Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu

Olga Zofia Wardziak

Środowiskowe i rozwojowe uwarunkowania zmienności marzanki wonnej *Galium odoratum* (L.) Scop.

Autoreferat pracy doktorskiej

Praca wykonana pod kierunkiem
dr hab. Ewy Osińskiej (prof. nadzw. SGGW)
w Katedrze Roślin Warzywnych i Leczniczych

Recenzenci
prof. dr hab. Zenon Węglarz
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

prof. dr hab. Jan Dyduch
Wydział Ogrodniczy
Katedra Warzywnictwa i Roślin Leczniczych
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Warszawa, 2010

WSTĘP I CEL PRACY

Marzanka wonna *Galium odoratum* (L.) Scop. jest rośliną leczniczą. Jej aktywność farmakologiczna związana jest głównie z zawartymi w zielu kumarynami. Ziele marzanki wonnej pozyskuje się wyłącznie z roślin występujących na stanowiskach naturalnych. Roślina ta, ze względów klimatycznych, jak i nie zawsze racjonalnej gospodarki leśnej zagrożona jest wyginięciem. Dlatego też objęta została ustawową ochroną gatunkową.
Skuteczną metodą ochrony marzanki wonnej występującej w środowisku leśnym wydaje się być wprowadzanie jej do uprawy. Wymaga to jednak podjęcia badań dotyczących między innymi zmienności wewnątrzgatunkowej i rozwoju roślin, w tym mechanizmów reprodukcji, wpływu czynników środowiska na rozwój, a także dynamiki gromadzenia się w roślinie związków biologicznie czynnych.
W niniejszej pracy skoncentrowano się głównie na:

- określeniu zakresu zróżnicowana siedliskowego, genetycznego i chemicznego dziko rosnących populacji marzanki wonnej, występujących w wybranych rejonach Polski,
- prześledzeniu międzypopulacyjnego zróżnicowania cech morfologiczno-rozwojowych, określeniu skali zmienności tych cech u roślin ze stanowisk naturalnych i z uprawy,
- określeniu zawartości i składu chemicznego wybranych grup związków biologicznie czynnych podczas rozwoju ontogenetycznego roślin na stanowiskach naturalnych i w uprawie,
- określeniu wpływu wybranych czynników agrotechnicznych na plon i skład chemiczny ziela marzanki,
- określeniu optymalnych metod ekstrakcji ziela marzanki oraz oznaczeniu aktywności przeciwutleniającej uzyskanych ekstraktów.

MATERIAŁY I METODY

Przeprowadzone badania obejmowały trzyletni cykl (2005-2008) doświadczeń terenowych, polowych i laboratoryjnych, i dotyczyły:

- badań terenowych populacji marzanki wonnej,
- analizy rozwojowej i fitochemicznej wybranych populacji w warunkach naturalnych i uprawowych,
- oceny efektywności generatywnego i wegetatywnego rozmnażania tego gatunku,
- oceny wpływu wybranych czynników środowiskowych i uprawowych na plon i skład chemiczny surowca,
- oceny wpływu warunków ekstrakcji na skład chemiczny uzyskanych ekstraktów,
- oceny aktywności przeciwutleniającej ekstraktów.

1. Badania terenowe

Wybór stanowisk

Jako obszary badań wybrano 2 regiony Polski, należące do ważniejszych pod względem różnorodności i zasobności stanowisk naturalnych *Galium odoratum* (rys. 1).

Rys. 1. Obszar badań terenowych

Analiza fitosocjologiczna zbiorowisk roślinnych

Na wybranych do badań obszarach, na bazie danych florystycznych wytypowano 20 stanowisk naturalnych marzanki wonnej. Dokładna lokalizacja stanowisk była możliwa dzięki odbiornikowi GPS (Global Positioning System) firmy Philips. Obserwacje wykonywano wiosną, latem i jesienią przez dwa okresy wegetacyjne roślin. Powierzchnię zdjęć fitosocjologicznych wybierano w sposób subiektywny (próba tendencyjna), tzn. opisywano zbiorowiska roślinne charakteryzujące się znaczącym udziałem marzanki wonnej (Zaręba 1988). Spisując gatunki zastosowano skalę ilościowości i towarzyskości wg Brauna-Blanqueta (1964). Poszczególne gatunki przyporządkowano do odpowiadających im jednostek syntaksonomicznych (Matuszkiewicz 2001). Zdjęcia zestawiono w jedną tabelę zbiorczą i poddano klasyfikacji numerycznej, co ułatwiło interpretację porządkowanych obiektów. W pracy zastosowano metodę aglomeracyjną. W celu wyróżnienia jednorodnych florystycznie grup zbiorowisk, uporządkowane dane wprowadzono do programu SPSS, a wyniki przedstawiono graficznie w postaci dendrogramu, będącego obrazem podobieństw pomiędzy zdjęciami fitosocjologicznymi. Jako miarę podobieństwa, na bazie ilościowości gatunków, zastosowano odległość euklidesową (Sneath i Sokal 1973), a hierarchiczne grupowanie zdjęć wykonano metodą Warda. Wykorzystując ekologiczne liczby wskaźnikowe roślin naczyniowych Polski (Zarzycki i in. 2002) dla każdego stanowiska określono wskaźniki: zawartości materii organicznej, kwasowości i wilgotności gleby oraz wskaźnik świetlny.

Bezwzględna zawartość jądrowego DNA oraz poziom poliploidalności

Zawartość jądrowego DNA oznaczono metodą cytometrii przepływowej (FCM) w pracowni Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Rolniczo-Technicznego w Bydgoszczy. Wykorzystana metoda polega na analizie intensywności fluorescencji wybarwionych fluorochromami jąder (Śliwińska 1993). Materiał do badań stanowiły młode liście 60 roślin pochodzących z 20 badanych populacji ze stanowisk naturalnych. Jako standard wewnętrzny zastosowano liście *Brasica napus* cv. 'Bor' (2C=2,18 pg). Próby przygotowywano zgodnie z wcześniej opisaną procedurą (Thiem i Śliwińska 2003) z niewielkimi modyfikacjami. W każdej próbie analizowano około 5000-10 000 jąder komórkowych. Bezwzględną zawartość DNA jądrowego obliczono stosując liniową zależność pomiędzy pozycjami pików 2C *Galium odoratum* i *Brassica napus.*

Rozwój roślin na naturalnych stanowiskach przy zróżnicowanym sposobie pozyskiwania surowca

Celem badań było określenie wpływu zróżnicowanego sposobu pozyskiwania ziela na rozwój roślin na naturalnych stanowiskach oraz na gromadzenie się związków biologicznie czynnych w surowcu.
Badania prowadzono w latach 2007/2008 na stanowisku naturalnym w miejscowości Zełwągi, zlokalizowanym na terenie Nadleśnictwa Maskulińskie. Populacja marzanki zajmowała tam powierzchnię około 30 m^2, charakteryzowała się silnym wzrostem oraz dużą liczebnością. Na stanowisku wyznaczono losowo 9 poletek wielkości 1 m^2. Badania przeprowadzono w trzech powtórzeniach.
W 2007 roku na wyznaczonych poletkach przeprowadzono w następujący sposób zbiór ziela w fazie pełni kwitnienia roślin:

- cięcie w połowie wysokości pędów,
- cięcie przy ziemi,
- bez cięcia (kontrola).

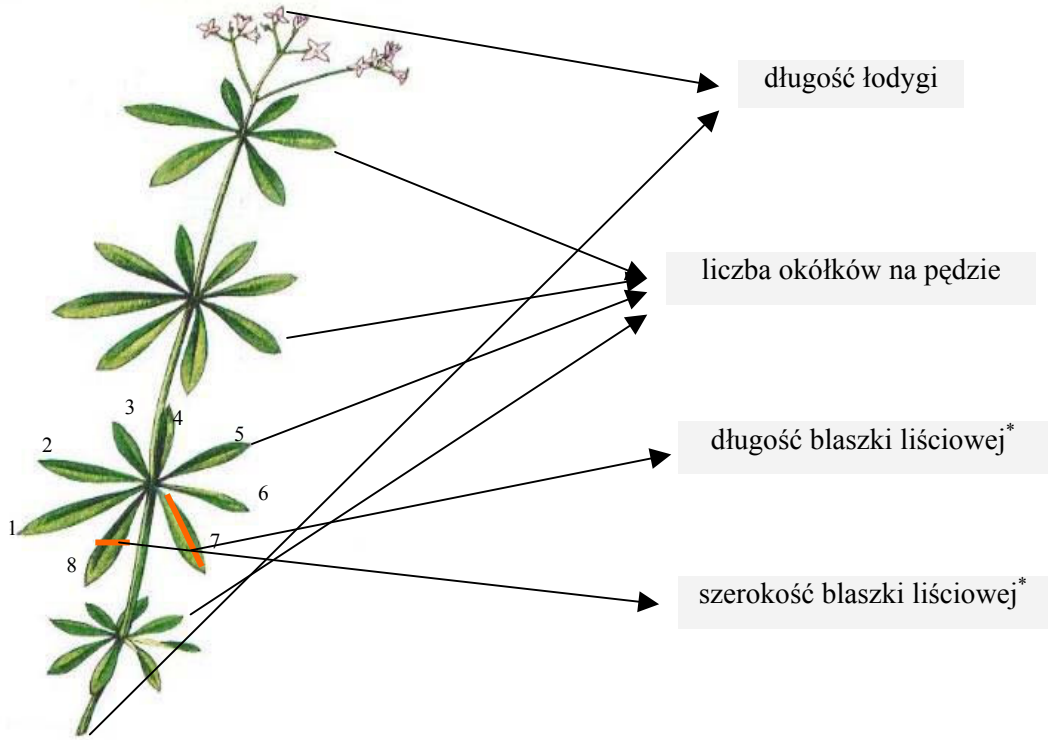
Wiosną 2008 r. (od kwietnia do połowy maja) na każdym poletku dokonano pomiarów biometrycznych cech osobniczych roślin (rys. 2). W tym też roku z poletek zebrano jednokrotnie ziele w fazie pełni kwitnienia roślin, tj. w maju. Określono masę świeżego i suchego ziela. W powietrznie suchym zielu oznaczono zawartość kumaryn, metodą spektrofotometryczną wg Wierzchowskiej-Renke i Steckiej (1976), polifenolokwasów (w przeliczeniu na kwas kawowy), glikozydów irydoidowych (w przeliczeniu na aukubinę), wg FP VI (2002).

2. Analiza rozwojowa i fitochemiczna wybranych populacji w warunkach naturalnych i uprawowych

Ocena cech morfologiczno-rozwojowych roślin

Ocenę cech morfologicznych roślin prowadzono na 20 stanowiskach naturalnych oraz w uprawie, co dwa tygodnie od maja do października, w latach 2006 i 2007 (rys. 2). Doświadczenie polowe założono wiosną 2006 roku wysadzając, w rozstawie 60x30 cm, wcześniej ukorzenione dwuwęzłowe sadzonki pochodzące ze stanowisk naturalnych, w ilości 30 sztuk dla każdej populacji. Glebę wyściółkowano substratem korowym. Dla każdej analizowanej cechy obliczono średnie arytmetyczne, odchylenie standardowe oraz współczynnik zmienności.

W 2007 r. przeprowadzono dwukrotny zbiór ziela ze stanowisk naturalnych i z uprawy (drugi rok wegetacji roślin) – w pełni kwitnienia i po kwitnieniu roślin. Ziele zbierano z 10 losowo wybranych roślin z każdej populacji, pozostawiając dwa dolne okółki liści. Następnie ziele wysuszono w suszarni w temperaturze 30°C przy przepływie powietrza od 0,2 do 0,25 m·s^{-2}.



* przez cały sezon wegetacyjny prowadzono pomiary długości i szerokości liści 3 okółka od góry pędu

Rys. 2. Obserwowane cechy morfologiczno-rozwojowe marzanki wonnej

W celu oceny niepoliczalnych cech morfologiczno-rozwojowych roślin opracowano własny klasyfikator zgodnie z wytycznymi International Plant Genetic Resources Institute oraz z wykorzystaniem danych literaturowych (Pawłowski 1977, Szafer 1988).

Badania fitochemiczne (metody)

Surowiec pozyskany w dwóch fazach rozwojowych roślin ze stanowisk naturalnych oraz z uprawy poddano analizom chemicznym w laboratorium KRWiL. Zawartość badanych związków biologicznie czynnych wyrażono w przeliczeniu na suchą masę. W surowcach oznaczono zawartość następujących związków: sumę kumaryn (metodą spektrofotometryczną wg Wierzchowskiej-Renke i Steckiej (1976)), sumę polifenolokwasów w przeliczeniu na kwas kawowy (wg FP VI 2002), sumę glikozydów irydoidowych w przeliczeniu na aukubinę (wg FP VI 2002). Metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) wg FP VI (2002) przeprowadzono analizę ilościową kumaryny, oraz metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) analizę składu związków biologicznie aktywnych (kumaryn, polifenolokwasów, flawonoidów). Ocenę aktywności przeciwutleniającej ekstraktów wykonano metodą DPPH (Chen i Ho 1997) i FRAP (Benzie i Strain 1999).

