

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

**MEDICINOS FAKULTETAS**

**Biomedicinos mokslų institutas (Farmacijos ir farmakologijos centras)**

**MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS**

**Lapų epidermio anatominių struktūrų parametrų įtaka eterinio aliejaus kiekiui *Thymus pulegioides* augaluose**

**Farmacijos studijų programa**

**Studentas (-ė): Laurita Rožytė**

**V kursas, 3 grupė**

Darbo vadovas: asist. dr. Kristina Ložienė .....

(parašas)

Farmacijos ir farmakologijos centro vadovas: doc. dr. Kristina Garuolienė .....

(parašas)

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

(parašas)

Darbo įteikimo data: 2024-05-09 Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

Studento elektroninio pašto adresas: [laurita.rozyte@mf.stud.vu.lt](mailto:laurita.rozyte@mf.stud.vu.lt)

2024 m.

## TURINYS

SANTRAUKA .....	4
SUMMARY .....	6
ĮVADAS .....	8
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA .....</b>	<b>10</b>
1.1. <i>Thymus gentis</i> .....	10
1.2. <i>Thymus pulegioides</i> .....	11
1.3. Eterinio aliejaus kiekis ir sudėtis .....	13
1.4. Cheminis polimorfizmas .....	15
1.5. <i>Thymus pulegioides</i> eterinio aliejaus savybės bei panaudojimas .....	16
1.6. Eterinio aliejaus išskyrimo būdai .....	17
1.7. Eterinių aliejų liaukutės .....	19
1.8. Žiotelės .....	20
<b>2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODIKA .....</b>	<b>21</b>
2.1. Žaliavos rinkimas ir paruošimas .....	21
2.2. <i>Thymus pulegioides</i> individų suskirstymas į chemotipų grupes .....	21
2.3. Eterinio aliejaus išskyrimas .....	21
2.4. Keturbriaunio čiobrelio lapo anatominių struktūrų analizė .....	23
2.4.1. Preparatų ruošimas mikroskopavimui .....	23
2.4.2. Keturbriaunio čiobrelio lapų mikroskopavimas .....	23
2.5. Statistinė analizė .....	24
<b>3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....</b>	<b>25</b>
3.1. <i>Thymus pulegioides</i> eterinio aliejaus kiekybinė analizė .....	25
3.2. Eterinio aliejaus liaukučių tankio <i>Thymus pulegioides</i> lapų epidermyje analizė .....	29
3.3. <i>Thymus pulegioides</i> eterinio aliejaus liaukučių diametro analizė .....	34
3.4. <i>Thymus pulegioides</i> žiotelių tankio analizė .....	38
<b>4. IŠVADOS .....</b>	<b>43</b>

<b>5. REKOMENDACIJOS</b> .....	45
<b>6. LITERATŪROS SARAŠAS</b> .....	46
<b>6. PRIEDAI</b> .....	53

## SANTRAUKA

Lauritos Rožytės magistro baigiamasis darbas „Lapų epidermio anatominių struktūrų parametrų įtaka eterinio aliejaus kiekiui *Thymus pulegioides* augaluose“. Mokslinė vadovė dr. Kristina Ložienė, Vilniaus Universitetas, Medicinos fakultetas, Biomedicinos mokslų institutas (Farmacijos ir farmakologijos centras), 2024 m.

**Darbo tikslas:** Ištirti keturbriaunio čiobrelio (*T. pulegioides*) eterinio aliejaus kiekio sąsajas su lapo epidermio anatominėmis struktūromis, tiesiogiai bei netiesiogiai susijusiomis su eterinio aliejaus sinteze ir kaupimusi.

**Darbo uždaviniai:** 1. Nustatyti ir palyginti eterinio aliejaus kiekius *T. pulegioides* individuose. 2. Nustatyti, kokiai chemotipų (fenolinių ar nefenolinių) grupei priklauso tiriamieji *T. pulegioides* individai. 3. Nustatyti ir palyginti eterinio aliejaus liaukučių bei žiotelių tankį *T. pulegioides* lapų viršutiniame ir apatiniame epidermyje. 4. Nustatyti ir palyginti *T. pulegioides* eterinio aliejaus liaukučių diametrą abiejuose lapų epidermiuose.

**Tyrimo objektas ir metodika:** Keturbriaunio čiobrelio 27 individų antžeminės dalys žydėjimo metu surinktos atskirai iš 5 skirtingų augaviečių ir išdžiovintos. *T. pulegioides* individų priskyrimas fenolinių arba nefenolinių chemotipų grupei atliktas organoleptiškai pagal žaliavos ir/ar išskirto eterinio aliejaus kvapą. Eterinis aliejus iš *T. pulegioides* individų išskirtas hidrodistiliacijos metodu ir jo kiekis išreikštas procentais. Eterinio aliejaus liaukutėms ir žiotelėms tirti lako atspaudu metodu paruošti keturbriaunio čiobrelio lapų viršutinio ir apatinio epidermio anatominiai preparatai, mikroskopavimas atliktas Leica DM500 mikroskopu. Eterinio aliejaus liaukučių dydžiui įvertinti matuotas jų diametras lapų viršutiniame ir apatiniame epidermyje. Eterinio aliejaus liaukučių bei žiotelių tankiui įvertinti skaičiuotas jų kiekis lapo viršutinio ir apatinio epidermio mm<sup>2</sup>. Statistinė analizė atlikta MS Excel 2023 ir STATISTICA® 7 programomis.

**Tyrimo rezultatai ir išvados:** Tirti *T. pulegioides* augalai vidutiniškai buvo sukaupę  $0,60 \pm 0,35$  % eterinio aliejaus. Fenoliniams chemotipams priklausančiuose individuose eterinio aliejaus kiekis ( $0,78 \pm 0,31$  %) statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo eterinio aliejaus kiekio nefenoliniams chemotipams priklausančiuose individuose ( $0,45 \pm 0,36$  %). Eterinio aliejaus liaukučių tankis lapo apatiniame epidermyje buvo didesnis ir statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo tankio lapo viršutiniame epidermyje (atitinkamai  $6,7 \pm 1,6$  ir  $5,8 \pm 1,3$  liaukučių mm<sup>2</sup>). *T. pulegioides* augaluose nustatytas statistiškai reikšmingas teigiamas

koreliacijos ryšys ( $r = 0,469$ ,  $p < 0,05$ ) tarp suminio eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus  $\text{mm}^2$  lapo ploto ir eterinio aliejaus kiekio. Eterinio aliejaus liaukučių diametras lapo viršutiniame epidermyje ( $63,0 \pm 2,3 \mu\text{m}$ ) buvo didesnis ir statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo diametro apatiniame epidermyje ( $61,4 \pm 2,0 \mu\text{m}$ ). Fenolinių chemotipų grupei priklausančiuose individuose vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras tiek lapo viršutiniame, tiek apatiniame epidermyje (atitinkamai  $63,2 \pm 2,6$  ir  $61,5 \pm 2,3 \mu\text{m}$ ) buvo didesnis ir statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo diametro nefenolinių chemotipų individuose (atitinkamai  $62,1 \pm 1,3$  ir  $61 \pm 1,5 \mu\text{m}$ ). Statistiškai reikšmingo koreliacinio ryšio tarp eterinio aliejaus kiekio ir eterinio aliejaus liaukučių diametro nenustatyta. Žiotelių tankis lapo apatiniame epidermyje buvo 3 kartus didesnis ir patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo tankio viršutiniame epidermyje (atitinkamai  $380,3 \pm 40,6$  ir  $142,4 \pm 33$  žiotelių  $\text{mm}^2$ ). Tarp žiotelių tankio ir eterinio aliejaus kiekio koreliacinis ryšys nebuvo nustatytas, tačiau nustatytas statistiškai reikšmingas koreliacinis ryšys tarp suminio žiotelių skaičiaus lapo  $\text{mm}^2$  ir eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus apatiniame epidermyje ( $r = 0,399$ ,  $p < 0,05$ ).

## SUMMARY

Master' thesis by Laurita Rožytė "The Impact of Leaf Epidermal Anatomical Parameters on the Essential Oil Quantity in *Thymus pulegioides* Plants". Scientific supervisor dr. Kristina Ložienė, Vilnius University, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences (Pharmacy and Pharmacology Center), 2024.

**Aim of the study:** To investigate the connection between the essential oil quantity and leaf epidermal anatomical structures of *Thymus pulegioides* directly and indirectly related to the synthesis and accumulation of the essential oil.

**Objectives of the study:** 1. To estimate and compare the essential oil quantities in *T. pulegioides* plants. 2. To determine which group of chemotypes (phenolic or non-phenolic) the investigated *T. pulegioides* plants belong to. 3. To estimate and compare the density of glandular trichomes and stomata on the upper and lower epidermis of leaves of *T. pulegioides*. 4. To estimate and compare the diameter of glandular trichomes on both sides of leaves of *T. pulegioides*.

**Methods of the study:** The flowering aerial parts of the 27 *T. pulegioides* plants were collected separately from 5 natural habitats and dried. The assignment of *T. pulegioides* individuals to the group of phenolic or non-phenolic chemotypes was carried out organoleptically according to the smell of the raw material and/or the extracted essential oil. The essential oil from *T. pulegioides* plants was extracted by hydrodistillation and its content was expressed as a percentage. For the investigation of glandular trichomes and stomata anatomical preparations of the upper and lower epidermis of *T. pulegioides* leaves were prepared by the impress method, microscopy was done with a Leica DM5000 microscope. To estimate the size of glandular trichomes their diameter was measured in the upper and lower epidermis of leaves. To estimate the density of glandular trichomes and stomata their quantity per mm<sup>2</sup> was calculated in the upper and lower epidermis of leaves. Statistical analysis was done using MS Excel 2023 and STATISTICA<sup>®</sup> 7 programs.

**Results and conclusions of the study:** The essential oil amount in the investigated *T. pulegioides* plants was  $0.60 \pm 0.35$  %. The essential oil percentage in the plants of phenolic chemotypes ( $0.78 \pm 0.31$  %) significantly ( $p < 0.05$ ) differed from the essential oil percentage in the plants of non-phenolic chemotypes ( $0.45 \pm 0.36$  %). The density of glandular trichomes was significantly ( $p < 0.05$ ) major in lower epidermis than in upper epidermis of leaves ( $6.7 \pm$

1.6 and  $5.8 \pm 1.3$  glandular trichomes/mm<sup>2</sup>, respectively). A statistically significant positive correlation ( $r = 0.469$ ,  $p < 0.05$ ) was found between total number of glandular trichomes per mm<sup>2</sup> of leaf area and essential oil percentage. The diameter of glandular trichomes was significantly ( $p < 0.05$ ) major in upper epidermis ( $63.0 \pm 2.3$   $\mu\text{m}$ ) than in lower epidermis of leaves ( $61.4 \pm 2.0$   $\mu\text{m}$ ). There the diameter of glandular trichomes of individuals of phenolic chemotypes in upper and lower epidermis of leaf was significantly ( $p < 0.05$ ) major ( $63.2 \pm 2.6$  and  $61.5 \pm 2.3$   $\mu\text{m}$ , respectively) than diameter of glandular trichomes of individuals of non-phenolic chemotypes ( $62.1 \pm 1.3$  and  $61 \pm 1.5$   $\mu\text{m}$ , respectively). No statistically significant correlation was found between essential oil percentage and diameter of glandular trichomes. Stomata density was three times major in lower epidermis and significantly ( $p < 0.05$ ) differed from density in upper epidermis ( $380.3 \pm 40.6$  and  $142.4 \pm 33$  stomas in 1 mm<sup>2</sup> leaf area, respectively). No correlation was found between stomata density and essential oil percentage, however, statistically significant correlation ( $r = 0.399$ ,  $p < 0.05$ ) was found between the total number of stomata in mm<sup>2</sup> of leaf area and the density of glandular trichomes in lower epidermis.

## ĮVADAS

Keturbriaunis čiobrelis (*Thymus pulegioides* L.), priklausantis notrelinių (Lamiaceae) šeimai, čiobrelio (*Thymus*) genčiai, yra plačiai Europoje paplitęs daugiametis, eterinius aliejus kaupiantis augalas (1). Dėl kaupiamo eterinio aliejaus aromatingumo bei antimikrobinių, antioksidantinių, priešuždegiminių savybių keturbriaunis čiobrelis yra plačiai vartojamas farmacijos, parfumerijos bei maisto pramonėse (2,3).

*T. pulegioides*, kaip ir kitos *Thymus* genties rūšys, pasižymi cheminiu polimorfizmu, t. y. skirtingi tos pačios rūšies individai sintetina skirtingos cheminės sudėties eterinius aliejus. Panašios cheminės sudėties eterinius aliejus kaupiantys individai priklauso tam pačiam chemotipui. Pagal eteriniuose aliejuose dominuojančius cheminius junginius *T. pulegioides* rūšyje yra išskiriamos dvi chemotipų grupės – fenoliniai ir nefenoliniai chemotipai. Fenoliniam chemotipams priklauso tie *T. pulegioides* individai, kuriuose kaupiasi farmakologiniu požiūriu vertingi fenoliai – timolis ir/ar karvakrolis (1,4–6).

Augalo gebėjimas susintetinti tam tikrą eterinio aliejaus kiekį yra nulemtas genetiškai, todėl tos pačios rūšies skirtingi individai gali sukaupti nevienodus šio antrinio metabolito kiekius. Pavyzdžiui, Lietuvoje augantys keturbriauniai čiobreliai gali sukaupti nuo 0,33 % iki 1,21 % eterinio aliejaus (7). Čiobreliuose eteriniai aliejai kaupiasi eterinių aliejų liaukutėse, kurios daugiausia aptinkamos lapuose, menkai stiebuose bei taurėlapiuose. Eterinių aliejų liaukutės yra randamos maždaug trečdalyje induočių augalų rūšių. Unikali bei pagrindinė jų savybė yra gebėjimas sintetinti, kaupti bei išskirti didelį, palyginus su jų dydžiu, kiekį eterinių aliejų, kurie prisideda prie augalo prisitaikymo aplinkoje (8–10).

Vizualiai neįmanoma įvertinti, kiek konkretus keturbriaunio čiobrelio individas sukaupia eterinio aliejaus, o kiekvieno individo eterinio aliejaus kiekybinės sudėties tyrimas yra ilgas ir gana brangus. Taip pat nėra žinoma, ar skiriasi žiotelių, kurios gali būti netiesiogiai susijusios su eterinio aliejaus sinteze, ir eterinio aliejaus liaukučių rodikliai (pavyzdžiui, diametras ir/ar tankis lapo epidermio ploto vienetu) fenoliniam ir nefenoliniam chemotipams priklausančiuose *T. pulegioides* individuose. Todėl *T. pulegioides* lapo epidermio anatominių struktūrų, tiesiogiai ar netiesiogiai susijusių su eterinio aliejaus kaupimusi, ir eterinio aliejaus kiekio sąsajų žinios būtų naudingos atrenkant vertingus individus iš jų natūralių būveinių su tikslu ateityje juos kultivuoti ir naudoti medicininiais tikslams.



**Darbo tikslas:**

Ištirti keturbriaunio čiobrelio (*T. pulegioides*) eterinio aliejaus kiekio sąsajas su lapo epidermio anatominėmis struktūromis, tiesiogiai bei netiesiogiai susijusiomis su eterinio aliejaus sinteze ir kaupimusi.

**Darbo uždaviniai:**

- 1) nustatyti ir palyginti eterinio aliejaus kiekius *T. pulegioides* individuose;
- 2) nustatyti, kokiai chemotipų (fenolinių ar nefenolinių) grupei priklauso tiriamieji *T. pulegioides* individai;
- 3) nustatyti ir palyginti eterinio aliejaus liaukučių bei žiotelių tankį *T. pulegioides* lapų viršutiniame ir apatiniame epidermyje;
- 4) nustatyti ir palyginti *T. pulegioides* eterinio aliejaus liaukučių diametrą abiejuose lapų epidermiuose.

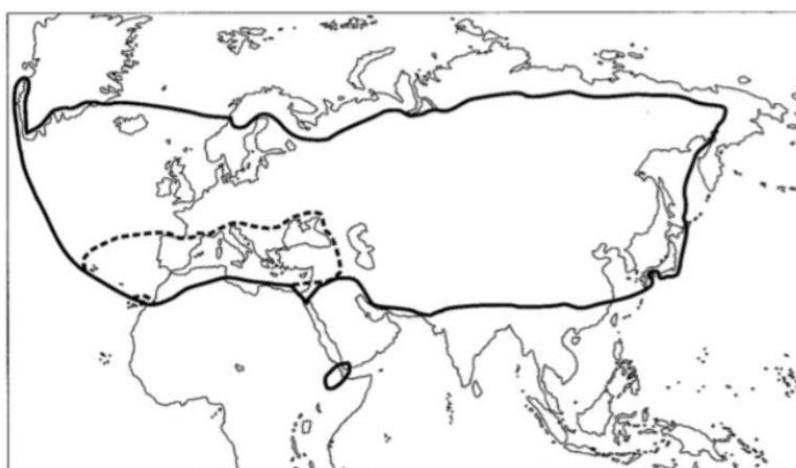
## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. *Thymus* gentis

Notreliniai arba lūpažiedžiai (Lamiaceae) – šešta pagal rūšių skaitlingumą induočių augalų šeima, kuriai priskiriamos 236 gentys ir nuo 6900 iki 7200 augalų rūšių. Tai daugiausia žoliniai augalai, sintetinantys eterinius aliejus, kuriuos kaupia specialiose talpyklose – eterinių aliejų liaukutėse arba liaukiniuose plaukeliuose. Paplitę visame pasaulyje, kvapnūs, eterinių aliejų gausūs Lamiaceae šeimos augalai turi didelę vertę medicinoje, farmakologijoje, aromaterapijoje, kosmetologijoje bei maisto gamyboje (11–14).

Viena iš gausiausių Lamiaceae šeimos genčių yra čiobrelis (*Thymus*), kuriai priskiriama maždaug 220 rūšių (11). Yra manoma, jog lotyniškas žodis *thymus* kilo iš graikiško žodžio „*thyo*“, liet. kvėpalai, arba „*thymos*“, liet. drąsa arba jėga (15). *Thymus* genties augalai yra aromatingi, nedideli, daugiamečiai žoliniai heliofiliniai augalai, kurie auga gerai drenuojamoje, kalkingoje ar smėlėtoje žemėje ir idealiomis sąlygomis reikalauja daug saulės šviesos (16). Šios genties atstovai plačiai paplitę visame Eurazijos žemyne, šiaurės ir rytų Afrikoje bei pietinėje Grenlandijoje, kelios rūšys yra endeminės Viduržemio jūros regione (1,4).

