis iš epidermio ląstelių ir gali būti sudarytas iš vienos arba kelių ląstelių. Jų dydis gali svyruoti nuo kelių mikrometrų iki kelių centimetrų ir gali būti įvairių formų. Kriterijus, kuris dažniausiai naudojamas klasifikuojant juos, yra tai, ar jie yra neliaukiniai, ar liaukiniai. Neliaukiniai trichomai yra plačiai paplitę augalų karalystėje, įskaitant gaubtasėklius, plikasėklius, pataisūnus, paparčius ir samanas. Liaukiniai trichomai paprastai yra daugialąstės, sudarytos iš diferencijuotų bazinių, stiebinių ir viršūninių ląstelių ir gamina didelius kiekius skirtingų klasių specializuotų metabolitų. Augalai gamina šiuos liaukinius trichomus ir jų specializuotus metabolitus, kaip eterinius aliejus, kad galėtų sąveikauti su aplinka. Jie atlieka jau prieš tai minėtus esminius

vaidmenis, pavyzdžiui, saugant nuo žolėdžių ir patogenų, ir apsaugo nuo abiotinių veiksnių, tokių kaip UV, stipri šviesa ar sausros stresas (55).

Nepaisant liaukinių trichomų morfologijos įvairovės, keli tipai, atrodo, kartojasi įvairiose augalų rūšyse ir šeimose. Atrodo, kad jų morfologija yra pritaikyta prie jų gaminamų junginių tipo, ypač atsižvelgiant į lakumą. Nelakios ir dažnai lipnios dervingos medžiagos, tokios kaip acilcukrai ar tam tikri diterpenoidai, dažniausiai gaminamos kapitatinėse trichomose (angl. *capitate trichomes*). Paprastai juos sudaro viena bazinė ląstelė, viena ar kelios stiebelio ląstelės ir viena ar kelios sekrecinės ląstelės kotelio gale. Trichomo gale esančios ląstelės išskiria junginius tiesiai į trichomo paviršių. Lakiuosius junginius gaminančiuose trichomuose paprastai yra saugojimo vietos, leidžiančios sulaikyti lakiąsias medžiagas savo skystoje būsenoje, kurios išsiskiria tik pažeidžiant trichomus (pvz., po žolėdžių). Ši erdvė gali būti subkutikulė (angl. *subcuticular*), tai yra, esanti tarp sekrecinių ląstelių ir kutikulės (angl. *cuticle*). Taip yra *Lamiaceae* (mėtų šeimos) skydiškuose trichomuose (angl. *peltate trichomes*) arba *Asteraceae* (ramunėlių šeimos) dvišakiuose trichomuose (angl. *bifurcate trichomes*)(55).

Thymus genties augaluose yra aprašyti trys morfologiškai skirtingi liaukinių trichomų tipai:

- Peltatiniai trichomai (angl. *peltate trichomes*), susidedantys iš bazinės ląstelės, stiebelio ląstelės ir 12 ląstelių galvutės, yra pasiskirstę ant stiebo, lapo, vainiko ir išorinės taurelės pusės.
- Kapitatiniai trichomai (angl. *capitate trichomes*), susidedantys iš vienaląščio pagrindo, 1–2 ląščių stiebo ir vienaląstės galvutės, yra išsidėstę plačiau nei peltatiniai, esantys ant stiebo, lapo, ir taurelės.
- Digitiforminiai trichomai (angl. *digitiform trichomes*) yra tiesiog paskirstyti išorinėje vainikėlio pusėje, kurią sudaro 1 bazinė ląstelė, 3 stiebo ląstelės ir 1 galvos ląstelė. Visi trys liaukų trichomų tipai gali išskirti eterinį aliejų.

Visuose peltatiniuose trichomuose ir digitiforminiuose trichomuose eterinis aliejus saugomas didelėje subkutikulinėje erdvėje, išsiskiriantis plyšus kutikulei, o kituose trichomuose eterinis aliejus kerta ploną kutikulę (56).

V. Kamašina ir K. Ložiene tyrė *Thymus × oblongifolius* Opiz, *Thymus pulegioides* L. ir *Thymus serpyllum* L., surinktų Lietuvoje, viršutinių ir apatinių lapų pusių epidermių struktūras: eterinio aliejaus liaukučių tankį ir diametrą, epidermio ląstelių skaičių aplink eterinio aliejaus liaukutes bei žiotelių tankį. Šiame tyrime buvo naudotas įspaudo metodas ant žydėjimo metu surinktu augalų. Pagal rezultatus matome, kad didžiausias vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis yra *Thymus pulegioides* apatinėje lapo epidermio pusėje ir *Thymus × oblongifolius*

viršutinėje lapo epidermio pusėje. Didžiausias vidutinis eterinio aliejaus laukučių diametras buvo *Thymus pulegioides* viršutinėje lapo epidermio pusėje. Didžiausias vidutinis žiotelių tankis buvo *Thymus pulegioides* apatinėje lapo epidermio pusėje (57).

TYRIMO METODAI

2.1. Augalinės žaliavos rinkimas

Augalinė žaliava buvo ruošiama Gamtos tyrimų centro Lauko bandymų stotyje (Prašiškių g. 41, Vilnius). *Thymus pulegioides* individai buvo perkelti iš natūralių augaviečių, vegetatyviai padauginėti ir kiekviename bandomajame laukelyje pasodinti po 9 individus. Iš viso buvo įkurti 8 eksperimentiniai laukeliai, kurių kiekvieno plotas 1 m². Pirmame, trečiame ir penktame laukeliuose buvo pasodinti moteriški fenoliniai individai, antrame, ketvirtame ir šeštame laukeliuose buvo pasodinti hermafroditiniai fenoliniai individai, o septintame ir aštuntame laukeliuose buvo pasodinti moteriški nefenoliniai individai (2.1.1 Paveikslas). Fenoliniai chemotipai yra augalų tipas, kurių eterinių aliejų sudėtyje dominuoja timolis ir karvakrolis. Nefenolinių chemotipų eterinių aliejų sudėtyje pagrindiniai dominuoja linalolis ir geraniolis, bet gali dominuoti ir kitos medžiagos (35). *T. pulegioides* individai buvo auginami vienodomis sąlygomis, netręšiami ir nelaistomi. Žaliava nuimama keturis kartus skirtingais *T. pulegioides* fenofazių periodais: I pjovimas prieš žydėjimą (kai pilnai susidaro pumpurai, tuomet iš kiekvieno laukelio buvo nupjaunami 3 individai (individai 1, 2, 3) (2.1.2 Paveikslas), II pjovimo metu žaliava buvo pjaunama pilno žydėjimo metu, tuomet irgi buvo pjaunami 3 individai (individai 4, 5, 6) kiekviename bandomajame laukelyje (2.1.3 Paveikslas), III pjovimo metu žaliava buvo imama iš paskutiniųjų 3 individų (individai 7, 8, 9) šiems pilnai peržydėjus (2.1.4 Paveikslas). Ketvirtame laukelyje iš eksperimentinių laukelių po žydėjimo žaliava nebuvo surinkta, kadangi visi trys individai buvo nudegę. IV pjovimo metu pjaunama iš po I ir II pjovimų atželę ir antrąkart sužydėję *T.pulegioides* individai (iš viso 6 individai (individai 1, 2, 3, 4, 5, 6) (2.1.5 Paveikslas). Kiekvieno pjovimo augalinė žaliava (vienas *T. pulegioides* mėginys), surinkta iš 8 skirtingų bandomųjų laukelių, džiovinta atskirai kambario temperatūroje.

7	8	9
4	5	6
1	2	3

8 L- MN

7	8	9
4	5	6
1	2	3

7 L- MN

7	8	9
4	5	6
1	2	3

6 L- HF

7	8	9
4	5	6
1	2	3

5 L- MF

7	8	9
4	5	6
1	2	3

4 L- HF

7	8	9
4	5	6
1	2	3

3 L- MF

7	8	9
4	5	6
1	2	3

2 L- HF

7	8	9
4	5	6
1	2	3

1 L- MF

2.1.1 Paveikslas. Eksperimentinių laukelių (L) ir augalų išdėstymo schema. MF – moteriški fenoliniai individai; HF – hermafroditiniai fenoliniai individai; MN- moteriški nefenoliniai individai



2.1.2 Paveikslas. *Thymus pulegioides* prieš pirmą žydėjimą (I pjovimas).



2.1.3 Paveikslas. *Thymus pulegioides* žydėjimo metu (II pjovimas).



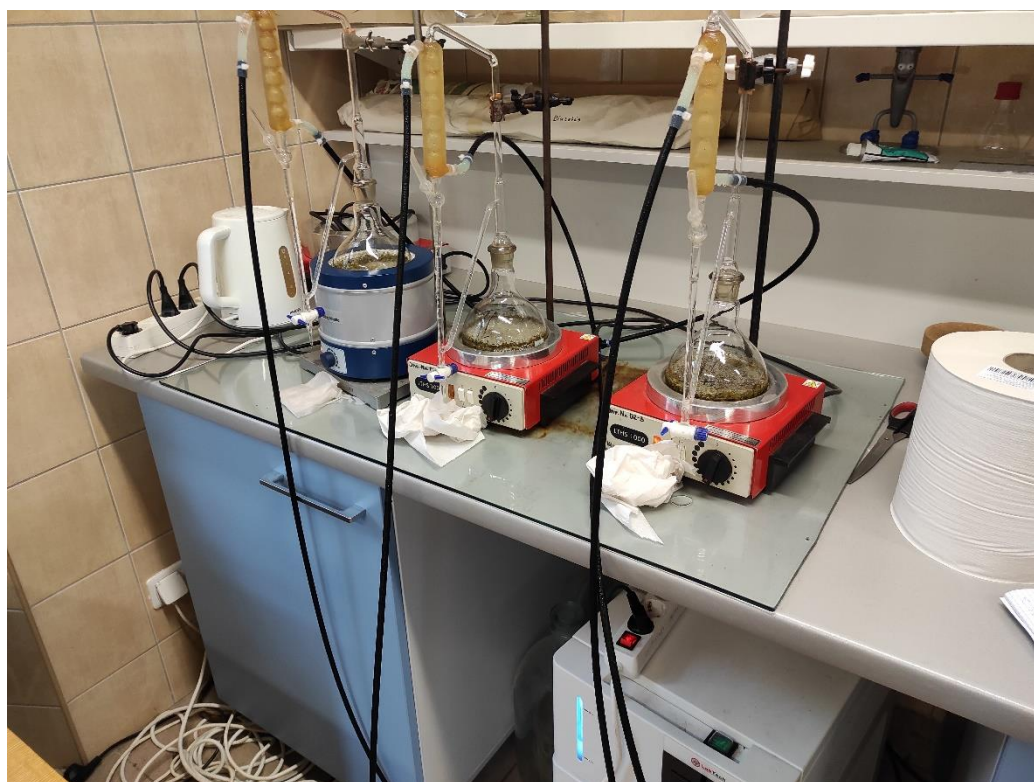
2.1.4 Paveikslas. *Thymus pulegioides* po pirmo žydėjimo (III pjovimas).