3. Ocena efektywności generatywnego i wegetatywnego rozmnażania

Rozmnażanie generatywne

W ramach badań dotyczących generatywnego rozmnażania marzanki wonnej przeprowadzono doświadczenia mające na celu określenie wpływu metody stratyfikacji na kiełkowanie nasion oraz wpływu wieku nasion i sposobu „uszkadzania łupiny nasiennej" na liczbę wykształconych siewek. Przedmiotem badań były owoce (nasiona) marzanki wonnej zebrane w roku 2007 z roślin ze stanowisk naturalnych. Zbioru nasion dokonano losowo w momencie, gdy 80% owoców było już w pełni dojrzałych. Za owoce niedojrzałe uznawano niewłaściwie wybarwione i małe.

Wpływ metody stratyfikacji na kiełkowanie nasion

Wartość siewną nasion badano laboratoryjnie określając energię i zdolność kiełkowania. Materiał siewny podzielono na dwie części: owoce otarte mechanicznie (o), owoce nieotarte (n). Tak przygotowane nasiona poddano następującym metodom stratyfikacji: moczenie w zimnej wodzie przez 24 h lub 3 minuty w wodzie o temp. 60-70ºC, następnie siew do podłoża lub przełożenie do woreczka foliowego na 30 tygodni do chłodziarki (temp. 2ºC) bez dostępu światła, moczenie 20 min w 0,5 ml kwasu siarkowego i siew do podłoża lub przełożenie do woreczka foliowego na 30 tygodni do chłodziarki (temp. 2ºC) bez dostępu światła lub nasiona suche (nienapęczniałe) wysiewano bezpośrednio do podłoża. Stratyfikację w 2ºC przeprowadzono w chłodziarce SANYO CHL 350 T B10/350 T B10. Po okresie 30 tygodni nasiona z chłodziarki przenoszono do kontrolowanych warunków świetlnych (10 h dnia-natężenie napromienienia PAR 30 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 14 h nocy) i temperaturowych (20ºC). Przez kolejne tygodnie prowadzono obserwacje kiełkowania nasion oraz początkowego wzrostu i rozwoju siewek.

Wpływ wieku nasion i sposobu „uszkadzania łupiny nasiennej" na liczbę wykształconych siewek

Owoce stratyfikowano przez okres 8 tygodni w wilgotnym piasku, w temperaturze 4ºC, bez dostępu światła. Po tym czasie podzielono je na trzy części, po 25 nasion każda: całe owoce – kontrola, owoce z całkowicie usuniętą okrywą (wyizolowane zarodki), owoce z usuniętą w 1/3 okrywą nasienną w okolicy korzenia zarodkowego.

Tak przygotowane nasiona umieszczano na szalkach Petriego ze zmodyfikowaną pożywką MS/B5 bez regulatorów wzrostu wg Gamborg i in. (1965). Doświadczenie prowadzono w temperaturze 24ºC, a natężenie napromienienia PAR wynosiło 10 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Przez kolejne tygodnie prowadzono obserwacje kiełkowania nasion oraz wzrostu i rozwoju siewek.

Rozmnażanie wegetatywne

Rozmnażanie przez sadzonkowanie

Celem doświadczenia było określenie wpływu rodzaju sadzonek, terminu ich pobierania z rośliny matecznej oraz rodzaju podłoża na ukorzenianie się sadzonek.

Czynnik A – rodzaj sadzonek:	**Czynnik B** – termin pobrania sadzonek (ze stanowisk naturalnych):	**Czynnik C** – rodzaj podłoża:
- sadzonki zielne (ze szczytów pędów z dwoma okółkami liści)	- wiosna (IV)	- perlit
- sadzonki rozłogowo-pędowe: czterowęzłowe, trzywęzłowe, dwuwęzłowe, jednowęzłowe	- jesień (X)	- odkwaszony torf (pH 5,7)
		- nieodkwaszony torf (pH 4,5)

Pobrane ze stanowisk naturalnych sadzonki hormonizowano, a następnie umieszczano w pojemnikach wypełnionych perlitem lub torfem**.** Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach przez okres ośmiu tygodni w szklarni, w warunkach wysokiej wilgotności W każdym powtórzeniu znajdowało się 50 sztuk sadzonek.

Mikrorozmnażanie

Doświadczenia prowadzono wieloetapowo w latach 2006-2008 w laboratorium kultur tkankowych KRWiL. Materiał wyjściowy stanowiły rośliny pochodzące ze stanowisk naturalnych. W pierwszym etapie określono wpływ metody odkażania (podchloryn sodu i chloramina T) na efektywność otrzymywania żywotnych eksplantatów. W kolejnych etapach badań porównano efektywność odkażania eksplantatów wierzchołkowych i węzłowych w zależności od terminu ich pobierania (wiosenno-letni i jesienny) oraz określano wpływ składu pożywki na rozwój eksplantatów inicjalnych. Eksplantaty wykładano pojedynczo do probówek z pożywką MS (Murashige i Skoog 1962):

a) bez regulatorów wzrostu,
b) zawierającą 0,1 $mg \cdot dm^{-3}$ 6-benzyloadeniny (BA) i 0,01 $mg \cdot dm^{-3}$ kwasu naftylo-1-octowego (NAA),
c) zawierającą 0,1 $mg \cdot dm^{-3}$ 6-benzyloadeniny (BA),
d) zawierającą 1,0 $mg \cdot dm^{-3}$ kwasu giberelinowego (GA_3)
e) zawierającą 0,5 $mg \cdot dm^{-3}$ kwasu indolilooctowego (IAA).

Określono także wpływ cytokinin na rozwój pędów z pąków bocznych marzanki. W doświadczeniu wykorzystano pożywkę MS z dodatkiem 30 $g \cdot dm^{-3}$ sacharozy i 6,5 $g \cdot dm^{-3}$ agaru. Do pożywki dodawano kinetynę lub BA w stężeniach 1,0; 2,5; 5,0 $mg \cdot dm^{-3}$, z dodatkiem 0,01 $mg \cdot dm^{-3}$ NAA lub bez dodatku auksyny. Kontrolą była pożywka podstawowa bez regulatorów wzrostu. Zastosowano dwa poziomy natężenia napromienienia światła fluorescencyjnego: 7,5 i 33,0 $\mu E\ m^{-2} \cdot s^{-1}$. Do polipropylenowych pojemników hodowlanych zawierających po 100 ml pożywki wykładano po pięć eksplantatów. Wszystkie doświadczenia prowadzono w pokoju wzrostowym przy 16 godzinnym fotoperiodzie i temperaturze 24ºC. Po 12 tygodniach określono długość i liczbę pędów powstałych z jednego eksplantatu oraz liczbę węzłów na nowo wytworzonych pędach.

4. Ocena wpływu wybranych czynników środowiskowych i uprawowych na plon i skład chemiczny surowca

Badania agrotechniczne przeprowadzono w latach 2006-2008 na Polu Doświadczalnym KRWiL w Wilanowie-Zawadach.

Wpływ zacienienia na rozwój roślin, plon i jakość surowca

Badania prowadzono w latach 2006-2007. Materiał wyjściowy do założenia doświadczenia wiosną 2006 r. stanowiły dwuwęzłowe sadzonki rozłogowo-pędowe pobrane ze stanowiska naturalnego z okolicy miejscowości Zełwągi (region warmińsko-mazurski). Doświadczenie założono metodą bloków losowanych w trzech powtórzeniach. Rośliny wysadzono do gruntu w rozstawie 30x30 w liczbie 60 sztuk w każdym powtórzeniu.

Zastosowano następujące warianty natężenia światła: w pełnym świetle słonecznym, pod pojedynczą cieniówką, pod podwójną cieniówką. Przez cały czas trwania doświadczenia prowadzono pomiar natężenia światła (cztery razy każdego miesiąca przy użyciu fitofotometru SONOPAN RF-100. W 2006 r. (od maja do października) co 4 tygodnie prowadzono badania biometryczne roślin. W roku 2007, kiedy rośliny były w fazie generatywnej przeprowadzono zbiór ziela (zbiór wiosenny), ścinając rośliny nad drugim okółkiem (licząc od ziemi). Drugi pokos ziela wykonano w wegetatywnej fazie rozwoju roślin, jesienią. Określono plon świeżego i powietrznie suchego ziela w przeliczeniu na $1m^2$.

W powietrznie suchym zielu oznaczono zawartość kumaryn (metodą spektrofotometryczną wg Wierzchowskiej-Renke i Steckiej (1976)), polifenolokwasów w przeliczeniu na kwas kawowy, glikozydów irydoidowych w przeliczeniu na aukubinę (wg FP VI 2002).

Wpływ pH podłoża na rozwój roślin, plon i jakość surowca

Badania prowadzono w latach 2007-2008, na trzech podłożach (torf z piaskiem w stosunku 1:1) różniących się pH (4,5, 5,5, 6,5). W każdym poziome pH wysadzono po 300 sztuk ukorzenionych dwuwęzłowych sadzonek rozłogowo-pędowych marzanki w rozstawie 10x15 cm. Rośliny przykryto pojedynczą cieniówką uzyskując ok. 50% zacienienia. Do pomiarów cech biometrycznych wybierano po 30 roślin z każdej kombinacji. Badania prowadzono w okresie od maja do października 2007 co 4 tygodnie.

Wiosną 2008 roku, w fazie kwitnienia roślin, ścięto ziele na wysokości drugiego okółka nad ziemią, a następnie powietrznie suchy surowiec poddano analizie chemicznej określając: sumę kumaryn (metodą spektrofotometryczną wg Wierzchowskiej-Renke i Steckiej (1976)), polifenolokwasów w przeliczeniu na kwas kawowy, glikozydów irydoidowych w przeliczeniu na aukubinę (wg FP VI 2002).

Wpływ sposobu zakładania plantacji na plon i jakość surowca
Celem doświadczenia było określenie wpływu terminu sadzenia oraz zagęszczenia roślin na ich rozwój, a także jakość ziela marzanki. Do doświadczenia wybrano trzy populacje, z czego dwie pochodziły z woj. warmińsko-mazurskiego (nr 2 i nr 6), a jedna z woj. lubelskiego (nr 19), charakteryzujące się intensywnym wzrostem oraz wysoką zawartością związków biologicznie aktywnych. Doświadczenie założono w roku 2006 metodą bloków losowanych w trzech powtórzeniach.

Czynnik A-populacja:	**Czynnik B**-termin sadzenia:	**Czynnik C**-rozstawa:
2	maj (wiosna) – T_1	30x30 cm – R_1
6	wrzesień (jesień) – T_2	30x40 cm – R_2
19		

Ukorzenione dwuwęzłowe sadzonki rozłogowo-pędowe w liczbie 20 sztuk w każdym powtórzeniu wysadzono w obu terminach. Miejsce uprawy było osłonięte szpalerem drzew od strony południowej. Obserwacje cech morfologiczno-rozwojowych roślin prowadzono co dwa tygodnie przez cały okres wegetacji roślin, w latach 2006 i 2007. W roku 2008 przeprowadzono zbiór ziela w dwóch fazach rozwojowych roślin. Pierwszego dokonano w maju, w okresie kwitnienia, kiedy 80% roślin miało w pełni wykształcone kwiaty. Drugi pokos miał miejsce we wrześniu. W powietrznie suchym zielu oznaczono zawartość kumaryn (metodą spektrofotometryczną wg Wierzchowskiej-Renke i Steckiej (1976)), polifenolokwasów w przeliczeniu na kwas kawowy, glikozydów irydoidowych w przeliczeniu na aukubinę (wg FP VI 2002).

5. Ocena wpływu warunków ekstrakcji na skład chemiczny uzyskanych ekstraktów

Materiał do badań stanowiło ziele roślin populacji nr 8 (Zełwągi) zebrane ze stanowisk naturalnych i z uprawy. Ziele zbierano w fazie generatywnej i wegetatywnej roślin. Surowiec wysuszono w suszarni w temperaturze 35ºC.

Czynnik A-medium ekstrakcyjne:	**Czynnik B**-metoda ekstrakcji:
- alkohol (metanol 75%)	- ekstrakcja pod chłodnicą zwrotną
- woda	- ekstrakcja w zautomatyzowanym aparacie Soxleta (Büchi B-811)
	- ekstrakcja z zastosowaniem ultradźwięków

W ekstraktach oznaczono zawartość kumaryn metodą TLC oraz określono ich siłę przeciwutleniającą metodą FRAP i DPPH.

6. Ocena aktywności przeciwutleniającej ekstraktów

Oznaczenie ogólnej aktywności przeciwutleniającej metodą FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)
Oznaczenie wykonano na ekstraktach wodnych. Aktywność przeciwutleniającą FRAP oznaczono metodą podaną przez Benzie i Strain (1999), polegającą na redukcji w kwaśnym środowisku żelaza na trzecim stopniu utlenienia do formy żelazawej o intensywnym niebieskim zabarwieniu, która najwyższą absorbancję wykazuje przy długości fali 593 nm. Reakcja nie jest specyficzna i zachodzi pod wpływem każdej substancji posiadającej właściwości redukujące. Wartość FRAP mieszaniny antyoksydantów jest sumą wartości FRAP poszczególnych jej składników.

Oznaczenie ogólnej aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH
Oznaczenie wykonano na ekstraktach wodnych. Analizę przeprowadzono według metody Chen i Ho (1997), a procent inhibicji DPPH obliczono zgodnie ze wzorem podanym przez Rossi i in. (2003). Oznaczenie polega na kolorometrycznym pomiarze stopnia zredukowania rodników DPPH.