*Thymus* gentis skirstoma į 8 skyrius (*Micantes*, *Piperella*, *Teucrioides*, *Mastichina*, *Pseudothymbra*, *Thymus*, *Hyphodromi*, *Serpyllum*), iš kurių penki yra randami Iberijos pusiasalyje bei šiaurės vakarų Afrikoje, o skyriui *Thymus* priklausantys čiobreliai labiau paplitę Viduržemio jūros regione, kuris yra laikomas genties kilmės centru (17,18).



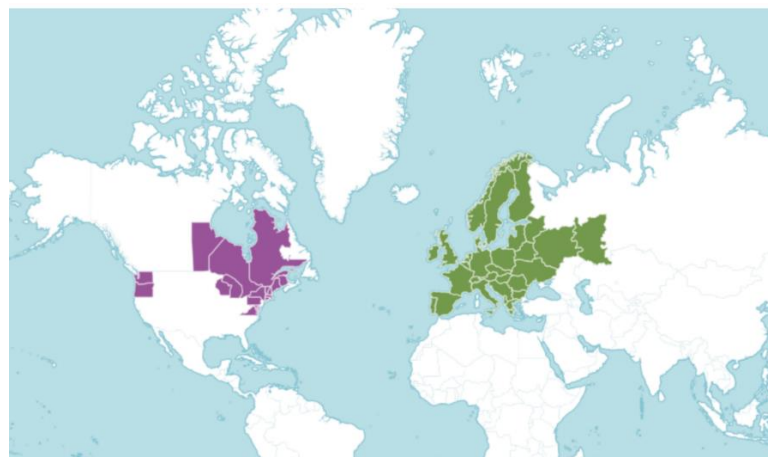
1 pav. *Thymus* genties rūšių paplitimas. Punktyrinė linija žymi visus skyrius, išskyrus sect. *Serpyllum* ir sect. *Hyphodromi* bei subsect. *Serpyllastrum* (18).

Čiobreliai yra labai atsparūs ekstremalioms klimato sąlygoms ir gali augti vėsioje ar net labai sausoje aplinkoje. Kai kurios šiai genčiai priklausančios rūšys gali būti išskirtinai apibūdinamos kaip atsparios šaltoms žiemoms, todėl yra laikomos vertingais augalais žemės ūkyje vėsesnio klimato regionuose, pvz., šiaurės Europos šalyse (1). Ypač *Serpyllum* skyriaus rūšys, tokios kaip *Thymus glacialis*, augantis Siberyje, ar *Thymus praecox* Grenlandijoje, gali išgyventi labai žemose temperatūrose (18). Šiam skyriui taip pat priklauso ir Lietuvoje savaime augantis keturbriaunis čiobrelis (*Thymus pulegioides*) (19).

## 1.2. *Thymus pulegioides*

Keturbriaunis čiobrelis (*T. pulegioides*) – daugiametis augalas, kylančiu, keturbriauniu stiebu, kurio briaunos yra plaukuotos, šonai pliki arba pakaitomis du priešiniai plaukuoti, su trumpakočiais, 5–18 mm ilgio ir 2–10 mm pločio, kiaušiniškos, plačiai kiaušiniškos, ovalios arba plačiai elipsiškos formos lapais. Augalo aukštis varijuoja 5–25 centimetrų ribose. Žydi ilgai, nuo birželio iki rugsėjo mėnesio. Šviesiai violetinės spalvos žiedai telkiasi šakučių viršūnėse varpos formos žiedynuose (20,21).

*T. pulegioides* kilmės vieta yra laikoma Europa, pvz., natūraliai auga Baltijos šalyse, Vokietijoje, Belgijoje, Austrijoje, Danijoje ir kt. Šis augalas randamas sausose pievose, pamiškėse, ganyklose, dirvonuose, šlaituose, pakelėse, ant pylimų. Lietuvoje keturbriaunis čiobrelis yra gana dažnas (20–22). Skirtingai nei kitos ekonomiškai svarbios *Thymus* genties rūšys, pvz., *Thymus vulgaris* ar *Thymus capitatus*, *T. pulegioides* yra tinkamas auginimui atšiauriame Lietuvos klimate dėl atsparumo šalnimis (23).



2 pav. Keturbriaunio čiobrelio paplitimas. Natūralios augavietės pažymėtos žalia spalva, nenatūralios – violetine (22).

Keturbriaunis čiobrelis – viena iš komercinių čiobrelio rūšių. Dėl kaupiamo eterinio aliejaus sudėtinių komponentų, tokių kaip  $\alpha$ -terpinilo acetatas, monoterpeniniai fenoliai timolis ir karvakrolis, acikliniai monoterpeniniai alkoholiai geraniolis ir linalolis, dėl aromatinių, antibakterinių bei antioksidantinių savybių, jis yra naudojamas kaip vaistinis bei kosmetinis augalas, taip pat kaip prieskonis (6,24). Be to, keturbriaunis čiobrelis sintetina ir kitus junginius, tokius kaip  $\gamma$ -terpinenas, borneolis, p-cimenas, mircenas, eugenolis, neralis, įvairius flavonoidus, taninus (19). Pastebėta, jog *T. pulegioides* kaupia daugiau fenolinių junginių nei kitos aprašytos *Thymus* genties rūšys, ypač rozmarino rūgštis, todėl jį galima laikyti puikiu biologiškai aktyvių junginių šaltiniu (1).

Vieno atlikto tyrimo metu buvo nustatyta, jog *T. pulegioides* turi didesnę mineralinių medžiagų kiekį lyginant su *Thymus zygis* ir *Thymus fragrantissimus*. Ypač kalio turtingas keturbriaunis čiobrelis gali turėti didelį potencialą funkciniuose maisto produktuose, skirtuose širdies ir kraujagyslių sveikatai palaikyti (25).

Etnobotaniniai tyrimai parodė, jog *T. pulegioides* antžeminės dalys buvo naudojamos liaudies medicinoje šiaurės Portugalijoje, Ispanijoje, Balkanų pusiasalio ir Baltijos regiono šalyse, kai kuriose Viduržemio jūros regiono dalyse. Diuretinėmis, dezinfekuojančiomis ir virškinimo procesą gerinančiomis savybėmis pasižymintis augalas buvo naudojamas ruošiant užpilus, nuovirus ir sirupus (1).

Kroatijoje atlikto tyrimo metu buvo įrodyta, kad šešios čiobrelio rūšys, įskaitant ir keturbriaunį čiobrelį, gali būti perspektyvios priemonės gydant neurodegeneracinius sutrikimus, tokius kaip Alzheimerio liga. Buvo pastebėtas nuo dozės priklausomas acetilcholinesterazę inhibuojantis poveikis bei stiprios antioksidantinės savybės, saugančios nuo radikalų susidarymo bei slopinančios lipidų peroksidaciją (26).

Lietuvoje čiobreliai dažniausiai yra vartojami kaip atsikosėjimą, gleivių pašalinimą skatinanti priemonė. Vaistinėse parduodamų preparatų, tokių kaip „Bronchipret“, „Pertusinas“ ar „Pertusinas forte“, „Stoptussin fyto“, sudėtyje yra naudojama *T. serpyllum herba* (paprastųjų čiobrelių žolė) ir *T. vulgaris* ir/ar *T. zygis herba* (vaistinių čiobrelių žolė) (27). Nors keturbriaunis čiobrelis ir nėra įtrauktas į šiuos preparatus, tačiau atsižvelgiant į augalo kaupiamas chemines medžiagas, būdingas *Thymus* genčiai, pvz., timolis, jis taip pat gali būti vartojamas esant kvėpavimo takų sutrikimams. Europos farmakopėjoje yra aprašyta *T. serpyllum* antžeminė dalis (*Serpylli herba*) bei *T. vulgaris* ir *T. zygis*, arba jų mišinio,

nesmulkinti lapai bei žiedai (*Thymi herba*) (28,29). Keturbriaunis čiobrelis į Europos farmakopėją nėra įtrauktas.

### 1.3. Eterinio aliejaus kiekis ir sudėtis

*Thymus* genties augalai sintetina eterinius aliejus, kurie yra pagrindiniai šios genties atstovų antriniai metabolitai. Jie yra lakūs, kvapnūs, natūraliai susidarantys junginiai, kurie dažniausiai išskiriami distiliacijos būdu ir naudojami farmacijos, maisto, kosmetikos, parfumerijos ir kitose pramonės šakose (15).

Manoma, jog eterinio aliejaus antriniai metabolitai tiesiogiai nedalyvauja augalo augimo ir vystymosi procese, tačiau įrodyta, kad jie turi didelę reikšmę augalams apsisaugant nuo žoliaėdžių gyvūnų ir mikrobinių infekcijų, taip pat veikia kaip atraktantai apdulkintojams bei sėklas platinantiems gyvūnams privilioti (30). Stresas, pavyzdžiui, patogeno infekcija, gali skatinti lakiųjų junginių išsiskyrimą iš augalo (15). Be to, eterinių aliejų sintetinimas gali būti adaptyvi augalo savybė, padedanti prisitaikyti sausame klimate, kadangi lakiosios medžiagos garuoja ir taip sudaro drėgmės sočią aplinką aplink augalą, kurioje yra apsunkinamas vandens praradimas (18).

Lakūs antriniai metabolitai susideda iš monoterpenų, seskviterpenų ir diterpenų. *Thymus* gentyje labiausiai paplitę monoterpenai, tokie kaip timolis (10–64 %), karvakrolis (0,4–20,6 %), p-cimenas (9,1–22,2 %),  $\alpha$ -pinenas (0,9–6,6 %), linalolis (2,2–4,8 %), 1,8-cineolis (0,2–14,2 %),  $\gamma$ -terpinenas (5–10 %), kamfenas,  $\alpha$ -terpinenas,  $\beta$ -pinenas ir terpinen-4-olis (15). *Thymus* genties augaluose randami karvakrolis, citralis, cinamaldehydas, limonenas, eugenolis, mentolis ir timolis JAV maisto ir vaistų administracijos (angl. Food and Drug Administration) pripažinti saugiomis medžiagomis, o Europos komisijos registruoti kaip maisto kvapiosios medžiagos (31).

Antrinių metabolitų kiekis, kurį geba susintetinti augalas, yra nulemtas genetiškai, todėl tai pačiai rūšiai priklausantys skirtingi individai gali sukaupti nevienodą eterinio aliejaus kiekį. Tačiau, augalo augimo vieta ir aplinka, dirvožemio cheminė sudėtis, žaliavos rinkimo laikas bei surinktos augalo dalys, kartu su ekstrakcijos ir analizės metodais, taip pat gali daryti įtaką nustatomam eterinio aliejaus kiekiui bei sudėčiai. Vieno atlikto tyrimo metu buvo nustatyta, jog padidėjus aliuminio, geležies, vario, kalio ir mangano kiekiams dirvožemyje, keturbriaunio čiobrelio žaliavoje sumažėjo eterinių aliejų kiekis, o padidėjus sieros kiekiui, *T. pulegioides*

eteriniuose aliejuose nustatytas didesnis linalolio ir karvakrolio kiekis bei mažiau p-cimeno (7,15,24).

Taip pat, eterinių aliejų sudėtis ir kiekis kinta priklausomai nuo augalo vystymosi stadijos. Pavyzdžiui, p-cimeno ir  $\gamma$ -terpineno kiekiai mažėja žydėjimo pradžioje ir jo metu, bet didėja žydėjimo pabaigoje, o timolio ir karvakrolio reikšmės atvirkščiai – didėja augalui pradendant žydėti (32).

Manoma, jog džiovintoje *Thymus* žolėje lakių antrinių metabolitų kiekis gali siekti iki 2,5 % (15). Tačiau, dėl minėtų genetinių bei aplinkos veiksnių, skirtingi individai susintetina nevienodą kiekį bei skirtingos cheminės sudėties eterinius aliejus (1 lentelė). Pavyzdžiui, Lietuvoje savaime augantis keturbriaunis čiobrelis gali sukaupti nuo 0,33 % iki 1,21 % eterinio aliejaus (7,15).

1 lentelė. Skirtingose šalyse augančių *Thymus pulegioides* eterinių aliejų kiekis bei pagrindiniai junginiai

Šalis	Eterinio aliejaus kiekis, %	Pagrindiniai junginiai, %	Literatūros šaltiniai
Lietuva	0,33–1,21 %	linalolis – 80,3 %; geraniolis – 16,3–43,8 %; timolis – 30,9 %; karvakrolis – 29,05 %.	(7,32,33)
Slovakija	0,2–0,3 %	linalolis – 60,2 %; karvakrolis – 32,9 %; timolis – 20,8 %.	(32,34)
Pietų Italija	0,9–1,1 %	timolis – 21,8–39,1 %; p-cimenas – 19,9 %; $\beta$ -kariofilenas – 7,5 %	(32,35)
Kroatija	0,28–1,31 %	geraniolis – 37,6–48,6 %; karvakrolis – 10–30 %; linalolis – 28,2–28,6 %; timolis – 1–22 %; eugenolis – 11,2–20,7 %.	(19,33)

Vengrija	0,15 %	timolis – 5,1–50,4 %; β-kadinenas – 13,6–28,4 %; timolio metilo eteris – 0,2–25,2 %.	(36)
Rumunija	0,7–1 %	Karvakrolio chemotipas: karvakrolis – 50,5–62,6 %; γ-terpinenas – 9,8–9,8 %; p-cimenas – 5,8–7,1 % timolis – 1,6–6,6 %. Timolio chemotipas: timolis – 22,89 %; p-cimenas – 14,57 %; timolio metilo eteris – 11,19 %.	(4,37)
Kosovas	1,58 %	geraniolis – 34,52 %; terpinilo acetatas – 18,83 %; α- geranilio acetatas – 13,64 %; timolis – 5,76 %.	(38)
Portugalija	1,8 %	timolis – 26 % karvakrolis – 21 % γ-terpinenas – 8,8 % p-cimenas – 7,8 %	(39)

#### 1.4. Cheminis polimorfizmas

*Thymus* genties rūšims, taip pat ir keturbriauniui čiobrelui, yra būdingas cheminis polimorfizmas. Skirtingi *T. pulegioides* individai sintetina skirtingos cheminės sudėties eterinius aliejus. Tam tikrų cheminių junginių vyravimą individo eteriniame aliejuje lemia genetiniai veiksniai, bet yra manoma, jog abiotiniai aplinkos veiksniai, tokie kaip drėgmė, temperatūra, dirvožemio cheminė sudėtis, turi įtakos chemotipų pasiskirstymui erdvėje. Buvo nustatyta, jog tiek fenolinių junginių gamybai, tiek fenoliniams chemotipams yra palankesnis šiltesnis ir sausesnis klimatas, o nefenoliniai junginiai didesniais kiekiais kaupiasi bei nefenolinių chemotipų grupei priklausantys chemotipai labiau paplitę vėsesnėje ir drėgnesnėje aplinkoje (40). Tačiau augalų genetinės savybės eterinių aliejų cheminę sudėtį įtakoja labiau nei skirtingos aplinkos sąlygos (41).

Didelė dalis čiobrelių yra renkama iš natūralių augaviečių, tačiau, būtent dėl cheminio polimorfizmo, būdingo visiems *Thymus* genties augalams, nėra įmanoma surinkti homogeniškos ir standartizuotos žaliavos. Tos pačios augalų rūšies individų cheminės sudėties įvairovė gali lemti nevienodą juose susikaupiančio eterinio aliejaus biologinį aktyvumą bei jo panaudojimo galimybes. Buvo nustatyta, jog fenolius kaupiančio keturbriaunio čiobrelio ekstraktai, kurių sudėtyje yra didelis karvakrolio ir (arba) timolio kiekis, turėjo didesnę antioksidantinę poveikį (42). Todėl pagal tam tikras biologines ir chemines savybes atrinktų augalų individų auginimas galėtų užtikrinti žaliavos homogeniškumą (32,43).

Pagal tai, kokie cheminiai junginiai dominuoja eteriniame aliejuje, *Thymus* genties individas priskiriamas tam tikram chemotipui bei chemotipų grupei. *T. pulegioides* rūšies individai gali priklausyti vienai iš dviejų – fenolinių ir nefenolinių – chemotipų grupių. Pagal pagrindines eterinio aliejaus sudedamąsias dalis buvo aprašyti šeši chemotipai Lietuvoje augančiam keturbriauniui čiobreliui: linalolio (L), geraniolio (G), karvakrolio (C), timolio (T), timolio/karvakrolio (T/C) ir  $\alpha$ -terpenilo acetato (33,44). *T. pulegioides* individai kaupiantys vertingus fenolius – timolį ir/ar karvakrolį – priklauso fenolinių chemotipų grupei.

Kokio tipo chemotipui – fenoliniam ar nefenoliniam – priklausys *T. pulegioides* individas, galima nustatyti ir organoleptiškai, pagal kvapą. Keturbriaunio čiobrelio individai kvėpiantys citrina ir karvakroliu atitinkamai priklauso geraniolio ir karvakrolio chemotipams, „esterių“ kvapas būdingas  $\alpha$ -terpenilo acetato chemotipui. Karvakrolio chemotipas dar gali būti apibūdinamas kaip turintis „fenolinių“ kvapą (33,45).

### 1.5. *Thymus pulegioides* eterinio aliejaus savybės bei panaudojimas

**Antibakterinis veikimas.** Keturbriaunio čiobrelio eterinis aliejus pasižymi antimikrobinėmis savybėmis daugiausiai dėka timolio ir karvakrolio, kurie veikia mikroorganizmų ląstelių membranos pralaidumą, saugydami jos architektūrą ir sukeldami jonų praradimą, ir inhibuoja bakterijų augimą. Yra įrodytas čiobrelių eterinių aliejų ir jų pagrindinių komponentų timolio ir karvakrolio efektyvumas prieš skirtingus patogenus, tokius kaip *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli* ir *Salmonella typhimurium* (46).

*T. pulegioides* eterinis aliejus, gebantis stabdyti nepageidaujamų mikroorganizmų augimą kosmetikos ir maisto produktuose, galėtų būti naudojamas kaip pakaitalas sintetiniams konservantams, galintiems sukelti rimtų sveikatos problemų žmonėms (47).



**Antiūždegiminis aktyvumas.** Tyrimai rodo, jog timolis veikia priešūždegimiškai, dėl sugebėjimo padidinti antioksidantinių fermentų, tokių kaip superoksido dismutazė, glutationo peroksidazė, glutationo-S-transferazė ir katalazė, aktyvumą. Šie fermentai neutralizuoja uždegimo metu neutrofilų gaminamas reaktyviasias deguonies formas, kurios gali reaguoti su lipidais, baltymais ir nukleino rūgštimis bei taip sukelti mutacijas ir ląstelių žūtį (46).

