
Piotr Madanecki

**Badanie wpływu żerowania wybranych gatunków
owadów na jakość surowca leczniczego
pozyskiwanego z roślin szpilkowych na przykładzie
jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.)
i sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)**

Praca doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie
Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Wydziału Farmaceutycznego
Akademii Medycznej w Gdańsku

Promotor

Prof. dr hab. J. Renata Ochocka

Gdańsk 2005

Spis treści

WSTĘP.....	8
CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	10
1 Rośliny lecznicze i owady.....	10
1.1 Rola owadów w życiu roślin.....	10
1.2 Owady pożyteczne z punktu widzenia produkcji zielarskiej	11
1.2.1 Owady jako zapylacze roślin leczniczych.....	11
1.2.2 Owady drapieżne i pasożytnicze.....	15
1.2.3 Pozostałe owady pożyteczne pod kątem upraw zielarskich.....	16
1.2.4 Podsumowanie.....	17
1.3 Owady szkodliwe z punktu widzenia produkcji zielarskiej.....	17
1.3.1 Owady roślinożerne.....	17
1.3.2 Podsumowanie.....	23
2 Podstawowe grupy metabolitów wtórnych wytwarzanych przez rośliny w celu obrony przed owadami.....	25
2.1 Działanie wtórnych metabolitów.....	26
2.2 Izoprenoidy.....	27
2.3 Monoterpeny.....	28
3 Taksonomia i biologicznie aktywne związki wybranych gatunków roślin szpilkowych.....	30
3.1 Biologia i taksonomia sosny zwyczajnej <i>Pinus sylvestris</i> L. i jałowca pospolitego <i>Juniperus communis</i> L.....	30
3.1.1 Sosna zwyczajna (<i>Pinus sylvestris</i> L.).....	30
3.1.2 Jałowiec pospolity (<i>Juniperus communis</i> L.).....	32
3.2 Związki biologicznie aktywne izolowane z sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) i jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.).....	34
3.2.1 Skład i zastosowanie olejku sosnowego.....	34
3.2.2 Skład i zastosowanie olejku jałowcowego.....	35
4 Biologia i pozycja systematyczna wybranych gatunków owadów żerujących na sośnie pospolitej <i>Pinus sylvestris</i> L. i jałowcu pospolitym <i>Juniperus communis</i> L.	37

4.1 Miodownica sosnowa (<i>Cinara pini</i> L.).....	38
4.2 Znamionek jałowcowy (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.).....	40
5 Wybrane metody analizy ilościowej i jakościowej olejków eterycznych.....	45
5.1 Chromatografia gazowa w achiralnej i chiralnej analizie składników olejków eterycznych	45
5.2 Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME).....	47
6 Analiza i składowanie danych chromatograficznych.....	54
6.1 Sieciowe oprogramowanie naukowe - przegląd technologii.....	55
6.2 Wizualizacja danych naukowych, a grafika wektorowa w sieci Internet.....	56
6.3 Wizualizacja danych chromatograficznych.....	58
6.4 Podsumowanie.....	58
7 Podstawy teoretyczne metody optymalizacji Taguchi	60
8 Podsumowanie.....	64
CEL PRACY.....	65
MATERIAŁY I METODY.....	67
1 Odczynniki, bufony i roztwory.....	67
2 Aparatura.....	68
3 Eksploracja obszaru badań.....	69
4 Materiał roślinny używany podczas realizacji pracy.....	70
4.1 Materiał użyty w optymalizacji metody headspace SPME pod kątem analizy materiałów pochodzących z różnych gatunków roślin szpilkowych.....	70
4.2 Materiał roślinny użyty w badaniu sezonowej zmienności składu związków monoterpenu.....	71
4.3 Materiał roślinny użyty w badaniu wpływu żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) na skład chemiczny frakcji monoterpenu szyszkojagód jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.).....	72
4.4 Materiał roślinny użyty w badaniu wpływu żerowania miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.) na skład chemiczny frakcji monoterpenu młodych pędów sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.).....	75
5 Metodyka zbioru i przechowywania materiału roślinnego.....	78

5.1 Metodyka zbioru i przechowywania materiału do optymalizacji metody headspace SPME pod kątem analizy materiałów pochodzących z różnych gatunków roślin szpilkowych.....	78
5.2 Metodyka zbioru i przechowywania materiału do badań sezonowych zmian składu związków monoterpenuych.....	78
5.3 Metodyka zbioru i przechowywania materiału do badań wpływu żerowania owadów na skład chemiczny roślin żywicielskich.....	79
5.3.1 Metodyka zbioru i przechowywania materiału do badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.) na skład frakcji monoterpenuych młodych pędów sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.).....	79
5.3.2 Metodyka zbioru i przechowywania materiału do badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) na skład frakcji monoterpenuych jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.).....	81
6 Optymalizacja warunków headspace SPME z uwzględnieniem metody Taguchi.....	84
7 Przygotowanie materiału do analiz chromatograficznych z użyciem metody headspace SPME/GC.....	90
8 Analiza lotnych składników olejku metodą headspace SPME/GC.....	91
8.1 Headspace SPME.....	91
8.2 Analizy chromatograficzne.....	92
8.2.1 Warunki wykonywania analiz chromatograficznych.....	92
8.2.2 Ocena metody headspace SPME/GC w analizie mieszanin lotnych związków.....	96
9 Badanie sezonowej zmienności składu olejku sosny zwyczajnej.....	100
10 Badanie osobniczej zmienności składu olejku sosny zwyczajnej i jałowca pospolitego.....	100
11 Projektowanie i realizacja sieciowego systemu archiwizacji i analizy danych chromatograficznych ChromNET.....	101
11.1 Cele.....	101
11.2 Założenia projektowe.....	101
11.3 Budowa aplikacji.....	102
11.4 Wykorzystane narzędzia programistyczne.....	105
12 Analiza danych chromatograficznych.....	106
12.1 Rejestracja i integracja przy pomocy oprogramowania Chroma.....	106
12.2 Wstępna analiza danych chromatograficznych przy pomocy programu ChromNET.....	106

13 Hodowla znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) z zebranych w warunkach naturalnych szyszkojagód jałowca.....	108
14 Przygotowanie preparatów mikroskopowych i technika wykonywania zdjęć.....	109
15 Identyfikacja wykorzystywanych w badaniach gatunków owadów.....	110
16 Ocena odsetka szyszkojagód jałowca wykazujących ślady żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) w dostępnym w handlu surowcu.....	111
WYNIKI I DYSKUSJA.....	113
1 Obserwacja i dokumentacja cyklu życiowego uwzględnionych w badaniach gatunków owadów pod kątem ich znaczenia dla surowca leczniczego.....	114
1.1 Obserwacja i analiza cyklu życiowego i biologii miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.) pod kątem jakości pozyskiwanego z sosny zwyczajnej surowca leczniczego.....	114
1.2 Obserwacja i analiza cyklu życiowego i biologii znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) pod kątem jakości pozyskiwanego z jałowca pospolitego surowca leczniczego.....	116
1.3 Badanie częstości występowania oznak żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) w surowcu znajdującym się w obrocie handlowym na terenie kraju.....	119
2 Badanie zmienności sezonowej składu frakcji monoterpenowej sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.).....	124
2.1 Wyniki analiz chromatograficznych otrzymane w ramach badania zmienności sezonowej składu frakcji monoterpenowej sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.).....	124
2.1.1 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych.....	124
2.1.2 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych.....	127
2.2 Dyskusja.....	128
3 Badanie osobniczej zmienności składu frakcji monoterpenowej wybranych gatunków roślin szpilkowych.....	130
3.1 Osobnicza zmienność składu chemicznego sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) na przykładzie analizy związków monoterpenowych.....	130
3.1.1 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych.....	130
3.1.2 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych.....	132

3.2 Osobnicza zmienność składu chemicznego jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.) na przykładzie analizy związków monoterpenowych.....	134
3.2.1 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych.....	134
3.2.2 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych.....	136
3.3 Dyskusja.....	138
4 Badanie wpływu suszenia i długotrwałego przechowywania na skład chemiczny frakcji monoterpenowej surowca leczniczego pozyskiwanego z sosny zwyczajnej i jałowca pospolitego.....	139
4.1 Wyniki badania zmian składu chemicznego frakcji monoterpenowej młodych pędów sosny zwyczajnej spowodowanych suszeniem i długotrwałym przechowywaniem	139
4.1.1 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych.....	139
4.1.2 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych.....	140
4.2 Wyniki badania zmian składu chemicznego frakcji monoterpenowej szyszkojagód jałowca spowodowanych suszeniem i długotrwałym przechowywaniem	140
4.2.1 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych.....	140
4.2.2 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych.....	142
5 Badanie wpływu żerowania wybranych gatunków owadów na skład surowca pozyskiwanego z sosny zwyczajnej i jałowca pospolitego.....	143
5.1 Badania wpływu żerowania mszycy miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.) na związku monoterpenowe sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.).....	143
5.1.1 Porównanie składu związków monoterpenowych pędów zaatakowanych i nie wykazujących oznak żerowania w obrębie grupy roślin zaatakowanych.....	144
5.1.2 Porównanie składu związków monoterpenowych pędów roślin zaatakowanych i nie wykazujących oznak żerowania mszyc.....	145
5.1.3 Wpływ długotrwałego przechowywania surowca w świetle uszkodzeń wywołanych przez owady.....	146
5.1.4 Wyniki analiz chiralnych w odniesieniu do opisanych wcześniej kierunków badań.....	149
5.2 Żerowanie owadów z gatunku znamionek jałowcowy (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.), a skład związków monoterpenowych szyszkojagód jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.).....	151
5.2.1 Porównanie składu związków monoterpenowych szyszkojagód zaatakowanych i nie wykazujących oznak żerowania w obrębie tego samego osobnika.....	151
5.2.2 Wpływ długotrwałego przechowywania surowca w świetle uszkodzeń wywołanych przez owady.....	153
5.2.3 Wyniki analiz w warunkach chiralnych w odniesieniu do opisanych wcześniej kierunków badań.....	154
5.3 Dyskusja.....	156

6 Zaprojektowanie i stworzenie specjalistycznego oprogramowania do archiwizacji i analizy porównawczej danych chromatograficznych ChromNET.....	162
6.1 Opis oprogramowania ChromNET.....	162
6.2 Podsumowanie.....	171
WNIOSKI.....	173
PIŚMIENNICTWO.....	175
PODZIĘKOWANIA.....	182
DODATEK A – szczegółowe dane wejściowe.....	183
1 Badania sezonowych zmian składu związków monoterpenuowych sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.).....	183
2 Badania wpływu żerowania mszycy miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.) na związki monoterpenuowe w pędach sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.).....	187
3 Badania wpływu żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) na związki monoterpenuowe w szyszkojadach jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.).....	192
4 Ocena metody headspace SPME/GC w analizie mieszanin lotnych związków.....	198
DODATEK B – kod źródłowy oprogramowania ChromNET.....	205
DODATEK C – współpraca naukowa.....	206
DODATEK D – spisy fotografii, rysunków i tabel.....	207

WSTĘP

415 mln lat temu, gdy rośliny rozpoczynały dopiero podbój lądów, nic nie zapowiadało jeszcze problemów z jakimi miały się uporać. Nowe środowisko wymagało wykształcenia szeregu nowych przystosowań takich jak wykształcenie struktur oddechowych, tkanek wzmacniających i przewodzących. Jednak w drodze na ląd podążały za nimi jeszcze inne organizmy. Prymitywne bezkręgowce coraz bardziej uniezależniały się od życia w wodzie, a najłatwiejszym do zdobycia pokarmem stały się dla nich właśnie one - lądowe rośliny. Pierwsze owady pojawiły się na Ziemi około 250 mln lat temu i wkrótce zdominowały świat zwierzęcy lądów. Od samego początku ich ewolucja powiązana była ściśle z ewolucją roślin. Rozpoczął się trwający do dnia dzisiejszego okres niekończących się, wzajemnych interakcji. Wojny, sojusze, czy wyścigi zbrojeń - każda z tych relacji wywierała piętno na biorących w niej udział organizmach i wymuszała zmiany ewolucyjne. Presja roślinożerców (głównie owadów) zmusiła rośliny do wykształcenia szeregu całkowicie nowych przystosowań. Oprócz zmian morfologicznych zaczęły pojawiać się przystosowania fizjologiczne - powstały pierwsze metabolity wtórne pełniące rolę, często toksycznych dla roślinożerców, repelentów. Wiele z tych substancji stało się później składnikami leków wykorzystywanych przez człowieka. Owady, natomiast, pozostają do dzisiaj w ścisłych związkach z roślinami starając się przystosować swój metabolizm nie tylko do neutralizowania, ale czasami nawet do wykorzystywania, wytwarzanych przez rośliny toksyn.

Ekologia biochemiczna jest dynamicznie rozwijającym się kierunkiem nauki. Znajduje to wyraz w pojawiających się coraz liczniej artykułach naukowych i a także pozycjach książkowych dążących do usystematyzowania coraz większej ilości napływających ciągle informacji [Harborne, 1997] [Cardé i Millar, 2004]. W ostatnich latach wraz z wprowadzaniem coraz bardziej czułych metod analizy chemicznej pojawiły się nieosiągalne dotąd możliwości badań biochemii interakcji roślin i współżyjącymi z nimi owadów [Haynes i Millar, 2000] [Millar i Haynes, 2000]. Wyniki badań takich interakcji nie tylko poszerzają naszą wiedzę o organizmach żywych, ale często znajdują praktyczne zastosowanie w wielu ważnych dziedzinach takich jak: ochrona roślin uprawnych

[Turlings i Tumlinson, 1992] [Loughrin i in., 1994] [Chermanskaya, 1999] [Arimura i in., 2002] gospodarka leśna [Byers, 1981] [Baier i in., 2002], czy ochrona środowiska naturalnego.

Prowadzone obecnie projekty badawcze obejmują coraz większą liczbę gatunków roślin i współżyjących z nimi owadów, lecz ciągle niewiele jest wiadomo na temat wpływu żerowania owadów na skład chemiczny licznych roślin leczniczych, a w konsekwencji na jakość pozyskiwanego z nich surowca.

Celem niniejszego opracowania jest zbadanie wpływu żerowania wybranych gatunków owadów na skład chemiczny surowca pozyskiwanego z dwóch gatunków roślin szpilkowych: sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) i jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.). Obydwa wymienione gatunki roślin znalazły zastosowanie w lecznictwie i zostały uwzględnione w Farmakopei [FP III, 1954] [FP VI, 2002]. Rośliny te stanowią źródło cennych olejków eterycznych. O ich aktywności biologicznej decyduje głównie frakcja monoterpenu. Wpływ żerowania owadów na skład ilościowy i jakościowy tej frakcji był analizowany w niniejszej pracy.

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1 Rośliny lecznicze i owady

Tematem niniejszego rozdziału jest historia i dzień dzisiejszy badań nad interakcjami roślin i owadów. Przedstawiono także podstawowe typy zależności i oddziaływań obserwowane pomiędzy tymi grupami organizmów. Szczególną uwagę zwrócono na ważne z punktu widzenia produkcji zielarskiej interakcje roślin leczniczych i owadów.

1.1 Rola owadów w życiu roślin

Rolę jaką spełniają owady w życiu roślin trudno jest przecenić. Wśród wielu typów zależności najważniejszymi są relacje roślin z owadami żerującymi na nich oraz z owadami zapylającymi ich kwiaty.

Okolo 50% gatunków owadów zaliczanych jest do fitofagów [Boczek i in., 2000]. Gatunki te żywią się żywymi bądź martwymi roślinami i są od nich całkowicie uzależnione. W toku ewolucji rośliny wykształciły szereg sposobów obrony przed żywiącymi się nimi owadami. Jedne z tych metod okazywały się bardziej skuteczne od innych. W wyniku tego można dziś zaobserwować znaczne zróżnicowanie pomiędzy poszczególnymi gatunkami roślin pod względem ilości żerujących na nich gatunków owadów np.: miłorząb jest atakowany jedynie przez nieliczne gatunki owadów, na sośnie żeruje okolo 150 gatunków, a na dębie okolo 1000 [Boczek i in., 2000]. Dotychczasowe obserwacje świadczą jednak, że nie ma gatunków roślin całkowicie wolnych od żerujących na nich owadów.

Jedynie przez zdolność do wykształcania coraz to nowych metod obrony rośliny zdołały uniknąć całkowitego wyniszczenia przez szybko rozmnażające się i przystosowujące o nowych warunków owady. Mechanizmy obrony roślin przed owadami można podzielić na dwie grupy:

- obrona chemiczna polegająca nie tylko na wytwarzaniu szeregu substancji zniechęcających owady do żerowania (repelenty chemiczne czyli trucizny

pokarmowe), ale także na produkcji chemicznych atraktantów wabiących naturalnych wrogów owadów roślinożernych.

- wykształcenie przystosowań morfologicznych i anatomicznych utrudniających lub wręcz uniemożliwiających żerowanie owadów (wytwarzanie włosków, kolców, bardzo twardych i odpornych na zgryzanie liści, struktur umożliwiających osiedlenie się i przeżycie owadów drapieżnych¹)

Poruszając problem interakcji roślin z owadami nie należy jednakże zapominać o pożytecznej roli owadów jako zapylaczy. Z punktu widzenia gospodarki rolnej korzyści płynące z działalności owadów jako zapylaczy nie tylko równoważą, ale wręcz przewyższają wyrządzone przez nie szkody [Boczek i in., 2000]. Podobnych relacji należy także oczekiwać analizując całościowy wpływ działalności owadów na uprawiane na dużą skalę rośliny lecznicze.

1.2 Owady pożyteczne z punktu widzenia produkcji zielarskiej

1.2.1 Owady jako zapylacze roślin leczniczych

Początki aktywności owadów jako zapylaczy roślin datuje się na okres powstania pierwszych okrytonasiennych czyli 125-145 mln lat temu. Początkowo rolę zapylaczy pełniły chrząszcze (*Coleoptera*) z czasem jednak dominować zaczęły młodsze ewolucyjnie grupy owadów takie jak błonkówki (*Hymenoptera*) i motyle (*Lepidoptera*). W ciągu całego okresu koewolucji zmieniały się zarówno rośliny jak i zapylające je owady.

W przypadku roślin zaobserwować można ewolucję kwiatu, który u gatunków owadopylnych przyjmuje żywe barwy i często zwiększa swoje rozmiary. Rośliny zwabiają zapylaczy nie tylko barwą, ale także zapachem. Na kwiatach stwierdzono również występowanie tzw. wskaźników lokalizacji nektaru – barwnych znaków kierujących owady do narządów rozmnażania roślin i nektaru. Znaki takie powstają często przez nierównomierne rozmieszczenie barwnika w różnych obszarach korony kwiatu (np.

¹ przystosowania takie można zaobserwować między innymi u niektórych roślin z rodzaju *Acacia* (np. *Acacia cornigera*)

naparstnica purpurowa – *Digitalis purpurea* L.). Mogą jednak występować w postaci specjalnych brodawek barwnikowych zawierających barwnik o innej budowie chemicznej niż ten, który nadaje podstawową barwę kwiatów (np. *Papaver* sp.). Ciekawym odkryciem było stwierdzenie występowania w roślinach niewidzialnych dla oka ludzkiego wskaźników lokalizacji nektaru [Thompson i in., 1972]. Tworzą je skupienia barwników silnie absorbujących światło w zakresie UV (np. wiesiołek (*Oenothera* sp.)) [Dement i Raven, 1974]). Wskaźniki takie są dostrzegane przez niektóre, wrażliwe na światło UV owady (w tym pszczołę miodną – *Apis mellifera* L.). Odkrycie niewidzialnych dla większości zwierząt wskaźników nektaru w kwiatach roślin, wytwarzanych specjalnie dla zapylających je owadów potwierdza tylko wyjątkowość wzajemnych interakcji pomiędzy tymi grupami organizmów.

W przypadku owadów także zaobserwować można daleko posuniętą specjalizację związaną z pełnioną przez nie funkcją zapylaczy roślin. Modyfikacji uległy narządy gębowe owadów zapylających przystosowując się do pobierania płynnego pokarmu (nektaru) np.: motyle, muchówki, błonkówki. Owady będące zapylaczami aktywnymi w dzień wykazują także większą wrażliwość w percepcji barw.

W toku ewolucji często zachodzi specjalizacja i dostosowanie się określonego gatunku rośliny do określonej grupy gatunków zapylaczy. W skrajnych przypadkach specjalizacja taka prowadzi do sytuacji, gdy dana roślina zapylana jest wyłącznie przez jeden gatunek owada, tak jak ma to miejsce w przypadku figowców (*Ficus* sp.) gdzie niemal każdy gatunek jest zapylany przez odrębny rodzaj niewielkich błonkówek [Harborne, 1997].

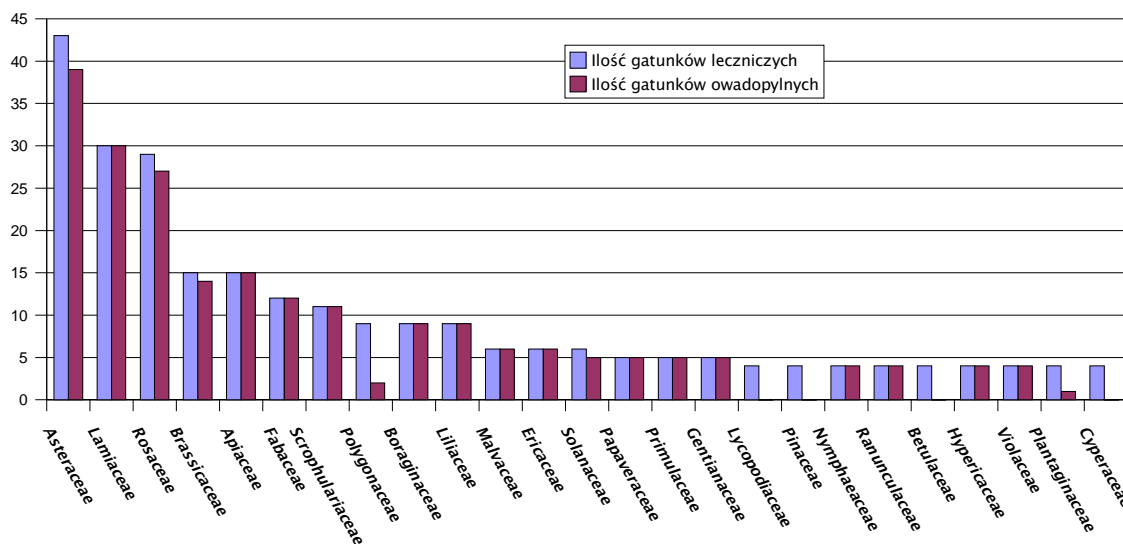
Stwierdzono, że około 78% krajowych gatunków roślin wykorzystuje owady w procesie zapylania. W klimacie umiarkowanym głównym zapylaczem roślin jest pszczoła miodna – zapyla ona kwiaty 75% gatunków roślin owadopylnych. Inne błonkówki zapylają 21% gatunków roślin owadopylnych podczas gdy pozostałe owady zaledwie 4% [Boczek i in., 2000].

Ciekawe dane dotyczące przystosowań roślin do owadopylności uzyskano poprzez analizę bazy danych elektronicznego klucza do oznaczania roślin „Flora Ojczysta” [Moraczewski i in., 2000]. W liczącej 1210 gatunków roślin bazie danych autorzy

oznaczyli 881 gatunków (72,8%) jako rośliny owadopylne. Jeszcze większy odsetek gatunków owadopylnych można stwierdzić wśród roślin zaklasyfikowanych przez autorów niniejszej publikacji jako rośliny lecznicze. Wśród 336 gatunków oznaczonych jako rośliny lecznicze aż u 275 gatunków występuje zjawisko zapylania przez owady. Oznacza to, że około 82% rodzimych roślin leczniczych zapylanych jest przez owady.

Tabela nr 1 Częstość występowania różnych form zapylania wśród roślin na podstawie bazy danych programu „Flora Ojczysta” [Moraczewski i in., 2000]

	Rośliny lecznicze (336 gatunków)		Wszystkie rośliny uwzględnione w bazie danych (1210 gatunków)	
Ilość gatunków, u których zapylanie nie występuje	10	(2,9%)	40	(3,3%)
Ilość gatunków owadopylnych	275	(81,8%)	881	(72,8%)
Ilość gatunków wiatropylnych	49	(14,6%)	270	(22,3%)
Ilość gatunków hydrogamicznych	1	(0,3%)	5	(0,4%)
Ilość gatunków samopylnych	98	(29,2%)	337	(27,8%)
Ilość gatunków apogamicznych	7	(2,1%)	16	(1,3%)



Rys. 1 Schemat obrazujący udział gatunków owadopylnych wśród roślin leczniczych w poszczególnych rodzinach.

Jak już wcześniej wspomniano, w klimacie umiarkowanym głównym zapylaczem roślin jest pszczoła miodna. Przystosowania roślin do zapylania przez tego owada objawiają się dużym odsetkiem gatunków o kwiatach żółtych, niebieskich lub

białych. Wynika to z faktu, iż kwiaty o takich barwach są najchętniej odwiedzane przez pszczoły [von Frish, 1950]. Analiza wykonana z pomocą elektronicznego klucza do oznaczania roślin „Flora Ojczysta” [Moraczewski i in., 2000] wykazała, że 90,9% gatunków roślin owadopylnych uwzględnionych w bazie danych programu wytwarza kwiaty w wymienionych kolorach. Wśród owadopylnych roślin leczniczych odsetek ten jest jeszcze większy i wynosi 93%^{2,3}.

Tabela nr 2 Zestawienie barw kwiatów roślin leczniczych na tle wszystkich gatunków roślin uwzględnionych w komputerowym kluczu do oznaczania roślin Flora Ojczysta [Moraczewski i in., 2000]

Barwa kwiatów	Owadopylne rośliny lecznicze (275 gat.)			Wszystkie owadopylne rośliny uwzględnione w bazie danych (881 gat.)		
	białe	żółte	niebieskie	białe	żółte	niebieskie
Ilość gatunków	143	97	16	412	329	60
Razem	256 gatunków (93%)			801 gatunków (90,9%)		

Szczególnie preferowane przez pszczołę miodną są rośliny z rodzin *Lamiaceae*, *Scrophulariaceae*, *Fabaceae*, a także *Asteraceae*, do których należy wiele gatunków roślin leczniczych. Wiele z nich jest uprawianych na dużą skalę.

Ewolucja roślin w kierunku zapylania przez owady prowadziła do znacznych przekształceń kwiatów dotyczących nie tylko ich barwy, ale także kształtu. Uważa się, że ewolucja roślin owadopylnych przebiegała od kwiatów promienistych w kierunku kwiatów grzbiecistych. Cecha grzbiecistości kwiatów jest więc bezpośrednio związana z owadopylnością, a częstość występowania gatunków o kwiatach grzbiecistych może być pewnym wyznacznikiem powiązań procesu zapylania u roślin z owadami.

² przedstawione dane otrzymano stosując standardową konfigurację programu (margines bezpieczeństwa dla cech rozmytych: średni).

³ nie uwzględniono kwiatów o barwach pośrednich np. niebieskofioletowych

Tabela nr 3 Częstość występowania kwiatów grzbiecistych u roślin leczniczych na tle wszystkich gatunków uwzględnionych w komputerowym kluczu do oznaczania roślin Flora Ojczysta [Moraczewski i in., 2000]

	Owadopylne rośliny lecznicze (275 gatunków)	Wszystkie owadopylne rośliny uwzględnione w bazie danych (881 gatunków)
Ilość gatunków o kwiatkach grzbiecistych	97 (35,3%)	337 (38,2%)

Ocenia się, że w USA szkodniki owadzie powodują straty w wysokości 3,5 mld USD, jednak zyski jakie przynoszą owady zapylające rośliny przewyższają wymienione straty i oceniane są na 4 mld USD [Boczek i in., 2000]

Na koniec należy jeszcze wspomnieć o zjawisku samozapylenia roślin. U wielu roślin (nawet u gatunków posiadających grzbieciste kwiaty o budowie wyraźnie sugerującej owadopylność) występuje zjawisko samopylności (zapylenia własnym pyłkiem). Zdolność taka uniezależnia roślinę od owadów. Z drugiej jednak strony nie zapewnia przenoszenia materiału genetycznego pomiędzy różnymi osobnikami (samozapylenie zachodzi najczęściej w obrębie jednego kwiatu). Uważa się jednak, że nawet w przypadku takich gatunków roślin zapylenie przez owady jest korzystne. U osobników zapyłanych przez owady następuje efektywniejsze zawiązywanie nasion [Harborne, 1997].

1.2.2 Owady drapieżne i pasożytnicze

Owady drapieżne i pasożytnicze przyczyniają się do obniżenia liczebności populacji gatunków szkodliwych z punktu widzenia produkcji zielarskiej. Rola owadów jako pasożytów i drapieżców nie ogranicza się jedynie do redukcji liczebności innych owadów. Wiele owadów drapieżnych atakuje groźne dla upraw ślimaki, a gatunki pasożytnicze żerują m.in. na roślinożernych gryzoniach.

Tabela nr 4 Owady drapieżne i pasożytnicze – zestawienie najważniejszych grup.

Rola ekologiczna	Rząd	Grupa	Uwagi
Pasożyty	muchówki (<i>Diptera</i>)	rączyce (<i>Tachinidae</i>)	pasożyty m. in. gąsienic motyli (<i>Lepidoptera</i>), larw rośliniarek (<i>Symphyla</i>), komarnic (<i>Tipulidae</i>)
	błonkówki (<i>Hymenoptera</i>)	gąsienicznikowate (<i>Ichneumonidae</i>)	pasożyty wewnętrzne i zewnętrzne gąsienic motyli (<i>Lepidoptera</i>), larw chrząszczy (<i>Coleoptera</i>) i innych owadów
		męczelkowate (<i>Braconidae</i>)	
		bleskotkowate (<i>Chalcididae</i>)	
	kruszynkowate (<i>Trichogrammatidae</i>)		
Drapieżne	Ważki (<i>Odonata</i>)	wiele gatunków	aktywni drapieżcy chwytający ofiary (inne owady) w locie, larwy także są drapieżne
	siatkoskrzydłe (<i>Neuroptera</i>)	złotooki (<i>Chrysopidae</i>)	drapieżne larwy niszczą mszyce (<i>Aphidodea</i>), wciernastki (<i>Thysanoptera</i>), czerwce, skoczki (<i>Jassidae</i>) i inne owady
	pluskwiaki różnoskrzydłe (<i>Heteroptera</i>)	wiele gatunków	larwy i formy dorosłe polują na inne owady
	Chrząszcze (<i>Coleoptera</i>)	biagaczowate (<i>Carabidae</i>)	larwy i postacie dorosłe atakują dżdżownice, ślimaki i inne owady
		biedronkowate (<i>Coccinellidae</i>)	larwy i postacie dorosłe atakują mszyce (<i>Aphidodea</i>), czerwce (<i>Coccoidea</i>), przedziorki (<i>Tetranychidae</i>)
muchówki (<i>Diptera</i>)	bzygowate (<i>Syrphidae</i>)	drapieżne larwy niektórych gatunków atakują mszyce (<i>Aphidodea</i>)	

Owady drapieżne i pasożytnicze są z powodzeniem wykorzystywane w walce biologicznej ze szkodnikami roślin uprawnych. Bez wątplenia pozostało jeszcze wiele gatunków wartych zbadania pod kątem ich wykorzystania w walce biologicznej ze szkodnikami roślin leczniczych.

1.2.3 Pozostałe owady pożyteczne pod kątem upraw zielarskich

Wiele gatunków owadów roślinożernych odgrywa dużą rolę w regulacji liczebności chwastów występujących w uprawach polnych. Podobną rolę mogą one odgrywać w uprawach roślin zielarskich.

Owady żyjące w glebie stale bądź przechodzące w niej jedynie część cyklu życiowego przyczyniają się do jej spulchniania.

1.2.4 Podsumowanie

Jak wykazano w niniejszym rozdziale owady są nieodzownym czynnikiem zapylania, a co za tym idzie zawiązywania nasion, większości gatunków roślin strefy umiarkowanej. Nawet rośliny, u których dominuje zjawisko samozapylania nie utraciły zdolności do wykorzystywania owadów jako roznosicieli pyłku. Wśród roślin leczniczych odsetek gatunków owadopylnych jest nawet większy niż odsetek gatunków owadopylnych wśród wszystkich krajowych gatunków roślin. Wiąże się to ze znaczną przewagą przedstawicieli rodzin *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Rosaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Fabaceae* oraz *Scrophulariaceae* wśród krajowych roślin leczniczych (około 46%) [Moraczewski i in., 2000]. Rodziny te charakteryzują się dużą, utrwaloną ewolucyjnie tendencją do występowania owadopylności. Zapyłaczem większości krajowych gatunków roślin owadopylnych jest pszczoła miodna. Przystosowania do tego zapyłacza zaobserwować można między innymi w barwie kwiatów zarówno wśród przeważającej większości krajowych gatunków roślin jak i w podgrupie rodzimych gatunków roślin leczniczych.

Owady zapyłające (a w szczególności pszczoła miodna) stanowią więc bardzo ważny czynnik zapylania (a co za tym idzie zawiązywania nasion) przeważającej większości krajowych gatunków roślin leczniczych. Ma to szczególne znaczenie w procesie pozyskiwania nasion gatunków roślin leczniczych uprawianych na dużą skalę.

1.3 Owady szkodliwe z punktu widzenia produkcji zielarskiej

1.3.1 Owady roślinożerne

Jak już wcześniej wspomniano około połowa gatunków owadów to tzw. fitofagi czyli organizmy roślinożerne. Zdolność rozrodcza owadów jest tak wielka, że gdyby rośliny nie dysponowały mechanizmami obrony przed owadami prawdopodobnie nie przetrwałyby do dnia dzisiejszego. Stało się jednak inaczej. Rośliny wykształciły szereg przystosowań utrudniających bądź wręcz uniemożliwiających żerowanie owadom roślinożernym. Obok przystosowań morfologicznych istotną rolę w obronie roślin pełnią przystosowania biochemiczne. Ogromna różnorodność tzw. metabolitów wtórnych,

których obecność stwierdzano w tkankach roślinnych była przez długi czas zagadką dla naukowców. Początkowo uważano, że metabolity wtórne są produktami bocznych odgałęzień procesów metabolicznych lub formą składowania substancji toksycznych dla metabolizmu rośliny. Przeprowadzane obecnie badania skłaniają jednak do wniosku, iż metabolity wtórne są wytwarzane przez rośliny w znacznej mierze w celach obronnych przed zwierzętami roślinożernymi. Teoria zakładająca, że metabolity wtórne powstały jako element obrony chemicznej skierowanej przeciwko zwierzętom roślinożernym prowadzi do kilku interesujących wniosków i pytań.

- Pierwszy wniosek dotyczy toksyczności metabolitów wtórnych dla owadów. Owady stanowią większość gatunków lądowych zwierząt roślinożernych występujących na Ziemi – należy więc oczekiwać, że wiele (jeśli nie większość) metabolitów wtórnych roślin powinna działać toksycznie na owady. Powyższe twierdzenie znalazło potwierdzenie w wynikach niektórych badań naukowych [Harborne, 1997]. Substancje toksyczne dla owadów nie zawsze muszą być toksyczne dla ssaków.
- Drugi wniosek dotyczy substancji aktywnych występujących w roślinach leczniczych. Jeżeli metabolity wtórne powstały jako element obrony chemicznej skierowanej przeciwko organizmom roślinożernym (głównie owadom) to właśnie niszczące rośliny owady, paradoksalnie, przyczyniły się do powstania szeregu właściwości roślin leczniczych. A więc to właśnie owadom (i innym roślinożernym zwierzętom) zawdzięczamy powstanie wielu metabolitów wtórnych wykorzystywanych w lecznictwie. Jak wiele gatunków roślin stało się roślinami leczniczymi produkując metabolity wtórne skierowane przeciwko żerującym na nich owadom? Trudno dzisiaj znaleźć odpowiedź na to i podobne pytania.
- Trzeci wniosek także wiąże się z roślinami leczniczymi. Jeżeli wiele z substancji aktywnych będących metabolitami wtórnymi powstało w toku ewolucji jako element obrony chemicznej roślin przed owadami, to czy występowanie śladów żerowania tzw. „szkodników” owadzich na surowcu leczniczym powinno decydować o jego dyskwalifikacji? Wiele doświadczeń i obserwacji

przeprowadzonych na różnych gatunkach roślin zdaje się potwierdzać tezę, iż żerowanie owadów zwiększa zawartość określonych metabolitów wtórnych w tkankach roślinnych [Khan i Harborne, 1991] [Martin i in., 2003]. Podobnej prawidłowości należy oczekiwać w przypadku metabolitów wtórnych będących jednocześnie substancjami aktywnymi leczniczo co także zostało potwierdzone [Martin i in., 2003] [Miszta, 1987].

Wpływ żerowania owadów na rośliny lecznicze ciągle nie został zbadany w wystarczającym stopniu. Uprawy roślin leczniczych na szeroką skalę stwarzają nowe możliwości rozwoju powiązanych z nimi owadom. Czasami są to gatunki nie traktowane w przeszłości jako szkodniki, gdyż nie zasiedlają roślin ważnych z rolniczego punktu widzenia. Wyjątkowo korzystną niszę ekologiczną i szansę szybkiego wzrostu liczebności stworzyły im dopiero niedawno wprowadzone uprawy niektórych gatunków roślin leczniczych.

Owady mogą na wiele sposobów uszkadzać rośliny. Najczęściej spotykane typy uszkodzeń to:

- uszkodzenia powodowane przez owady wolno żerujące na powierzchni roślin

Uszkodzenia te obejmują zwykle tkanki liści, pędów i owoców. Powodujące je owady posiadają gryzące (np. pchełki (*Halticinae*)) lub kłująco-ssące (np. mszyce (*Aphidodea*)) narządy gębowe. W zależności od typu narządów gębowych uszkodzenia powstają przez zgryzanie tkanki roślinnej (np. blaszki liściowej) lub nakłuwanie roślin i wysysanie płynnego pokarmu.

W wyniku żerowania niektórych gatunków owadów wyposażonych w narządy gębowe gryzące powstają dołczkowate wyżerki w liściach (np. niektóre zwójkówki), żerowanie innych prowadzi do powstawania otworków w liściach (np. pchełki (*Halticinae*) żerujące m. in. na malwie czarnej (*Alcea Rosea* var. *nigra* L.)), jeszcze inne zgryzają brzeg blaszki liściowej (np. oprzędziki (*Sitoma* sp.) żerujące na kozieradce pospolitej (*Trigonella foenum-graecum* L.) oraz gąsienice motyli)

Sposób zgryzania blaszki liściowej może umożliwiać identyfikację gatunku owada

Ssawka owadów wyposażonych w kłująco-ssące narządy gębowe jest wprowadzana do tkanek roślinnych na różne okresy czasu i na różne głębokości. Niektóre gatunki owadów zagłębiają ją jedynie w komórki nabłonka, inne sięgają do miększu lub nawet tkanek przewodzących. W efekcie żerowania tej grupy owadów powstają zwykle plamki i odbarwienia. Najczęściej pojawiają się one na liściach, pączkach, owocach i kwiatostanach. Żerowanie może z czasem prowadzić do odbarwień zaatakowanych organów, wcześniejszego opadania liści lub nawet zamierania roślin. Płynny pokarm owadów odżywiających się w

ten sposób stanowi cytoplazma i zawartości wakuol komórek roślinnych. Cytoplazma komórek roślinnych zawiera 5–15% suchej masy, przy czym około 5% stanowią aminokwasy i około 5% cukry. W przypadku komórek sitowych lub członów rurek sitowych obecny jest także tzw sok (roztwór asymilatów). Dominuje tutaj sacharoza stanowiąca 10–25%. Glukoza i fruktoza występują rzadko. Związki azotowe stanowią zaledwie 0,03–0,4% i występują głównie w formie wolnych aminokwasów. Liczne owady żywiące się sokiem roślinnym produkują tzw spadź – słodką wydzielinę zawierającą 18–29% cukrów.

- uszkodzenia powodowane przez owady minujące

W skład grupy owadów minujących wchodzi wiele bliżej nie spokrewnionych ze sobą gatunków (niektóre chrząszcze (*Coleoptera*), motyle (*Lepidoptera*), muchówki (*Diptera*), błonkówki (*Hymenoptera*)). Łączy je charakterystyczny sposób żerowania larw, które wgrzyzają się i żerują wewnątrz blaszki liściowej, rzadziej w płatkach korony kwiatu, w owocu lub pędzie, pomiędzy dwoma warstwami epidermy (np. gąsienice motyla szrotówka kasztanowcowiaczka (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimic) żerujące wewnątrz liści kasztanowca zwyczajnego (*Aesculus hippocastanum* L.)). W przypadku gatunków żerujących wewnątrz liści pokarm larw stanowi głównie tkanka mięsista. Owady dorosłe składają jaja na powierzchni liści lub do ich wnętrza. Larwy tej grupy owadów charakteryzują się spłaszczonym ciałem i niewielką głową. W miarę rozwoju powiększają one komorę, w której przebywają, zjadając tkankę rośliny. Epiderma znajdująca się z obydwu stron komory brunatnieje i obumiera co prowadzi do zmniejszenia powierzchni asymilacyjnej liścia. W przypadku części gatunków larwy przechodzą pełny rozwój wewnątrz liścia. Larwy innych gatunków mogą po pewnym czasie opuszczać komorę i żerować na powierzchni rośliny lub tworzyć galasy. Kształt i wielkość tzw min powstających na liściach wskutek żerowania larw są na tyle charakterystyczne dla gatunku wywołującego ich powstanie owada, iż często pozwalają na jego identyfikację.

- uszkodzenia powodowane przez owady zwijające liście

Większość owadów zwijających liście stanowią motyle (*Lepidoptera*), np. zwojki (*Tortricidae*) atakujące uprawy wielu gatunków roślin leczniczych. Zdolność zwijania liści mają także nieliczne gatunki chrząszczy (*Coleoptera*), muchówki (*Diptera*), błonkówki (*Hymenoptera*), a także nieliczne tropikalne gatunki owadów prostoskrzydłych (*Orthoptera*). Najczęstszą metodą zwijania liści jest ich oplecenie nićmi, które na powietrzu kurczą się i wymuszają zwinięcie blaszki liściowej. Czasami owady w charakterystyczny dla gatunku sposób nadgryzają liście. Zwinięty liść stanowi źródło pokarmu oraz bezpieczną kryjówkę przed pasożytami i drapieżcami. Służy także jako miejsce przepoczwarzania się oraz ochrona przed niekorzystnymi czynnikami fizycznymi. Ciekawą teorię na temat zwijania liści przez owady można znaleźć w książce „Ekologia biochemiczna” [Harborne, 1997]. W wielu roślinach rolę repelentów odgrywają substancje wykazujące działanie fotouczulające (furanokumaryny, hyperycyna). Wg autora wymienionej książki zwijanie liści przez owady jest prawdopodobnie także próbą ominięcia tej strategii obrony chemicznej roślin – larwa znajdująca się wewnątrz zwiniętego liścia jest mniej narażona

na promieniowanie słoneczne i może żerować na roślinach zawierających znaczne ilości substancji fotodynamicznych, np. jednymi z owadów atakujących zawierający znaczne ilości substancji fotouczulających (hyperycyna) dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum* L.) są zwijające liście gąsienice motyli z wymienianej już wcześniej grupy zwójek (*Tortricidae*).

- galasy wytwarzane przez owady

Galasy są tworami powstającymi przez rozrost tkanki roślinnej. Postają one w następstwie żerowania niektórych gatunków owadów. Oprócz owadów powstawanie galasów powodować mogą niektóre nicienie (*Nematoda*) i roztocze (grupa szpecieli (*Eriophyoidea*)). Spośród owadów powstawanie galasów wywołuje żerowanie niektórych gatunków chrząszczy, motyli, pluskwiaków równoskrzydłych, przylżeńców, muchówek i błonkówek. Galasy tworzą się na skutek działania składników śliny żerującego owada. Na skutek żerowania owada gromadzi się w roślinie oksydaza polifenolowa. Związek ten powoduje w komórkach otaczających gromadzenie się kwasu 3-indoliloctowego, co prowadzi do powiększenia ich rozmiarów i intensywnych podziałów komórkowych. W ślinie niektórych owadów stwierdzono także występowanie dodatkowych związków chemicznych: giberelin, cytokinin, oraz wolnych aminokwasów i amidów, które także biorą udział powstawaniu galasu. Galasy mogą być tworzone na różnych organach rośliny, jednak ich umiejscowienie i kształt są charakterystyczne dla tworzącego je gatunku owada.

- uszkodzenia powodowane przez owady wygryzające chodniki

Uszkodzenia powodowane przez tę grupę owadów obejmują nasiona, pędy, owoce, drewno, korę, korzenie i pączki. Owady wygryzające chodniki w roślinie tworzą w czasie żerowania korytarze w których odbywają rozwój. Korytarze te są wygodnym schronieniem przed niekorzystnymi czynnikami środowiska i wrogami naturalnymi. Taki sposób żerowania utrudnia też stosowanie chemicznych środków ochrony roślin. Do tej grupy należy wiele bardzo szkodliwych dla roślin uprawnych gatunków owadów. Żerowanie wewnątrz wygryzionych w roślinie chodników ogranicza się najczęściej do postaci larwalnych. Czasami jednak także postaci dorosłe pozostają i żerują w wygryzanych przez siebie chodnikach (np. kornikowate (*Ipidae*)).

Rośliny wykorzystywane w lecznictwie, podobnie jak inne rośliny, współżyją z wielką liczbą gatunków owadów. Wzajemne interakcje okazują się zarówno korzystne jak i szkodliwe dla roślin. Problem owadów żerujących na roślinach leczniczych nabiera szczególnego znaczenia w przypadku wielohektarowych upraw. Uprawy zielarskie zajmują w naszym kraju powierzchnię około 30 tys. hektarów, co stawia Polskę w grupie największych producentów ziół w Europie [Jambor, 2001]. Plantacje takie stwarzają nowe nisze ekologiczne dla owadów żerujących na tych roślinach prowadząc niejednokrotnie

do ich masowych pojawów. W takich przypadkach konieczna staje się walka chemiczna lub biologiczna. W uprawie znajduje się obecnie około 70 gatunków roślin. Do najważniejszych z nich zalicza się rumianek pospolity (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), mięta pieprzową (*Mentha x citrata* Ehrh.), kozłek lekarski (*Valeriana officinalis* L.), dzurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum* L.) i ostropest plamisty (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) [Jambor, 2001]. W tabeli nr 5 przedstawiono zestawienie najczęściej uprawianych gatunków roślin leczniczych i gatunki owadów mogących powodować szkody w ich uprawach.

Tabela nr 5 Najczęściej uprawiane gatunki roślin leczniczych oraz owady mogące powodować szkody w ich uprawach (na podstawie serii artykułów „ABC... uprawowych roślin zielarskich” [Kordana i Kordana, 1999] oraz zaleceń ochrony roślin Instytutu Ochrony Roślin [Pruszyński i in., 2003])

Gatunek rośliny	Żerujące na niej owady i roztocze
Dzięgiel (Arcydzięgiel) litwor ⁴ (<i>Angelica archangelica</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), przędziorki (<i>Tetranychidae</i>)
Babka lancetowata ⁴ (<i>Plantago lanceolata</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), skoczkwate (<i>Jassidae</i>), pchełki (<i>Halticinae</i>)
Bazylika wonna (<i>Ocimum basilicum</i>)	zmieniki (<i>Miridae</i>), mszyce (<i>Aphidodea</i>)
Bylica Boże drzewko (<i>Artemisia abrotanum</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), kapturka byliczanka (<i>Cucullia artemisiae</i> Hufn.), słonecznica bylicówka (<i>Heliotis scutosa</i> Schiff.), pluskwiaki różnoskrzydłe (<i>Heteroptera</i>)
Bylica estragon <i>Artemisia dracunculus</i> L.	mszyce (<i>Aphidodea</i>), skoczkwate (<i>Jassidae</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>), zwojki (<i>Tortricidae</i>)
Czarnuszka siewna (<i>Nigella sativa</i> L.)	błyszczka jarzynówka (<i>Plusia gamma</i> L.), piętnówki (<i>Mamestra</i>)
Cząber ogrodowy (<i>Satureja hortensis</i> L.)	skoczkwate (<i>Jassidae</i>), pchełki (<i>Halticinae</i>)
Drapacz lekarski (<i>Cnicus benedictus</i> L.)	miniarkowate (<i>Agromyzidae</i>), mszyce (<i>Aphidodea</i>)
Dziurawiec zwyczajny ⁴ (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	zwojki (<i>Tortricidae</i>), stonka dzurawcowa (<i>Chrysomela hyperici</i> Forst.)
Fiołek trójbarwny ⁴ (<i>Viola tricolor</i> L. s. s.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), przędziorki (<i>Tetranychidae</i>), przyszcarki fiołkowe (<i>Cecidomyiidae</i>)
Glistnik jaskótcze ⁴ (<i>Chelidonium majus</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>)
Hyzop lekarski (<i>Hyssopus officinalis</i> L.)	skoczkwate (<i>Jassidae</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>), błyszczka jarzynówka (<i>Plusia gamma</i> L.), piętnówki (<i>Mamestra</i>), zwojki (<i>Tortricidae</i>)
Jeżówka purpurowa (<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench)	zwojki (<i>Tortricidae</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>)
Kolendra siewna ⁴ (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	zmieniki (<i>Miridae</i>), mszyce (<i>Aphidodea</i>)
Karbieńiec pospolity (<i>Lycopus europaeus</i> L.)	zwojki (<i>Tortricidae</i>), skoczkwate (<i>Jassidae</i>), pchełki (<i>Halticinae</i>)
Karczoch zwyczajny (<i>Cynara scolymus</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), rolnice (<i>Noctuidae</i>)
Kminek zwyczajny ⁴ (<i>Carum carvi</i> L.)	zmieniki (<i>Miridae</i>), płozek kminiacek (<i>Depressaria nervosa</i> Haw.)
Konwalia majowa ⁴ (<i>Convallaria majalis</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), poskrzypka liliowa (<i>Lilloceris lili</i> Scop.), poskrzypka cebulowa (<i>Lilloceris meridigera</i> L.)
Fenkuł (Koper) włoski ⁴ (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>)
Kozieradka pospolita (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.)	oprzędzik pręgowany (<i>Sinoma lineatus</i> L.), oprzędzik wielożerny (<i>Sitona crinitus</i> Herbst.)
Kozłek lekarski ⁴ (<i>Valeriana officinalis</i> L.)	miniarkowate (<i>Agromyzidae</i>), mszyce (<i>Aphidodea</i>)
Lubczyk ogrodowy ⁴ (<i>Levisticum officinale</i> W. D. J. Koch)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>)
Majeranek ogrodowy ⁴ (<i>Majorana hortensis</i> Moench)	miniarkowate (<i>Agromyzidae</i>), mszyce (<i>Aphidodea</i>)
Malwa czarna (<i>Alcea Rosea</i> var. <i>nigra</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), pchełki (<i>Halticinae</i>), pędrusie (<i>Apion</i> sp.), skośnik ślazaczek (<i>Platyedra malvella</i> Hbn.), scieśniak ślazowy (<i>Ortholitha cervinata</i> Schiff.)
Melisa lekarska ⁴ (<i>Melissa officinalis</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), skoczkwate (<i>Jassidae</i>), pchełki (<i>Halticinae</i>), tarczki zielony (<i>Cassida viridis</i> L.)