7. Opracowanie statystyczne wyników

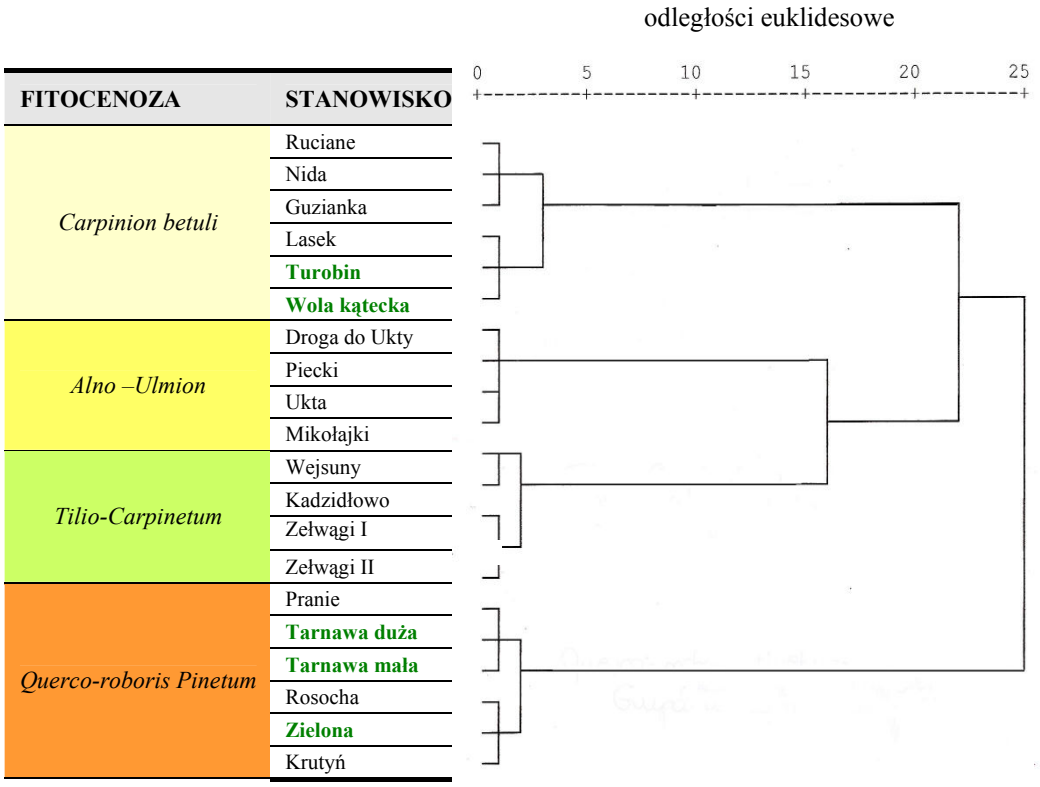
Do opracowania wyników doświadczeń użyto testu χ^2 na niezależność cech oraz metody jednoczynnikowej i dwuczynnikowej analizy wariancji. Do porównania średnich zastosowano test Tukey'a na poziomie istotności α=0,05 lub α=0,01. Do wykonania obliczeń zastosowano program Statgraphics *Plus* w wersji 4.1. W celu wyodrębnienia podobnych grup populacji w badaniach na stanowiskach naturalnych oraz w uprawie posłużono się metodą analizy skupień (Jendrzejczak 1998).

WYNIKI I DYSKUSJA

1. Badania terenowe

Analiza fitosocjologiczna zbiorowisk roślinnych

Na podstawie analizy fitosocjologicznej określono cztery grupy zbiorowisk roślinnych, w których występowała marzanka. W większości zaklasyfikowano je do rzędu *Fagetalia sylvaticae* (związek ***Alno-Ulmion*** i ***Carpinion betuli,*** zespół: ***Tilio-Carpinetum***), dla którego marzanka wonna jest gatunkiem charakterystycznym (Matuszkiewicz 2002), natomiast sześć z nich do rzędu *Piceetalia abietis* (zespół: ***Querco roboris–Pinetum)*** (rys. 3).



• stanowiska z woj. lubelskiego

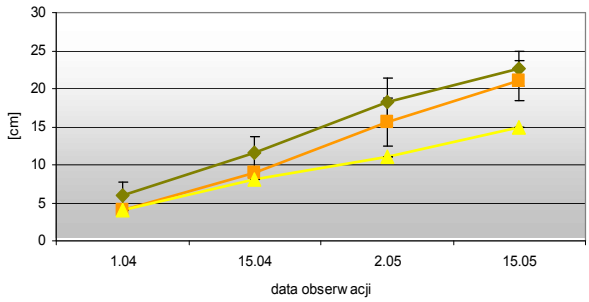
Rys. 3. Dendrogram obrazujący podobieństwa w składzie gatunkowym stanowisk marzanki wonnej, uzyskany przy pomocy analizy skupień metodą Warda

Bezwzględna zawartość jądrowego DNA oraz poziom poliploidalności

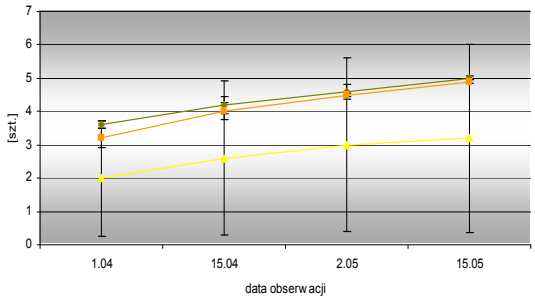
Przeprowadzona analiza zawartości jądrowego DNA 20 populacji marzanki wonnej, pochodzących ze stanowisk naturalnych, nie wykazała dużego zróżnicowania wewnątrzgatunkowego. Wartość ta wahała się od 1,34 do 1,43. W obrębie badanych populacji nie stwierdzono obecności poliploidów. Podobne wyniki otrzymała w swoich badaniach Skalińska i in. (1959) stwierdzając, że marzanka nie wykazuje zróżnicowania wewnątrzgatunkowego. Dotychczas nie wyróżniono w obrębie tego gatunku niższych jednostek systematycznych, takich jak odmiana czy forma.

Rozwój roślin na stanowiskach naturalnych przy zróżnicowanym sposobie pozyskiwania surowca

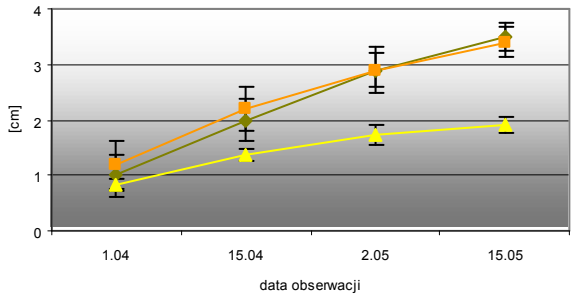
Wyniki badań dotyczących rozwoju roślin na naturalnych stanowiskach wykazały, że sposób pozyskiwania surowca ma duży wpływ na odnawianie się populacji oraz na jakość pozyskiwanego z nich ziela (wykresy 1-4, tab. 1). Stosując cięcie roślin w połowie długości pędów już po około czterech tygodniach zaobserwowano intensywny wzrost pędów, a pod koniec okresu wegetacyjnego pędy osiągnęły długość zbliżoną do tych roślin, które nie były cięte (22 cm). Rośliny cięte przy samym gruncie albo zamierały, albo ich wzrost w następnym sezonie wegetacyjnym był słaby. Podobnych obserwacji dokonała Oświęcimska i in. (1984). Autorka ta uważa także, że ścinanie pędów marzanki tuż przy ziemi powoduje słabe odrastanie roślin (ok. 24%) w roku następnym. Tak więc bardzo często obecnie spotykany tzw. „przemysłowy" sposób zbioru, polegający na wycięciu lub wykopaniu wszystkiego, co wydaje się być poszukiwanym surowcem zagraża nie tylko poszczególnym gatunkom, lecz całym siedliskom, które rzadko odtwarzają się w pierwotnej postaci. Odnośnie jakości pozyskanego surowca stwierdzono, że zbiór ziela marzanki polegający na ścinaniu roślin przy ziemi istotnie obniża zawartość w nim kumaryny w następnym roku, a nieznacznie podnosi zawartość polifenolokwasów. Nie stwierdzono natomiast wyraźnej kierunkowej zależności pomiędzy sposobem cięcia ziela a zawartością glikozydów irydoidowych.



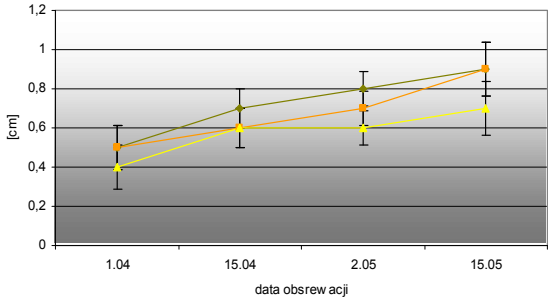
Wyk. 1. Przyrost wysokości roślin [cm]



Wyk. 2. Liczba okółków liściowych na pędzie [szt.]



Wyk. 3. Długość blaszek liściowych [cm]



Wyk. 4. Szerokość blaszek liściowych [cm]

-bez cięcia; - cięcie w połowie wysokości; -cięcie przy ziemi

Tab. 1. Zawartość kumaryn, polifenolokwasów, glikozydów irydoidowych w zielu [% s.m.]

Sposób cięcia ziela	Kumaryny	Polifenolokwasy	Glikozydy irydoidowe
rośliny nie cięte w ubiegłym roku	0,41 a	1,68 b	0,99 b
cięcie w połowie wysokości roślin	0,43 a	1,77 b	1,12 a
cięcie przy ziemi	0,30 b	1,84 a	0,87 c

Jednakowymi literami oznaczono wartości nieróżniące się istotnie na poziomie α=0,05 wg testu Tukey'a.

2. Analiza rozwojowa i fitochemiczna wybranych populacji w warunkach naturalnych i uprawowych

Ocena cech morfologiczno-rozwojowych roślin

Ocena policzalnych jak i niepoliczalnych cech morfologiczno-rozwojowych roślin na stanowiskach naturalnych wykazała niewielkie ich zróżnicowanie. W uprawie rośliny oceniano w taki sam sposób jak na stanowiskach naturalnych. Wykonane pomiary biometryczne roślin wykazały, podobnie jak te przeprowadzone w warunkach naturalnych, średnie zróżnicowanie odnośnie długości pędów, liczby okółków na pędzie oraz długości i szerokości liści. Długości pędów marzanki wonnej według Tokarza i in. (1969), Szafera i in. (1988) oraz Strzeleckiej i Kowalskiego (2000) wynosi od 10 do 60 cm, twierdzą oni też, że istotny wpływ na tą cechę roślin mają warunki siedliskowe. Obserwowane w niniejszej pracy rośliny na stanowiskach naturalnych pod koniec okresu wegetacji posiadały pędy o średniej długości 28 cm, a w uprawie 22 cm (wykres 5 i 6). Odnośnie liczby okółków liści na pędzie stwierdzono, że u roślin na stanowiskach naturalnych wahała się ona od 5 do 6 szt., zaś w warunkach uprawowych od 6 do 10 szt. (wykres 7 i 8).

Według Sulmy i in. (1964, 1967, 1969) liczba okółków liści na pędzie to cecha mało zmienna dla marzanki i nie jest ona zależna od siedliska i zbiorowiska roślinnego, w którym ona występuje. Uważa on także, że wielkość liści marzanki nie zależy od stanowiska, na którym ona rośnie. Najkrótszymi liśćmi na stanowiskach naturalnych charakteryzowały się rośliny populacji nr 2 (3 cm), a najdłuższymi-rośliny populacji nr 9 i 20 (4 cm). Po przeniesieniu roślin do uprawy długość blaszek liściowych populacji nr 2 wynosiła średnio 3,7 cm, a populacji nr 9 pozostała bez zmian (wykresy 9-12). Warunki pogodowe panujące podczas prowadzenia doświadczeń polowych nie odbiegały skrajnie od krajowych wieloletnich, za wyjątkiem roku 2007, który charakteryzował się wyższą temperaturą powietrza oraz zwiększoną ilością opadów. Na podstawie uzyskanych w tej pracy wyników można przypuszczać, że warunki meteorologiczne nie mają znaczącego wpływu na rozwój roślin.

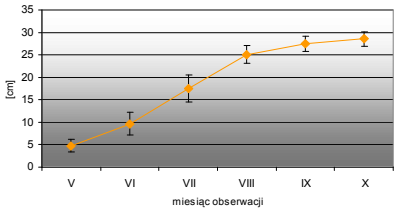
Za pomocą hierarchicznej analizy skupień podzielono 20 badanych populacji (na stanowiskach naturalnych i w uprawie) na 10 grup (skupień), składających się z obiektów bardziej podobnych wielocechowo wewnątrz grup niż między grupami. Wyodrębnione grupy miały różną liczebność-od jednej do dziewięciu. Jednakże podobieństwo poszczególnych populacji było różne na stanowiskach naturalnych oraz w uprawie. Analizując skład poszczególnych grup można zaobserwować, że w najliczniejszych grupach występowały populacje pochodzące z obu regionów Polski (rys. 4 i 5).

Średnie z populacji w warunkach naturalnych i uprawowych

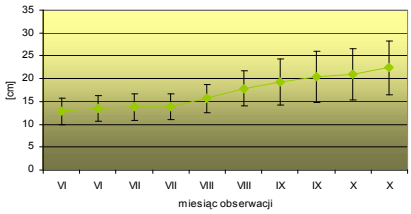
STANOWISKA NATURALNE	UPRAWA

Długość pędów [cm]

Wyk. 5

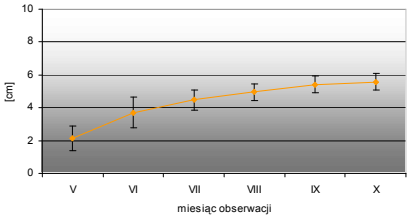


Wyk. 6

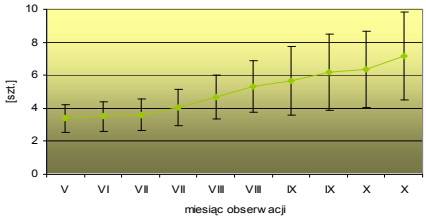


Liczba okółków na pędzie [szt.]