**Priešgrybelinės savybės.** Portugalijoje atlikto tyrimo metu buvo įrodyta, jog *T. pulegioides* eterinis aliejus gali būti potencialus vietinis preparatas prieš patogeninius grybelius. Jis inhibuoja ne tik dermatofitus, *Aspergillus* ir *Candida* rūšis (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*), bet ir flukonazolui atsparius *C. albicans* izoliatus bei *C. krusei* ir *C. glabrata*, kurių atsparumas flukonazolui yra lengvai indukuojamas. Priešgrybelinis keturbriaunio čiobrelio eterinio aliejaus veikimas pasireiškia dėl susidarančių pažeidimų patogeninių grybelių citoplazminėje membranoje bei žymaus ergosterolio kiekio sumažėjimo (39,47).

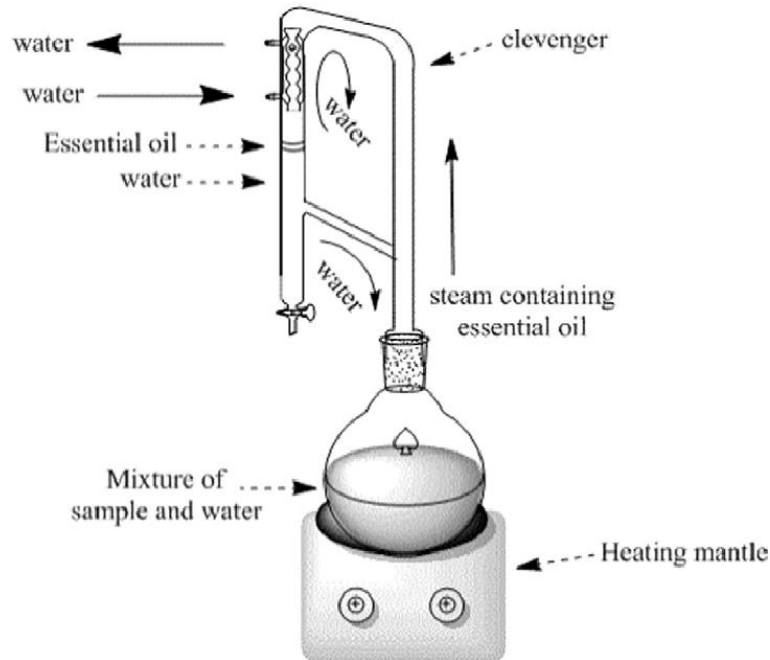
**Antioksidantinis poveikis.** Vieno tyrimo metu buvo nagrinėtas keturbriaunio čiobrelio eterinio aliejaus antioksidantinės savybės. Tyrėjai nustatė, jog *T. pulegioides* eterinis aliejus inhibuoja pirminius ir antrinius oksidacijos produktus ir, tam tikromis sąlygomis, statistiškai reikšmingai ( $p < 0.05$ ) geriau nei butilhidroksianizolis (konservantas ir antioksidantas, naudojamas kosmetikos ir maisto produktuose). Be to, kai kuriuose tyrimuose, keturbriaunio čiobrelio eterinis aliejus antioksidantinėmis savybėmis pralenkė alfa-tokoferolį ir delta-tokoferolį (4).

## 1.6. Eterinio aliejaus išskyrimo būdai

Eteriniai aliejai iš augalinės žaliavos gali būti išgaunami keliais metodais, kurie gali būti klasifikuojami į dvi kategorijas: klasikiniai/tradiciniai metodai ir inovatyvūs metodai (48).

Pats paprasčiausias ir seniausias eterinių aliejų išskyrimo metodas yra hidrodistiliacija. Eterinių aliejų kiekiui nustatyti pagal Europos farmakopėjos trečiąjį leidimą yra rekomenduojama Klevengerio sistema (angl. Clevenger system) (3 pav.). Hidrodistiliacijos metu susmulkinta augalinė žaliava yra panardinama į vandenį ir kaitinama elektriniu kaitintuvu. Lakiųjų medžiagų ir vandens garų mišinys netiesiogiai vėsina vandeniu kondensuojasi ir patenka į surinktuvą dalį. Vanduo nesimaišo su dauguma terpeninių molekulių, todėl lakieji eterinio aliejaus komponentai po kondensacijos yra lengvai atskiriami nuo vandens. Garų

distiliacijos metodo principas nuo hidrodistiliacijos skiriasi tuo, jog garai yra gaminami atskiroje talpykloje ir leidžiami pro augalinę žaliavą (48–50).



3 pav. Hidrodistiliacijos Klevengerio aparato sistema (51).

Kiti tradiciniai eterinių aliejų išskyrimo metodai apima maceraciją ir Soksleto ekstrakciją (angl. Soxhlet extraction). Maceracijos metu augalinės medžiagos yra mirkomos riebaluose arba organiniame tirpiklyje, pavyzdžiui, aliejus, alkoholis, ir laikomos kambario temperatūroje mažiausiai tris dienas. Toks ilgas mirkymo laikas suardo ląstelių sienes ir taip „ištraukia“ bioaktyvias medžiagas į tirpiklį. Soksleto ekstrakcijos metu kolboje garinamas tirpiklis kondensuojasi kondensatoriuje ir teka per mėginį, o vėliau grįžta į kolbą, todėl šis procesas vyksta ciklais (52,53).

Vienas iš pagrindinių klasikinių ekstrakcijos metodų trūkumų yra aukštos temperatūros, kurios gali chemiškai pakeisti eterinių aliejų komponentus. Taip pat, išekstrahuoto eterinio aliejaus kokybė gali labai suprastėti, jei ekstrakcijos laikas yra ilgas, kas būdinga aukščiau minėtiems tradiciniams būdams. Todėl, pastaruoju metu didėja naujų metodų, kurie būtų greitesni, ekologiškesni ir efektyvesni nei tradiciniai, poreikis. Inovatyviems metodams priklauso ekstrakcija superkritiniais skysčiais, ekstrahavimas ultragarsu, ekstrakcija panaudojant mikrobangas, mikrobangų garų distiliacija (angl. the microwave steam distillation)

ir kt. Pavyzdžiui, ekstrahavimas ultragarsu, lyginant su tradiciniais ekstrakcijos metodais, padidina ekstrakcijos efektyvumą ir greitį, sumažina reikalingą temperatūrą ir leidžia rinktis iš daugiau tirpiklių. Nors inovatyvūs metodai turi daug privalumų išskiriant eterinius aliejus iš augalų, norint juos naudoti pramoniniu lygiu reikėtų gerai įvertinti produkcijos sąnaudas, kadangi šie metodai yra gana brangūs (48,50).

### 1.7. Eterinių aliejų liaukutės

*Thymus* genties augalai eterinius aliejus kaupia specializuotose talpyklose – eterinių aliejų liaukutėse (angl. glandular trichomes). Šios unikalios struktūros, kurios yra randamos maždaug trečdalyje induočių augalų rūšių, palyginus su jų dydžiu, geba sintetinti bei išskirti didelį kiekį eterinių aliejų (8).

Eterinių aliejų liaukutės yra sudėtingos, poliarizuotos bei labai organizuotos ląstelių struktūros, kurių morfogenezę kontroliuoja painus molekulinis procesų rinkinys, lemiantis jų išsidėstymą ant lapų epidermio bei vėlesnę jų diferenciaciją. Be to, eterinių aliejų liaukučių iniciacija ir diferenciacija vyksta skirtingu metu skirtingose lapo vietose, todėl net ir labai jaunuose augalo lapuose galima aptikti nevienodos vystymosi stadijos liaukučių (8).

Yra išskiriami du pagrindiniai eterinių aliejų liaukučių tipai: angl. *peltate* ir angl. *capitate*. *Peltate* tipo liaukutės yra apibrėžiamos kaip turinčios trumpą kotelį ir didelę sekrecinę galvutę, kuri sudaryta iš 4–18 liaukinių ląstelių, išsidėsčiusių viename ar dviejuose koncentrinuose apskritimuose. *Capitate* tipo liaukutės turi ilgesnį kotelį, kurio viršūnėje yra viena ar dvi liaukinės ląstelės. Pastebėta, jog daugiau eterinio aliejaus sintetina *peltate* tipo liaukutės (8,15,54).

*Thymus* genčiai priklausančiuose augaluose daugiausia eterinių aliejų liaukučių yra aptinkama lapuose, menkai taurėlapuose bei stiebuose (*T. pulegioides* stiebe liaukutės randamos tik briaunose). *Thymus* genties atstovuose eterinių aliejų liaukučių spalva, forma ir dydis skiriasi mažai, tačiau, dėl aplinkos ir genetinių veiksnių, jų skaičius bei tankis lapuose žymiai skiriasi net ir tos pačios rūšies individuose. Įprastai, jų tankis būna didesnis tose čiobrelėlių rūšyse, kurių atstovai turi mažesnius lapus, išskyrus *T. serpyllum*. Taip pat manoma, jog eterinių aliejų liaukučių tankis yra didesnis augaluose, kurie auga sausame klimato, kadangi tankus eterinių aliejų liaukučių sluoksnis gali užtikrinti didesnę apsaugą nuo saulės spindulių ir taip sumažinti prarandamo vandens kiekį (9,10,55).

## 1.8. Žiotelės

Žiotelės (angl. *stomata*) yra specializuotos epidermio struktūros. Jos būtinos augalams fotosintezei vykdyti, todėl iš dalies gali būti netiesiogiai susijusios su lakiųjų junginių sinteze augaluose. Jos reguliuoja dujų, daugiausiai CO<sub>2</sub> ir O<sub>2</sub>, mainus tarp augalo ir aplinkos ir kontroliuoja transpiracijos metu prarandamo vandens kiekį (56,57). Žiotelė susidaro iš 2 varstomųjų ląstelių, turinčių chloroplastų, ir 2 arba 4 pagalbinių ląstelių (58).

Žiotelės gali greitai varstyti, taip prisitaikydamos prie nuolatos kintančios aplinkos. Jų varstymą veikia klimato sąlygos, tokios kaip drėgmė, CO<sub>2</sub> koncentracija bei gaunamos šviesos intensyvumas. Taip pat didelę reikšmę turi ir hormoniniai signalai, ypač augalų hormonas abscizo rūgštis, kuri reguliuoja daugumą augalo augimo ir vystymosi aspektų bei atsaką į stresą. Žiotelių atsivėrimą lemia kalio druskų ir/ar cukrų susikaupimas varstomosiose ląstelėse, dėl to mažėja vandens potencialas ir vėlesnis vandens pasisavinimas, o žiotelės užsidaryti priverčia abscizo rūgštis, kuri, veikdama jonų kanalus, skatina tirpiųjų medžiagų pašalinimą iš varstomųjų ląstelių ir taip priverčia jas susitraukti, užsidaryti. Be to, žiotelės būna atsivėrusios tik dienos metu, kuomet jos gali sugerti fotosintezei reikalingą CO<sub>2</sub>, ir užsivėrusios naktį, kad būtų sumažinta vandens transpiracija (52,56,59,60).

Žiotelių tankis kinta priklausomai nuo augalo rūšies, tačiau, yra pastebėta, jog jis gali kisti ir skirtingose to pačio lapo vietose bei skirtinguose to pačio augalo lapuose. Čiobreliuose didžiausias žiotelių tankis yra randamas apatinėje lapo pusėje. Pavyzdžiui, vieno tyrimo metu buvo paskaičiuotas žiotelių tankio vidurkis *T. pulegioides* lapų epidermio viršutinėje ir apatinėje pusėse, atitinkamai gauti rezultatai yra 49,5 ir 522,5 žiotelės 1 mm<sup>2</sup>. Tame pačiame tyrime buvo tirti ir *T. × oblongifolius* ir *T. serpyllum*, kuriuose didesnis žiotelių tankis taip pat rastas apatinėje lapo pusėje (61).

## 2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODIKA

### 2.1. Žaliavos rinkimas ir paruošimas

Keturbriaunio čiobrelis 27 individų antžeminė dalis buvo surinkta 2021 metų liepos mėnesį iš 5 skirtingų augaviečių Tauragės, Šilalės ir Telšių rajonuose (vakarinė Lietuvos dalis) (2 lentelė). Kiekvieno individo žaliava buvo renkama atskirai, džiovinama ir laikoma sausoje, nuo tiesioginių saulės spindulių apsaugotoje patalpoje. Kiekvieno keturbriaunio čiobrelis individo antžeminės masės orasausė žaliava buvo ruošiama kitam darbo etapui, pašalinant nereikalingas dalis – stiebus, kurie buvo išrinkti rankiniu būdu atskiriant nuo lapelių ir žiedų. Paruoštos žaliavos – lapų ir žiedų mišinio – kiekis vienam individui varijavo 2,18–43,85 g ribose.

2 lentelė. Augavietės, kuriose tirti *Thymus pulegioides* augalai

Augavietės Nr.	Rajonas	Vietovė	Žaliavos surinkimo data
I	Šilalės raj.	Rubinavo piliakalnis	2021.07.02
II	Šilalės raj.	Medvėgalio piliakalnis	2021.07.03
III	Šilalės raj.	Kaltinėnai, Pilės piliakalnis	2021.07.03
IV	Telšių raj.	Rainiai	2021.07.03
V	Tauragės raj.	Skaudvilė	2021.07.10

### 2.2. *Thymus pulegioides* individų suskirstymas į chemotipų grupes

Tirtų keturbriaunio čiobrelis individų priskyrimas fenolinių arba nefenolinių chemotipų grupei buvo atliktas organoleptiškai pagal žaliavos ir/ar eterinio aliejaus kvapą. *T. pulegioides* individai, kurių lapai pasižymėjo „fenoliniu“ kvapu, buvo priskirti fenolinių chemotipų grupei, o citrina ar kitaip kvėpiantys individai – nefenolinių chemotipų grupei.

### 2.3. Eterinio aliejaus išskyrimas

Eteriniai aliejai iš *T. pulegioides* tirtų individų išskirti naudojant Klevengerio tipo aparatą (angl. Clevenger apparatus) hidrodistiliacijos metodu. Kiekvieno individo turimos žaliavos kiekis buvo nevienodas, todėl skyrėsi pakartojimų skaičius bei vienam pakartojimui

naudojamos *T. pulegioides* orasausės žaliavos kiekis. Eterinio aliejaus kiekis, priklausomai nuo turimos žaliavos masės, kiekviename individe buvo nustatomas 1–3 pakartojimais.

Elektroninėmis svarstyklėmis pasverta žaliava buvo suberta į 1000 ml apvaliadugnę kolbą ir pripildyta 500 ml vandens, gerai sudrėkinant mėginį. Kolba buvo įstatoma į elektrinį kaitintuvą ir sujungiama su Klevengerio tipo distiliacijos aparatūra (4 pav.). Distiliavimo pradžia buvo laikomas momentas nuo pirmo eterinio aliejaus lašo nutekėjimo iš kondensoriaus į surinktuvo graduotąją dalį. Distiliavimas buvo vykdomas 2 valandas. Po distiliacijos pabaigos, atvėsus mėginiui kolboje, buvo išmatuotas eterinio aliejaus kiekis, suskaičiuojant mažąsias padalas (1 m. p. – 0,02 ml) graduotoje surinktuvo dalyje. Eterinis aliejus buvo išleidžiamas iš surinktuvo į stiklinį buteliuką, kuris uždaromas ir papildomai sandarinamas parafilm sandarinimo plėvele. Jei gauto eterinio aliejaus kiekis buvo mažas ir jo gryno negalima surinkti, buvo naudojamas heksano tirpalas, kuris pilamas į graduotąją surinktuvo dalį ir išleidžiamas į stiklinį buteliuką kartu su eteriniu aliejumi.

Eterinio aliejaus kiekiui išreikšti orasausėje žaliavoje buvo naudojama formulė:

$$X = \frac{V}{m} \cdot 100$$

X – eterinio aliejaus kiekis žaliavoje (% V/m), V – eterinio aliejaus tūris (ml), m – žaliavos masė (g).



4 pav. *Thymus pulegioides* žaliavos distiliavimas Klevengerio tipo aparatūra (asmeninis archyvas)

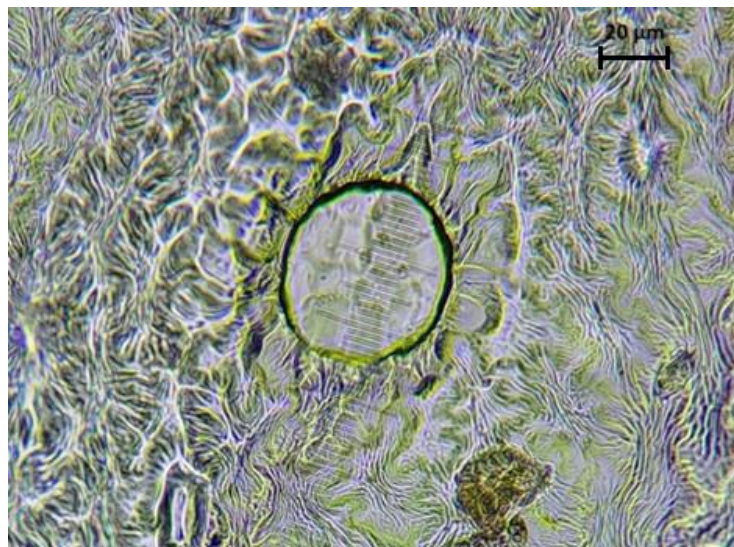
## 2.4. Keturbriaunio čiobrelio lapo anatominių struktūrų analizė

### 2.4.1. Preparatų ruošimas mikroskopavimui

Keturbriaunio čiobrelio preparatai mikroskopavimui buvo ruošiami nuo 5 skirtingų kiekvieno individo šakučių. Viršutinė ir apatinė lapo pusė buvo padengiama skaidriu nagų laku, išdžiūvus atsargiai nulupama plėvelė, kuri dedama ant stiklinio objektinio stiklelio bei uždengiama dengiamuoju stikliuku.

### 2.4.2. Keturbriaunio čiobrelio lapų mikroskopavimas

Paruošti preparatai buvo mikroskopuojami su Leica DM500 mikroskopu, naudojant 40× didinimo objektyvą, kai matymo laukas lygus 0,196 mm<sup>2</sup>. Pasirinktas matymo laukų skaičius kiekvieno tirta keturbriaunio čiobrelio individo viršutinei ir apatinei lapo pusei – po 30–60. Viename matymo lauke buvo skaičiuojamas žiotelių ir eterinių aliejų liaukučių skaičius bei eterinių aliejų liaukučių diametras (μm). Eterinių aliejų liaukučių diametrai matuoti buvo naudojama skalė, esanti mikroskopo okuliare, kurios viena maža padala yra lygi 2,5 μm (5 pav).