Gatunek rośliny	Żerujące na niej owady i roztocze
Mięta pieprzowa ⁴ (<i>Mentha x citrata</i> Ehrh.)	skoczkwate (<i>Jassidae</i>), pchełki (<i>Halticinae</i>), tarczyk zielony (<i>Cassida viridis</i> L.), stonka ziemniaczana (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say.), zmieniki (<i>Miridae</i>)
Mniszek pospolity ⁴ (<i>Taraxacum officinale</i> F. H. Wigg.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), rolnice (<i>Noctuidae</i>), błyszczka jarzynówka (<i>Plusia gamma</i> L.), piętnówki (<i>Mamestra</i>)
Mydlnica lekarska (<i>Saponaria officinalis</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), oweńnica lucernianka (<i>Subcoccinella vigintiquatuorpunctata</i>), skośnik mydlniczek (<i>Lita fischerella</i> Tr.)
Nagietek lekarski ⁴ (<i>Calendula officinalis</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>), błyszczka jarzynówka (<i>Plusia gamma</i> L.), piętnówki (<i>Mamestra</i>)
Ogórecznik lekarski (<i>Borago officinalis</i> L.)	pchełki (<i>Halticinae</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>)
Oman wielki (<i>Inula helenium</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), skoczkwate (<i>Jassidae</i>), tarczyk czerwony (<i>Cassida murea</i> L.)
Ostropest plamisty (<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), błyszczka jarzynówka (<i>Plusia gamma</i> L.), piętnówki (<i>Mamestra</i>), rusałka osetnik (<i>Vanessa cardui</i> L.)
Pieprzowiec roczny (<i>Capsicum annuum</i> L.)	miniarkowate (<i>Agromyzidae</i>), mszyce (<i>Aphidodea</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>)
Pokrzyk wilcza-jagoda ⁴ (<i>Atropa belladonna</i> L.)	miniarkowate (<i>Agromyzidae</i>), mszyce (<i>Aphidodea</i>), stonka ziemniaczana (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say.), piętnówki (<i>Mamestra</i>), wciernastki (<i>Thysanoptera</i>)
Pokrzywa zwyczajna ⁴ (<i>Urtica dioica</i> L.)	zwójki (<i>Tortricidae</i>), mszyce (<i>Aphidodea</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>), błyszczka jarzynówka (<i>Plusia gamma</i> L.), rusałka pokrzywnik (<i>Aglais urticae</i> L.), rusałka osetnik (<i>Vanessa cardui</i> L.), rusałka pawik (<i>Inachis io</i> L.)
Prawoślaz lekarski ⁴ (<i>Althaea officinalis</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), skośnik ślazaczek (<i>Platyedra malvella</i> Hbn.), scieśniak ślazowy (<i>Ortholitha cervinata</i> Schiff.), warcabnik ślazowiec (<i>Pyrgus malvae</i> L.)
Rumian rzymski (<i>Anthemis nobilis</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), wciernastki (<i>Thysanoptera</i>)
Rumianek pospolity ⁴ (<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert)	płaszak rumiankowiec (<i>Olibrus aeneus</i> F.), chowacz rumiankowiec (<i>Centorhynchus regulosus</i> Hrbst.)
Rutwica lekarska (<i>Galega officinalis</i> L.)	miniarkowate (<i>Agromyzidae</i>), mszyce (<i>Aphidodea</i>), oprzędzik pręgowany (<i>Sinoma lineatus</i> L.)
Rabarbar (Rzewień) dloniasty ⁴ (<i>Rheum palmatum</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), przędziorki (<i>Tetranychidae</i>), kałdunica zielona (<i>Gastroidea viridula</i> Deg.) kałdunica rdostowa (<i>Gastroidea polygonii</i> L.), rolnice (<i>Noctuidae</i>)
Serdecznik pospolity (<i>Leonurus cardiaca</i> L.)	miniarkowate, mszyce (<i>Aphidodea</i>)
Szałwia lekarska ⁴ (<i>Salvia officinalis</i> L.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), skoczkwate (<i>Jassidae</i>), przędziorki (<i>Tetranychidae</i>)
Szanta zwyczajna (<i>Marrubium vulgare</i> L.)	skoczkwate (<i>Jassidae</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>), błyszczka jarzynówka (<i>Plusia gamma</i> L.), piętnówki (<i>Mamestra</i>)
Tymianek pospolity ⁴ (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	skoczkwate (<i>Jassidae</i>), pchełki (<i>Halticinae</i>)
Wiesiołek dwuletni ⁴ (<i>Oenothera biennis</i> L. s. s.)	pchełki (pchełki rdostowe) (<i>Halticinae</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>)
Wrotycz (Złocien) maruna (<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip.)	mszyce (<i>Aphidodea</i>), pchełki (<i>Halticinae</i>), zmieniki (<i>Miridae</i>), błyszczka jarzynówka (<i>Plusia gamma</i> L.), piętnówki (<i>Mamestra</i>), literówka kropłówka (<i>Autographa confusa</i> Steph.)

Obserwacje roślin uprawnych i żerujących na nich owadów dostarczają jednak dowodów, iż nie zawsze działalność organizmów roślinożernych prowadzi do obniżenia plonów. Liczne gatunki owadów poprzez żerowanie na młodych liściach stymulują rośliny do efektywniejszej fotosyntezy. Jeśli zapasy węglowodanowe rośliny są wystarczające to nawet defoliacja na poziomie 50% może nie wpływać na wysokość plonu lub wręcz ją zwiększać [Boczek i in., 2000]. Nie zmienia to jednak faktu, że żerowanie owadów najczęściej prowadzi do zmniejszenia wysokości plonu oraz obniżenia jego jakości. Dokładne określenie wpływu żerowania owadów na surowiec otrzymywany z roślin leczniczych wymaga jeszcze wielu badań.

4 – gatunek uwzględniony w monografiach szczegółowych surowców roślinnych [FP VI, 2002]

1.3.2 Podsumowanie

Negatywny wpływ owadów na wydajność i jakość produkcji zielarskiej wydaje się nie ulegać dyskusji. Przy jego rozpatrywaniu uwidaczniają się jednak znaczne braki w obecnym stanie wiedzy dotyczące skomplikowanych interakcji roślina-owad zwłaszcza w kontekście produkcji zielarskiej. Potrzeba szczegółowych badań w odniesieniu do każdego analizowanego przypadku, aby móc rzeczywiście wiarygodnie ocenić wpływ owadów uznawanych za szkodliwe na pozyskiwany do celów leczniczych surowiec roślinny. Proponując sposoby ochrony roślin należy uwzględnić także ochronę owadów uznawanych za pożyteczne gdyż, jak wykazano w poprzednim rozdziale, ich rola może być znacznie ważniejsza od oddziaływania owadów szkodliwych. Mnogość uprawianych i pozyskiwanych w siedlisk naturalnych gatunków roślin leczniczych i związanych z nimi owadów, stwarza szerokie pole dla wielu ciekawych badań z zakresu ekologii biochemicznej interakcji owad - roślina.

2 Podstawowe grupy metabolitów wtórnych wytwarzanych przez rośliny w celu obrony przed owadami

Metabolity wtórne stanowią podstawowy element obrony chemicznej roślin nie tylko przed owadami, ale także przed innymi zwierzętami roślinożernymi. W bieżącym rozdziale opisano podstawowe kryteria podziału toksycznych lub odstraszcających zwierzęta metabolitów wtórnych oraz mechanizmy ich działania na organizmy zwierząt roślinożernych. Osobny podrozdział poświęcono związkom z grupy izoprenoidów, ponieważ są one wytwarzane przez rośliny szpilkowe będące obiektem opisywanych w niniejszej pracy badań.

Związki chemiczne wytwarzane przez rośliny w celu obrony przed roślinożernymi owadami należą do kilku grup różniących się znacznie pod względem budowy chemicznej. Niektóre z tych substancji wykazują stosunkowo prostą budowę np. monoterpeny, kwas monofluorooctowy, kwas szczawiowy, proste aminokwasy niebiałkowe. Inne stanowią bardzo złożone struktury np. peptydy i białka.

Generalnie związki toksyczne wytwarzane przez rośliny podzielić można na dwie duże grupy:

- związki zawierające azot
- związki bezazotowe

Tabela nr 6 Przykłady toksyn roślinnych zawierających azot [Harborne, 1997]

Klasa związku	Przykład	Źródło	Toksyczność
Aminokwasy niebiałkowe	L-DOPA	nasiona roślin z rodzaju <i>Mucuna</i>	owady, szczególnie chrząszcze strąkowcowate
	β -cyanoalanina	nasiona wyki (<i>Vicia</i> sp.)	dawka śmiertelna dla szczurów 200 mg/kg masy ciała
Glikozydy cyjanogenne	linamaryna i lotaustralina	komonica zwyczajna (<i>Lotus corniculatus</i> L.)	powszechna, dawka śmiertelna HCN dla człowieka wynosi około 50 mg
Glukozynolany	synigryna	rośliny z rodzaju <i>Brassica</i>	bydło i owady
Alkaloidy	senecionina	liście starca <i>Senecio jacobaea</i>	szczególnie bydło
	atropina	jagody <i>Atropa belladonna</i> L.	ssaki, ale nie ptaki LD ⁵⁰ dla szczurów 750 mg/kg
Peptydy	amanityna	<i>Amanita phalloides</i>	ssaki
	wiskotoksyna	jagody jemioli pospolitej <i>Viscum album</i> L.	wszystkie zwierzęta oprócz ptaków
Białka	abryna	<i>Abrus precatorius</i> L.	dawka letalna dla człowieka wynosi około 0,5 mg
	fitochemaglutyminy	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	chrząszcze strąkowcowate

Tabela nr 7 Przykłady bezazotowych toksyn roślinnych [Harborne, 1997].

Klasa związku	Przykład	Źródło	Toksyczność
Iridoidy	aukubina	w liściach <i>Aucuba japonica</i>	owady, ptaki
Laktony seskwiterpenów	hymenowina	w <i>Hymenoxys odorata</i>	zwierzęta gospodarskie, owady
Glikozydy nasercowe	ouabaina	w <i>Acokanthera ouabaio</i>	trucizna dla serca, LD ⁵⁰ dla szczurów 17,2 mg/kg
Saponiny	kwas medikagenowy	w liściach lucerny siewnej (<i>Medicago sativa</i> L.)	ryby, owady
Furanokumaryny	ksantotoksyna	Pasternak zwyczajny (<i>Pastinaca sativa</i> L.)	owady
Izoflawonoidy	rotenon	w korzeniach roślin z rodzaju <i>Derris</i>	głównie owady i ryby
Chinony	hiperycyna	w liściach dziurawca zwyczajnego (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	ssaki, szczególnie owce
Poliacetyleny	oenantetoksyna	w korzeniach <i>Oenanthe crocata</i>	ssaki
Aflatoksyny	aflatoksyna B ₁	w orzeszkach ziemnych zakażonych grzybem <i>Aspergillus flavus</i>	ptaki i ssaki

2.1 Działanie wtórnych metabolitów

Metabolity wtórne wytwarzane przez rośliny mogą działać na owady na wiele różnych sposobów np.:

- Garbniki posiadają właściwość nieodwracalnego łączenia się z białkami budującymi ściany przewodu pokarmowego owadów, co może powodować jego uszkodzenie.
- Aminokwasy niebiałkowe włączane są do szlaków syntezy białek, co prowadzi do powstawania nieaktywnych enzymów.
- Glikozydy cyjanogenne stanowią źródło cyjanków, które blokują cykl oddechowy.
- Czasami jednak do ochrony wystarcza jedynie wydzielanie substancji nieprzyjemnej w smaku (np. gorzkie kukurbitacyny) lub obniżającej wartość pokarmową (np. inhibitory proteaz).

Jednym z ciekawszych sposobów w jaki rośliny starają się ograniczyć inwazję żerujących na nich owadów jest produkcja owadzych hormonów linienia. Substancje te mogą osiągać znaczne stężenia w tkankach roślinnych. Występują głównie u roślin należących do starszych ewolucyjnie grup, świadcząc, że ta strategia obrony roślin jest przez nie stosowana od zamierzchłych czasów [Harborne, 1997].

Do ważnych w medycynie wtórnych metabolitów roślinnych wykazujących odstrasżające lub toksyczne działanie na owady należą między innymi: alkaloidy, glikozydy nasercowe, saponiny, garbniki i izoprenoidy.

Ostatnia grupa jest szczególnie interesująca ze względu jej powszechne występowanie u roślin szpilkowych będących obiektem badań opisywanych w tym opracowaniu. Zagadnienie ewolucji mechanizmów obronnych roślin stanowią przedmiot ciągle prowadzonych badań [Gang i in., 1999] [Trapp i Croteau, 2001].

2.2 Izoprenoidy

Izoprenoidy czyli terpeny są dużą grupą syntetyzowanych przez organizmy żywe związków chemicznych biogenetycznie pochodzących od izopentenylo-difosforanu lub jego izomeru - dimetyloallilodifosforanu. Z pięciowęglowych prekursorów powstają cząsteczki, w których liczba atomów jest wielokrotnością liczby 5. W rezultacie tą liczną i zróżnicowaną grupę można podzielić na podgrupy: monotereny(C10), seskwiterpeny (C15), diterpeny(C20), sesterterpeny(C25) - bardzo rzadkie w przyrodzie, triterpeny(C30), tetraterpeny(C40), politerpeny(C5n). W wyniku licznych modyfikacji chemicznych liczba atomów węgla w cząsteczce może jednak ulegać zmianie. W ten sposób do izoprenoidów są zaliczane także takie substancje jak steroidy i irydoity, mimo, że liczba atomów węgla w ich cząsteczkach nie jest podzielna przez 5 [Kohlmünzer, 1998]. Terpeny są jednymi z najczęściej występujących lotnych substancji wydzielanych przez rośliny (volatile organic compounds - VOCs). Geneza powstania tych metabolitów jest jednak niejasna. Prowadzone ostatnio badania rzucają nowe światło na zagadnienia związane z pierwotną funkcją i pochodzeniem tych związków chemicznych [Holopainen, 2004].

Okazuje się, iż lotne terpeny pełnią wiele funkcji na różnych poziomach. Można wyróżnić 4 zasadnicze płaszczyzny działania tych związków.

- poziom tkankowy - działają tutaj jako antyoksydanty przeciwdziałając niekorzystnym reakcjom utleniania zachodzącym pod wpływem działania ozonu oraz roślinożerców.

- poziom powierzchni liścia – pełnią rolę ograniczającą wzrost patogennych mikroorganizmów oraz ograniczają żerowanie roślinożernych zwierząt.
- poziom ekosystemu – pełnią liczne funkcje jako repelenty pokarmowe, atraktanty pokarmowe, związki wabiące naturalnych wrogów roślinożerców (pasożyty, drapieżców), stymulatory i inhibitory składania jaj, stymulatory i inhibitory gromadzenia się, prekursorzy feromonów, substancje obronne gromadzone i wykorzystywane przez owady, itp. [Renwick i in., 1976] [Byers, 1981] [Turlings i in., 1995] [Harborne, 1997].
- poziom atmosfery – sterowanie temperaturą, wilgotnością i nasłonecznieniem przez udział w tworzeniu mgieł i zwiększanie zachmurzenia. Emisja terpenów może także zmniejszać ilość promieniowania UV docierającego do roślin.

Szczególnie ostatni poziom działania wydaje się zaskakujący – wręcz trudny do przyjęcia. A jednak ostatnie badania świadczą, iż to właśnie potrzeba regulacji warunków klimatycznych (i mikroklimatycznych) mogła być pierwotną przyczyną wytworzenia przez rośliny tej grupy substancji. Ich rola jako repelentów owadów i innych roślinożernych zwierząt mogła pojawić się później [Close i McArthur, 2002] [Bonn i Moortgat, 2003].

2.3 Monoterpeny

Jak już wcześniej wspomniano monoterpeny są pochodnymi izopentenylofosforanu lub jego izomeru – dimetyloallilodifosforanu. Z pięciowęglowych prekursorów powstają cząsteczki, w których liczba atomów jest wielokrotnością liczby 5. W przypadku monoterpenów liczba atomów węgla w cząsteczce wynosi 10. Związki te mają znaczny (niekiedy dominujący) udział wśród substancji wchodzących w skład olejków roślinnych. W postaci olejków znajdują też zastosowanie w lecznictwie.

Monoterpeny i ich pochodne (najczęściej tlenowe) zwane monoterpenoidami można podzielić na:

- niecykliczne
- jednopierścieniowe (jednocykliczne)
- dwupierścieniowe (dwucykliczne)

Do monoterpenów niecyklicznych należą np.: myrcen występujący w roślinach szpilkowych oraz geraniol stanowiący główny składnik olejku różanego, pelargonowego i cytrynowego [Kołodziejczyk, 2003].

Do najbardziej znanych monoterpenów jednopierścieniowych należy limonen. Monoterpen ten występuje naturalnie w dwóch formach enancjomerycznych. Charakteryzuje się przyjemnym zapachem cytryny. Występuje w olejkach izolowanych z kminku, pomarańczy, cytryny, selera, a także w olejkach z roślin szpilkowych [Kołodziejczyk, 2003]. Inną grupą monoterpenów jednopierścieniowych są terpineny. Występują one najczęściej w postaci mieszaniny izomerów, zwykle są to α -terpinen oraz γ -terpinen. Ich cechą charakterystyczną jest brak asymetrycznego atomu węgla, w związku z czym są one optycznie nieczynne. Terpineny zostały wykryte w oleju kolendrowym i majerankowym [Wrzeciono i Zaprutko, 2001]. Występują także w olejkach izolowanych z roślin szpilkowych. Do monoterpenów jednopierścieniowych występujących w olejkach izolowanych z roślin szpilkowych należy także α -felandren.

Monoterpeny i monoterpenoidy dwupierścieniowe są jedna z najbardziej zróżnicowanych grup terpenów. Wśród monoterpenów występujących w olejkach izolowanych z roślin szpilkowych należą tutaj takie monoterpeny jak sabinen, 3-karen, α -pinen, β -pinen i kamfen. Część z nich występuje naturalnie w postaci mieszaniny enancjomerów. 3-karen i α -pinen stanowią główne składniki olejku pozyskiwanego z sosny zwyczajnej. Ten ostatni jest także dominującym składnikiem olejku pozyskiwanego z szyszkojagód jałowca pospolitego.

3 Taksonomia i biologicznie aktywne związki wybranych gatunków roślin szpilkowych

W niniejszym rozdziale zawarto krótką charakterystykę gatunków roślin będących obiektem badań prowadzonych przez autora pracy. Z uwagi na fakt, że opisywane rośliny są bardzo pospolite i powszechnie znane, opis morfologiczny został ograniczony do minimum. Więcej miejsca poświęcono biologii uwzględnionych w pracy gatunków, gdyż ma to związek z cyklem rozwojowym objętych badaniami owadów. Opisano także aktywne biologicznie składniki olejków stanowiące w znacznym stopniu o leczniczym działaniu surowców pozyskiwanych z objętych badaniami gatunków roślin.

3.1 Biologia i taksonomia sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L. i jałowca pospolitego *Juniperus communis* L.

3.1.1 Sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.)

Sosna zwyczajna zwana także sosną pospolitą jest podstawowym gatunkiem lasotwórczym na terenie Polski. Dzięki dużej tolerancji ekologicznej wchodzi ona w skład niemal wszystkich sklasyfikowanych na terenie kraju typów lasów.

Pozycja systematyczna

Królestwo:	<i>Eucaryota</i>	jądrowe
Podkrólestwo:	<i>Phytobionta</i>	rośliny
Gromada:	<i>Spermatophyta</i>	nasienne
Podgromada:	<i>Gymnospermae</i>	nagonasienne
Klasa:	<i>Pinopsida</i>	szpilkowe
Rząd:	<i>Pinales</i>	szpilkowce
Rodzina:	<i>Pinaceae</i>	sosnowate
Rodzaj:	<i>Pinus</i> L.	sosna
Gatunek:	<i>Pinus sylvestris</i> L.	sosna zwyczajna

Morfologia

Sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.) jest drzewem osiagającym w wieku 80 lat 25m wysokości. Posiada ona dobrze rozwinięty, palowy system korzeniowy. Kora w dolnej

części strzały staje się gruba i popękana natomiast w górnej części jest cienka, łuszcząca się i przyjmuje barwę czerwonożółtą. Szpilkowate liście długości 4–7 cm występują w liczbie 2 w pochewkach krótkopędów. Kwiaty męskie są barwy jasnożółtej zebrane w kotkowate kwiatostany. Kwiaty żeńskie przyjmują postać czerwonych szyszeczek. W pełni wykształcone szyszki osiągają długość od 2,5 do 7 cm i zawierają szare lub czerniawe, wyposażone w aparat lotny w postaci skrzydełka, nasiona. Kształt korony drzewa różni się w zależności od jego wieku i zajmowanego przez nie siedliska. Drzewa młode mają koronę raczej rzadką, stożkowatego kształtu. Drzewa starsze, rosnące w zwartym drzewostanie, wykształcają koronę stosunkowo wysoko, kształtu szerokoowalnego lub nieregularną. Pień jest od dołu pozbawiony bocznych odgałęzień na znacznym odcinku. Odmienne wyglądają drzewa starsze rosnące samotnie lub w znacznym rozproszeniu. W takim wypadku korona jest szeroka i zaczyna się nisko. Sosna zwyczajna żyje do 100–120 lat, niekiedy jednak znacznie przekracza ten wiek.

Biologia

Sosna zwyczajna jest masowo sadzona szczególnie na glebach suchych, piaszczystych, nieurodzajnych lub zdegradowanych. Rozmnaża się także poprzez samosiew. Szyszki początkowo są barwy zielonej. Dopiero jesienią następnego roku stają się szarobrązowe. Nasiona dojrzewają w październiku i listopadzie drugiego roku. Dojrzałe nasiona wysypują się z szyszek w marcu i kwietniu trzeciego roku. Są one rozsiewane przez wiatr (anemochoria). Sosna zwyczajna jest jedynym lasotwórczym gatunkiem sosny w Polsce [Seneta, 1981].



Fot. 1 Młodnik sosnowy na terenie lasu w okolicach miejscowości Otomin. Obszar ten stanowi także miejsce licznego występowania mszycy – miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) (fot. autor).

3.1.2 Jałowiec pospolity (*Juniperus communis* L.)

Pozycja systematyczna

Królestwo:	<i>Eucaryota</i>	jądrowe
Podkrólestwo:	<i>Phytobionta</i>	rośliny
Gromada:	<i>Spermatophyta</i>	nasienne
Podgromada:	<i>Gymnospermae</i>	nagonasienne
Klasa:	<i>Pinopsida</i>	szpilkowe
Rząd:	<i>Pinales</i>	szpilkowce
Rodzina:	<i>Cupressaceae</i>	cyprysowate
Rodzaj:	<i>Juniperus</i>	jałowiec
Gatunek:	<i>Juniperus communis</i> L.	jałowiec pospolity

Morfologia

Jałowiec pospolity jest krzewem lub niewielkim drzewem o bardzo zmiennym pokroju. Na terenie kraju dorasta do wysokości 13 m [Seneta, 1981] – zwykle jednak jest znacznie niższy. Iglaste liście osiągają 15 mm długości i występują po 3 w okółkach.

Biologia

Jałowiec pospolity jest rośliną dwupienną. Kwitnienie ma miejsce w czerwcu. Ze zrośniętych ze sobą trzech owocolistków powstaje mięsisty twór zwany szyszkojagodą. Rozwój szyszkojagody trwa 2 lata. Już jesienią pierwszego roku rozwoju osiąga ona niemal normalne rozmiary jednak zachowuje zieloną barwę. Dopiero jesienią drugiego roku następuje powolne ciemnienie szyszkojagód. Wiosną trzeciego roku szyszkojagody przyjmują charakterystyczną, ciemnogrnatową barwę i są w pełni dojrzałe. Dojrzała szyszkojagoda jest kulistego kształtu, a jej średnica wynosi 4,5 –8 mm. We wnętrzu szyszkojagody znajduje się od 1 do 3 nasion przy czym najczęściej jest ich 3.

Jałowiec pospolity występuje na wrzosowiskach i jako podszyt lasów szpilkowych. Jest on rośliną światłożądną – najlepiej rozwija się na skrajach lasów, poboczach dróg leśnych oraz w miejscach gdzie występują przerzedzenia drzewostanu. Jednocześnie jest to gatunek o stosunkowo niewielkich wymaganiach odnośnie gleby, przez co może pełnić rolę rośliny pionierskiej. [Babiński, 1974] [Kapuściński, 1946] [Seneta, 1981].



Fot. 2 Zgrupowanie jałowców pospolitych (*Juniperus communis* L) przy skraju lasu w okolicach wsi Cisy na terenie Kociewia. Obszar ten stanowi także miejsce liczego występowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) (fot. mgr Anna Majewska, zamieszczone za zgodą autorki).

3.2 Związki biologicznie aktywne izolowane z sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) i jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.)

3.2.1 Skład i zastosowanie olejku sosnowego

Olejek sosnowy *Oleum Pini sylvestris* został opisany w formie monografii w tomie III Farmakopei Polskiej [FP III, 1954]. Zgodnie z farmakopeą olejek ten otrzymuje się poprzez destylację z parą wodną świeżych liści szpilkowych sosny zwyczajnej. Ma on postać bezbarwnej lub jasnożółtawej, optycznie czynnej cieczy o swoistym zapachu i ostrym smaku. Olejek sosnowy powinien się charakteryzować skręcalnością optyczną α_D^{20} w granicach od -20° do $+13^\circ$ i ciężarem właściwym w granicach 0,861–0,881 g/cm³.

Także olejek terpentynowy - *Oleum Terebinthinae* otrzymywany z *Pinus sylvestris* L. posiada monografie w farmakopeach: Polskiej, Czeskiej, Francuskiej, Szwajcarskiej, Węgierskiej, Brytyjskiej [Ochocka, 1993].

W składzie chemicznym olejku sosnowego znaczący udział procentowy posiadają: **α -pinen, kamfen, β -pinen, 3-karen, myrcen, limonen, terpinolen, tricyklen, octan bornylu**. Wymienione związki należą do frakcji monoterpenowej i wykazującą aktywność farmakologiczną wykorzystywaną w leczeniu. Skład olejku poszczególnych osobników może się jednak znacznie różnić, co jest związane z występowaniem chemotypów [Weissmann i Lange, 1990].

Olejek sosnowy działa drażniąco na błonę śluzową oskrzeli, pobudza czynność wydzielniczą oskrzeli, upłynnia zalegającą wydzielinę i ułatwia jej odkrztuszenie. Jest więc stosowany jako środek wykrztuśny (*expectorans*), w schorzeniach górnych dróg oddechowych, w nieżycie gardła i oskrzeli, w kaszlu, pylicy. Na skórę działa drażniąco powodując miejscowe przekrwienia, rozgrzanie i zmniejszenie bólu. Stosowany jest zewnętrznie jako środek rozgrzewający w bólach mięśni i stawów (*rubefaciens, antirheumaticum*). Składniki olejku wykazują również właściwości przeciwbakteryjne.

3.2.2 Skład i zastosowanie olejku jałowcowego

Według Farmakopei Polskiej olejek jałowcowy jest bezbarwną, żółtawą lub zielonawą, ruchliwą cieczą o swoistym zapachu i palącym, gorzkawym smaku. Olejek jałowcowy powinien się charakteryzować skręcalnością optyczną w granicach α_D^{20} w granicach od od $+15^\circ$ do -15° . Olejki jałowcowe południowo-europejskie są lewoskrętne, natomiast północno-europejskie prawoskrętne. Ciężar właściwy olejku powinien wynosić $0,857-0,877 \text{ g/cm}^3$ [FP VI, 2002] [European Pharmacopoeia, 2002].

Skład olejku jałowcowego różni się w zależności od odmiany chemicznej rośliny, pochodzenia surowca, czasu zbioru i stadium wegetacji. Skład ilościowy i jakościowy związków czynnych w poszczególnych organach pojedynczej rośliny także się różnią.

Szyszkogoda jałowca zawiera średnio od 0,5% do 2% olejku eterycznego w którego skład wchodzi głównie monoterpeny takie jak α -pinen, β -pinen, kamfen, kadinen, kariofilen, myrcen, limonen, terpinen-4-ol, γ -terpinen. Ponadto olejek jałowcowy zawiera seskwiterpeny, diterpeny, flawonoidy, garbniki, leukoantocyjany, żywice, woski i inne. Najwyższy udział procentowy w olejku jałowca mają monoterpeny. Wśród monoterpenów zaś największy udział procentowy w olejkach ze wszystkich organów rośliny ma α -pinen. W niektórych przypadkach jednak w zdecydowanej większości występuje sabinen (chemotyp sabinenowy) [Ochocka i in., 1997] [Vernin i in., 1998]. Zawartość α -pinenu, sabinenu i myrcenu waha się w dość szerokich granicach i jest najbardziej zmienna wśród związków frakcji monoterpenowej.

Olejek z szyszkogód jałowca wykazuje działanie diuretyczne – jest ono ściśle skorelowane z zawartością terpinen-4-olu. Składniki olejku wykazują także działanie bakteriobójcze i grzybobójcze. Właściwości bakteriobójcze olejku jałowcowego wykorzystywane są w ostrych i podostrych zakażeniach dróg moczowych. W celu zapobieżenia nawrotom zakażeń podaje się napary z mieszanek ziołowych, zawierających jagody jałowca. Jest również środkiem pomocniczym w kamicy moczowej i zakażeniach dróg moczowych. Działanie przeciwwirusowe olejku jałowcowego zostały wykazane na kulturach komórek ludzkich, zakażonych Herpes simplex typu 1 [Newall i in., 1996]. Wyciągi z szyszkogód jałowca wzmagają wydzielanie żółci i ułatwiają jej przepływ

przez drogi żółciowe, stąd stosowane bywają w zastoju i skąpym wydzielaniu żółci oraz związanych z tym zaburzeniach trawiennych i trudnościach z przyswajaniem pokarmu. Działanie hipoglikemiczne odwaru z szyszkogód jałowca (*decoctum Juniperi*) stwierdzono w badaniach prowadzonych na gryzoniach. Zastosowany odwar zawierał głównie związki gorzkie i olejek eteryczny. Testy wykazały, że 500 mg odwaru na 1 kg masy ciała szczura wykazuje takie same działanie hipoglikemiczne jak 3 mg glibenklamidu. [Sanchez de Medina i in., 1993]. Stosowany zewnętrznie olejek jałowcowy wykazuje działanie drażniące skórę, powodując jej przekrwienie, a zarazem działa bakteriobójczo. Cechę tę wykorzystuje się w leczeniu bólu reumatycznego i nerwobóli.

4 Biologia i pozycja systematyczna wybranych gatunków owadów żerujących na sośnie pospolitej *Pinus sylvestris* L. i jałowcu pospolitym *Juniperus communis* L.

Juniperus communis L. i *Pinus sylvestris* L. są roślinami pospolicie występującymi na terenie kraju. Stanowią one ważną bazę pokarmową dla wielu gatunków owadów. W bieżącym rozdziale znalazł się krótki przegląd wiedzy na temat owadów żerujących na sośnie pospolitej i jałowcu pospolitym. Więcej miejsca poświęcono na dane dotyczące pozycji systematycznej, morfologii i biologii dwóch gatunków owadów będących obiektem badań opisanych w niniejszym opracowaniu: znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) oraz miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.)

Na sośnie żeruje około 150 gatunków owadów [Boczek i in., 2000], lecz tylko niektóre z nich mogą występować w dużej liczbie i powodować znaczne szkody. W opracowaniu „Drzewa iglaste i owady na nich żerujące” [Stocki i in., 2000], autorzy szczegółowo opisują przeszło 80 gatunków oraz dodatkowo wymieniają 10 grup owadów o różnej randze systematycznej dzieląc je na szkodniki nasion i szyszek, siewek i sadzonek, upraw, młodników, drzewostanów średnich i starszych klas wieku, szkodniki wtórne niszczące strzały, konary gałęzie i owady żerujące na pniakach i posuszu. Jak można wywnioskować z przytoczonego podziału, sosna jest więc nie tylko atakowana przez znaczną liczbę gatunków owadów, ale także jest narażona na ich ataki na każdym etapie swojego cyklu życiowego.

Jałowiec pospolity jest także atakowany przez liczne gatunki owadów [Soika i in., 1997] [Rose i in., 2000] [Zieliński, 1997] [Garcia, 1998] [Jaśkiewicz, 2000]. W opracowaniu „Jałowiec pospolity i jego rola w lesie” [Babiński, 1974] autor opisuje 22 gatunki owadów żerujące na tej roślinie dzieląc je na owady uszkadzające szyszkojagody, igły, pąki, pędy, miazgę, łyko i korę.

4.1 Miodownica sosnowa (*Cinara pini* L.)

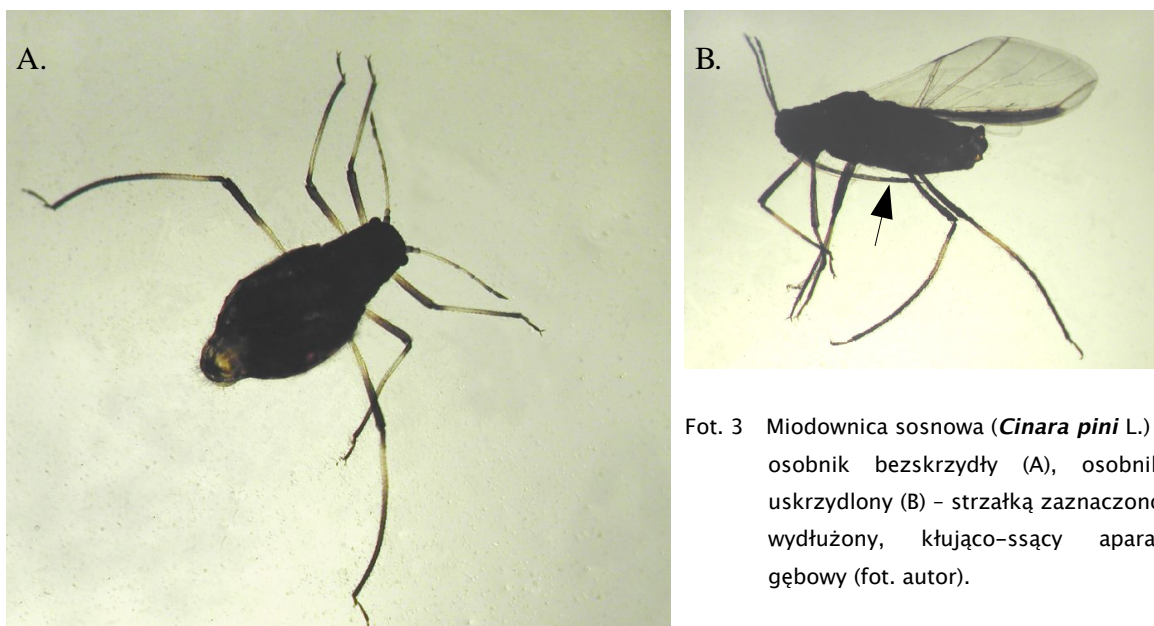
Miodownica sosnowa (*Cinara pini* L.) jest pospolicie występującą mszycą. Rośliną żywicielską dla tego gatunku jest sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.).

Pozycja systematyczna

Typ:	<i>Arthropoda</i>	stawonogi
Gromada:	<i>Insecta</i>	owady
Rząd	<i>Homoptera</i>	pluskwiaki równoskrzydłe
Rodzina	<i>Aphididae</i>	mszycowate
Podrodzina:	<i>Lachninae</i>	miodownice
Rodzaj:	<i>Cinara</i>	
Gatunek:	<i>Cinara pini</i> L.	miodownica sosnowa

Morfologia

Zwarte, ciemno zabarwione ciało owada osiąga 2–4 mm długości. Odnóża i czułki są dobrze wykształcone. Uwagę zwracają wydłużone narządy gębowe typu kłująco-ssącego. Niektóre osobniki posiadają dobrze rozwinięte skrzydła - reszta jest bezskrzydła.



Fot. 3 Miodownica sosnowa (*Cinara pini* L.), osobnik bezskrzydły (A), osobnik uskrzydłony (B) – strzałką zaznaczono wydłużony, kłująco-ssący aparat gębowy (fot. autor).

Biologia

Mszyce od wiosny do jesieni bytują na pędach rośliny żywicielskiej wysysając z niej substancje pokarmowe przy pomocy długiej kłujki. Poszczególne osobniki tworzą niekiedy liczne kolonie. W koloniach można zaobserwować zarówno osobniki uskrzydłone jak i bezskrzydłe. Osobniki uskrzydłone biorą udział w rozprzestrzenianiu się na nowe rośliny żywicielskie. Zimują łatwe do zauważenia, ciemne, błyszczące jaja ułożone w rzędach na zewnętrznej stronie liści szpilkowych. Zimę przeżywają także partenogenetyczne, bezskrzydłe samice przebywające w okolicach wierzchołkowych okółków. Wiosną i latem (maj, czerwiec, lipiec) mszyce osiągają maksymalną liczebność. Tworzą wtedy kolonie obficie produkujące słodką wydzielinę - spadź. Mimo liczego występowania znaczenie tej mszycy jako szkodnika jest raczej niewielkie. Większe znaczenie ekologiczne wydają się mieć miodownice sosnowe jako producenci słodkiej spadzi. Wydzielina ta jest bowiem pokarmem wielu owadów (mrówek, gąsieniczek i innych błonkoskrzydłych) będących często pasożytami lub drapieżcami w stosunku do szkodników pierwotnych sosny. Ma to szczególnie duże znaczenie na ubogich siedliskach [Stocki i in., 2000].

4.2 Znamionek jałowcowy (*Megastigmus bipunctatus* Swed.)

Znamionek jałowcowy jest niewielkim owadem z rodziny *Torymidae*. Cykl życiowy tej błonkówki związany jest ściśle z rośliną żywicielską – jałowcem pospolitym (*Juniperus communis* L.) gdyż larwy znamionka żerują we wnętrzu szyszkojagód tej rośliny.

Pozycja systematyczna

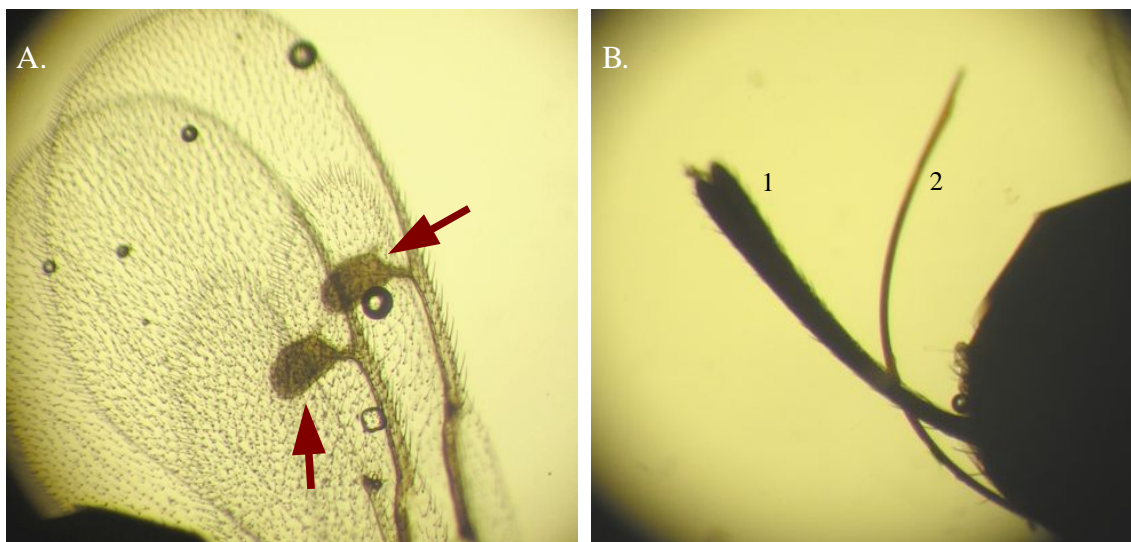
Typ:	<i>Arthropoda</i>	stawonogi
Gromada:	<i>Insecta</i>	owady
Rząd:	<i>Hymenoptera</i>	błonkoskrzydłe
Nadrodzina:	<i>Chalcidoidea</i>	bleskotkowate
Rodzina:	<i>Torymidae</i>	
Podrodzina:	<i>Megastigminae</i>	
Rodzaj:	<i>Megastigmus</i>	
Gatunek:	<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed. (<i>M. cunzei</i>)	
		znamionek jałowcowy

Morfologia

Znamionek jałowcowiec (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) [Kapuściński, 1946] [Skrzypczyńska, 1983] [Dolgin, 1993] [Roques i Skrzypczyńska, 2003] jest niewielkim owadem osiągającym długość 1,9 – 3,3 mm. Samce są zwykle nieco mniejsze od samic. Barwa ciała dorosłych owadów jest zmienna i zależy od rejonu, z którego pochodzą. Skrzydła są przezroczyste, tęczowo mieniące się. Odnóża dobrze wykształcone. Tułów łukowato wypukły z najsilniej rozwiniętym śródpleczem. U samic zaobserwować można nieco większy, bardziej owalny odwłok zakończony tzw. pokładelkiem – wyspecjalizowanym narządem umożliwiającym składanie jaj do wnętrza nasion w szyszkojagodach jałowca pospolitego. Pokładelko ma wydłużony kształt. W jego skład wchodzi specjalnie wykształcone szczecinki umożliwiające przebijanie twardych osłon szyszkojagód i znajdujących się w ich wnętrzu nasion.



Fot. 4 Znamionek jałowcowy (*Megastigmus bipunctatus* Swed.): Samiec (A) różni się od samicy (B) między innymi mniejszym odwłokiem pozbawionym żeńskich przydatków płciowych (pokładetko) oraz kształtem i wielkością znamion skrzydłowych (fot. autor).

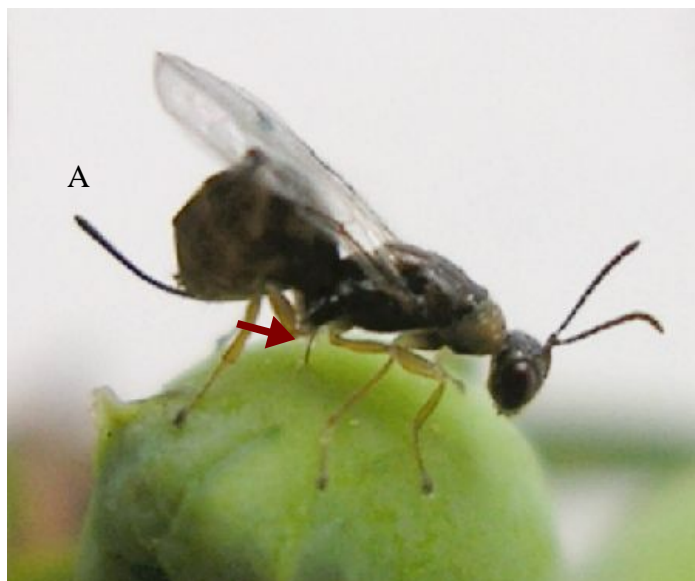


Fot. 5 Budowa skrzydeł (A) i zewnętrznych narządów płciowych żeńskich (B) samicy znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.). Na mikroskopowej fotografii skrzydeł można zauważyć liczne pokrywające ich powierzchnię włoski. Strzałkami oznaczono dobrze wykształcone znamiona skrzydłowe, które dały początek polskojęzycznej nazwie rodzajowej. Na zdjęciu końcowego odcinka odwłoka samicy (B) można zauważyć pokrytą włoskami osłonę pokładetka (1), oraz wydobyte z niej podczas preparatyki pokładetko (2). (fot. autor)

Biologia

Biologia gatunku *Megastigmus bipunctatus* Swed. jest ściśle związana z jego rośliną żywicielską - jałowcem pospolitym (*Juniperus communis* L.). Występowanie owadów ogranicza się do bezpośredniego sąsiedztwa roślin żywicielskich. Owady dorosłe pojawiają się na terenie kraju w okresie od drugiej połowy lipca (obszary nizinne) do pierwszej połowy sierpnia (obszary podgórskie) (obserwacje autora poczynione na terenie Kaszub świadczą, iż na tym terenie wylot osobników dorosłych może odbywać się wcześniej). Środowiskiem życia znamionków są skupienia jałowców najczęściej w pobliżu granicy lasu, a także jałowce stanowiące podszyt lasów. Podstawowym czynnikiem ograniczającym wydaje się być nasłonecznienie (znamionek jest gatunkiem ciepło- i światłolubnym). W przypadku jałowców stanowiących podszyt starszych drzewostanów zasiedleniu przez znamionka podlegają najczęściej rośliny znajdujące się w partiach brzeżnych (bardziej nasłonecznionych), na granicy lasu i pola oraz przy drogach. Okres pojawu owadów dorosłych trwa około 3 tygodnie. W tym czasie nie przyjmują one pokarmu z wyjątkiem woskowego nalotu z powierzchni liści jałowca. Spijają także krople rosy pojawiające się rankiem na roślinie żywicielskiej. Poszczególne osobniki jako imago żyją zaledwie kilka dni. W tym czasie przebywają na roślinie żywicielskiej. Jedynie samce wykonują krótkie przeloty na sąsiednie krzaki jałowca. Po zalotach i kopulacji samice składają jajeczka do nasion we wnętrzu jasnozielonych, tegorocznych szyszkojagód jałowca, mających już wtedy średnicę około 4-5 mm. Proces składania jaj poprzedzony jest badaniem szyszkojagody za pomocą czułków. Prawdopodobnie ma to na celu sprawdzenie kondycji szyszkojagody oraz czy nie złożyła do niej już jajeczka inna samica. Proces składania jaj wymaga wprowadzenia pokładełka głęboko do wnętrza szyszkojagody, tak aby dostać się do jednego z pokrytych twardą okrywą nasion. W przypadku natrafienia na zbiornik olejkowy samica wyciąga pokładełko i ponawia próbę w innej części szyszkojagody. Pojedyncze jajo zostaje złożone do wnętrza zarodka w centralnej części nasienia. Szyszkojagoda jałowca zawiera najczęściej trzy nasiona. Jajo jest jednak zwykle składane tylko do jednego spośród nich. Stosunkowo rzadko spotyka się szyszkojagody, w których uszkodzone zostają dwa lub trzy nasiona. Jak się wydaje

wielkość szyszkojagody nie ma wpływu na częstość składania w niej jaj przez znamionka [Kapuściński, 1946].



Fot. 6 Samica znamionka jałowcowego podczas składania jaja do wnętrza szyszkojagody jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.). Strzałka wskazuje część zagłębionego w tkankach szyszkojagody pokładełka. Samica zawija pokładełko pod sobą w taki sposób, że dotyka ono zatułowia pomiędzy biodrami i praktycznie prostopadle zagłębia się w szyszkojagodzie. Osłona pokładełka (A) na tym etapie jest całkowicie oddzielona od reszty pokładełka i zachowuje normalne położenie (fot. autor).

Z jaja po około 2 tygodniach wylęga się biaława, wydłużona larwa. Żeruje ona wyjadając wnętrze nasienia do jesieni po czym zapada w zimowy letarg. Wiosną wznawia żerowanie. Podczas żeru larwa wyjada całe wnętrze nasienia, tworząc w ten sposób komorę, w której się przepoczwarcza. Łupina nasienna oraz osłona nasienna pozostają nieuszkodzone i pełnią funkcję naturalnego oprzędu. Przez cały okres żerowania larwy znamionka szyszkojagoda jałowca rozwija się normalnie. Nawet zasiedlenie wszystkich nasion szyszkojagody przez larwy znamionka nie wywołuje żadnych widocznych na zewnątrz zmian w porównaniu z szyszkojagodami nie zasiedlonymi. Owad dorosły po opuszczeniu osłon poczwarki zaczyna wygryzać otwór wylotowy, aby wydostać się na zewnątrz. Poczwarka jest zawsze skierowana częścią głowową do szczytu szyszkojagody, co wskazuje owadowi dorosłemu właściwy kierunek wędrówki. Przegryzienie twardej, zdrewniałej łupiny nasiennej, a następnie miąższu i skórki szyszkojagody zabiera znamionkowi aż 6 dni. W czasie gdy samica znamionka dopiero zaczyna wygryzać sobie

otwór wylotowy w skórcie szyszkojagody samce, które wcześniej wydostały się z szyszkojagód wyczuwają to. Na szyszkojagodzie, w której znajduje się samica rozgrywa się seria gwałtownych niekiedy walk, w wyniku których wyłoniony zostaje najsilniejszy z konkurentów. Oczekuje on na samicę (niekiedy cała noc), a gdy ta opuści szyszkojagodę, odbywa z nią gody [Kapuściński, 1946].

Już w czasie przegryzania się znamionka przez wierzchnie warstwy tkanek szyszkojagody zielona w tym czasie szyszkojagoda wybarwia się w tym miejscu na fioletowo. Po opuszczeniu jej przez owada pozostaje charakterystyczny otwór wylotowy otoczony fioletowo-niebieską obwódką. W miarę upływu czasu obwódka zasycha przybierając brunatną barwę. Szyszkojagoda natomiast dojrzewa zmieniając barwę z zielonej na ciemnofioletową. Szyszkojagody uszkodzone przez znamionka nie opadają lecz dojrzewają i pozostają na krzewie tak długo jak pozostałe nie uszkodzone szyszkojagody.