Wyk. 7

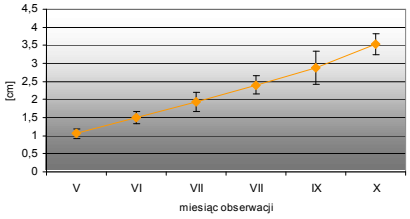


Wyk. 8

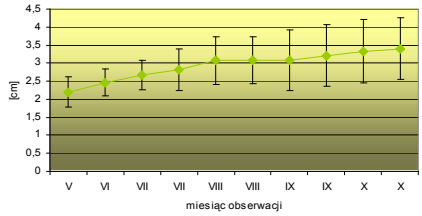


Długość liści [cm]

Wyk. 9

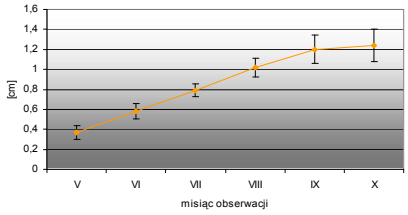


Wyk. 10

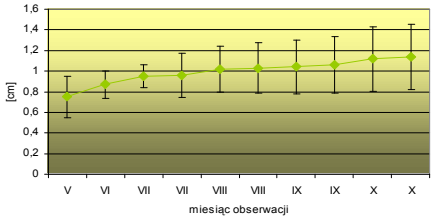


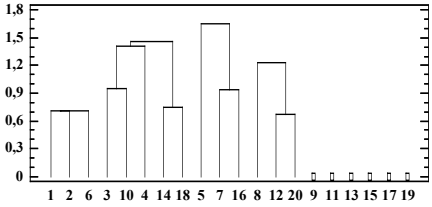
Szerokość liści [cm]

Wyk.11



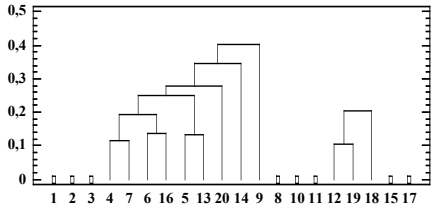
Wyk. 12





populacja

Rys. 4. Dendrogram podobieństwa dla 20 populacji pod względem cech rozwojowych na stanowiskach naturalnych



populacja

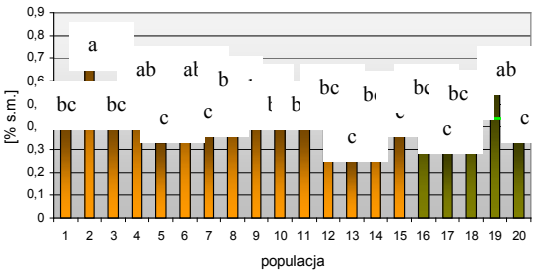
Rys. 5. Dendrogram podobieństwa dla 20 populacji pod względem cech rozwojowych w uprawie

Ocena cech niepoliczalnych roślin 20 populacji marzanki wonnej wykazała, że ich rozwój na stanowiskach naturalnych był bardziej wyrównany niż w uprawie. Wszystkie populacje na stanowiskach naturalnych w tym samym czasie rozpoczynały kwitnienie, jednakże rośliny w woj. lubelskim osiągały pełnię kwitnienia o około dziesięć dni później od pozostałych. Odnośnie niepoliczalnych cech morfologicznych większe różnice zaobserwowano w przypadku roślin będących w uprawie. Wyraźnie różniły się one pod względem formy wzrostu-przeważnie pokrój ich był w połowie wzniesiony lub wzniesiony, a nieliczne posiadały pędy płożące. W porównaniu do roślin na stanowiskach naturalnych rośliny w uprawie zakwitały później i szybciej kończyły wegetację.

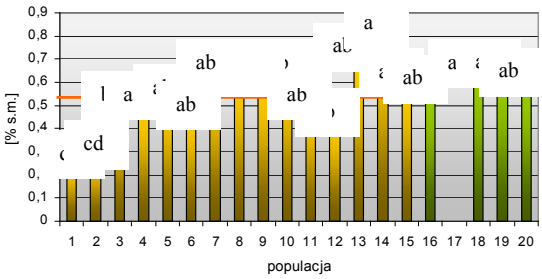
Badania fitochemiczne

W prezentowanej pracy starano się określić zróżnicowanie chemiczne ziela marzanki zarówno pozyskanego ze stanowisk naturalnych, jak i z uprawy. Surowiec (ziele) zbierano w okresie kwitnienia roślin (w maju) oraz po około 4 miesiącach (po kwitnieniu roślin). W powietrznie suchym zielu oznaczano zawartość kumaryn, polifenolokwasów, glikozydów irydoidowych. Niezależnie od miejsca zbioru surowca wyższą zawartość kumaryn stwierdzono w zielu zebranym w okresie kwitnienia roślin, (stanowiska naturalne-0,43%, uprawa-0,58%) niż po ich kwitnieniu (stanowiska naturalne-0,34%, uprawa-0,36%) (wykres 13-16). Wcześniejsze badania przedstawione w pracach m.in. Hlavy i in. (1984), Mahlajuka (1991), Strzeleckiej i Kowalskiego (2000) oraz Basera i in. (2004) potwierdzają, że zawartość kumaryny i jej pochodnych w zielu marzanki jest najwyższa w okresie kwitnienia roślin a po kwitnieniu może jej być nawet dwukrotnie mniej.

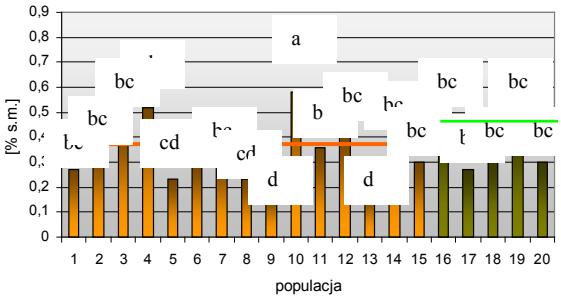
Ziele zebrane w fazie wegetatywnej (po kwitnieniu roślin) ze stanowisk naturalnych charakteryzowało się wyższą zawartością polifenolokwasów (1,19%) niż z uprawy (1,16%) (wykresy 17-20). Podobną tendencję zaobserwowano odnośnie zawartości glikozydów irydoidowych w zielu. Było ich sześciokrotnie więcej w surowcu pochodzącym ze stanowisk naturalnych (0,71% po kwitnieniu roślin) (wykresy 21-24). Ożarowski i Jaroniewski (1987) podają, że zawartość asperulozydu (jednego z glikozydów irydoidowych) w zielu marzanki wynosi około 0,05%. Wcześniejsze prace Osińskiej i Rosłon (2004) dotyczące oceny ziela marzanki (pozyskanego w czasie kwitnienia roślin) pod kątem zawartości aukubozydu i polifenolokwasów wskazują, że jest w nim ok. 0,82% aukubozydu i około 2% polifenolokwasów.



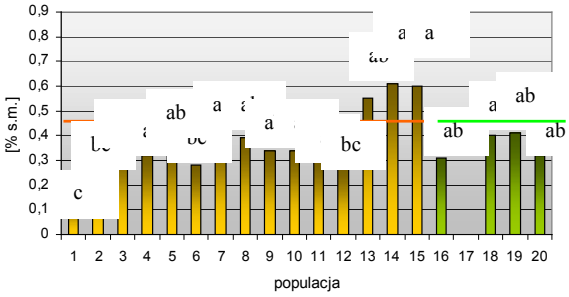
Wyk. 13. Zawartość kumaryn w zielu zebranym w fazie generatywnej ze stanowisk naturalnych [% s.m.]



Wyk. 14. Zawartość kumaryn w zielu zebranym w fazie generatywnej z uprawy [% s.m.]



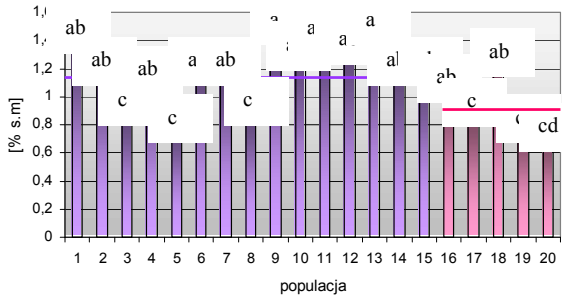
Wyk. 15. Zawartość kumaryn w zielu zebranym w fazie wegetatywnej ze stanowisk naturalnych [% s.m.]



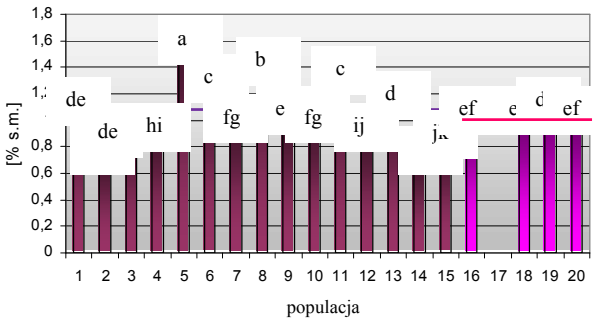
Wyk. 16. Zawartość kumaryn w zielu zebranym w fazie wegetatywnej z uprawy [% s.m.]

populacje z woj. warmińsko-mazurskiego populacje z woj. lubelskiego

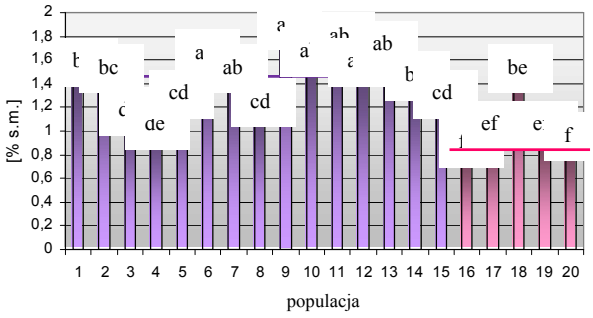
Jednakowymi literami oznaczono wartości nieróżniące się istotnie na poziomie α=0,05 wg testu Tukey'a średnia



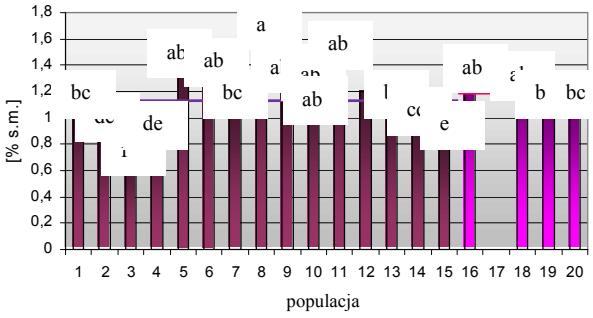
Wyk. 17. Zawartość polifenolokwasów w zielu zebranym w fazie generatywnej ze stanowisk naturalnych [% s.m.]



Wyk. 18. Zawartość polifenolokwasów w zielu zebranym w fazie generatywnej z uprawy [% s.m.]



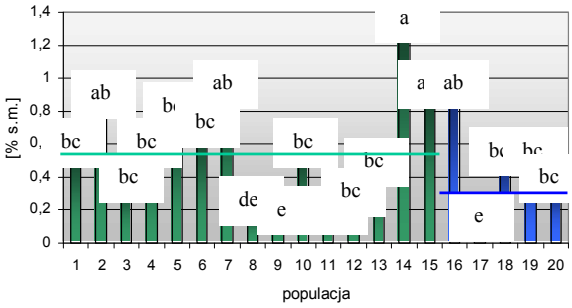
Wyk. 19. Zawartość polifenolokwasów w zielu zebranym w fazie wegetatywnej ze stanowisk naturalnych [% s.m.]



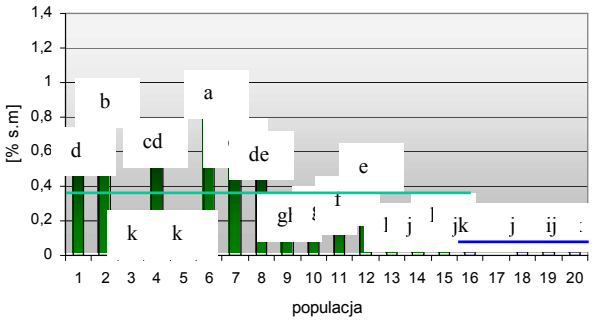
Wyk. 20. Zawartość polifenolokwasów w zielu zebranym w fazie wegetatywnej z uprawy [% s.m.]

populacje z woj. warmińsko-mazurskiego populacje z woj. lubelskiego

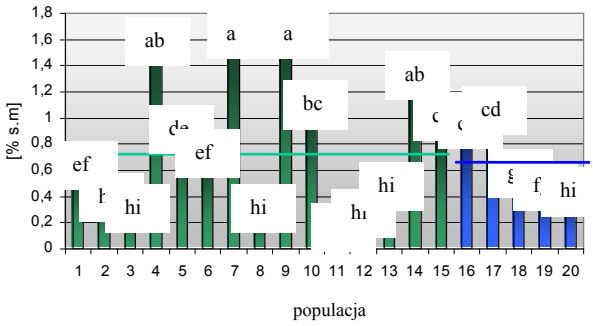
Jednakowymi literami oznaczono wartości nie różniące się istotnie na poziomie α=0,05 wg testu Tukey'a średnia



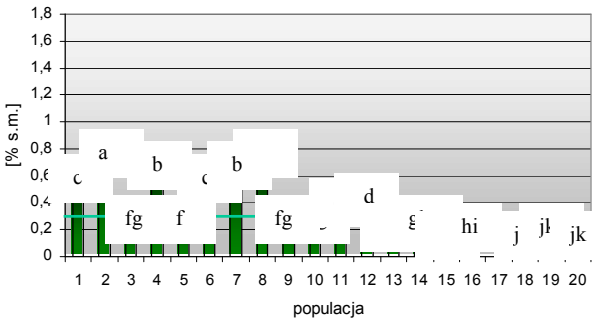
Wyk. 21. Zawartość glikozydów irydoidowych w zielu zebranym w fazie generatywnej ze stanowisk naturalnych [% s.m.]