5 pav. *Thymus pulegioides* eterinio aliejaus liaukutė ir mikroskopo okuliario skalė (asmeninis archyvas)

Gauti žiotelių ir eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus rezultatai buvo perskaičiuojami 1 mm<sup>2</sup> lapo epidermio naudojant formulę:

$$b = \frac{a}{0,196 \text{ mm}^2}$$

b – žiotelių arba eterinio aliejaus liaukučių skaičius 1 mm<sup>2</sup>, a – žiotelių arba eterinio aliejaus liaukučių skaičius matymo lauke, t. y. 0,196 mm<sup>2</sup>.

## 2.5. Statistinė analizė

Tyrimo gautiems rezultatams vertinti buvo naudojama MS Excel 2023 ir STATISTICA<sup>®</sup> 7 programos. Iš gautų rezultatų buvo apskaičiuojami vidurkiai, standartiniai nuokrypiai, standartinės paklaidos bei nustatomi variacijos ir koreliacijos koeficientai. Duomenų analizei buvo naudojami t-testas, vienfaktorinė ANOVA analizė, Scheffe testas, Pirsono (Pearson) tiesinės koreliacijos analizė, o esant neparimetriniams duomenims taikyti Kruskal-Wallis ir Mann-Whitney U testai bei Spirmano (Spearman) koreliacinė analizė. Buvo pasirenkamas reikšmingumo lygmuo  $\alpha = 0,05$ .



### 3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. *Thymus pulegioides* eterinio aliejaus kiekybinė analizė

Tyrimo metu buvo nustatyta, kad Lietuvos vakarinėje dalyje augantis keturbriaunis čiobrelis vidutiniškai sukaupia  $0,60 \pm 0,35$  % eterinio aliejaus. Mažiausias eterinio aliejaus kiekis nustatytas III augavietėje augusiame individe nr. 15 ( $0,12 \pm 0,03$  %), o didžiausias – IV augavietėje augusiame individe nr. 22 ( $1,4 \pm 0,02$  %) (3 lentelė); eterinio aliejaus kiekio variacijos koeficientas tarp tirtų *T. pulegioides* individų buvo lygus 51 %. Šio tyrimo rezultatai yra panašūs į kito Lietuvoje atlikto tyrimo rezultatus, kurie nurodo, jog nustatytas *T. pulegioides* eterinio aliejaus kiekis varijavo 0,23 % – 0,96 % ribose, o apskaičiuotas vidutinis kiekis siekė  $0,56 \pm 0,17$  % (24). Tačiau literatūroje nurodoma, kad vidurio Europos šalyse augantys keturbriauniai čiobreliai eterinio aliejaus sukaupia palyginus mažiau nei Lietuvoje. Pavyzdžiui, Vengrijoje tirtų *T. pulegioides* augalų vidutinis eterinio aliejaus kiekis siekė vos 0,15 %, o Slovakijoje varijavo 0,2 % – 0,3 % ribose (34,36). Šiltesnio klimato šalyse, tokiose kaip Portugalija ir Pietų Italija, keturbriaunis čiobrelis sukaupia atitinkamai 1,8 % ir 0,9 % – 1,1 % eterinio aliejaus (35,39).

Net 81 % visų tirtų *T. pulegioides* augalų eterinio aliejaus kiekis nesiekė 1 %. Daugiau nei 1 % eterinio aliejaus buvo nustatyta tik 5-iose individuose, kas sudaro 19 % visų tirtų *T. pulegioides* individų (3 lentelė). Ankstesni tyrimai taip pat parodė, kad Lietuvoje augantys *T. pulegioides* augalai retai kada sukaupia eterinio aliejaus daugiau nei 1 % (24,32).

3 lentelė. Eterinio aliejaus kiekis *Thymus pulegioides* individuose, augusiuose skirtingose augavietėse bei priklaususiuose skirtingiems chemotipams

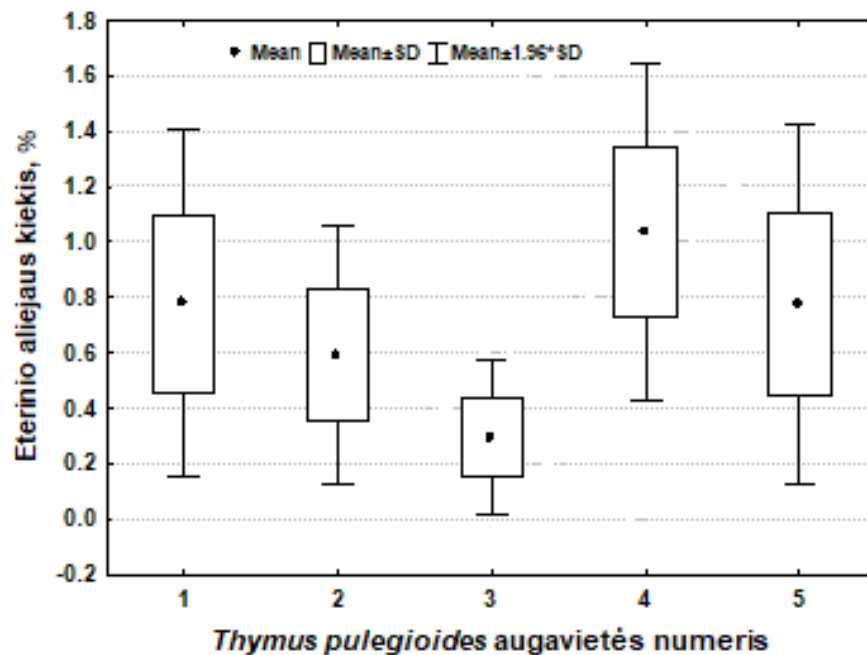
Augavietė	Individo numeris	Chemotipas	Vidutinis eterinio aliejaus kiekis individe $\pm$ SP, %	Augavietėje tirtų individų eterinio aliejaus kiekio vidurkis $\pm$ SN, %
I	1	F	1,11*	$0,78 \pm 0,32^{ab}$
	2	F	$0,98 \pm 0,03$	
	3	F	$0,18 \pm 0,00$	
	4	F	$0,84 \pm 0,06$	
	5	F	$0,80 \pm 0,05$	

	6	F	0,76 ± 0,01	
II	7	F	0,32 ± 0,03	0,59 ± 0,24 <sup>ab</sup>
	8	N	0,34 ± 0,09	
	9	F	0,54 ± 0,07	
	10	F	0,67 ± 0,03	
	11	F	0,9 ± 0,22	
	12	F	0,79*	
III	13	F	0,38*	0,29 ± 0,14 <sup>a</sup>
	14	N	0,48 ± 0,07	
	15	N	0,12 ± 0,03	
	16	N	0,21*	
	17	N	0,28 ± 0,14	
IV	18	F	0,89*	1,03 ± 0,31 <sup>b</sup>
	19	F	1,09 ± 0,03	
	20	F	1,20*	
	21	F	0,59*	
	22	F	1,4 ± 0,02	
V	23	F	0,52*	0,78 ± 0,33 <sup>ab</sup>
	24	F	0,88*	
	25	N	0,50*	
	26	**	***	
	27	N	1,20*	

*SP* – standartinė paklaida; *SN* – standartinis nuokrypis; \* – dėl mažo žaliavos kiekio distiliuota vienu pakartojimu, todėl paklaida neapskaičiuota; \*\* – dėl mažo eterinio aliejaus kiekio chemotipas nenustatytas; \*\*\* – dėl mažo žaliavos kiekio eterinio aliejaus kiekis nenustatytas; *F* – fenolinis chemotipas; *N* – nefenolinis chemotipas; skirtingos ir tos pačios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ( $p < 0,05$ ) ir nereikšmingus eterinio aliejaus kiekio vidurkių skirtumus tarp augaviečių.

Tyrimo metu tirti keturbriaunio čiobrelis individai buvo surinkti iš 5 skirtingų augaviečių. Didžiausias vidutinis eterinio aliejaus kiekis *T. pulegioides* individuose buvo

nustatytas IV augavietėje (Telšių r.) ir siekė  $1,03 \pm 0,31$  %, o mažiausias – III augavietėje (Šilalės r.) ir buvo lygus tik  $0,29 \pm 0,14$  %, t. y. 3,5 karto mažesnis nei IV augavietėje. Dviejose augavietėse (I ir V augavietėje) vidutinis eterinio aliejaus kiekis keturbriauniuose čiobreliuose buvo vienodas, atitinkamai  $0,78 \pm 0,32$  % ir  $0,78 \pm 0,33$  % (3 lentelė). Kruskal-Wallis testas parodė, kad pagal eterinio aliejaus kiekį patikimai ( $p < 0,05$ ) viena nuo kitos skyrėsi III ir IV augavietės (6 pav., 3 lentelė).

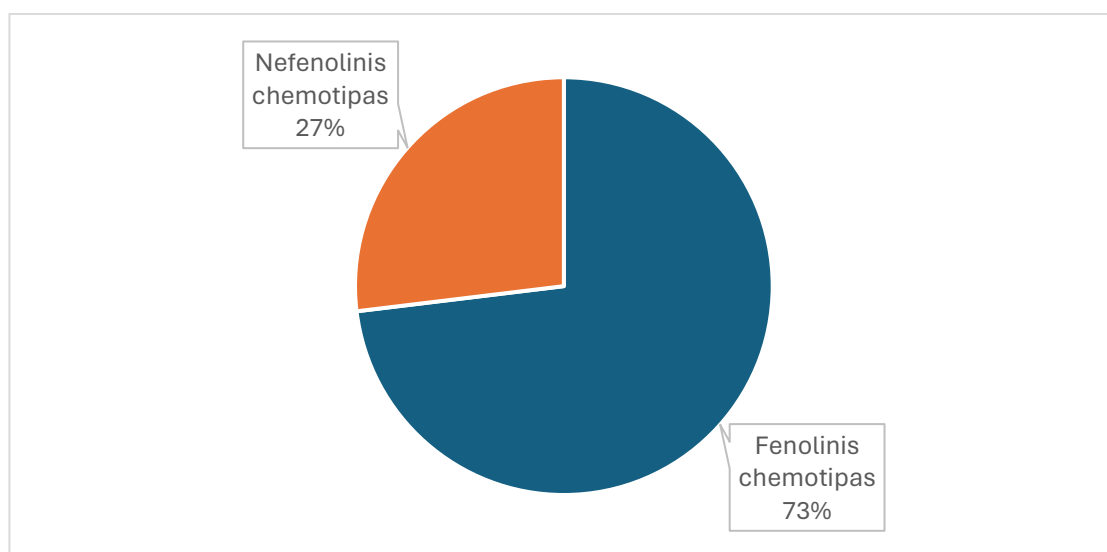


6 pav. Eterinio aliejaus kiekio pasiskirstymas tarp *Thymus pulegioides* augaviečių

Tarp tirtų *T. pulegioides* individų fenoliniams chemotipams priklausė tris kartus daugiau individų, nei nefenoliniams chemotipams (7 pav., 3 lentelė). Remiantis literatūros duomenimis, Čekijoje augančiuose keturbriauniuose čiobreliuose buvo išskirti 3 chemotipai: timolio, karvakrolio ir linalolio. Fenolinių chemotipų (timolio ir karvakrolio) grupei priklausė 62,5 % individų, likę 37,5 % priskirti nefenoliniam linalolio chemotipui. Pasak tyrimo duomenų fenolinis karvakrolio chemotipas vyravo vėsesnio bei drėgnesnio klimato aukštesniuose Čekijos regionuose (> 450 metrų virš jūros lygio), o timolio ir linalolio chemotipai buvo aptinkami žemesnėje altitudėje (< 450 m virš jūros lygio) ir sausesniame klimato augančiuose *T. pulegioides* augaluose (34). Kitame Lietuvoje atliktame tyrime (2003 m.) rezultatai parodė, jog iš 25 tirtų *T. pulegioides* individų 13 iš jų priklausė fenolinių chemotipų grupei (44). Šio

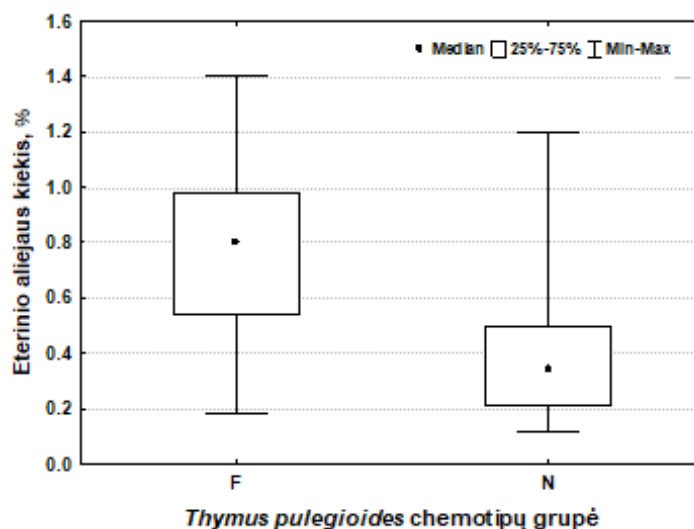
darbo rezultatai yra gana panašūs į ankstesnius tyrimus, kadangi nustatytas fenolinių chemotipų grupei priklausančių individų skaičius yra didesnis nei priklausančių nefenoliniams chemotipams. Todėl galima teigti, kad vakarinėje Lietuvos dalyje labiau vyrauja fenoliniams chemotipams priklausančios *T. pulegioides* individai.

Dviejose augavietėse (I augavietėje (Šilalės r., 6 individai) ir IV augavietėje (Telšių r., 5 individai)) tirti *T. pulegioides* augalai priklausė tik fenolinių chemotipų grupei. Nefenoliniams chemotipams priklausančių individų daugiausiai buvo III augavietėje (3 lentelė).



7 pav. Tirtų *Thymus pulegioides* individų pasiskirstymas pagal chemotipus

Vidutinis eterinio aliejaus kiekis fenolinių chemotipų grupei priklausiusiuose *T. pulegioides* individuose siekė  $0,78 \pm 0,31$  %, o nefenolinių chemotipų individuose –  $0,45 \pm 0,36$  %, t. y. du kartus mažiau nei fenolinių chemotipų individuose. Mann-Whitney U testas parodė, jog pagal vidutinį eterinio aliejaus kiekį skirtumas tarp fenoliniams ir nefenoliniams chemotipams priklausančių *T. pulegioides* individų buvo statistiškai reikšmingas ( $p < 0,05$ ) (8 pav.).

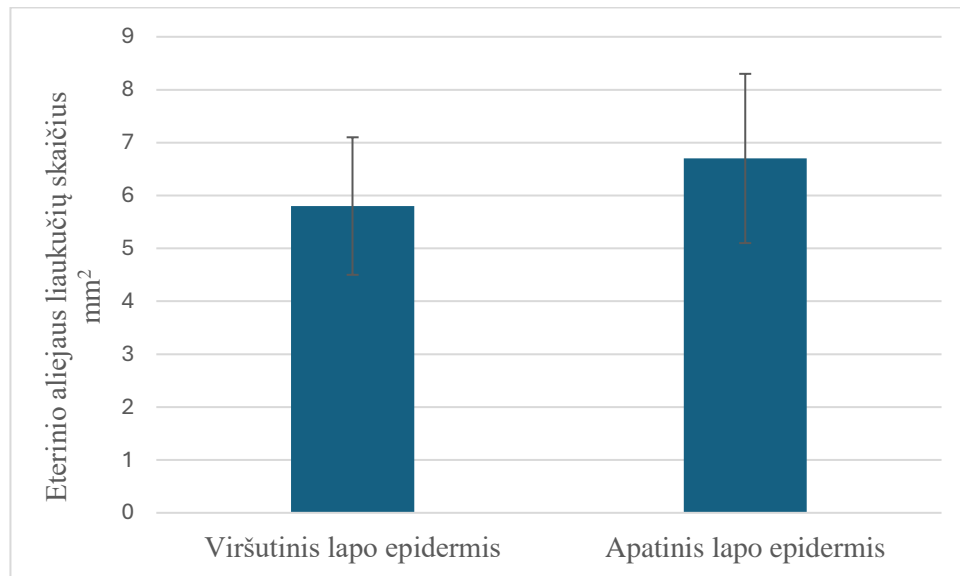


8 pav. *Thymus pulegioides* eterinio aliejaus kiekio pasiskirstymas pagal chemotipų grupes (F – fenolinis chemotipas; N – nefenolinis chemotipas)

### 3.2. Eterinio aliejaus liaukučių tankio *Thymus pulegioides* lapų epidermyje analizė

Tyrimo metu nustatyta, kad vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis keturbriaunio čiobrelio lapų apatiniame epidermyje buvo 16 % didesnis, nei viršutiniame: apatiniame epidermyje jis siekė  $6,7 \pm 1,6$  (variacijos koeficientas 24 %), viršutiniame –  $5,8 \pm 1,3$  (variacijos koeficientas 23 %) liaukučių  $\text{mm}^2$  (9 pav.). Atliktas t-testas parodė, jog vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis skirtingose *T. pulegioides* lapo pusėse skyrėsi patikimai ( $p < 0,05$ ). Nors ankstesnių tyrimų metu *T. pulegioides*, surinktų rytinėje Lietuvos dalyje (Vilniaus r.), lapų tiek viršutiniame, tiek apatiniame epidermiuose vidutinis eterinio aliejaus liaukučių skaičius  $\text{mm}^2$  buvo atitinkamai 1,7 ir 1,8 karto didesnis lyginant su šiame darbe tirtais vakarinėje Lietuvos dalyje surinktais šios rūšies augalais, daugiau eterinio aliejaus liaukučių taip pat buvo nustatyta lapų apatiniame epidermyje (61). Lietuvoje augančios kitos *Thymus* genties rūšies, *Thymus serpyllum* (paprastasis čiobrelis), augalų lapų apatiniame epidermyje taip pat buvo nustatyta daugiau eterinio aliejaus liaukučių, nei viršutiniame epidermyje (atitinkamai  $10,9 \pm 0,3$  ir  $9,9 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ). Tačiau natūralios kilmės tarprūšiniame hibride *Thymus* × *oblongifolius* eterinio aliejaus liaukučių buvo daugiau lapų viršutiniame, o ne apatiniame epidermyje (atitinkamai  $12,1 \pm 0,2$  ir  $11,8 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ) (61). M. Majdi ir kt. nustatė, kad *T. vulgaris* lapų viršutiniame epidermyje eterinio aliejaus liaukučių skaičius taip pat buvo didesnis (net 2,5 karto) nei apatiniame epidermyje, atitinkamai  $14,0 \pm 1,8$  ir  $6,0 \pm 0,9 \text{ mm}^2$  (62). Taip pat didesnis eterinio aliejaus liaukučių tankis lapų viršutiniame nei apatiniame epidermyje buvo nustatytas