2.1.5 Paveikslas. *Thymus pulegioides* antro žydėjimo metu (IV pjovimas).

2.2. Eterinių aliejų kiekybinė analizė

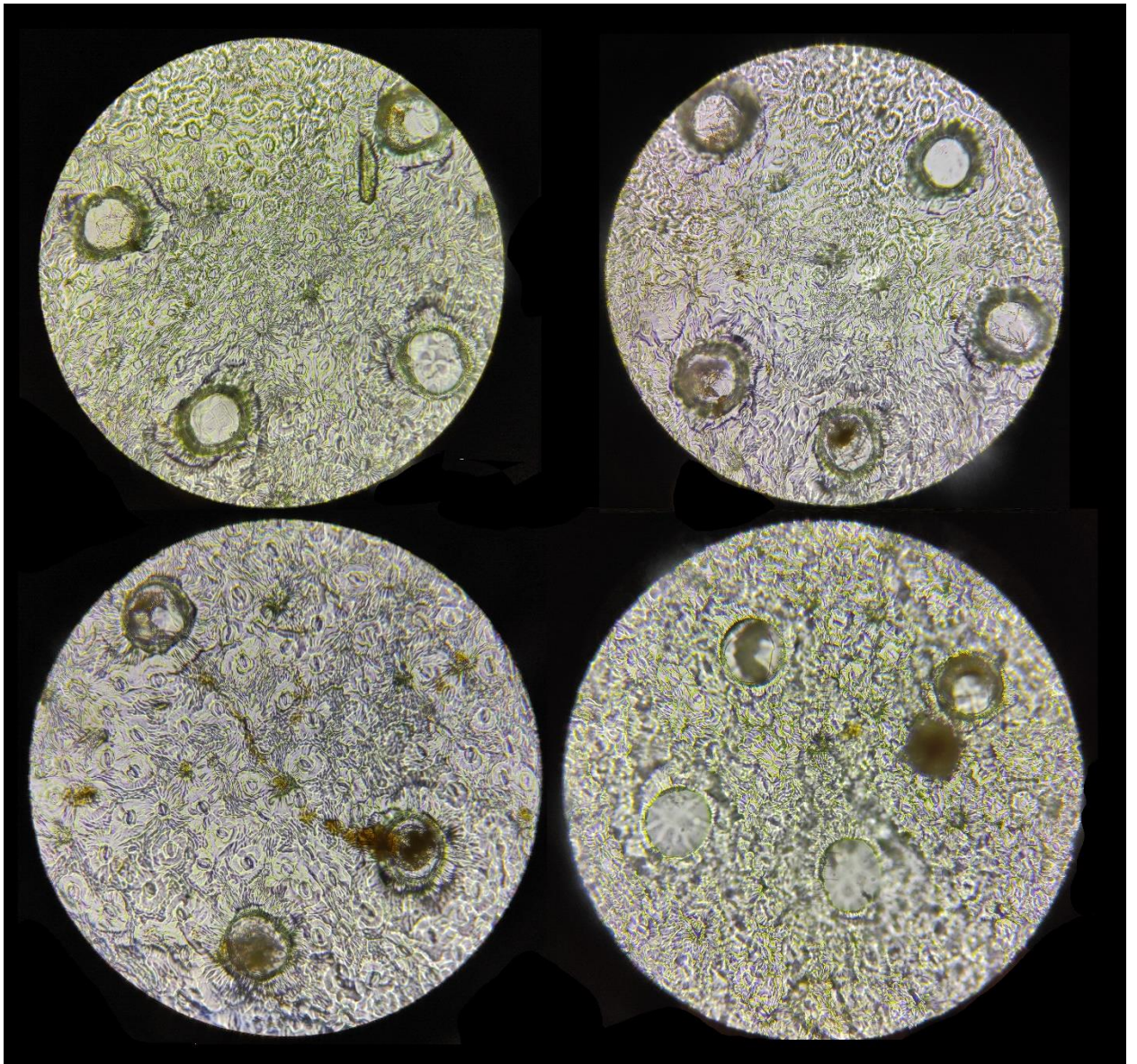
Eterinių aliejų kiekybinei analizei naudota orasausė žaliava, naudojami tik lapai ir žiedai, stiebai atskiriami nuo lapų ir žiedų ir analizei nenaudojami. Eteriniai aliejai išskirti hidrodistiliacijos metodu, naudojant Klevengerio aparatus (Clevenger apparatus) (Paveikslas 2.2.1) pagal European Pharmacopoeia aprašytą metodiką (2008) (58). Distiliavimo trukmė dvi valandos. Augalinė žaliava iš kiekvieno pjovimo distiliuota 1-3 pakartojimais priklausomai nuo turimos žaliavos kiekio. Eterinis aliejus, surinktas iš kiekvieno *T. pulegioides* žaliavos mėginio, supilamas į atskirus 2 ml stiklinius buteliukus ir laikomas šaldiklyje. Eterinio aliejaus kiekis kiekviename mėginyje buvo įvertinamas mililitrais 100 gramų orasausėje žaliavoje (V/W – tūris iš masės).



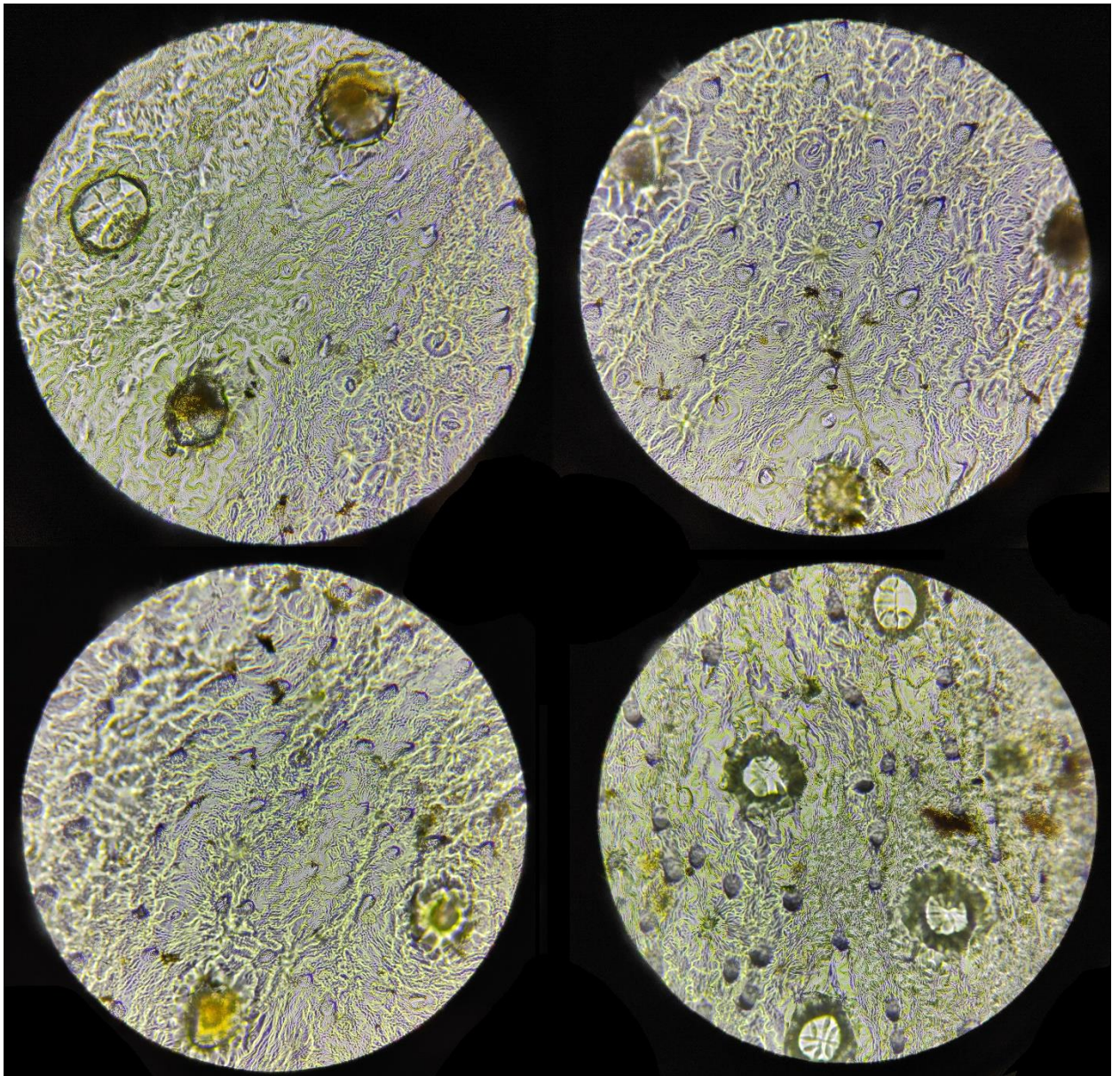
2.2.1 Paveikslas. Tyrime naudota distiliavimo įranga – Klevengerio aparatai.

2.3. Lapo epidermio struktūrų analizė

Lapo epidermio struktūrų analizė atlikta įspaudo metodu (59). Atliekant lapo epidermio struktūrų analizę įvertintas žiotelių ir eterinių aliejų liaukučių tankis 1 mm^2 bei eterinių aliejų liaukučių dydis (diametras) mikrometrais, μm . Iš kiekvieno *T. pulegioides* mėginio (nukirptos augalinės žaliavos mėginio) atrinktos 8 šakelės, jų lapeliai buvo padengiami bespalviu nagų laku: keturiose šakelėse lakuota viršutinė, kitose keturiose – apatinė lapo pusė. Išdžiūvus lakui susidariusi plėvelė nuimama ir paruošiami preparatai stebėjimui pro mikroskopą. Iš kiekvieno mėginio pagaminti du preparatai mikroskopavimui: viename preparate stebėtos epidermio struktūros apatinėje lapo pusėje (Paveikslas 2.3.1), kitame – viršutinėje (Paveikslas 2.3.2). Matymo laukų skaičius kiekviename preparate 25–30. Mikroskopuota mikroskopu Leica. Anatominių struktūrų analizei nenaudoti lapo pakraščiai, lapo pamatinė dalis, lapo gyslos.