Wyk. 22. Zawartość glikozydów irydoidowych w zielu zebranym w fazie generatywnej z uprawy [% s.m.]



Wyk. 23. Zawartość glikozydów irydoidowych w zielu zebranym w fazie wegetatywnej] ze stanowisk naturalnych [% s.m.]



Wykres 24. Zawartość glikozydów irydoidowych w zielu zebranym w fazie wegetatywnej z uprawy [% s.m.]

populacje z woj. warmińsko-mazurskiego populacje z woj. lubelskiego

Jednakowymi literami oznaczono wartości nieróżniące się istotnie na poziomie α=0,05 wg testu Tukey'a średnia

Obecność kumaryny w zielu roślin 20 badanych populacji określono wstępnie wykorzystując metodę chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Następnie uzyskane wyniki potwierdzono bardziej szczegółową analizą przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Wśród zidentyfikowanych związków zarówno w zielu zebranym ze stanowisk naturalnych, jak i z uprawy poza kumaryną stwierdzono obecność następujących polifenolokwasów: kwasu o-kumarowego, elagowego, chlorogenowego, ferulowego oraz rozmarynowego, a także glikozydu flawonoidowego - rutyny.
Ich zawartość w dużym stopniu związana była z pochodzeniem surowca (populacją) oraz fazą rozwojową roślin. Ziele populacji z rejonu warmińsko-mazurskiego charakteryzowało się ponad trzykrotnie wyższą zawartością kumaryny niż z woj. Lubelskiego, niezależnie czy pozyskiwane było ze stanowisk naturalnych (38,61 mg·100 g.$^{-1}$ s.m w fazie generatywnej; 31,33 mg·100 g^{-1} s.m. w fazie wegetatywnej), czy z uprawy (94,14 mg·100 g.$^{-1}$ s.m w fazie generatywnej; 69,84 mg·100 g^{-1} s.m w fazie wegetatywnej). Odwrotną tendencję stwierdzono w przypadku kwasu chlorogenowego (stanowiska naturalne 311,59 mg·100 g^{-1} s.m. w fazie generatywnej; 322,87 mg·100 g^{-1} s.m w fazie wegetatywnej, uprawa 874,36 mg·100 g^{-1} s.m. w fazie generatywnej; 754,98 mg·100 g^{-1} s.m w fazie wegetatywnej). Zawartość w analizowanych surowcach polifenolokwasów, tj. kwasu elagowego, ferulowegoi rozmarynowego, była znacznie niższa niż kwasu chlorogenowego, a kwas o-kumarowy wystąpił jedynie w śladowych ilościach, niezależnie od miejsca zbioru ziela i fazy rozwojowej roślin. W surowcach pochodzących z uprawy stwierdzono występowanie rutyny w ilości od 12,99 do 41,22 mg·100 g^{-1} s.m, natomiast w zielu ze stanowisk naturalnych zawartość tego związku była około trzy razy mniejsza i wahała się od 6,67 do 10,11 mg·100 g^{-1} s.m. (tab. 2 i 3).

Tab. 2. Zawartość zidentyfikowanych związków biologicznie aktywnych w zielu ze stanowisk naturalnych [mg·100 g^{-1} s.m.]

Rejon	Związek/faza zbioru	kumaryna		kwas o-kumarowy		kwas elagowy		kwas chlorogenowy		kwas ferulowy		kwas rozmarynowy		rutyna	
		g.	w.	g.	w.	g.	w.	g.	w	g.	w	g.	w.	g.	w.
woj. warmińsko mazurskie	**Średnia dla populacji**	**38,61***	**31,33**	**0,32**	**0,37**	**2,82**	**2,79**	**240,03**	**249,87**	**9,71***	**5,1**	**10,04***	**7,38**	**6,67**	**10,11***
woj. lubelskie	**Średnia dla populacji**	**11,74***	**9,38**	**0,37**	**0,36**	**2,73**	**3,27**	**311,59**	**322,87**	**8,46**	**7,44**	**9,98**	**8,68**	**7,27**	**9,36**

w – ziele zebrane w fazie wegetatywnej
g – ziele zebrane w fazie generatywnej
związki o najwyższym udziale
*p<0,05

Tab. 3. Zawartość zidentyfikowanych związków biologicznie aktywnych w zielu z uprawy [mg·100 g^{-1} s.m.]

Rejon	Związek/faza zbioru	kumaryna		kwas o-kumarowy		kwas elagowy		kwas chlorogenowy		kwas ferulowy		kwas rozmarynowy		rutyna	
		g.	w.	g.	w.	g.	w.	g.	w	g.	w	g.	w.	g.	w.
woj. warmińsko mazurskie	**Średnia dla populacji.**	**94,14***	**69,84**	**0,19**	**0,25***	**2,75**	**3,9***	**802,9***	**618,77**	**1,61**	**4,45***	**15,66**	**15,44**	**37,83**	**41,22***
woj. lubelskie	**Średnia dla populacji.**	**24,68***	**21,1**	**0,13**	**0,15**	**3,28***	**1,8**	**874,36***	**754,98**	**2,06**	**5,0*2**	**6,6***	**4,9**	**12,99**	**23,94***

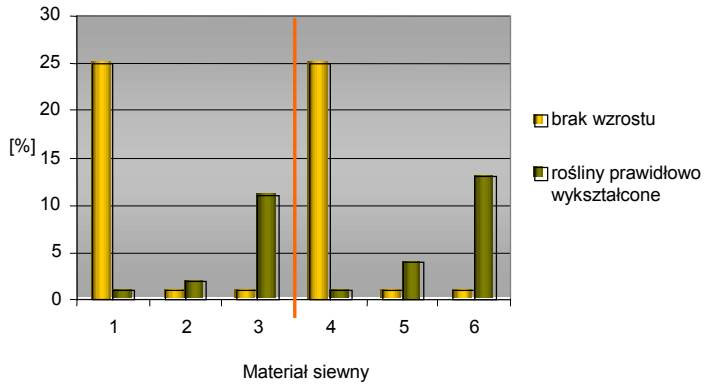
w – ziele zebrane w fazie wegetatywnej
g – ziele zebrane w fazie generatywnej
związki o najwyższym udziale
*p<0,05

3. Ocena efektywności generatywnego i wegetatywnego rozmnażania

Rozmnażanie generatywne

W wyniku przeprowadzonych badań laboratoryjnych stwierdzono, że nasiona marzanki wonnej charakteryzują się bardzo niską naturalną zdolnością kiełkowania. Niezależnie od zastosowanych metod stratyfikacji zdolność ich kiełkowania nie przekraczała 20%. W kulturach *in vitro* zdolność

kiełkowania wyizolowanych zarodków (całkowicie usunięta okrywa nasienna) nie przekroczyła 25% (wykres 25).



Owoce po trzyletnim przechowywaniu
1. całe owoce
2. owoce z usuniętą w 1/3 okrywą nasienną w okolicy korzenia zarodkowego
3. owoce z całkowicie usuniętą okrywą (wyizolowane zarodki)

Owoce jednoroczne
4. całe owoce
5. owoce z usuniętą w 1/3 okrywą nasienną w okolicy korzenia zarodkowego
6. owoce z całkowicie usuniętą okrywą (wyizolowane zarodki)

Wyk. 25. Wpływ wieku nasion i sposobu uszkadzania łupiny nasiennej na liczbę wykształconych siewek

Rozmnażanie wegetatywne

Wyniki doświadczeń związanych z rozmnażaniem marzanki wonnej poprzez sadzonkowanie wskazują, że dwuwęzłowe sadzonki rozłogowo-pędowe (pobrane z roślin matecznych zarówno wiosną, jak i jesienią oraz ukorzeniane w torfie o pH 4,5) są najbardziej przydatne do wegetatywnego rozmnażania tej rośliny (99% prawidłowo ukorzenionych sadzonek).

Mikrorozmnażanie

Wyniki tej pracy wskazują, że marzankę wonną można skutecznie rozmnażać w kulturach *in vitro*. Jak dotąd nie zajmowano się mikrorozmnażaniem tego gatunku. Dotychczasowe doniesienia literaturowe dotyczą wyłącznie *Galium tinctorium* i *Galium schultesii* (Wilson i Balague 2007, Klavina i in. 2004).

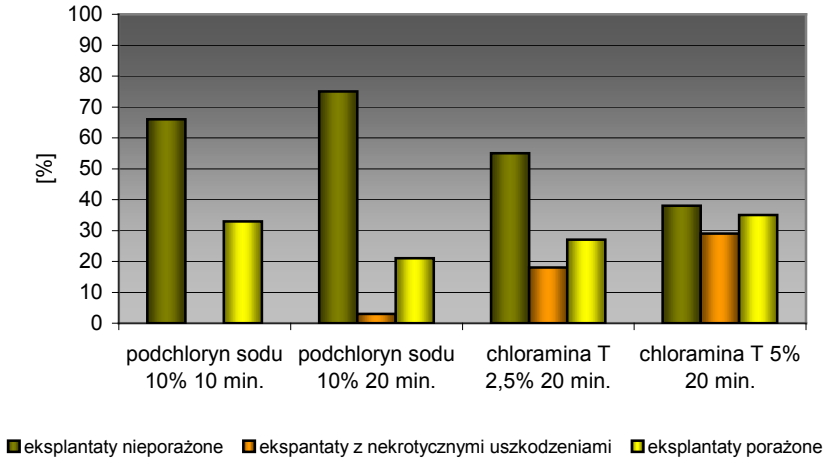
W ramach prowadzonych w niniejszej pracy badań stwierdzono, że najskuteczniejszą substancją odkażającą jest podchloryn sodu ($\chi^2_{(1)}$=4,74 p=0,0295), natomiast chloramina T w dużym stopniu uszkadza eksplantaty (wykres 26). Podobne wyniki otrzymali Klavina i in. (2004) dla wierzchołków pędów *Galium tinctorium* odkażanych handlowym preparatem ACE.

Najwięcej prawidłowo rozwijających się pędów otrzymano z ekspantatów wierzchołkowych pobieranych we wrześniu ($\chi^2_{(3)}$=20,27 p=0,0001) (wykres 27).

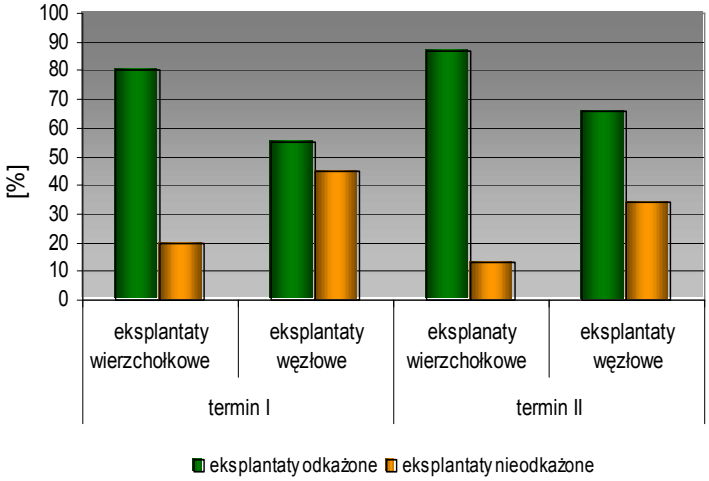
Stwierdzono, że rozwój eksplantatów istotnie zależał od składu pożywki. Najlepszy rozwój eksplantatów zaobserwowano na pożywce MS bez dodatku regulatorów wzrostu oraz wzbogaconej dodatkiem 0,1 mg·dm^{-3} BA (wykres 28), natomiast najwięcej pędów bocznych na eksplantatach stwierdzono na pożywce z dodatkiem 1 mg·dm^{-3} kinetyny i nieznacznie mniej na pożywce bez dodatku regulatorów wzrostu. Kinetyna w wyższych stężeniach, a także BA we wszystkich zastosowanych stężeniach nie sprzyjały rozwojowi pędów bocznych.

Pędy o największej liczbie węzłów uzyskano na pożywce bez regulatorów wzrostu. Wzrastające stężenia obu cytokinin powodowały wytworzenie pędów o coraz mniejszej liczbie węzłów. BA w większym stopniu niż kinetyna hamowała wydłużanie pędów. Najdłuższe pędy otrzymano na pożywce bez regulatorów wzrostu oraz zawierającej 1 mg·dm^{-3} kinetyny.