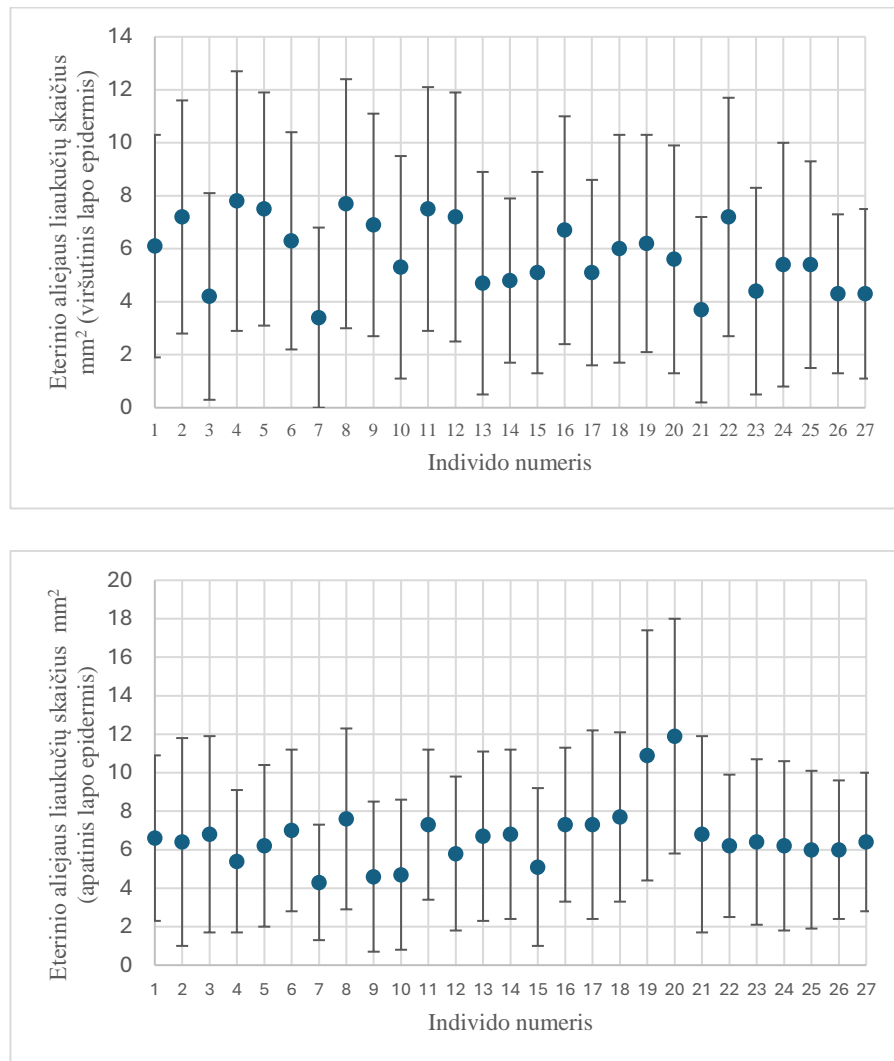
Lietuvoje auginamame hibride *T. × citriodorus* (atitinkamai  $10,0 \pm 5,4$  ir  $9,0 \pm 5,8$  mm<sup>2</sup>) ir Portugalijoje tirtuose *T. albicans* augaluose ( $66 \pm 18$  ir  $62 \pm 12$  mm<sup>2</sup>) (10,55).



9 pav. Eterinio aliejaus liaukučių skaičius *Thymus pulegioides* lapų viršutiniame bei apatiniame epidermiuose

Lyginant eterinio aliejaus liaukučių tankį abiejuose lapo epidermiuose tarp atskirų individų matyti, kad net 63 % individų turėjo daugiau eterinio aliejaus liaukučių apatiniame epidermyje, ir tik 9-uose, kas sudaro 33 % visų tirtų augalų, individuose liaukučių skaičius buvo didesnis viršutinėje lapo pusėje. Individe nr. 15 eterinio aliejaus liaukučių tankis buvo vienodas abiejuose lapo epidermiuose (10 pav., priedas nr. 1). Tirtų augalų lapų apatiniajame epidermyje eterinio aliejaus liaukučių skaičius ploto vienetu varijavo didesnių reikšmių ribose: mažiausias eterinio aliejaus liaukučių skaičius lapo viršutiniame epidermyje buvo  $3,4 \pm 3,4$  mm<sup>2</sup> (individas nr. 7, II augavietė), o didžiausias –  $7,8 \pm 4,9$  mm<sup>2</sup> (individas nr. 4, I augavietė); tuo tarpu apatinėje lapo pusėje mažiausias eterinio aliejaus liaukučių skaičius buvo  $4,3 \pm 3,0$  mm<sup>2</sup> (individas nr. 7, II augavietė), o didžiausias –  $11,9 \pm 6,1$  mm<sup>2</sup> (individas nr. 20, IV augavietė) (10 pav., priedas nr. 1). Atlikta vienfaktorinė ANOVA analizė parodė, jog eterinio aliejaus liaukučių tankis tarp tirtų individų skyrėsi statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) tiek viršutiniame, tiek apatiniame lapo epidermyje, o Scheffe testas patikslino, kad pagal eterinio aliejaus liaukučių tankį apatiniajame epidermyje tik 20-as individas patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo 7-o, 9-o, 10-o ir 15-o individų. Atlikus Pirsono (Pearson) tiesinės koreliacijos analizę nustatyta,

kad eterinio aliejaus liaukučių tankio koreliacija tarp lapo viršutinio ir apatinio epidermio buvo statistiškai nereikšminga.



10 pav. Eterinio aliejaus liaukučių skaičius tirtų *Thymus pulegioides* individų lapų viršutiniajame ir apatiniajame epidermyje

Didžiausią vidutinį eterinio aliejaus liaukučių tankį lapo viršutiniame epidermyje turėjo I augavietėje, o apatiniame epidermyje – IV augavietėje augę *T. pulegioides* augalai. Mažiausius vidutinius eterinio aliejaus liaukučių tankius lapo viršutiniame ir apatiniame epidermyje turėjo atitinkamai V ir II augavietėse augę *T. pulegioides* augalai (4 lentelė). Trijose augavietėse (III, IV ir V) augusių *T. pulegioides* individų vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis lapo apatiniame epidermyje buvo didesnis nei viršutiniame (4 lentelė). Atlikta

vienfaktorinė ANOVA analizė parodė, kad pagal vidutinį eterinio aliejaus liaukučių skaičių ploto vienetu tiek viršutiniame, tiek apatiniame epidermyje augavietės skyrėsi statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ). Scheffe testas parodė, kad pagal eterinio aliejaus liaukučių tankį viršutiniajame lapo epidermyje patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi I augavietė nuo III-ios ir V-os augaviečių bei II augavietė nuo V-os augavietės, o apatinėje lapo pusėje nuo visų kitų augaviečių išsiskyrė IV augavietė (4 lentelė). Analizuojant augaviečių skirtumus pagal suminį (viršutiniame ir apatiniame epidermyje kartu paėmus) eterinio aliejaus liaukučių skaičių  $\text{mm}^2$  lapo ploto, gauti panašūs rezultatai: IV augavietė statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo kitų augaviečių, išskyrus I-ąją.

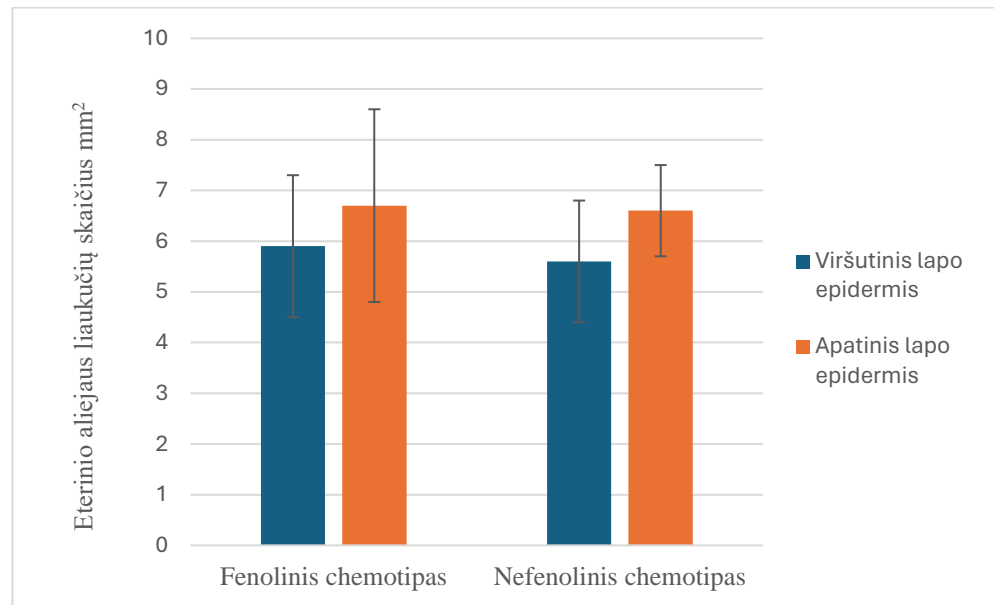
4 lentelė. Vidutinis eterinio aliejaus liaukučių skaičius  $\text{mm}^2$  skirtingose augavietėse augusių *Thymus pulegioides* lapų viršutiniame ir apatiniame epidermyje (skirtingos ir tos pačios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ( $p < 0,05$ ) ir nereikšmingus eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus  $\text{mm}^2$  vidurkių skirtumus tarp augaviečių)

Augavietė	Vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis	
	Lapo viršutinis epidermis	Lapo apatinis epidermis
I	6,5 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	6,4 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
II	6,3 $\pm$ 1,7 <sup>ab</sup>	5,7 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>
III	5,3 $\pm$ 0,8 <sup>ac</sup>	6,6 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>
IV	5,7 $\pm$ 1,3 <sup>bc</sup>	8,7 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>
V	4,8 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	6,02 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>

Lyginant eterinio aliejaus liaukučių tankį skirtingoms chemotipų grupėms priklausančiuose keturbriaunio čiobrelis individuose matyti, kad fenolinių chemotipų grupei priklausančiuose augaluose vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis abiejuose lapo epidermiuose buvo kiek didesnis nei nefenolinių chemotipų augaluose: viršutiniame epidermyje jis didesnis 5 %, o apatiniame – 2 %. (11 pav., priedas nr. 1). Atliktas t-testas parodė, jog pagal vidutinį eterinio aliejaus liaukučių tankį abiejose lapo pusėse skirtumas tarp

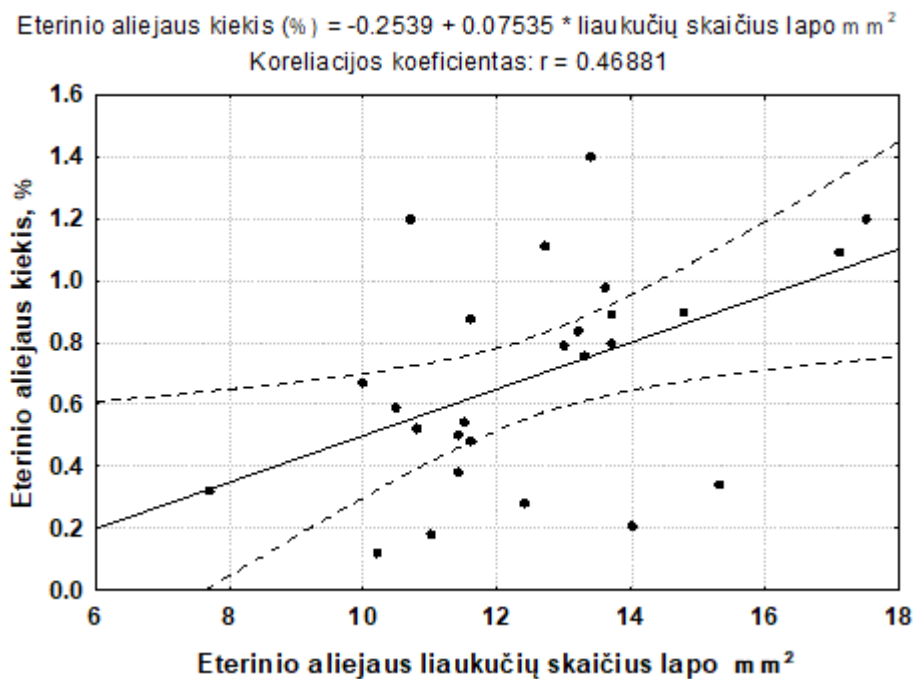


fenoliniams ir nefenoliniams chemotipams priklausančių individų buvo statistiškai nereikšmingas ( $p < 0,05$ ).



11 pav. Eterinio aliejaus liaukučių skaičius skirtingų chemotipų *Thymus pulegioides* lapų viršutiniame ir apatiniame epidermyje

Vertinant sąsajas tarp keturbriaunio čiobrelio suminio (viršutiniame ir apatiniame epidermyje kartu paėmus) eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus  $\text{mm}^2$  lapo ploto ir eterinio aliejaus kiekio taikyta Pirsono (Pearson) tiesinės koreliacijos analizė, kuri parodė, kad tarp šių dviejų rodiklių egzistuoja statistiškai reikšmingas ( $p < 0,05$ ) vidutinio stiprumo teigiamas koreliacijos ryšys ( $r = 0,469$ ) (12 pav.). Analizuojant tuos pačius rodiklius atskirai tarp fenoliniams ir nefenoliniams chemotipams priklausančių *T. pulegioides* individų taikyta Spirmano (Spearman) koreliacijos analizė ir nustatyta statistiškai reikšminga ( $p < 0,05$ ) koreliacija ( $r_s = 0,782$ ) tik fenolinių chemotipų grupėje.

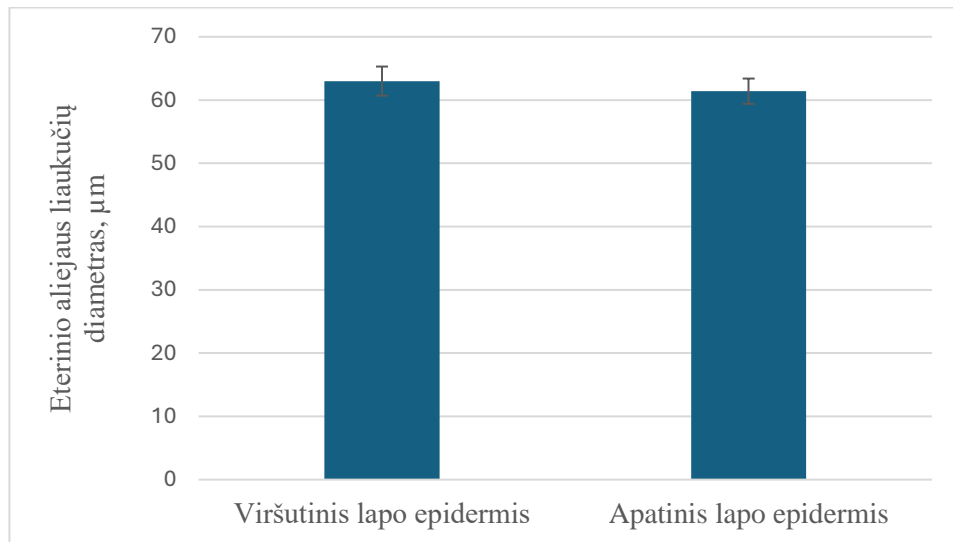


12 pav. Ryšys tarp *Thymus pulegioides* eterinio aliejaus kiekio ir eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus lapo  $mm^2$

### 3.3. *Thymus pulegioides* eterinio aliejaus liaukučių diametro analizė

Tyrimo metu nustatyta, jog, priešingai nei eterinio aliejaus liaukučių tankis, vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras buvo didesnis *T. pulegioides* viršutiniame lapo epidermyje (13 ir 9 pav). Nors vidutiniai eterinio aliejaus liaukučių diametrai abiejuose lapo epidermiuose skyrėsi mažai (viršutiniame epidermyje jis siekė  $63,0 \pm 2,3 \mu m$  (variacijos koeficientas 4 %), o apatiniame vos 3 % mažiau –  $61,4 \pm 2,0 \mu m$  (variacijos koeficientas 3 %)) (13 pav.), atliktas t-testas parodė, jog šis skirtumas buvo statistiškai patikimas ( $p < 0,05$ ). Vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras anksčiau Lietuvoje tirtu keturbriaunio čiobrelis tiek viršutiniame, tiek apatiniame lapo epidermyje buvo tik 1 % didesnis nei buvo nustatytas šiame darbe, o vidutinio eterinio aliejaus liaukučių diametro skirtumai tarp viršutinio ir apatinio lapo epidermio buvo identiški –  $1,6 \mu m$  (61). Kitoje Lietuvoje savaime augančioje *Thymus* genties rūšyje *Thymus serpyllum* ir tarprūšiniame hibride *Thymus \times oblongifolius* vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras viršutiniame lapo epidermyje taip pat buvo didesnis nei apatiniame, atitinkamai  $58,0 \pm 0,6$  ir  $57,3 \pm 0,7 \mu m$  bei  $55,9 \pm 0,4$  ir  $53,1 \pm 0,4 \mu m$  (61). *T. vulgaris* augaluose, užaugintuose Maria Curie-Sklodowska universiteto Botanikos sode (Lublinas, Lenkija), eterinio aliejaus liaukutės taip pat buvo didesnės lapo viršutiniame epidermyje, tačiau vidutinis eterinio aliejaus

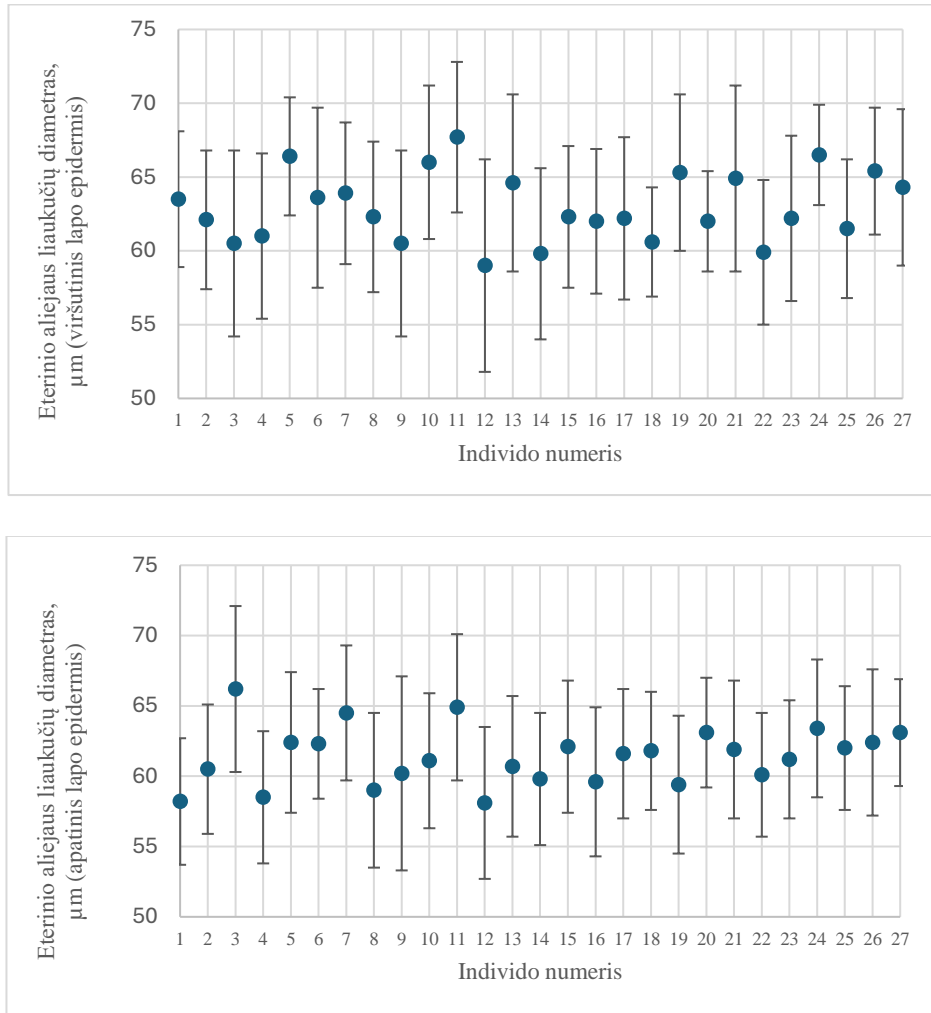
liaukučių diametras viršutiniame ir apatiniame lapo epidermyje buvo atitinkamai 17,03 ir 16,5  $\mu\text{m}$  mažesnis lyginant su šiame darbe tirtais *T. pulegioides* augalais (54).