2.3.1 **Paveikslas.** Keli epidermio struktūros apatinės lapo pusės matymo laukai, kuriose yra matomos žiotelės ir trichomai (padidinta 20 kartų).



2.3.2 Paveikslas. Keli epidermio struktūros viršutinės lapo pusės matymo laukai, kuriose yra matomos žiotelės ir trichomai (padidinta 20 kartų).

2.4. Duomenų statistinė analizė

Apskaičiuoti eterinio aliejaus kiekių vidurkiai, standartinės paklaidos, žiotelių, eterinių aliejaus liaukučių tankio ir dydžių vidurkiai, standartiniai nuokrypiai. Eterinio aliejaus kiekių skirtumui tarp skirtingų fenofazių įvertinimui naudotas Kruskal-Wallis testas. Pasirinktas reikšmingumo lygmuo $\alpha = 0,05$. Toks reikšmingumo lygmuo taikomas visame darbe. Žiotelių, eterinio aliejaus liaukučių tankio ir dydžių skirtumui įvertinti naudota vienfaktorinė dispersinė analizė (One Way Anova), jei atitinka duomenų pasiskirstymo normalumo sąlygą, ir Kruskal-Wallis testas, jei neatitinka normalumo sąlygos. Prieš taikant Anova ar Kruskal-Wallis patikrintas

duomenų pasiskirstymo normalumas, naudojant Shapiro-Wilk W testą. Statistinė analizė buvo atliekama programomis RStudio ir SPSS.

TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Fenofazės įtaka *T. pulegioides* eterinių aliejų kiekybinei sudėčiai.

Nustatyta keturbriaunio čiobrelio (*Thymus pulegioides* L.) vidutinė eterinio aliejaus koncentracija 100 gramų žaliavos kiekvieno tiriamojo laukelio skirtingose fenofazėse (3.1.1 Lentelė).

3.1.1 Lentelė. Bendra žaliavos masė, bendras eterinio aliejaus kiekis ir vidutinė eterinio aliejaus koncentracija kiekviename laukelyje skirtingos fenofazės (skirtingas spalvinis fonas) metu.

Laukelis	Chemotipas	Lytis	Fenofazė	Bendra žaliavos masė, g	Bendras eterinio aliejaus kiekis, ml	Vidutinė eter. aliejaus koncentracija, ml/100 g
1	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	18,36	0,18	0,980
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	6,347	0,04	0,630
3	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	14,911	0,17	1,140
4	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	1,707	0,01	0,586
5	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	6,359	0,04	0,629
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	6,277	0,08	1,274
7	Nefenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	9,265	0,06	0,648
8	Nefenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	11,343	0,06	0,529
1	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	22,62	0,31	1,370
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	5,943	0,05	0,841
3	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	16,988	0,2	1,177
4	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	2,028	0,02	0,986
5	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	4,572	0,06	1,312
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	8,117	0,1	1,232
7	Nefenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	18,376	0,12	0,653
8	Nefenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	29,128	0,13	0,446
1	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	9,756	0,12	1,230
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo	1,578	0,03	1,901
3	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	10,994	0,12	1,092

4*	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo	-	-	-
5	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	2,976	0,04	1,344
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo	14,421	0,16	1,109
7	Nefenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	16,597	0,06	0,362
8	Nefenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	13,398	0,07	0,522
1	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	8,059	0,12	1,489
2	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	3,821	0,04	1,047
3	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	9,687	0,14	1,445
4	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	1,374	0,03	2,183
5	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	7,736	0,08	1,034
6	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	5,341	0,06	1,123
7	Nefenolinis	Moteriška	II žydėjimas	13,939	0,07	0,502
8	Nefenolinis	Moteriška	II žydėjimas	5,982	0,06	1,003

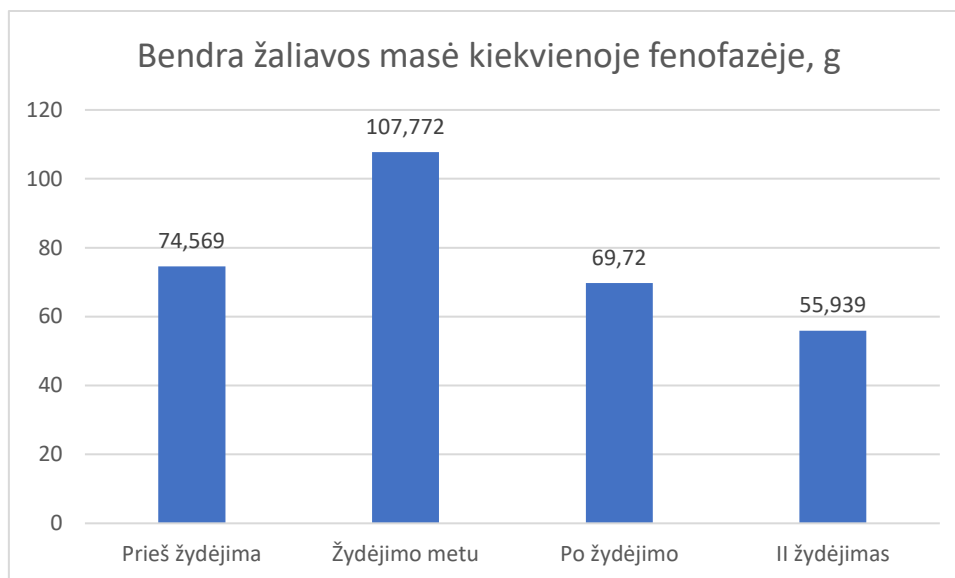
* Nebuvo surinkta, kadangi visi trys individai buvo žuvę.

3.1.2 Lentelė. Vidutiniai žaliavos masės ir eterinio aliejaus kiekiai bei koncentracijos visuose laukeliuose skirtingos fenofazės (skirtingas spalvinis fonas) metu (SD – standartinis nuokrypis).

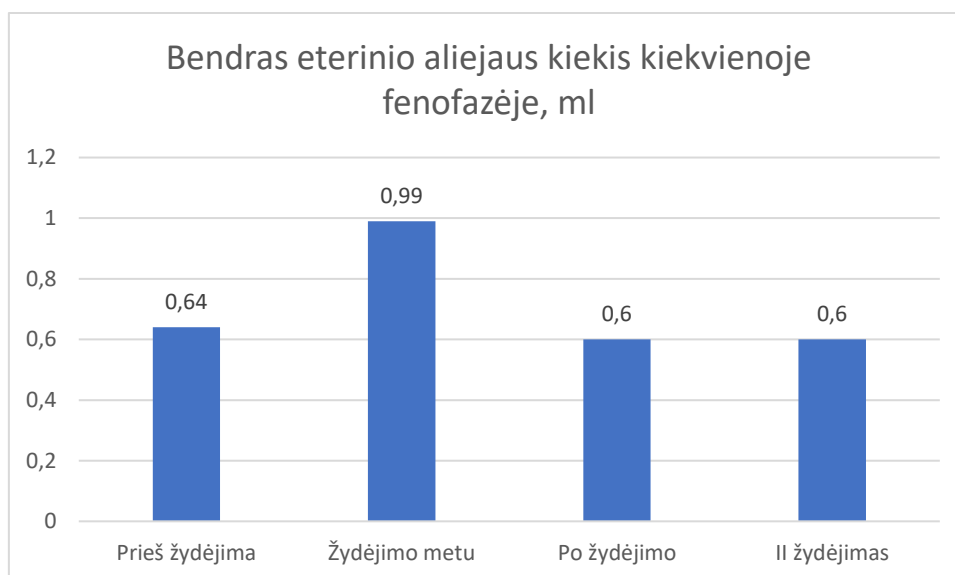
Fenofazė	Vidutinė žaliavos masė visuose laukeliuose, g	SD, g	Vidutinis eter. aliejaus kiekis visuose laukeliuose, ml	SD, ml	Vidutinė eter. aliejaus koncentracija visuose laukeliuose, ml/100 g	SD, ml/100 g
Prieš žydėjimą	6,779	2,199	0,058	0,029	0,825	0,283
Žydėjimo metu	7,698	2,251	0,071	0,031	0,962	0,374
Po žydėjimo	6,972	2,848	0,060	0,037	0,956	0,503
II Žydėjimas	6,215	2,473	0,067	0,040	1,148	0,520

Didžiausia bendra žaliavos masė buvo gauta žydėjimo metu (107,772 g), antra buvo prieš žydėjimo periode (74,569 g), trečia buvo po žydėjimo periode (69,72 g), o mažiausiai žaliavos buvo per antrą žydėjimą (55,939 g) (3.1.1 Paveikslas). Analogiškai kaip su žaliavos mase, taip pat

ir su bendru eterinio aliejaus kiekiu. Didžiausias bendras eterinio aliejaus kiekis buvo žydėjimo metu (0,99 ml), antras buvo prieš žydėjimo periode (0,64 ml), o paskutiniai periodai davė vienodus eterinio aliejaus kiekius (0,6 ml) (3.1.2 Paveikslas).