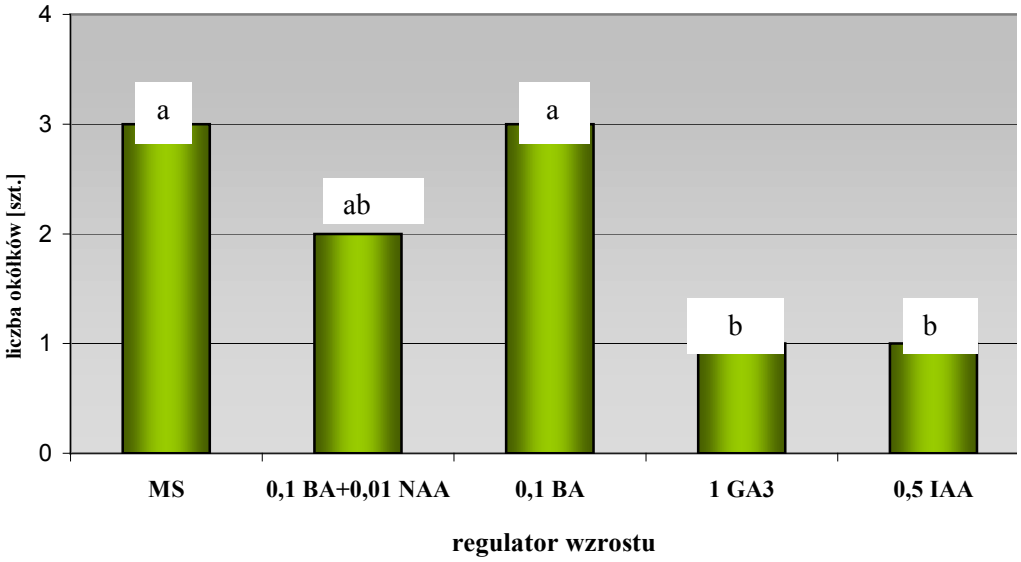
Przebieg procesów morfogenezy zależy nie tylko od rodzaju i koncentracji cytokinin i auksyn w pożywce, lecz także od fizycznych warunków kultury, zwłaszcza temperatury i światła (Rout 2000). W przeprowadzonych w tej pracy doświadczeniach dłuższe pędy otrzymano przy natężeniu napromienienia światła fluorescencyjnego 7,5 µE·s^{-1}·m^{-2} niż 33,0 µE·s^{-1}·m^{-2}. Rośliny uzyskane na pożywce bez dodatku regulatorów wzrostu w warunkach niższego natężenia światła ukorzeniły się w 95%. Przy wyższym natężeniu światła ukorzeniło się jedynie 50% roślin (fot. 1A i B). Wynika to być może z tego, że marzanka wonna jako roślina runa leśnego lasów liściastych przystosowana jest do rozwoju w warunkach o niskim natężeniu światła.



Wyk. 26. Wpływ metody odkażania na liczbę odkażonych, żywotnych eksplantatów węzłowych [%]



Wyk 27. Wpływ rodzaju eksplantatu i terminu jego pobierania na liczbę odkażonych eksplantatów [%]



Jednakowymi literami oznaczono wartości nieróżniące się istotnie na poziomie α=0,05 wg testu Tukey'a

Wyk. 28. Wpływ rodzaju pożywki na wzrost eksplantatów [szt.]

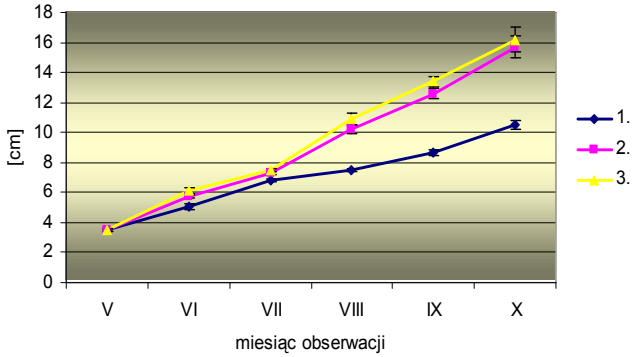
A B

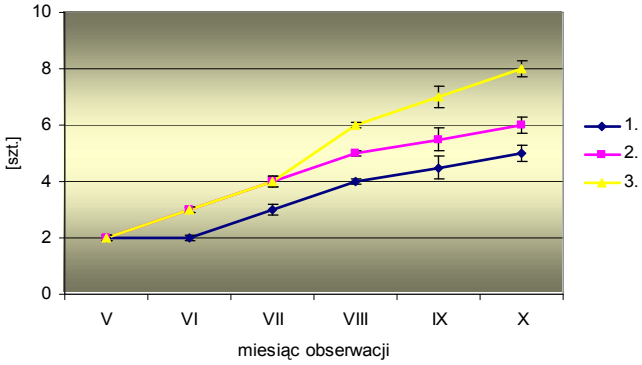
Fot. 1. Eksplantaty rosnące na pożywce MS bez regulatorów wzrostu przy poziomie napromienienia A. 33,0 $\mu E \cdot s^{-1} m^{-2}$, B. 7,5 $\mu E \cdot s^{-1} m^{-2}$

4. Ocena wpływu wybranych czynników środowiskowych i uprawowych na plon i skład chemiczny surowca

Wpływ zacienienia na rozwój roślin, plon i jakość surowca

Wyniki badań polowych dotyczące wpływu natężenia światła na rozwój roślin wykazały, że zarówno masa ziela, jak i zawartość w nim związków biologicznie czynnych istotnie zależy od natężenia światła. Najbardziej dynamiczny wzrost roślin, a co za tym idzie istotnie najwyższą masę ziela uzyskano wtedy, kiedy rośliny były najbardziej zacienione (wykres 29 i 30)

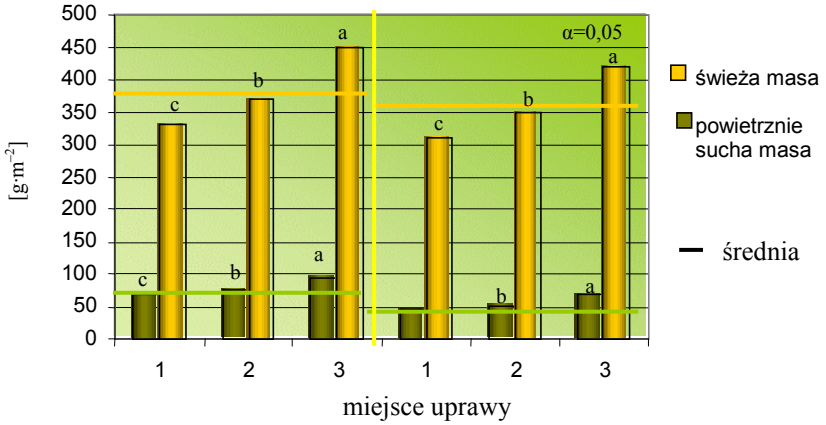




Wyk. 29. Przyrost wysokości pędów [cm] **Wyk. 30. Liczba okółków liściowych [szt]**

1. rośliny rosnące w pełnym świetle słonecznym**, 2.** rośliny rosnące pod pojedynczą cieniówką
3. rośliny rosnące pod podwójną cieniówką

Rośliny rosnące w pełnym oświetleniu przez cały okres wegetacji były mniejsze, a uzyskana z nich masa surowca była około 30% niższa niż z roślin rosnących w zacienieniu (wykres 31). Zawartość kumaryn, polifenolokwasów, jak i glikozydów irydoidowych była zawsze istotnie wyższa w zielu roślin rosnących pod podwójną cieniówką. Stwierdzono również, że surowiec zbierany w fazie kwitnienia roślin charakteryzował się wyższą zawartością kumaryn, niezależnie od stopnia zacienienia roślin. W przypadku polifenolokwasów było ich więcej w zielu zbieranym po kwitnieniu roślin (tab. 4).



1. rośliny rosnące w pełnym świetle słonecznym, **2.** rośliny rosnące pod pojedynczą cieniówka
3. rośliny rosnące pod podwójną cieniówką
* średnie oznaczone tą samą literą nie różniły się istotnie przy poziomie istotności α=0,05 wg testu Tukey'a

Wyk. 31. Plon ziela [g·m $^{-2}$]

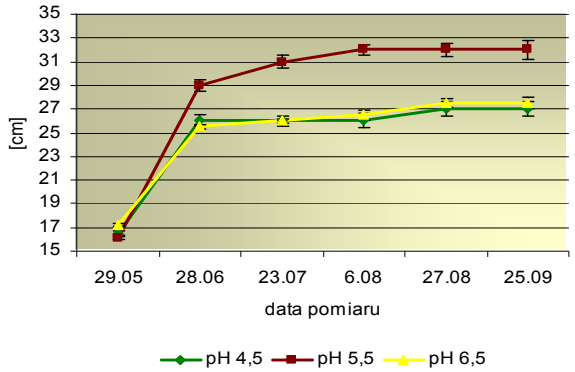
Tab. 4. Zawartość związków biologicznie aktywnych w zielu [%s.m.]

MIEJSCE UPRAWY	KUMARYNY		POLIFENOLOKWASY		GLIKOZYDY IRYDOIDOWE	
FAZA ROZWOJOWA	**generatywna**	**wegetatywna**	**generatywna**	**wegetatywna**	**generatywna**	**wegetatywna**
1. rośliny rosnące w pełnym świetle	0,21c	0,1 c	0,71 c	0,89 b	0,36 c	0,33 c
2. rośliny rosnące pod pojedynczą cieniówka	0,36 ab	0,27 b	0,83 b	0,92 b	0,4 b	0,42 b
3. rośliny rosnące pod podwójną cieniówką	0,45 a	0,39 a	1,24 a	1,29 a	0,57 a	0,51 a
Średnia dla fazy rozwojowej	**0,34***	**0,25**	**0,92**	**1,03***	**0,44***	**0,42**

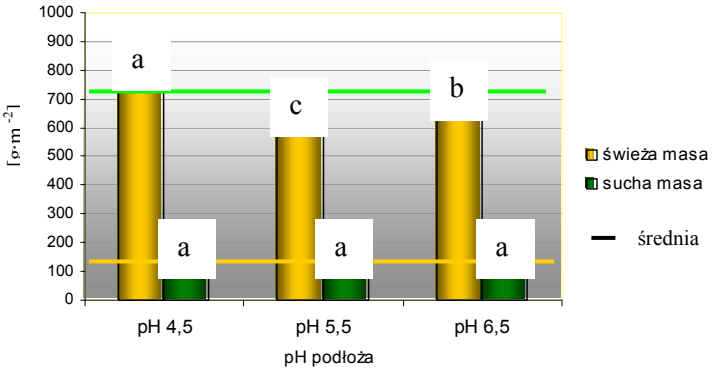
* średnie oznaczone tą samą literą nie różniły się istotnie przy poziomie istotności α=0,05 wg testu Tukey'a

Wpływ pH podłoża na rozwój roślin, plon i jakość surowca

Badając wpływ pH podłoża na rozwój roślin i jakość surowca stwierdzono, że odczyn gleby wpływa na cechy morfologiczno-rozwojowe marzanki wonnej i zawartość w zielu związków biologicznie czynnych. I tak najdłuższe pędy wykształciły rośliny rosnące na podłożu o pH 5,5 (32 cm) (wykres 32), natomiast istotnie wyższą masę ziela uzyskano z roślin rosnących na podłożu o pH 4,5 (780 $g \cdot m^{-2}$) (wykres 33). Najwyższą ogólną zawartością kumaryn i glikozydów irydoidowych charakteryzowało się ziele roślin rosnących na podłożu o pH 5,5, natomiast polifenolokwasów - o pH 6,5 (tab. 6).