13 pav. Eterinio aliejaus liaukučių diametras *Thymus pulegioides* lapų viršutiniame bei apatiniame epidermiuose

Lyginant atskirų *T. pulegioides* individų eterinio aliejaus liaukučių diametrą skirtinguose lapo epidermiuose matyti, kad nors 78 % tirtų individų didesnės eterinio aliejaus liaukutės buvo lapo viršutiniame epidermyje, vis tik 5-iuose individuose, kas sudaro 19 %, didesnės liaukutės buvo apatinėje lapo pusėje. Individe nr. 14 eterinio aliejaus liaukučių diametras buvo vienodas abiejuose lapo epidermiuose (14 pav., priedas nr. 2). Iš visų tirtų *T. pulegioides* augalų išsiskyrė individas nr. 12, augęs II augavietėje, kuris tiek viršutiniame, tiek apatiniame lapo epidermyje turėjo mažiausias eterinio aliejaus liaukutes: eterinio aliejaus liaukučių diametras atitinkamai buvo  $59,0 \pm 7,2$  ir  $58,1 \pm 5,4$   $\mu\text{m}$ . Tuo tarpu didžiausias eterinio aliejaus liaukučių diametras viršutinėje ( $67,7 \pm 5,1$   $\mu\text{m}$ ) ir apatinėje ( $66,2 \pm 5,9$   $\mu\text{m}$ ) lapo pusėje buvo nustatytas skirtinguose individuose (atitinkamai individe nr. 11 iš II augavietės ir individe nr. 3 iš I augavietės) (14 pav., priedas nr. 2). Vienfaktorinė ANOVA analizė parodė, jog tiek viršutinėje, tiek apatinėje lapo pusėje eterinio aliejaus liaukučių diametro skirtumas tarp individų buvo statistiškai reikšmingas (atitinkamai  $F = 7,277$  ir  $F = 7,537$ ,  $p < 0,05$ ). Scheffe testas parodė, kad viršutiniame lapo epidermyje individas nr. 5 patikimai išsiskyrė nuo individų nr. 12 ir nr. 14, individas nr. 11 – nuo individų nr. 9, nr. 12 ir nr. 14, o apatiniame epidermyje individas nr. 3 statistiškai reikšmingai išsiskyrė nuo 7-ių individų. Taikant Pirsono (Pearson)

tiesinės koreliacijos analizę statistiškai reikšmingos koreliacijos tarp eterinio aliejaus liaukučių diametro viršutiniame ir apatiniame epidermyje nerasta.



14 pav. Eterinio aliejaus liaukučių diametras tirtų *Thymus pulegioides* individų lapų viršutiniajame ir apatiniajame epidermyje

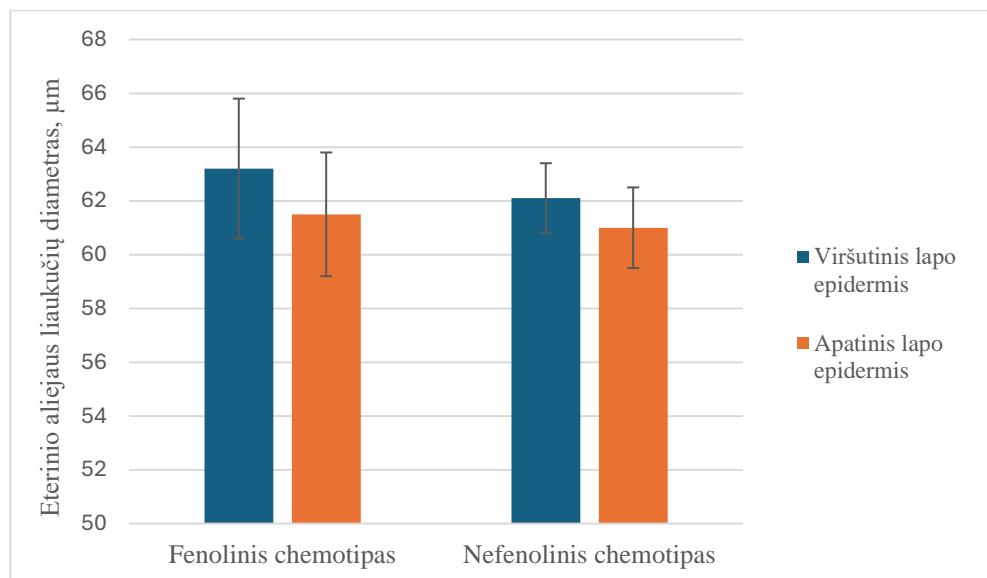
Vienfaktorinė ANOVA analizė parodė, kad keturbriaunio čiobrelis eterinio aliejaus liaukučių vidutinis diametras tiek viršutiniajame, tiek apatiniajame epidermyje statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi tarp augaviečių. Keturbriaunio čiobrelis individai, augę V augavietėje, turėjo didžiausią vidutinį eterinio aliejaus liaukučių diametą viršutiniame bei apatiniame lapo epidermiuose, nors šios augavietės tirtų augalų vidutinis eterinio aliejaus liaukučių skaičius buvo mažiausias tik viršutiniame lapo epidermyje (5 ir 4 lentelės). Atlikus Pirsono koreliacijos analizę, buvo nustatytas statistiškai reikšmingas ( $p < 0,05$ ) vidutinio

stiprumo neigiamas koreliacinis ryšys ( $r = -0,481$ ) tarp eterinio aliejaus liaukučių diametro apatiniame epidermyje ir eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus  $\text{mm}^2$  viršutiniame lapo epidermyje. Mažiausias eterinio aliejaus liaukutes abiejose lapo pusėse turėjo III augavietės individai. Scheffe testas parodė, kad tik III ir V augavietės statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi viena nuo kitos pagal eterinio aliejaus liaukučių diametrą abiejose lapo pusėse (5 lentelė). Visose penkiose augavietėse tirtų *T. pulegioides* individų vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras buvo didesnis viršutiniame lapo epidermyje (5 lentelė).

5 lentelė. Vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras ( $\mu\text{m}$ ) skirtingose augavietėse augusių *Thymus pulegioides* lapų viršutiniame ir apatiniame epidermyje (skirtingos ir tos pačios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ( $p < 0,05$ ) ir nereikšmingus eterinio aliejaus liaukučių diametro vidurkių skirtumus tarp augaviečių)

Augavietė	Vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis	
	Lapo viršutinis epidermis	Lapo apatinis epidermis
I	62,9 $\pm$ 2,1 <sup>ab</sup>	61,4 $\pm$ 3,0 <sup>ab</sup>
II	63,2 $\pm$ 3,3 <sup>ab</sup>	61,3 $\pm$ 2,8 <sup>ab</sup>
III	62,2 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	60,8 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
IV	62,5 $\pm$ 2,5 <sup>ab</sup>	61,3 $\pm$ 1,5 <sup>ab</sup>
V	64,0 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	62,4 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>

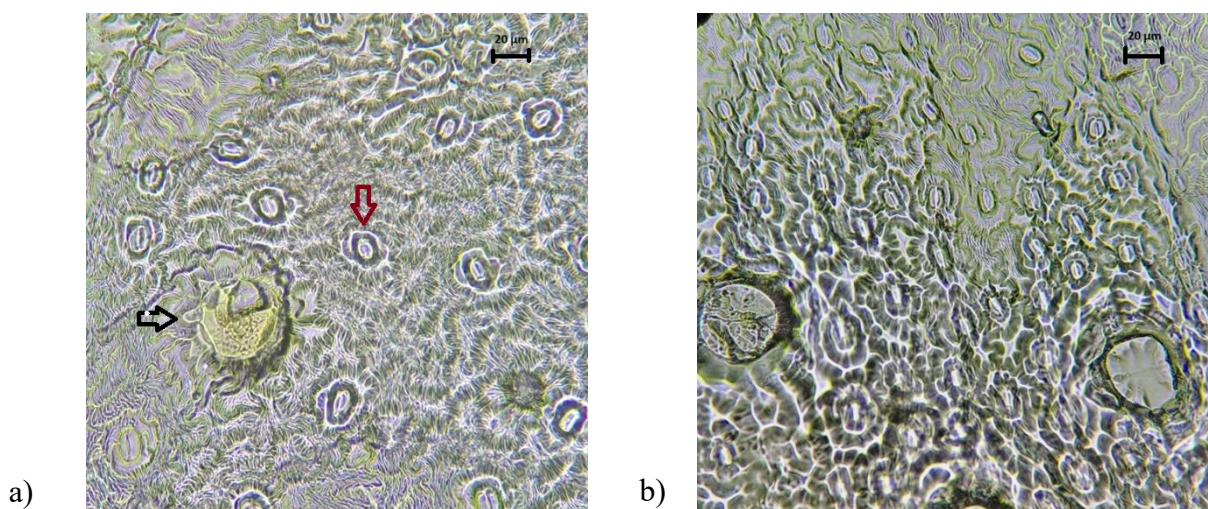
Kaip ir eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus ploto vienetu atveju, didesnis vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras abiejuose lapų epidermiuose buvo nustatytas fenolinių chemotipų grupei priklausančiuose *T. pulegioides* individuose (15 ir 11 pav.). Nors šis skirtumas abiejuose lapų epidermiuose sudarė tik iki 2 %, atliktas t-testas parodė, kad jis buvo statistiškai reikšmingas ( $p < 0,05$ ) (15 pav., priedas nr. 2). Statistiškai reikšmingi koreliaciniai ryšiai tarp eterinio aliejaus kiekio ir eterinio aliejaus liaukučių diametro nenustatyti.



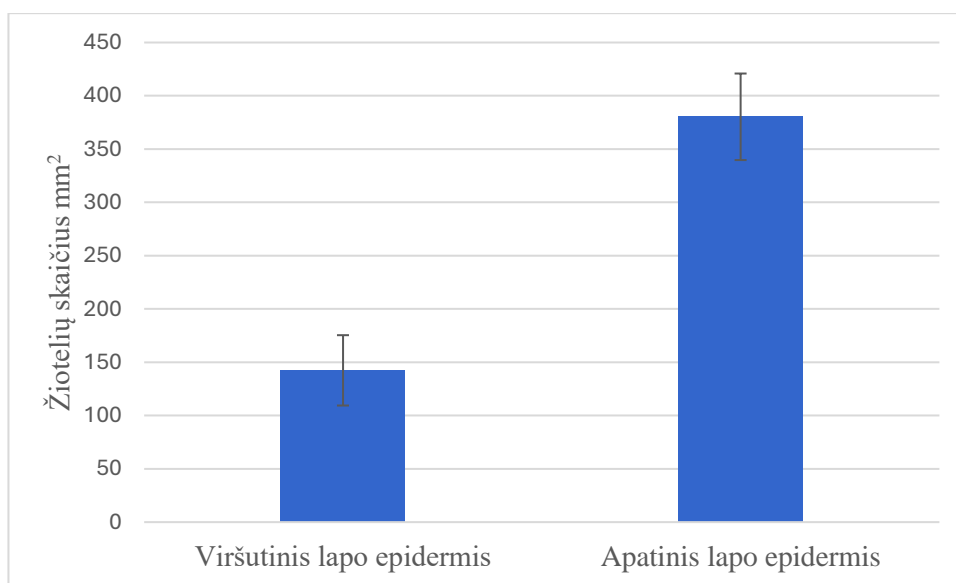
15 pav. Eterinio aliejaus liaukučių diametras skirtingų chemotipų *Thymus pulegioides* lapų viršutiniame ir apatiniame epidermyje

### 3.4. *Thymus pulegioides* žiotelių tankio analizė

Tyrimo metu nustatyta, jog vidutinis žiotelių tankis keturbriaunio čiobrelis apatiniajame lapo epidermyje yra net 3 kartus didesnis nei viršutiniame: apatiniame epidermyje jis buvo lygus  $380,3 \pm 40,6$  žiotelių (variacijos koeficientas 11 %), viršutiniame –  $142,4 \pm 33$  (variacijos koeficientas 23 %) žiotelių  $\text{mm}^2$  (16 ir 17 pav.). Atliktas t-testas parodė, jog vidutinis žiotelių tankis skirtingose lapo pusėse *T. pulegioides* rūšyje statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi. Taip pat rasta teigiama vidutinio stiprumo Pirsono (Pearson) koreliacija ( $r = 0,484$ ) tarp žiotelių tankio viršutiniame ir apatiniame lapo epidermyje. Literatūros duomenimis, Vokietijoje, Anglijoje, Ispanijoje, Portugalijoje, Prancūzijoje, Šveicarijoje, Austrijoje ir Bulgarijoje augusių *T. pulegioides* augaluose vidutinis žiotelių skaičius  $\text{mm}^2$  taip pat buvo didesnis apatiniajame lapo epidermyje (63). Kito Lietuvoje atlikto tyrimo metu buvo tiriamas organinių trąšų poveikis *T. × citriodorus* lapų anatominiams parametrų. Nepriklausomai nuo naudotų trąšų, taip pat ir kontrolinėje grupėje, gauti rezultatai buvo panašūs į šio darbo rezultatus: visose tirtose *T. × citriodorus* augalų grupėse vidutinis žiotelių skaičius  $\text{mm}^2$  buvo mažesnis viršutiniame lapo epidermyje nei apatiniame (10). Viršutinėje lapų pusėje, lyginant su apatine puse, mažesnis vidutinis žiotelių skaičius  $\text{mm}^2$  buvo nustatytas ir kituose Lietuvoje augančiuose *Thymus* genties atstovuose, tokiuose kaip *Thymus × oblongifolius* (atitinkamai  $133,1 \pm 3,2$  ir  $341,2 \pm 5,2$   $\text{mm}^2$ ) ir *Thymus serpyllum* (atitinkamai  $118,4 \pm 4,8$  ir  $180,8 \pm 6,0$   $\text{mm}^2$ ) (61).



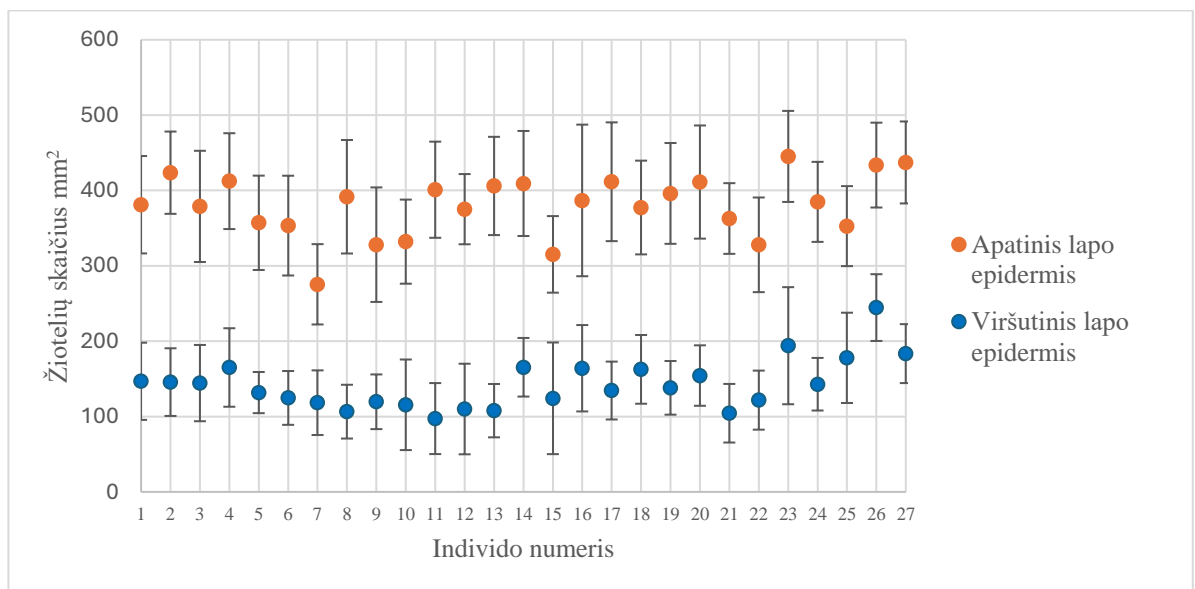
16 pav. Žiotelės viršutiniame (a) ir apatiniame (b) *Thymus pulegioides* lapo epidermyje (juoda rodyklė – eterinio aliejaus liaukutė; raudona rodyklė – žiotelė) (individas nr. 8) (asmeninis archyvas)



17 pav. Žiotelių skaičius *Thymus pulegioides* lapų viršutiniame bei apatiniame epidermiuose

Lyginant žiotelių skaičių abiejuose lapo epidermiuose tarp atskirų individų matyti, kad visi 27 tirti individai turėjo daugiau žiotelių lapo apatiniame epidermyje (18 pav., priedas nr. 3). Mažiausias žiotelių skaičius mm<sup>2</sup> apatinėje lapo pusėje buvo  $275,5 \pm 53,3$  individe nr. 7 (II

augavietė), tuo tarpu tas pats individas (nr. 7) turėjo ir mažiausią eterinio aliejaus liaukučių skaičių abiejuose lapo epidermiuose. Atlikus Pirsono (Pearson) tiesinės koreliacijos analizę, nustatyta statistiškai reikšminga ( $p < 0,05$ ) vidutinio stiprumo teigiama koreliacija ( $r = 0,480$ ) tarp žiotelių tankio ir eterinio aliejaus liaukučių tankio apatinėje lapo pusėje (18 ir 10 pav., priedas nr. 3). Apatinėje lapo pusėje didžiausias žiotelių skaičius  $\text{mm}^2$  buvo  $445,2 \pm 60,4$  (individas nr. 23, V augavietė); tuo tarpu viršutiniame epidermyje mažiausias žiotelių skaičius  $\text{mm}^2$  buvo  $97,3 \pm 47,1$  (individas nr. 11, II augavietė), o didžiausias –  $244,6 \pm 44,3$  (individas nr. 26, V augavietė) (18 pav., priedas nr. 3). Scheffe testas parodė, kad žiotelių tankiu apatiniame lapo epidermyje individas nr. 7 patikimai skyrėsi pagal šį rodiklį net nuo 14-os individų; žiotelių tankiu viršutinėje lapo pusėje nuo visų individų (išskyrus individus nr. 23 ir nr. 25) patikimai išsiskyrė individas nr. 26.