Znamionek jałowcowy nie jest jedynym organizmem uszkadzającym szyszkojagody jałowca pospolitego, jednak pozostawiane przez niego otwory wylotowe są na tyle charakterystyczne, że pozwalają na jednoznaczne odróżnienie szyszkojagód uszkodzonych przez ten gatunek od innych.

5 Wybrane metody analizy ilościowej i jakościowej olejków eterycznych

W bieżącym rozdziale zawarto opis metod analitycznych stosowanych przy badaniach składu jakościowego i ilościowego olejków eterycznych. Ponieważ chromatografia gazowa stanowi powszechnie znaną i stosowaną technikę – jej opis ograniczono do minimum skupiając się raczej na technice mikroekstracji do fazy stałej (SPME) i nowych możliwościach jaki stwarza połączenie tej techniki z chromatografią gazową przy badaniu składników olejków eterycznych, szczególnie w kontekście badań interakcji owad-roślina. Nieco miejsca poświęcono także metodologii rozdzielania chiralnych z użyciem chromatografii gazowej.

5.1 Chromatografia gazowa w achiralnej i chiralnej analizie składników olejków eterycznych

Początki chromatografii gazowej datuje się na rok 1952, kiedy to A.T. James i A.J.T. Martin opublikowali pracę na temat rozdzielania mieszanin kwasów tłuszczowych i amin za pomocą podziałowej chromatografii gazowej. Od tamtego czasu nastąpiło wielkie upowszechnienie się tej metody połączone ze znacznym postępem w dziedzinie konstrukcji aparatury, technologii wytwarzania kolumn chromatograficznych i zastosowania techniki mikrokomputerowej. Szacuje się, że chromatograf gazowy jest w chwili obecnej najpopularniejszym instrumentem w laboratoriach analitycznych na świecie [Witkiewicz i Hetper, 2001].

Chromatografia gazowa okazała się metodą wręcz niezastąpioną szczególnie przy rozdzielaniu złożonych mieszanin związków lotnych, takich jak olejki eteryczne. Ciągłe udoskonalanie technologii produkcji kolumn chromatograficznych doprowadziło do uzyskania kolumn kapilarnych o bardzo dobrych parametrach (wysokiej sprawności), co umożliwiło dokładne poznanie składu olejków eterycznych izolowanych z wielu gatunków roślin [Wibe i in., 1998] [Schäfer i in., 1995] [Persson i in., 1996] [Valterova i in., 1995] (w tym także znacznej liczby roślin leczniczych). Do analizy złożonych mieszanin terpenoidów metodą GC używa się obecnie najczęściej kolumn kapilarnych (85% wszystkich analiz opisanych w literaturze naukowej w 1986 roku). Najczęściej używane

fazy stacjonarne to: DB-1, Carbowax, OV-1, OV101, PEG 20M, BP5, DB-5. Długość używanych kolumn chromatograficznych waha się od 25 do 100 m, a grubość warstwy fazy stacjonarnej wynosi od 0,2 do 0,7 μm . Stosowane temperatury obejmują zakres od 50 °C (70 °C) do 280 °C (5 °C/min) [Lockwood, 2001].

Mimo znacznego postępu w technologii rozdzielców złożonych mieszanin metodą chromatografii gazowej ciągle pojawiają się nowe wyzwania. Podstawowy i stały problem stanowi koelucja różniących się w niewielkim stopniu składników złożonych mieszanin jakimi są olejki eteryczne. Odpowiedni dobór parametrów fizycznych kolumny (długość, średnica, grubość i typ fazy stacjonarnej) oraz wysiłki zmierzające do opracowania optymalnej metody rozdzielania nie zawsze dają oczekiwane rezultaty. Potrzebę zwiększenia zdolności rozdzielczej w rozdzielcach chromatograficznych zwiększyły jeszcze dodatkowo prowadzone w ostatnich latach badania form enanjomerycznych składników olejków eterycznych. Wszystkie te czynniki powodują, że przeprowadzanie analiz chromatograficznych z użyciem pojedynczej kolumny staje się w pewnych przypadkach niewystarczające. Jedną z dróg do uzyskania lepszych rozdzielców składników złożonych mieszanin okazało się łączenie dwóch kolumn o różnych fazach stacjonarnych (ang. two-dimensional gas chromatography - GCxGC) [Marriott i in., 2001]. Anality są rozdzielane na pierwszej kolumnie po czym część z nich (np. określona frakcja) jest kompensowana i wprowadzana na drugą kolumnę, gdzie ulega ponownemu rozdzielaniu na innej fazie stacjonarnej. Bardzo ciekawą odmianą tej techniki jest „comprehensive two-dimensional gas chromatography”. Metodę tą można nazwać „prawdziwą” GCxGC ponieważ mieszanina rozdzielona na pierwszej kolumnie jest w całości wprowadzana na drugą kolumnę w postaci pulsacyjnie dozowanych porcji. Porcje te są następnie szybko rozdzielane na drugiej kolumnie wykorzystującej technikę „Fast GC”. Technologia ta zwiększa efektywność rozdzielania do tego stopnia, że posiadająca podobną sprawność pojedyncza kolumna chromatograficzna musiałaby mieć długość około 100 km! [Marriott i in., 2001].

Jak już wcześniej wspomniano jednym z czynników powodujących potrzebę uzyskania większej zdolności rozdzielczej analiz chromatograficznych są prowadzone obecnie na coraz większą skalę badania form enanjomerycznych składników olejków

lotnych [Valterova i in., 1995] [Persson i in., 1996] [Sjödín i in., 1996] [Wang i in., 1997]. Zastosowanie chiralnych faz stacjonarnych w chromatografii gazowej zostało znacznie udoskonalone pod koniec lat sześćdziesiątych przez Gil-Av i współpracowników [Schurig, 2002]. Wkrótce potem nastąpił szybki rozwój technologii wytwarzania kolumn chromatograficznych oraz poszukiwanie nowych faz stacjonarnych pod kątem ich przydatności dla tego typu analiz. W przypadku rozdzielów chiralnych składników olejków eterycznych szczególnie przydatne okazały się fazy stacjonarne oparte na pochodnych cyklodekstryn [Bicchi i in., 1999]. Modyfikacje chemiczne związków z tej grupy pozwoliły na wytwarzanie faz stacjonarnych o nieco zmienionych właściwościach, co zaowocowało stworzeniem całego szeregu dostępnych komercyjnie kolumn chromatograficznych przeznaczonych do różnego typu analiz chiralnych [Restek Corp., 1997].

5.2 Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME)

Proces przygotowania próbek do analizy może być długotrwały, skomplikowany, pracochłonny i drogi. Często wymaga też dużych ilości materiału wyjściowego. Jako przykład można podać proces destylacji olejków eterycznych z materiału roślinnego, który wymaga często kilku godzin poświęconych na przygotowanie (rozdrobienie) dużych ilości materiału roślinnego oraz na samą destylację. Sam proces wymaga dużych ilości energii i specjalistycznego szkła laboratoryjnego. Aparatura destylacyjna zajmuje dużo miejsca i wymaga ciągłego dozoru oraz stosowania zabezpieczeń (niebezpieczeństwo pożaru, wybuchu lub poparzenia). Jako proces przebiegający w wysokiej temperaturze destylacja może sprzyjać spontanicznym przemianom chemicznym termolabilnych substancji, co może prowadzić do fałszywych wyników analiz. Destylacja jako metoda przygotowania próbek do analizy wraz z poprzedzającymi ją czynnościami zajmuje często wielokrotnie więcej czasu niż same analizy. W przypadku badań populacyjnych lub podobnych, obejmujących duże ilości prób, metoda ta jest głównym czynnikiem ograniczającym możliwości przerobowe laboratorium.

Wobec przytoczonego powyżej przykładu nie powinien dziwić fakt, iż od samego początku badań analitycznych szukano nowych metod przygotowywania próbek do analizy – metod, które pozwalałyby na uniknięcie lub przynajmniej zminimalizowanie przytoczonych powyżej problemów.

Metoda mikroekstrakcji do fazy stałej (ang. Solid Phase Microextraction – SPME) została wynaleziona w roku 1989 [Arthur i Pawliszyn, 1990]. Technologia ta jest następnym etapem ewolucji metodyki przygotowania próbek do analiz, którą zapoczątkowano w latach siedemdziesiątych opracowaniem metody SPE (ekstrakcji do fazy stałej) (ang. Solid Phase Extraction).

W technice SPE analizowaną cieklą próbę przepuszcza się przez złożę sorbentu osadzonego na nośniku. Uwolnienie analitów następuje poprzez przepuszczenie przez złożę niewielkiej ilości rozpuszczalnika organicznego [Berrueta i Gallo, 1990].

SPE ma wiele zalet. Niektóre z nich to:

- redukcja czasu badania,
- małe objętości rozpuszczalnika
- niski koszt analizy

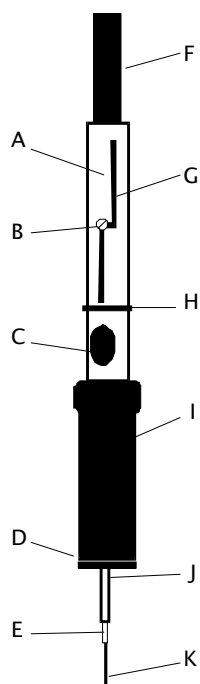
Metoda ta posiada jednak także wady:

- Oddziaływania między matrycą a sorbentem mogą powodować małe odzyski analizowanych związków.
- Zawiesiny obecne w próbce mogą powodować zatykanie lub blokowanie złoża.
- Poszczególne partie sorbentu mogą się różnić, co prowadzi do słabej odtwarzalności ekstrakcji.
- Ekstrakt zawierający związki uwolnione ze złoża wymaga zazwyczaj dalszego wzbogacania, co powoduje, że zakres zastosowań SPE jest ograniczony do związków o stosunkowo małej lotności.

Większość przedstawionych wad SPE rozwiązano w metodzie SPME przez zmianę geometrii sorbentu, polegającą na naniesieniu go na cienkie włókno szklane lub kwarcowe. Cylindryczny kształt zewnętrznej powierzchni ułatwia wymianę masy podczas sorpcji

oraz desorpcji analitów oraz eliminuje kłopoty związane z zatykaniem złoża. Metoda SPME jest łatwa w stosowaniu, szybka i nie wymaga używania rozpuszczalników organicznych. Pozwala uzyskać rzeczywiste, powtarzalne wyniki jakościowe i ilościowe w odniesieniu do próbek o różnym charakterze chemicznym i fizycznym.

Przyrząd do SPME przypomina wyglądem strzykawkę. Wewnątrz metalowej igły znajduje się włókno pokryte złożem. Włókno to może być wysuwane na zewnątrz przy pomocy tłoka, tak aby umożliwić jego kontakt z analitami. W czasie kontaktu ze złożem anality są absorbowane lub adsorbowane (w zależności od rodzaju złoża) po czym złoże jest ponownie chowane w osłonie (igle). Czas ekstrakcji zależy od rodzaju analitu i dobranych warunków i wynosi zwykle od 2 do 30 min. Po wsunięciu włókna do metalowej osłony może ono być transportowane, o ile istnieje taka potrzeba. W ten sposób możliwe jest nawet pobieranie próbek w terenie i przewożenie ich do laboratorium analitycznego. Przed transportem końcówka osłony włókna powinna być jednak uszczelniona. Po wprowadzeniu igły do dozownika chromatografu gazowego i ponownym wysunięciu włókna znajdujące się w nim anality są uwalniane pod wpływem wysokiej temperatury. Dzieje się tak, gdyż wraz ze wzrostem temperatury zmienia się wartość współczynnika podziału związków związanych przez złoże SPME. Uwolnione anality są porywane przez gaz nośny i dostarczone na kolumnę chromatograficzną, gdzie następuje ich rozdzielenie.



Rys. 2 Schemat budowy przyrządu do SPME

- A – tuleja 1
- B – śruba blokująca tłok
- C – otwór kontroli rodzaju złoża
- D – odkręcana końcówka
- E – włókno łączące
- F – tłok
- G – prowadnica
- H – gumowy pierścień
- I – tuleja 2
- J – osłona złoża (igła)
- K – pokryte złożem włókno

Przy badaniach z użyciem metody SPME ważny jest wybór odpowiedniego rodzaju złoża. Polimery pokrywające włókna do SPME można podzielić na podstawie mechanizmu ekstrakcji i polarności.

Tabela nr 8 Zestawienie i charakterystyka dostępnych rodzajów złożów używanych w metodzie SPME.

Grubość i rodzaj złoża	Mechanizm ekstrakcji	Polarność
7µm PDMS ⁵	ABSORPCJA	NIEPOLARNE
30µm PDMS	ABSORPCJA	NIEPOLARNE
100µm PDMS	ABSORPCJA	NIEPOLARNE
85µm PA ⁶	ABSORPCJA	POLARNE
65µm PDMS-DVB ⁷	ADSORPCJA	DIPOLARNE
65µm CW-DVB ⁸	ADSORPCJA	POLARNE
85µm CW-PDMS	ADSORPCJA	DIPOLARNE
55µm/30µm DVB/CA-PDMS	ADSORPCJA	DIPOLARNE

W przypadku włókna pokrytego substancją o właściwościach **absorbentu** ekstrakcja odbywa się na zasadzie rozdziału analitów pomiędzy matrycę a polimer stanowiący pokrycie (fazę stałą). Polimer ten można przyrównać do gąbki (lub cieczy), która chłonie całą swoją objętością. Zdolność włókna do absorpcji/desorpcji warunkuje jego grubość i wielkość cząsteczek analitów. Pozornie nie ma współzawodnictwa o miejsce wiązania, jednak związki migrują z różną prędkością, a pojemność włókna jest ograniczona jego grubością. Włókna absorbujące pokryte są PDMS lub PA.

5 – polidymetylosiloksanowe

6 – poliakrylanowe

7 – DVB – diwinylobenzen

8 – CW – carboxen

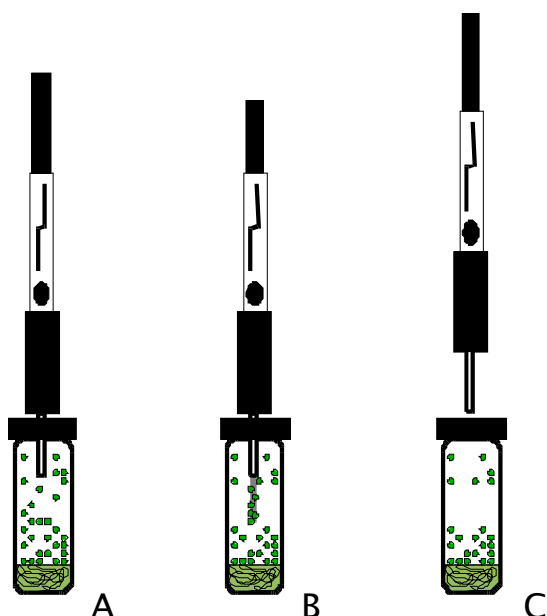
W przypadku włókna pokrytego substancją o właściwościach **adsorbentu** wiązanie analitów zachodzi dzięki fizycznym i chemicznym oddziaływaniom. Na całej swej powierzchni złoża tego typu posiadają mikro- i mesopory. Mechanizm ekstrakcji przypomina łapanie analitów w pory-pułapki wewnątrz złoża. Anality są zatrzymywane poprzez tworzenie wiązań wodorowych lub oddziaływania Wan der Waalsa. Ilość porów jest ograniczona, więc związki współzawodniczą o miejsce wiązania. Związki z wyższym współczynnikiem podziału wypierają związki z niższym współczynnikiem.

Do analizy składników lotnych olejków roślinnych optymalne wydają się włókna pokryte PDMS. Jako złoża o właściwościach adsorbentu stwarza ono mniejsze niebezpieczeństwo zafałszowania proporcji składu złożonych mieszanin spowodowanego konkurencją analitów o miejsce wiązania (jak to ma miejsce w przypadku złóż o charakterze adsorbentów), zwłaszcza w przypadkach stosunkowo dużych ich stężeń w matrycy. Dane literaturowe także zdają się świadczyć o wysokiej przydatności tego typu złoża w procesie analizy składników olejków eterycznych metodą SPME/GC [Schäfer i in., 1995] [Sigma-Aldrich Co., 1998].

Wykonywanie SPME bez bezpośredniego kontaktu z matrycą stanowi bardzo atrakcyjną metodę stosowaną w celu ekstrakcji lotnych związków przed ich analizą chromatograficzną. Dzieje się tak dlatego, że brak bezpośredniego kontaktu z matrycą wpływa dodatnio na trwałość włókien SPME, gdyż nie ulegają one zanieczyszczeniu wielkocząsteczkowymi organicznymi składnikami matrycy. Brak takich zanieczyszczeń nie tylko przedłuża ich żywotność, ale także zwiększa efektywność ekstrakcji. Analiza fazy nadpowierzchniowej SPME (headspace SPME) jest modyfikacją tradycyjnej techniki SPME polegającą na tym, że lotne składniki mieszaniny (matrycy) nie są absorbowane bądź adsorbowane poprzez bezpośrednie zanurzenie w niej złoża lecz z par zalegających tuż nad mieszaniną (matrycą) w zamkniętym naczyniu. Modyfikacja ta jest szczególnie przydatna przy analizach lotnych składników izolowanych bezpośrednio z materiału roślinnego, który zawiera szereg wielkocząsteczkowych substancji organicznych i innych zanieczyszczeń (śluzę, żywice, białka, barwniki roślinne). Headspace SPME umożliwia ekstrakcję lotnych składników olejków bez kontaktu złoża SPME z matrycą. W najprostszym przypadku pozyskanie analitów polega na:

- fragmentacji określonej ilości materiału roślinnego
- umieszczeniu go w niewielkim naczyniu
- odczekaniu czasu, który pozwoli na ustalenie się równowagi lotnych substancji w gazie nad próbką (w celu zwiększenia lotności analizowanych składników próbka bywa czasami podgrzewana)
- przeprowadzeniu standardowej ekstrakcji metodą SPME, uważając jednak, aby włókno nie wchodziło w kontakt ze znajdującym się na dnie naczynia materiałem roślinnym

Powyższe etapy wymagają optymalizacji warunków z uwzględnieniem rodzaju matrycy, typu i stężenia analizowanych substancji lotnych oraz rodzaju użytego włókna SPME, tak aby uzyskiwane wyniki były w pełni powtarzalne i wiarygodne. Jednak przytoczony schemat w pełni obrazuje prostotę prezentowanej metody.



Rys. 3 Schemat obrazujący zasadę działania przyrządu do SPME na przykładzie badania headspace SPME
 A - metalowa osłona złoże przebija membranę naczynka z rozdrobnionym materiałem roślinnym.
 B - złoże zostaje wysunięte, a znajdujące się w otoczeniu lotne anality adsorbują/absorbują się na nim (złoże nie wchodzi w bezpośredni kontakt z materiałem roślinnym znajdującym się na dnie naczynka)
 C - złoże zostaje ponownie wsunięte do metalowej osłony (igły), która następnie zostaje wysunięta z naczynka, zaabsorbowane/zaadsorbowane na złożu anality mogą następnie zostać termicznie uwolnione po wprowadzeniu igły do rozgrzanego dozownika chromatografu i wysunięciu złoża.

Dzięki zastosowaniu metody SPME stało się możliwe przeprowadzenie wielu interesujących badań obejmujących różne dziedziny nauki [Mindrup, 1995] [Wolley i Mindrup, 1996]. Mnogość zastosowań metody SPME przyczynia się do ciągłego wzrostu jej popularności wśród analityków. Znajduje ona szerokie zastosowanie m. in. w analizach jakościowych artykułów spożywczych, badaniach dotyczących ochrony środowiska, badaniach medycznych i biochemicznych. Szczególne miejsce zajmuje jako alternatywna

metoda badania materiałów botanicznych, między innymi dlatego, iż pozwala na szczegółowe poznanie składu poszczególnych części anatomicznych [Schäfer i in., 1995], nawet poprzez bezpośrednią ekstrakcję analitów ze struktur roślinnych.

Szczególnie interesujące wydają się być możliwości jej zastosowania do badań interakcji owad-roślina. SPME daje możliwość analizy składu chemicznego nawet bardzo niewielkiej i trudnej do analizowania próbki. Umożliwiło to np. wykonanie przeprowadzonych w toku niniejszej pracy analiz składników olejków eterycznych pojedynczych szyszkojagód jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) noszących ślady żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* L.), czy też poddanie analizie chromatograficznej składników olejków lotnych uzyskanych z niewielkich (długości poniżej 1 cm) fragmentów pędów sosnowych pobranych dokładnie w miejscu żerowania mszycy miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.). Metoda SPME umożliwia także badania związków lotnych wydzielanych przez owady w śladowych ilościach (np. feromonów owadzich).

Na zakończenie wspomnieć należy, że metoda SPME może być używana nie tylko w połączeniu z chromatografią gazową, ale także (dzięki stworzeniu specjalnych rozwiązań technicznych) z wysokosprawną chromatografią cieczową, co jeszcze bardziej zwiększyło możliwy zakres zastosowań.

6 Analiza i składowanie danych chromatograficznych

Konieczność przyśpieszenia przetwarzania dużej ilości danych chromatograficznych będących wynikiem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy zrodziła potrzebę stworzenia specjalistycznego oprogramowania do analizy i archiwizacji danych chromatograficznych. Bieżący rozdział stanowi przegląd technologii i oprogramowania stosowanego przy tworzeniu systemów przetwarzania i przechowywania danych naukowych.

Wykresy chromatograficzne wymagają zaawansowanej obróbki zanim dane w nich zawarte będą gotowe do wykorzystania. Wiele ze związanych z tym procesem zadań jest wykonywanych przez wyspecjalizowane programy komputerowe. Obróbka komputerowa danych chromatograficznych obejmuje między innymi:

- wykrywanie pików chromatograficznych
- obliczanie powierzchni pików
- obliczanie procentowych zawartości badanych substancji
- obliczenia ilościowe na podstawie danych kalibracyjnych
- przyporządkowywanie poszczególnych pików chromatograficznych określonym substancjom wchodzącym w skład analizowanej mieszaniny

Zadaniem oprogramowania jest także przechowywanie danych chromatograficznych oraz wspomaganie złożonych analiz tych danych.

Jesteśmy obecnie świadkami bardzo szybkiego rozwoju sieci komputerowych. Niektóre czasopisma naukowe wymagają udostępniania szczegółowych wyników badań na stronach WWW. Na niespotykaną wcześniej skalę upowszechnia się międzynarodowa współpraca naukowa. Wszystkie te zjawiska rodzą nowe potrzeby i stawiają nowe zadania przed oprogramowaniem chromatograficznym:

- możliwość udostępniania wyników analiz chromatograficznych w sieci Internet w postaci sieciowych baz danych chromatograficznych
- wgląd do danych chromatograficznych bez konieczności instalowania dodatkowego oprogramowania
- analiza danych chromatograficznych on-line

- czynione są także próby unifikacji formatu danych chromatograficznych (lub szerzej: danych analitycznych) w celu ułatwienia ich przepływu pomiędzy różnymi aplikacjami, systemami operacyjnymi, instrumentami badawczymi.

Wyrazem dążenia do spełnienia tych zadań są najnowsze produkty takich firm jak Agilent(ChemStation), Waters(Empower), ACD/Labs(ACD/ChromManager) i inne.

6.1 Sieciowe oprogramowanie naukowe – przegląd technologii

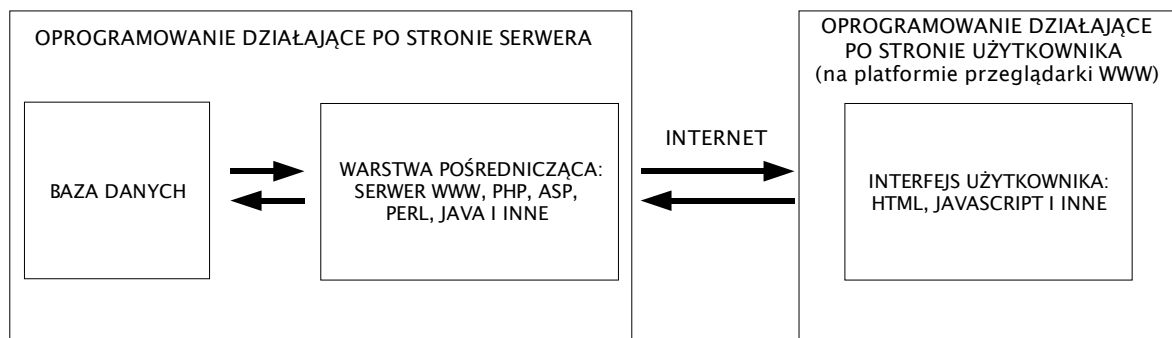
Ewolucja standardów oprogramowania sieciowego prowadzi do powstawania coraz bardziej skomplikowanych systemów udostępniania i przetwarzania informacji. Wkrótce po powstaniu języka opisu strony (HTML) pojawiła się potrzeba tworzenia stron interaktywnych – dynamicznie reagujących na poczynania użytkowników. Umożliwiło to zastosowanie wielu rozwijanych ciągle technologii i języków programowania. Dopiero jednak połączenie stron WWW z bazami danych otworzyło nowe możliwości rozwoju oprogramowania naukowego. Technologie i języki programowania takie jak Perl, Java, JavaScript, PHP, ASP w połączeniu z bazami danych pozwoliły na stworzenie potężnych, dostępnych dla każdego, narzędzi do katalogowania, przechowywania i analizy danych naukowych.

HTML (HyperText Markup Language) jest językiem opisu stron WWW interpretowanym przez przeglądarki internetowe [Musciano i Kennedy, 1998]. Specyfikacja języka jest kontrolowana przez organizację o nazwie World Wide Web Consortium.

PHP (PHP: Hypertext Preprocessor) jest szeroko rozpowszechnionym, skryptowym językiem programowania zaprojektowanym głównie do tworzenia dynamicznych serwisów WWW (ale nie tylko) [Atkinson, 2000] [Hilton i Willis, 2000]. Dzięki ścisłej współpracy z oprogramowaniem serwera WWW aplikacje sieciowe tworzone w tym języku charakteryzują się znaczną szybkością działania. Możliwość zagnieżdżania poleceń PHP w kodzie HTML oraz podobieństwo składni PHP do składni uznanych języków programowania (C, Perl) znacznie ułatwia i przyspiesza tworzenie nawet

skomplikowanych aplikacji WWW. Dostępność wersji PHP dla różnych systemów operacyjnych i typów komputerów także przyczyniła się do wzrostu popularności tego języka programowania.

JavaScript podobnie jak opisywany wcześniej PHP jest językiem skryptowym. Jest to jednak język przeznaczony raczej do pisania programów wykonywanych po stronie użytkownika, a nie po stronie serwera, jak to się dzieje w przypadku PHP. Przeglądarka internetowa jest środowiskiem, w którym uruchamiane są zagnieżdżone w kodzie HTML polecenia tego języka. JavaScript jest językiem programowania przeznaczonym do pisania prostych programów wspomagających działanie aplikacji WWW (np. obsługa formularzy, różnego rodzaju kalkulatory itp.) [Danesh, 1997].



Rys. 4 Schemat budowy udostępnionej w sieci Internet bazy danych. Jak można zauważyć do działania baza taka wymaga współpracy wielu programów.

Rozpoczęto też prace nad stworzeniem standardu formatu danych naukowych. W wielu przypadkach standard ten opiera się na technologii XML (extensible markup language).

6.2 Wizualizacja danych naukowych, a grafika wektorowa w sieci Internet

Jednocześnie z bazami danych naukowych pojawiła się potrzeba wizualizacji tych danych. Nawet interaktywne generowanie grafiki rastrowej okazuje się czasami niewystarczające. W 1996 roku firma Macromedia stworzyła pierwszą wersję oprogramowania do tworzenia i prezentacji grafiki wektorowej i animacji na stronach

WWW o nazwie Macromedia Flash. Niebawem nowy standard bardzo się rozpowszechnił. Mimo, że format ten wymaga instalacji dodatkowego oprogramowania szacuje się, iż w chwili obecnej ponad 90% przeglądarek internetowych ma zainstalowane dodatki umożliwiające odtwarzanie plików w tym formacie. Od 1998 roku firma Macromedia nieodpłatnie udostępnia specyfikację formatu Macromedia Flash, co spowodowało powstanie wielu, tworzonych przez niezależnych programistów, aplikacji zapisujących pliki w tym formacie. Wydawać się może, iż standard zapisu plików Macromedia Flash stał się zatem standardem „otwartym”. W praktyce jednak kontroluje go wyłącznie firma Macromedia. Potrzeba powstania całkowicie „otwartego” standardu grafiki wektorowej spowodowała stworzenie specyfikacji formatu SVG (Scalable Vector Graphics) zarekomendowanego przez World Wide Web Consortium w roku 2001. Mimo, iż jest to standard „otwarty”, oparty na XML oraz oficjalnie zalecany, nie rozpowszechnił się na taką skalę jak konkurencyjny format Macromedia Flash, jednak także może być wykorzystywany do wizualizacji danych naukowych.

Platformy Macromedia Flash oraz SVG wydają się wielce obiecujące pod względem wizualizacji danych naukowych. W obu przypadkach możliwa jest interakcja z użytkownikiem, co otwiera nowe możliwości przy konstrukcji interfejsów oprogramowania sieciowego. Wektorowa grafika przestaje być jedynie statycznym rysunkiem lub animacją, ale zaczyna przypominać włączony do strony WWW program reagujący na poczynania użytkownika. Szczególną uwagę należy zwrócić na możliwość pisania skryptów w specjalnie zaprojektowanym dla standardu Macromedia Flash języku skryptowym ActionScript [Moock, 2003]. Efekty działania takich programów można podziwiać w postaci interaktywnych gier sieciowych. Mimo potężnych możliwości i znacznego rozpowszechnienia technologii Macromedia Flash, wciąż jest ona rzadko spotykana w profesjonalnych serwisach informacji naukowej. Przyczyna tego zjawiska leży być może w postrzeganiu tej technologii raczej jako platformy do tworzenia gier i innych aplikacji multimedialnych służących rozrywce niż jako potężnego narzędzia zdolnego wnieść całkiem nową jakość do sieciowych aplikacji naukowych.

6.3 Wizualizacja danych chromatograficznych

Wizualizacja danych chromatograficznych przechowywanych w sieciowych bazach danych jest niewątpliwie jedną z dziedzin gdzie szerokie zastosowanie znajdują technologie generowania wektorowej grafiki. Dzięki udostępnieniu przez firmę Macromedia specyfikacji formatu plików Flash powstało wiele narzędzi i bibliotek programistycznych, które mogą zostać wykorzystane w tworzonym oprogramowaniu sieciowym (wiele z tych narzędzi jest rozpowszechnianych bezpłatnie). Możliwość interakcji z użytkownikiem rozszerza zastosowania technologii Macromedia Flash czyniąc z niej nie tylko narzędzie do prostej wizualizacji danych chromatograficznych, ale także element interfejsu użytkownika pomocny przy wizualnych manipulacjach związanych z edycją i analizą danych. W aplikacjach sieciowych wykorzystujących technologię Macromedia Flash do tworzenia interfejsu użytkownika można np. stosować technikę „przeciągnij i upuść” (ang. drag and drop). Ta użyteczna i intuicyjna technika jest powszechnie stosowana w interfejsach graficznych systemów operacyjnych i w tworzonych dla nich aplikacjach, jest jednak prawie nie spotykana na stronach WWW. W przypadku tworzenia sieciowych aplikacji chromatograficznych otwiera to praktycznie nieograniczone możliwości wizualnych operacji edycyjnych (np. oznaczanie pików chromatograficznych, manualna edycja linii bazowej, ustawianie początku i końca integracji czy wizualne zarządzanie chromatogramami).

6.4 Podsumowanie

Rozwój międzynarodowej współpracy naukowej stwarza potrzebę szybkiego dostępu do danych i informacji oraz ich łatwego przenoszenia i wizualizacji w różnych systemach komputerowych. Język HTML wspomagany technologiami takimi jak PHP, Perl, ASP Java czy JavaScript już od pewnego czasu stał się standardem przy tworzeniu interfejsów publicznie dostępnych sieciowych baz danych naukowych. Brak uznanego standardu zapisu danych chromatograficznych oraz ograniczenia technologii HTML limitowały dotychczas możliwości stworzenia sieciowych baz danych

chromatograficznych na wzór baz danych sekwencji DNA czy białek [Cheng-Yu Wang F., 1997]. Rozwijające się obecnie technologie generowania grafiki wektorowej na stronach WWW, nowe możliwości budowania interfejsów użytkownika, oraz opracowywane standardy zapisu danych chromatograficznych powinny przyspieszyć powstawanie sieciowych narzędzi służących nie tylko do przechowywania i wizualizacji tych danych, ale także do ich złożonych analiz.

7 Podstawy teoretyczne metody optymalizacji Taguchi

Użyta w tym opracowaniu metoda headspace SPME pozwala na bardzo szybkie przygotowanie składników olejków eterycznych do analizy. Mimo, że jest ona stosunkowo prostą techniką składa się z kilku etapów, z których każdy powinien zostać poddany optymalizacji w celu uzyskania optymalnej wydajności oraz powtarzalności uzyskanych tą drogą wyników.

Podstawowe etapy przygotowania próbki do analizy z użyciem metody SPME obejmują:

- preinkubację materiału roślinnego po jego fragmentacji i umieszczeniu w zamkniętym naczyniu
- absorpcję lotnych składników na pokrytym odpowiednim złożem włóknie SPME
- desorpcję analitów po wprowadzeniu osłony złoża SPME (igły) do rozgrzanego dozownika chromatografu i wysunięciu złoża

W przypadku punktu pierwszego wartościami podlegającymi optymalizacji będą temperatura i czas preinkubacji. W przypadku etapu absorpcji i desorpcji należy odpowiednio dobrać czas ich trwania.

Jako, że mamy tu do czynienia z szeregiem zmiennych, które należy zoptymalizować dobrym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie nowych metod służących do optymalizacji złożonych układów doświadczalnych. Jedną z takich metod, a raczej ich zbiorem, są metody Taguchi [Taguchi, 1987]. Są one obecnie szeroko i z powodzeniem stosowane w optymalizacji procesów przemysłowych [Li, 2000] [Arunachalam i in., 1999] [Noori, 1998], jakkolwiek nie znalazły jeszcze szerokiego zastosowania w optymalizacji metod analitycznych.

Podstawy matematyczne są skomplikowane i wykraczające poza zakres niniejszej pracy, jakkolwiek poniżej przedstawiono podstawową charakterystykę metod Taguchi z uwypukleniem różnic w stosunku do tradycyjnych metod optymalizacji i planowania doświadczeń. Poniższy opis został przygotowany na podstawie dokumentacji

dostarczonej z programem [StatSoft Inc., 1995]. Metody Taguchi umożliwiają stosowanie dużej liczby wielkości wejściowych (np. 16 lub 32), w przypadku których nie można dokonać oceny wpływu współdziałania wielkości wejściowych, natomiast podstawowym zagadnieniem jest konstrukcja szacunków opisujących wpływ pojedynczych wielkości wejściowych przy minimalnej liczbie pomiarów. Podstawowymi założeniami, a jednocześnie cechami różniącymi metody Taguchi od tradycyjnych procedur sterowania jakością są:

- koncepcja kwadratowej funkcji straty jakości,
- użycie współczynników stosunku sygnału do szumu (S/N),
- użycie tablic ortogonalnych.

Kwadratowa funkcja straty jakości

W metodach Taguchi założono, że każde odchylenie parametrów od wartości najbardziej pożądanej powoduje stratę jakości podniesioną do kwadratu. Dlatego zabiegi optymalizacyjne powinny mieć na celu minimalizację kwadratów odchyleń od stanu idealnego. Konwencjonalne metody optymalizacji doświadczeń zakładają, że funkcja utraty jakości ma charakter nieciągły. Oznacza to, że odchylenie od specyfikacji nominalnej w pewnym określonym zakresie nie wpływa na jakość, czyli funkcja utraty jakości jest równa zero. Po wyjściu poza ten określony przedział tolerancji utrata jakości jest nieakceptowana. Dobrym zobrazowaniem małego realizmu tradycyjnego podejścia jest przykład podany przez autorów programu Statistica [StatSoft Inc., 1995]: „Czy jest różnica pomiędzy samochodem, w którym nic się nie popsulo w trakcie roku po zakupie, a samochodem, w którym objawiły się stukania, kilka zaczepów odpadło i popsul się zegar na desce rozdzielczej? Każdy, komu zdarzyło się kupić samochód podobny do drugiego z wymienionych, wie, jak dokuczliwe mogą być te pozornie drobne i może nawet dopuszczalne problemy jakościowe. Celem jest pokazanie, jak nierealistyczne jest zakładanie, że odchylenie procesu produkcyjnego od nominalnej specyfikacji nie powoduje utraty jakości, o ile tylko znajduje się wewnątrz przedziału tolerancji. Wręcz odwrotnie, jeżeli proces nie jest idealnie w celu, to pojawia się utrata jakości, wyrażalna

na przykład w terminach satysfakcji użytkownika. Więcej, funkcja utraty jakości nie jest liniową funkcją odchylenia od nominalnej specyfikacji, lecz raczej kwadratową (odwrócone U). Jeżeli pojawi się stukanie w jakimś miejscu samochodu, użytkownik nie jest jeszcze rozsierdzony, ale gdy pojawią się stukania w dalszych dwóch miejscach, może określić samochód jako śmieć. Stopniowe odchylenie procesu od specyfikacji nominalnej nie skutkuje proporcjonalną, ale raczej podniesioną do kwadratu utratą jakości.”

Współczynniki stosunku sygnału do szumu (S/N)

W celu precyzyjnego pomiaru utraty jakości powstała koncepcja czynników sygnału (ang. signal factors – S) oraz czynników zakłócających, czynników szumu (ang. noise factors – N). Szumem są te czynniki, które pozostają poza kontrolą użytkownika produktu. W przypadku reakcji metody SPME są to np. wahania temperatury próbki podczas ekstrakcji spowodowane niedokładnością termoregulatora itp. Sygnałami są te czynniki, które są ustawiane lub kontrolowane przez eksperymentatora, np. temperatura czy czas preinkubacji opróbki. Kluczową zasadą mierzenia jakości przyjętą przez Taguchi’ego jest minimalizacja zmienności układu doświadczalnego w odpowiedzi na czynniki zakłócające, szumowe (N – ang. noise factors), przy jednoczesnej maksymalizacji zmienności w odpowiedzi na czynniki sygnału (S – ang. signal factors). Należy wspomnieć, że Taguchi (1987) opracował kilka rodzajów współczynników S/N w zależności od przyjętej strategii optymalizacyjnej. W niniejszej pracy używany będzie współczynnik „im większy – tym lepszy” (ang. larger-the-better).

Tablice ortogonalne

Taguchi opracował system stabilizowanych planów doświadczenia (tablic), które umożliwiają obliczenie maksymalnej liczby nieobciążonych (ortogonalnych) efektów głównych przy minimalnej liczbie układów planu [StatSoft Inc., 1995]. Podstawowa właściwość tablic ortogonalnych polega na tym, że pomiędzy każdą parą kolumn, każda kombinacja poziomów wartości (np. wartości temperatury desorpcji w metodzie SPME) występuje równą ilość razy. Praktyczną konsekwencją stosowania tablic ortogonalnych i

ogólnie metod Taguchi jest znaczne ograniczenie liczby doświadczeń, które należy wykonać w trakcie optymalizacji, zwłaszcza jeśli optymalizacja dotyczy większej liczby zmiennych. Przykładowo, optymalizując (poprzez testowanie wszystkich możliwych kombinacji) cztery zmienne, przyjmujące po 4 możliwe wartości należy wykonać $4^4 = 256$ niezależnych eksperymentów. Dzięki wykorzystaniu metody Taguchi udało się tę ilość zredukować do 16 prób w trzech powtórzeniach (48 analiz).

Innymi ważnymi aspektami metod Taguchi związanymi bezpośrednio z metodyką doświadczeń i analizą wyników, są pojęcia: zmiennych zależnych i niezależnych oraz doświadczeń weryfikujących. Definicję zmiennych zależnych i niezależnych przytoczono za podręcznikiem elektronicznym do programu Statistica [StatSoft Inc., 1995]: „Terminy zmienna zależna i niezależna mają zastosowanie przede wszystkim w badaniach doświadczalnych, gdzie niektóre zmienne podlegają manipulacji i w tym sensie są niezależne od wstępnych wzorców reakcji, właściwości, zamierzeń itp. osobników. Spodziewamy się, że pewne inne zmienne zależą od sposobu manipulacji lub warunków doświadczenia. To znaczy zależą one od tego co zrobi osobnik w odpowiedzi. Zmienne niezależne są tymi, które są manipulowane, podczas gdy zmienne zależne są tylko mierzone lub rejestrowane”. Zgodnie z podanymi definicjami zmiennymi niezależnymi w optymalizacji metody SPME będą takie czynniki jak np. temperatura i czas preinkubacji próbki, czas ekstrakcji, temperatura i czas desorpcji. Zmiennymi zależnymi zaś mogą być np. wysokość otrzymanych pików chromatograficznych czy wzajemne stosunki pól powierzchni pików poszczególnych substancji.

Pozostałe zagadnienia związane z metodą Taguchi zostały opisane na przykładzie wykonywanych doświadczeń optymalizacyjnych w części metodycznej pracy i podczas dyskusji wyników.

8 Podsumowanie

Opisane w części teoretycznej niniejszej pracy zagadnienia z konieczności zostały potraktowane jedynie pobieżnie. Zdając sobie sprawę z ograniczonej objętości niniejszego opracowania starano się przynajmniej w zarysie przybliżyć bieżący stan wiedzy dotyczący wybranych dyscyplin. Ze względu na interdyscyplinarny charakter opracowania niejednokrotnie podawano informacje podstawowe. Miało to na celu przybliżenie opisywanych zagadnień specjalistom z różnych i często bardzo odległych dziedzin, takich jak entomologia, analityka czy informatyka.

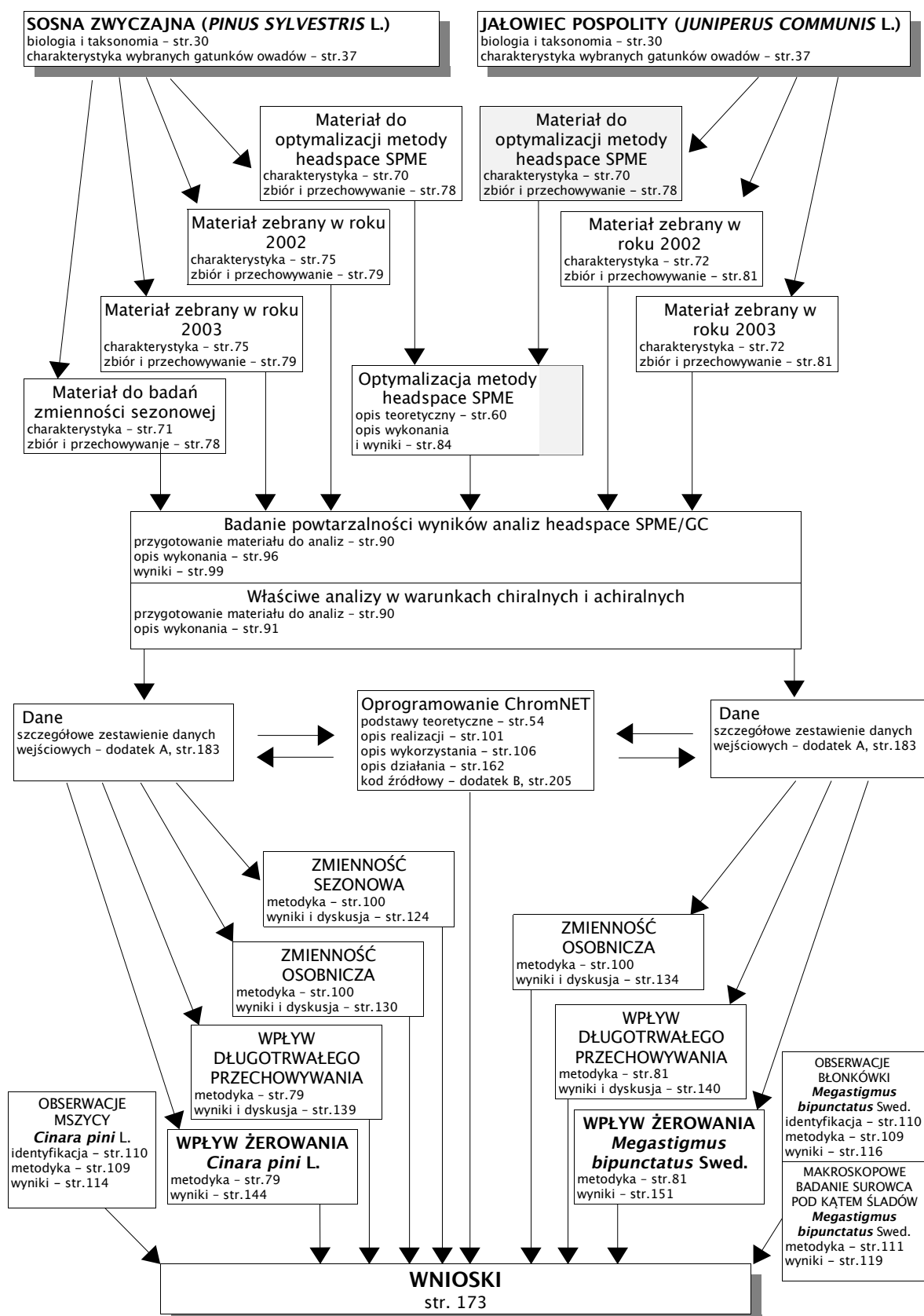
CEL PRACY

Celem niniejszego opracowania jest zbadanie wpływu żerowania wybranych gatunków owadów na skład chemiczny surowca pozyskiwanego z dwóch gatunków roślin szpilkowych: sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) i jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.). Obydwa wymienione gatunki roślin znalazły zastosowanie w lecznictwie i zostały uwzględnione w Farmakopei [FP III, 1954] [FP VI, 2002]. Rośliny te stanowią źródło cennych olejków eterycznych. O ich aktywności biologicznej decyduje głównie frakcja monoterpenu. Wpływ żerowania owadów na skład ilościowy i jakościowy tej frakcji był analizowany w niniejszej pracy.

Cele pochodne to:

- optymalizacja metody headspace SPME pod kątem jej wykorzystania w analizach lotnych substancji roślin szpilkowych
- analiza zmienności sezonowej składu olejków wymienionych gatunków roślin szpilkowych, co powinno pozwolić na opracowanie optymalnej metodyki zbioru surowca do celów badawczych
- analiza zmienności osobniczej składu olejków wymienionych gatunków roślin szpilkowych z uwzględnieniem form enancjomerycznych składników olejków
- analiza wpływu długotrwałego przechowywania surowca z wymienionych gatunków roślin szpilkowych na skład frakcji monoterpenu (z uwzględnieniem form enancjomerycznych składników olejków).
- stworzenie specjalistycznego oprogramowania do archiwizacji i analizy porównawczej danych chromatograficznych

Schemat obrazujący strukturę i sposób realizacji niniejszej pracy uwzględniający przepływ materiałów i informacji zamieszczony został na stronie 66.



Rys. 5 Schemat obrazujący sposób wykonania i strukturę niniejszej pracy. Szarym wypełnieniem oznaczono materiały i wyniki otrzymane w ramach realizacji innych projektów (więcej informacji na str.206). Materiał badawczy zebrany w roku 2002 poddawany był suszeniu i długotrwałemu przechowywaniu. Materiał zebrany w roku 2003 był zamrażany bezpośrednio po zbiorze.

MATERIAŁY I METODY

1 Odczynniki, bufory i roztwory

Substancje wzorcowe do oznaczania olejków metodą chromatografii gazowej:

[-] α -pinen

[+] α -pinen

kamfen

[-] β -pinen

[+] β -pinen

myrcen

α -felandren

[+]-3-karen

p-cymen

α -terpinen

[-]limonen

[+]limonen

sabinen

γ -terpinen

terpinolen

terpinen-4-ol

Wszystkie w/w substancje wzorcowe firmy FLUKA CHEMIKA.

2 Aparatura

- Przyrząd do SPME - mikrostrzykawka z włóknem pokrytym polidimetylosiloksanem (PDMS), grubość warstwy PDMS 100 μm - firmy SUPELCO.
- Chromatograf gazowy firmy HEWLETT-PACKARD 4890 D używany z kolumną achiralną, o złożu niepolarnym HP 101 (Agilent Technologies) oraz z kolumną chiralną HP-Chiral (Agilent Technologies), detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID).
- Serwer sieciowy DELL PowerEdge 700 do przetwarzania danych.
- Elektroniczna waga laboratoryjna AM-50 firmy AXIS
- Termostatowana łaźnia wodna firmy EPPENDORF
- Młynek laboratoryjny do rozdrabniania surowca (20.000 obr/min) firmy KIKA-WERKE.
- Stoper elektroniczny WB-388 firmy HUGER.
- Szklane fiolki zamykane septą z zakrętką do analiz metodą SPME.
- Szkło laboratoryjne

3 Eksploracja obszaru badań

Obszar badań obejmował tereny leśne położone na obszarze Kociewia (Cisy, Ocypel) oraz w pobliżu Gdańska (lasy otaczające Otomin). Pierwsze obserwacje miały na celu poznanie entomofauny zasiedlającej objęte pracą gatunki roślin szpilkowych ze szczególnym uwzględnieniem fitofagów. Ponieważ prezentowana praca dotyczy wpływu żerowania owadów na surowiec leczniczy pozyskiwany z roślin szpilkowych, największą uwagę zwrócono na gatunki żerujące na organach roślinnych wykorzystywanych do produkcji tegoż surowca.