Wyk. 32. Przyrost wysokości roślin w zależności od pH gleby [cm]



Wyk. 33. Masa świeżego i suchego ziela w zależności od **pH gleby [$g \cdot m^{-2}$]**

* średnie oznaczone tą samą literą nie różniły się istotnie przy poziomie istotności α=0,05% wg testu Tuckey'a

Tab. 5. Zawartość związków biologicznie aktywnych w suchym zielu [%·s.m]

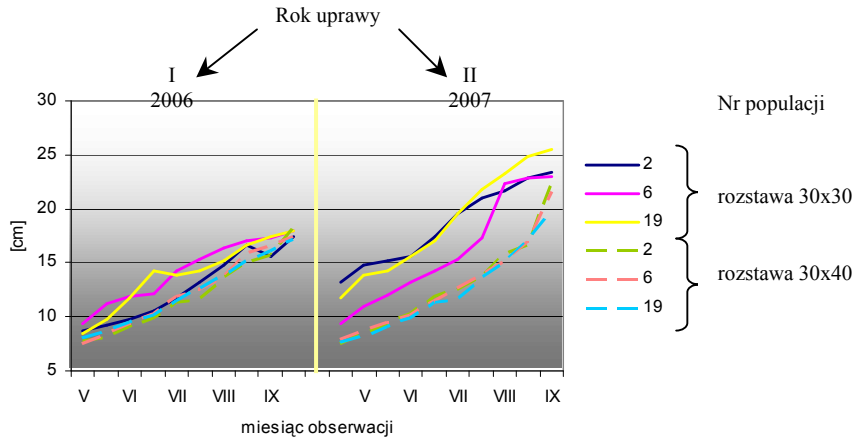
pH gleby	kumaryny	polifenolokwasy	glikozydy irydoidowe
pH 4,5	0,80 b*	0,53 b	0,93 b
pH 5,5	1,10 a	0,60 ab	1,32 a
pH 6,5	0,54 c	0,71 a	1,00 ab
średnia	0,80	0,62	1,06

* średnie oznaczone tą samą literą nie różniły się istotnie przy poziomie istotności α=0,05

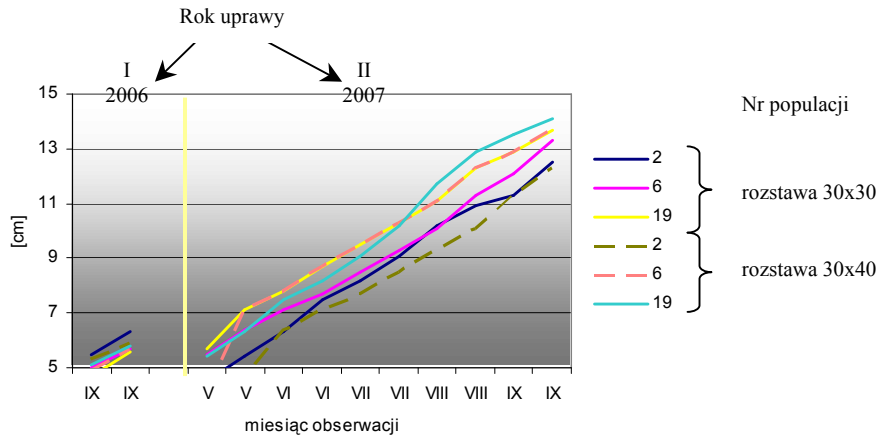
Wpływ sposobu zakładania plantacji na plon i jakość surowca

W ścisłych doświadczeniach polowych starano się określić wpływ terminu sadzenia marzanki wonnej oraz zagęszczenia roślin na ich rozwój i jakość ziela. Badano rośliny 3 populacji charakteryzujących się intensywnym wzrostem i wysoką zawartością związków biologicznie aktywnych. Rośliny posadzone w terminie wiosennym charakteryzowały się intensywniejszym wzrostem niż w jesiennym (wykres 34-37). Wyższą masę ziela uzyskano przy wiosennym terminie zakładania plantacji oraz kiedy ścinano rośliny w okresie ich kwitnienia (wykres 38 i 39). Nie stwierdzono natomiast wpływu zagęszczenia roślin na poletku na plon ziela.

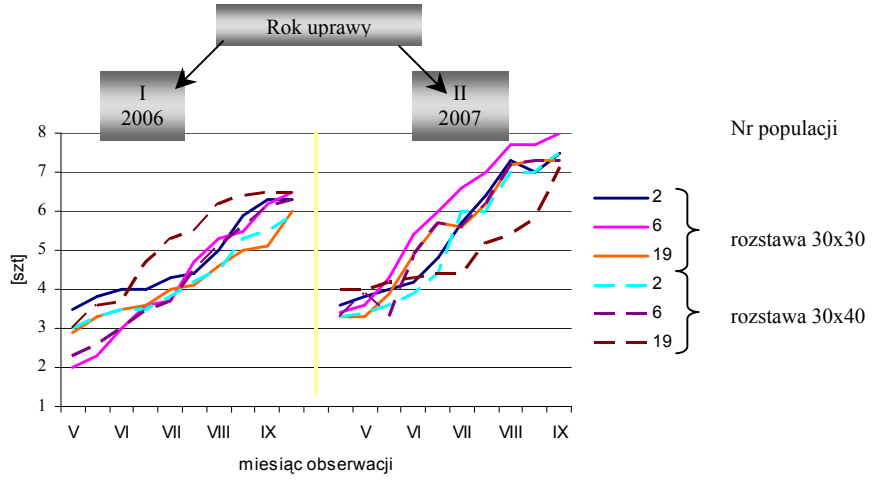
Wyższą zawartością związków kumarynowych i glikozydów irydoidowych charakteryzowało się ziele pozyskane z roślin sadzonych wiosną niż jesienią. Natomiast termin zakładania plantacji nie miał istotnego wpływu na zawartość kwasów polifenolowych w surowcu (tab. 6 i 7).



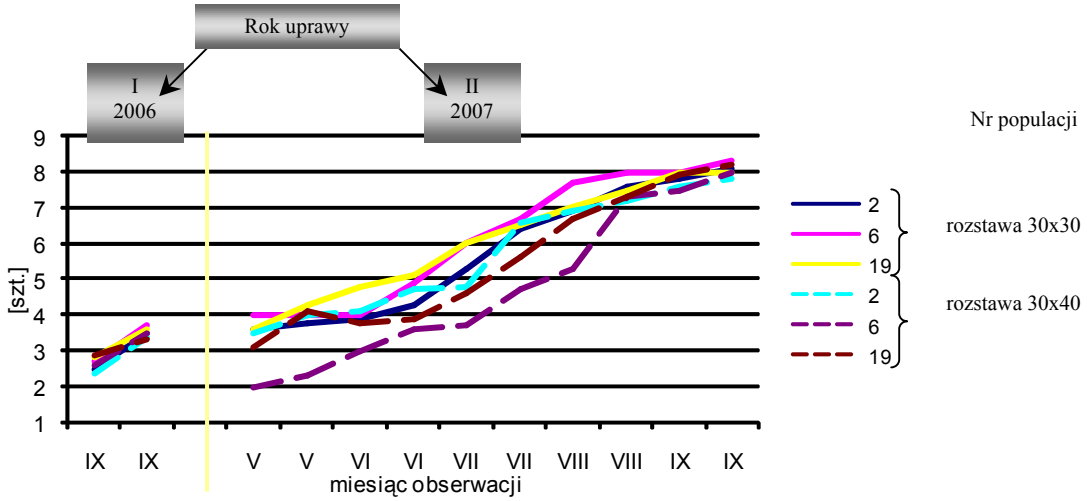
Wyk. 34. Przyrost długości pędów roślin posadzonych w maju [cm]



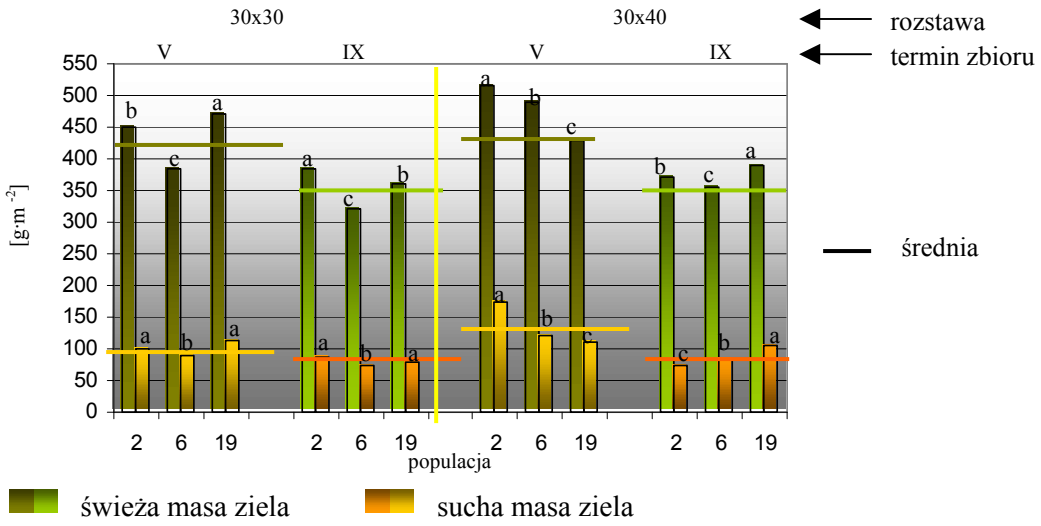
Wyk. 35. Przyrost długości pędów roślin posadzonych we wrześniu [cm]



Wyk. 36. Liczba okółków na pędzie roślin posadzonych w maju [szt.]

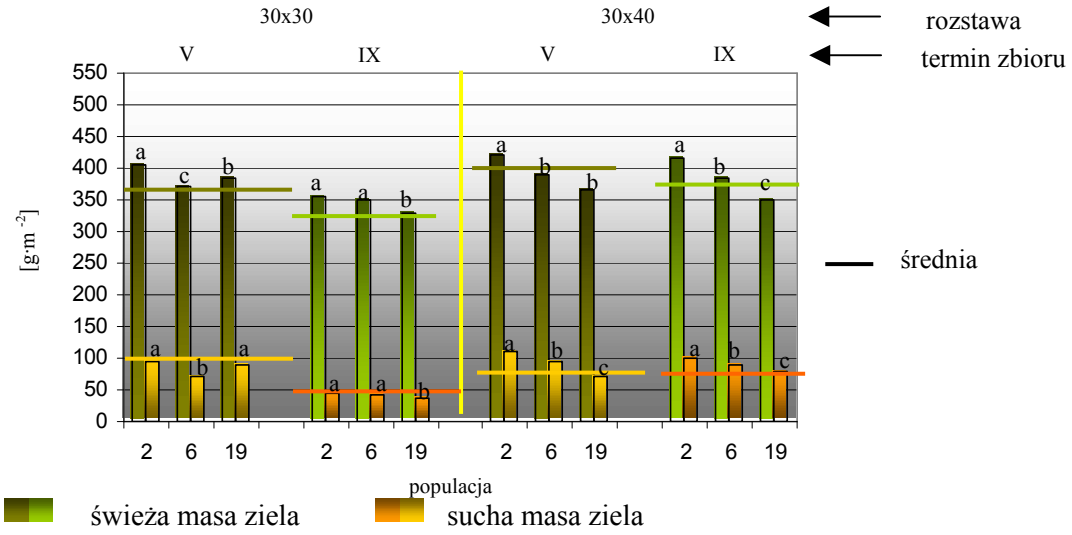


Wyk. 37. Liczba okółków na pędzie roślin posadzonych we wrześniu [szt.]



Jednakowymi literami oznaczono wartości nie różniące się istotnie na poziomie α=0,05 wg testu Tukey'a

Wyk. 38. Świeża i powietrznie sucha masa ziela (wiosenny termin sadzenia) [g·m^{-2}]



Jednakowymi literami oznaczono wartości nie różniące się istotnie na poziomie α=0,05 wg testu Tukey'a

Wyk. 39. Świeża i powietrznie sucha masa ziela (jesienny termin sadzenia) [g·m $^{-2}$]

Tab. 6. Zawartość związków biologicznie aktywnych w zielu marzanki (wiosenny termin sadzenia) [% s.m.]

GRUPA ZWIĄZKÓW	KUMARYNY				POLIFENOLOKWASY				GLIKOZYDY IRYDOIDOWE			
ROZSTAWA	30x30		30x40		30x30		30x40		30x30		30x40	
POPULACJA	g.	w.	g.	w.	g.	w.	g.	w.	g.	w.	g.	w.
2	0,36	0,29	0,36	0,27	1,55	1,1	1,53	1,05	0,78	0,45	0,75	0,45
6	0,23	0,19	0,24	0,18	1,03	0,8	1,07	0,8	0,66	0,37	0,64	0,39
19	0,33	0,25	0,31	0,25	1,4	1,2	1,41	1,18	0,67	0,4	0,66	0,41
średnia dla rozstawy	**0,27**		**0,26**		**1,18**		**1,17**		**0,55**		**0,55**	
średnia dla fazy rozwojowej	**g: 0,3***		**w: 0,24**		**g:1,33***		**w: 1,02**		**g: 0,69***		**w: 0,41**	
A: populacja	p-V				p-V				p-V			
	0,0000				0,0001				0,0083			
B: faza	0,0000				0,0000				0,0001			
C: rozstawa	0,0656				0,8307				0,6180			

g – ziele zebrane w fazie generatywnej
w – ziele zebrane w fazie wegetatywnej
W tabeli przedstawiono średnie wyniki z dwóch lat badań $^{*}p < 0,05$

Tab. 7. Zawartość związków biologicznie aktywnych w zielu marzanki (jesienny termin sadzenia) [% s.m.]

GRUPA ZWIĄZKÓW	KUMARYNY				POLIFENOLOKWASY				GLIKOZYDY IRYDOIDOWE			
ROZSTAWA	30x30		30x40		30x30		30x40		30x30		30x40	
POPULACJA	g.	w.	g.	w.	g.	w.	g.	w.	g.	w.	g.	w.
2	0,35	0,21	0,31	0,2	1,51	1,1	1,56	1,03	0,65	0,4	0,63	0,41
5	0,2	0,11	0,25	0,14	1,01	0,7	1,1	1,01	0,6	0,31	0,59	0,33
19	0,29	0,18	0,27	0,16	1,38	1,5	1,43	1,2	0,55	0,32	0,55	0,29
średnia dla rozstawy	**0,22**		**0,22**		**1,2**		**1,18**		**0,47**		**0,46**	
średnia dla fazy rozwojowej	**g: 0,27***		**w: 0,17**		**g:1,33***		**w:1,09**		**g:0,59***		**w: 0,34**	
A: populacja	p-V				p-V				p-V			
	0,0629				0,0001				0,0280			
B: faza	0,0008				0,0001				0,0001			
C: rozstawa	0,9981				0,2637				0,8907			

g – ziele zebrane w fazie generatywnej
w – ziele zebrane w fazie wegetatywnej
W tabeli przedstawiono średnie wyniki z dwóch lat badań, $^{*}p < 0,05$

5. Ocena wpływu warunków ekstrakcji na skład chemiczny uzyskanych ekstraktów

Wydajność ekstrakcji oraz zawartość w ekstraktach z ziela marzanki określanych związków biologicznie aktywnych istotnie zależała od rodzaju ekstrakcji oraz użytego rozpuszczalnika. Wydajność ekstrakcji przeprowadzonej w łaźni ultradźwiękowej (39%), jak i aparacie Soxhleta (42,5%) była wyższa niż ekstrakcji pod chłodnicą zwrotną (29%). Ekstrakcje, w których jako ekstrahenta użyto wodę okazały się wydajniejsze (41,4%) niż te, w których ekstrahentem był alkohol (31,8%). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze prace Martino i in. (2006). Wyższą zawartością kumaryn charakteryzowały się ekstrakty alkoholowe, natomiast kwasów polifenolowych-wodne. Stwierdzono także, że jakość uzyskanych wyciągów istotnie zależy od fazy rozwojowej roślin w której zbierano surowiec (tab. 8 i 9).