18 pav. Žiotelių tankis tirtų *Thymus pulegioides* individų lapų viršutiniajame ir apatiniajame epidermyje

Didžiausias vidutinis žiotelių tankis tiek viršutiniame, tiek apatiniame lapo epidermyje buvo nustatytas V augavietėje tirtuose *T. pulegioides* individuose, nors vidutinis eterinio aliejaus liaukučių skaičius šioje augavietėje tirtų individų viršutiniame lapo epidermyje buvo mažiausias. Taip pat nustatyta neigiama, nors statistiškai nereikšminga Pirsono (Pearson) koreliacija ( $r = -0,028$ ) tarp abiejų lapo pusių žiotelių skaičiaus sumos ir eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus viršutiniame lapo epidermyje. Mažiausią vidutinį žiotelių skaičių abiejose

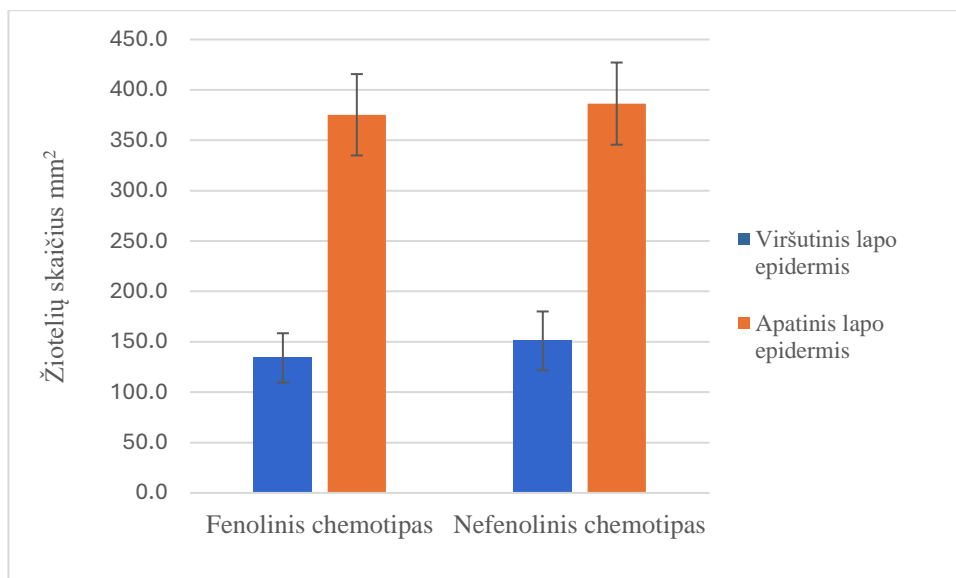


lapo pusėse turėjo II augavietės individai, kurių apatiniame epidermyje buvo mažiausias taip pat ir vidutinis eterinio aliejaus liaukučių skaičius, taip pat nustatyta statistiškai reikšminga ( $p < 0,05$ ) teigiama Pirsono koreliacija ( $r = 0,399$ ) tarp suminio abiejuose lapo epidermiuose esančių žiotelių skaičiaus ir eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus apatiniame epidermyje (6 ir 4 lentelės). Atlikta vienfaktorinė ANOVA analizė parodė, kad pagal vidutinį žiotelių skaičių tiek viršutiniame, tiek apatiniame epidermyje augavietės skyrėsi statistiškai patikimai (atitinkamai  $F = 32,394$  ir  $F = 18,510$ ,  $p < 0,05$ ). Scheffė testas parodė, kad pagal žiotelių tankį viršutiniajame lapo epidermyje bei suminį (viršutiniame ir apatiniame epidermiuose kartu paėmus) žiotelių skaičių  $\text{mm}^2$  lapo plote II ir V augavietės patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo visų kitų augaviečių; tuo tarpu pagal žiotelių tankį apatiniame epidermyje II augavietė statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo visų kitų augaviečių, išskyrus IV-ąją augavietę (6 lentelė).

6 lentelė. Vidutinis žiotelių skaičius  $\text{mm}^2$  skirtingose augavietėse augusių *Thymus pulegioides* lapų viršutiniame ir apatiniame epidermyje (skirtingos ir tos pačios raidės žymi atitinkamai statistiškai reikšmingus ( $p < 0,05$ ) ir nereikšmingus žiotelių tankio vidurkių skirtumus tarp augaviečių)

Augavietė	Vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis	
	Lapo viršutinis epidermis	Lapo apatinis epidermis
I	143,1 $\pm$ 13,9 <sup>a</sup>	384,4 $\pm$ 28,5 <sup>ab</sup>
II	111,2 $\pm$ 8,5 <sup>b</sup>	350,6 $\pm$ 47,6 <sup>b</sup>
III	139,2 $\pm$ 25,2 <sup>a</sup>	385,8 $\pm$ 40,7 <sup>ab</sup>
IV	136,3 $\pm$ 23,7 <sup>a</sup>	375,1 $\pm$ 32,1 <sup>b</sup>
V	188,6 $\pm$ 36,7 <sup>c</sup>	410,7 $\pm$ 40,2 <sup>ab</sup>

Priešingai nei eterinio aliejaus liaukučių tankio atveju, didesnis vidutinis žiotelių tankis abiejuose lapų epidermiuose buvo nustatytas nefenolinių chemotipų grupei priklausančiuose *T. pulegioides* augaluose: viršutiniame epidermyje jis buvo didesnis 13 %, o apatiniame – 3 % (19 ir 11 pav., priedas nr. 3). Atliktas t-testas parodė, kad vidutinis žiotelių tankis tarp fenolinių ir nefenolinių chemotipų grupių statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi tik viršutiniajame epidermyje.



19 pav. Žiotelių tankis skirtingų *Thymus pulegioides* chemotipų lapo viršutiniame ir apatiniame epidermyje

## 4. IŠVADOS

1. *Thymus pulegioides* augalai, tirti Lietuvos vakarinėje dalyje, vidutiniškai buvo sukaukę  $0,60 \pm 0,35$  % eterinio aliejaus, kuris varijavo  $0,12 - 1,4$  % ribose ir tik penktadalyje individų viršijo 1 %. Eterinio aliejaus kiekis fenoliniams chemotipams priklausančiuose individuose ( $0,78 \pm 0,31$  %) statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo eterinio aliejaus kiekio nefenoliniams chemotipams priklausančiuose individuose ( $0,45 \pm 0,36$  %).

2. Eterinio aliejaus liaukučių tankis *T. pulegioides* lapo apatiniame epidermyje buvo didesnis ir statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo tankio lapo viršutiniame epidermyje (atitinkamai  $6,7 \pm 1,6$  ir  $5,8 \pm 1,3$  liaukučių  $\text{mm}^2$ ), tačiau statistiškai patikimas koreliacinis ryšys tarp eterinio aliejaus liaukučių tankio epidermiuose nenustatytas. Fenolinių chemotipų grupei priklausančiuose individuose vidutinis eterinio aliejaus liaukučių tankis tiek lapo viršutiniame, tiek apatiniame epidermyje (atitinkamai  $5,9 \pm 1,4$  ir  $6,7 \pm 1,9$  liaukučių  $\text{mm}^2$ ) buvo didesnis, tačiau reikšmingai nesiskyrė nuo tankio nefenolinių chemotipų individuose (atitinkamai  $5,6 \pm 1,2$  ir  $6,6 \pm 0,9$  liaukučių  $\text{mm}^2$ ). Nustatytas statistiškai reikšmingas teigiamas koreliacijos ryšys ( $r = 0,469$ ,  $p < 0,05$ ) tarp suminio (viršutiniame ir apatiniame epidermyje kartu paėmus) eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus  $\text{mm}^2$  lapo ploto ir eterinio aliejaus kiekio.

3. Eterinio aliejaus liaukučių diametras *T. pulegioides* lapo viršutiniame epidermyje ( $63,0 \pm 2,3$   $\mu\text{m}$ ) buvo didesnis ir statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo diametro apatiniame epidermyje ( $61,4 \pm 2,0$   $\mu\text{m}$ ), bet statistiškai reikšmingas koreliacinis ryšys tarp eterinio aliejaus liaukučių diametro epidermiuose nenustatytas. Fenolinių chemotipų grupei priklausančiuose individuose vidutinis eterinio aliejaus liaukučių diametras tiek lapo viršutiniame, tiek apatiniame epidermyje (atitinkamai  $63,2 \pm 2,6$  ir  $61,5 \pm 2,3$   $\mu\text{m}$ ) buvo didesnis ir statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo diametro nefenolinių chemotipų individuose (atitinkamai  $62,1 \pm 1,3$  ir  $61 \pm 1,5$   $\mu\text{m}$ ). Statistiškai reikšmingo koreliacinio ryšio tarp eterinio aliejaus kiekio ir eterinio aliejaus liaukučių diametro nenustatyta.

4. Žiotelių tankis lapo apatiniame epidermyje buvo 3 kartus didesnis ir patikimai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo tankio viršutiniame epidermyje (atitinkamai  $380,3 \pm 40,6$  ir  $142,4 \pm 33$  žiotelių  $\text{mm}^2$ ); tarp žiotelių tankio epidermiuose nustatytas patikimas teigiamas koreliacinis ryšys ( $r = 0,484$ ,  $p < 0,05$ ). Abiejuose lapo epidermiuose žiotelių tankis buvo didesnis nefenolinių chemotipų individuose. Tarp žiotelių tankio ir eterinio aliejaus kiekio koreliacinis ryšys nebuvo nustatytas, tačiau nustatytas statistiškai reikšmingas koreliacinis ryšys tarp

suminio žiotelių skaičiaus lapo mm<sup>2</sup> ir eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus apatiniame epidermyje ( $r = 0,399$ ,  $p < 0,05$ ) rodo galimą netiesioginę žiotelių kiekio lapo ploto vienetė įtaką eterinio aliejaus sintezei ir/ar jo kaupimuisi *T. pulegioides* augaluose.

## 5. REKOMENDACIJOS

Norint iš *T. pulegioides* išskirti daugiau eterinio aliejaus, tikslinga rinkti fenoliniams chemotipams priklausančius individus, kadangi juose susikaupia daugiau eterinio aliejaus, o jo sudėtyje, kaip žinoma, yra farmakologiškai vertingo junginio – timolio. Fenolinių chemotipų augaluose nustatytas reikšmingas koreliacinis ryšys tarp suminio (viršutiniame ir apatiniame epidermyje kartu paėmus) eterinio aliejaus liaukučių skaičiaus mm<sup>2</sup> lapo ploto ir eterinio aliejaus kiekio rodo, kad daugiau eterinio aliejaus sukaupiančius šių chemotipų individus nuo kitų būtų galima atskirti greitesniu ir pigesniu eterinio aliejaus liaukučių mikroskopavimo būdu.

## 6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Taghouti M, Martins-Gomes C, Schäfer J, Félix LM, Santos JA, Bunzel M, et al. *Thymus pulegioides* L. as a rich source of antioxidant, anti-proliferative and neuroprotective phenolic compounds. *Food Funct.* 2018 Jul 17;9(7):3617–29.
2. Ložienė K, Vaičiulytė V. Geraniol and Carvacrol in Essential Oil Bearing *Thymus pulegioides*: Distribution in Natural Habitats and Phytotoxic Effect. *Molecules.* 2022 Jan;27(3):986.
3. čiobrelis [Internete]. [žiūrėta 2023-10-14]. Internetinė prieiga: <https://www.vle.lt/straipsnis/ciobrelis/>
4. Jianu C, Rusu LC, Muntean I, Cocan I, Lukinich-Gruia AT, Goleț I, et al. In Vitro and In Silico Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Potential of *Thymus pulegioides* Essential Oil. *Antioxidants.* 2022 Dec;11(12):2472.
5. Vaičiulytė V, Ložienė K, Taraškevičius R. Impact of Edaphic and Climatic Factors on *Thymus pulegioides* Essential Oil Composition and Potential Prevalence of Chemotypes. *Plants Basel Switz.* 2022 Sep 27;11(19):2536.
6. Wester P, Möselers BM, Knöss W. Intra-population terpene polymorphism of *Thymus pulegioides* L.: Evidence for seven chemotypes in a German limestone grassland. *Biochem Syst Ecol.* 2020 Dec 1;93:104173.
7. Radusiene J, Janulis V. [Improvement of diversity, trade and conservation of medicinal and aromatic plants]. *Med Kaunas Lith.* 2004;40(8):705–9.
8. Huchelmann A, Boutry M, Hachez C. Plant Glandular Trichomes: Natural Cell Factories of High Biotechnological Interest. *Plant Physiol.* 2017 Sep 1;175(1):6–22.
9. Minarchenko V, Tymchenko I, Glushchenko L, Pidchenko V. Comparative morphological studies of raw parts of the most common species of in Ukraine. *Eur Pharm J.* 2020 Jan 1;67(1):38–45.
10. Vaičiulytė V, Ložienė K, Sivicka I. Effect of Organic Matter Fertilizers on the Composition of Volatiles, Morphometrical and Anatomical Parameters of Essential Oil-

- Bearing *Thymus × citriodorus* Cultivated in an Open Field Conditions. Horticulturae. 2022 Oct;8(10):917.
11. Karpiński TM. Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals. Biomolecules. 2020 Jan;10(1):103.
  12. Alosaimi AA. Petiole anatomy of selected species in family Lamiaceae and its systematic relevance. Flora. 2023 Sep 1;306:152367.
  13. notreliniai [Internet]. [žiūrėta 2023-11-14]. Internetinė prieiga: <https://www.vle.lt/straipsnis/notreliniai/>
  14. Snieškienė V, Stankevičienė A, Ragažinskienė O. Notrelinių (Lamiaceae Lindl.) šeimos prieskoninių augalų ligos VDU Kauno botanikos sode. 2014;
  15. Karaca M, Ince AG, Elmasulu S. CHEMICAL COMPOSITIONS OF VOLATILE AND NONVOLATILE SECONDARY METABOLITES IN THYME (*THYMUS* L.). In 2022. p. 3–52.
  16. 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. Food Chem. 2015 Apr 15;173:339–47.
  17. Sostaric I, Liber Z, Grdisa M, Marin PD, Dajic Stevanovic Z, Satovic Z. Genetic diversity and relationships among species of the genus *Thymus* L. (section *Serpyllum*). Flora - Morphol Distrib Funct Ecol Plants. 2012 Sep 1;207(9):654–61.
  18. Stahl-Biskup E, editor. Thyme: the genus *thymus*. 1. publ. London: Taylor & Francis; 2002. 330 p. (Medicinal and aromatic plants - industrial profiles).
  19. Radoni A, Masteli J. Essential Oil and Glycosidically Bound Volatiles of *Thymus pulegioides* L. growing Wild in Croatia. Croat Chem Acta. 2008;
  20. Lekavičius A. Vadovas augalams pažinti. Mokslas; 1989. 436 p.
  21. Čiobreliai (*Thymus*) - VU Botanikos sodas [Internet]. [žiūrėta 2023-11-20]. Internetinė prieiga: <https://www.botanikos-sodas.vu.lt/puslapiai/augal%C5%B3-gentys/%C4%8Diobreliai>

22. Plants of the World Online [Internet]. [žiūrėta 2023-11-20]. *Thymus pulegioides* L. | Plants of the World Online | Kew Science. Internetinė prieiga: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:461562-1>
23. Vaičiulytė V, Ložienė 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.
24. 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.
25. Afonso AF, Pereira OR, Válega M, Silva AMS, Cardoso SM. Metabolites and Biological Activities of *Thymus zygis*, *Thymus pulegioides*, and *Thymus fragrantissimus* Grown under Organic Cultivation. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem* [Internet]. 2018 Jul [žiūrėta 2023 11-21];23(7). Internetinė prieiga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6099726/>
26. Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir-Knežević S. Antioxidant and Anticholinesterase Potential of Six *Thymus* Species. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM* [Internet]. 2015 [žiūrėta 2023-11-21];2015. Internetinė prieiga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4553186/>
27. VVKT - Vaistai [Internet]. [žiūrėta 2023-11-21]. Internetinė prieiga: <https://vapris.vvkt.lt/vvkt-web/public/medications?showData=true&mainSearchField=thymus+&fullName=&substance=&strength=&pharmaceuticalForm=&medicationState=3&medicationState=2&atcCode=&rtt=&rttNumber=&procedureNumber=>
28. Wild thyme - European Pharmacopoeia 11.5 [Internet]. [žiūrėta 2024-01-02]. Internetinė prieiga: <https://pheur.edqm.eu/app/11-5/content/11-5/1891E.htm?highlight=on&terms=thyme>
29. Thyme - European Pharmacopoeia 11.5 [Internet]. [žiūrėta 2024-01-02]. internetinė prieiga: <https://pheur.edqm.eu/app/11-5/content/11-5/0865E.htm?highlight=on&terms=thyme>