Najpospolitszym gatunkiem zasiedlającym szyszkojagody jałowca okazał się znamionek jałowcowy (*Megastigmus bipunctatus* Swed.). Najliczniejszym gatunkiem zasiedlającym młode pędy sosny zwyczajnej jest mszyca miodownica sosnowa (*Cinara pini* L.). Gatunki te zostały wybrane do dalszych badań.

Następny etap eksploracji polegał na wyznaczeniu miejsc liczego występowania wymienionych gatunków. Miejsca te stały się obszarami pozyskiwania surowca do badań.

W przypadku miodownicy sosnowej bardzo licznym występowaniem tego gatunku charakteryzowały się młodniki na terenie lasów w pobliżu miejscowości Otomin. Młodniki te były ciekawe także ze względu na zróżnicowany wiek drzew tam rosnących.

W przypadku znamionka jałowcowego stwierdzono kilka miejsc charakteryzujących się częstym występowaniem tego gatunku. Zgodnie z danymi literaturowymi były to miejsca ciepłe i nasłonecznione [Kapuściński, 1946], co przyczyniało się do intensywnego wytwarzania szyszkojagód przez jałowce rosnące na tych obszarach. Stwierdzone miejsca występowania znamionka jałowcowego to lasy otaczające miejscowości Cisy, Ocypel oraz Klaniny na terenie Kociewia. Pojedyncze rośliny zaatakowane przez tego owada zostały także odnalezione w innych miejscach. Wszystkie lokalizacje zbioru materiału zostały zestawione w tabeli nr 9.

Tabela nr 9 Dokładne położenia miejsc pozyskiwania materiału wyznaczone przy pomocy obrotownika GPS.

	SZEROKOŚĆ GEOGRAFICZNA (N)	DŁUGOŚĆ GEOGRAFICZNA (E)	WYSOKOŚĆ NAD POZIOMEM MORZA	GATUNEK ROŚLINY, Z KTÓREJ POZYSKIWANO MATERIAŁ
OTOMIN	54°330 - 54°335	18°473 - 18°478	109,9m - 142,9m	<i>Pinus sylvestris</i> L.
KLANINY	53°821 - 53°825	18°201 - 18°209	78,2m - 123,4m	<i>Juniperus communis</i> L.
OCYPEL	53°803 - 53°809	18°286 - 18°298	41,4m - 150,3m	<i>Juniperus communis</i> L.
OKOLICE REZERWATU „KRZYWE KOŁO W PĘTLI WDY”	53°42163	18°20970	91m	<i>Juniperus communis</i> L.
SKÓRCZ	53°785	18°505	74,40m	<i>Juniperus communis</i> L.
CISY	53°940 - 53°942	18°248 - 18°268	107,3m - 152,9m	<i>Juniperus communis</i> L.
WYGONIN	53°57017	18°09529	123m	<i>Juniperus communis</i> L.

4 Materiał roślinny używany podczas realizacji pracy

Materiał roślinny oraz metodyka jego pozyskiwania i przechowywania różniły się w zależności od obiektu i celu badań.

Materiałem roślinnym użytym przy optymalizacji metody headspace SPME oraz przy badaniach sezonowej zmienności składu olejków były liście szpilkowe. W przypadku badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego na skład olejku jałowca surowcem były szyszkojagody jałowca (zarówno wykazujące jak i nie wykazujące oznak ataku owada). W przypadku zaś badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej na skład chemiczny olejku sosny zwyczajnej materiałem badawczym były młode pędy sosnowe o długości około 20 - 30 cm.

W niniejszym rozdziale zamieszczono dane dotyczące użytego w toku wykonywania niniejszej pracy materiału roślinnego. Informacje odnośnie metodyki jego zbioru i przechowywania zamieszczono na stronie 78. Pomocny może okazać się także schemat struktury pracy zamieszczony na stronie 66.

4.1 Materiał użyty w optymalizacji metody headspace SPME pod kątem analizy materiałów pochodzących z różnych gatunków roślin szpilkowych

Optymalizacja etapów metody headspace SPME została przeprowadzona z użyciem materiału roślinnego pochodzącego z trzech gatunków roślin szpilkowych: sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.), jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.), oraz dodatkowo świerka pospolitego (*Picea abies* (L.) H. Karst.). Świerk pospolity został włączony jako jeden z najpospolitszych gatunków roślin szpilkowych na terenie kraju. Włączenie tego gatunku miało na celu jak największą unifikację dobranych warunków nie tylko w stosunku do materiału roślinnego wykorzystywanego w toku niniejszej pracy, ale także w przyszłości. Materiał stanowiły liście szpilkowe wymienionych gatunków roślin.

4.2 Materiał roślinny użyty w badaniu sezonowej zmienności składu związków monoterpenowych

Ocena sezonowej zmienności składu wykonana została dla sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.).

Tabela nr 10 Charakterystyka poszczególnych osobników z gatunku sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.) objętych badaniami sezonowej zmienności składu związków monoterpenowych.

osobnik nr 1	<p>Lokalizacja: teren Lasów Otomińskich (około 15 km od Gdańska), skraj uprawy leśnej, przy drodze gruntowej, miejsce dobrze oświetlone.</p> <p>Opis: wiek około 15 lat, korona nieregularna, zdrowy, liście szpilkowe normalnie zabarwione, bez uszkodzeń. Z osobnika tego pobierano dwie próbki z różnych części korony:</p> <p>1A – od strony drogi (lepsze warunki oświetleniowe) 1B – od strony uprawy (część korony rosnąca w zwarciu z innymi drzewami – częściowe zacinienie).</p>
osobnik nr 2	<p>Lokalizacja: teren Lasów Otomińskich, centralna część uprawy leśnej, wśród innych osobników tego samego gatunku i wieku</p> <p>Opis: wiek około 15 lat, dolna część korony w wyniku zwarcia z innymi drzewami znajduje się w lekkim zacięciu, górna część korony dobrze oświetlona, zdrowy, liście szpilkowe normalnie wybarwione, bez uszkodzeń</p>
osobnik nr 3	<p>Lokalizacja: teren Lasów Otomińskich, skraj lasu przy skrzyżowaniu dwóch dróg leśnych, miejsce słoneczne, dobrze oświetlone</p> <p>Opis: osobnik najstarszy spośród badanych, pień wyraźnie ukształtowany, bez dolnych gałęzi, korona nieregularna i licznie występujące krótkopędy – cechy charakterystyczne dla drzew starszych</p>
osobnik nr 4	<p>Lokalizacja: teren Lasów Otomińskich, młodnik sosnowy, miejsce średnio oświetlone z uwagi na obecność innych drzew tego samego gatunku w bezpośredniej bliskości</p> <p>Opis: drzewo młode, wiek około 10 lat, liście szpilkowe zdrowe, nieuszkodzone, normalnie wybarwione.</p>
osobnik nr 5	<p>Lokalizacja: teren Lasów Otomińskich, przy drodze gruntowej, skraju lasu miejsce dobrze nasłonecznione, wokół otwarta przestrzeń, jedyne drzewo w bezpośredniej bliskości to druga sosna w podobnym wieku</p> <p>Opis: wiek około 15 lat, gałęzie niezbyt gęste, liście szpilkowe zdrowe, bez uszkodzeń</p>
osobnik nr 6	<p>Lokalizacja: teren Ogrodu Roślin Leczniczych przy Katedrze i Zakładzie Farmakognozji AMG, przy budynku Wydziału Farmacji Akademii Medycznej w Gdańsku, jedno z drzew tworzących kępę trzech sosen rosnących w swoim pobliżu, ale nie w bezpośrednim zwarciu, miejsce wzrostu dobrze nasłonecznione, otwarta przestrzeń</p> <p>Opis: wiek około 15–20 lat, osobnik szyszkujący o bardzo gęstej koronie sięgającej do samej ziemi, liście szpilkowe zdrowe, grube, ciemno zabarwione.</p>

Analizy chromatograficzne w warunkach achiralnych objęły wszystkie badane osobniki. Analizy w warunkach chiralnych przeprowadzono w stosunku do trzech wybranych osobników *Pinus sylvestris* L. (szczegółowe dane zawiera tabela 42 na stronie 184).

4.3 Materiał roślinny użyty w badaniu wpływu żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na skład chemiczny frakcji monoterpenowej szyszkogagód jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.)

Materiałem roślinnym użytym w badaniach wpływu żerowania znamionka jałowcowego na związki monoterpenowe jałowca pospolitego były szyszkogagody jałowca. Szczegółowe zestawienie materiału użytego w badaniach prezentuje tabela nr 11.

Tabela nr 11 Charakterystyka poszczególnych osobników z gatunku jałowiec pospolity (*Juniperus communis* L.) objętych badaniami wpływu żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na związki monoterpenowe w szyszkogagodach jałowca. (W przypadku kolumny zatytułowanej „Sposób przechowywania próbek” użyte skróty oznaczają: SU – surowiec przechowywany w temperaturze pokojowej przez rok, po czym zamrożony, SW – surowiec poddany zamrożeniu w stanie świeżym bezpośrednio po zbiorze). Dane dotyczące lokalizacji miejsc zbioru prób przedstawiono w tabeli nr 9 na stronie 70.

L.p.	KOD OSOBNIKA	DATA ZBIORU MATERIAŁU (MIESIĄC I ROK)	MIEJSCE ZBIORU MATERIAŁU (NAZWA NAJBLIŻSZEJ MIEJSCOWOŚCI)	SPOSÓB PRZECHOWYWANIA PRÓBEK
1	j01	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
2	j02	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
3	j03	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
4	j04	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
5	j05	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
6	j06	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
7	j07	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
8	j08	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
9	j09	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
10	j10	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
11	j11	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
12	j12	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
13	j13	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
14	j14	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
15	j15	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
16	j16	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
17	j17	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
18	j18	07.2002	Klaniny (obszar Kociewia)	SU
19	j19	05.2002	okolice rezerwatu „Krzywe Koło w pętli Wdy”	SU
20	j20	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
21	j21	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
22	j22	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
23	j23	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
24	j24	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
25	j25	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
26	j26	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
27	j27	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
28	j28	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
29	j29	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
30	j30	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
31	j31	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU

Lp.	KOD OSOBNIKA	DATA ZBIORU MATERIAŁU (MIESIĄC I ROK)	MIEJSCE ZBIORU MATERIAŁU (NAZWA NAJBLIŻSZEJ MIEJSCOWOŚCI)	SPOSÓB PRZECHOWYWANIA PRÓBEK
32	j32	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
33	j33	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
34	j34	03.2002	Cisy (obszar Kociewia)	SU
35	j35	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
36	j36	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
37	j37	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
38	j38	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
39	j39	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
40	j40	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
41	j41	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
42	j42	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
43	j43	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
44	j44	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
45	j45	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
46	j46	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
47	j47	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
48	j48	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
49	j49	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
50	j50	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
51	j51	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
52	j52	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
53	j53	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
54	j54	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
55	j55	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
56	j56	11.2003	Klaniny (obszar Kociewia)	SW
57	j57	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
58	j58	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
59	j59	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
60	j60	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
61	j61	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
62	j62	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
63	j63	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
64	j64	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
65	j65	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
66	j66	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
67	j67	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
68	j68	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
69	j69	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
70	j70	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
71	j71	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
72	j72	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
73	j73	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
74	j74	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
75	j75	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
76	j76	03.2003	Ocypel (obszar Kociewia)	SW
77	j77	01.2004	Skórcz (obszar Kociewia)	SW
78	j78	01.2004	Skórcz (obszar Kociewia)	SW
79	j79	04.2004	Okolice jeziora Wygonin	SW

Każdy z poddanych analizie osobników wykazywał mniejsze lub większe oznaki żerowania znamionka jałowcowego. W odniesieniu do każdego osobnika analizowano szyszkojagody wykazujące oznaki żerowania znamionka jałowcowego oraz szyszkojagody nie wykazujące takich oznak. Wszystkie wymienione w tabeli próby zostały poddane chromatograficznym analizom achiralnym. Analizy chiralne objęły wszystkie próby z wyjątkiem prób j01-j18 oraz j30, j31 i j73.

Oznaczenia prób

Poszczególne próby zostały oznaczone kodami zawierającymi informacje o roślinie, z której pobierano materiał, a także dodatkowe informacje dotyczące uszkodzeń spowodowanych przez owady. W ten sposób zminimalizowano potrzebę każdorazowego referowania pełnych opisów poszczególnych materiałów. Zasady nazewnictwa prób przedstawiono poniżej na przykładach:

- **j20c** - jałowiec nr 20, materiał badawczy stanowi szyszkojagoda wykazująca oznaki żerowania znamionka jałowcowego (otwór wylotowy)
- **j22z** - jałowiec nr 22, materiał badawczy stanowi szyszkojagoda nie wykazująca oznak żerowania owadów

4.4 Materiał roślinny użyty w badaniu wpływu żerowania miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) na skład chemiczny frakcji monoterpenowej młodych pędów sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)

Materiałem roślinnym użytym w badaniach wpływu żerowania miodownicy sosnowej na związki monoterpenowe sosny zwyczajnej były młode pędy sosnowe o długości około 20–30 cm. Szczegółowe zestawienie osobników, z których pobierano materiał użyty w badaniach prezentuje tabela nr 12.

Tabela nr 12 Charakterystyka poszczególnych osobników z gatunku sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.) objętych badaniami wpływu żerowania miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) na związki monoterpenowe w młodych pędach sosnowych. (W przypadku kolumny zatytułowanej „Stan osobnika” użyte skróty oznaczają: Z – osobnik zdrowy, nie wykazujący śladów bytności i żerowania mszyc, M – osobnik zaatakowany, zasiedlony przez mszyce. W przypadku kolumny zatytułowanej „Sposób przechowywania próbek” użyte skróty oznaczają: SU – surowiec przechowywany w stanie suchym przez rok, po czym zamrożony, SW – surowiec poddany zamrożeniu w stanie świeżym, bezpośrednio po zbiorze).

L.p.	KOD OSOBNIKA	DATA ZBIORU MATERIAŁU (MIESIĄC I ROK)	STAN OSOBNIKA	SPOSÓB PRZECHOWYWANIA PRÓBEK
1	s01	05.2002	M	SU
2	s02	05.2002	M	SU
3	s03	05.2002	M	SU
4	s04	05.2002	M	SU
5	s05	05.2002	M	SU
6	s06	05.2002	M	SU
7	s07	05.2002	M	SU
8	s08	05.2002	M	SU
9	s09	05.2002	M	SU
10	s10	05.2002	M	SU
11	s11	05.2002	M	SU
12	s12	05.2002	M	SU
13	s13	05.2002	M	SU
14	s14	05.2002	M	SU
15	s15	05.2002	M	SU
16	s16	05.2002	M	SU
17	s17	05.2002	M	SU
18	s19	05.2002	M	SU
19	s20	05.2002	Z	SU
20	s21	05.2002	Z	SU
21	s22	05.2002	Z	SU
22	s23	05.2002	Z	SU
23	s24	05.2002	Z	SU
24	s25	05.2002	Z	SU
25	s26	05.2002	Z	SU
26	s27	05.2002	Z	SU
27	s28	05.2002	Z	SU
28	s29	05.2002	Z	SU

Lp.	KOD OSOBNIKA	DATA ZBIORU MATERIAŁU (MIESIĄC I ROK)	STAN OSOBNIKA	SPOSÓB PRZECHOWYWANIA PRÓBEK
29	s30	05.2002	Z	SU
30	s31	05.2002	Z	SU
31	s32	05.2002	Z	SU
32	s33	05.2002	Z	SU
33	s34	05.2002	Z	SU
34	s02'	06.2003	Z	SW
35	s04'	06.2003	Z	SW
36	s05'	06.2003	Z	SW
37	s15'	06.2003	Z	SW
38	s19'	06.2003	Z	SW
39	s25'	06.2003	Z	SW
40	s28'	06.2003	Z	SW
41	s35	06.2003	Z	SW
42	s36	06.2003	Z	SW
43	s34'	06.2003	Z	SW
44	s37	06.2003	Z	SW
45	s38	06.2003	Z	SW
46	s39	06.2003	Z	SW
47	s40	06.2003	Z	SW
48	s41	06.2003	Z	SW
49	s42	06.2003	Z	SW
50	s43	06.2003	Z	SW
51	s44	06.2003	Z	SW
52	s45	06.2003	Z	SW
53	s46	06.2003	Z	SW
54	s47	06.2003	Z	SW
55	s48	06.2003	Z	SW
56	s49	06.2003	Z	SW
57	s50	06.2003	Z	SW
58	s51	06.2003	Z	SW
59	s52	06.2003	Z	SW
60	s53	06.2003	M	SW
61	s54	06.2003	M	SW
62	s55	06.2003	M	SW
63	s56	06.2003	M	SW
64	s57	06.2003	M	SW
65	s58	06.2003	M	SW
66	s59	06.2003	M	SW
67	s60	06.2003	M	SW
68	s61	06.2003	M	SW
69	s62	06.2003	M	SW
70	s63	06.2003	M	SW
71	s64	06.2003	M	SW
72	s65	06.2003	M	SW
73	s66	06.2003	M	SW
74	s67	06.2003	M	SW
75	s68	06.2003	M	SW
76	s69	06.2003	M	SW

Lp.	KOD OSOBNIKA	DATA ZBIORU MATERIAŁU (MIESIĄC I ROK)	STAN OSOBNIKA	SPOSÓB PRZECHOWYWANIA PRÓBEK
77	s70	06.2003	M	SW
78	s71	06.2003	M	SW
79	s72	06.2003	M	SW
80	s73	06.2003	M	SW
81	s74	06.2003	M	SW
82	s75	06.2003	M	SW
83	s76	06.2003	M	SW
84	s77	06.2003	M	SW

Wszystkie analizowane osobniki zasiedlały obszar na terenie lasów w pobliżu miejscowości Otomin (dane dotyczące lokalizacji miejsca zbioru prób przedstawiono w tabeli nr 9 na stronie 70). Skład chemiczny frakcji monoterpenowej każdego z uwzględnionych w badaniach osobników analizowany był w warunkach achiralnych oraz chiralnych.

Oznaczenia prób

Poszczególne próby zostały oznaczone kodami zawierającymi informacje o roślinie, z której pobierano materiał, a także dodatkowe dane dotyczące uszkodzeń spowodowanych przez owady. W ten sposób zminimalizowano potrzebę każdorazowego referowania pełnych opisów poszczególnych materiałów. Zasady nazewnictwa prób przedstawiono poniżej na przykładach:

- **s34** – sosna nr 34 – osobnik nie wykazujący oznak ataku mszyc *Cinara pini* L.
- **s26c** – sosna nr 26 – osobnik zaatakowany, materiał stanowi pęd zaatakowany (zasiedlony przez mszyce)
- **s26z** – sosna nr 26 – osobnik zaatakowany, ale materiał stanowi pęd wolny od mszyc (niezasiedlony przez mszyce)
- **s28'** – sosna nr 28 – osobnik całkowicie zdrowy w momencie pobrania materiału w roku 2003, jednak materiał z tego osobnika był już pobierany wcześniej (w roku 2002) i w tamtym roku mógł on być osobnikiem całkowicie wolnym od mszyc (w takim przypadku materiał pobrany w roku 2002 został oznaczony jako **s28**) lub zaatakowanym (wtedy pobrano z niego dwie próbki, które oznaczono jako **s28c** (pęd zaatakowany) i **s28z** (pęd nie wykazujący oznak bytności mszyc).

5 Metodyka zbioru i przechowywania materiału roślinnego

W bieżącym rozdziale opisano ogół czynności związanych ze zbiorem i przechowywaniem materiału roślinnego używanego podczas realizacji bieżącej pracy. Rozdział podzielono na działy poświęcone materiałom używanym w poszczególnych badaniach. Szczegółową charakterystykę każdego z użytych surowców zamieszczono na stronie 70. Pomocny może okazać się także schemat struktury pracy zamieszczony na stronie 66.

5.1 Metodyka zbioru i przechowywania materiału do optymalizacji metody headspace SPME pod kątem analizy materiałów pochodzących z różnych gatunków roślin szpilkowych

Zbiór materiału odbył się 13.10.2003. Liście szpilkowe sosny zwyczajnej, jałowca pospolitego oraz świerka pospolitego zebrane były w dużych ilościach (ok. 1-2 kg) z pojedynczych roślin wymienionych gatunków. Stosunkowo duża ilość materiału była podyktowana potrzebą wykonania standardowej destylacji olejku z surowca ponieważ porównanie wyników otrzymanych zużyciem metody SPME i standardowej destylacji z parą wodną było jednym z elementów optymalizacji. Zbiór materiału z pojedynczych okazów roślin eliminuje wpływ osobniczej zmienności składu chemicznego na wyniki optymalizacji. Zbiór odbył się w okolicach miejscowości Otomin. Po czternastodniowym suszeniu w warunkach zacielenia i przewiewu materiał został zamrożony i tak był przechowywany do czasu doświadczeń optymalizacyjnych.

5.2 Metodyka zbioru i przechowywania materiału do badań sezonowych zmian składu związków monoterpenuych

W toku badań wybrano 6 osobników sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). Przy doborze osobników zwrócono szczególną uwagę na stan zdrowotny drzew. Wybrano osobniki nie wykazujące oznak chorób ani ataku szkodników. Jednocześnie wybrano osobniki w różnym wieku oraz rosnące w różnych warunkach oświetleniowych. Przeważająca większość wybranych drzew rośnie na terenie lasów otaczających

miejsowość Otomin. Jedno z drzew znajduje się w Ogrodzie Roślin Leczniczych AMG. Próbkę materiału roślinnego były pobierane w odstępach okołomiesięcznych przez okres 12 miesięcy. Materiał pobierany był zawsze z tej samej strony rośliny. W przypadku drzew materiał pobierany był zawsze z tej samej części korony. Po transporcie do laboratorium próbki były natychmiast zamrażane i przechowywane w stanie zamrożenia. Końcowym etapem przygotowania próbek do analizy było odważenie 200 mg liści szpilkowych z każdej poddawanej badaniu próbki. Liście te były wybierane losowo z różnych części pędu. Przed ważeniem liście zostały wstępnie pocięte na fragmenty o długości ok. 5 mm w celu zapewnienia homogenności próbki.

Dokładne daty pobierania próbek zamieszczono poniżej :

- 18.01.2003
- 1.02.2003
- 8.03.2003
- 26.04.2003
- 29.05.2003
- 8.07.2003
- 5.08.2003
- 8.09.2003
- 13.10.2003
- 5.11.2003
- 20.12.2003

5.3 Metodyka zbioru i przechowywania materiału do badań wpływu żerowania owadów na skład chemiczny roślin żywicielskich

5.3.1 Metodyka zbioru i przechowywania materiału do badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) na skład frakcji monoterpenowej młodych pędów sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)

W przypadku badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej na skład olejku sosny zwyczajnej materiał stanowiły młode, tegoroczne pędy sosnowe. Surowiec był pobierany z terenu młodników sosnowych leżących na terenie lasów w pobliżu miejscowości Otomin. Zbiór materiału przeprowadzono z roślin nie zasiedlonych oraz

zasiedlonych przez mszyce. W przypadku roślin zaatakowanych pobierano pędy, na których występowały najliczniejsze kolonie owadów. Dokładne miejsce bytowania owadów oznaczono poprzez przewiązanie pędu barwną nicią. Opisywana procedura zaznaczania dokładnego miejsca przebywania kolonii owadów była konieczna, ponieważ wkrótce po zebraniu surowca mszyce zaczynały się przemieszczać opuszczając miejsce żerowania. Z roślin zaatakowanych przez mszyce pobierano także pędy zupełnie nie zasiedlone w celu zbadania ewentualnych różnic w składzie chemicznym pomiędzy zasiedlonymi i niezasiedlonymi pędami w obrębie tej samej rośliny. Do badań nie pobierano głównych pędów szczytowych mimo ich niejednokrotnie bardzo licznego zasiedlenia przez mszyce, gdyż mogłoby to doprowadzić do nieprawidłowego wzrostu drzew. Surowiec zbierano przez okres dwóch lat. Zbiór wykonywano zawsze jednorazowo ze wszystkich objętych badaniami roślin. Odszukanie roślin w terenie i zbiór materiału zabierało do dwóch dni (26.05.2003, 16,19.06.2003). W pierwszym roku prowadzenia zbioru oznaczono wszystkie badane egzemplarze roślin w terenie za pomocą etykiet z numerami. Podejście to okazało się jednak nie w pełni zadowalające. W następnym roku stwierdzono wyraźnie mniejszą liczebność mszyc. Dodatkowo okazało się, że zasiedliły one (nielicznie) jedynie kilka roślin spośród roślin oznaczonych rok wcześniej jako mocno zaatakowane. Stwierdzono natomiast obecność mszyc na roślinach, które nie zostały rok wcześniej uwzględnione w badaniach. W rezultacie dobór roślin do badań przeprowadzono ponownie, tak, aby uzyskać w przybliżeniu 50% próbek z roślin zaatakowanych i 50% próbek z roślin niezaatakowanych. Oznaczone rok wcześniej rośliny zostały tym razem uwzględnione tylko w części. Pozwoliło to jednak na przeprowadzenie interesujących porównań w celu zbadania ewentualnych różnic składu olejku u osobników zasiedlonych rok wcześniej, a w momencie drugiego pobierania materiału nie wykazujących oznak obecności mszyc. Ponieważ liczebność mszyc w roku 2003 była mniejsza zbiór surowca zaplanowano około 20 dni później w stosunku do daty zbioru w roku 2002.

Materiał zebrany w roku 2002 poddany został suszeniu w warunkach zaciemnienia, przewiewu powietrza, w temperaturze pokojowej. W takich warunkach przechowywany był przez okres 12 miesięcy po czym poddany zamrożeniu i tak

przechowywany do czasu analiz. Materiał zebrany w roku 2003 natychmiast po transporcie do laboratorium był poddawany zamrożeniu i w takich warunkach przechowywany do czasu analiz. Odrębne metody przechowywania materiału do czasu analizy utrudniają wykonywanie porównań pomiędzy materiałem zebrany w roku 2002 i w roku 2003. Pozwalają one jednak na zbadanie bardzo ważnej z farmaceutycznego punktu widzenia kwestii - jak długotrwałe przechowywanie wpływa na skład chemiczny surowca noszącego ślady żerowania owadów.

Końcowym etapem przygotowania próbek było odważenie 100 mg porcji materiału (materiał w stanie wysuszonym zebrany 26.05.2002) lub 200 mg materiału (materiał zamrożony natychmiast po zebraniu 16 i 19.06.2003). Różnice w ilości odważanego materiału wynikają z wyższej zawartości olejku w materiale suchym dzięki czemu do przeprowadzenia analizy wystarczyło 100 mg. Materiał zamrożony w stanie świeżym zawierał znaczne ilości wody.

5.3.2 Metodyka zbioru i przechowywania materiału do badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na skład frakcji monoterpenowej jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.)

W przypadku badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego na skład olejku jałowca pospolitego materiał stanowiły dojrzałe, wybarwione na kolor ciemnogrnatowy lub niemal czarny szyszkojagody jałowca. Materiał pobierany był z zaatakowanych krzewów jałowca. Do badań pobierano zarówno szyszkojagody zdrowe jak i zaatakowane. Zrezygnowano z pobierania materiału z krzewów nie zaatakowanych ze względu na trudności metodyczne - odsetek szyszkojagód noszących oznaki żerowania znamionka najczęściej jest niski - rzędu kilku procent. Jednoznaczna, przeprowadzona w terenie ocena czy obficie owocujący, znacznych rozmiarów jałowiec nie jest zaatakowany jest więc bardzo utrudniona. W przypadku niewielkich krzewów zachodzi niebezpieczeństwo, że szyszkojagody wykazujące oznaki żerowania znamionka już odpadły, co także mogłoby prowadzić do błędnych wniosków. Z drugiej strony wszelkie międzyosobnicze badania porównawcze utrudnia duża zmienność osobnicza dotycząca składu

chemicznego olejku. Zrezygnowano także z oznaczania w terenie poszczególnych roślin. Spowodowane to było znaczną dynamiką liczebności znamionka będącą po części odpowiedzią na wahania produkcji szyszkojagód przez poszczególne krzewy jałowca w poszczególnych latach.

Podobnie jak w przypadku sosny zwyczajnej zebrany w roku 2002 materiał poddany został suszeniu w warunkach zaciemnienia, przewiewu powietrza w temperaturze pokojowej. W takich warunkach przechowywany był przez okres 12 miesięcy po czym poddany zamrożeniu i przechowywany do czasu analiz. Materiał zebrany w roku 2003 natychmiast po transporcie do laboratorium był poddawany zamrożeniu i w takich warunkach przechowywany do czasu analiz. Odrębne metody przechowywania materiału do czasu analizy utrudniają wykonywanie porównań pomiędzy materiałem zebrany w roku 2002 i w roku 2003. Podobnie jak w przypadku badań surowca pozyskiwanego z sosny zaatakowanej przez mszyce pozwalają one jednak na zbadanie bardzo ważnej z farmaceutycznego punktu widzenia kwestii – jak długotrwałe przechowywanie wpływa na skład chemiczny surowca noszącego ślady żerowania owadów.

Końcowym etapem przygotowania próbek był wybór szyszkojagód noszących wyraźne ślady żerowania owadów oraz takich cech nie wykazujących. Przyjęto następującą metodologię: jako próbkę traktowano pojedynczą szyszkojagodę. Z materiału zebranego z każdej poddawanej analizom rośliny wybrano jedną szyszkojagodę wykazującą oznaki żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) oraz szyszkojagodę takich oznak nie wykazującą. Obie szyszkojagody były ważone, a ich masa zapisywana.

Tabela nr 13 Zestawienie ilości materiału roślinnego używanego do pojedynczej analizy. Jak widać zastosowanie metody SPME umożliwiło znaczne zredukowanie ilości materiału umożliwiającej wykonanie oznaczeń.

opis materiału	ilość materiału użyta do analizy
liście szpilkowe sosny (badanie zmienności sezonowej składu olejku)	200 mg
szyszkojagody jałowca w stanie wysuszonym (badanie wpływu żerowania <i>Megastigmus bipunctatus</i> na skład olejku)	pojedyncze szyszkojagody (~ 50 mg)
szyszkojagody jałowca zamrożone w stanie świeżym (badanie wpływu żerowania <i>Megastigmus bipunctatus</i> na skład olejku)	pojedyncze szyszkojagody (~ 50 mg)
młode pędy sosny w stanie wysuszonym (badanie wpływu żerowania <i>Cinara pini</i> na skład olejku)	100 mg
młode, zamrożone w stanie świeżym pędy sosny (badanie wpływu żerowania <i>Cinara pini</i> na skład olejku)	200 mg

6 Optymalizacja warunków headspace SPME z uwzględnieniem metody Taguchi

W rozdziale opisano procedurę i wyniki optymalizacji warunków mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Wykonywana z fazy nadpowierzchniowej ekstrakcja SPME (headspace SPME) stanowiła ważny etap przygotowania materiału do analizy chromatograficznej w toku wykonywania niniejszej pracy. Jako procedura wieloetapowa wymagała jednak optymalizacji każdego z etapów. Materiał roślinny użyty w doświadczeniach optymalizacyjnych, a także sposób jego zbioru oraz przechowywania opisano na str. 70 i 78.

Jak już wcześniej wspomniano mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) wykonywana w odmianie headspace SPME obejmuje 3 etapy wymagające optymalizacji: preinkubację próby, ekstrakcję oraz desorpcję. W celu przeprowadzenia optymalizacji wymienionych etapów posłużono się statystyczną metodą Taguchi [Taguchi, 1987]. Metodę tę zastosowano jako alternatywę w stosunku do tradycyjnych badań optymalizacji, dzięki czemu udało się znacznie zredukować ilość eksperymentów koniecznych do osiągnięcia zamierzonego celu. Zaczynając planowanie doświadczenia wg metody Taguchi należy w pierwszej kolejności ustalić co będzie podlegało optymalizacji – w tym przypadku były to warunki procesu analizy metodą SPME:

- czas preinkubacji
- temperatura preinkubacji
- czas ekstrakcji (absorpcji)
- czas desorpcji.

Dla każdej z tych zmiennych dobrano cztery wartości. Przy dobieraniu ich zakresu kierowano się źródłami literaturowymi oraz wynikami wykonanych wcześniej doświadczeń.

Tabela nr 14 Zakresy wartości optymalizowanych zmiennych użyte przy optymalizacji procedury headspace SPME.

A	B	C	D
czas preinkubacji	temperatura preinkubacji/absorpcji	czas absorpcji	czas desorpcji
1: 5min	1: 30°C	1: 30s	1: 30s
2: 10min	2: 40°C	2: 1min	2: 1min
3: 20min	3: 50°C	3: 2min	3: 2min
4: 30min	4: 60°C	4: 5min	4: 5min

Do przeprowadzania optymalizacji użyto gotowych planów doświadczeń w postaci tzw. tablic ortogonalnych. Tablice te stanowią gotowe, otrzymane metodami statystycznymi plany doświadczeń. Rola eksperymentatora ogranicza się w tym przypadku tylko do wyboru właściwego planu (tablicy). Wyboru tablicy dokonano na podstawie ilości zmiennych, które będą optymalizowane (w tym przypadku były to 4 zmienne: czas preinkubacji, temperatura preinkubacji/absorpcji, czas absorpcji i czas desorpcji). Przy wyborze tablicy ortogonalnej wzięto także pod uwagę ilość wartości (poziomów), które przyporządkowano dla każdej z tych zmiennych (w tym przypadku każdą zmienną analizowano pod kątem czterech wartości (poziomów) - np. czas absorpcji był analizowany pod kątem następujących wartości: 30 s, 1 min., 2 min., i 5 min.)

W celu wykonania tak zaplanowanej optymalizacji użyto tablicy ortogonalnej L¹⁶ dostępnej w programie komputerowym Statistica [StatSoft Inc., 1995]. Aby wykonać optymalizację z użyciem wymienionej tablicy, należało przeprowadzić 16 analiz stosując w każdej z nich inną, zapisaną w tablicy, kombinację wartości badanych zmiennych.

Tabela nr 15 Wygląd tablicy ortogonalnej L¹⁶. Litery A,B,C,D w nagłówkach kolumn oznaczają zmienne brane pod uwagę w procesie optymalizacji. Każda z tych zmiennych jest analizowana pod względem czterech wartości oznaczonych liczbami. Pierwsza kolumna zawiera numery układów, z których każdy charakteryzuje się unikalną kombinacją wartości zmiennych. Na podstawie poniższej tablicy stworzono plan optymalizacji metody headspace SPME zamieszczony w tabeli nr 16.

UKŁAD	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	1	4	4	4
5	2	1	2	3
6	2	2	1	4
7	2	3	4	1
8	2	4	3	2
9	3	1	3	4
10	3	2	4	3
11	3	3	1	2
12	3	4	2	1
13	4	1	4	2
14	4	2	3	1
15	4	3	2	4
16	4	4	1	3

Aby badanie można było uznać za wiarygodne każdą z wymienionych 16 analiz należy powtórzyć co najmniej dwa razy (w toku opisywanej procedury optymalizacyjnej każda analiza została wykonana w 3 powtórzeniach co dało razem 48 analiz).

Odrębnym problemem przy optymalizacji warunków analiz z użyciem metody headspace SPME był dobór właściwej strategii optymalizacji.

Jako cel optymalizacji przyjęto otrzymanie jak najwyższych i jak najliczniejszych pików chromatograficznych.

Wymieniony cel zrealizowano przy użyciu następujących strategii optymalizacji:

- duża ilość pików wysokich (im większy–tym lepszy) – wartość mierzona to ilość pików
- duża ilość pików wysokich (im większy–tym lepszy) – wartość mierzona to średnia wysokość pików
- duża ilość pików wysokich (im większy–tym lepszy) – wartość mierzona to ilość pików oraz średnia wysokość pików

Analizę SPME wykonano według planu optymalizacji zamieszczonego w tabeli nr 16.

Tabela nr 16 Plan optymalizacji metody SPME oparty na tablicy ortogonalnej L'16.

UKŁAD	A CZAS PREINKUBACJI	B TEMPERATURA ABSORPCJI	C CZAS ABSORPCJI	D CZAS DESORPCJI
1	1 (5min)	1 (30°C)	1 (30 s)	1 (30 s)
2	1 (5min)	2 (40°C)	2 (1min)	2 (1min)
3	1 (5min)	3 (50°C)	3 (2min)	3 (2min)
4	1 (5min)	4 (60°C)	4 (5min)	4 (5min)
5	2 (10min)	1 (30°C)	2 (1min)	3 (2min)
6	2 (10min)	2 (40°C)	1 (30 s)	4 (5min)
7	2 (10min)	3 (50°C)	4 (5min)	1 (30 s)
8	2 (10min)	4 (60°C)	3 (2min)	2 (1min)
9	3 (20min)	1 (30°C)	3 (2min)	4 (5min)
10	3 (20min)	2 (40°C)	4 (5min)	3 (2min)
11	3 (20min)	3 (50°C)	1 (30 s)	2 (1min)
12	3 (20min)	4 (60°C)	2 (1min)	1 (30 s)
13	4 (30min)	1 (30°C)	4 (5min)	2 (1min)
14	4 (30min)	2 (40°C)	3 (2min)	1 (30 s)
15	4 (30min)	3 (50°C)	2 (1min)	4 (5min)
16	4 (30min)	4 (60°C)	1 (30 s)	3 (2min)

Po naważeniu liści szpilkowych próby przenoszono do fiolek, gdzie przez minutę rozcierano materiał za pomocą szklanej bagietki. Po preinkubacji próby w termostacie przy użyciu przyrządu do SPME przeprowadzono ekstrakcję, a następnie desorpcję termiczną w iniektorze chromatografu gazowego w stosując warunki przewidziane dla każdego z 16 układów. Każdy układ warunków powtórzono trzykrotnie. Układy

doświadczalne wykonywano w przypadkowej kolejności, aby uniknąć błędów statystycznych (siła i ilość uderzeń podczas rozcierania materiału, szybkość wprowadzania prób do chromatografu itp).

Uzyskane w wyniku przeprowadzonych z użyciem tablicy ortogonalnej L¹⁶ analiz dane zostały następnie poddane analizie przez program komputerowy Statistica, co pozwoliło na obliczenie optymalnych wartości zmiennych zależnych oraz ilorazu sygnału do szumu S/N (Eta) w odniesieniu do każdej stosowanej strategii.

W wyniku otrzymano 3 zestawy wartości warunków optymalnych dla sosny zwyczajnej, świerka pospolitego i jałowca pospolitego, a także oczekiwane wartości S/N, które przedstawiono w tabelach nr 17 i 18 na stronie 88.

Eksperyment weryfikujący wykonano przeprowadzając dwukrotnie analizę dla każdego z zestawów warunków optymalnych w celu sprawdzenia zgodności wartości S/N z wartością oczekiwaną (stosunek S/N obliczano jako średnią z dwóch pomiarów), co miało na celu potwierdzenie powtarzalności otrzymanych wyników. Z przeprowadzonego badania wynika, że wartości te w większości przypadków nie różnią się znacząco, a w kilku przypadkach stwierdzono nawet lepszy stosunek sygnału do szumu niż przewidywany.

Na podstawie otrzymanych wartości parametrów optymalnych wybrano zestaw złożony z parametrów, które najczęściej się powtarzały.

Tabela nr 17 Wyniki optymalizacji parametrów analizy SPME dla liści szpilkowych sosny (*Pinus sylvestris* L)

	strategia optymalizacji	wielkość mierzona (zmiennie zależne)	A: czas preinkubacji	B: temperatura absorpcji	C: czas absorpcji	D: czas desorpcji	oczekiwany stosunek sygnału do szumu (S/N)	eksperymentalny stosunek sygnału do szumu (S/N) – średnia z dwóch powtórzeń
3	Duża ilość pików wysokich (im większy–tym lepszy)	ilość pików	2: 10min	2: 40°C	4: 5min	4: 5min	23,63441	18,86491
4	Duża ilość pików wysokich (im większy–tym lepszy)	średnia wysokość pików	2: 10min	4: 60°C	4: 5min	3: 2min	67,02586	64,14752
5	Duża ilość pików wysokich (im większy–tym lepszy)	ilość pików i średnia wysokość pików (znormalizowane)	2: 10min	2: 40°C	4: 5min	4: 5min	26,64443	32,26416

Tabela nr 18 Wyniki optymalizacji parametrów analizy SPME dla liści szpilkowych świerka (*Picea abies* (L.) H. Karst.)

	strategia optymalizacji	wielkość mierzona (zmiennie zależne)	A: czas preinkubacji	B: temperatura absorpcji	C: czas absorpcji	D: czas desorpcji	oczekiwany stosunek sygnału do szumu (S/N)	eksperymentalny stosunek sygnału do szumu (S/N) – średnia z dwóch powtórzeń
3	Duża ilość pików wysokich (im większy–tym lepszy)	ilość pików	3: 20min	3: 50°C	4: 5min	2: 1min	21,65827	22,27887
4	Duża ilość pików wysokich (im większy–tym lepszy)	średnia wysokość pików	3: 20min	2: 40°C	4: 5min	2: 1min	69,67739	63,09216
5	Duża ilość pików wysokich (im większy–tym lepszy)	ilość pików i średnia wysokość pików (znormalizowane)	3: 20min	3: 50°C	4: 5min	2: 1min	24,66844	34,08659

Tabela nr 19 Wartości optymalne parametrów w analizie SPME olejku eterycznego z liści szpilkowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.), świerka pospolitego (*Picea abies* (L.) H. Karst.) i jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.)

GATUNEK Z KTÓREGO POBRANO MATERIAŁ (LIŚCIE SZPILKOWE)	CZAS PREINKUBACJI	TEMPERATURA PREINKUBACJI	CZAS ABSORPCJI	CZAS DESORPCJI
Sosna zwyczajna (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	10 min.	40°C	5 min.	5 min.
Świerk pospolity (<i>Picea abies</i> (L.) H. Karst.)	20 min.	50°C	5 min.	1 min.
Jałowiec pospolity (<i>Juniperus communis</i> L.)	10 min.	60°C	5 min.	2 min.

Podjmując ostateczną decyzję o wyborze optymalnych warunków analizy SPME uwzględniono także nie opisywane w tej pracy eksperymenty z użyciem innych surowców oraz badania wpływu temperatury preinkubacji na wysokość pików chromatograficznych. Starano się także o jak największe skrócenie czasu analiz i w przypadkach gdzie możliwe było zastosowanie różnych czasów preinkubacji, absorpcji czy też desorpcji preferowano raczej czasy krótsze. Po uwzględnieniu wszystkich opisywanych czynników ustalono optymalne warunki analiz SPME. Warunki te przedstawiono w tabeli nr 20.

Tabela nr 20 Wartości optymalne parametrów poszczególnych etapów SPME wybrane na podstawie przeprowadzonych badań materiału pochodzącego z wybranych gatunków roślin szpilkowych.

Czas preinkubacji	10 min
Temperatura preinkubacji	60°C
Czas absorpcji	5 min
Czas desorpcji	2 min

7 Przygotowanie materiału do analiz chromatograficznych z użyciem metody headspace SPME/GC

Próbki materiału roślinnego przechowywane były do czasu analizy w stanie zamrożenia.

Pierwszym etapem przygotowania materiału do analizy była jego fragmentacja w celu uwolnienia lotnych składników olejku. Fragmentację prowadzono przy użyciu młynka laboratoryjnego lub ręcznie, za pomocą szklanej bagietki. Wybór metody rozdrobnienia materiału zależał od rodzaju materiału oraz od wielkości użytej do analizy próbki. Suche próbki o większej objętości były rozdrabniane za pomocą młynka laboratoryjnego. Metody tej użyto przy fragmentacji surowca przy badaniach sezonowych zmian składu olejków wybranych gatunków roślin szpilkowych oraz przy badaniach wpływu żerowania miodownicy sosnowej na skład olejku sosny (materiał zebrany 26.05.2002 i poddany suszeniu).

Jednak w przypadku małych objętości materiału (np. pojedyncze szyszkojagody jałowca) oraz dużej zawartości wody w próbkach (np. młode pędy sosny zamrożone w stanie świeżym) zdecydowanie lepszą metodą okazała się fragmentacja ręczna, którą przeprowadzano w szklanych naczynkach rozgniatając surowiec przy pomocy szklanej bagietki.

Tabela nr 21 Zastosowane metody fragmentacji surowca w zestawieniu z rodzajem materiału.

rodzaj materiału	metoda rozdrabniania	czas
suszone i zamrożone w stanie świeżym szyszkojagody jałowca, zamrożone w stanie świeżym młode pędy sosny	fragmentacja ręczna przez rozgniatacie bagietką	60 s
wysuszone pędy sosny	fragmentacja przy użyciu młynka laboratoryjnego	5 s
liście szpilkowe sosny i świerka	fragmentacja przy użyciu młynka laboratoryjnego	10 s

8 Analiza lotnych składników olejku metodą headspace SPME/GC

W bieżącym rozdziale opisano sposób wykonywania analiz związków monoterpenowych w materiale pochodzącym z roślin szpilkowych. Wszystkie analizy opisane w niniejszej pracy wykonywane były techniką headspace SPME/GC. Rozdział ten podzielono na dwie części, z których pierwszą poświęcono metodzie headspace SPME, a drugą właściwym analizom chromatograficznym.

Podstawy teoretyczne dotyczące wybranych aspektów chromatografii olejków eterycznych zamieszczono na stronie 45. Podstawy teoretyczne dotyczące metody SPME opisano na stronie 47.

Szczegółowe dane otrzymane w wyniku wszystkich przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy analiz chromatograficznych zamieszczono w dodatku A (str. 183). Pomocny może okazać się także schemat struktury pracy zamieszczony na stronie 66.

8.1 Headspace SPME

Przygotowanie próbki metodą headspace SPME do właściwej analizy chromatograficznej było przeprowadzane w następujący sposób:

Preinkubacja

Preinkubację rozdrobionego materiału roślinnego prowadzono w temperaturze 60°C przez 10 minut. Temperaturę tę zapewniano przez częściowe zanurzenie naczynia z próbką w wodzie ogrzewanej przez termostatowaną łaźnię wodną.

Ekstrakcja

Ekstrakcję przeprowadzono po przebicciu septy w naczyniu z próbką przy pomocy igły przyrządu do SPME i wysunięciu złoża SPME (stosowano złożo PDMS o grubości 100 µm). Czas trwania tego etapu wynosił 5 minut. Temperatura podobnie jak w przypadku poprzedniego etapu była utrzymywana przy pomocy łaźni wodnej i wynosiła 60°C.

Desorpcja

Desorpcja termiczna zachodziła po wprowadzeniu igły przyrządu SPME do dozownika chromatografu i wysunięciu włókna SPME. Czas tego etapu wynosił 2 minuty. Temperaturę dozownika chromatografu utrzymywano na poziomie 220°C.

Przedstawione warunki przygotowania próbki metodą SPME zostały dla każdego jej etapu zoptymalizowane przy pomocy metody Taguchi (opis statystycznej metody Taguchi można znaleźć w części teoretycznej niniejszej pracy na stronie 60).

8.2 Analizy chromatograficzne

Analizy chromatograficzne wykonano przy użyciu chromatografu gazowego HEWLETT-PACKARD 4890 D z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID).

Użyte kolumny kapilarne zostały dobrane na podstawie danych literaturowych i rozdziałów testowych [Marriott i in., 2001] [Schurig, 2002] [Lockwood, 2001] [Restek Corp., 1997]. W celu zwiększenia separacji rozdzielanych substancji zastosowano zoptymalizowany pod kątem SPME inlet chromatograficzny o małym świetle (0,75 mm).

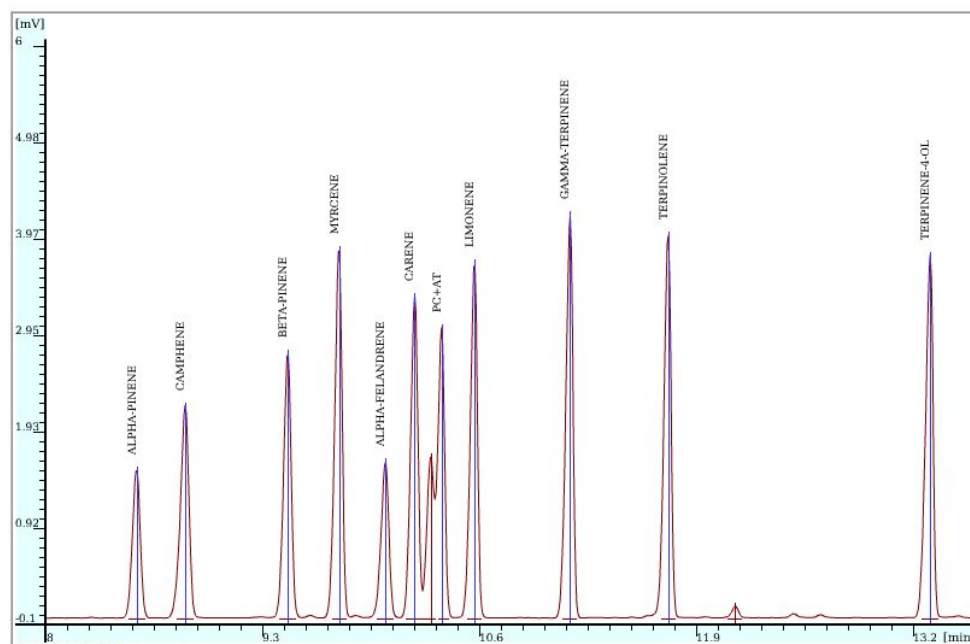
8.2.1 Warunki wykonywania analiz chromatograficznych

W celu wykonania analiz achiralnych oraz chiralnych stosowano dwa różne programy temperaturowe oraz dwa typy kolumn chromatograficznych.

Tabela nr 22 Zestawienie warunków rozdziałów achiralnych i chiralnych przeprowadzonych w odniesieniu do wszystkich materiałów roślinnych analizowanych w niniejszej pracy.