Tab. 8. Zawartość kumaryn w ekstraktach [%]

MEDIUM EKSTRAKCYJNE	RODZAJ EKSTRAKCJI			
	POD CHŁODNICĄ ZWROTNĄ	W ŁAŹNI ULTRADZWIĘKOWEJ	W APARACIE SOXHLETA	średnia
Ziele zebrane w fazie generatywnej				
ALKOHOL	0,12	0,21	0,26	0,19
WODA	0,08	0,16	0,19	0,14
średnia	0,10	0,18	0,22	
Ziele zebrane w fazie wegetatywnej				
ALKOHOL	0,07	0,14	0,19	0,13
WODA	0,05	0,06	0,17	0,09
średnia	0,06	0,10	0,18	

medium ekstrakcyjne	średnia	rodzaj ekstrakcji	średnia
alkohol	0,16*	pod chłodnicą	0,08
woda	0,11	w łaźni	0,1
*p<0,01		w aparacie Soxhleta	0,2
		$NIR_{\alpha=0,01}$	0,036

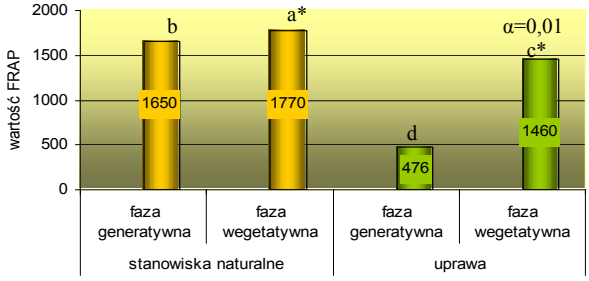
Tab. 9. Zawartość polifenolokwasów w ekstraktach, w przeliczeniu na kwas kawowy [%]

MEDIUM EKSTRAKCYJNE	RODZAJ EKSTRAKCJI			
	POD CHŁODNICĄ ZWROTNĄ	W ŁAŹNI ULTRADZWIĘKOWEJ	W APARACIE SOXHLETA	średnia
Ziele zebrane w fazie generatywnej				
ALKOHOL	0,76	0,93	0,97	0,88
WODA	1,44	1,92	2,01	1,79
średnia	1,10	1,42	1,49	
Ziele zebrane w fazie wegetatywnej				
ALKOHOL	0,47	0,99	1,04	0,83
WODA	1,21	1,91	1,98	1,7
średnia	0,84	1,45	1,51	

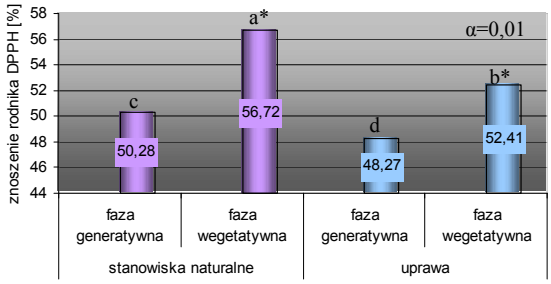
medium ekstrakcyjne	średnia	rodzaj ekstrakcji	średnia
alkohol	0,85	pod chłodnicą	0,97
woda	1,73*	w łaźni	1,43
*p<0,01		w aparacie Soxhleta	1,5
		$NIR_{\alpha=0,01}$	0,036

6. Ocena aktywności przeciwutleniającej ekstraktów

Większą aktywność przeciwutleniającą posiadały ekstrakty uzyskane z ziela pochodzącego ze stanowisk naturalnych (charakteryzującego się wyższą zawartością polifenolokwasów) niż z uprawy (wykres 40 i 41). Aktywność przeciwutleniająca na ogół jest związana z zawartością polifenoli, co potwierdzają wcześniejsze badania Velioglu i in. (1998), Makarskiej i Michalak (2005), Jamroza i in. (2006) oraz Drużyńskiej i Jeżak (2007).



Wyk. 40. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów oznaczona metodą FRAP



Wyk. 41. Efekt znoszenia rodnika DPPH

WNIOSKI

1. Badane populacje marzanki wonnej występowały w czterech typach zbiorowisk roślinnych: *Carpinion betuli, Alno-Ulmion, Tilio-Carpinetum, Querco-roboris Pinetum.*
2. Analiza 20 populacji wykazała, że nie są one zróżnicowane pod względem zawartości jądrowego DNA, która wahała się od 1,34 do 1,43 pg/2C.
3. Niewłaściwy zbiór ziela marzanki wonnej na stanowiskach naturalnych, polegający na ścinaniu ulistnionych pędów przy ziemi, prowadzi do wyraźnego osłabienia roślin, a nawet do ich zamierania.
4. Marzankę wonną można skutecznie rozmnażać w kulturach *in vitro*:
    - wysoką skutecznością odkażania eksplantatów charakteryzuje się podchloryn sodu,
    - optymalną pożywką do regeneracji pędów jest pożywka MS bez regulatorów wzrostu,
    - dłuższe pędy oraz lepsze ukorzenianie eksplantatów można uzyskać przy poziomie napromienienia 7,5 $\mu E \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$.
5. W uprawie na rozwój marzanki wonnej jak i na jakość ziela istotny wpływ mają termin zakładania plantacji, pH podłoża oraz zacienienie roślin.
6. Rośliny badanych populacji w nieznacznym stopniu różniły się pod względem morfologiczno-rozwojowym, przy czym różnice te były bardziej wyraźne u roślin przeniesionych do uprawy.
7. Oceniane populacje marzanki wonnej różniły się pod względem składu chemicznego. Rośliny pochodzące z rejonu warmińsko-mazurskiego charakteryzowały się wyższą zawartością kumaryn niż te z woj. lubelskiego.
8. Zawartość związków biologicznie aktywnych w zielu zależała od fazy rozwojowej roślin:
    - najwyższą zawartością kumaryn charakteryzowało się ziele zebrane w okresie kwitnienia roślin,
    - najwyższą zawartością kwasów fenolowych i związków irydoidowych charakteryzowało się ziele zebrane w fazie wegetatywnej, po kwitnieniu roślin.
9. Ziele pochodzące z roślin uprawianych charakteryzowało się wyższą zawartością kumaryn, natomiast niższą zawartością kwasów fenolowych i związków irydoidowych niż ziele pochodzące ze stanowisk naturalnych.
10. Wyższą wydajnością technologiczną charakteryzowała się ekstrakcja przy użyciu łaźni ultradźwiękowej i aparatu Soxleta niż pod chłodnicą zwrotną.
11. Ekstrakty alkoholowe odznaczały się wyższą zawartością związków kumarynowych, natomiast wodne-kwasów polifenolowych.
12. Najwyższą siłą przeciwutleniającą wyróżniały się wyciągi z ziela zebranego ze stanowisk naturalnych w wegetatywnej fazie rozwoju roślin roślin.

BIBLIOGRAFIA

Baser K., Ozek T., Kremer N., Deliorman D., Ergun F. 2004. Composition of the essential oils of *Galium aparine* L. and *Galium odoratum* (L.) Scop. from Turkey. J. Essent. Oil Res. 16 (4): 305-307.

Benzie I.F.F., Strain J.J. 1999. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology 299: 15-27.

Braun-Blanquet J. 1964. Pflanzensocjologie. Springer, Wien, New York.

Chen J.H., Ho C.T. 1997. Antioxidant activities of coffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. Agric. Food. Chem. 45: 2374-2378.

Drużyńska B., Jeżak A. 2007. Właściwości przeciwutleniające polifenoli zawartych w okrywie nasiennej nasion bobu. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 5 (54): 113-121.

Farmakopea Polska VI. 2002. Wyd. PTF, Warszawa.

Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. 1965. Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean cell cultures. Exp. Cell. Res. 50: 151-158.

Hlava B., Stary F., Pospisil F. 1984. Rośliny kosmetyczne. Wyd. PWRiL, Warszawa

Jamróz J., Mazurek A., Kaźmierczuk M., Kargul K. 2006. Aktywność przeciwutleniająca wyciągów otrzymywanych z aromatycznych odmian chmielu. Acta Agroph. 7 (4): 895-899.

Jendrzejczak E. 1998. Zastosowanie metody analizy skupień w porównawczych badaniach wpływu czynników na różne cechy roślin. Post. Nauk. Rol. 4: 67-75.

Klavina D., Gailite A., Jakobsone G., Necajeva J., Gavrilova G. 2004. Tissue culture technology in conservation of threatened plant species of Latvia. Acta Univ. Latv., Biology 676: 183-188.

Mahlajuk W. P. 1991. Lekarstwiennyje rastenja w narodnoj medicine. Priwolżckoje kniżnoje izdatelctwo: 121-123.

Makarska E., Michalak M. 2005. Aktywność przeciwutleniająca kwasów fenolowych jęczmienia jarego. Annales UMCS, Sec. E. 60: 263-269.

Martino E., Ramaiola I., Urbano M., Bracco F., Collina S. 2006. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. J. Chrom. 1125: 147-151.

Matuszkiewicz W. 2001. Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski. Wyd. PWN, Warszawa.

Matuszkiewicz J. M. 2002. Zespoły leśne Polski. Wyd. PWN, Warszawa.

Murashige T., Skoog E. 1962. A revised medium for rapid growth and biomasses with *Tabacco* tissue culture. Plant Physiol. 15: 473-497.

Osińska E., Rosłon W. 2004. Wstępne badania nad uprawą marzanki wonnej (*Asperula odorata* L.). Folia Univ. Agric. Stetin. 239 (95): 285-288.

Oświęcimska M., Sendra J., Gawłowska J., Kmieć K., Strzałka M., Janeczko Z. 1984. Marzanka wonna *Asperula odorata* L. w Polsce Południowej cz. I. Studia Naturae 25: 11-36.

Ożarowski A., Jaroniewski W. 1987. Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Wyd. IWZZ, Warszawa: 247-248.

Pawłowski B. 1977. Skład i budowa zbiorowisk roślinnych oraz metody ich badania. Wyd. PWN, Warszawa.

Skalińska M., Czapik R., Piotrowicz M. 1959. Chromosome numbers of Angiosperms. Acta Soc. Bot. Pol. 20: 505-529.

Rout G. R. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. Biotech. Adv. 18: 91-120.

Sneath P. H. A., Sokal R. R. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman and Company, San Francisco: 19-31.

Strzelecka H., Kowalski J. (red.) 2000. Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa. Wyd. PWN, Warszawa.

Sulma T., Tokarz H., Wierzchowska K. 1967. Zmienność morfologiczna marzanki wonnej *Asperula odorata* pochodzącej z różnych zbiorowisk roślinnych w uprawie ogrodowej. Acta Biol. et Med. Soc. Scient. Gedanensis. 11: 321-340.

Sulma T., Wierzchowska-Renke K. 1969. Z badań nad zawartością kumaryny w zielu marzanki wonnej (*Asperula odorata* L.) przeniesionej do uprawy ogrodowej z kilku zbiorowisk zespołu buczyny pomorskiej *(Melico-Fagetum)* Acta Biol. et Med. Soc. Scient. Gedan. 14: 415-422.

Szafer W., Kulczyński S., Pawłowski B. 1988. Rośliny Polskie. Wyd. PWN, Warszawa: 613-618.

Śliwińska E. 1993. Cytometria przepływowa – nowa metoda analizy genomów. Hodowla Roślin i Nasiennictwo 2: 10-15.

Thiem B., Śliwińska E. 2003. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures. Plant Sci.: 164: 129-134.

Tokarz H., Sulma T., Bujewicz M. 1969. Liczebność aparatów szparkowych w liścich marzanki wonnej *Asperula odorata* w różnych ekologicznie zbiorowiskach leśnych jej występowania oraz w uprawie ogrodowej. Acta Biol. et Med. Soc. Scient. Gedan. 14: 443-467.

Wierzchowska-Renke K., Stecka L. 1976. Oznaczanie zawartości kumaryn w żubrówce leśnej. Nomae Herb. 4: 8-11.

Wilson G., Balague C. 2007. Biosynthesis of anthraquinone by cells of *Galium mollugo* L., growth in a chemostat with limiting sucrose or phosphate. J. Exper. Bot. 36: 485-493.

Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. J. Agric. Food Chem. 46: 4113-4117.

Zaręba R. 1988. Fitosocjologia i typologia leśna. Wyd. SGGW-AR, Warszawa: 67-69.

Zarzycki K., Trzcińska-Tacik H., Różańsko W., Szeląg W., Wołek J., Korzeniak U. 2002. Ekologiczne liczby wskaźnikowe roślin naczyniowych Polski. Instytut Botaniki, Polska Akademia Nauk, Kraków.