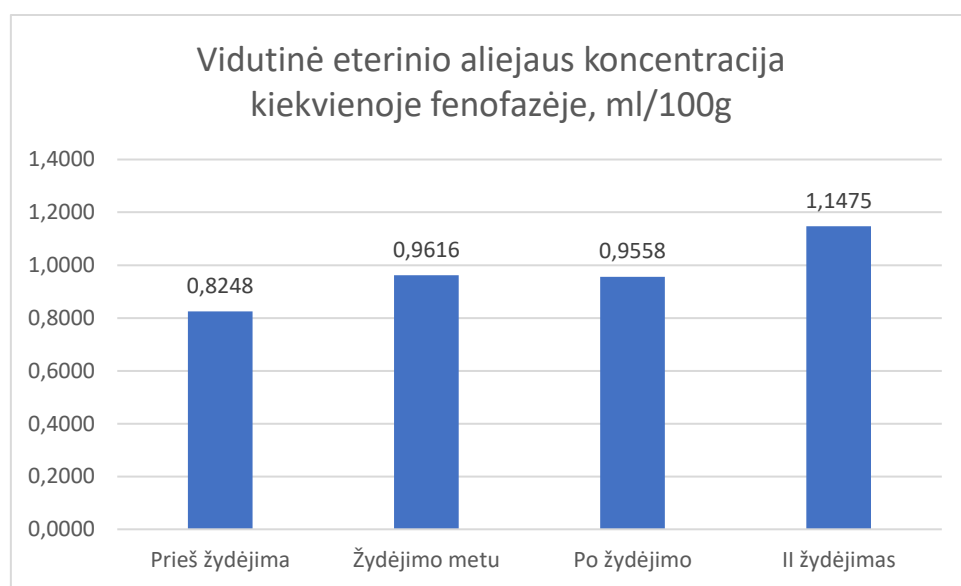
3.1.1 Paveikslas. Bendra žaliavos masė visuose laukeliuose kiekvienos fenofazės metu, g. Skirtumai statistiškai nepatikimi ($p = 0,28$)



3.1.2 Paveikslas. Bendras eterinio aliejaus kiekis visuose laukeliuose kiekvienos fenofazės metu, ml. Skirtumai statistiškai nepatikimi ($p = 0,43$)

Siekiant eliminuoti žaliavos masės įtaką, eterinių aliejų išeiga visuose variantuose buvo perskaičiuota 100-ui gramų žaliavos. Tokiu būdu, didžiausia vidutinė eterinio aliejaus koncentracija žaliavoje buvo antro žydėjimo metu (1,1475 ml/100 g), antra didžiausia

koncentracija – žydėjimo metu (0,9616 ml/100 g), trečia – po žydėjimo periode (0,9558ml/100 g), ir mažiausia koncentracija buvo prieš pirmą žydėjimą (0,8248 ml/100 g) (3.1.3 Paveikslas). Nors matomas koncentracijų skirtumas tarp fenofazių, tačiau statistinė analizė parodė, kad šitame tyrime fenofazė neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos eterinio aliejaus koncentracijai ($p = 0,65$). Papildomai dar buvo analizuota fenofazės įtaka skirtingose grupėse (fenoliniuose, nefenoliniuose, moteriškuose, hermafroditiniuose individuose), bet juose irgi fenofazė neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos eterinių aliejų koncentracijai ($p > 0,05$).



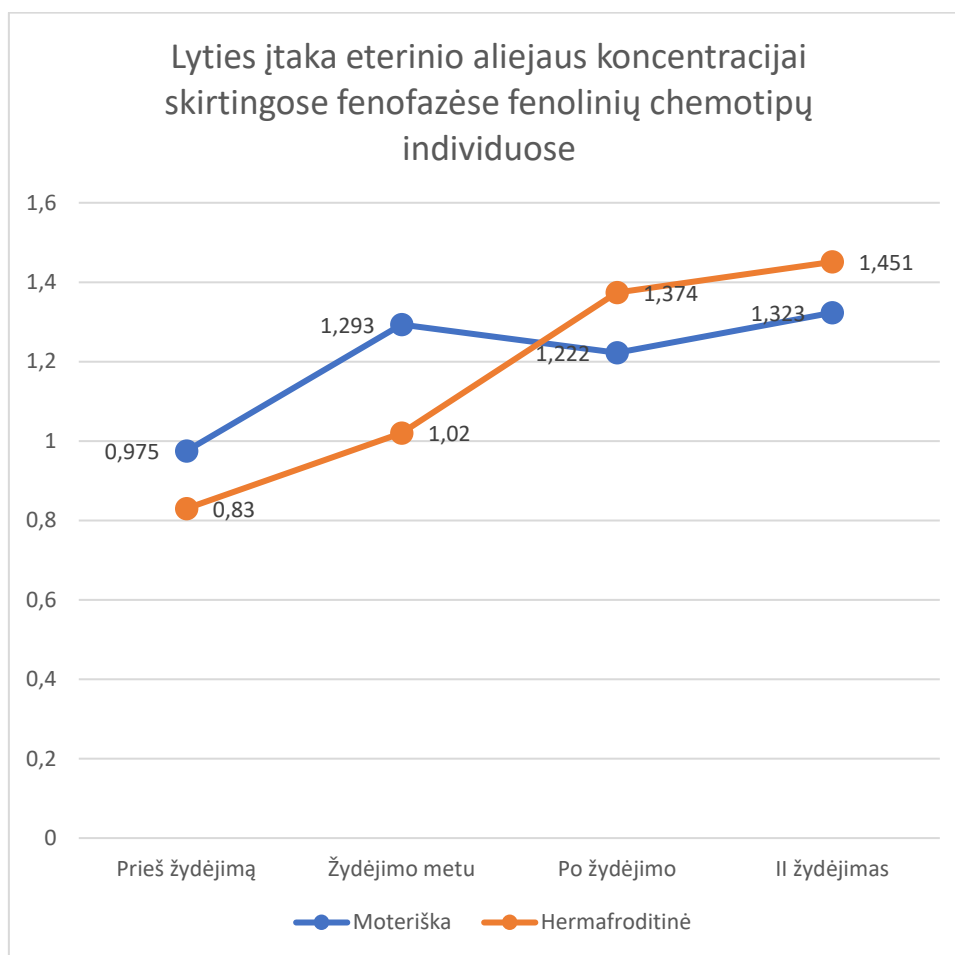
3.1.3 Paveikslas. Vidutinė eterinio aliejaus koncentracija kiekvienos fenofazės metu. Skirtumai statistiškai nepatikimi ($p = 0,65$).

Gauti rezultatai skyrėsi nuo Felice Senatore daryto 1996 metų tyrimo, kuriame nustatinėjo žaliavos rinkimo laiko įtaką *T. pulegioides*, užaugintų pietų Italijoje, eteriniams aliejams. Tame tyrime didžiausia eterinio aliejaus koncentracija buvo pilno žydėjimo metu (1,11 g/ 100 g). Galimos priežastys, kodėl buvo gauti skirtingi rezultatai, yra dėl skirtingo klimato ir geografinės padėties tarp pietų Italijos ir Lietuvos bei skirtingų genetinių charakteristikų. (20)

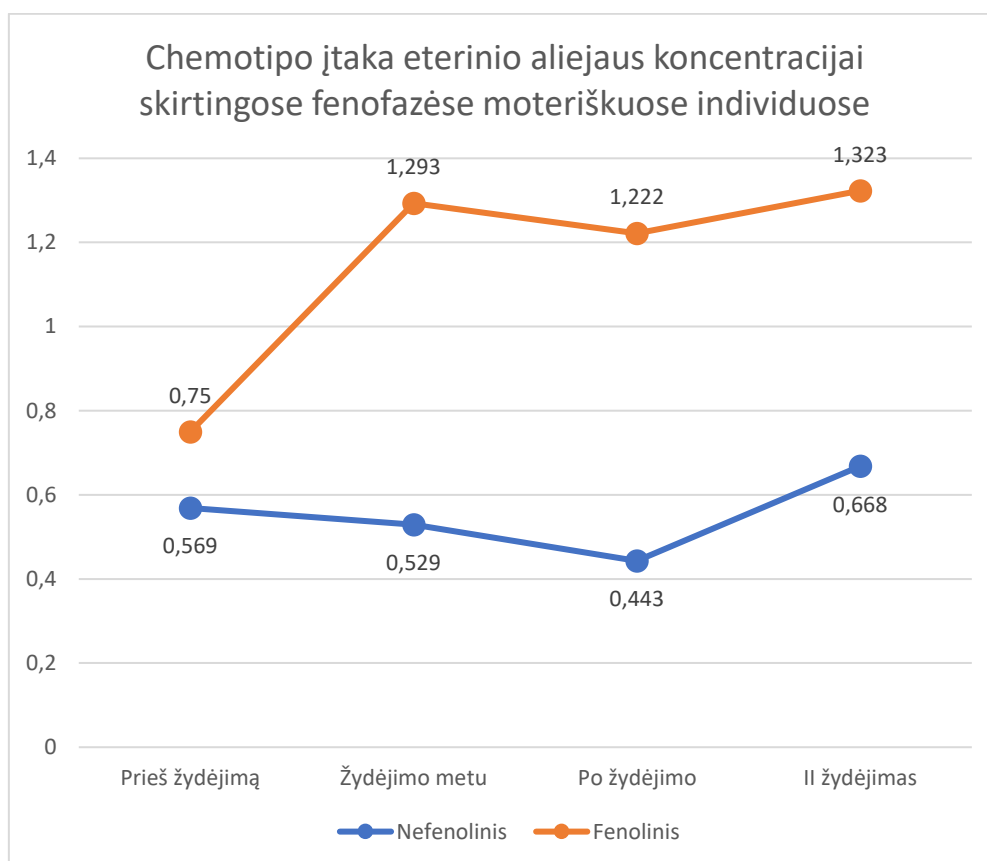
Taip pat gauti rezultatai skiriasi nuo Vaidos Vaičiulytės, Ritos Butkienės ir Kristinos Ložienės daryto su *T. pulegioides* tyrimo, kurio duomenys buvo rinkti Lietuvoje per šešių metų periode. Jų tyrime 2010 metais didžiausia eterinio aliejaus koncentracija buvo po žydėjimo periode (apie 0,93 %). Galimos priežastys, kodėl buvo gauti skirtingi rezultatai, yra dėl skirtingo kritulių kiekio, kadangi 2010 metais liepos mėnesį buvo didelis kritulių kiekis (208 mm), o 2023 metų liepos

mėnesį buvo mažas kritulių kiekis (55 mm), bei jų tyrime buvo naudojami tik karvakrolio chemotipo individai, o šitame tyrime, buvo naudojami ir fenoliniai ir nefenoliniai chemotipai. (19)

Taip pat buvo analizuota kitų veiksnių (chemotipų ir lyčių) įtaka eterinio aliejaus koncentracijai. Nors yra matomas eterinio aliejaus koncentracijos skirtumas tarp moteriškų ir hermafroditinių individų skirtingose fenofazėse, iš kurių ryškiausias būtų žydėjimo metu, bet statistinė analizė rodo, kad augalo lytis neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos eterinio aliejaus koncentracijai (3.1.4. Paveikslas). Žiūrinti į chemotipus, tenai statistinė analizė rodo, kad chemotipas turėjo statistiškai reikšmingą įtaką eterinio aliejaus koncentracijai (3.1.5. Paveikslas). Kaip matoma paveiksle, fenoliniai individai per visas fenofazes turi ryškiai didesnę koncentraciją nei nefenoliniai individai.



3.1.4 Paveikslas. Lyties įtaka eterinio aliejaus koncentracijai, ml/100 g, skirtingose fenofazėse fenolinių chemotipų individuose.



3.1.5 Pavikslas. Chemotipo įtaka eterinio aliejaus koncentracijai, ml/100 g, skirtingose fenofazėse moteriškuose individuose.