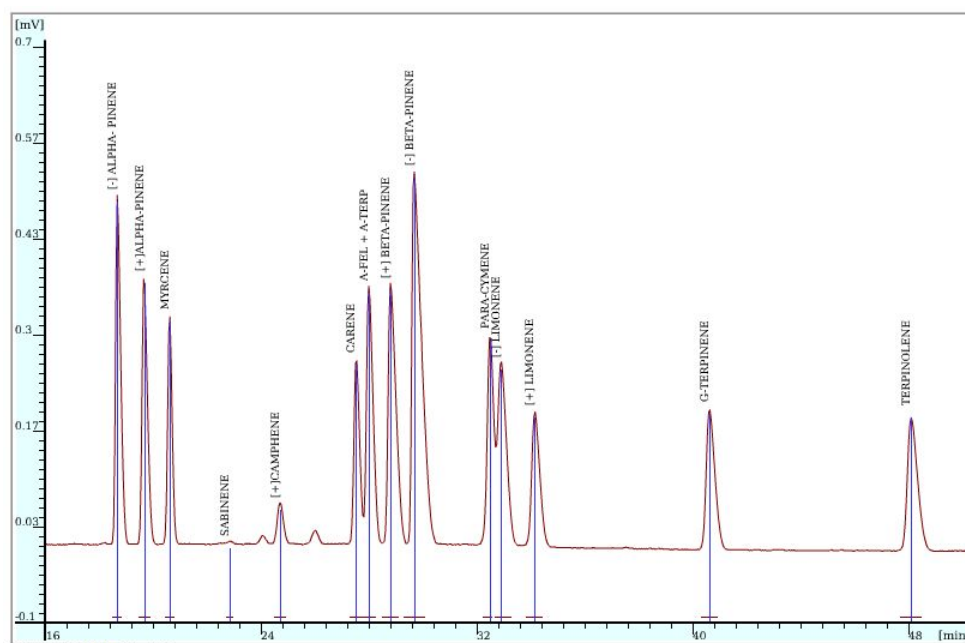
WARUNKI ROZDZIAŁU	ANALIZY ACHIRALNE	ANALIZY CHIRALNE
TYP I DANE TECHNICZNE KOLUMNY KAPILARNEJ	Kolumna kapilarna HP 101 Agilent Technologies, długość: 25 m, I.D.: 0,32 mm	Kolumna kapilarna HP Chiral (20% Permethyated B-Cyclodextrin) Agilent Technologies, długość: 30 m, I.D.: 0,32 mm
TEMPERATURA DOZOWNIKA	220°C	220°C
TEMPERATURA DETEKTORA	250°C	250°C
TEMPERATURA POZĄTKOWA PIECA CHROMATOGRAFU	50°C (4 min.)	65°C (50 min.)
TEMPO WZROSTU TEMPERATURY PODCZAS ANALIZY	10°C/min.	5°C/min.
TEMPERATURA KOŃCOWA	240°C	160°C
CZAS ROZDZIAŁU	30 min.	90 min.
GAZ NOŚNY	Argon (39,5 kPa)	Hel (47,6 kPa)
SPLIT	1:50	1:30
PURGE VALVE	OFF = 22 min., ON = 1 min.	ON

Szczegółowe dane wejściowe (służące jako punkt wyjścia do dalszych analiz) uzyskane z przeprowadzonych w toku niniejszej pracy analiz chromatograficznych zamieszczono w dodatku A (str. 183). W dalszej części tego rozdziału zamieszczono przykładowe chromatogramy ukazujące rozdziały chromatograficzne substancji badanych z użyciem opisanych powyżej warunków.

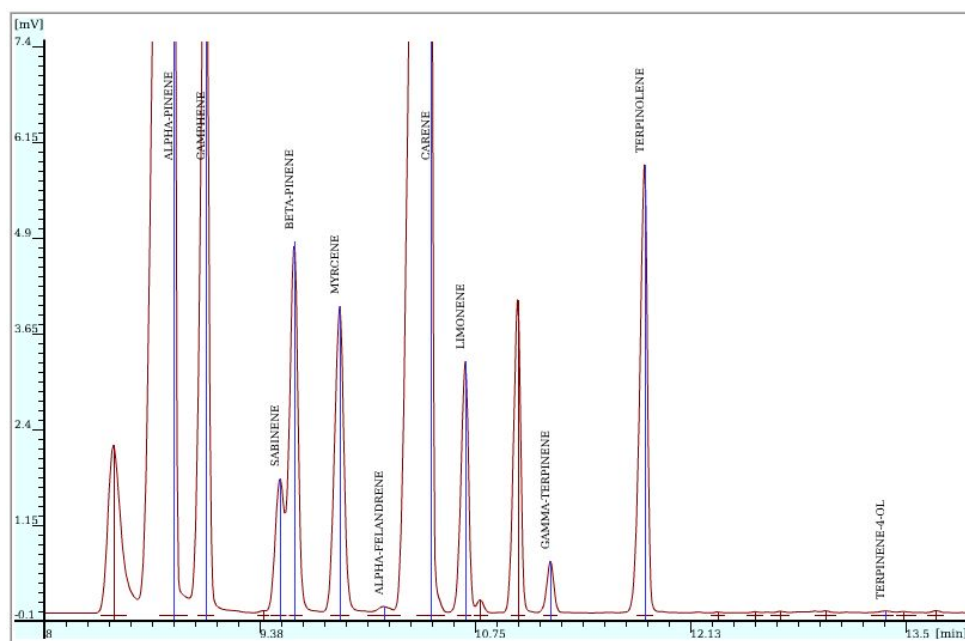


Rys. 6 Chromatogram przedstawiający rozdział badanych związków monoterpenowych na kolumnie HP 101. Chromatogram otrzymano przez analizę headspace SPME/GC roztworu substancji wzorcowych w metanolu⁹. (chromatogram wygenerowany przez oprogramowanie ChromNET)

9 - skrót PC+AT oznacza pik paracymenu i α -terpinenu, skrót G-TERPINENE oznacza γ -terpinen.



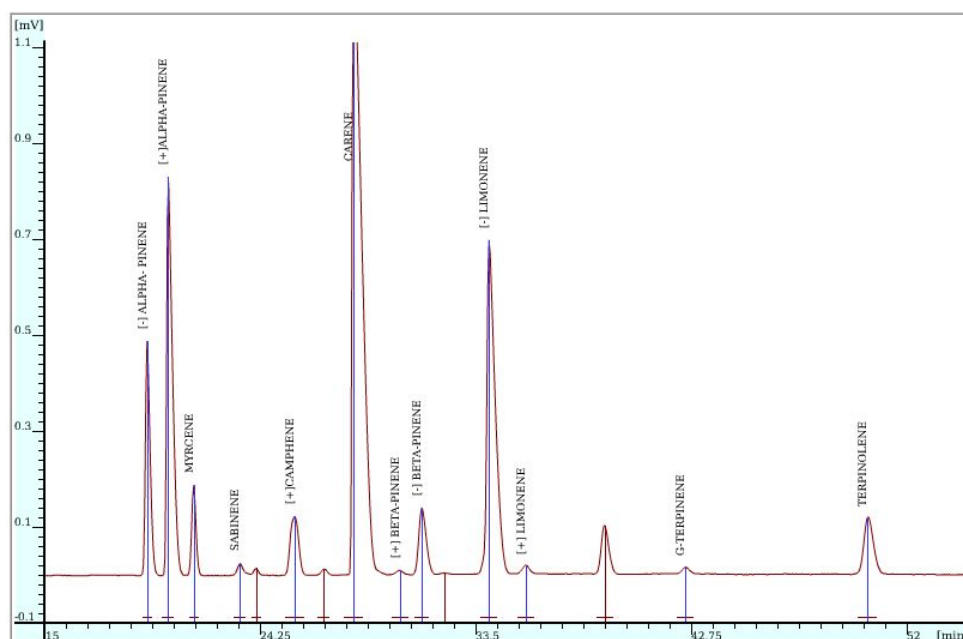
Rys. 7 Chromatogram przedstawiający rozdział badanych związków monoterpenowych z uwzględnieniem ich form enancjomerycznych na kolumnie HP Chiral (20% Permethylated B-Cyclodextrin). Chromatogram otrzymano przez analizę headspace SPME/GC roztworu substancji wzorcowych w metanolu¹⁰. (chromatogram wygenerowany przez oprogramowanie ChromNET)



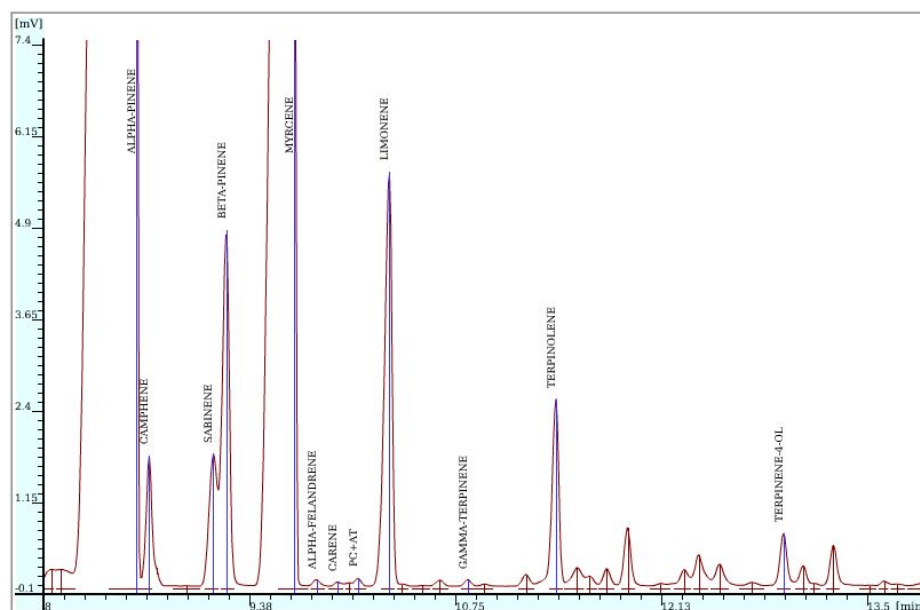
Rys. 8 Chromatogram przedstawiający rozdział związków monoterpenowych na kolumnie HP 101. Chromatogram otrzymano przez analizę headspace SPME/GC substancji lotnych z liści szpilkowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)¹¹. (chromatogram wygenerowany przez oprogramowanie ChromNET)

10 - skrót A-FEL+A-TERP oznacza pik α -felandrenu i α -terpinenu, skrót G-TERPINENE oznacza γ -terpinen.

11 - skrót PC+AT oznacza pik para-cymenu i α -terpinenu, skrót G-TERPINENE oznacza γ -terpinen.



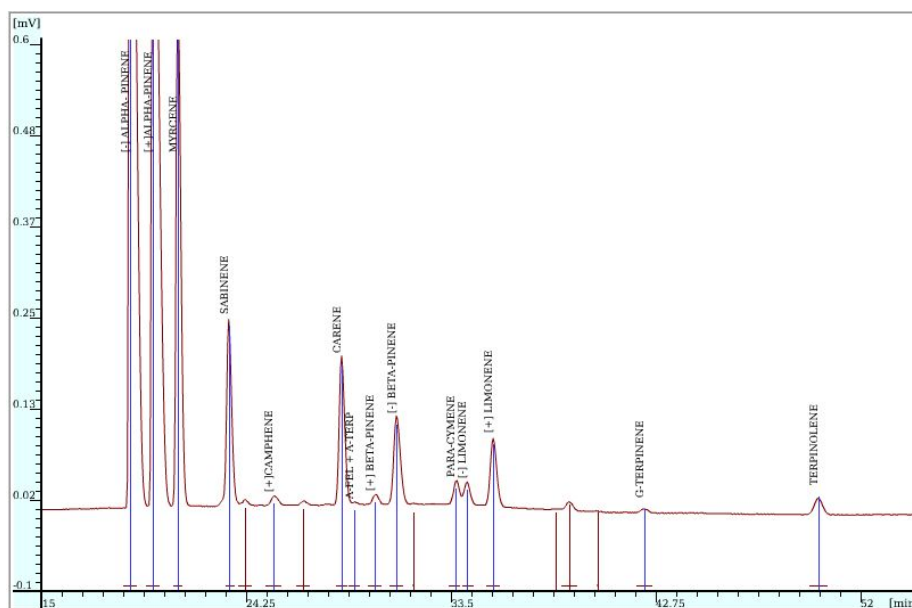
Rys. 9 Chromatogram przedstawiający rozdział związków monoterpenu z uwzględnieniem ich form enancjomerycznych na kolumnie HP Chiral (20% Permethyated B-Cyclodextrin). Chromatogram otrzymano przez analizę headspace SPME/GC substancji lotnych z liści szpilkowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)¹². (chromatogram wygenerowany przez oprogramowanie ChromNET)



Rys. 10 Chromatogram przedstawiający rozdział związków monoterpenu na kolumnie HP 101. Chromatogram otrzymano przez analizę headspace SPME/GC substancji lotnych z pojedynczej szyszkojagody jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.)¹³. (chromatogram wygenerowany przez oprogramowanie ChromNET)

12 - skrót A-FEL+A-TERP oznacza pik α -felandrenu i α -terpinenu, skrót G-TERPINENE oznacza γ -terpinen.

13 - skrót PC+AT oznacza pik para-cymenu i α -terpinenu, skrót G-TERPINENE oznacza γ -terpinen.



Rys. 11 Chromatogram przedstawiający rozdział związków monoterpenowych z uwzględnieniem ich form enancjomerycznych na kolumnie HP Chiral (20% Permethyated B-Cyclodextrin). Chromatogram otrzymano przez analizę headspace SPME/GC substancji lotnych z pojedynczej szyszkojagody jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.)¹⁴. (chromatogram wygenerowany przez oprogramowanie ChromNET)

8.2.2 Ocena metody headspace SPME/GC w analizie mieszanin lotnych związków.

Zgodnie z przyjętymi standardami i normami dla roślinnych olejków (normy farmakopealne, normy ISO, EMEA) badając skład olejku określone są względne zawartości procentowe poszczególnych składników.

Analiza headspace SPME stosowana w rutynowych, porównawczych badaniach znacząco ułatwia prowadzenie takich oznaczeń. W przypadku prowadzonych badań istotne jest w ocenie stosowanej metody i jej parametrów, określenie powtarzalności (zgodności).

W celu zbadania powtarzalności przygotowano mieszaninę wzorcowych związków terpenowych i prowadzono oznaczenia zawartości procentowej poszczególnych składników mieszaniny. Przeprowadzono także badanie powtarzalności wyników analiz chromatograficznych w odniesieniu do każdego analizowanego materiału roślinnego. Procedurę stosowano nie tylko w odniesieniu do próbek pochodzących z różnych

14 - skrót A-FEL+A-TERP oznacza pik α -felandrenu i α -terpinenu, skrót G-TERPINENE oznacza γ -terpinen.

gatunków roślin, ale także do próbek tego samego gatunku, które różniły się miejscem (np. organem) z którego je pobrano oraz sposobem przygotowania lub przechowywania (np. młode pędy sosnowe w stanie suchym były traktowane jako inny materiał niż młode pędy sosnowe przechowywane w zamrożeniu, w stanie świeżym). Badanie powtarzalności wyników analiz chromatograficznych zostało przeprowadzone niezależnie dla analiz w warunkach chiralnych oraz achiralnych. Dobór osobników roślin, z których pobrano materiał w celu wykonania badania powtarzalności był losowy.

Tabela nr 23 Zestawienie materiałów użytych przy badaniu powtarzalności metody. W stosunku do każdego z materiałów wykonano analizy w warunkach achiralnych oraz chiralnych. Więcej informacji o użytym materiale roślinnym można znaleźć na stronach 71, 72 i 75.

SUBSTANCJA/SUROWIEC	OPIS	ILOŚĆ	SPOSÓB PRZYGOTOWANIA
roztwór substancji wzorcowych	w 600 μ l metanolu rozpuszczono: [-] α -pinen (1 μ l), [+] α -pinen (0,5 μ l), myrcen (1 μ l), [-]kamfen (3 μ l nasyconego roztworu metanolowego), 3-karen (1 μ l), [-] β -pinen (0,5 μ l), [+] β -pinen (1 μ l), para-cymen (1 μ l), [-] limonen (0,5 μ l), [+] limonen (1 μ l), γ -terpinen (1 μ l), terpinolen (1 μ l), α -felandren (1 μ l), α -terpinen (1 μ l)	1 μ l (analizy w warunkach achiralnych) 20 μ l (analizy w warunkach chiralnych)	roztwór umieszczano bezpośrednio w naczyniu pomiarowym, w którym przeprowadzono headspace SPME
szyszkojagody jałowca 1 (osobnik j20)	przechowywane przez rok w temperaturze pokojowej	100 mg	rozgniatane ręcznie szklaną bagietką przez 60s.
szyszkojagody jałowca 2 (osobnik j37)	zamrożone bezpośrednio po zbiorze	100 mg	rozgniatane ręcznie szklaną bagietką przez 60s.
młode pędy sosnowe 1 (osobnik s20)	przechowywane przez rok w stanie suchym	100 mg	mielone młynkiem 5s.
młode pędy sosnowe 2 (osobnik s25')	zamrożone bezpośrednio po zbiorze	200 mg	rozgniatane ręcznie szklaną bagietką przez 60s.
liście szpilkowe sosnowe (osobnik nr 1) oznaczony tak w toku badań sezonowych zmian składu frakcji monoterpenowej	zamrożone bezpośrednio po zbiorze	200 mg	mielone młynkiem 10s.

W toku badania wykonywano analizy chromatograficzne w warunkach identycznych z zastosowanymi w toku właściwych analiz chromatograficznych przeprowadzanych w toku realizacji niniejszej pracy. Po wykonaniu 11 powtórzeń chromatogramy były integrowane i eksportowane do oprogramowania ChromNET, gdzie generowano zestawienie obejmujące względne zawartości analizowanych związków

monoterpenowych. W tabelach nr 24 i 25 zamieszczono zestawienie wyników opisywanego badania powtarzalności analiz w stosunku do roztworu substancji wzorcowych i różnych materiałów roślinnych używanych w toku realizacji niniejszej pracy. W celu eliminacji błędów pomiarowych posłużono się testem Q-Dixona (znanym także pod nazwą testu Q lub testu Dixona). Szczegółowe dane wyjściowe, które posłużyły do stworzenia niniejszego zestawienia zamieszczono w dodatku A w tabelach o numerach 45–56 (str. 199).

W toku niniejszej pracy metoda headspace SPME wykorzystywana była jako półilościowa technika przygotowania próbek do chromatograficznych analiz porównawczych zawartości względnych składników złożonych mieszanin. Wobec powyższego faktu nie ma uzasadnienia przeprowadzanie większości wymaganych testów stosowanych przy walidacji typowo ilościowych metod analitycznych.

Jak wskazują uzyskane wyniki oznaczeń matryca biologiczna ma bardzo duży wpływ na powtarzalność analiz. W prowadzonych badaniach zawartości związków monoterpenowych analizowano w młodych pędach (drewno, łyko, liść szpilkowy) sosny, jak również w szyszkojagodach jałowca. Na proces ekstrakcji znacząco wpływał rodzaj struktur anatomicznych tkanki wydzielniczej w danym gatunku rośliny. Tak zróżnicowany materiał wymagał badań powtarzalności, przeprowadzanych analogicznie jak dla substancji wzorcowych. Niejednorodna natura matrycy biologicznej jest przyczyną niższej powtarzalności wyników rozdziałów chromatograficznych w przypadku materiałów roślinnych niż to można obserwować na przykładzie analiz roztworu substancji wzorcowych. Uzyskane wyniki analiz tych ostatnich świadczą o dobrej powtarzalności metody headspace SPME/GC stosowanej w ramach niniejszej pracy.

Tabela nr 24 Zestawienie wyników badań powtarzalności achiralnych analiz chromatograficznych (headspace SPME/GC) dla roztworu substancji wzorcowych i różnych materiałów roślinnych wykorzystywanych w czasie realizacji pracy. Zestawienie obejmuje średnie zawartości procentowe badanych związków monoterpenowych oraz (w nawiasach kwadratowych) odchylenie standardowe.

OPIS MATERIAŁU	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	para-cymen + α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol
	[%]											
roztwór wzorcowy	8,6 [\pm 0,27]	2,53 [\pm 0,07]	-	12,97 [\pm 0,27]	6,01 [\pm 0,04]	4,73 [\pm 0,03]	8,84 [\pm 0,04]	18,31 [\pm 0,14]	16 [\pm 0,14]	11,03 [\pm 0,16]	10,98 [\pm 0,21]	-
szyszkogody jałowca w stanie wysuszonym (osobnik j20)	83,94 [\pm 4,72]	0,68 [\pm 0,16]	0,4 [\pm 0,07]	1,72 [\pm 0,13]	9,43 [\pm 4,99]	0,05 [\pm 0,03]	0,31 [\pm 0,09]	0,12 [\pm 0,05]	2,77 [\pm 0,65]	0,02 [\pm 0,01]	0,36 [\pm 0,13]	0,2 [\pm 0,1]
szyszkogody jałowca zamrożone w stanie świeżym (osobnik j37)	43,55 [\pm 4,17]	0,38 [\pm 0,05]	0,15 [\pm 0,03]	2,27 [\pm 0,12]	49,63 [\pm 4]	0,1 [\pm 0,03]	0,03 [\pm 0,01]	0,09 [\pm 0,03]	3,04 [\pm 0,3]	0,04 [\pm 0,01]	0,56 [\pm 0,06]	0,16 [\pm 0,04]
liście szpilkowe sosny (osobnik nr 1)	55,25 [\pm 0,86]	7,2 [\pm 0,07]	0,77 [\pm 0,03]	2,64 [\pm 0,03]	2,66 [\pm 0,06]	0,09 [\pm 0,01]	27,32 [\pm 0,62]	0	1,12 [\pm 0,05]	0,32 [\pm 0,02]	2,62 [\pm 0,14]	0,03 [\pm 0,01]
młode pędy sosny w stanie wysuszonym (osobnik s20)	11,22 [\pm 1,16]	0,53 [\pm 0,08]	1,08 [\pm 0,29]	2,19 [\pm 0,86]	1,58 [\pm 0,17]	0,16 [\pm 0,07]	75,8 [\pm 1,06]	0	2,47 [\pm 0,3]	0,41 [\pm 0,04]	4,29 [\pm 0,56]	0,27 [\pm 0,05]
młode, zamrożone w stanie świeżym pędy sosny (osobnik s25')	54 [\pm 5,62]	1,86 [\pm 0,27]	0,1 [\pm 0,01]	1,82 [\pm 0,12]	13,04 [\pm 2,09]	0,05 [\pm 0,01]	0,15 [\pm 0,03]	0,04 [\pm 0,01]	28,44 [\pm 4,1]	0,06 [\pm 0,01]	0,4 [\pm 0,04]	0,04 [\pm 0,01]

Tabela nr 25 Zestawienie wyników badań powtarzalności chiralnych analiz chromatograficznych (headspace SPME/GC) dla roztworu substancji wzorcowych i różnych materiałów roślinnych wykorzystywanych w czasie realizacji pracy. Zestawienie obejmuje średnie zawartości procentowe badanych związków monoterpenowych oraz (w nawiasach kwadratowych) odchylenie standardowe.

OPIS MATERIAŁU	[-] α -pinen	[+] α -pinen	myrcen	sabinen	[-]kamfen	3-karen	[-] β -pinen	[+] β -pinen	para-cymen	[-] limonen	[+] limonen	γ -terpinen	terpinolen	α -felandren + α -terpinen
	[%]													
roztwór wzorcowy	7,93 [\pm 0,48]	3,7 [\pm 0,23]	5,88 [\pm 0,07]	-	1,56 [\pm 0,08]	9,29 [\pm 0,17]	5,81 [\pm 0,22]	8,39 [\pm 0,3]	12,33 [\pm 0,55]	5,85 [\pm 0,07]	9,57 [\pm 0,09]	10,75 [\pm 0,31]	10,52 [\pm 0,42]	8,44 [\pm 0,06]
szyszkogody jałowca w stanie wysuszonym (osobnik j20)	19,68 [\pm 1,49]	69,48 [\pm 2,4]	5,9 [\pm 2,31]	0,44 [\pm 0,03]	0,22 [\pm 0,02]	0,32 [\pm 0,06]	1,16 [\pm 0,07]	0,58 [\pm 0,03]	0,07 [\pm 0,01]	0,72 [\pm 0,06]	1,18 [\pm 0,07]	0,01 [\pm 0,01]	0,25 [\pm 0,05]	0
szyszkogody jałowca zamrożone w stanie świeżym (osobnik j37)	21,75 [\pm 2,28]	17,82 [\pm 1,5]	53,98 [\pm 3,62]	0,27 [\pm 0,05]	0,33 [\pm 0,01]	0,02 [\pm 0,01]	1,94 [\pm 0,15]	0,2 [\pm 0,01]	0,08 [\pm 0,04]	1,25 [\pm 0,08]	1,55 [\pm 0,13]	0,06 [\pm 0,02]	0,63 [\pm 0,04]	0,12 [\pm 0,02]
liście szpilkowe sosny (osobnik nr 1)	11,82 [\pm 0,34]	42,63 [\pm 0,53]	2,65 [\pm 0,07]	2,12 [\pm 0,08]	7,05 [\pm 0,21]	26,27 [\pm 0,9]	2,04 [\pm 0,06]	0,49 [\pm 0,03]	0	1,62 [\pm 0,09]	0,41 [\pm 0,02]	0,3 [\pm 0,04]	2,6 [\pm 0,12]	0
młode pędy sosny w stanie wysuszonym (osobnik s20)	2,53 [\pm 0,27]	7,49 [\pm 2,01]	1,44 [\pm 0,19]	2,77 [\pm 0,8]	1,67 [\pm 0,1]	74,99 [\pm 2,59]	1,92 [\pm 0,7]	0	0,89 [\pm 0,22]	1,53 [\pm 0,19]	0,19 [\pm 0,02]	0,36 [\pm 0,07]	4,2 [\pm 0,72]	0
młode, zamrożone w stanie świeżym pędy sosny (osobnik s25')	11,43 [\pm 0,76]	38,75 [\pm 7,3]	14,31 [\pm 2,62]	0,32 [\pm 0,04]	1,08 [\pm 0,16]	0,09 [\pm 0,02]	1,14 [\pm 0,05]	0,53 [\pm 0,05]	0	30,98 [\pm 4,86]	0,94 [\pm 0,06]	0,01 [\pm 0,02]	0,38 [\pm 0,03]	0,04 [\pm 0,02]

9 Badanie sezonowej zmienności składu olejku sosny zwyczajnej

Próby liści szpilkowych 6 osobników sosny zwyczajnej zbierane były w regularnych comiesięcznych odstępach czasu od stycznia 2003 do grudnia 2003 roku (1 rok). Następnie poddawane były zamrożeniu i przechowywane do czasu analizy. Zaabsorbowane na złożu SPME lotne składniki olejków poddawano analizie chromatograficznej z zastosowaniem chromatografu gazowego wyposażonego w kolumnę o złożu achiralnym oraz detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Analizy chiralne przeprowadzono dla trzech wybranych osobników sosny. Szczegółowe wyniki analiz zamieszczono w tabeli nr 42 na str.184.

10 Badanie osobniczej zmienności składu olejku sosny zwyczajnej i jałowca pospolitego

W celu przeprowadzenia wymienionych badań użyto danych otrzymanych w wyniku analiz chromatograficznych materiału roślinnego zebranego w ramach realizacji głównego celu pracy - badań wpływu żerowania owadów na skład frakcji monoterpenowej surowca pozyskiwanego z sosny zwyczajnej i jałowca pospolitego (szczegółową charakterystykę materiału roślinnego oraz metodykę zbioru i przechowywania zamieszczono na stronach 75 i 79 (*Pinus sylvestris* L) oraz 72 i 81 (*Juniperus communis* L). (szczegółowe wyniki analiz zamieszczono w dodatku A na stronach 187 i 192.

11 Projektowanie i realizacja sieciowego systemu archiwizacji i analizy danych chromatograficznych ChromNET

11.1 Cele

Celem zaprojektowania i stworzenia sieciowego oprogramowania do archiwizacji i analizy porównawczej danych chromatograficznych ChromNET było:

- stworzenie narzędzia, które w znacznej mierze przyspieszyłoby analizę dużych ilości danych chromatograficznych
- zapewnienie możliwości rozbudowy i dostosowania oprogramowania do potrzeb użytkowników poprzez swobodny dostęp do kodu źródłowego.
- zapewnienie możliwości efektywnej archiwizacji dużych ilości danych chromatograficznych
- zapewnienie dostępu do danych chromatograficznych poprzez sieć Internet bez potrzeby kupna/installacji dodatkowego oprogramowania
- zbadanie możliwości zastosowania technologii generowania grafiki wektorowej w formacie Macromedia Flash dla potrzeb wizualizacji i analizy danych chromatograficznych

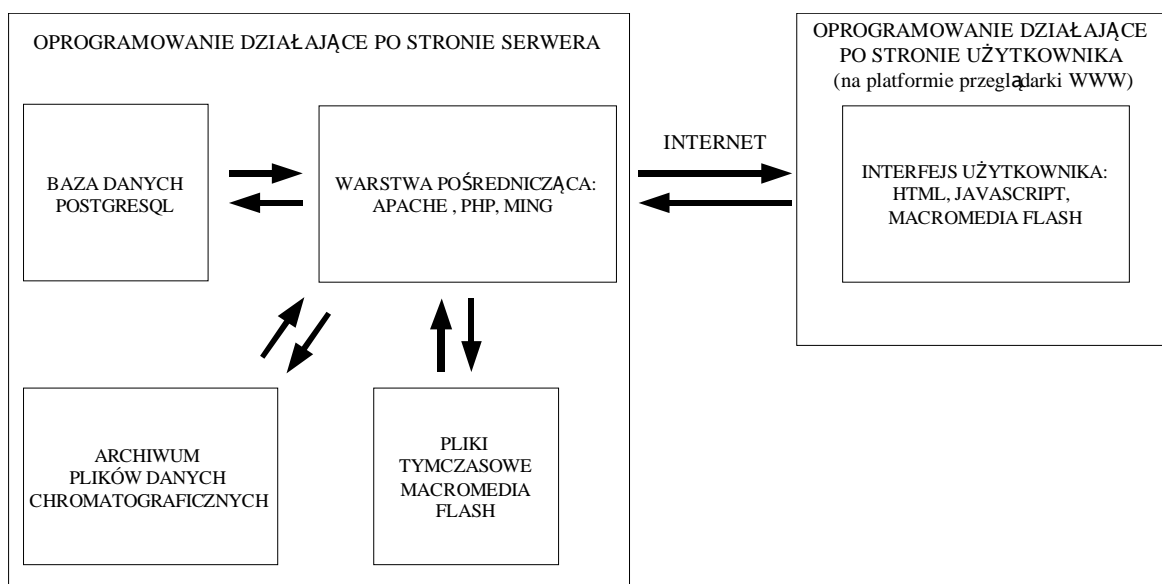
11.2 Założenia projektowe

Głównymi założeniami projektowymi przyjętymi podczas prac nad oprogramowaniem ChromNET było:

- stworzenie wieloużytkownikowego systemu archiwizacji i analizy porównawczej danych chromatograficznych w postaci aplikacji WWW
- zbudowanie oprogramowania przy użyciu bezpłatnie dostępnych narzędzi i technologii
- wykorzystanie technologii generowania grafiki wektorowej (Macromedia Flash lub SVG) do wizualizacji danych chromatograficznych oraz przy tworzeniu części interfejsu użytkownika
- wykorzystanie bazy danych SQL do przechowywania danych
- stworzenie podsystemu archiwizacji plików danych chromatograficznych
- uczynienie obsługi programu tak intuicyjną jak to tylko możliwe

- zastosowanie obiektowego sposobu programowania w celu uproszczenia konstrukcji kodu oraz zwiększenia jego przejrzystości
- rozbitcie kodu PHP na wiele plików zawierających logicznie powiązane ze sobą instrukcje w celu ułatwienia edycji kodu źródłowego

11.3 Budowa aplikacji



Rys. 12 Schemat struktury oprogramowania do archiwizacji i analizy porównawczej danych chromatograficznych ChromNET.

Na powyższym schemacie przedstawiono strukturę i zasadę działania oprogramowania do archiwizacji i analizy danych chromatograficznych ChromNET. Kluczową część oprogramowania stanowi tzw. „warstwa pośrednicząca”. Składają się na nią: oprogramowanie serwera WWW, skrypty PHP oraz biblioteka programistyczna MING służąca do dynamicznego generowania plików w formacie Macromedia Flash. Skrypty PHP mają za zadanie:

- kontrolę użytkowników (uwierzytelnienie, kontrola sesji)
- pośredniczenie pomiędzy użytkownikiem a bazą danych (wydawanie poleceń, pobieranie wyników zapytań)
- import nowych danych chromatograficznych
- zarządzanie archiwum plików z danymi chromatograficznymi

- generowanie przy pomocy biblioteki MING plików w formacie Macromedia Flash w celu wizualizacji i wizualnej edycji danych chromatograficznych
- zarządzanie plikami tymczasowymi Macromedia Flash
- tworzenie interfejsu użytkownika
- wykonywanie obliczeń związanych z analizą danych chromatograficznych

Zadaniem oprogramowania serwera WWW jest wysyłanie wygenerowanych przez skrypty PHP elementów interfejsu do przeglądarki w komputerze użytkownika.

W bazie danych przechowywane są zarówno informacje dotyczące użytkowników (dane osobowe, zaszyfrowane hasła, ustawienia) jak i dane chromatograficzne (dane dotyczące poddanych analizie próbek, chromatogramów, ich organizacji i przynależności). Przechowywane są tam także informacje dotyczące znajdujących się w archiwum plików z danymi chromatograficznymi. W bazie tej znajdują się także informacje związane z analizą i edycją danych chromatograficznych (dane matryc ułatwiających identyfikację i oznaczanie pików chromatograficznych, pozycje początku i końca integracji).

Pliki z danymi chromatograficznymi są przechowywane w specjalnie do tego celu przeznaczonym katalogu na dysku serwera. Przechowywane są zarówno pliki z danymi w postaci tekstowej (konieczne do poprawnego zaimportowania danych przez system ChromNET¹⁵) jak i pliki w oryginalnym formacie (opcjonalne). Podczas importu każdy plik zapisywany jest pod nową, unikalną nazwą, dzięki czemu wszystkie pliki z danymi chromatograficznymi mogą znajdować się w tym samym katalogu i nie ma możliwości ich przypadkowego nadpisania podczas importu nowego pliku. Oryginalna nazwa każdego pliku jest jednak zapisywana w bazie danych. Dane dotyczące współrzędnych poszczególnych punktów tworzących krzywą chromatograficzną ze względu na dużą objętość nie są importowane do bazy danych, lecz każdorazowo odczytywane z pliku tekstowego. Rozwiązanie to znacznie przyspieszyło import plików oraz działanie bazy

15 - obecnie obsługiwane są jedynie pliki tekstowe z danymi chromatograficznymi wyeksportowanymi przez program Chroma i Chromax

danych. Pozostałe dane zawarte w importowanym pliku tekstowym są automatycznie umieszczane w bazie danych. W szczególności dotyczy to danych pików chromatograficznych.

Interfejs użytkownika oparty jest na języku HTML. Zawiera także elementy w formacie Macromedia Flash umożliwiające wizualizację i wizualną edycję danych chromatograficznych (nadawanie nazw pikom chromatograficznym i wspomaganie identyfikacji pików chromatograficznych przy pomocy tzw: „matryc”, ustawianie początku i końca integracji metodą „przeciągnij i upuść”). Wybór tej technologii jako podstawowej techniki wizualizacji danych w systemie ChromNET podyktowany był jej znacznym rozpowszechnieniem oraz dużymi możliwościami interakcji z użytkownikiem (standard Macromedia Flash pozwala na pisanie programów w specjalnie zaprojektowanym języku ActionScript [Moock, 2003]) Technika formularzy HTML wspomagana przez JavaScript umożliwia między innymi: dokładne skalowanie krzywej chromatograficznej, ustawienie trybu i parametrów integracji, edycję danych tekstowych związanych z projektami, próbkami, matrycami, zarządzanie chromatogramami i projektami, import plików z danymi chromatograficznymi. Modułowa budowa interfejsu wzorowana na popularnych aplikacjach WWW (systemy portalowe) umożliwia jego łatwą rozbudowę.

Wizualizacja chromatogramu odbywa się poprzez odczytanie współrzędnych tworzących krzywą chromatograficzną z pliku z danymi chromatograficznymi znajdującego się w archiwum plików. Dane dotyczące pików chromatograficznych pobierane są z bazy danych. Następnie przy użyciu biblioteki MING tworzony jest tymczasowy plik w formacie Macromedia Flash. Plik ten zapisywany jest w specjalnym katalogu pod unikalną nazwą, a następnie wraz elementami interfejsu przesyłany do przeglądarki użytkownika. Z chwila wylogowania użytkownika usuwane są wszystkie tymczasowe pliki w formacie Macromedia Flash o czasie ostatniej modyfikacji dłuższym od dwóch godzin. Powyższe rozwiązanie zapewnia możliwość jednoczesnej pracy wielu użytkowników bez niebezpieczeństwa nadpisywania plików.

Przy edycji danych chromatograficznych przy pomocy części interfejsu użytkownika w formacie Macromedia Flash wykorzystywane są możliwości odczytywania i

zmiany pozycji obiektów oraz wykrywania kontaktu obiektów (pokrywanie się obszarów, na których znajdują się obiekty matryc oraz obiekty pików chromatograficznych).

11.4 Wykorzystane narzędzia programistyczne

Podczas tworzenia oprogramowania ChromNET wykorzystano następujące języki programowania: HTML, PHP, JavaScript, Macromedia Flash ActionScript.

Do komunikacji z bazą danych użyto języka SQL.

Do stworzenia i uruchomienia aplikacji użyto następującego oprogramowania:

- PostgreSQL (www.postgresql.org) – oprogramowanie obsługujące bazę danych [Dybikowski, 2001]
- PHP (www.php.net) – oprogramowanie interpretujące i wykonujące kod PHP [Atkinson, 2000]
- MING (<http://ming.sourceforge.net/>) – biblioteka programistyczna służąca do dynamicznego generowania plików w formacie Macromedia Flash
- Apache (<http://httpd.apache.org/>) – oprogramowanie serwera WWW [Laurie i Laurie, 2000]
- Quanta Plus (<http://quanta.sourceforge.net/>) – środowisko programistyczne
- Mozilla Firefox (<http://www.mozilla.org>) – przeglądarka internetowa, dla której optymalizowano kod JavaScript
- Macromedia Flash Player (<http://www.macromedia.com>) – oprogramowanie pozwalające odtwarzać pliki w formacie Macromedia Flash
- Fedora Core Linux – system operacyjny [Ball, 1999] [Butzen i Forbes, 1999]

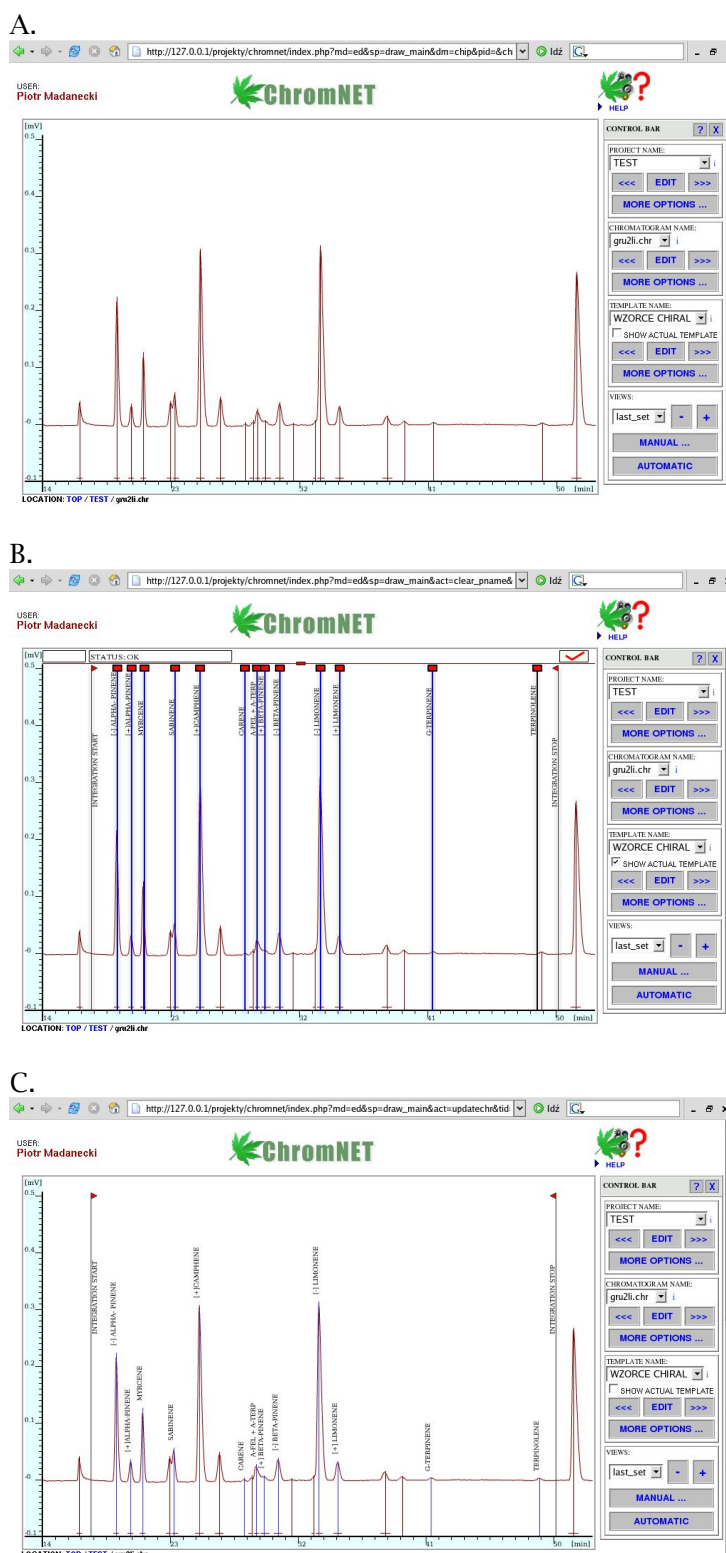
12 Analiza danych chromatograficznych

12.1 Rejestracja i integracja przy pomocy oprogramowania Chroma

Integrację danych chromatograficznych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Chroma firmy POL-LAB.

12.2 Wstępna analiza danych chromatograficznych przy pomocy programu ChromNET

Po integracji z użyciem oprogramowania Chroma, dane chromatograficzne były eksportowane do pliku tekstowego ASCII. Następnie tak przygotowane dane chromatograficzne importowano do systemu ChromNET. Po zaimportowaniu dane chromatograficzne były organizowane w grupy chromatogramów (projekty). Dla każdego chromatogramu ustawiano początek i koniec integracji oraz przyporządkowywano nazwy pikom zidentyfikowanych wcześniej z użyciem wzorców substancji, ewentualnie metody spektrometrii mas.



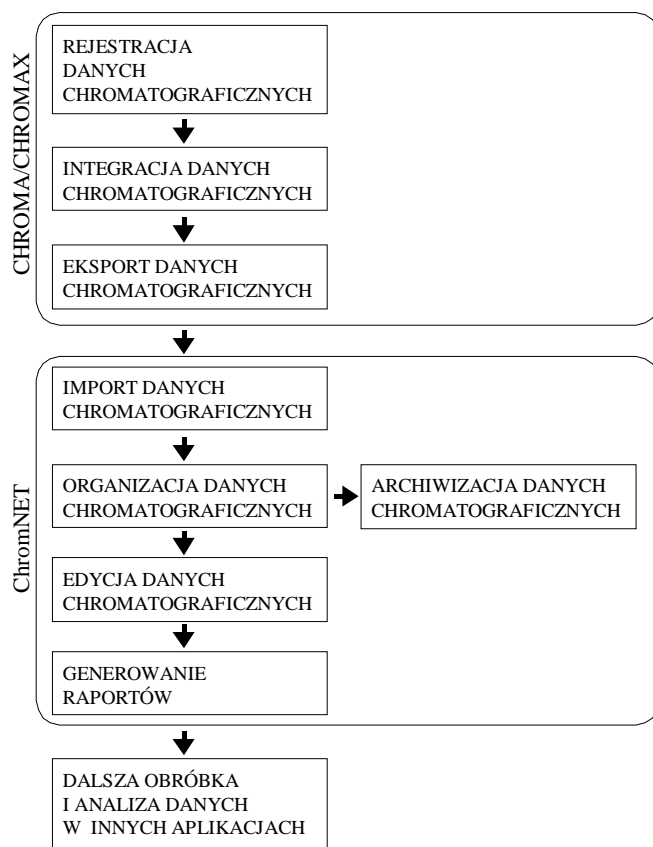
Rys. 13 Szybkie oznaczenie pików chromatograficznych poprzez nadanie im nazw w oprogramowaniu ChromNET.

A – wyjściowy chromatogram (rozdziel chiralny składników olejku świerkowego)

B – użycie matrycy do oznaczenia pików (znacznik tepinolenu wymaga niewielkiej ręcznej korekty)

C – wygląd chromatogramu po wprowadzeniu informacji o nazwach pików do bazy danych

Następnie generowano raport obejmujący zestawione wyniki integracji wszystkich chromatogramów w danym projekcie. Przeniesione do arkusza kalkulacyjnego dane podlegały potem dalszej obróbce.



Rys. 14 Schemat obejmujący rejestrację i początkowe etapy analizy danych chromatograficznych oraz użyte oprogramowanie.

13 Hodowla znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) z zebranych w warunkach naturalnych szyszkojagód jałowca

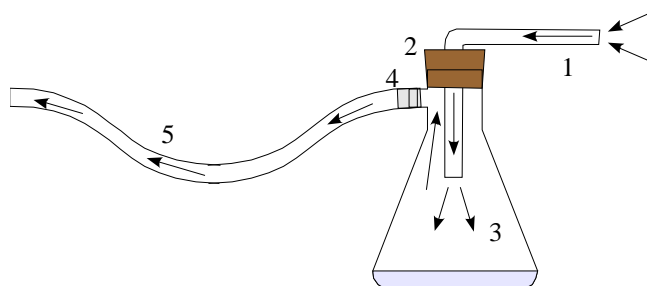
Materiał do hodowli pozyskany został z terenów leśnych w pobliżu miejscowości Klaniny (obszar Kociewia) dnia 11.06.2004. Zbierano pędy długości 20–40cm, z wykształconą dużą ilością szyszkojagód w drugim roku rozwoju. Zbiór przeprowadzono z krzewów, które już wcześniej wykazywały oznaki zasiedlenia przez znamionka jałowcowego. Zebrane pędy przetransportowano w foliowych woreczkach do laboratorium, gdzie zostały umieszczone w słojach z wodą i przykryte przezroczystą folią w celu uniemożliwienia ucieczki opuszczających szyszkojagody owadów. Tak

zabezpieczony materiał umieszczono w warunkach dużego nasłonecznienia. Dnia 21.06.2004 zaobserwowano pojawienie się niewielkich błonkówek, które wstępnie zidentyfikowano jako postacie dorosłe gatunku *Megastigmus bipunctatus* Swed. (znamionek jałowcowy).

14 Przygotowanie preparatów mikroskopowych i technika wykonywania zdjęć

W przypadku gatunku *Cinara pini* L. w celach stworzenia dokumentacji zdjęciowej posłużono się okazami mszyc zebranymi w rejonie prowadzenia badań (młodniki na terenie lasów w pobliżu miejscowości Otomin). Fragmenty młodych pędów sosny wycinano wraz z bytującymi na nich koloniami mszyc. Następnie transportowano je do laboratorium w niewielkich pojemnikach.

W przypadku znamionka jałowcowego wykorzystano owady wyhodowane przez autora. Owady były chwymane przy pomocy specjalnie skonstruowanego aspiratora (ekshaustora) [Boczek i in., 2000].



Rys. 15 Aspirator użyty do chwymania znamionków (strzałkami zaznaczono kierunek przepływu powietrza). 1 – szklana rurka, 2 korek, 3–kolbka z niewielką ilością wody, 4–warstwa waty, 5–długa, elastyczna rurka

Przygotowanie preparatów polegało na umieszczeniu owadów na szkiełku podstawowym w kropli wody z niewielką ilością detergentu dodawanego w celu zmniejszenia napięcia powierzchniowego cieczy (ograniczało to tworzenie się pęcherzyków powietrza na oglądanych obiektach). Preparat przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Zdjęcia wykonywano zarówno spod mikroskopu jak i binokularu przy pomocy cyfrowego aparatu fotograficznego bez użycia adapterów.

Zdjęcia przekrojów szyszkojagód i nasion z otworami wylotowymi znamionka jałowcowego, oraz szyszkojagód wykazujących oznaki żerowania znamionka i innych

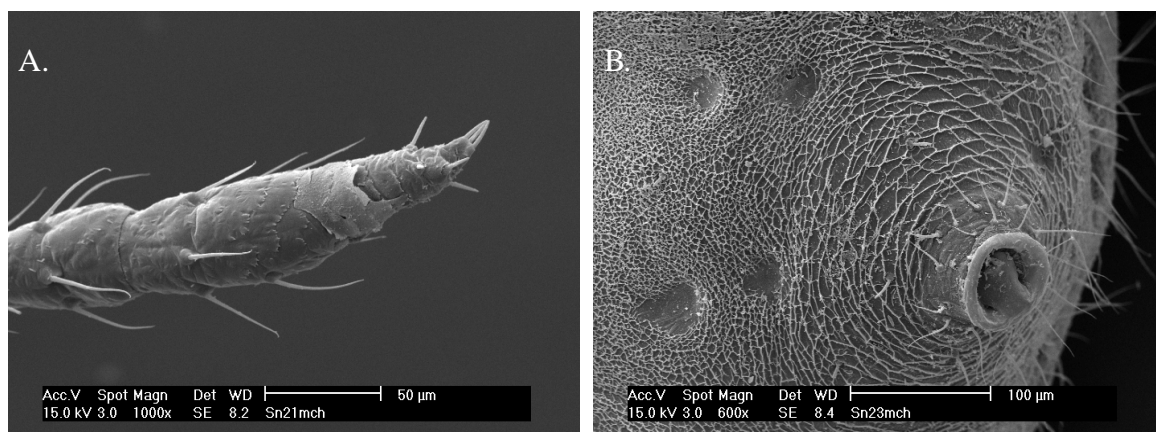
owadów znalezionych w surowcu dostępnym w handlu na terenie kraju wykonano z użyciem skanera.