30. Radulovic NS, Blagojevic PD, Stojanovic-Radic ZZ, Stojanovic NM. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Curr Med Chem*. 20(7):932–52.
31. Conde-Hernández LA, Espinosa-Victoria JR, Trejo A, Guerrero-Beltrán JÁ. CO<sub>2</sub>-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *J Food Eng*. 2017 May 1;200:81–6.
32. Ložienė K. Selection of fecund and chemically valuable clones of thyme (*Thymus*) species growing wild in Lithuania. *Ind Crops Prod*. 2009 Mar 1;29(2):502–8.
33. Mockute D, Bernotiene G. The  $\alpha$ -terpenyl acetate chemotype of essential oil of *Thymus pulegioides* L. *Biochem Syst Ecol*. 2001 Jan 1;29(1):69–76.
34. Kameníková M, Fialová S, Ťažký A, Čičová I. Polyphenolic compounds and essential oil analysis of selected species of the genus *Thymus* / Analýza fenolových zložiek a analýza silice vybraných druhov rodu *Thymus*. *Eur Pharm J*. 2015 Jun 1;62(s9):12–7.
35. Martino LD, Bruno M, Formisano C, Feo VD, 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 12;14(11):4614–24.
36. Pluhár Z, Kocsis M, Kuczmog A, Csete S, Simkó H, Sárosi S, et al. Essential oil composition and preliminary molecular study of four Hungarian *Thymus* species. *Acta Biol Hung*. 2012 Mar 1;63:81–96.
37. Pavel M, MIHAILO R, TATJANA S. Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: Chemical composition and antimicrobial activity. *J Serbian Chem Soc*. 2010 Jan 1;75.
38. Ibrahim MH, Papajani V, Zeljkovic SC, Matevski V. Essential Oil Analysis of Two *Thymus* spp. Growing Wild in Kosovo. *J Essent Oil Bear Plants* [Internet]. 2014 Sep 3 [žiūrėta 2023-12-09]; Internetinė prieiga: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2014.884773>

39. Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol.* 2006;55(10):1367–73.
40. Ložienė K, Venskutonis PR. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochem Syst Ecol.* 2005 May 1;33(5):517–25.
41. Baser KHC, Buchbauer G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications.* CRC Press; 2009. 994 p.
42. Ložienė K, Venskutonis PR, Šipailienė A, Labokas J. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chem.* 2007 Jan 1;103(2):546–59.
43. Máthé Á, Máthé I. Quality assurance of cultivated and gathered medicinal plants. *Acta Hortic.* 2008 Jan 1;765:67–76.
44. 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 Mar 1;31(3):249–59.
45. Mockute D, Bernotiene G. Five Chemotypes of the Essential Oils of *Thymus pulegioides* L. Growing Wild in Lithuania. *J Essent Oil Bear Plants.* 2013 Mar 12;6:139–47.
46. Castelani L, Pfrimer K, Giglioti R, van Cleef EHCB, Salles MSV, Júnior LCR. Effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil supplementation on the microbiological quality of raw milk of lactating dairy cows. *Res Vet Sci.* 2023 Aug 1;161:118–21.
47. Shanaida M, Hudz N, Białoń M, Kryvtsowa M, Svydenko L, Filipaska A, et al. Chromatographic profiles and antimicrobial activity of the essential oils obtained from some species and cultivars of the *Menthaeae* tribe (Lamiaceae). *Saudi J Biol Sci.* 2021 Nov 1;28(11):6145–52.
48. Asbahani AE, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int J Pharm.* 2015 Apr 10;483(1):220–43.

49. Katekar VP, Rao AB, Sardeshpande VR. A hydrodistillation-based essential oils extraction: A quest for the most effective and cleaner technology. *Sustain Chem Pharm.* 2023 Dec 1;36:101270.
50. Oreopoulou A, Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Chapter 15 - Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. In: Watson RR, editor. *Polyphenols in Plants (Second Edition)* [Internet]. Academic Press; 2019 [žiūrėta 2023-12-12]. p. 243–59. Internetinė prieiga: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128137680000256>
51. Samadi M, Abidin Z, Yunus R, Radiah D, Yoshida H, Lok E. Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil. *Chin J Chem Eng.* 2016 Sep 1;25.
52. Subramanian P, Anandharamakrishnan C. Chapter two - Extraction of bioactive compounds. In: Anandharamakrishnan C, Subramanian P, editors. *Industrial Application of Functional Foods, Ingredients and Nutraceuticals* [Internet]. Academic Press; 2023 [žiūrėta 2023-12-12]. p. 45–87. Internetinė prieiga: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128243121000029>
53. Vičkačkaitė V. Ekstrakciniai mėginio paruošimo dujų chromatografinėi analizei metodai.
54. Kowalski R, Kowalska G, Jankowska M, Agnieszka N, Kałwa K, Pankiewicz U, et al. Secretory structures and essential oil composition of selected industrial species of Lamiaceae. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus Ograd.* 2019 Apr 12;18:53–69.
55. Marques NT, Filipe A, Pinto P, Barroso J, Trindade H, Power DM, et al. Trichome Density in Relation to Volatiles Emission and 1,8-Cineole Synthase Gene Expression in *Thymus albicans* Vegetative and Reproductive Organs. *Chem Biodivers.* 2020 Mar;17(3):e1900669.
56. Shimazaki K ichiro, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434>. *Annual Reviews*; 2007 [žiūrėta 2023-12-19]. Light Regulation of Stomatal Movement. Internetinė prieiga: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434>

57. Daszkowska-Golec A, Szarejko I. Open or Close the Gate – Stomata Action Under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions. *Front Plant Sci.* 2013 May 13;4:138.
58. žiotelė [Internet]. [cited 2023-12-19]. Internetinė prieiga: <https://www.vle.lt/straipsnis/zioтеле/>
59. Melotto M, Underwood W, He SY. Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annu Rev Phytopathol.* 2008;46:101–22.
60. Lee HC. Chapter 7 - Calcium Signaling Mediated by Cyclic ADP-Ribose and NAADP: Roles in Cellular Response to Stress. In: Storey KB, Storey JM, editors. *Cell and Molecular Response to Stress* [Internet]. Elsevier; 2002 [žiūrėta 2023-12-20]. p. 91–104. (Sensing, Signaling and Cell Adaptation; vol. 3). Internetinė prieiga: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568125402800092>
61. 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 28;51(1–2):85–97.
62. Majdi M, Malekzadeh-Mashhady A, Maroufi A, Crocoll C. Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with thymol/carvacrol biosynthesis in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors. *Plant Physiol Biochem.* 2017 Jun 1;115:152–62.
63. Kaleva K. Notes on some epidermal characteristics in *Thymus* L. (Labiatae). *Ann Bot Fenn.* 1967;4(1):95–101.

## 6. PRIEDAI

Priedas nr. 1. Eterinio aliejaus liaukučių tankis tirtų *Thymus pulegioides* individų lapų viršutiniame bei apatiniame epidermyje

Indi- vido Nr.	Che- moti- pas	Eterinio aliejaus liaukučių skaičius mm <sup>2</sup>					
		Viršutinis lapo epidermis			Apatinis lapo epidermis		
		Vid. ± SN	Min. – Maks.	V, %	Vid. ± SN	Min. – Maks.	V, %
1	F	6,1 ± 4,2	0,0 – 15,3	69	6,6 ± 4,3	0,0 – 15,3	65
2	F	7,2 ± 4,4	0,0 – 15,3	61	6,4 ± 5,4	0,0 – 20,4	84
3	F	4,2 ± 3,9	0,0 – 10,2	93	6,8 ± 5,1	0,0 – 17,9	75
4	F	7,8 ± 4,9	0,0 – 20,4	63	5,4 ± 3,7	0,0 – 15,3	69
5	F	7,5 ± 4,4	0,0 – 15,3	57	6,2 ± 4,2	0,0 – 15,3	68
6	F	6,3 ± 4,1	0,0 – 10,2	65	7,0 ± 4,2	0,0 – 15,3	60
7	F	3,4 ± 3,4	0,0 – 10,2	100	4,3 ± 3,0	0,0 – 10,2	70
8	N	7,7 ± 4,7	0,0 – 15,3	61	7,6 ± 4,7	0,0 – 20,4	62
9	F	6,9 ± 4,2	0,0 – 17,9	61	4,6 ± 3,9	0,0 – 15,3	85
10	F	5,3 ± 4,2	0,0 – 15,3	79	4,7 ± 3,9	0,0 – 12,8	83
11	F	7,5 ± 4,6	0,0 – 15,3	61	7,3 ± 3,9	0,0 – 15,3	53
12	F	7,2 ± 4,7	0,0 – 15,3	65	5,8 ± 4,0	0,0 – 15,3	69
13	F	4,7 ± 4,2	0,0 – 15,3	89	6,7 ± 4,4	0,0 – 20,4	66
14	N	4,8 ± 3,1	0,0 – 10,2	65	6,8 ± 4,4	0,0 – 20,4	65
15	N	5,1 ± 3,8	0,0 – 15,3	75	5,1 ± 4,1	0,0 – 15,3	80
16	N	6,7 ± 4,3	0,0 – 15,3	64	7,3 ± 4,0	0,0 – 17,9	55
17	N	5,1 ± 3,5	0,0 – 12,8	69	7,3 ± 4,9	0,0 – 20,4	67
18	F	6,0 ± 4,3	0,0 – 10,2	72	7,7 ± 4,4	0,0 – 15,3	57
19	F	6,2 ± 4,1	0,0 – 15,3	66	10,9 ± 6,5	0,0 – 25,5	60
20	F	5,6 ± 4,3	0,0 – 15,3	77	11,9 ± 6,1	0,0 – 25,5	51
21	F	3,7 ± 3,5	0,0 – 10,2	95	6,8 ± 5,1	0,0 – 17,9	75
22	F	7,2 ± 4,5	0,0 – 15,3	63	6,2 ± 3,7	0,0 – 15,3	60
23	F	4,4 ± 3,9	0,0 – 15,3	89	6,4 ± 4,3	0,0 – 15,3	67

24	F	5,4 ± 4,6	0,0 – 15,3	85	6,2 ± 4,4	0,0 – 20,4	71
25	N	5,4 ± 3,9	0,0 – 10,2	72	6,0 ± 4,1	0,0 – 15,3	68
26	**	4,3 ± 3,0	0,0 – 10,2	70	6,0 ± 3,6	0,0 – 15,3	60
27	N	4,3 ± 3,2	0,0 – 12,8	74	6,4 ± 3,6	0,0 – 15,3	56

*Vid.* – vidurkis; *SN* – standartinis nuokrypis; *Min.* – minimali reikšmė; *Maks.* – maksimali reikšmė; *V* – variacijos koeficientas; \*\* – dėl mažo eterinio aliejaus kiekio chemotipas nenustatytas.

*Priedas nr. 2. Eterinio aliejaus liaukučių diametras tirtų Thymus pulegioides individų lapų viršutiniame bei apatiniame epidermyje*

Indi- vido Nr.	Che- moti- pas	Eterinio aliejaus liaukučių diametras, μm					
		Viršutinis lapo epidermis			Apatinis lapo epidermis		
		Vid. ± SN	Min. – Maks.	V, %	Vid. ± SN	Min. – Maks.	V, %
1	F	63,5 ± 4,6	55,0 – 77,5	7	58,2 ± 4,5	50,0 – 70,0	8
2	F	62,1 ± 4,7	55,0 – 75,0	8	60,5 ± 4,6	50,0 – 72,5	8
3	F	60,5 ± 6,3	52,5 – 72,5	10	66,2 ± 5,9	55,0 – 75,0	9
4	F	61,0 ± 5,6	47,5 – 75,0	9	58,5 ± 4,7	45,0 – 65,0	8
5	F	66,4 ± 4,0	57,5 – 75,0	6	62,4 ± 5,0	50,0 – 72,5	8
6	F	63,6 ± 6,1	50,0 – 77,5	10	62,3 ± 3,9	52,5 – 70,0	6
7	F	63,9 ± 4,8	50,0 – 70,0	8	64,5 ± 4,8	50,0 – 72,5	7
8	N	62,3 ± 5,1	50,0 – 72,5	8	59,0 ± 5,5	47,5 – 75,0	9
9	F	60,5 ± 6,3	45,0 – 72,5	10	60,2 ± 6,9	47,5 – 72,5	11
10	F	66,0 ± 5,2	57,5 – 87,5	8	61,1 ± 4,8	52,5 – 70,0	8
11	F	67,7 ± 5,1	57,5 – 80,0	8	64,9 ± 5,2	50,0 – 75,0	8
12	F	59,0 ± 7,2	45,0 – 80,0	12	58,1 ± 5,4	47,5 – 67,5	9
13	F	64,6 ± 6,0	50,0 – 77,5	9	60,7 ± 5,0	47,5 – 70,0	8
14	N	59,8 ± 5,8	37,5 – 70,0	10	59,8 ± 4,7	50,0 – 72,5	8
15	N	62,3 ± 4,8	47,5 – 70,0	8	62,1 ± 4,7	50,0 – 72,5	8
16	N	62,0 ± 4,9	50,0 – 72,5	8	59,6 ± 5,3	47,5 – 72,5	9

17	N	62,2 ± 5,5	50,0 – 72,5	9	61,6 ± 4,6	50,0 – 72,5	7
18	F	60,6 ± 3,7	55,0 – 67,5	6	61,8 ± 4,2	52,5 – 67,5	7
19	F	65,3 ± 5,3	50,0 – 82,5	8	59,4 ± 4,9	47,5 – 67,5	8
20	F	62,0 ± 3,4	52,5 – 67,5	5	63,1 ± 3,9	55,0 – 72,5	6
21	F	64,9 ± 6,3	57,5 – 82,5	10	61,9 ± 4,9	52,5 – 72,5	8
22	F	59,9 ± 4,9	52,5 – 70,0	8	60,1 ± 4,4	50,0 – 67,5	7
23	F	62,2 ± 5,6	50,0 – 72,5	9	61,2 ± 4,2	50,0 – 67,5	7
24	F	66,5 ± 3,4	60,0 – 75,0	5	63,4 ± 4,9	50,0 – 70,0	8
25	N	61,5 ± 4,7	50,0 – 67,5	8	62,0 ± 4,4	50,0 – 72,5	7
26	**	65,4 ± 4,3	55,0 – 75,0	7	62,4 ± 5,2	50,0 – 72,5	8
27	N	64,3 ± 5,3	50,0 – 72,5	8	63,1 ± 3,8	55,0 – 72,5	6

*Vid.* – vidurkis; *SN* – standartinis nuokrypis; *Min.* – minimali reikšmė; *Maks.* – maksimali reikšmė; *V* – variacijos koeficientas; \*\* – dėl mažo eterinio aliejaus kiekio chemotipas nenustatytas.

*Priedas nr. 3. Žiotelių tankis tirtų Thymus pulegioides individų lapų viršutiniame bei apatiniame epidermyje*

Indi- vido Nr.	Che- moti- pas	Žiotelių skaičius mm <sup>2</sup>					
		Viršutinis lapo epidermis			Apatinis lapo epidermis		
		Vid. ± SN	Min. – Maks.	V, %	Vid. ± SN	Min. – Maks.	V, %
1	F	146,8 ± 51,2	30,6 – 255,1	35	381,1 ± 64,6	224,5 – 520,4	17
2	F	145,7 ± 44,9	51,0 – 239,8	31	423,6 ± 54,6	295,9 – 530,6	13
3	F	144,4 ± 50,6	61,2 – 244,9	35	378,9 ± 73,8	250,0 – 525,5	19
4	F	165,1 ± 52,1	71,4 – 306,1	32	412,4 ± 63,6	290,8 – 540,8	15
5	F	131,8 ± 27,3	76,5 – 199,0	21	357,1 ± 62,6	234,7 – 479,6	18
6	F	124,7 ± 35,7	51,0 – 188,8	29	353,4 ± 66,2	234,7 – 479,6	19
7	F	118,4 ± 42,9	45,9 – 229,6	36	275,5 ± 53,3	183,7 – 413,3	19
8	N	106,5 ± 35,7	40,8 – 173,5	34	391,7 ± 75,3	260,2 – 612,2	19
9	F	119,6 ± 36,3	51,0 – 234,7	30	328,1 ± 76,0	173,5 – 469,4	23

<b>10</b>	F	115,6 ± 60,1	5,1 – 285,7	52	332,1 ± 55,8	229,6 – 428,6	17
<b>11</b>	F	97,3 ± 47,1	30,6 – 204,1	48	401 ± 63,8	255,1 – 540,8	16
<b>12</b>	F	110 ± 60,1	15,3 – 280,6	55	375,2 ± 46,6	295,9 – 454,1	12
<b>13</b>	F	107,8 ± 35,4	35,7 – 209,2	33	406 ± 65,2	265,3 – 566,3	16
<b>14</b>	N	165,4 ± 38,9	81,6 – 244,9	24	409,3 ± 69,7	255,1 – 530,6	17
<b>15</b>	N	124,2 ± 74,1	45,9 – 362,2	60	315,2 ± 50,8	219,4 – 433,7	16
<b>16</b>	N	164,1 ± 57,3	61,2 – 321,4	35	386,8 ± 100,6	193,9 – 607,1	26
<b>17</b>	N	134,5 ± 38,4	51,0 – 244,9	29	411,6 ± 78,8	234,7 – 571,4	19
<b>18</b>	F	162,6 ± 45,6	76,5 – 255,1	28	377,4 ± 62,2	244,9 – 535,7	16
<b>19</b>	F	138,1 ± 35,6	76,5 – 193,9	26	396,1 ± 66,9	260,2 – 530,6	17
<b>20</b>	F	154,4 ± 40,1	45,9 – 234,7	26	411,2 ± 75,1	244,9 – 556,1	18
<b>21</b>	F	104,4 ± 38,9	35,7 – 173,5	37	362,8 ± 46,9	244,9 – 469,4	13
<b>22</b>	F	121,8 ± 39,2	51,0 – 199,0	32	327,9 ± 62,8	239,8 – 459,2	19
<b>23</b>	F	194 ± 77,7	71,4 – 408,2	40	445,2 ± 60,4	316,3 – 561,2	14
<b>24</b>	F	142,9 ± 34,9	76,5 – 204,1	24	384,9 ± 53,1	285,7 – 500,0	14
<b>25</b>	N	177,9 ± 59,9	51,0 – 316,3	34	352,7 ± 53,1	270,4 – 474,5	15
<b>26</b>	**	244,6 ± 44,3	158,2 – 311,2	18	433,7 ± 56,3	357,1 – 556,1	13
<b>27</b>	N	183,5 ± 39,1	91,8 – 239,8	21	437,2 ± 54,4	306,1 – 540,8	12

*Vid.* – vidurkis; *SN* – standartinis nuokrypis; *Min.* – minimali reikšmė; *Maks.* – maksimali reikšmė; *V* – variacijos koeficientas; \*\* – dėl mažo eterinio aliejaus kiekio chemotipas nenustatytas.