Dar buvo analizuojama koreliacija tarp eterinio aliejaus koncentracijos ir lapo epidermio struktūrų kiekybinių rodiklių. Santykinai stipriausia koreliacija buvo su eterinio aliejaus liaukučių tankiu, apatinėje lapo pusėje koreliacijos koeficientas buvo 0,23011, o $p = 6,07723e-12$, viršutinės lapo pusės koeficientas – 0,10879, o $p = 0,00126$. Koreliacija su eterinio aliejaus liaukučių diametru yra labai silpna, apatinėje lapo pusėje koeficientas – 0,065909, o $p = 0,000698$, viršutinės lapo pusėje koeficientas – 0,035244, o $p = 0,07738$. Silpniausia koreliacija yra su žiotelėmis, abiejų lapo pusių koreliacijos koeficientas yra mažesnis nei 0,03. Apskritai, silpna šių rodiklių koreliacija leidžia daryti išvadą, kad eterinių aliejų koncentracijos pokyčiai skirtingais vegetacijos laikotarpiais praktiškai neatsispindi lapo epidermio struktūrų pokyčiuose..

3.2. Fenofazės įtaka *T. pulegioides* žiotelių ir eterinių aliejų liaukučių tankiui bei eterinių aliejų liaukučių dydžiui

Nustatytas keturbriaunio čiobrelis (*Thymus pulegioides* L.) vidutinis žiotelių tankis apatinėje ir viršutinėje lapo pusėse viename kvadratiniam milimetre (3.2.1 Lentelė).

3.2.1 Lentelė. Vidutinis žiotelių tankis apatinėje ir viršutinėje lapo pusėse skirtinguose chemotipuose ir skirtingo lytiškumo individuose kiekvienos fenofazės metu (SD – standartinis nuokrypis)

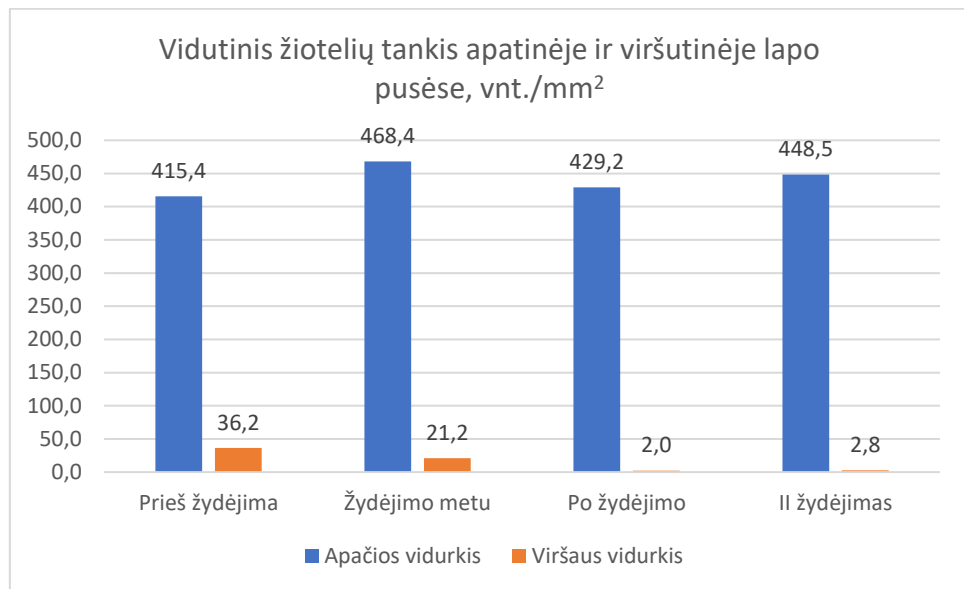
Laukelis	Chemotipas	Lytis	Fenofazė	Vidutinis žiotelių tankis apatinėje lapo pusėje, vnt./mm ²	SD, vnt./mm ²	Vidutinis žiotelių tankis viršutinėje lapo pusėje, vnt./mm ²	SD, vnt./mm ²
1	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	329,4	7,9	47,4	4,3
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	391,9	10,0	43,2	3,1
3	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	387,6	12,7	37,2	3,3
4	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	410,0	10,6	15,9	4,0
5	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	481,6	13,1	63,8	8,1
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	430,0	7,2	3,5	1,0
7	Nefenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	450,6	11,4	50,1	5,2
8	Nefenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	442,2	13,4	28,4	4,6
1	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	465,2	9,2	58,9	4,8
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	489,1	9,3	7,8	1,2
3	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	442,8	10,4	38,6	4,6
4	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	417,8	12,4	0,7	0,4
5	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	509,7	10,3	13,8	3,0
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	465,9	11,4	17,9	2,2
7	Nefenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	520,0	10,2	30,4	3,8
8	Nefenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	436,4	11,7	1,3	0,4
1	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	306,7	9,0	6,7	1,6
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo	439,3	12,5	1,6	0,7
3	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	493,1	6,6	0,9	0,6
4*	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo				
5	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	447,3	8,0	4,0	1,2
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo	422,9	8,3	0,7	0,4
7	Nefenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	472,2	12,8	0,0	0,0

8	Nefenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	422,7	16,4	0,0	0,0
1	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	450,0	7,8	4,1	1,4
2	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	418,0	9,0	1,3	0,5
3	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	466,8	10,6	8,9	2,0
4	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	464,3	10,7	0,2	0,2
5	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	485,0	1,8	2,8	1,1
6	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	441,0	16,9	0,7	0,4
7	Nefenolinis	Moteriška	II žydėjimas	434,2	16,5	1,5	0,8
8	Nefenolinis	Moteriška	II žydėjimas	428,7	9,2	3,2	1,1

* Nebuvo surinkta, kadangi visi trys individai buvo žuvę.

Didžiausias vidutinis žiotelių tankis apatinėje lapo pusėje yra žydėjimo metu (468,4 vnt./mm²), o viršutinėje pusėje – prieš žydėjimo periode (36,2 vnt./mm²). Antras didžiausias tankis apatinėje pusėje yra antro žydėjimo metu (448,5 vnt./mm²), o viršutinėje pusėje – žydėjimo metu (21,2 vnt./mm²). Po to apatinėje pusėje yra po žydėjimo periodas (429,2 vnt./mm²), o viršutinėje pusėje – antro žydėjimo metu (2,8 vnt./mm²). Mažiausias tankis apatinėje pusėje buvo prieš žydėjimo periodą (415,4 vnt./mm²), o viršutinėje pusėje – po žydėjimo periode (2,0 vnt./mm²) (3.2.1 Paveikslas). Analizuojant gautus rezultatus, prieš išskirstant juos į grupes, statistinė analizė rodo, kad fenofazė turi statistiškai reikšmingą įtaką žiotelių tankiui abiejose lapo pusėse (apatinės pusės $p = 1,14e-14$, o viršutinės pusės $p < 2,2e-16$). Suskirsčius gautus rezultatus į grupes (moteriški, hermafroditiniai, fenoliniai ir nefenoliniai individai), buvo atlikta statistinė analizė tiriant fenofazės įtaką žiotelių tankiui kiekvienoje grupėje. Statistinė analizė parodė, kad fenofazė turi statistiškai reikšmingą įtaką žiotelių tankiui kiekvienoje grupėje, visose grupėse $p < 0,05$.

Rezultatuose matomas ryškus keturbriaunio čiobrelis lapo epidermio bruožas, kuriame apatinėje lapo pusėje yra daug kartų daugiau žiotelių nei viršutinėje lapo pusėje. Tą patį bruožą, galime matyti V. Kamašinos ir K. Ložienės tyrime su *Thymus × oblongifolius*, *T. pulegioides* ir *T. serpyllum*, nors jų gauti vidurkiai šiek tiek skiriasi nuo gautų šitame tyrime (apatinėje pusėje buvo 522,5 vnt./mm², o viršutinėje pusėje – 49,5 vnt./mm²), kas gali būti paaiškinama skirtingomis meteorologinėmis sąlygomis ir genetiniais skirtumais. (57)



3.2.1 Paveikslas. Vidutinis žiotelių tankis apatinėje ir viršutinėje lapo pusėse kiekvienos fenofazės metu. Nustatyti statistiškai patikimi skirtumai tarp fenofazių apatinėje lapo pusėje ($p = 1,14e-14$, $n=196\div 228$), išskyrus porą *Prieš žydėjimą–Po žydėjimo*, ir viršutinėje lapo pusėje ($p < 2,2e-16$, $n=203\div 225$), išskyrus porą *Po žydėjimo–II žydėjimas*.

Nustatytas keturbriaunio čiobrelio (*Thymus pulegioides* L.) vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis apatinėje ir viršutinėje lapo pusėse viename kvadratiniam milimetre (3.2.3 Lentelė).

3.2.2 Lentelė. Vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis ir standartinis nuokrypis (SD) apatinėje ir viršutinėje lapo pusėse kiekvienos fenofazės metu

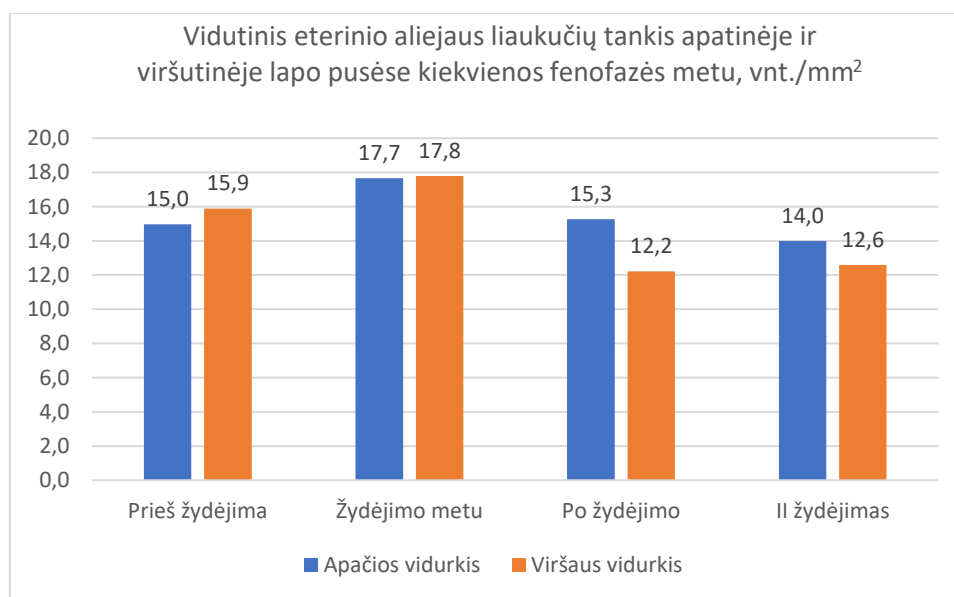
Laukelis	Chemotipas	Lytis	Fenofazė	Vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis apatinėje lapo pusėje, vnt./mm ²	SD, vnt./mm ²	Vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis viršutinėje lapo pusėje, vnt./mm ²	SD, vnt./mm ²
1	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	11,8	0,8	17,5	0,9
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	12,6	0,7	11,7	0,8
3	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	12,9	1,0	13,8	0,7