15 Identyfikacja wykorzystywanych w badaniach gatunków owadów

Wstępna identyfikacja gatunków owadów wykorzystywanych w prowadzonych w toku pracy badaniach została wykonana przez autora na podstawie dostępnej literatury [Kapuściński, 1946] [Roques i Skrzypczyńska, 2003] [Stocki i in., 2000] [Koehler i Schnaider, 1972]. Budowa morfologiczna owadów została udokumentowana w postaci zdjęć zamieszczonych w części teoretycznej przy opisie gatunków. W przypadku miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) jest to fotografia nr 3 zamieszczona na stronie 38 natomiast w przypadku znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) są to fotografie nr 4,5 i 6 zamieszczone na stronach 41 – 43.

Identyfikacja znamionka jałowcowego *Megastigmus bipunctatus* Swed. została potwierdzona na podstawie zdjęć mikroskopowych i makro przez prof. dr hab. Małgorzatę Skrzypczyńską (Katedra Entomologii Leśnej, Wydział Leśny, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie) – autorkę wielu prac poświęconych owadom należącym do tego rodzaju [Skrzypczyńska, 1983] [Roques i Skrzypczyńska, 2003].

Identyfikacja miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) została potwierdzona na podstawie zdjęć mikroskopowych i makro oraz preparatów przez dr Jarmo Holopainena (Department Ecology and Environmental Science, University of Kuopio, Finland) – autora licznych prac poświęconych ekologii biochemicznej interakcji owad – roślina ze szczególnym uwzględnieniem roli związków lotnych wydzielanych przez rośliny [Holopainen, 2004]. Część prac dotyczyła także badań roślin szpilkowych i mszyc na nich żerujących [Holopainen i Kainulainen, 2004]. Przy identyfikacji mszyc z rodzaju *Cinara* często napotyka się trudności wynikające z faktu istnienia wielu bardzo zbliżonych morfologicznie gatunków należących do tej grupy. W celu dodatkowego potwierdzenia identyfikacji wykonano zdjęcia preparatów mszyc z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego (Laboratory of Electron Microscopy, University of Kuopio, Finland).



Fot. 7 Cechy diagnostyczne wybranych struktur objętych badaniami mszyc, potwierdzające ich przynależność do gatunku *Cinara pini* L. A – wierzchołek czułka; na zdjęciu widoczne 3 szczecinki subapikalne różniące *C. pini* L. od zbliżonego gatunku – *C. nuda* Mordw. B – powiększenie rurkowego tworu zwanego „syfonem” służącego do wydzielania feromonów; widoczne włoski wokół otworu syfonu rozmieszczone w 2 okółkach oraz wyraźnie widoczna siateczkowata ornamentacja grzbietowej części kutikuli potwierdzająca wstępną identyfikację.

(fot. udostępnione przez dr Jarmo Holopainena (Department Ecology and Environmental Science, University of Kuopio, Finland) wykonane przez Alpo Peltari (Laboratory of Electron Microscopy, University of Kuopio, Finland), zamieszczone za zgodą autorów).

16 Ocena odsetka szyszkojagód jałowca wykazujących ślady żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) w dostępnym w handlu surowcu

Ocenę stopnia rozpowszechnienia szyszkojagód wykazujących oznaki żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) w surowcu dostępnych na rynku przeprowadzono poprzez analizę próbek surowca różnych producentów.

Ponieważ występowanie znamionka związane jest często z określonymi typami siedlisk i określonymi obszarami [Kapuściński, 1946] [obserwacje własne autora], możliwe są znaczne fluktuacje odsetka szyszkojagód wykazujących oznaki żerowania tego owada nawet w odniesieniu do tego samego producenta ze względu na różne miejsca pozyskiwania surowca.

Przy zakupie surowca starano się nabyć co najmniej 3 opakowania szyszkojagód danego producenta, przy czym w wybierano opakowania różniące się datą przydatności do spożycia ponieważ zwiększało to szansę, że surowiec pochodzi z różnych źródeł i różnych partii. Badanie przeprowadzono poprzez wzrokową kontrolę minimum 300

szyszkojagód wybranych losowo z surowca danego producenta. W odniesieniu do każdego producenta pobierano 3 próbki po 100 szyszkojagód. Próbki te pobierano w miarę możliwości z różniących się datą przydatności do spożycia opakowań. Wzrokowa kontrola surowca polegała na poszukiwaniu szyszkojagód posiadających otwory wylotowe znamionka (większe otwory z brunatną obwódką) lub otwory wylotowe błonkówki pasożytniczej *Trichomalus laevinucha* Thoms. z rodziny *Pteromalidae* [Kapuściński, 1946] pasożytującej na larwach znamionka jałowcowego (występowanie śladów pasożyta było równoznaczna z obecnością gospodarza - szyszkojagodę klasyfikowano więc jako wykazującą oznaki żerowania znamionka). W analizach pomijano występujące w niewielkiej liczbie szyszkojagody uszkodzone w stopniu uniemożliwiającym stwierdzenie żerowania znamionka bądź jego brak.

WYNIKI I DYSKUSJA

W niniejszym rozdziale zamieszczono i opisano wyniki otrzymane w toku realizacji niniejszej pracy. Głównym celem było zbadanie wpływu żerowania wybranych gatunków owadów na skład frakcji monoterpenowej surowca pozyskiwanego z dwóch gatunków roślin szpilkowych: sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) i jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.).

Dane uzyskane z przeprowadzonych w odniesieniu do znacznej liczby roślin analiz chromatograficznych pozwoliły także na realizację celów pochodnych obejmujących takie zagadnienia jak:

- osobnicza i sezonowa zmienność składu frakcji monoterpenowej wśród poddanych badaniom gatunków roślin,
- wpływ długotrwałego przechowywania surowca na względne proporcje związków monoterpenowych

Wykonano także obserwacje i dokumentację zdjęciową dotyczącą biologii i cyklu życiowego uwzględnionych w toku pracy gatunków owadów pod kątem ich znaczenia dla surowca leczniczego. W przypadku szyszkojagód jałowca pospolitego przeprowadzono analizę częstości występowania uszkodzeń powodowanych przez znamionka jałowcowego w odniesieniu do surowca leczniczego i przyprawowego znajdującego się w obrocie handlowym na terenie kraju.

W toku pracy przeprowadzono także dobór optymalnych warunków poszczególnych etapów techniki headspace SPME/GC pod kątem jej wykorzystania w analizach materiału z roślin szpilkowych.

W celu analizy dużych ilości danych chromatograficznych stworzono specjalistyczne oprogramowanie o nazwie ChromNET.

Schemat obrazujący przepływ materiałów i informacji podczas realizacji wszystkich celów niniejszej pracy został zamieszczony na stronie 66. Schemat ten obejmuje także informacje odnośnie lokalizacji powiązanych rozdziałów w tej publikacji.

1 Obserwacja i dokumentacja cyklu życiowego uwzględnionych w badaniach gatunków owadów pod kątem ich znaczenia dla surowca leczniczego

W bieżącym rozdziale opisano obserwacje biologii i cyklu życiowego ujętych w opracowaniu gatunków owadów pod kątem ich znaczenia dla jakości surowca leczniczego.

Zamieszczono także dokumentację zdjęciową dotyczącą przeprowadzonych badań i obserwacji oraz wyniki analizy częstości występowania uszkodzeń spowodowanych przez znamionka jałowcowego wśród dostępnego w handlu na terenie kraju surowca leczniczego i przyprawowego.

Metodyka dotycząca prezentowanych zagadnień (identyfikacja gatunków owadów, technika wykonywania zdjęć i preparatów mikroskopowych oraz ocena dostępnego w handlu surowca pod kątem śladów żerowania znamionka jałowcowego) została opisana na stronach 109, 110 i 111. Pomocny może okazać się także schemat struktury pracy zamieszczony na stronie 66.

1.1 Obserwacja i analiza cyklu życiowego i biologii miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) pod kątem jakości pozyskiwanego z sosny zwyczajnej surowca leczniczego

Obserwacja i analiza cyklu życiowego i biologii miodownicy sosnowej została poprzedzona oznaczeniem gatunku owada przeprowadzonym na podstawie dokumentacji zdjęciowej sporządzonej przez autora oraz przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (University of Kuopio, Finlandia). Zastosowanie metod mikroskopii elektronowej przy identyfikacji gatunku mszycy było konieczne ze względu na występowanie w obrębie rodzaju *Cinara* sp. wielu bardzo morfologicznie zbliżonych gatunków (opis identyfikacji i zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowego zamieszczono na stronie 110). Podczas realizacji tego etapu pracy wykonano bogatą dokumentację zdjęciową (makrofotografie i zdjęcia mikroskopowe), część z nich zamieszczono w rozdziale poświęconym morfologii gatunku *Cinara pini* L. (str. 37) oraz w rozdziale niniejszym.

Jak opisano w rozdziale poświęconym biologii mszycy miodownicy sosnowej (str. 37) mszyca ta występuje szczególnie licznie od maja do lipca zasiedlając młode pędy sosnowe. Duże kolonie liczące setki osobników były zwykle dość łatwo zauważalne, gdyż

ciemny kolor stłoczonych ciał owadów kontrastuje z zielenią młodych pędów sosnowych. Mniejsze kolonie mogą jednak pozostać niezauważone z powodu osłaniających je, jeszcze nie w pełni wykształconych, często przylegających do łodygi, liści szpilkowych. W przypadku odcięcia pędu wraz z bytującymi na nim mszycami, część z owadów usiłuje uciec, duża część jednak pozostaje ukryta wśród liści szpilkowych. Uszkodzenia rośliny są w przypadku miodownicy sosnowej praktycznie niezauważalne - wykształcone w postaci długiej kłujki narządy gębowe nie pozostawiają wyraźnie widocznych śladów na łodydze. Obficie wydzielana rosa miodowa stanowi czynnik zwabiający inne owady (najczęściej mrówki), które bytują na opanowanych przez mszyce organach rośliny. Rosa miodowa, jak się wydaje, może stanowić pożywkę dla niebezpiecznych mikroorganizmów (np. grzybów) jednak potrzeba szczegółowych badań, aby potwierdzić tę teorię. Zimują ciemne, błyszczące jaja ułożone w rzędach na zewnętrznej stronie liści szpilkowych oraz partenogenetyczne, bezskrzydłe samice przebywające w okolicach wierzchołkowych okółków, stąd zarówno jaja jak i dorosłe owady mogą się dostawać do surowca leczniczego także zimą.

Poczynione obserwacje wskazują na konieczność kontroli materiału wykorzystywanego w celach leczniczych pod kątem obecności owadów, gdyż zgodnie z zamieszczonymi w Farmakopei Polskiej zaleceniami odnośnie norm czystości surowca leczniczego, nie powinien on zawierać owadów ani pozostałości po ich żerowaniu [FP VI, 2002].

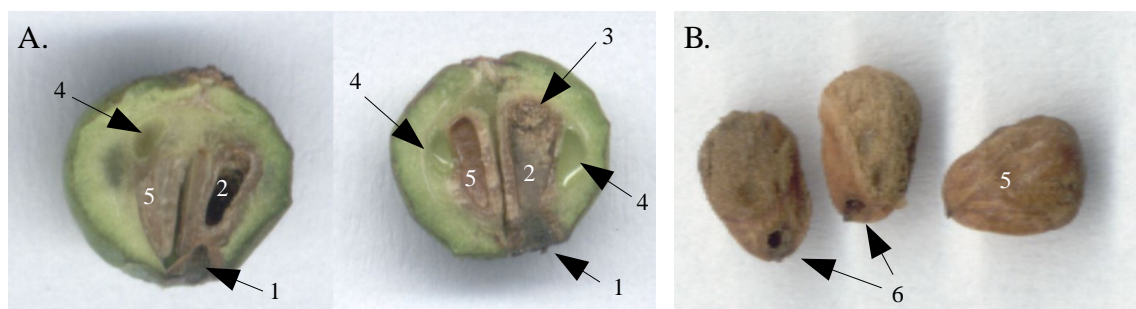


Fot. 8 A– kolonia miodownic na młodym pędzie sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.), B– każdej kolonii mszyc towarzyszy zwykle grupa mrówek, które nie tylko spijają słodką wydzielinę mszyc, ale także aktywnie bronią kolonii przed wrogami (fot. autor).

1.2 Obserwacja i analiza cyklu życiowego i biologii znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) pod kątem jakości pozyskiwanego z jałowca pospolitego surowca leczniczego

Obserwacja i analiza cyklu życiowego i biologii znamionka jałowcowego została poprzedzona oznaczeniem gatunku owada przeprowadzonym na podstawie dokumentacji zdjęciowej sporządzonej przez autora (opis identyfikacji zamieszczono na stronie 110). Podczas realizacji tego etapu pracy wykonano bogatą dokumentację zdjęciową (makrofotografie i zdjęcia mikroskopowe). Część z nich zamieszczono w rozdziale poświęconym morfologii gatunku *Megastigmus bipunctatus* Swed. (str. 37) oraz w rozdziale niniejszym. W ramach realizacji opisywanego etapu pracy prowadzono także hodowlę owadów. Umożliwiło to obserwację cyklu życiowego badanego gatunku oraz wykonanie unikalnych zdjęć np. samicy podczas składania jaj (str. 43) czy zdjęć mikroskopowych obrazujących wybrane szczegóły budowy morfologicznej (str. 41).

Analizując cykl życiowy znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) pod kątem jakości surowca leczniczego należy przede wszystkim rozpatrzyć stopień uszkodzenia szyszkojagód przez żerujące larwy. Samica znamionka już w czasie składania jaja przebija pokładelkiem zewnętrzne struktury szyszkojagody, co zaobserwowano podczas hodowli tych owadów w ramach realizacji niniejszej pracy (fot nr 6 na stronie 43), jednak z powodu małej średnicy pokładelka uszkodzenia te są widoczne po zalepieniu otworków przez tkankę przyraną jedynie jako niewielkie brunatne wzniesienia o średnicy mniejszej niż 1/10 mm, nie zawsze wyraźnie dostrzegalne [Kapuściński, 1946]. Żerująca wewnątrz szyszkojagody larwa w miarę swego rozwoju wyjada cały zarodek i bielmo. Co ciekawe, nie następuje wydalanie zbędnych produktów przemiany materii. Wszystkie odchody są magazynowane wewnątrz ciała larwy w postaci półpłynnej masy. Komora, w której żeruje larwa usłana jest tzw. zgryzkami. Są to małe grudki zmiażdżonych narządami gębowymi larwy tkanek roślinnych. Prawdopodobnie powstają one w czasie żerowania larwy, w jej otworze gębowym. Larwa po rozdrobnieniu tkanki roślinnej w swoich narządach gębowych wysysa półpłynną zawartość, natomiast całą, trudno przyswajalną resztę formuje w grudki (zgryzki), które wydalą z narządów gębowych [Kapuściński, 1946]. Zgryzki początkowo pokrywające boki komory larwalnej są tuż przed przepoczwarczeniem się larwy gromadzone i ubijane w część komory znajdującej się w szczytowej partii szyszkojagody. W momencie przejścia w stadium poczwarki następuje wydalanie wszystkich zgromadzonych w organizmie od początku rozwoju zbędnych produktów przemiany materii, które w postaci półpłynnych ekskrementów są gromadzone w komorze larwalnej w okolicach dolnej części ciała owada. Po pewnym czasie odchody wysychają, tworząc ubitą masę wyściełającą dolną część komory zabarwioną nieco jaśniej od pozostałej części komory. W celu poznania wewnętrznej struktury szyszkojagody wykazującej ślady żerowania znamionka jałowcowego wykonano przekroje uszkodzonych szyszkojagód, które zaprezentowano na fotografii nr 9.



Fot. 9 Uszkodzenia szyszkojagód i nasion jałowca pospolitego powodowane przez znamionka jałowcowego. Na przekrojach wykonanych przez szyszkojagody uszkodzone przez znamionka (fot. A) zaznaczono: otwór wylotowy wygryziony przez owady dorosłe (1), komorę we wnętrzu nasienia, gdzie przebywała larwa, a następnie poczwarka (2), zgromadzone przez larwę resztki pokarmu i odchody tworzące nieco jaśniejszą, ubitą warstwę (3), zbiorniki olejkowe (4), zdrowe nasiona jałowca (5). Na zdjęciu B. zaprezentowano wyizolowane z szyszkojagody nasiona jałowca. Jedno nich nie wykazuje zewnętrznych oznak żerowania znamionka (5). Na dwóch pozostałych można dostrzec ciemne otwory pozostawione przez opuszczające nasiona owady dorosłe (6) (fot. autor).

Dorosły owad wygryza się z szyszkojagody pozostawiając charakterystyczny otwór wylotowy otoczony najpierw niebieską, a w miarę dojrzewania szyszkojagody brunatniejszą, obwódką. Otwory wylotowe znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) przedstawiono na fotografii nr 10 (fot. nr 10A wykonano w ramach prowadzonej w ramach niniejszej pracy hodowli owadów, fotografię 10B wykonano w środowisku naturalnego występowania znamionka na terenie lasów otaczających miejscowość Otomin).



Fot. 10 Szyszkojagody jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) z otworami wylotowymi pozostawionymi przez znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.). A – szyszkojagody sfotografowane tuż po ich opuszczeniu przez owady dorosłe (szyszkojagody zielone, niebieska obwódka wokół położonych na szczycie szyszkojagody otworów wylotowych). B – szyszkojagody sfotografowane rok po ich opuszczeniu przez owady dorosłe (szyszkojagody dojrzałe, ciemnogrnatowe, widoczna brunatna

obwódka wokół położonych na szczycie szyszkogody otworów wylotowych – takie szyszkogody mogą się dostawać do surowca leczniczego w czasie jego zbioru) (fot. autor).

Dojrzałe szyszkogody zbierane jako surowiec leczniczy nie zawierają już we wnętrzu żywych larw znamionka (fot. 10 B). Zawierają one natomiast odchody, zgryzki oraz resztki oskórka larw znamionków (fot. nr 9 na stronie 118), co wobec zapisów farmakopealnych dotyczących czystości surowca leczniczego nie powinno mieć miejsca [FP VI, 2002].

Przesunięty w czasie cyklu rozwojowy wykazuje natomiast pasożytująca na larwach znamionka błonkówka *Trichomalus laevinucha* Thoms. W tym przypadku żywe larwy lub poczwarki pasożyta znajdujące się jeszcze we wnętrzu szyszkogód mogą być zbierane wraz z surowcem leczniczym (fot. nr 11 na str. 122), co także pozostaje w sprzeczności z zaleceniami Farmakopei [FP VI, 2002].

Wobec braku żywych znamionków jałowcowych wewnątrz zbieranych jako surowiec leczniczy szyszkogód wydawałoby się, że intensywny zbiór surowca w miejscach występowania tego owada nie powinien mieć wpływu na jego liczebność, jednak poprzez selektywne usuwanie ze środowiska jego pasożyta (w miejscach intensywnego zbioru szyszkogód *Trichomalus laevinucha* Thoms. należy do rzadkości [Kapuściński, 1946]) działalność człowieka może się przyczyniać do wzrostu liczebności *Megastigmus bipunctatus* Swed., a w konsekwencji do wzrostu odsetka szyszkogód wykazujących ślady i pozostałości żerowania tego owada w surowcu leczniczym.

1.3 Badanie częstości występowania oznak żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) w surowcu znajdującym się w obrocie handlowym na terenie kraju

Badanie częstości występowania oznak żerowania znamionka jałowcowego objęło surowiec pochodzący od 13 producentów. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono:

- **średni odsetek szyszkogód wykazujących oznaki żerowania znamionka na poziomie 5,59%**

- znaczne różnice pomiędzy surowcem pochodzącym z różnych źródeł dotyczące odsetka szyszkojagód wykazujących ślady żerowania tego owada (w badanych próbach odsetek szyszkojagód wykazujących oznaki żerowania znamionka wahał się w szerokich granicach i przyjmował wartości od 0% do 19%)
- dużą rolę znamionka jako owada uszkadzającego szyszkojagody jałowca pospolitego (powyżej 99% wszystkich zaobserwowanych w badanym surowcu uszkodzeń poczynionych przez owady stanowiły otwory wylotowe znamionka jałowcowego¹⁶⁾)

Szczegółowe zestawienie wyników przeprowadzonego badania obrazuje tabela nr 26. Badaniami objęto zarówno surowiec przeznaczony na przyprawę jak i surowiec zebrany w celach leczniczych. Metodę przeprowadzenia analizy opisano na stronie 111.

Tabela nr 26 Zawartości procentowe szyszkojagód jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) wykazujących ślady żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) w surowcu, który stanowiły szyszkojagody jałowca (*Juniperi fructus*) pochodzącym od różnych producentów.

PRODUCENT	ŚREDNI ODSETEK SZYSZKOJAGÓD WYKAZUJĄCYCH ŚLADY ŻEROWANIA W BADANEJ PARTII SUROWCA DANEGO PRODUCENTA
Bonifratrzy	12,33%
Herbalux S.C.	14,67%
Herbapol Lublin S.A.	4,67%
K.P.P.S. "INTERJAREK"	1,33%
KAMIS-PRZYPRAWY S.A.	2,00%
KOTÁNYI Polonia Sp. zo.o.	1,00%
P.W. DR KALDYSZ	6,00%
P.W. „ROL-TOM”	1,33%
Runo Sp. zo.o.	8,67%
Zakład Konfekcjonowania Ziół "Boguccy"	3,5%
Zakład Konfekcjonowania Ziół "FLOS"	6,67%
Zakład Zielarski "Kawon-Hurt"	8,11%
„ZIOŁOPEX” Sp. zo.o.	2,33%
	ŚREDNIO: 5,59%

Podczas badania stwierdzono duże wahania stopnia liczby szyszkojagód wykazujących oznaki żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) nawet w obrębie surowca tego samego producenta, lecz pochodzącego z różnych partii. Świadczy to, iż opublikowane w tej pracy dane liczbowe dotyczące stopnia zanieczyszczenia surowca poszczególnych producentów szyszkojagodami wykazującymi ślady żerowania znamionka w żadnym wypadku nie mogą być uważane za wiarygodny

16 - lub jego pasożyta - błonkówki *Trichomalus laevinucha* Thoms.

wyznacznik jakości surowców dostarczanych przez tych producentów. Dają one jedynie pobieżny pogląd na aktualnie panującą na rynku sytuację. Z chwilą zmiany źródła pozyskiwania surowca przez producenta (co prawdopodobnie zdarza się nierzadko) odsetek szyszkojagód wykazujących oznaki żerowania znamionka może ulec diametralnej zmianie.

O wiele ważniejszy wydaje się natomiast, oszacowany w wyniku tego badania, średni odsetek szyszkojagód uszkodzonych przez znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) w surowcu dostępnym w handlu na terenie kraju. Jak się okazało nie jest on zbyt wysoki (5,59%), ale znaczący.

W świetle przeprowadzonego badania stwierdzono także dużą rolę gatunku *Megastigmus bipunctatus* Swed. jako jedyne owada powodującego obecne w surowcu na tak dużą skalę uszkodzenia. Podczas wykonywania oględzin surowca stwierdzono jedynie kilka przypadków uszkodzeń wywołanych przez inne owady żerujące na szyszkojagodach jałowca opisywane w literaturze [Babiński, 1974] [Kapuściński, 1946] [Rose i in., 2000]. Przyczyna takiego wyniku badania tkwi jednak nie tyle w częstotliwości występowania znamionka, ile w sposobie uszkodzania szyszkojagód oraz reakcji rośliny na te uszkodzenia. Szyszkojagoda jałowca po jej opuszczeniu przez postać dorosłą znamionka jałowcowego nie tylko nie zostaje przez roślinę odrzucona, ale w dalszym ciągu rozwija się i dojrzewa. Podobnie zresztą jak to się działo wcześniej – jeszcze podczas rozwoju owada w jej wnętrzu. Roślina zdaje się nie dostrzegać intruza nawet, gdy ten daje o sobie znać przegryzając się na zewnątrz w celu wydostania się z szyszkojagody. Dlatego też szyszkojagody z śladami żerowania znamionka tak często trafiają do surowca leczniczego. Tkwią one na roślinie chociaż owady dawno już je opuściły i dojrzewają, a następnie są zbierane wraz z innymi nie wykazującymi oznak żerowania owadów szyszkojagodami. Co do mechanizmu, który sprawia, że roślina nie odrzuca szyszkojagód uszkodzonych przez znamionki można snuć wiele przypuszczeń. Może być to efekt strategii rośliny – ponieważ znamionki uszkodzają zwykle jedno z trzech nasion w szyszkojagodzie, roślina stara się wyprodukować przynajmniej dwa pozostałe, zdrowe nasiona i dlatego nie odrzuca szyszkojagody. Może to być także efekt odpowiedniej strategii żerowania znamionka – mógł on w toku ewolucji wykształcić zdolność produkcji

substancji zapobiegającej odrzucaniu zaatakowanej szyszkojagody - przecież jej odrzucenie z żywą larwą wewnątrz oznaczałoby jej śmierć. Ten aspekt współżycia znamionka jałowcowego z jego rośliną żywicielską wydaje się być bardzo ciekawym obszarem dla nowych badań, zwłaszcza, że jak się wydaje, jest on główną przyczyną tak powszechniej obecności uszkodzonych przez tego owada szyszkojagód w surowcu leczniczym i przyprawowym.



Fot. 11 Uszkodzenia szyszkojagód jałowca dostępnych w handlu spowodowane przez owady:

1,2,3 – najbardziej typowe uszkodzenia powodowane przez znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.)

4,5 – szyszkojagody zasiedlone przez więcej niż jedną larwę znamionka.

6,7,8 – otwory wylotowe błonkówki *Trichomalus laevinucha* Thoms.

9 – szyszkojagoda jałowca z otworem wylotowym gąsienicy licinka jałowczyka (*Argyresthia praecocella* Z.) (fot. autor).

Zewnętrzne uszkodzenia szyszkojagód jałowca spowodowane przez owady mają najczęściej postać różnego rodzaju otworów wylotowych. Zdjęcie nr 11 przedstawia szyszkojagody wykazujące oznaki żerowania owadów wyizolowane z surowców pochodzących od różnych producentów. Numerami 1,2,3 oznaczono najbardziej typowe uszkodzenia powodowane przez znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) – wokół otworów wylotowych znajdujących się na szczycie szyszkojagody widoczne są mniej lub bardziej wyraźne brunatne obwódki. W pojedynczej szyszkojagodzie żeruje najczęściej jedna larwa znamionka, jednak zdarzają się także szyszkojagody zasiedlone przez dwie, a nawet trzy larwy (fot. nr 11 – szyszkojagody

oznaczone numerami 4, 5). Otwory wylotowe pozostawiane przez pasożyta znamionka jałowcowego – błonkówkę *Trichomalus laevinucha* Thoms. charakteryzują się brakiem brunatnej obwódki (fot. nr 11 – szyszkojagody oznaczone numerami 6, 7, 8). Stosunkowo rzadko spotkać można w surowcu leczniczym i przyprawowym uszkodzenia powodowane przez inne owady: uszkodzenie widoczne na bocznej powierzchni szyszkojagody oznaczonej na fot. nr 11 numerem 9 zidentyfikowano jako otwór wylotowy gąsienicy motyla licinka jałowczyka (*Argyresthia praecocella* Z.) [Kapuściński, 1946].

Obecność szyszkojagód wykazujących pozostałości żerowania znamionka jałowcowego i innych owadów jest niezgodna z zaleceniami farmakopealnymi odnośnie czystości surowca leczniczego. Zestawienie wybranych norm przedstawiono w tabeli nr 27.

Tabela nr 27 Wybrane, ważne pod względem występowania owadów, dopuszczalne normy jakości, dotyczące szyszkojagód jałowca pospolitego *Juniperus communis* L. [FP VI, 2002] [Ceskoslovensky Lekopis, 1987] [Deutches Arzneibuch, 1998] [European Pharmacopoeia, 2002]

Farmakopea	Polska	Czeska	Niemiecka	Europejska
Norma czystości	Dopuszczalna zawartość [%]			
Szyszkojagody niewłaściwie zabarwione	12.0	15.0	5.0	5.0
Obce składniki	–	0.5	2.0	2.0
Zanieczyszczenia organiczne	2.0	0.5	–	–
Uszkodzone szyszkojagody	9.0	–	–	–

2 Badanie zmienności sezonowej składu frakcji monoterpenowej sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)

W niniejszym rozdziale zamieszczono i opisano wyniki badania zmienności sezonowej składu frakcji monoterpenowej sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z uwzględnieniem form enancjomerycznych.

Analiza sezonowej zmienności składu frakcji monoterpenowej sosny zwyczajnej w połączeniu z danymi dotyczącymi innych gatunków roślin szpilkowych pozwoliła na sformułowanie ogólnych wniosków, mających znaczenie dla doboru właściwej metodyki zbioru materiału do celów badawczych.

Charakterystykę materiału użytego w badaniach oraz metodykę zbioru i przechowywania zamieszczono na stronach 71 i 78. Otrzymane w wyniku analiz chromatograficznych dane wejściowe dotyczące gatunku *Pinus sylvestris* L. zamieszczono w dodatku A (str. 183). Pomocny może okazać się także schemat struktury pracy zamieszczony na stronie 66.

2.1 Wyniki analiz chromatograficznych otrzymane w ramach badania zmienności sezonowej składu frakcji monoterpenowej sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)

2.1.1 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono jedynie niewielkie różnice sezonowe dotyczące zmian stosunków ilościowych badanych składników olejku. Zanotowano słabo wyrażoną tendencję do wzrostu zawartości α -pinenu i kamfenu w okresie intensywnego wzrostu roślin (kwiecień, maj), co można zauważyć w tabeli nr 28.

W celu graficznego przedstawienia maksymalnych i minimalnych względnych zawartości analizowanych związków w odniesieniu do poszczególnych osobników posłużono się metodą stosowaną w badaniach ekologicznych, pozwalającą na łatwe stwierdzenie, czy zebrane dane wykazują charakter uporządkowanych zmian okresowych [Remmert, 1985].

W tabeli nr 28, w kolumnach odpowiadających poszczególnym miesiącom, wpisano numery osobników, u których zawartość odpowiedniego składnika olejku osiągała wartość najwyższą (wpisy wyróżnione kolorem czerwonym) jak również wartość najniższą (wpisy wyróżnione kolorem niebieskim).

Tabela nr 28 Zbiornicze zestawienie występowania najwyższych zawartości (kolor czerwony) i najniższych zawartości (kolor niebieski) wybranych związków monoterpenowych u poszczególnych osobników na przestrzeni okresu badawczego.

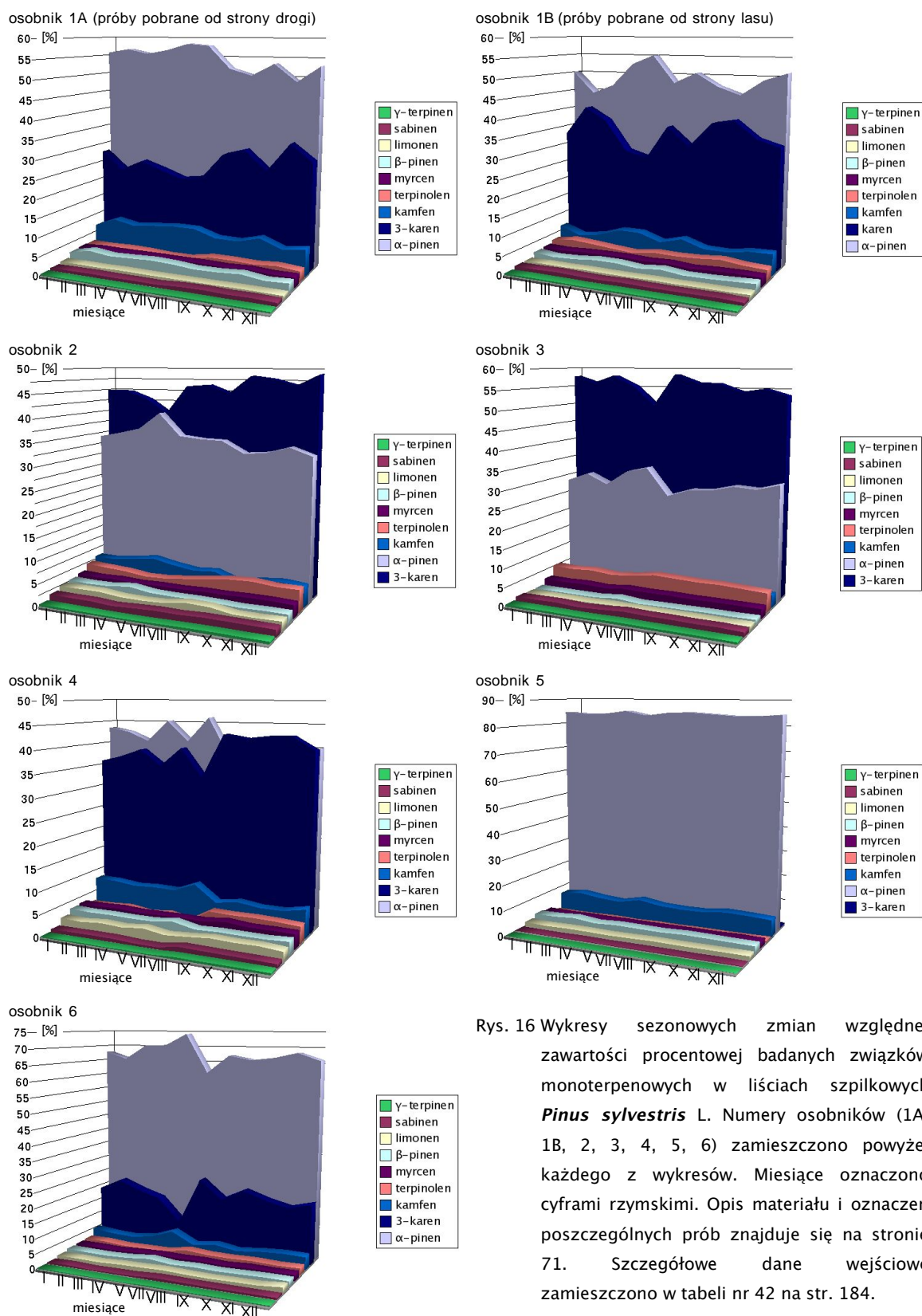
	I	II	III	IV	V	VII	VIII	IX	X	XI	XII
α -pinen				2 5	1A 1B 3 6	4 3 6		2 4	1B	1A	
kamfen		1B		2 5	1A 1B 3 5 6	4 3	4	2 6		1A	
sabinen	1A		1B 6	2 3		3 6 4	4	1A 2			1B
β -pinen		1A 1B	5	1B 2 5	3 6	4 3		6	2	1A 4	
myrcen	2		5 1A 6	2 3	1B 3 6			4 1B	1A		4 5
3-karen				2	1A 1B 3 6	3 6	4		1B	1A 4	2
limonen	5 1A		6	1A 3	3 4 5	4	2	1B		2	1B 6
γ -terpinen		1B		3 4	1B 2 6	3 6 1A	4	2		1A	
terpinolen		1B 3	6	2	1A 1B	3 6 4	4		2	1A	

Dominującymi składnikami monoterpenowymi w analizowanym materiale zgodnie ze źródłami literaturowymi okazały się α -pinen i 3-karen [Weissmann i Lange, 1990]. Większe różnice zaobserwowano w proporcjach pomiędzy składnikami olejków w przypadku porównań poszczególnych osobników (duża zmienność osobnicza) co zostało przedstawione w zestawieniu zamieszczonym w tabeli nr 29.

Tabela nr 29 Zakresy zawartości głównych składników frakcji monoterpenowej uzyskane w wyniku sezonowych badań składu sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). Tabela obejmuje średnie wartości udziału procentowego głównych składników monoterpenowych w odniesieniu do poszczególnych osobników ustalone na podstawie comiesięcznych analiz składu prowadzonych przez okres roku (metodyka – str.78). W zestawieniu uwzględniono pary osobników – o najwyższej i najniższej średniej względnej zawartości procentowej danego monoterpenu.

Składnik monoterpenowy	Zawartość maksymalna(%) [odchylenie standardowe]/osobnik	Zawartość minimalna(%) [odchylenie standardowe]/osobnik
α -pinen	84,43[\pm 0,54] / osobnik nr 5	29,5[\pm 2,09] / osobnik nr 3
3-karen	55,51[\pm 2,40] / osobnik nr 3	0,15[\pm 0,07] / osobnik nr 5
kamfen	7,99[\pm 1,02] / osobnik nr 1A	2,73[\pm 0,56] / osobnik nr 3
terpinolen	5,38[\pm 0,46] / osobnik nr 3	0,63[\pm 0,11] / osobnik nr 5
myrcen	3,52[\pm 0,16] / osobnik nr 4	2,10[\pm 0,17] / osobnik nr 6
β -pinen	3,24[\pm 0,24] / osobnik nr 5	1,13[\pm 0,18] / osobnik nr 3
limonen	2,25[\pm 0,35] / osobnik nr 2	1,08[\pm 0,04] / osobnik nr 1B

Wśród niewielkich fluktuacji względnej zawartości procentowej analizowanych monoterpenów podczas okresu badawczego daje się zauważyć pewną prawidłowość polegającą na wzajemnym powiązaniu zmian stężeń 3-karenu i α -pinenu. W okresach spadku zawartości pierwszego z nich, zawartość drugiego wzrasta i odwrotnie. Zależność tę można zaobserwować na wykresach (rys. nr 16).



Rys. 16 Wykresy sezonowych zmian względnej zawartości procentowej badanych związków monoterpenowych w liściach szpilkowych *Pinus sylvestris* L. Numery osobników (1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 6) zamieszczono powyżej każdego z wykresów. Miesiące oznaczono cyframi rzymskimi. Opis materiału i oznaczeń poszczególnych prób znajduje się na stronie 71. Szczegółowe dane wejściowe zamieszczono w tabeli nr 42 na str. 184.

Podobne obserwacje można poczynić w odniesieniu do pozostałych, mających mniejszy udział procentowy, składników monoterpenowych (np. zmiany zawartości

tepinolenu wydają się być sprzężone ze zmianami względnej zawartości procentowej karenu, a wahania zawartości kamfenu odzwierciedlają zmiany w udziale procentowym α -pinenu). Jednak w przypadku składników monoterpenowych stanowiących względnie niewielką część frakcji monoterpenowej korelacja taka jest mniej widoczna.

Stwierdzono także niewielkie różnice w zawartości badanych składników olejku pomiędzy materiałem pochodzącym z różnych części korony tego samego osobnika wzrastających w różnych warunkach oświetleniowych i temperaturowych (tabela nr 30 na stronie 127).

Tabela nr 30 Różnice we średniej względnej zawartości procentowej poszczególnych związków monoterpenowych zawartych w liściach szpilkowych pochodzących z różnych części korony osobnika nr 1. Wartości średnie obliczono na podstawie comiesięcznych analiz składu prowadzonych przez okres roku (metodyka – str.78). W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

Składnik olejku	1A (część korony lepiej oświetlona) [%]	1B (część korony rosnąca w zwarciu z innymi drzewami) [%]
α -pinen	54,39 _[±3,13]	49,02 _[±3,29]
3-karen	26,56 _[±3,80]	34,34 _[±4,17]
kamfen	7,99 _[±1,02]	5,83 _[±0,99]
β -pinen	2,97 _[±0,41]	2,16 _[±0,30]
myrcen	2,85 _[±0,13]	2,58 _[±0,16]
terpinolen	2,79 _[±0,44]	3,52 _[±0,42]
sabinen	0,90 _[±0,18]	0,96 _[±0,10]
limonen	1,12 _[±0,04]	1,08 _[±0,04]

2.1.2 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych

Analizom chiralnym poddano próby liści szpilkowych trzech wybranych osobników sosny zwyczajnej zbierane w regularnych comiesięcznych odstępach czasu od stycznia 2003 do grudnia 2003 roku (1 rok).

W wyniku badań stwierdzono jedynie niewielkie różnice sezonowe dotyczące zmian stosunków ilościowych badanych form enancjomerycznych składników olejku. W przypadku dominującego składnika olejku gatunku *Pinus sylvestris* L. – α -pinenu, zawartość formy [+] była około 3 razy wyższa od zawartości formy [-]. Proporcje te utrzymywały się z małymi odchyleniami u wszystkich badanych osobników przez cały okres badań. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku form enancjomerycznych β -pinenu oraz limonenu w materiale pochodzącym z gatunku *Pinus sylvestris* L. Stosunek pomiędzy formami enancjomerycznymi tych monoterpenów utrzymywał się na zbliżonym

poziomie przez cały okres prowadzenia badań (dane dotyczące wyników analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych zamieszczono w tabeli nr 42 na str.184).

2.2 Dyskusja

Wyniki przeprowadzonych analiz sugerują niewielką zmienność sezonową w odniesieniu do poszczególnych składników frakcji monoterpenowej u gatunku *Pinus sylvestris* L. Świadczą o tym stosunkowo niskie wartości odchylenia standardowego, które można zaobserwować analizując dane w tabeli nr 29. Zauważalne wahania zawartości względnej badanych związków nie wydają się wykazywać kierunkowości i zachodzą niezależnie u wszystkich badanych osobników. Pewne prawidłowości dotyczą jedynie α -pinenu i kamfenu, które w większości poddanych badaniom roślin osiągają maksymalny udział we frakcji monoterpenowej w okresie najintensywniejszego wzrostu (kwiecień i maj) jednak nie są to zmiany znaczące (szczegółowe dane dotyczące wyników analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych zamieszczono w tabeli nr 42 na str.184). O wiele wyraźniej zaznacza się osobnicza zmienność składu frakcji monoterpenowej, co widać w zestawieniu w tabeli nr 29. Zawartości względne poszczególnych monoterpenów przyjmują często graniczne wartości w przypadku osobnika nr 5, co w połączeniu ze znacznymi różnicami w składzie frakcji monoterpenowej (np. bardzo niski udział 3-karenu) świadczy, że osobnik ten może należeć do innego chemotypu [Weissmann i Lange, 1990]. W toku chromatograficznych analiz w warunkach chiralnych także nie stwierdzono znacznych zmian w stosunkach pomiędzy formami enancjomerycznymi.

Przeprowadzone w ramach innego projektu realizowanego w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej badania zmienności sezonowej w odniesieniu do jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) przyniosły podobne wyniki. U obydwu analizowanych gatunków nie wykazano wyraźnych kierunkowych zmian we względnej zawartości procentowej składników frakcji monoterpenowej. Obserwowane fluktuacje są indywidualne i prawdopodobnie związane z czynnikami środowiskowymi (np.: nasłonecznieniem, mikroklimatem, patogenami). W świetle uzyskanych wyników sezon wegetacji, podczas którego zbierany jest materiał badawczy ma niewielki wpływ na

jego skład chemiczny, co oznacza, że materiał zbierany podczas różnych okresów wegetacyjnych może być traktowany jako w przybliżeniu jednorodny. Względna stałość składu chemicznego podczas całego okresu wegetacyjnego świadczy, że w przypadku roślin szpilkowych kolejne fazy cyklu życiowego oraz aktywności fizjologicznej nie łączą się bezpośrednio ze zmianami dotyczącymi biosyntezy poszczególnych związków monoterpenowych. Obserwacje różnic w składzie frakcji monoterpenowej w przypadku materiału pobieranego z rosnących w różnych warunkach oświetleniowo - termicznych części korony pojedynczego drzewa skłaniają raczej do wniosku, iż to lokalne warunki mikroklimatyczne i ich zmiany mają największy wpływ na względne proporcje badanych monoterpenów. Potwierdzają to także dostępne źródła literaturowe [Llusia i Penuelas, 2000] [Banhorpe i Njar, 1984] [Kainulainen i in., 2000].

3 Badanie osobniczej zmienności składu frakcji monoterpenowej wybranych gatunków roślin szpilkowych

W bieżącym rozdziale opisano wyniki analizy osobniczej zmienności składu związków monoterpenowych stwierdzone na podstawie danych uzyskanych z przeprowadzonych analiz chromatograficznych materiału pochodzącego z sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) oraz jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.). Do uzyskania przedstawionych danych posłużył materiał wykorzystany w toku realizacji głównego celu pracy. Jego charakterystykę oraz metodykę zbioru i przechowywania zamieszczono na stronach 72 i 81 (*Juniperus communis* L.) oraz 75 i 79 (*Pinus sylvestris* L.). Otrzymane w wyniku analiz chromatograficznych dane wejściowe zamieszczono w dodatku A (str. 187 i 192). Pomocny może okazać się także schemat struktury pracy zamieszczony na stronie 66.

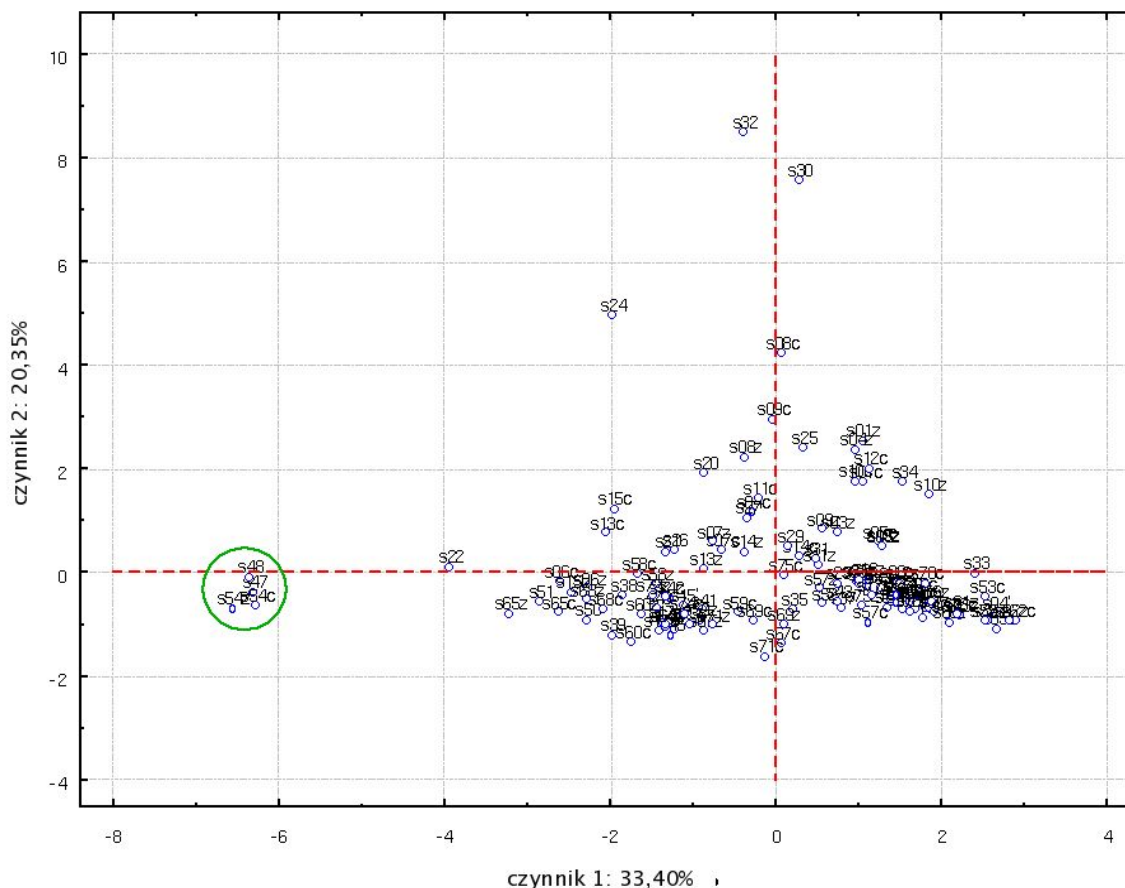
3.1 Osobnicza zmienność składu chemicznego sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na przykładzie analizy związków monoterpenowych

Badania surowców olejkowych, a do takich należą rośliny szpilkowe, wykazują dużą zmienność osobniczą w obrębie jednego gatunku. Znaczna, potwierdzona przez wielu autorów, osobnicza zmienność składu chemicznego sosny zwyczajnej jest czynnikiem utrudniającym poszukiwania korelacji pomiędzy składem chemicznym rośliny nie zaatakowanej, a rośliny z oznakami żerowaniem owadów. Prowadzone badania objęły znaczną liczbę roślin, w stosunku do których przeprowadzono zarówno analizy achiralne jak i chiralne związków monoterpenowych. Pozwoliło to na przedstawienie składu frakcji monoterpenowej z uwzględnieniem enancjomerów tych związków.

3.1.1 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych

Uzyskane wyniki analiz w warunkach achiralnych są zgodne z podawanym w literaturze składem frakcji monoterpenowej stwierdzanym u gatunku *Pinus sylvestris* L. [Yazdani i in., 1982] [Yazdani i in., 1985] [Yazdani i Nillson, 1986] [Chalchat i in., 1986] [Sjödin i in., 1993] [Weissmann i Lange, 1990]. Dominującymi składnikami frakcji monoterpenowej są 3-karen oraz α -pinen. W wyniku badań zanotowano znaczne wahania względnej

zawartości wymienionych związków monoterpenu. Wynikają one z dużej zmienności osobniczej dotyczącej składu chemicznego występującej u badanego gatunku. W celu oceny zróżnicowania badanych prób przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA).



Rys. 17 Wykres rozrzutu obrazujący wyniki analizy głównych składowych w odniesieniu do wszystkich próbek pobranych z sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) (n=127) stworzony na podstawie względnych zawartości składników monoterpenu. Jak można zauważyć próby charakteryzujące się niską zawartością 3-karenu (chemotyp „nisko-karenowy” – próby: s47, s48, s54c i s54z) stanowią wyraźnie wydzieloną grupę (zakreślono ją okręgiem). Opis materiału i oznaczeń poszczególnych próbek znajduje się na stronie 75. Szczegółowe dane wejściowe zamieszczono w tabeli nr 43 na str. 188.

Zgodnie z wykresem rozrzutu (rys. nr 17) uzyskanym w wyniku analizy PCA wśród badanych próbek można wyodrębnić stosunkowo nieliczną grupę trzech osobników charakteryzujących się drastycznie małą zawartością 3-karenu. Osobniki te charakteryzują się ponadto zwiększoną względną zawartością procentową α -pinenu (od 29 do 51%) oraz myrcenu (od 15 do 61%).

Wyróżnione próby „nisko-karenowe” (rys. 17) potwierdzają występowanie dwóch chemotypów karenowych w przypadku gatunku *Pinus sylvestris* L. Dotychczasowe badania wskazują na dominację chemotypu „wysoko-karenowego” w naszej strefie geograficznej. Na północy Europy, w Finlandii i Szwecji stwierdzono jednak występowanie obu chemotypów, (północ - chemotyp „wysoko-karenowy”, południe - chemotyp „nisko-karenowy”). Badania prowadzone na terenie Szwecji wykazały obecność chemotypu „wysoko-karenowego” w większości badanych populacji [Yazdani i in., 1985] [Sjödín i in., 1993] [Sjödín i in., 1996].

Na podstawie szczegółowych danych w tabeli nr 43 na stronie 188 stworzono zestawienie zamieszczone w tabeli nr 31. W przypadku każdego z badanych związków podano zarówno średnią zawartość jak i medianę.

Tabela nr 31 Podstawowe składniki monoterpenowe stwierdzone w młodych pędach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) (n=24) i ich względna zawartość procentowa (w zestawieniu uwzględniono jedynie materiał pochodzący z roślin nie opanowanych przez mszyce, przy czym materiał ten nie był poddawany suszeniu, lecz zamrażany natychmiast po zbiorze i w stanie zamrożenia przechowywany do czasu analizy). W zestawieniu nie uwzględniono chemotypu „nisko-karenowego” (osobniki s47 i s 48) ze względu na odmienny skład chemiczny. W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

składnik monoterpenowy	średnia zawartość [%]	mediana [%]	wartości skrajne [%]
α -pinen	15,34 [\pm 5,45]	14,63	4,52–29,12
kamfen	1,36 [\pm 0,45]	1,31	0,73–2,21
β -pinen + sabinen	5,27 [\pm 3,52]	3,81	2,77–16,33
myrcen	7,21 [\pm 6,92]	3,23	2,76–24,61
α -felandren	0,05 [\pm 0,03]	0,05	0–0,13
3-karen	56,42 [\pm 13,34]	63,23	33,75–73,67
limonen	5,75 [\pm 6,79]	2,37	1,27–24,56
γ -terpinen	0,76 [\pm 0,23]	0,79	0,01–1,06
terpinolen	7,78 [\pm 1,72]	7,94	4,67–10,56
terpinen-4-ol	0,06 [\pm 0,02]	0,07	0,03–0,11

3.1.2 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych

Możliwości analityczne i wprowadzenie faz chiralnych do rozdzielaczy chromatograficznych pozwoliło na badania zawartości enancjomerów chiralnych związków terenowych. Potwierdzono, występowanie w przypadku gatunku *Pinus sylvestris* L. 3-karenu jako (+)-3-karen [Sjödín i in., 1993] [Sjödín i in., 1996] [Ochocka i in., 2002].

Skład enancjomeryczny węglowodorów terpenowych sosny zwyczajnej wskazywał na występowanie obu enancjomerów α -pinenu, β -pinenu, limonenu i kamfenu [Wibe i in., 1998] [Asztemborska i Ochocka, 2002]. Wszystkie prace wskazują na bardzo dużą różnorodność w występowaniu poszczególnych enancjomerów. Mimo licznych badań szlak biosyntezy związków monoterpenowych z uwzględnieniem biosyntezy stereospecyficznej ciągle nie jest dobrze poznany. „Klasyczny” szlak biosyntezy monoterpenów zachodzący w plastydach [Ruzicka, 1954] został obecnie uzupełniony przez tzw. „szlak Rohmera” zachodzący w cytozolu [Rohmer, 1999]

Prowadzone w toku niniejszej pracy systematyczne badania poszerzają wiedzę na temat zawartości chiralnych węglowodorów terpenowych w sośnie zwyczajnej. Analizy chiralne młodych pędów sosnowych dowodzą występowania obydwu enancjomerów w przypadku α -pinenu, β -pinenu oraz limonenu. Wzajemne proporcje pomiędzy formami enancjomerycznymi wskazywały na znaczną zmienność osobniczą. Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli nr 43 na str. 188. Na ich podstawie otrzymano zestawienie zamieszczone w tabeli nr 32. Jak można zauważyć w przypadku α -pinenu wśród badanych osobników *Pinus sylvestris* L. dominowały formy [+]. W przypadku limonenu oraz β -pinenu stwierdzono tendencję odwrotną - dominującą formą enancjomeryczną była forma [-]. O ile w przypadku α -pinenu oraz β -pinenu stwierdzono znaczną zmienność osobniczą dotyczącą proporcji form enancjomerycznych, o tyle w przypadku limonenu stosunek proporcji form enancjomerycznych nie ulegał relatywnie dużym zmianom. Nie zaobserwowano też wyraźnych różnic we wzajemnych proporcjach enancjomerów przy porównywaniu roślin o typowym składzie frakcji monoterpenowej oraz osobników należących do chemotypu „nisko-karenowego”. Szczegółowych dane wejściowe zamieszczono w tabeli nr 43 na stronie 188. Na jej podstawie stworzono zestawienie w tabeli nr 32.

Tabela nr 32 Wzajemne proporcje procentowe form enancjomerycznych α -pinenu, β -pinenu i limonenu zaobserwowane wśród poddanych badaniom osobników sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) (n=26) (w zestawieniu uwzględniono jedynie osobniki nie wykazujące oznak żerowania mszyc, z których materiał nie był poddawany suszeniu lecz zamrażany natychmiast po zbiorze). W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

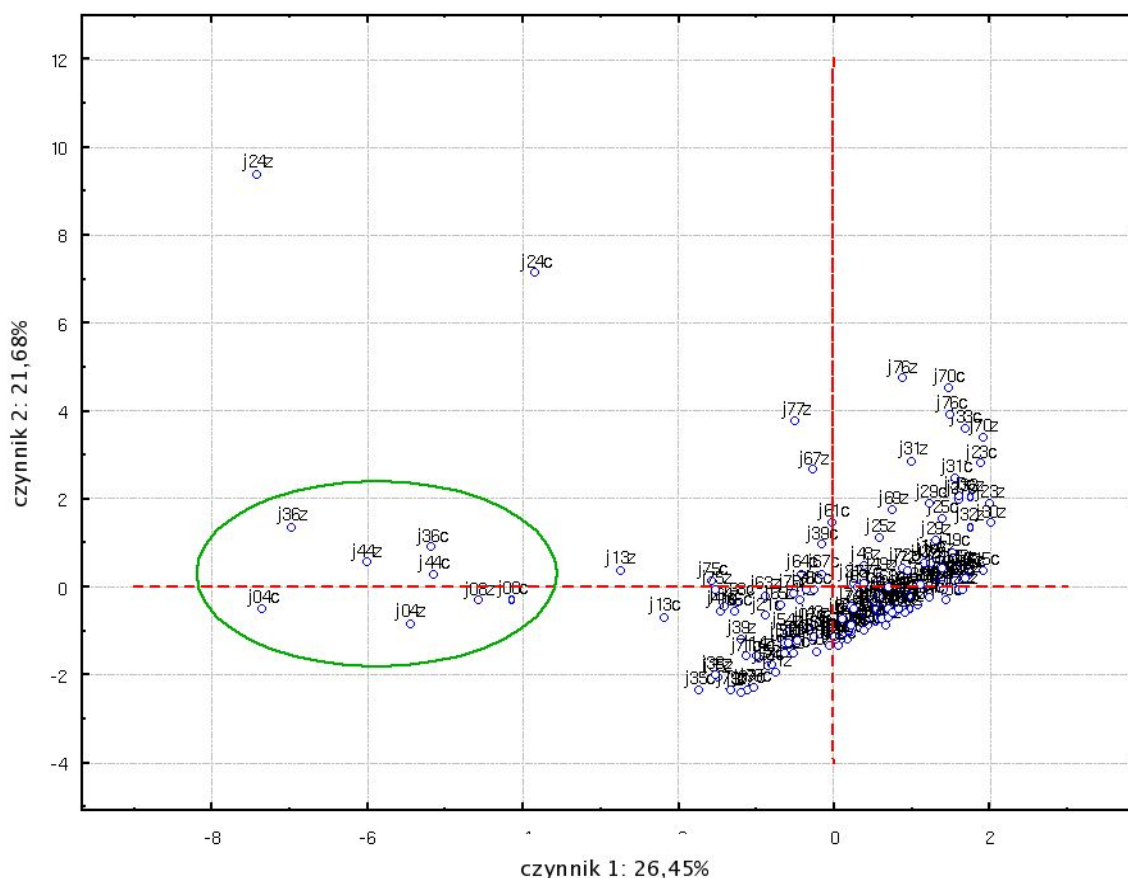
	skrajne proporcje form enancjomerycznych [-]/[+]	średnie proporcje form enancjomerycznych [-]/[+]	mediany proporcji form enancjomerycznych [-]/[+]
α -pinen	10/90 - 70/30	29,1 _[±16,11] / 70,9 _[±16,11]	25,81 / 74,19
β -pinen	65/35 - 100/0	87,42 _[±9,44] / 12,58 _[±9,44]	89,36 / 10,64
limonen	76/24 - 97/3	92,34 _[±4,77] / 7,66 _[±4,77]	92,93 / 7,07

3.2 Osobnicza zmienność składu chemicznego jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) na przykładzie analizy związków monoterpenu

Podobnie jak w przypadku sosny, jałowiec pospolity charakteryzuje się dużą zmiennością osobniczą w aspekcie biosyntezy związków monoterpenu [Sybilska i in., 1994] [Ochocka i in., 1997] [Asztemborska i Ochocka, 2002] [Filipowicz i in., 2003]. Prowadzone badania objęły znaczną liczbę roślin, w stosunku do których przeprowadzono zarówno analizy achiralne jak i chiralne związków monoterpenu. Pozwoliło to na sformułowanie pewnych wniosków dotyczących składu oraz proporcji pomiędzy formami enancjomerycznymi tych związków w badanych roślinach.

3.2.1 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych

W wyniku przeprowadzonych analiz achiralnych związków monoterpenu stwierdzono znaczne różnice osobnicze dotyczące składu frakcji monoterpenu szyszkojałóg jałowca. Zgodnie z dostępną literaturą dominującymi składnikami okazały się α -pinen, oraz myrcen [Sybilska i in., 1994] [Ochocka i in., 1997] [Koukos i Papadopoulou, 1997] [Vernin i in., 1998]. W celu oceny zróżnicowania badanych prób przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA). Jako dane wejściowe posłużyły względne zawartości składników monoterpenu zamieszczone w tabeli nr 44 na str. 193.



Rys. 18 Wykres rozrzutu obrazujący wyniki analizy głównych składowych wszystkich prób pobranych z jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) (n=158) stworzony na podstawie względnych zawartości składników monoterpenu. Próby charakteryzujące się wysoką zawartością sabinenu (chemotyp sabinenowy) stanowią wydzieloną grupę (zakreślone). Opis materiału i oznaczeń poszczególnych prób znajduje się na stronie 75. Szczegółowe dane wejściowe zamieszczono w tabeli nr 44 na str. 193.

Obok roślin o typowym składzie chemicznym tworzących na rys. nr 18 najliczniejszą grupę, wyodrębnić można także próby wykazujące podwyższoną zawartość sabinenu (zaznaczone na wykresie zielonym okręgiem). Próby oznaczone j13c i j13z wykazują podwyższoną zawartość sabinenu (ok. 20%). Ilość ta jest jednak nieco mniejsza niż w próbach zakreślonych zielonym okręgiem, co sprawia, że klasyfikują się one pośrednio. Próby j24c oraz j24z charakteryzują się wyższą zawartością limonenu, terpinen-4-olu, γ -terpinenu oraz para-cymenu i α -terpinenu. Mimo, iż składniki te mają stosunkowo niewielki udział we frakcji monoterpenu jałowca, kumulacja tych różnic spowodowała wyraźne wydzielenie tych prób na wykresie. Szczegółowe zestawienie

danych obejmujące próby charakteryzujące się typowym składem frakcji monoterpenowej zaprezentowano w tabeli nr 33. Do jego stworzenia wykorzystano dane wejściowe zamieszczone w tabeli nr 44 na stronie 193.

Tabela nr 33 Podstawowe składniki monoterpenowe stwierdzone w szyszkogodach jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) (n=43) i ich względna zawartość procentowa (w zestawieniu uwzględniono jedynie szyszkogody nie wykazujące oznak żerowania znamionka jałowcowego, przy czym szyszkogody te nie były poddawane suszeniu, lecz zamrażane natychmiast po zbiorze). W zestawieniu nie uwzględniono osobników o podwyższonej zawartości sabinenu (chemotyp sabinenowy). Opis materiału i oznaczeń poszczególnych prób znajduje się na stronie 75. Szczegółowe dane wejściowe zamieszczono w tabeli nr 44 na str. 193. W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

składnik monoterpenowy	średnia zawartość [%]	mediana [%]	wartości skrajne [%]
α -pinen	65,04 [$\pm 11,95$]	65,44	37,78–81,28
kamfen	1,72 [$\pm 2,61$]	0,55	0,24–12,43
β -pinen	2,21 [$\pm 0,79$]	2,13	1,13–4,45
sabinen	1,03 [± 2]	0,27	0–8,17
myrcen	24,77 [$\pm 12,91$]	22,54	4,67–56,31
α -felandren	0,11 [$\pm 0,24$]	0,05	0,01–1,2
3-karen	0,81 [$\pm 1,92$]	0,05	0,02–8,49
para-cymen + α -terpinen	0,2 [$\pm 0,27$]	0,11	0,03–1,6
limonen	2,91 [$\pm 2,35$]	2,33	0,74–11,8
γ -terpinen	0,06 [$\pm 0,07$]	0,03	0–0,3
terpinolen	0,61 [$\pm 0,22$]	0,63	0,22–1,33
terpinen-4-ol	0,53 [$\pm 0,92$]	0,21	0,02–5,54

Próby charakteryzujące się podwyższonym udziałem sabinenu we frakcji monoterpenowej (17–30%) odznaczają się także obniżoną zawartością α -pinenu (42–58%). Szczegółowe dane zamieszczono w tabeli nr 44 na stronie 193.

3.2.2 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych

W wyniku przeprowadzenia analiz chiralnych szyszkogód jałowca pospolitego stwierdzono występowanie obydwu form enancjomerycznych w przypadku α -pinenu, β -pinenu oraz limonenu. Wzajemne proporcje pomiędzy formami enancjomerycznymi wykazywały znaczną zmienność osobniczą. Zestawienie wyników analiz zamieszczono w tabeli nr 34.

Tabela nr 34 Wzajemne proporcje form enancjomerycznych α -pinenu, β -pinenu i limonenu zaobserwowane wśród poddanych badaniom osobników jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) (n=44). (w zestawieniu uwzględniono jedynie materiał nie wykazujący oznak żerowania znamionka, przechowywany w stanie zamrożenia od momentu zbioru). Opis materiału i oznaczeń poszczególnych prób znajduje się na stronie 75. Szczegółowe dane wejściowe zamieszczono w tabeli nr 44 na str. 193. W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

	skrajne proporcje form enancjomerycznych [%] [-]/[+]	średnie proporcje form enancjomerycznych [%] [-]/[+]	mediany proporcji form enancjomerycznych [%] [-]/[+]
α -pinen	9/91 - 98/2	35,32_[±19,08] / 64,68_[±19,08]	32,83 / 67,18
β -pinen	43/57 - 99/1	75,77_[±14,11] / 24,23_[±14,11]	78,76 / 21,24
limonen	5/95 - 65/35	39,03_[±16,15] / 60,97_[±16,15]	42,12 / 57,88

Zestawione w tabeli nr 34 dane wskazują na występowanie badanych enancjomerów w bardzo skrajnych zawartościach. Bardzo charakterystyczne jest wyodrębnienie prób nr 24, na rys. 18, które w odróżnieniu od pozostałych charakteryzują się wyższą zawartością (-) enancjomeru α -pinenu [Ochocka i in., 2002] [Asztemborska i Ochocka, 2002].

3.3 Dyskusja

Otrzymane w wyniku przeprowadzonych badań wyniki świadczą, iż w przypadku obydwu analizowanych gatunków roślin szpilkowych występuje znaczna osobnicza zmienności składu chemicznego. Potwierdzają to dostępne źródła literaturowe [Ochocka i in., 1997] [Sybilska i in., 1994] [Vernin i in., 1998] [Koukos i Papadopoulou, 1997] [Angioni i in., 2003.] [Weissmann i Lange, 1990]. Występowanie chemotypów może wynikać ze strategii obrony przed zwierzętami roślinożernymi (np. owadami) – zagadnienie to zostało szerzej omówione w dyskusji dotyczącej wyników badań nad zmianami składu chemicznego pod wpływem żerowania owadów.

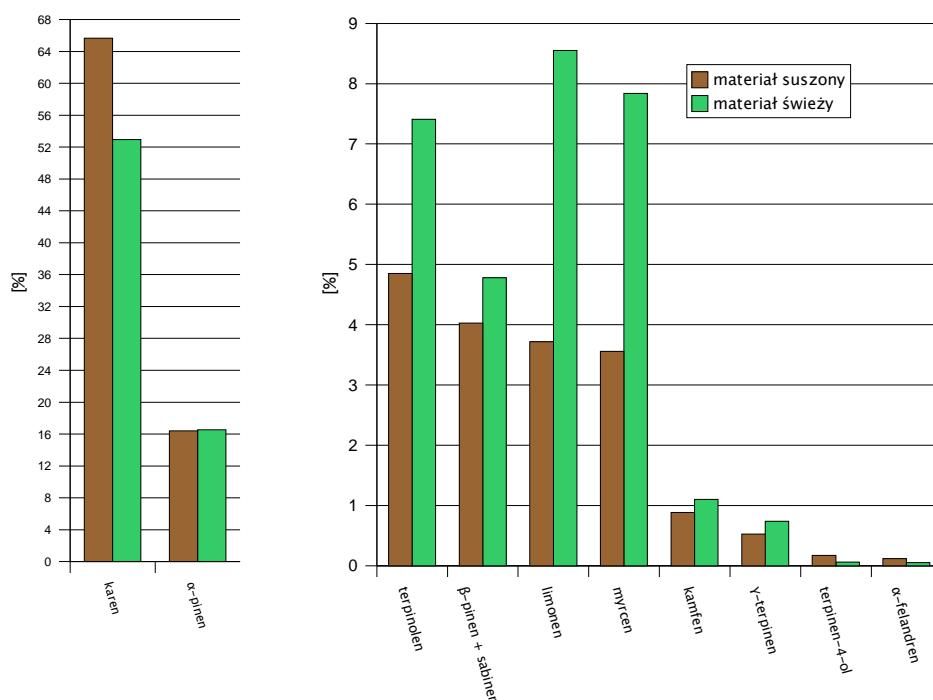
4 Badanie wpływu suszenia i długotrwałego przechowywania na skład chemiczny frakcji monoterpenowej surowca leczniczego pozyskiwanego z sosny zwyczajnej i jałowca pospolitego

W bieżącym rozdziale opisano wyniki badań porównawczych względnych zawartości procentowych składników monoterpenowych w surowcu przechowywanym od czasu zbioru w stanie zamrożenia oraz w surowcu podanym suszeniu i długotrwałemu przechowywaniu w temperaturze pokojowej. Badania dotyczyły surowców pozyskiwanych z jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) oraz sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). Do wykonania analiz porównawczych posłużyły dane uzyskane z analiz chromatograficznych wykonanych w ramach realizacji głównego celu pracy. Jego charakterystykę oraz metodykę zbioru i przechowywania zamieszczono na stronach 72 i 81 (*Juniperus communis* L.) oraz 75 i 79 (*Pinus sylvestris* L.). Otrzymane w wyniku analiz chromatograficznych dane wejściowe zamieszczono w dodatku A (str. 187 i 192). Pomocny może okazać się także schemat struktury pracy zamieszczony na stronie 66.

4.1 Wyniki badania zmian składu chemicznego frakcji monoterpenowej młodych pędów sosny zwyczajnej spowodowanych suszeniem i długotrwałym przechowywaniem

4.1.1 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych

W wyniku porównania względnych zawartości badanych związków monoterpenowych w materiale zamrażanym bezpośrednio po zbiorze oraz w materiale poddanym suszeniu i przechowywanym w temperaturze pokojowej przez rok, stwierdzono raczej niewielkie, ale dostrzegalne różnice w zawartości niektórych analizowanych związków. Największe zmiany dotyczyły 3-karenu, limonenu oraz myrcenu. Szczegółowe wyniki obliczeń zamieszczono w tabeli nr 37 na stronie 148. Wyższą względną zawartość 3-karenu stwierdzono w materiale poddanym suszeniu i przechowywaniu w temperaturze pokojowej przez rok. Jednocześnie materiał ten charakteryzował się niższą względną zawartością limonenu i myrcenu.



Rys. 19 Wykres obrazujący różnice we względnych zawartościach analizowanych monoterpenuw w młodych pędach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w zależności od sposobu przechowywania materiału. Opis materiału i sposobu jego przechowywania znajduje się na stronie 75. Szczegółowe dane wejściowe zamieszczono w tabeli nr 43 na str. 188.

4.1.2 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych

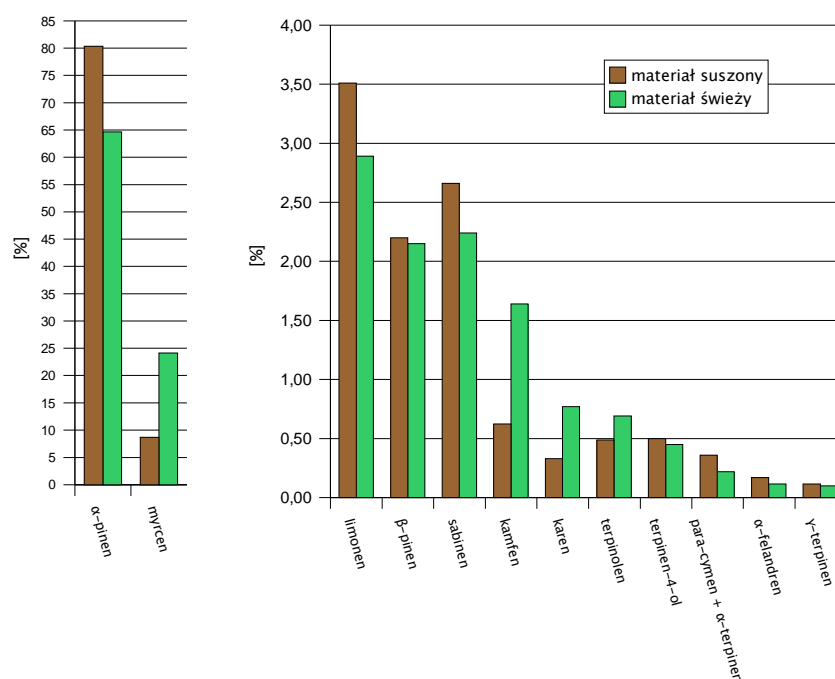
Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych nie wykazały znaczących różnic w proporcjach pomiędzy formami enancjomerycznymi badanych związków pod wpływem suszenia i długotrwałego przechowywania. Zestawienie średnich proporcji enancjomerów α -pinenu, β -pinenu oraz limonenu zamieszczono w tabeli nr 38 na stronie 150.

4.2 Wyniki badania zmian składu chemicznego frakcji monoterpenuwej szyszkojagód jałowca spowodowanych suszeniem i długotrwałym przechowywaniem

4.2.1 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych

W wyniku przeprowadzonych analiz porównawczych **stwierdzono wpływ długotrwałego przechowywania na względną zawartość składników monoterpenuwych**. Kontrolę stanowił w tym przypadku materiał poddany zamrożeniu

bezpośrednio po zbiorze i w takim stanie przechowywany do czasu analizy. W próbkach surowca poddanego długotrwałemu przechowywaniu w temperaturze pokojowej można zaobserwować wzrost względnej zawartości procentowej α -pinenu połączony ze spadkiem zawartości myrcenu. Względne zawartości procentowe pozostałych składników frakcji monoterpenowej ulegają zmianom w mniejszym zakresie, aczkolwiek także w wypadku innych analizowanych monoterpenu można zauważyć pewne zależności (np. niewielki spadek zawartości kamfenu w przypadku próbek poddanych długotrwałemu przechowywaniu w temperaturze pokojowej). Zestawienie średnich względnych zawartości procentowych badanych monoterpenu zamieszczono w tabeli nr 40 na stronie 153.



Rys. 20 Wykres obrazujący różnice we względnych zawartościach analizowanych monoterpenu w szyszkogodach jałowca (*Juniperus communis* L.) w zależności od sposobu przechowywania materiału. Opis materiału i sposobu jego przechowywania znajduje się na stronie 72. Szczegółowe dane wejściowe zamieszczono w tabeli nr 44 na str. 193.

4.2.2 Wyniki analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych

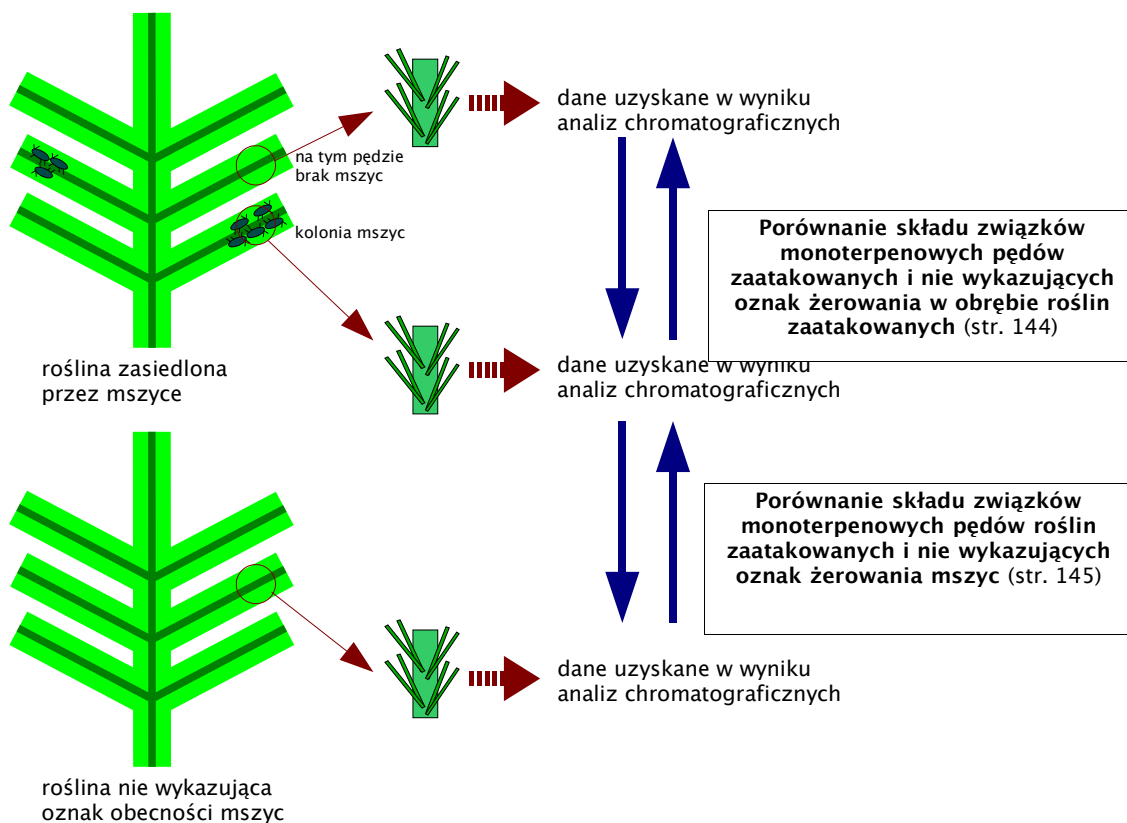
W przypadku analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych nie stwierdzono istotnego wpływu suszenia i długotrwałego przechowywania surowca na proporcje pomiędzy enancjomerami badanych monoterpénów. Zestawienie średnich proporcji pomiędzy badanymi formami enancjomerycznymi zamieszczono w tabeli nr 41 na stronie 155. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje dotyczące dużej stabilności olejków w przypadku gdy znajdują się one jeszcze wewnątrz struktur olejkowych surowca roślinnego w odróżnieniu od dużych zmian jakie zachodzą podczas przechowywania wyizolowanych olejków [Langa, 2002] [Filipowicz i in., 2003].

5 Badanie wpływu żerowania wybranych gatunków owadów na skład surowca pozyskiwanego z sosny zwyczajnej i jałowca pospolitego

W bieżącym rozdziale opisano rezultaty badań nad wpływem żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) oraz miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) na skład chemiczny frakcji monoterpenowej surowca pozyskiwanego z ich roślin żywicielskich. Starano się także wskazać możliwe przyczyny wyników przeprowadzonych analiz na podstawie aktualnej wiedzy dotyczącej interakcji owad-roślina. Charakterystykę oraz metodykę zbioru i przechowywania użytego w badaniach materiału roślinnego zamieszczono na stronach 72 i 81 (*Juniperus communis* L.) oraz 75 i 79 (*Pinus sylvestris* L.). Otrzymane w wyniku analiz chromatograficznych dane wejściowe zamieszczono w dodatku A (str. 187 i 192). Pomocny może okazać się także schemat struktury pracy zamieszczony na stronie 66.

5.1 Badania wpływu żerowania mszycy miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) na związki monoterpenowe sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)

Badania składu frakcji monoterpenowej przeprowadzono zarówno porównując pędy roślin zasiedlonych przez mszyce *Cinara pini* L. do pędów roślin nie wykazujących śladów ich bytowania jak również porównując pędy zasiedlone i niezasiedlone przez mszyce pochodzące z poszczególnych roślin zaatakowanych. W tym wypadku z jednej zaatakowanej rośliny pobierano pędy zasiedlone jak i wolne od mszyc. Ogólny schemat pobierania prób oraz analizy porównawczej wyników rozdziałów chromatograficznych został zamieszczony na schemacie (rys. nr 21).



Rys. 21 Schemat obrazujący sposób pobierania próbek oraz przeprowadzania analiz porównawczych. Szczegółowy opis materiału i metodyki jego zbioru znajduje się na stronie 79.

5.1.1 Porównanie składu związków monoterpenowych pędów zaatakowanych i nie wykazujących oznak żerowania w obrębie grupy roślin zaatakowanych

Wykonane w ramach realizacji niniejszej pracy badania porównawcze organów zasiedlonych i niezasiedlonych przez mszyce miodownice sosnowe (*Cinara pini* L.) pochodzących z zaatakowanych przez mszyce osobników sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) **nie ujawniło istotnych różnic w składzie i względnych proporcjach analizowanych związków frakcji monoterpenowej**. Szczegółowe dane dotyczące porównywanych związków monoterpenowych zostały zestawione w tabeli nr 35. Dane wejściowe zostały zamieszczone w tabeli nr 43 na str. 188.

Tabela nr 35 Porównanie względnej zawartości procentowej podstawowych składników monoterpenowych stwierdzonych w młodych pędach zaatakowanych przez mszyce drzew sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) obejmujące pędy zasiedlone przez kolonie mszyc z gatunku miodownica sosnowa (*Cinara pini* L.) (n=25) oraz pędy, na których nie stwierdzono obecności mszyc (n=25) (wszystkie uwzględnione przy zestawieniu próbek nie były podawane suszeniu, lecz zamrażane natychmiast po zbiorze i w stanie zamrożenia przechowywane do czasu analizy). W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

SKŁADNIK MONOTERPENOWY		MŁODE PĘDY BEZ WIDOCZNYCH OZNAK ŻEROWANIA MSZYC (n=25)	MŁODE PĘDY ZASIEDLONE PRZEZ KOLONIE MSZYC MIODOWNIC SOSNOWYCH (<i>CINARA PINI</i> L.) (n=25)
α-pinen	średnia zawartość	16,76 [±7,19]	14,98 [±7,13]
	mediana	17,76	13,55
kamfen	średnia zawartość	1,07 [±0,46]	0,84 [±0,41]
	mediana	1,12	0,78
β-pinen + sabinen	średnia zawartość	4,42 [±2,21]	4,89 [±3,76]
	mediana	3,35	3,2
myrcen	średnia zawartość	7,04 [±12,32]	7,55 [±13,22]
	mediana	3,05	2,99
α-felandren	średnia zawartość	0,05 [±0,03]	0,06 [±0,04]
	mediana	0,05	0,06
3-karen	średnia zawartość	53,46 [±17,9]	53,34 [±18,01]
	mediana	57,55	56,95
limonen	średnia zawartość	8,83 [±9,56]	10,07 [±11,27]
	mediana	3,4	2,9
γ-terpinen	średnia zawartość	0,76 [±0,24]	0,75 [±0,24]
	mediana	0,78	0,74
terpinolen	średnia zawartość	7,55 [±2,51]	7,46 [±2,46]
	mediana	7,83	7,51
terpinen-4-ol	średnia zawartość	0,06 [±0,03]	0,06 [±0,03]
	mediana	0,05	0,05

5.1.2 Porównanie składu związków monoterpenowych pędów roślin zaatakowanych i nie wykazujących oznak żerowania mszyc

W wyniku przeprowadzonych analiz składu związków monoterpenowych roślin zaatakowanych i nie wykazujących oznak bytności i żerowania mszyc z gatunku miodownica sosnowa (*Cinara pini* L.) **nie stwierdzono kierunkowych zmian we względnej zawartości analizowanych związków monoterpenowych**. Szczegółowe wyniki w dotyczące analizowanych związków monoterpenowych zostały przedstawione w tabeli nr 36. Dane wejściowe zostały zamieszczone w tabeli nr 43 na str. 188.

Tabela nr 36 Porównanie względnej zawartości procentowej podstawowych składników monoterpenowych stwierdzonych w młodych pędach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) obejmujące pędy zasiedlone przez kolonie mszyc z gatunku miodownica sosnowa (*Cinara pini* L.) (n=25), pędy, na których nie stwierdzono obecności mszyc pobrane z roślin zaatakowanych (n=25) oraz pędy roślin całkowicie wolnych od mszyc (n=26) (wszystkie uwzględnione przy zestawieniu próbki nie były podawane suszeniu, lecz zamrażane natychmiast po zbiorze i w stanie zamrożenia przechowywane do czasu analizy). W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

SKŁADNIK MONOTERPENOWY		OSOBNIKI NIEZASIEDLONE (n=26)	OSOBNIKI ZASIEDLONE PĘDY NIEZASIEDLONE (n=25)	OSOBNIKI ZASIEDLONE PĘDY ZASIEDLONE (n=25)
α-pinen	średnia zawartość	17,79 [±10,18]	16,76 [±7,19]	14,98 [±7,13]
	mediana	15,09	17,76	13,55
kamfen	średnia zawartość	1,38 [±0,44]	1,07 [±0,46]	0,84 [±0,41]
	mediana	1,37	1,12	0,78
β-pinen + sabinen	średnia zawartość	5,01 [±3,49]	4,42 [±2,21]	4,89 [±3,76]
	mediana	3,68	3,35	3,2
myrcen	średnia zawartość	8,88 [±9,64]	7,04 [±12,32]	7,55 [±13,22]
	mediana	3,27	3,05	2,99
α-felandren	średnia zawartość	0,05 [±0,03]	0,05 [±0,03]	0,06 [±0,04]
	mediana	0,05	0,05	0,06
3-karen	średnia zawartość	52,09 [±19,95]	53,46 [±17,9]	53,42 [±18,01]
	mediana	59,1	57,55	56,95
limonen	średnia zawartość	6,82 [±8,01]	8,83 [±9,56]	10,07 [±11,27]
	mediana	2,78	3,4	2,9
γ-terpinen	średnia zawartość	0,71 [±0,29]	0,76 [±0,24]	0,75 [±0,24]
	mediana	0,76	0,78	0,74
terpinolen	średnia zawartość	7,21 [±2,59]	7,55 [±2,51]	7,25 [±2,46]
	mediana	7,58	7,83	7,51
terpinen-4-ol	średnia zawartość	0,06 [±0,02]	0,06 [±0,03]	0,06 [±0,03]
	mediana	0,06	0,05	0,05

Otrzymane wyniki znajdują dodatkowe potwierdzenie na wykresie rozrzutu obrazującym rezultaty analizy głównych składowych (PCA) - rys. nr 17 na str. 131.

5.1.3 Wpływ długotrwałego przechowywania surowca w świetle uszkodzeń wywołanych przez owady

W wyniku badań materiału uszkodzonego przez owady pod kątem długotrwałego jego przechowywania nie stwierdzono znaczących różnic w składzie w porównaniu z materiałem nieuszkodzonym. Wynik badania świadczy, iż fakt żerowania

mszyc z gatunku *Cinara pini* L. nie ma większego wpływu na skład frakcji monoterpenowej tak świeżego jak i długotrwanie przechowywanego surowca. Zestawienie średnich, względnych zawartości procentowych badanych związków w różnie przechowywanych materiałach zamieszczono w tabeli nr 37 (szczegółowe dane wejściowe zostały zamieszczone w tabeli nr 43 na str. 188). Niewielkie zmiany we względnych zawartościach niektórych monoterpenów mogą być skorelowane z faktem żerowania owadów jednak nie mają one większego znaczenia w świetle jakości surowca leczniczego ocenianej pod kątem względnych zawartości związków monoterpenowych.

Tabela nr 37 Porównanie względnej zawartości procentowej podstawowych składników monoterpenowych stwierdzonych w młodych pędach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) obejmujące surowiec zamrożony bezpośrednio po zbiorze oraz surowiec przechowywany przez rok w stanie suchym. W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

SKŁADNIK MONOTERPENOWY		SUROWIEC ZAMROŻONY BEZPOŚREDNIO PO ZBIORZE I W TAKIM STANIE PRZECHOWYWANY			SUROWIEC PRZECHOWYWANY ROK W TEMPERATURZE POKOJOWEJ, PO CZYM ZAMROŻONY		
		OSOBNIKI NIEZASIEDŁONE (n=26)	OSOBNIKI ZASIEDŁONE PĘDY NIEZASIEDŁONE (n=25)	OSOBNIKI ZASIEDŁONE PĘDY ZASIEDŁONE (n=25)	OSOBNIKI NIEZASIEDŁONE (n=15)	OSOBNIKI ZASIEDŁONE PĘDY NIEZASIEDŁONE (n=18)	OSOBNIKI ZASIEDŁONE PĘDY ZASIEDŁONE (n=18)
α-pinen	średnia zawartość	17,79 [±10,18]	16,76 [±7,19]	14,98 [±7,13]	17,96 [±11,04]	15,05 [±8,28]	16,48 [±10,4]
	mediana	15,09	17,76	13,55	15,75	10,66	12,95
kamfen	średnia zawartość	1,38 [±0,44]	1,07[±0,46]	0,84 [±0,41]	1,05 [±0,53]	0,81 [±0,37]	0,83 [±0,5]
	mediana	1,37	1,12	0,78	0,91	0,77	0,73
β-pinen + sabinen	średnia zawartość	5,01 [±3,49]	4,42 [±2,21]	4,89 [±3,76]	4,1 [±2,63]	4,2 [±2,13]	3,8 [±1,62]
	mediana	3,68	3,35	3,2	3,22	3,41	3,1
myrcen	średnia zawartość	8,88 [±9,64]	7,04 [±12,32]	7,55 [±13,22]	3,59 [±6,22]	3,8 [±4,52]	3,3 [±3,6]
	mediana	3,27	3,05	2,99	2,21	2,44	2,16
α-felandren	średnia zawartość	0,05 [±0,03]	0,05 [±0,03]	0,06 [±0,04]	0,12 [±0,16]	0,12 [±0,28]	0,13 [±0,18]
	mediana	0,05	0,05	0,06	0	0	0,08
3-karen	średnia zawartość	52,09 [±19,95]	53,46 [±17,9]	53,42 [±18,01]	66 [±13,17]	65,4 [±12,47]	65,63 [±12,76]
	mediana	59,1	57,55	56,95	69,59	69,73	70,03
limonen	średnia zawartość	6,82 [±8,01]	8,83 [±9,56]	10,07 [±11,27]	1,95 [±1,25]	4,77 [±6,79]	4,15 [±7,17]
	mediana	2,78	3,4	2,9	1,55	2,12	1,6
γ-terpinen	średnia zawartość	0,71 [±0,29]	0,76 [±0,24]	0,75 [±0,24]	0,5 [±0,33]	0,56 [±0,13]	0,5 [±0,14]
	mediana	0,76	0,78	0,74	0,48	0,58	0,48
terpinolen	średnia zawartość	7,21 [±2,59]	7,55[±2,51]	7,25 [±2,46]	4,27 [±1,94]	5,16 [±1,01]	5,01 [±1,24]
	mediana	7,58	7,83	7,51	4,59	5,33	5,03
terpinen-4-ol	średnia zawartość	0,06 [±0,02]	0,06[±0,03]	0,06 [±0,03]	0,23 [±0,18]	0,14 [±0,08]	0,16 [±0,14]
	mediana	0,06	0,05	0,05	0,16	0,11	0,11

5.1.4 Wyniki analiz chiralnych w odniesieniu do opisanych wcześniej kierunków badań

W wyniku przeprowadzonych chromatograficznych analiz chiralnych stwierdzono występowanie dwóch form enancjomerycznych w przypadku α -pinenu, β -pinenu oraz limonenu. Otrzymane wyniki dotyczące wzajemnych proporcji enancjomerów w przypadku każdego z wymienionych monoterpenu świadczą o dużej zmienności osobniczej. Jednocześnie zaobserwować można zjawisko stałości stosunku proporcji pomiędzy formami enancjomerycznymi każdego z badanych związków monoterpenu mimo działania takich czynników zewnętrznych jak żerowanie owadów. Suszenie i długotrwałe przechowywanie surowca w temperaturze pokojowej także wydaje się nie mieć wpływu na wzajemne proporcje pomiędzy enancjomerami w przechowywanym surowcu leczniczym. Szczegółowe zestawienie uzyskanych danych przedstawiono w tabeli nr 38.

Tabela nr 38 Wzajemne proporcje procentowe form enancjomerycznych α -pinenu, β -pinenu i limonenu zaobserwowane wśród poddanych badaniom osobników sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) (Zastosowane skróty oznaczają: MZ – materiał zamrożony bezpośrednio po zbiorze i w takim stanie przechowywany do czasu analizy, MS – materiał poddany suszeniu a następnie przechowywany przez rok w temperaturze pokojowej po czy zamrożony i tak przechowywany do czasu analizy). W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

		α -pinen	β -pinen	limonen
OSOBNIKI NIEZASIEDLONE (MZ) (n=26)	średnie proporcje form enancjomerycznych [-]/[+]	29,1 _[±16,11] / 70,9 _[±16,11]	87,42 _[±9,44] / 12,58 _[±9,44]	92,34 _[±4,77] / 7,66 _[±4,77]
	mediany proporcji form enancjomerycznych [-]/[+]	25,81 / 74,19	89,36 / 10,64	92,93 / 7,07
OSOBNIKI ZASIEDLONE PĘDY NIEZASIEDLONE (MZ) (n=25)	średnie proporcje form enancjomerycznych [-]/[+]	27,68 _[±19,64] / 72,32 _[±19,64]	87,16 _[±8,84] / 12,84 _[±8,84]	91,41 _[±4,77] / 8,59 _[±4,77]
	mediany proporcji form enancjomerycznych [-]/[+]	20,22 / 79,78	85,76 / 14,24	92,53 / 7,47
OSOBNIKI ZASIEDLONE PĘDY ZASIEDLONE (MZ) (n=25)	średnie proporcje form enancjomerycznych [-]/[+]	27,69 _[±17,2] / 72,31 _[±17,2]	87,59 _[±8,39] / 12,41 _[±8,39]	91,92 _[±4,51] / 8,08 _[±4,51]
	mediany proporcji form enancjomerycznych [-]/[+]	21,02 / 78,98	85,91 / 14,09	92,18 / 7,82
OSOBNIKI NIEZASIEDLONE (MS) (n=15)	średnie proporcje form enancjomerycznych [-]/[+]	29,88 _[±24,52] / 70,12 _[±24,52]	92,61 _[±9,7] / 7,27 _[±9,7]	85,85 _[±8,3] / 14,15 _[±8,3]
	mediany proporcji form enancjomerycznych [-]/[+]	21,05 / 78,95	100 / 0	86,26 / 13,74
OSOBNIKI ZASIEDLONE PĘDY NIEZASIEDLONE (MS) (n=18)	średnie proporcje form enancjomerycznych [-]/[+]	29,64 _[±21,77] / 70,36 _[±21,77]	85,35 _[±15,77] / 14,65 _[±15,77]	88,48 _[±5,82] / 11,52 _[±5,82]
	mediany proporcji form enancjomerycznych [-]/[+]	22,58 / 77,43	90,63 / 9,38	88,51 / 11,5
OSOBNIKI ZASIEDLONE PĘDY ZASIEDLONE (MS) (n=18)	średnie proporcje form enancjomerycznych [-]/[+]	30,52 _[±21,19] / 69,48 _[±21,19]	85,55 _[±18,88] / 14,45 _[±18,88]	85,62 _[±13,57] / 14,38 _[±13,57]
	mediany proporcji form enancjomerycznych [-]/[+]	24,42 / 75,59	92,53 / 7,47	88,23 / 11,78

5.2 Żerowanie owadów z gatunku znamionek jałowcowy (*Megastigmus bipunctatus* Swed.), a skład związków monoterpenowych szyszkogagód jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.)

5.2.1 Porównanie składu związków monoterpenowych szyszkogagód zaatakowanych i nie wykazujących oznak żerowania w obrębie tego samego osobnika

Wyniki przeprowadzonych analiz achiralnych składników monoterpenowych szyszkogagód jałowca pospolitego **nie wykazały istotnego wpływu uszkodzeń spowodowanym żerowaniem znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na względne proporcje badanych związków monoterpenowych w analizowanym surowcu.** Szczegółowe wyniki zamieszczono w tabeli nr 39.

Tabela nr 39 Porównanie względnej zawartości procentowej podstawowych składników monoterpenowych stwierdzonych w szyszkogagodach jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) obejmujące szyszkogagody wykazujące oznaki żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) i szyszkogagody nieuszkodzone (wszystkie uwzględnione przy zestawieniu próbki nie były podawane suszeniu, lecz zamrażane natychmiast po zbiorze i w stanie zamrożeniu przechowywane do czasu analizy). W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

SKŁADNIK MONOTERPENOWY		SZYSZKOJAGODY BEZ OZNAK ŻEROWANIA OWADÓW (n=45)	SZYSZKOJAGODY USZKODZONE PRZEZ ZNAMIONKA JAŁOWCOWEGO (n=45)
α-pinen	średnia zawartość	64,3 [±12,2]	64,95 [±11,26]
	mediana	64,71	69,14
kamfen	średnia zawartość	1,66 [±2,56]	1,61 [±2,33]
	mediana	0,52	0,55
β-pinen	średnia zawartość	2,17 [±0,79]	2,13 [±0,77]
	mediana	2,05	1,93
sabinen	średnia zawartość	2,21 [±5,92]	2,27 [±5,68]
	mediana	0,27	0,3
myrcen	średnia zawartość	24,28 [±12,88]	23,95 [±11,08]
	mediana	21,92	21,39
α-felandren	średnia zawartość	0,11 [±0,23]	0,13 [±0,36]
	mediana	0,05	0,04
3-karen	średnia zawartość	0,78 [±1,88]	0,75 [±1,96]
	mediana	0,05	0,06
para-cymen + α-terpinen	średnia zawartość	0,23 [±0,3]	0,21 [±0,26]
	mediana	0,12	0,09
limonen	średnia zawartość	2,92 [±2,3]	2,85 [±2,79]
	mediana	2,34	2,22

SKŁADNIK MONOTERPENOWY		SZYSZKOJAGODY BEZ OZNAK ŻEROWANIA OWADÓW (n=45)	SZYSZKOJAGODY USZKODZONE PRZEZ ZNAMIONKA JAŁOWCOWEGO (n=45)
γ-terpinen	średnia zawartość	0,11 [±0,26]	0,08 [±0,16]
	mediana	0,03	0,03
terpinolen	średnia zawartość	0,68 [±0,39]	0,69 [±0,32]
	mediana	0,63	0,62
terpinen-4-ol	średnia zawartość	0,54 [±0,9]	0,37 [±0,48]
	mediana	0,23	0,19

Otrzymane wyniki znajdują dodatkowe potwierdzenie na wykresie rozrzutu obrazującym rezultaty analizy głównych składowych (PCA) - rys. nr 18 na str. 135.

5.2.2 Wpływ długotrwałego przechowywania surowca w świetle uszkodzeń wywołanych przez owady

W wyniku badań wpływu uszkodzeń wywołanych żerowaniem znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na poddane długotrwałemu przechowywaniu w temperaturze pokojowej szyszkogody jałowca **nie stwierdzono istotnych różnic we względnych zawartościach procentowych analizowanych związków monoterpenowych** w stosunku do przechowywanych w identycznych warunkach szyszkogód nieuszkodzonych. Szczegółowe zestawienie wyników zamieszczono w tabeli nr 40.