4	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	13,7	0,9	16,9	0,7
5	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	16,2	1,1	12,8	0,8
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	22,6	1,0	17,7	0,8
7	Nefenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	16,4	0,6	18,4	0,6
8	Nefenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	13,5	0,8	18,2	0,7
1	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	20,2	0,7	18,2	0,6
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	22,0	0,7	20,2	0,7
3	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	17,1	0,7	20,0	0,6
4	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	19,5	0,9	15,3	0,6
5	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	16,4	1,0	20,4	1,0
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	17,7	0,9	17,1	0,7
7	Nefenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	13,8	0,9	16,8	1,0
8	Nefenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	14,4	0,9	14,2	0,6
1	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	16,9	0,5	12,2	0,6
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo	16,8	0,9	13,7	1,2
3	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	16,0	0,6	12,2	0,6
4*	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo				
5	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	15,5	0,7	14,0	0,6
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo	16,4	0,7	12,6	0,6
7	Nefenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	11,7	1,0	10,2	0,7
8	Nefenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	13,4	0,9	10,5	0,8
1	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	13,7	0,7	13,3	0,8
2	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	12,9	0,6	11,7	0,8
3	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	11,7	0,8	11,5	0,8
4	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	18,3	0,9	16,3	1,0
5	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	18,4	1,0	14,7	0,8
6	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	12,6	0,6	11,2	0,8
7	Nefenolinis	Moteriška	II žydėjimas	9,5	0,7	8,8	0,7
8	Nefenolinis	Moteriška	II žydėjimas	14,8	0,7	13,3	0,6

* Nebuvo surinkta, kadangi visi trys individai buvo žuvę.

Didžiausias vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis apatinėje ir viršutinėje lapo pusėje buvo žydėjimo metu (apatinėje pusėje – 17,7 vnt./mm², viršutinėje – 17,8 vnt./mm²). Antras didžiausias tankis apatinėje lapo pusėje buvo po žydėjimo periode (15,3 vnt./mm²), o viršutinėje pusėje – prieš žydėjimo periode (15,9 vnt./mm²). Trečias didžiausias tankis apatinėje lapo pusėje buvo prieš žydėjimo periode (15,0 vnt./mm²), o viršutinėje pusėje – antro žydėjimo metu (12,6 vnt./mm²). Mažiausias vidutinis eterinių aliejų liaukučių tankis apatinėje pusėje buvo antro žydėjimo metu (14,0 vnt./mm²), o viršutinėje pusėje – po žydėjimo periode (12,2 vnt./mm²) (3.2.2 Paveikslas). Analizuojant gautus rezultatus, prieš išskirstant juos į grupes, statistinė analizė rodo, kad fenofazė turi statistiškai reikšmingą įtaką eterinio aliejaus liaukučių tankiui abiejose lapo pusėse (apatinėje pusėje $p = 5,432e-15$, viršutinėje – $p < 2,2e-16$). Suskirsčius gautus rezultatus į grupes (moteriški, hermafroditiniai, fenoliniai ir nefenoliniai individai), buvo atlikta statistinė analizė tiriant fenofazės įtaką eterinio aliejaus liaukučių tankiui kiekvienoje grupėje. Statistinė analizė parodė, kad fenofazė turi statistiškai reikšmingą įtaką eterinio aliejaus liaukučių tankiui kiekvienoje grupėje, visose grupėse $p < 0,05$.

Rezultatuose matome, kad eterinio aliejaus liaukučių tankis viršutinėje lapo pusėje nežymiai skiriasi nuo liaukučių tankio apatinėje lapo pusėje. Panašus skirtumas, buvo matomas V. Kamašinos ir K. Ložienės tyrime su *Thymus × oblongifolius*, *T. pulegioides* ir *T. serpyllum*. Tame tyrime vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis apatinėje lapo pusėje buvo 12,1 vnt./mm², o viršutinėje pusėje buvo 10,1 vnt./mm² (57)



3.2.2 Paveikslas. Vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis apatinėje ir viršutinėje lapo pusėse kiekvienos fenofazės metu. Skirtumai tarp fenofazių statistiškai patikimi apatinėje pusėje ($p = 5,432e-15$, $n = 196\div 228$), išskyrus poras *Prieš žydėjimą–Po žydėjimo* ir *Prieš žydėjimą–II*

žydėjimas, ir viršutinėje pusėje ($p < 2,2e-16$, $n = 203 \div 225$), išskyrus porą *Po žydėjimo–II žydėjimas*.

Nustatytas keturbriaunio čiobrelio (*Thymus pulegioides* L.) vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras apatinėje ir viršutinėje lapo pusėse mikrometrais (3.2.3 Lentelė).

3.2.3 Lentelė. Vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras apatinėje ir viršutinėje lapo pusėse kiekvienos fenofazės metu (SD – standartinis nuokrypis).

Laukelis	Chemotipas	Lytis	Fenofazė	Vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras apatinėje lapo pusėje, μm	SD, μm	Vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras viršutinėje lapo pusėje, μm	SD, μm
1	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	60,5	1,9	60,8	2,6
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	59,3	2,4	62,7	2,1
3	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	58,5	1,8	62,3	1,5
4	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	56,9	2,1	64,4	2,4
5	Fenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	58,5	2,1	59,8	2,2
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Prieš žydėjimą	62,1	2,2	61,6	2,4
7	Nefenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	55,3	2,1	59,2	2,4
8	Nefenolinis	Moteriška	Prieš žydėjimą	56,4	2,6	55,4	2,2
1	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	61,1	2,1	57,8	3,1
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	60,1	2,2	65,2	2,9
3	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	58,2	2,4	60,1	2,8
4	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	58,2	2,5	60,3	2,1
5	Fenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	61,1	2,2	60,8	2,5
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Žydėjimo metu	61,0	2,1	63,4	2,9
7	Nefenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	54,4	2,6	54,7	2,9
8	Nefenolinis	Moteriška	Žydėjimo metu	52,0	1,8	56,8	4,1
1	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	58,3	2,3	61,2	2,4

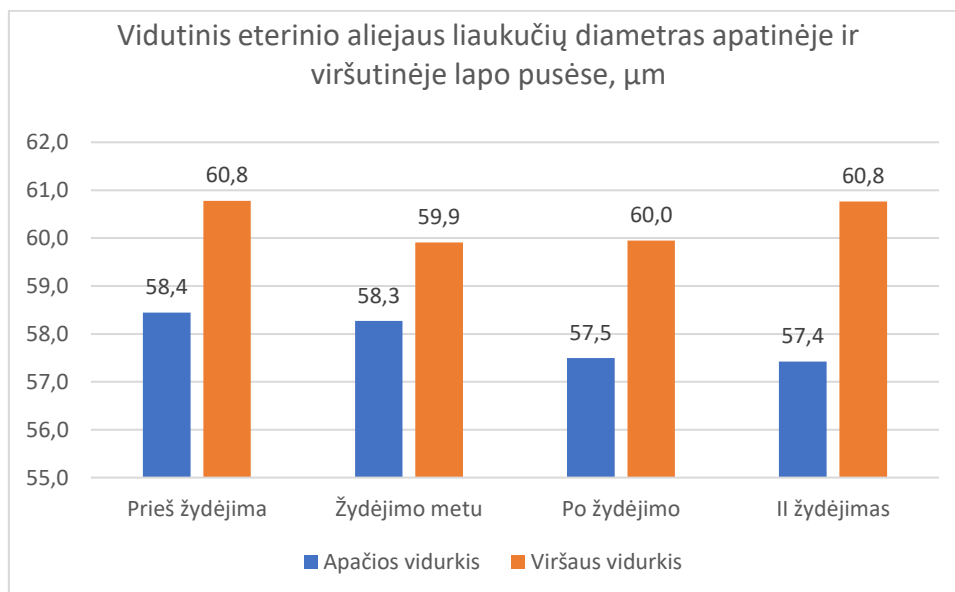
2	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo	54,8	2,8	56,1	3,7
3	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	60,1	2,5	63,9	3,6
4*	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo				
5	Fenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	54,9	2,8	60,3	2,2
6	Fenolinis	Hermafroditinė	Po žydėjimo	60,3	2,2	61,9	2,1
7	Nefenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	57,6	1,9	59,5	2,2
8	Nefenolinis	Moteriška	Po žydėjimo	56,5	2,2	56,7	2,9
1	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	61,5	2,6	61,3	2,3
2	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	59,3	3,0	64,4	1,9
3	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	58,5	3,1	61,2	2,2
4	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	55,2	2,8	59,9	2,8
5	Fenolinis	Moteriška	II žydėjimas	58,5	2,4	60,2	3,5
6	Fenolinis	Hermafroditinė	II žydėjimas	56,3	2,1	59,8	2,6
7	Nefenolinis	Moteriška	II žydėjimas	56,6	3,1	61,1	2,6
8	Nefenolinis	Moteriška	II žydėjimas	53,5	2,0	58,4	2,3

* Nebuvo surinkta, kadangi visi trys individai buvo žuvę.

Didžiausias vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras apatinėje ir viršutinėje pusėse paėmus visus laukelius bendrai buvo prieš žydėjimo periodą (apatinėje pusėje – 58,4 μm , viršutinėje – 60,8 μm). Antras didžiausias vidutinis diametras apatinėje lapo pusėje buvo žydėjimo metu (58,3 μm), o viršutinėje pusėje – antro žydėjimo metu (60,8 μm). Trečias didžiausias vidutinis diametras apatinėje ir viršutinėje pusėje buvo po žydėjimo periode (apatinėje pusėje buvo 57,5 μm , o viršutinėje pusėje – 60,0 μm). Mažiausias vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras apatinėje lapo pusėje buvo antro žydėjimo metu (57,4 μm), o viršutinėje pusėje – pirmo žydėjimo metu (59,9 μm) (3.2.3 Paveikslas). Analizuojant gautus rezultatus, prieš išskirstant juos į grupes, statistinė analizė rodo, kad fenofazė turi statistiškai reikšmingą įtaką eterinio aliejaus liaukučių diametrai apatinėje lapo pusėje ($p = 2.068e-10$), o viršutinėje neturi statistiškai reikšmingos įtakos ($p = 0,1599$). Suskirsčius gautus rezultatus į grupes (moteriški, hermafroditiniai, fenoliniai ir nefenoliniai individai), buvo atlikta statistinė analizė nustatyti fenofazės įtakai eterinio aliejaus liaukučių diametrai abejose lapo pusėse, kiekvienoje grupėje. Statistinė analizė parodė, kad fenofazė turi statistiškai reikšmingą įtaką eterinio aliejaus liaukučių diametrai fenoliniuose ir nefenoliniuose chemotipuose, taip pat hermafroditiniuose individuose viršaus ir apačios lapo pusių grupėse ($p < 0,05$). Taip pat fenofazė

statiškai reikšmingą įtaką turėjo moteriškai viršutinės lapo pusės grupei ($p = 2.192e-6$), bet neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos moteriškai apatinės lapo pusės grupei ($p = 0,7925$).

Rezultatuose matome, kad eterinio aliejaus liaukučių diametras viršutinėje lapo pusėje yra šiek tiek didesnis nei liaukučių diametras apatinėje lapo pusėje. Panašus skirtumas, buvo matomas V. Kamašinos ir K. Ložienės tyrime su *Thymus × oblongifolius*, *T. pulegioides* ir *T. serpyllum*. Tame tyrime vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras apatinėje lapo pusėje buvo 62,3 μm , o viršutinėje pusėje buvo 63,9 μm (57).



3.2.3 Paveikslas. Vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras apatinėje ir viršutinėje lapo pusėse kiekvienos fenofazės metu, μm . Skirtumai tarp fenofazių statistiškai patikimi apatinėje pusėje ($p = 2.068e-10$, $n = 588 \div 774$), išskyrus porą *Po žydėjimo–II žydėjimas*, bet nepatikimi viršutinėje pusėje ($p = 0,1599$, $n = 485 \div 778$).

IŠVADOS

1. Šis tyrimas parodė, kad nei fenoliniuose, nei nefenoliniuose *Thymus pulegioides* chemotipuose fenofazė neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos eterinių aliejų koncentracijai 100 gramų žaliavos. Nors statistiškai reikšmingos įtakos nenustatyta, didžiausia eterinių aliejų koncentracija rasta antro žydėjimo metu (1,1475 ml/100 g).
2. Tiek fenoliniuose, tiek ir nefenoliniuose *Thymus pulegioides* chemotipuose fenofazė turėjo statistiškai reikšmingos įtakos lapo epidermio struktūroms. Nustatyta ryški statistiškai reikšminga fenofazės įtaka žiotelių ir eterinio aliejaus liaukučių tankiui abiejose lapo pusėse bei eterinio aliejaus liaukučių diametrai apatinėje lapo pusėje. Žydėjimo metu buvo didžiausias vidutinis žiotelių tankis apatinėje pusėje (468,4 vnt./mm²), bei didžiausias vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis abiejose lapo pusėse (apatinėje – 17,7 vnt./mm², viršutinėje – 17,8 vnt./mm²), o prieš žydėjimą buvo didžiausias vidutinis žiotelių tankis viršutinėje pusėje (36,2 vnt./mm²) bei didžiausias vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras abiejose lapo pusėse (apatinėje – 58,4 μm, viršutinėje – 60,8 μm). Taip pat buvo pastebėtas ryškus keturbriaunio čiobrelio lapo epidermio bruožas, kad apatinėje lapo pusėje yra daug kartų daugiau žiotelių nei viršutinėje lapo pusėje.
3. Analizuojant koreliaciją tarp eterinio aliejaus koncentracijos ir lapo epidermio struktūrų kiekybinių rodiklių, santykinai stipriausia teigiama koreliacija nustatyta su eterinio aliejaus liaukučių tankiu (apatinėje lapo pusėje: koreliacijos koeficientas – 0,23011, p = 6,07723e-12; viršutinėje lapo pusėje – 0,10879, p = 0,00126). Silpna šių rodiklių koreliacija leidžia daryti išvadą, kad eterinių aliejų koncentracijos pokyčiai skirtingais vegetacijos laikotarpiais praktiškai neatsispindi lapo epidermio struktūrų pokyčiuose.
4. Remiantis šiuo tyrimu galima teigti, kad ryšys tarp sukauptų eterinių aliejų kiekių ir lapų epidermio struktūrų *Thymus pulegioides* augaluose labiausiai pasireiškia žydėjimo metu, kai stebima padidėjusi eterinių aliejų koncentracija ir didžiausias eterinių aliejų liaukučių tankis abiejose lapo pusėse bei didžiausias žiotelių tankis apatinėje lapo pusėje. Šio ryšio statistiniam reikšmingumui pasiekti reikalinga didesnė bandymo apimtis su didesniu pakartojimų skaičiumi.

REKOMENDACIJOS

- Nors didžiausia eterinio aliejaus koncentracija žaliavoje nustatyta antro žydėjimo metu (1,1475 ml/100 g), planuojant auginti *Thymus pulegioides* vaistinei žaliavai su tikslu gauti kuo didesnį eterinio aliejaus derlių, rekomenduojama pagrindinį žaliavos rinkimą atlikti pirmo žydėjimo metu, kadangi tada surenkamas beveik 4 kartus didesnis žaliavos kiekis (107,772 g iš 24 individų, arba 40,419 g/m²) negu antro žydėjimo metu (55,939 g iš 48 individų, arba 10,485 g/m²), o eterinio aliejaus koncentracija pirmo žydėjimo metu (0,9616 ml/100 g) yra tik 1,2 karto mažesnė negu antro žydėjimo metu.
- Kadangi dėl techninių problemų šiame darbe nebuvo galima atlikti kokybinės eterinių aliejų sudėties analizės, todėl rekomenduojama šį tyrimą pratęsti analizuojant keturbriaunio čiobrelio eterinio aliejaus kaupimosi kokybinius pokyčius skirtingose fenofazėse naudojant dujų chromatografijos metodą.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Svediene J, Raudoniene V, Loziene K, Bridziuvienė D, Paškevičius A, Vaiciulytė V. The effect of various thymus pulegioides chemotypes essential oils and pH on food spoilage microorganisms. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. 2015 Jan 1;18(2):276–88.
2. De Martino L, Bruno M, Formisano C, De Feo V, Napolitano F, Rosselli S, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Thymus* growing wild in southern Italy. *Molecules*. 2009 Nov;14(11):4614–24.
3. Begrow F, Engelbertz J, Feistel B, Lehnfeld R, Bauer K, Verspohl EJ. Impact of Thymol in thyme extracts on their antispasmodic action and ciliary clearance. *Planta Med*. 2010;76(4):311–8.
4. Almanea A, Abd El-Aziz GS, Ahmed MMM. The potential gastrointestinal health benefits of *Thymus vulgaris* essential oil: A review. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2019;12(4):1793–9.
5. Chen W, Viljoen AM. Geraniol - A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*. 2010 Oct;76(4):643–51.
6. Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. Vol. 173, *Food Chemistry*. Elsevier Ltd; 2015. p. 339–47.
7. Stahl-Biskup E, Venskutonis RP. Thyme. In: *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition*. Elsevier Inc.; 2012. p. 499–525.
8. ETNO. Prisdėk prie žolininkystės puoselėjimo Lietuvoje – tapk žolelių surinkėju! [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 17]. Available from: <https://www.etnoarbata.lt/vaistažolių-supirkimas>
9. Stravinskiene V. Pievos ir jų augalija. Iš *Aplinkos bioindikacijos praktika*. Kaunas: VDU leidykla, p. 61–121. 2012.
10. Mockute D, Bernotiene G. The α -terpenyl acetate chemotype of essential oil of *Thymus pulegioides* L. Vol. 29, *Biochemical Systematics and Ecology*. 2001.
11. Ložienė K, Venskutonis PR, Vaičiūnienė J. Chemical diversity of essential oil of *Thymus pulegioides* L. and *Thymus serpyllum* L. growing in Lithuania. 2002.
12. Ložienė K, Vaičiūnienė J, Venskutonis PR. Chemical composition of the essential oil of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Lithuania. *Biochem Syst Ecol*. 2003;31(3):249–59.
13. Németh-Zámbori É. Natural Variability of Essential Oil Components. In: Hüsnü Can Başer K, Hüsnü Can Başer K, editors. *Handbook of essential oils: Science, technology, and applications*. 3rd ed. 2021. p. 85–124.
14. Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB, Ehlers B. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE VARIATION IN MONOTERPENE CO-OCCURRENCE AND COMPOSITION IN THE ESSENTIAL OIL OF *Thymus vulgaris* CHEMOTYPES. Vol. 29, *Journal of Chemical Ecology*. 2003.
15. Linhart YB, Gauthier P, Keefover-Ring K, Thompson JD. Variable phytotoxic effects of *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) terpenes on associated species. *Int J Plant Sci*. 2014;176(1):20–30.

16. Ahern JR, Whitney KD. Sesquiterpene lactone stereochemistry influences herbivore resistance and plant fitness in the field. *Ann Bot.* 2014;113(4):731–40.
17. Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, et al. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. Vol. 22, *Molecules*. MDPI AG; 2017.
18. Golparvar AR, Bahari B. Effects of phenological stages on herbage yield and quality/quantity of oil in garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). *J Med Plant Res.* 2011 Nov 9;5(25):6085–9.
19. Vaičiulyte V, Butkiene R, Ložiene K. Effects of meteorological conditions and plant growth stage on the accumulation of carvacrol and its precursors in *Thymus pulegioides*. *Phytochemistry.* 2016 Aug 1;128:20–6.
20. Senatore F. Influence of Harvesting Time on Yield and Composition of the Essential Oil of a Thyme (*Thymus pulegioides* L.) Growing Wild in Campania (Southern Italy). 1996.
21. Franks PJ, Beerling DJ. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. 2009.
22. Kim L, Balani S, Edelberg M, Macke N. Effects of Various Environmental Factors on Stomatal Density, Area, and Potential Conductance Index. 2021;
23. Letchamo W, Gosselin A. Transpiration, essential oil glands, epicuticular wax and morphology of *Thymus vulgaris* are influenced by light intensity and water supply. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 1996;71(1):123–34.
24. Hetherington AM, Woodward & FI. The role of stomata in sensing and driving environmental change. 2003.
25. Garruña-Hernández R, Orellana R, Larque-Saavedra A, Canto A. Understanding the physiological responses of a tropical crop (*Capsicum chinense* Jacq.) at high temperature. *PLoS One.* 2014 Nov 3;9(11).
26. Morales R. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. Kn: Stahl-Biskup E, Saez F, Redaktorai. *Thyme: the genus thymus*. London: Taylor & Francis; 2002 m. p. 1–43.
27. Lenkavičius A.A. *Thymus* L. – Kn: Natkevičaitė–Ivanauskienė M. (red)., *Lietuvos TSR flora*, 5; 1976 m. p. 308–314.
28. Gudžinskas Z. *Lietuvos induočiai augalai*. 1999;
29. Kim M, Moon JC, Kim S, Sowndhararajan K. Morphological, chemical, and genetic characteristics of Korean native thyme bak-ri-hyang (*Thymus quinquecostatus* celak.). *Antibiotics.* 2020 Jun 1;9(6).
30. Sarfaraz D, Rahimmalek M, Saeidi G, Sabzalian MR. Genetic relations among and within wild and cultivated *Thymus* species based on morphological and molecular markers. *3 Biotech.* 2020 Jul 1;10(7).
31. Nicola S, Fontana E, Hoeberechts J. Effects of Rooting Products on Medicinal and Aromatic Plant Cuttings. 2003.
32. Iapichino G, Arnone C, Bertolino M, Roxas UA. Propagation of Three *Thymus* Species by Stem Cuttings. 2006.

33. Orellana MR, Rovira AM, Blanché C, Bosch M. Pollination and reproductive success in the gynodioecious endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). *Canadian Journal of Botany*. 2005 Feb;83(2):183–93.
34. Assouad' MW, Dommke B, Lumaret R, Valdeyron G. Reproductive capacities in the sexual forms of the gynodioecious species *Thymus vulgaris* L. 1978.
35. Vaičiulyte V, Ložiene K. Metabolomic analysis and effects of meteorological factors on phenolic and non-phenolic chemotypes of *Thymus pulegioides* L. cultured in the same locality. *Ind Crops Prod*. 2015 Dec 23;77:491–8.
36. Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. Volatiles from *Thymbra* and *Thymus* species of the Western Mediterranean Basin, Portugal and Macaronesia. 2010.
37. Minarchenko V, Tymchenko I, Glushchenko L, Pidchenko V. Comparative morphological studies of raw parts of the most common species of *Thymus* in Ukraine. Vol. 67, *Pharm. J*. 2019.
38. Radonic A, Mastelic J. Essential Oil and Glycosidically Bound Volatiles of *Thymus pulegioides* L. growing Wild in Croatia. 2008.
39. Vaičiulytė V, Ložienė K, Taraškevičius R, Butkienė R. Variation of essential oil composition of *Thymus pulegioides* in relation to soil chemistry. *Ind Crops Prod*. 2017 Jan 1;95:422–33.
40. Groendahl E, Ehlers BK, Keefover-Ring K. A new cis-sabinene hydrate chemotype detected in large thyme (*thymus pulegioides* L.) growing wild in denmark. *Journal of Essential Oil Research*. 2008;20(1):40–1.
41. Mártonfi P. Polymorphism of essential oil in *Thymus pulegioides* subsp. *chamaedrys* in Slovakia. *Journal of Essential Oil Research*. 1992;4(2):173–9.
42. Radušienė J, Janulis V. APŽVALGINIAI STRAIPSNIAI Vaistinių ir aromatinių augalų įvairovės tyrimo, jų panaudojimo bei išsaugojimo tendencijos. Vol. 40, 705 *Medicina* (Kaunas). 2004.
43. Li Y, Fabiano-Tixier AS. SPRINGER BRIEFS IN MOLECULAR SCIENCE GREEN CHEMISTRY FOR SUSTAINABILITY Essential Oils as Reagents in Green Chemistry. 2014.
44. Baptiste Hounda Fokou J, Michel Jazet Dongmo P, Fekam Boyom F. Essential Oil's Chemical Composition and Pharmacological Properties. In: *Essential Oils - Oils of Nature*. IntechOpen; 2020.
45. Rehman R, Hanif MA, Mushtaq Z, Al-Sadi AM. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. *Food Reviews International*. 2016 Apr 2;32(2):117–60.
46. Sotomayor JA, Martínez RM, García AJ, Jordán MJ. *Thymus zygis* subsp. *gracilis*: Watering level effect on phytomass production and essential oil quality. *J Agric Food Chem*. 2004 Aug 25;52(17):5418–24.
47. Radu CM, Radu CC, Bochiş SA, Arbănaşi EM, Lucan AI, Murvai VR, et al. Revisiting the Therapeutic Effects of Essential Oils on the Oral Microbiome. *Pharmacy*. 2023 Feb 10;11(1):33.
48. Kaya DA, Arslan M, Rusu LC. EFFECTS OF HARVESTING HOUR ON ESSENTIAL OIL CONTENT AND COMPOSITION OF *THYMUS VULGARIS*. Vol. 61, *FARMACIA*. 2013.
49. Nezhadali A, Nabavi M, Rajabian M, Akbarpour M, Pourali P, Amini F. Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and in vitro antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*. 2014 Jun;3(2):87–92.

50. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Trieste; 2008.
51. Cserháti T. Chromatography of Aroma Compounds and Fragrances. 2010.
52. Gudžinskas Z. žiotelė. In: Visuotinė lietuvių enciklopedija. 2015.
53. Kirkham MB. Stomatal Anatomy and Stomatal Resistance. In: Principles of Soil and Plant Water Relations. Elsevier; 2014. p. 431–51.
54. Thymus B, Pigott CD. Species Delimitation and Racial Divergence in. Vol. 53. 1954.
55. Schuurink R, Tissier A. Glandular trichomes: micro-organs with model status? Vol. 225, New Phytologist. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 2251–66.
56. Jia P, Liu H, Gao T, Xin H. Glandular trichomes and essential oil of *Thymus quinquecostatus*. The Scientific World Journal. 2013;2013.
57. Kamašina V, Ložiene K. The evaluation of phenotypic diversity of *Thymus × Oblongifolius* according to some anatomical characters and comparison with parent species. Acta Bot Hung. 2009 Mar;51(1–2):85–97.
58. European Pharmacopoeia, 6th ed.; Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare of the Council of Europe (EDQM): Strasbourg, France, 2008; Volume 1.
59. Dagys, J.; Bluzmanas, P.; Putrimas, A. Augalu, Fiziologijos Laboratoriniai darbai; Mintis: Vilnius, Lithuania, 1965; p. 309.

PRIEDAS 1

Fenofazė	Laukelis	Pirmo distiliavimo žaliavos masė g	Pirmo distiliavimo eterinio aliejaus kiekis ml	Pirmo distiliavimo eterinio aliejaus koncentracija ml/100 g žaliavos	Antro distiliavimo žaliavos masė g	Antro distiliavimo eterinio aliejaus kiekis ml	Antro distiliavimo eterinio aliejaus koncentracija ml/100 g žaliavos	Trečio distiliavimo žaliavos masė g	Trečio distiliavimo eterinio aliejaus kiekis ml	Trečio distiliavimo eterinio aliejaus koncentracija ml/100 g žaliavos	Bendra žaliavos masė g	Bendras eterinio aliejaus kiekis ml	Vidutinė eterinio aliejaus koncentracija ml/100g žaliavos
Prieš žydėjimą	1	8,586	0,09	1,0482	9,774	0,09	0,9208				18,36	0,18	0,9804
	2	6,347	0,04	0,6302							6,347	0,04	0,6302
	3	7,115	0,08	1,1244	7,796	0,09	1,1544				14,911	0,17	1,1401
	4	1,707	0,01	0,5858							1,707	0,01	0,5858
	5	6,359	0,04	0,6290							6,359	0,04	0,6290
	6	6,277	0,08	1,2745							6,277	0,08	1,2745
	7	9,265	0,06	0,6476							9,265	0,06	0,6476
	8	5,625	0,03	0,5333	5,718	0,03	0,5247				11,343	0,06	0,5290
Žydėjimo metu	1	8,063	0,11	1,3643	8,061	0,12	1,4886	6,496	0,08	1,2315	22,62	0,31	1,3705
	2	5,943	0,05	0,8413							5,943	0,05	0,8413
	3	8,056	0,1	1,2413	8,932	0,1	1,1196				16,988	0,2	1,1773
	4	2,028	0,02	0,9862							2,028	0,02	0,9862
	5	4,572	0,06	1,3123							4,572	0,06	1,3123
	6	8,117	0,1	1,2320							8,117	0,1	1,2320
	7	9,359	0,06	0,6411	9,017	0,06	0,6654				18,376	0,12	0,6530
	8	10,082	0,05	0,4959	10,024	0,04	0,3990	9,022	0,04	0,4434	29,128	0,13	0,4463
Po žydėjimo	1	9,756	0,12	1,2300							9,756	0,12	1,2300
	2	1,578	0,03	1,9011							1,578	0,03	1,9011
	3	10,994	0,12	1,0915							10,994	0,12	1,0915
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	2,976	0,04	1,3441							2,976	0,04	1,3441
	6	7,094	0,08	1,1277	7,327	0,08	1,0919				14,421	0,16	1,1095

	7	8,013	0,03	0,3744	8,584	0,03	0,3495				16,597	0,06	0,3615
	8	6,576	0,04	0,6083	6,822	0,03	0,4398				13,398	0,07	0,5225
II žydėjimas	1	8,059	0,12	1,4890							8,059	0,12	1,4890
	2	3,821	0,04	1,0468							3,821	0,04	1,0468
	3	9,687	0,14	1,4452							9,687	0,14	1,4452
	4	1,374	0,03	2,1834							1,374	0,03	2,1834
	5	7,736	0,08	1,0341							7,736	0,08	1,0341
	6	5,341	0,06	1,1234							5,341	0,06	1,1234
	7	7,078	0,04	0,5651	6,861	0,03	0,4373				13,939	0,07	0,5022
	8	5,982	0,06	1,0030							5,982	0,06	1,0030

PRIEDAS 2

Darbo pirminius duomenys apie eterinio aliejaus liaukučių diametrus, žiotelių tankius ir eterinio aliejaus liaukučių tankius galite rasti šitoje nuorodoje: [guobys_tyrdumenys.xlsx](#)

Slaptažodis: Guobys0321

Nuoroda galioja nuo 2024/04/29 iki 2025/04/29.