Tabela nr 40 Porównanie względnej zawartości procentowej podstawowych składników monoterpenowych stwierdzonych w szyszkogodach jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) obejmujące szyszkogody wykazujące oznaki żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) i szyszkogody nieuszkodzone (w zestawieniu uwzględniono zarówno próbki przechowywane w stanie suchym przez okres roku, jak i próbki zamrażane natychmiast po zbiorze i w stanie zamrożeniu przechowywane do czasu analizy). Oznaczenia w nagłówkach kolumn:

ZDSW – szyszkogody nie wykazujące oznak żerowania owadów, poddane zamrożeniu bezpośrednio po zbiorze, przechowywane w stanie zamrożenia do czasu analizy

ZASW – szyszkogody wykazujące oznaki żerowania znamionka jałowcowego, poddane zamrożeniu bezpośrednio po zbiorze, przechowywane w stanie zamrożenia do czasu analizy

ZDSU – szyszkogody nie wykazujące oznak żerowania owadów, przechowywane w stanie suchym przez rok, po czym poddane zamrożeniu i przechowywane w stanie zamrożenia do czasu analizy

ZASU – szyszkogody wykazujące oznaki żerowania znamionka jałowcowego, przechowywane w stanie suchym przez rok, po czym poddane zamrożeniu i przechowywane w stanie zamrożenia do czasu analizy. W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

SKŁADNIK MONOTERPENOWY		ZDSW (n=45)	ZASW (n=45)	ZDSU (n=34)	ZASU (n=34)
α-pinen	średnia zawartość	64,3 [±11,81]	65,95 [±11,26]	81,05 [±12,74]	79,65 [±13,24]
	mediana	64,71	69,14	85,42	83,77
kamfen	średnia zawartość	1,66 [±2,56]	1,61 [±2,33]	0,65 [±0,41]	0,6 [±0,4]
	mediana	0,52	0,55	0,45	0,45
β-pinen	średnia zawartość	2,17 [±0,79]	2,13 [±0,77]	2,29 [±1,12]	2,12 [±1,9]
	mediana	2,05	1,93	2,14	1,01
sabinen	średnia zawartość	2,21 [±5,92]	2,27 [±5,68]	2,74 [±7,17]	2,57 [±6,69]
	mediana	0,27	0,3	0,26	0,26
myrcen	średnia zawartość	24,28 [±12,88]	23,95 [±11,08]	7,81 [±6,73]	9,57 [±8,62]
	mediana	21,92	21,39	7,02	6,15
α-felandren	średnia zawartość	0,11 [±0,23]	0,13 [±0,36]	0,14 [±0,17]	0,19 [±0,28]
	mediana	0,05	0,04	0,08	0,07
3-karen	średnia zawartość	0,78 [±1,88]	0,75 [±1,96]	0,27 [±0,54]	0,39 [±0,93]
	mediana	0,05	0,06	0,05	0,06

SKŁADNIK MONOTERPENOWY		ZDSW (n=45)	ZASW (n=45)	ZDSU (n=34)	ZASU (n=34)
para-cymen + α -terpinen	średnia zawartość	0,23 [$\pm 0,3$]	0,21 [$\pm 0,26$]	0,37 [± 1]	0,35 [$\pm 0,76$]
	mediana	0,12	0,09	0,15	0,13
limonen	średnia zawartość	2,92 [$\pm 2,3$]	2,85 [$\pm 2,79$]	3,55 [$\pm 4,98$]	3,46 [$\pm 5,18$]
	mediana	2,34	2,22	2,11	1,99
γ -terpinen	średnia zawartość	0,11 [$\pm 0,26$]	0,08 [$\pm 0,16$]	0,13 [$\pm 0,4$]	0,11 [$\pm 0,28$]
	mediana	0,03	0,03	0,02	0,02
terpinolen	średnia zawartość	0,68 [$\pm 0,39$]	0,69 [$\pm 0,32$]	0,49 [$\pm 0,43$]	0,5 [$\pm 0,55$]
	mediana	0,63	0,62	0,36	0,36
terpinen-4-ol	średnia zawartość	0,54 [$\pm 0,9$]	0,37 [$\pm 0,48$]	0,51 [$\pm 1,08$]	0,48 [$\pm 0,88$]
	mediana	0,23	0,19	0,08	0,08

5.2.3 Wyniki analiz w warunkach chiralnych w odniesieniu do opisanych wcześniej kierunków badań

W wyniku przeprowadzonych chromatograficznych analiz chiralnych stwierdzono występowanie dwóch form enancjomerycznych w przypadku α -pinenu, β -pinenu oraz limonenu. Otrzymane wyniki dotyczące wzajemnych proporcji form enancjomerycznych w przypadku każdego z wymienionych monoterpenu świadczą o dużej zmienności osobniczej. Jednocześnie zaobserwować można zjawisko stałości stosunku proporcji pomiędzy formami enancjomerycznymi każdego z badanych związków monoterpenu mimo działania takich czynników zewnętrznych jak żerowanie owadów. Suszenie i długotrwałe przechowywanie surowca w temperaturze pokojowej także wydaje się nie mieć wpływu na wzajemne proporcje pomiędzy formami enancjomerycznymi w przechowywanym surowcu leczniczym. Szczegółowe zestawienie uzyskanych danych przedstawiono w tabeli nr 41.

Tabela nr 41 Wzajemne proporcje form enancjomerycznych α -pinenu, β -pinenu i limonenu zaobserwowane wśród poddanych badaniom osobników jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) – porównanie szyszkogagód nie wykazujących śladów żerowania owadów oraz uszkodzonych przez znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) (w zestawieniu uwzględniono zarówno materiał przechowywany w stanie zamrożenia od momentu zbioru jak i materiał przechowywany przez okres jednego roku w temperaturze pokojowej). W nawiasach kwadratowych podano odchylenie standardowe.

		SUROWIEC ZAMROŻONY BEZPOŚREDNIO PO ZBIORZE I W TAKIM STANIE PRZECHOWYWANY		SUROWIEC PRZECHOWYWANY ROK W TEMPERATURZE POKOJOWEJ, POCZYM ZAMROŻONY	
		SZYSZKOJAGODY BEZ OZNAK ŻEROWANIA OWADÓW (n=44)	SZYSZKOJAGODY USZKODZONE PRZEZ ZNAMIONKA JAŁOWCOWEGO (n=44)	SZYSZKOJAGODY BEZ OZNAK ŻEROWANIA OWADÓW (n=14)	SZYSZKOJAGODY USZKODZONE PRZEZ ZNAMIONKA JAŁOWCOWEGO (n=14)
α -pinen	średnie proporcje form enancjomerycznych [-]/[+]	35,32 _[±19,08] / 64,68 _[±19,08]	35 _[±18,48] / 65 _[±18,48]	34,47 _[±21,67] / 65,53 _[±21,67]	34,45 _[±21,25] / 65,55 _[±21,25]
	mediany proporcji form enancjomerycznych [-]/[+]	32,83 / 67,18	32,23 / 67,77	30,3 / 69,7	29,21 / 70,79
β -pinen	średnie proporcje form enancjomerycznych [-]/[+]	75,77 _[±14,11] / 24,23 _[±14,11]	75,89 _[±13,83] / 24,11 _[±13,83]	73,39 _[±13,09] / 26,61 _[±13,09]	73,14 _[±14,57] / 26,86 _[±14,57]
	mediany proporcji form enancjomerycznych [-]/[+]	78,76 / 21,24	79,21 / 20,8	74,62 / 25,38	74,74 / 25,27
limonen	średnie proporcje form enancjomerycznych [-]/[+]	39,03 _[±16,15] / 60,97 _[±16,15]	38,18 _[±15,56] / 61,82 _[±15,56]	47,02 _[±11,32] / 52,98 _[±11,32]	46,05 _[±10,48] / 53,95 _[±10,48]
	mediany proporcji form enancjomerycznych [-]/[+]	42,12 / 57,88	39,72 / 60,28	48,31 / 51,69	49,22 / 50,78

5.3 Dyskusja

Otrzymane wyniki zarówno w przypadku sosny zwyczajnej i żerujących na niej mszyc – miodownic sosnowych (*Cinara pini* L.), jak i jałowca pospolitego i odbywających rozwój wewnątrz jego szyszkojagód błonkówek – znamionków jałowcowych (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) nie wykazały wpływu owadów na skład frakcji monoterpenowej. Wskazuje to na brak indukowanej przez wymienione owady obrony chemicznej opartej na związkach monoterpenowych u badanych gatunków roślin. Fakt ten ma doniosłe znaczenie przy rozpatrywaniu wpływu owadów na jakość surowca leczniczego pozyskiwanego z wymienionych gatunków roślin. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że prawdopodobnie jest on znikomy. Związki z grupy monoterpenów stanowią główną grupę substancji biologicznie czynnych wykorzystywanych leczniczo w tej grupie roślin. Czy więc zalecenia farmakopealne odnośnie dyskwalifikacji surowca leczniczego wykazującego ślady żerowania owadów w tym konkretnym przypadku nie mają podstaw? Okazuje się, iż odpowiedź na postawione pytanie jest trudniejsza niż się wydaje na pierwszy rzut oka. Pierwszą możliwością jest występowanie indukowanego przez owady systemu obrony chemicznej opartego na substancjach innych niż monoterpeny. Mogły by to być np. seskwiterpeny lub inne substancje chemiczne. Przy wyciąganiu daleko idących wniosków na podstawie wyników badań należy w pierwszej kolejności zdać sobie sprawę, że w toku niniejszej pracy analizowany był tylko mały wycinek potężnej maszyny roślinnego metabolizmu. Występowanie innego typu indukowanej obrony chemicznej zdaje się potwierdzać fakt zasiedlenia przez mszyce (*Cinara pini* L.) innych roślin żywicielskich w drugim roku eksperymentu – początkowo zakładano wykonanie dwuletnich analiz składu chemicznego tych samych osobników sosny zwyczajnej przy czym w terenie oznaczono zarówno rośliny nie wykazujące obecności mszyc jak i te najliczniej zasiedlone. Fakt niemal zupełnego braku mszyc na oznaczonych roślinach w drugim roku eksperymentu zmusił autora pracy do ponownego doboru roślin i zmiany metodyki postępowania. Co spowodowało zmianę rośliny żywicielskiej? Czy był to czysty przypadek, czy też rośliny zaatakowane w poprzednim roku teraz były mniej atrakcyjne dla mszyc np. z powodu zmian w składzie chemicznym?

Aby znaleźć odpowiedź na to pytanie konieczne byłoby przeprowadzenie długoletnich obserwacji rozmieszczenia kolonii mszyc na obszarze badań. Jeśli w przypadku badanych roślin wystąpiła indukowana obrona chemiczna oparta na substancjach chemicznych innych niż związki monoterpeneowe to podstawowym pytaniem będzie: czy (i jak) związki te działają na organizm ludzki – czy są to substancje toksyczne dla człowieka? Jak więc można wywnioskować z powyższego opisu nie ma podstaw do negowania zaleceń farmakopealnych w odniesieniu do analizowanych w tej pracy interakcji owad-roślina nawet w świetle przedstawionych wyników. Dodatkowo należy wziąć pod uwagę, iż w toku realizacji opisywanych tutaj badań nie przewidziano ilościowych analiz zawartości olejków eterycznych w objętych opracowaniem surowcach. Znaczny spadek bezwzględnej zawartości substancji biologicznie czynnych pod wpływem żerowania owadów może być także przyczyną dyskwalifikacji surowca jednak liczne źródła literaturowe donoszą o efekcie odwrotnym – zwiększonej syntezie związków terpenowych pod wpływem uszkodzeń tkanek roślinnych (także tych powodowanych przez owady) [Steele i in., 1995] [Steele i in., 1998] [Bohlmann i in., 1998] [Fäldt i in., 2003] [Shen i in., 2000] [McKay i in., 2003], w niektórych przypadkach zanotowano także zmiany w składzie frakcji monoterpeneowej pod wpływem ataku owadów roślinożernych [Valterova i in., 1995]. Przenoszone przez owady mikroorganizmy mogą zmieniać skład chemiczny surowca roślinnego znajdując dogodne warunki bytowania i rozwoju w miejscu spowodowanych przez owady uszkodzeń tkanek roślinnych. Fakt żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na podstawie wyników badań opublikowanych w tej pracy wydaje się nie mieć większego wpływu na względne zawartości związków monoterpeneowych w uszkodzonych przez tego owada szyszkojadach jałowca pospolitego, jednak pozostawione przez niego otwory wylotowe stanowią wrota dla groźnych mikroorganizmów (np. grzybów), co może prowadzić do zmian w chemizmie surowca leczniczego (np. produkcja aflatoksyn przez grzyby). W tym świetle niepokojący wydaje się stwierdzony w wyniku analiz przeprowadzonych w ramach niniejszego opracowania fakt powszechnej obecności szyszkojadów uszkodzonych przez tego owada w surowcu leczniczym i przyprawowym znajdującym się w obrocie handlowym na terenie kraju.

Doświadczenia dotyczące wpływu uszkodzeń surowca leczniczego powstałych w wyniku żerowania owadów pod kątem jego długotrwałego przechowywania w stanie suchym nie ujawniły większych zmian we względnych zawartościach analizowanych związków monoterpenu. O ile w przypadku żerowania mszyc na młodych pędach sosny zwyczajnej powstałe uszkodzenia surowca są niewielkie to w przypadku otworu wylotowego znamionka jałowcowego mamy do czynienia ze stosunkowo dużym i głęboko sięgającym uszkodzeniem struktury szyszkojagody jałowca. Przerwanie ciągłości zewnętrznych osłon szyszkojagody powinno spowodować łatwiejsze parowanie lotnych składników olejku przy czym te o większej lotności powinny parować szybciej zmniejszając swój względny udział procentowy. Jak można wywnioskować z wyników analiz zamieszczonych w niniejszej pracy, tak się jednak nie dzieje. Otwór wylotowy znamionka jałowcowego ułatwia także dostęp powietrza do wnętrza szyszkojagody jednak i ten czynnik pozostaje bez wpływu na względne proporcje analizowanych związków monoterpenu. Wytlumaczeniem tych obserwacji może być fakt iż dorosły znamionek wygryzając otwór wylotowy robi to w miejscu pozbawionym zbiorników olejkowych - na szczycie szyszkojagody. Jeśli owad w czasie wygryzania otworu wylotowego natrafi na zbiornik olejkowy najprawdopodobniej ginie [Kapuściński, 1946]. Wewnętrzna struktura uszkodzonej szyszkojagody wydaje się być na tyle odporna, aby uniemożliwić parowanie olejku oraz powstrzymać dostęp powietrza. Potwierdzeniem tej teorii będą badania bezwzględnej zawartości olejku w szyszkojagodach jałowca uszkodzonych przez znamionka jałowcowego i jej porównanie z grupą kontrolną szyszkojagód nieuszkodzonych.

Fakt występowania form enancjomerycznych wśród badanych związków monoterpenu pozwolił na zbadanie ich wzajemnych proporcji u trzech spośród analizowanych monoterpenu: α -pinenu, β -pinenu oraz limonenu. We wszystkich przypadkach stwierdzono brak wpływu żerowania objętych badaniami gatunków owadów na względne proporcje pomiędzy formami enancjomerycznymi. Istnienie obrony chemicznej opartej na zmianie proporcji form enancjomerycznych wydaje się ciekawą możliwością w przypadku roślin szpilkowych, być może jednak u badanych gatunków ten typ obrony wymagałby zbyt radykalnych i przez to być może nieopłacalnych

energetycznie zmian metabolicznych. Liczne artykuły naukowe opisują stwierdzone przypadki selektywnej wrażliwości owadów na formy enancjomeryczne lotnych substancji produkowanych i uwalnianych przez rośliny [Norin, 1996] [Wibe i in., 1998]. Określone formy enancjomeryczne związków chemicznych działają czasami odstraszająco lub toksycznie na owady [Ngho i in., 1999] [Halarewicz-Pacan i in., 2003]. W przypadku analizowanych interakcji owad-roślina ten typ zależności jednak najwyraźniej nie występuje.

Analizując wyniki niniejszego opracowania należy wziąć pod uwagę jeszcze jedną możliwość: żerowanie owadów nie musi wywoływać zwiększonej produkcji określonych związków monoterpenowych - obrona chemiczna może polegać na ich zwiększonym uwalnianiu do środowiska zewnętrznego. Zwiększone uwalnianie substancji lotnych było notowane w przypadku uszkodzeń spowodowanych żerowaniem owadów w odniesieniu do wielu gatunków roślin [Turlings i in., 1995] [Turlings i Tumlinson, 1992] [Paré i Tumlinson, 1999] - także u roślin szpilkowych [Loreto i in., 2000] [Priemé i in. 2000]. Zbadano także wrażliwość owadów na wydzielane przez rośliny substancje lotne [Thiéry i Marion-Poll, 1998] [Bichao i in., 2003]. Powyższa tematyka wydaje się interesująca pod względem możliwości emisji związków przyciągających naturalnych wrogów mszyc miodownic sosnowych, a także dwóch aspektów związanych ze znamionkiem jałowcowym: wyboru szyszkojagody przez samicę składającą jaja oraz mechanizmu lokalizacji szyszkojagody zajętej przez larwę znamionka, którą przeprowadza samica jego pasożyta - błonkówki *Trichomalus laevinucha* Thoms. (w tym miejscu należy wspomnieć, iż uszkodzenia surowca powodowane przez tę błonkówkę znajdują się na drugim miejscu pod względem częstości występowania po uszkodzeniach powodowanych przez znamionka jałowcowego - fot nr 11 na stronie 122). Ponieważ badania realizowane w ramach niniejszej pracy nie objęły tego typu doświadczeń kwestia znaczenia monoterpenów w przypadku opisanych wyżej aspektów interakcji owad-roślina pozostaje otwarta.

W świetle przedstawionego powyżej toku myślenia ciekawe wydaje się zaobserwowane w toku realizacji tej pracy i potwierdzone przez liczne wcześniejsze badania [Weissmann i Lange, 1990] zjawisko znacznej osobniczej zmienności składu

związków monoterpenu wśród poddanych analizom gatunków roślin szpilkowych. Być może jest to jeszcze jedna strategia obrony przed roślinożernymi owadami. Badania przeprowadzone na kornikach (*Ips paraconfusus*, *Dendroctonus brevicomis*) zdają się potwierdzać tę tezę [Byers, 1992] [Harborne, 1997]. Mimo, iż wydawać by się mogło, że selekcja wywierana przez owady powinna doprowadzić do powstania jednego, optymalnego pod względem ochrony przed roślinożernymi owadami chemotypu, zjawisko takie nie nastąpiło w odniesieniu do żadnego z badanych gatunków. Przyczyny takiego stanu rzeczy należy upatrywać w zjawisku ewolucyjnego wyścigu pomiędzy owadami i broniącymi się przed ich atakiem roślinami. Prawdopodobnie powstaniu ściśle określonego i charakteryzującego się małą zmiennością chemotypu zapobiegają następujące szybko adaptacje ewolucyjne owadów. Ponadto skład chemiczny odstraszający lub wręcz toksyczny dla jednego gatunku owada może być silnym atraktantem dla innego gatunku [Byers i in., 1985] [Byers i in., 1988]. W takiej sytuacji bardziej celową strategią obrony wydaje się być wytworzenie znacznej zmienności składu chemicznego – tak aby z jednej strony zmusić owady do energochłonnego i zabierającego dużo czasu poszukiwania odpowiedniej do żerowania rośliny, a z drugiej strony zapobiec istnieniu dużych skupisk roślin o bardzo zbliżonym składzie chemicznym, co mogłoby prowadzić do powstania dużej bazy pokarmowej dla określonego gatunku owada i w konsekwencji do jego masowej gradacji [Langenheim, 1994]. Szczególnie ciekawa wydaje się rola działalności człowieka jako dodatkowego czynnika presji selekcyjnej na rośliny. Otóż prowadząc nasadzenia (np. lasów sosnowych) na znacznych powierzchniach używa się do tego celu materiału pochodzącego od stosunkowo niewielkiej liczby roślin (uznanych za wzorcowe pod kątem wykorzystania przez człowieka). Prowadzi to do ograniczenia różnorodności genetycznej populacji, co w połączeniu z presją owadów powinno powodować wzrost różnorodności składu chemicznego przy stosunkowo małym zróżnicowaniu genetycznym.

Jak już wcześniej wspomniano w wyniku realizacji opisywanych badań nie stwierdzono istotnego wpływu żerowania poddanych badaniom gatunków owadów na skład chemiczny frakcji monoterpenu sosny zwyczajnej i jałowca pospolitego. Próbuąc znaleźć możliwe przyczyny takiego stanu rzeczy należy także wziąć pod uwagę

strategie żerowania opisywanych gatunków owadów. Znaczna specjalizacja mszyc objawiająca się budową narządu gębowego wykształconego w postaci długiej cienkiej klujki prawdopodobnie pozwala im omijać struktury olejkowe podczas pobierania pokarmu. W przypadku znamionka jałowcowego, już w trakcie składania jaj samica natychmiast wycofuje pokładełko, jeżeli przebijając je przez kolejne warstwy szyszkojagody natrafi na zbiornik olejkowy. Następną próbą złożenia jaja zostaje podjęta dopiero po starannym oczyszczeniu pokładełka [Kapuściński, 1946]. Larwa owada żeruje wewnątrz pozbawionego struktur olejkowych nasienia, odgradzona od zbiorników olejkowych lupiną nasienną i osłoną nasienną. Ponieważ wyniki przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badań wydają się świadczyć o braku wpływu uszkodzenia zewnętrznych osłon szyszkojagody na względną zawartość składników frakcji monoterpenowej, struktury wewnętrzne szyszkojagody prawdopodobnie są wystarczająco mało przepuszczalne dla olejków, aby w znaczącym stopniu ułatwiać ich ucieczkę z szyszkojagody. Analizując więc sytuację z odwrotnego punktu widzenia można założyć, że nie zachodzi (lub zachodzi w bardzo niewielkim stopniu) przenikanie składników olejku ze zbiorników olejkowych do wnętrza nasienia gdzie znajduje się larwa znamionka. Proces wydostania się dorosłego owada z wnętrza nasienia wewnątrz szyszkojagody także zachodzi w taki sposób, aby ominąć zbiorniki olejkowe – lokalizacja otworu wylotowego na szczycie szyszkojagody jest jedną z najważniejszych cech diagnostycznych uszkodzeń powodowanych przez znamionka jałowcowego pozwalających na ich odróżnienie od uszkodzeń powodowanych przez inne owady (fot. nr 11 na stronie 122). Jak można zauważyć na przekroju szyszkojagody obszar ten jest praktycznie pozbawiony zbiorników olejkowych (fot. nr 9 na stronie 118). Analizując strategię życiowe objętych niniejszym opracowaniem gatunków owadów można więc stwierdzić, że starają się one w maksymalnym stopniu ograniczyć kontakt z substancjami olejkowymi rośliny gospodarza. Być może to właśnie jest przyczyną braku zmian we względnej zawartości składników monoterpenowych roślin w odpowiedzi na atak – roślina nie reaguje zmianami w metabolizmie analizowanych związków ponieważ jest to energochłonne i bezcelowe w przypadku badanych gatunków owadów.

6 Zaprojektowanie i stworzenie specjalistycznego oprogramowania do archiwizacji i analizy porównawczej danych chromatograficznych ChromNET

W niniejszym rozdziale opisano wyniki celu pochodnego niniejszego opracowania, którym było stworzenie specjalistycznego oprogramowania do archiwizacji i analizy porównawczej danych chromatograficznych.

Stworzone oprogramowanie nazwano ChromNET ze względu na główny cel jego stworzenia (archiwizacja i analiza danych chromatograficznych) oraz fakt wykorzystania przy jego realizacji ogólnie dostępnych technologii sieciowych.

Podstawy teoretyczne dotyczące opisywanej tematyki zamieszczono na stronie 54. Metodykę opisano na stronie 101. Opis wykorzystania stworzonego oprogramowania w ramach niniejszej pracy zamieszczono na stronie 106. Kompletny kod źródłowy załączono w dodatku B (str.205). Pomocny może okazać się także schemat struktury pracy zamieszczony na stronie 66.

W wyniku realizacji trzeciego celu pochodnego pracy powstało specjalistyczne oprogramowanie służące do archiwizacji i analizy porównawczej danych chromatograficznych. Dzięki wykorzystaniu technologii Macromedia Flash do wizualizacji, a także wizualnej edycji danych chromatograficznych, stworzono unikalną wieloużytkownikową aplikację sieciową zdolną do archiwizacji i przetwarzania dużych ilości danych. Oprogramowanie to w znaczny sposób przyspieszyło przetwarzanie wyników opublikowanych w tej pracy. Okazało także się pomocne przy opracowywaniu wyników innych projektów badawczych realizowanych w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku.

6.1 Opis oprogramowania ChromNET

Uwierzytelnianie użytkowników

Aplikacja WWW ChromNET umożliwia jednoczesną i niezależną pracę wielu użytkowników. Aby rozpocząć prace należy się zalogować wpisując identyfikator i hasło. Konta użytkowników są zakładane i kontrolowane przez administratora. Hasła

użytkowników są przechowywane w formie zaszyfrowanej, co podwyższa poziom bezpieczeństwa.

Główne okno programu

USER: Piotr Madanecki

MAIN MENU

- ▶ ADVANCED SEARCH
- ▶ CREATE NEW PROJECT
- ▶ CREATE NEW TEMPLATE
- ▶ SAMPLE MANAGER
- ▶ IMPORT NEW CHROMATOGRAM

ADDITIONAL MODULES

- ▶ VIEW STATISTICS

SETTINGS

- ▶ CHANGE USER SETTINGS
- ▶ CHANGE USER DATA
- ▶ CHANGE USER PASSWORD

LOGOUT

LOCATION: TOP /

NAME	DATE	ADDITIONAL DATA	COMMANDS	STATUS
INNE	14.12.2004 19:40	REPORT	ie d	U
SEZONOWOŚĆ - SOSNA	01.04.2004	REPORT	ie d	U
SEZONOWOŚĆ - ŚWIERK	01.04.2004	REPORT	ie d	U
TEMPLATES			ie d	-
METHODS			ie d	-
SHARED DATA			ie d	-

PAGES <<< 1 2 >>> SHOW 12 PER PAGE TRANSFORM SELECTED: d U

ChromNET v. 0.14

© Piotr Madanecki 2004
e-mail: p.mad@bioloby.pl

Rys. 22 Główne okno programu ChromNET.

Główne okno programu umożliwia wykonywanie większości operacji związanych z zarządzaniem i przeglądaniem chromatogramów, projektów, matryc. Dzieli się ono na menu z głównymi poleceniami znajdujące się po lewej stronie, oraz zajmującą główną jego część listę chromatogramów, projektów i matryc użytkownika.

Projekty są odpowiednikiem katalogów na dysku komputera. Ułatwiają one organizowanie chromatogramów i generowanie raportów zawierających wyniki integracji wszystkich chromatogramów wchodzących w skład danego projektu. Analogia do katalogów nie jest jednak dosłowna, gdyż w rzeczywistości informacje o przynależności chromatogramu do danego projektu są przechowywane w bazie danych, a na dysku komputera nie są tworzone żadne katalogi. Projekty tworzą strukturę hierarchiczną tzn. mogą zawierać podprojekty, a te mogą zawierać podprojekty niższego rzędu itd. Każdy projekt posiada nazwę, opis oraz datę utworzenia.

Chromatogramy są odpowiednikiem importowanych plików z danymi chromatograficznymi. Jeżeli nie zostały one przyporządkowane do któregoś z projektów to będą widoczne na stronie głównej, na szczytowym poziomie hierarchii projektów.

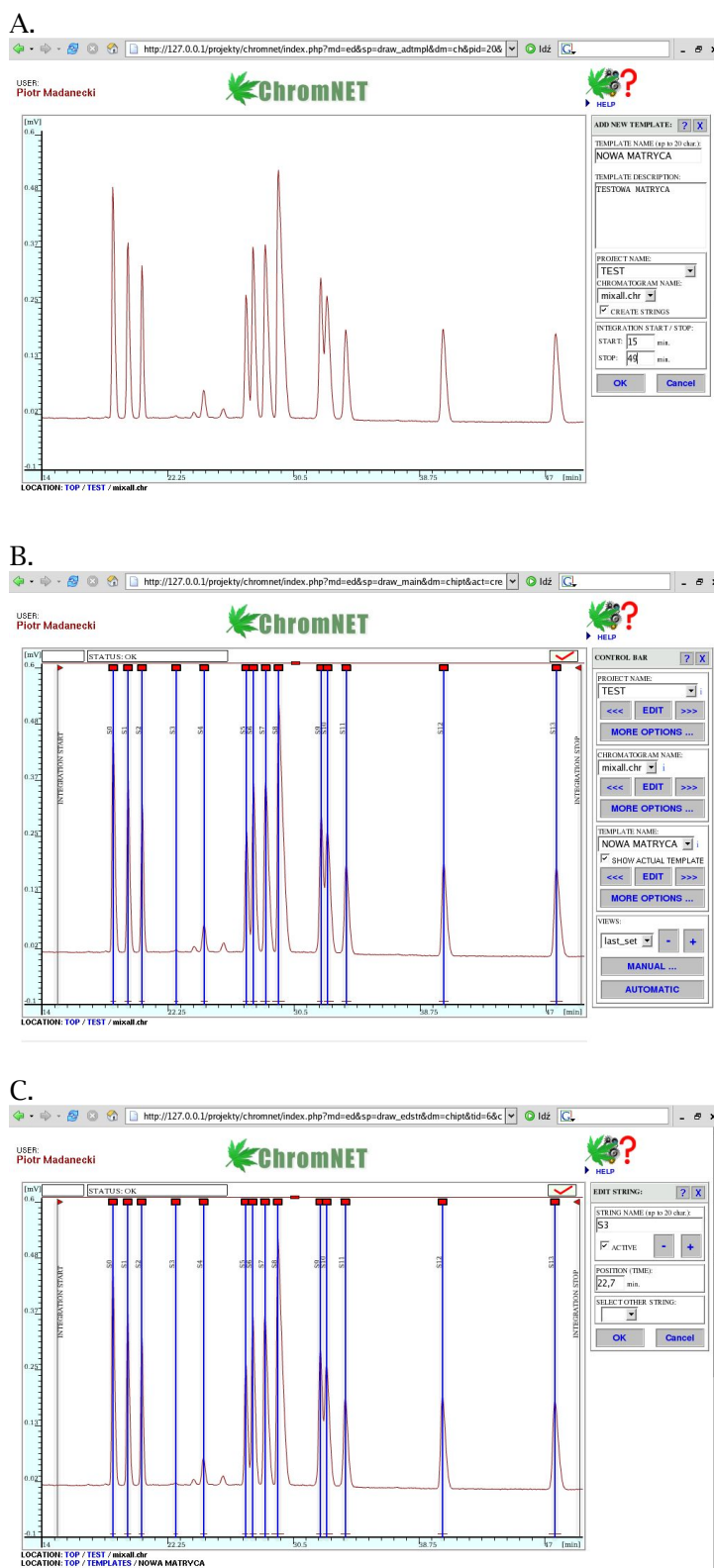
Każdy chromatogram odpowiada jednej analizowanej próbce. W przyszłych wersjach programu zostanie wprowadzona możliwość przyporządkowywania kilku chromatogramów jednej próbce (wiele powtórzeń).

Matryce znajdują się w osobnym projekcie (wirtualnym katalogu) o nazwie „templates”. Katalog ten nie może być usunięty przez użytkownika (katalog systemowy).

Matryce są generowane automatycznie po wskazaniu przez użytkownika chromatogramu, który zawiera analizę mieszaniny substancji wzorcowych o znanych czasach retencji. W miejscu pików chromatograficznych odpowiadających poszczególnym substancjom wzorcowym tworzone są graficzne znaczniki pików, tzw. „struny” (strings), czyli pionowe linie charakteryzujące się określoną pozycją i nazwą. Zbiór „strun” tworzy matrycę, która może być „nakładana” na inne wykresy chromatograficzne wspomagając oznaczanie pików chromatograficznych poprzez przyporządkowanie im nazw (rys nr 23).

Katalogi systemowe „methods” oraz „shared data” będą obsługiwane w przyszłych wersjach programu. Katalog „methods” będzie miejscem przechowywania informacji o metodach natomiast katalog „shared data” będzie katalogiem systemowym pozwalającym na przeglądanie udostępnionych przez innych użytkowników danych chromatograficznych.

W głównym oknie programu możliwe są operacje edycyjne takie jak usuwanie lub zmiana nazwy projektów a także, usuwanie poszczególnych próbek/chromatogramów.



Rys. 23 Kolejne etapy tworzenia matrycy:

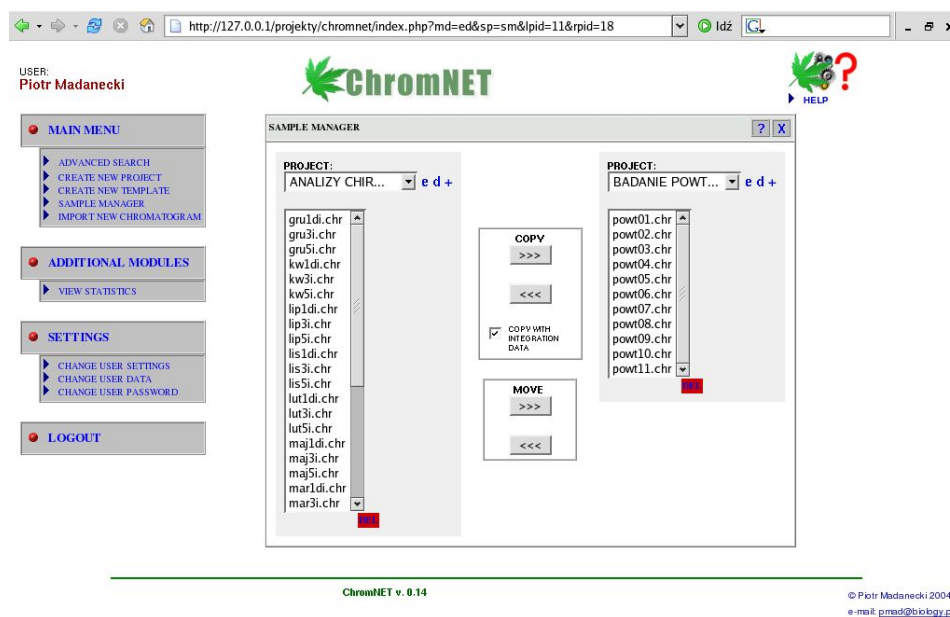
- A – wybór chromatogramu, określenie pozycji punktów kontrolnych integracji
- B – automatyczne wygenerowanie znaczników pików
- C – edycja nazw poszczególnych znaczników pików

Import danych chromatograficznych

Import danych chromatograficznych w bieżącej wersji oprogramowania ChromNET możliwy jest tylko z plików tekstowych wyeksportowanych przez oprogramowanie Chroma/Chromax produkcji firmy POL-LAB. Ponieważ większość oprogramowania analitycznego posiada obecnie możliwość eksportu danych w postaci plików tekstowych, import danych z oprogramowania innych producentów nie powinien sprawiać problemu po stworzeniu odpowiednich filtrów importu w przyszłych wersjach programu. Możliwości importu plików z innych aplikacji analitycznych powinny wzrosnąć jeszcze bardziej po wprowadzeniu i upowszechnieniu się specyfikacji nowego, opartego na języku XML formatu plików z danymi analitycznymi. Oprócz pliku tekstowego wyeksportowanego przez program Chroma/Chromax jest także możliwość przesłania i archiwizacji na serwerze odpowiadającego mu pliku w formacie oryginalnym. W oknie importu pliku można także wskazać projekt, do którego ma zostać przyporządkowany nowo importowany chromatogram.

Zarządzanie danymi chromatograficznymi

Do zarządzania danymi chromatograficznymi służy „zarządca próbek” (sample manager). W oknie tym możliwe jest przenoszenie bądź kopiowanie danych chromatograficznych pomiędzy projektami. Przy kopiowaniu możliwe jest jednoczesne skopiowanie danych chromatogramu i danych integracji (przyporządkowane pikom chromatograficznym nazwy, pozycje początku i końca integracji) lub też kopiowanie jedynie danych chromatogramu. Kopiowanie prowadzi nie tylko do duplikacji informacji dotyczących określonego chromatogramu przechowywanych w bazie danych, ale także do utworzenia kopii wszystkich plików powiązanych z danym chromatogramem. Od chwili utworzenia kopia chromatogramu traci więc wszelką łączność z danymi macierzystymi, uzyskuje nowy unikalny numer identyfikacyjny i może być analizowana całkowicie niezależnie. Możliwe jest także jednorazowe przenoszenie lub kopiowanie wielu chromatogramów.

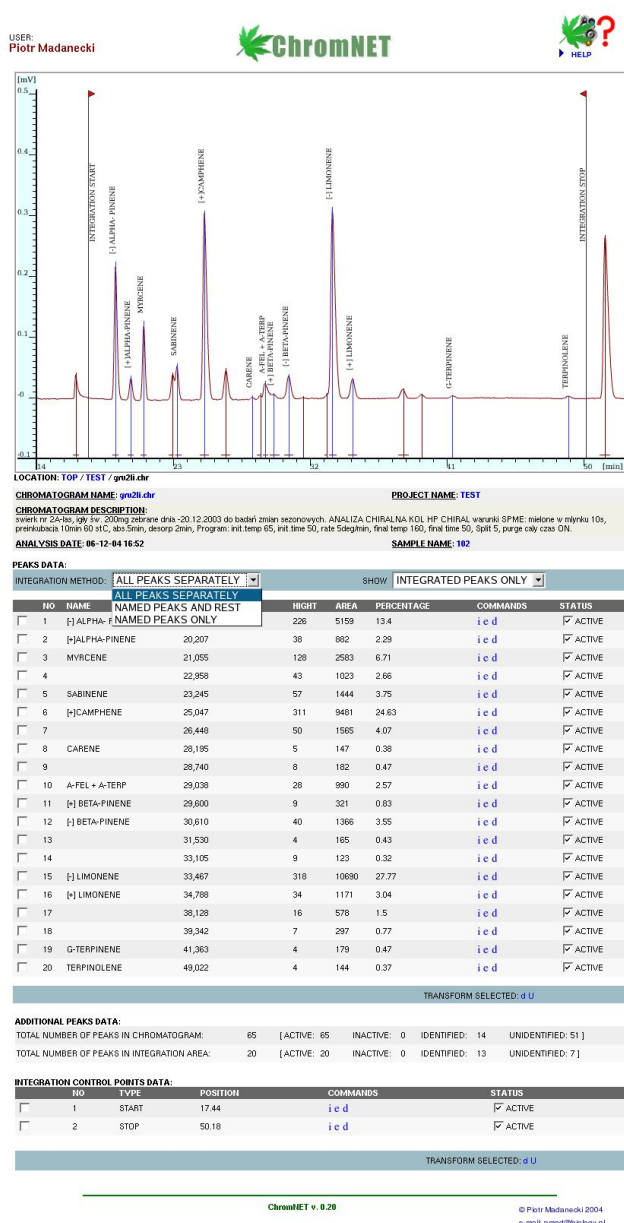


Rys. 24 Zarządca próbek i chromatogramów pozwala na przenoszenie lub kopiowanie danych chromatograficznych pomiędzy projektami.

Podgląd krzywej chromatograficznej

Wizualizacja danych chromatograficznych następuje poprzez pobranie informacji z archiwum plików (współrzędne tworzące krzywą chromatograficzną) oraz z bazy danych (informacje dotyczące pików chromatograficznych) i wygenerowanie pliku w formacie Macromedia Flash, który jest następnie przesyłany do przeglądarki WWW w komputerze użytkownika. Okno podglądu krzywej chromatograficznej prezentuje nie tylko chromatogram, ale też dane o pikach chromatograficznych i parametrach integracji. Udział procentowy pików obliczany jest na podstawie ich powierzchni oraz ustawień początku i końca integracji. Po prawej stronie znajduje się panel kontrolny umożliwiający zmianę skali podglądu, a także przejście do innego chromatogramu (projektu, matrycy). Ustawienia podglądu (views) mogą być zapisywane przez użytkowników w bazie danych, a następnie szybko przywracane poprzez wybór z menu.

A.



Rys. 25 A – Główne okno podglądu krzywej chromatograficznej prezentuje nie tylko graficzną reprezentację chromatogramu, ale także inne dotyczące go dane (m. in. opis, data przeprowadzenia analizy) oraz szczegółowe dane o integrowanych pikach (udział procentowy, wysokość, powierzchnia). W przypadku zmiany metody integracji udziały procentowe są natychmiastowo przeliczane i prezentowane. W dolnej części okna znajdują się statystyki dotyczące pików chromatograficznych oraz informacje dotyczące punktów kontrolnych integracji.

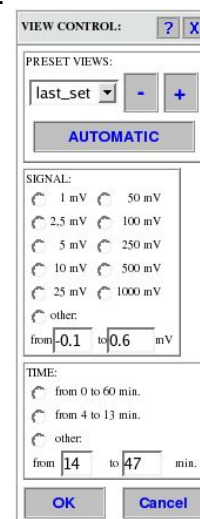
B – panel kontrolny umożliwia zmianę skali podglądu oraz zmianę bieżącego chromatogramu (projektu, matrycy).

C – panel skali podglądu umożliwia nie tylko ręczną modyfikację aktualnych parametrów, ale także zapisywanie w bazie danych schematów ustawień, które można potem szybko przywracać.

B.



C.



Wizualna edycja danych chromatograficznych

Możliwości formatu Macromedia Flash wykorzystane w systemie ChromNET nie ograniczają się jedynie do wizualizacji danych chromatograficznych, ale umożliwiają także ich wizualną edycję. Po wybraniu chromatogramu oraz matrycy możliwe jest „nałożenie” obrazu matrycy na wykres chromatograficzny i wzajemne przemieszczanie metodą „przeciągnij i upuść”. Możliwe jest także przemieszczanie pojedynczych znaczników pików matrycy. Jeżeli obiekt znacznika znajduje się w obszarze pików chromatograficznego jest to sygnalizowane przez zmianę jego koloru. Matryca zawiera także punkty kontrolne integracji (początek i koniec integracji). Także one są wyświetlane w postaci odpowiednio oznaczonych pionowych linii, które można przemieszczać. Po zatwierdzeniu zmian wszystkie dane dotyczące położenia znaczników pików i punktów kontrolnych integracji matrycy są przesyłane na serwer gdzie następuje:

- usunięcie nazw wszystkich pików danego chromatogramu (jeżeli jakieś nazwy istniały wcześniej)
- nadanie nazwy pikom, które w momencie naciśnięcia przycisku zatwierdzenia zmian znajdowały się w kontakcie z którymkolwiek znacznikiem pików (pik przejmuje nazwę znacznika, który znajdował się na jego obszarze)
- zachowanie bieżącej pozycji wszystkich znaczników pików i punktów kontrolnych integracji matrycy
- usunięcie wszystkich punktów kontrolnych integracji przypisanych wcześniej danemu chromatogramowi (jeżeli takie wcześniej istniały)
- przypisanie chromatogramowi nowych punktów kontrolnych integracji na podstawie matrycy

Projekty i raporty projektów

Jak już wcześniej wspomniano projekty systemu ChromNET stanowią coś w rodzaju wirtualnych katalogów, pomiędzy którymi można przenosić lub kopiować dane chromatograficzne zaimportowane do systemu. Umożliwia to organizowanie danych chromatograficznych przez użytkownika. Nazwa i opis każdego projektu mogą być edytowane. Pozwala to porządkować nawet pokaźne zbiory danych chromatograficznych.

Główną korzyścią jaką przynosi istnienie projektów nie jest jednak ich przydatność przy porządkowaniu danych chromatograficznych, lecz możliwość generowania szczegółowych raportów obejmujących wszystkie chromatogramy wchodzące w skład danego projektu.

Okno raportu pozwala na ustawienie trybu obliczania udziałów procentowych pików chromatograficznych. Dostępne są dwa tryby obliczeń: „piki o przyporządkowanych nazwach i reszta” (named peaks and rest) oraz „tylko piki o przyporządkowanych nazwach” (named peaks only). W przypadku zajścia takiej potrzeby można wyłączyć z obliczeń piki określonej substancji odznaczając pole wyboru obok jej nazwy. Pozostałe wartości zostaną wtedy przeliczone z ich pominięciem. Istnieje także możliwość zmiany rodzaju wyświetlanych w raporcie danych. Obecna wersja oprogramowania pozwala wyświetlać raporty obejmujące zestawienia:

- udziałów procentowych
- wysokości
- pól powierzchni
- wartości binarnych odzwierciedlających istnienie (1) lub brak (0) pików danej substancji w określonym chromatogramie projektu

ChromNET - Network Chromatographic Database - Mozilla Firefox

http://127.0.0.1/projekty/chromnet/index.php?md=ed&sp=pj_report&pid=13

ChromNET

PROJECT NAME: BADANIE POWTARZALNOŚCI

PROJECT DESCRIPTION:

SAMPLES-PEAKS DATA:

INTEGRATION METHOD: NAMED PEAKS AND REST

SHOW: PERCENTAGE

SAMPLE	ALPHA-PINENE	BETA-PINENE	MYRCENE	SABINENE	CAMPHENE	CARENE	BETA-PINENE	BETA-PINENE	HEIGHT	AREA	PERCENTAGE
pow01.dnr 11.25	41.08	2.71	2.01	6.71	26.87	0.45	1.96	1.71	0.3		
pow02.dnr 11.73	42.52	2.62	2.02	6.88	25.6	0.45	1.96	1.61	0.2		
pow03.dnr 11.38	41.71	2.54	2	6.72	26.38	0.5	1.97	1.64	0.43		
pow04.dnr 12.04	42.51	2.55	2.18	7.18	24.71	0.52	2.07	1.47	0.37		
pow05.dnr 11.73	41.74	2.04	2.13	6.97	25.16	0.53	2.03	1.55	0.39		
pow06.dnr 11.81	42.11	2.56	2.18	7.09	25.19	0.48	2.11	1.56	0.43		
pow07.dnr 12.03	42.18	2.63	2.17	7.18	24.9	0.45	2.06	1.54	0.4		
pow08.dnr 11.88	42.13	2.64	2.17	6.96	25.31	0.45	1.98	1.56	0.41		
pow09.dnr 11.08	41.29	2.5	1.99	6.64	27.26	0.52	1.95	1.72	0.4		
pow10.dnr 11.85	42.29	2.61	2.11	6.95	25.37	0.48	1.96	1.49	0.43		
pow11.dnr 11.85	41.52	2.69	2.07	6.97	26.12	0.49	2.02	1.57	0.37		

ChromNET v. 0.20

© Piotr Madamecki 2004
e-mail: pmad@biolgy.pl

Zakończono

Rys. 26 Raport dotyczący projektu pozwala na dynamiczną zmianę sposobu integracji oraz typu prezentowanych danych.

Dane wygenerowane w oknie raportu mogą być łatwo przeniesione za pomocą schowka w systemie Windows lub jego odpowiednika w systemie Linux (i innych

systemów operacyjnych) do innych aplikacji (np. arkusza kalkulacyjnego, pakietu statystycznego itd.) gdzie mogą być poddane dalszej obróbce.

6.2 Podsumowanie

Zastosowanie dostępnych w sieci Internet technologii do tworzenia naukowych i medycznych baz danych jest coraz powszechniejsze. Powstają coraz bardziej wyrafinowane narzędzia służące do zarządzania i przetwarzania przechowywanych tam informacji. Stworzony w ramach tej pracy system archiwizacji danych chromatograficznych ChromNET został zaprojektowany jako narzędzie mające na celu usprawnienie i przyspieszenie analizy dużych ilości danych analitycznych. Szczególnie ważnym elementem aplikacji jest moduł wizualizacji danych chromatograficznych oparty na technologii Macromedia Flash. Podstawowe korzyści osiągnięte w wyniku stworzenia wymienionego oprogramowania to:

- przyspieszenie obróbki i analizy wyników analiz chromatograficznych wykonanych w toku tego opracowania
- zbadanie możliwości zastosowania technologii Macromedia Flash do wizualizacji i wspomaganie analizy danych naukowych
- stworzenie eksperymentalnej aplikacji WWW pozwalającej na archiwizację, edycję, analizę i zarządzanie danymi chromatograficznymi
- pełny dostęp do kodu źródłowego, co daje nieograniczone możliwości rozbudowy systemu

Stworzone oprogramowanie znajdzie znacznie szersze zastosowanie w przyszłości. Może ono:

- stanowić podstawę szeregu projektów naukowo-informatycznych realizowanych przez jednostkę
- stać się narzędziem umożliwiającym łatwe udostępnianie bezpośrednich wyników badań analitycznych poprzez sieć Internet bez konieczności nabycia/installacji dodatkowego oprogramowania (np. w ramach międzynarodowej współpracy badawczej)
- stać się łatwo dostępną bazą danych (atlasem) chromatogramów lub podobnych danych analitycznych

- służyć nie tylko do analizy danych chromatograficznych, ale także do analizy danych uzyskanych metodą elektroforezy kapilarnej i innych podobnych technik analitycznych
- pełnić funkcję konwertera danych analitycznych pomiędzy różnymi systemami komputerowymi i oprogramowaniem
- generować wysokiej jakości wektorową grafikę do prezentacji i publikacji naukowych
- stanowić podstawową platformę do testowania algorytmów automatycznego rozpoznawania chromatogramów, czy też szukania różnic pomiędzy chromatogramami (biochemiczne badania populacyjne roślin, badania interakcji roślina-zwierzę)
- stanowić publicznie dostępną platformę dla praktycznej implementacji opracowywanych obecnie nowych standardów zapisu i składowania danych analitycznych

Stworzone w ramach niniejszej pracy oprogramowanie stanowi około **15700 linii kodu** (HTML, PHP, JavaScript, ActionScript) zawartego w 32 plikach. Pełny kod źródłowy oprogramowania załączono w postaci elektronicznej utrwalonej na płycie Mini-CD (załącznik B).

WNIOSKI

- W wyniku przeprowadzonych badań **nie stwierdzono** istotnego wpływu żerowania miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) oraz znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na względne proporcje składu procentowego monoterpenów zawartych w surowcach leczniczych pozyskiwanych z sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) i jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.).

Brak wpływu żerowania badanych gatunków owadów na względne proporcje związków monoterpenowych w poddanych analizom surowcach leczniczych stwierdzony w wyniku badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy stanowi ważny i pozytywny z farmaceutycznego punktu widzenia wkład do wiedzy o interakcjach roślin leczniczych z żerującymi na nich owadami. Należy jednak brać pod uwagę możliwość występowania związanych z żerowaniem owadów zmian jakościowych i ilościowych dotyczących innych, nie objętych badaniami, związków chemicznych, co może mieć duże znaczenie z uwagi na powszechne występowanie badanych gatunków owadów, zwłaszcza, że jak stwierdzono w ramach niniejszej pracy, ślady żerowania *Megastigmus bipunctatus* Swed. okazały się częste także w dostępnym w handlu na terenie kraju surowcu leczniczym i przyprawowym.

- Badania sezonowej zmienności składu frakcji monoterpenowej dotyczące gatunku *Pinus sylvestris* L. nie wykazały znaczących kierunkowych zmian sezonowych we względnych zawartościach procentowych badanych związków, co ma znaczenie przy doborze optymalnej metodyki zbioru materiału do celów badawczych.
- Badania osobniczej zmienności składu frakcji monoterpenowej jałowca pospolitego i sosny zwyczajnej wykazały znaczne osobnicze zróżnicowanie składu związków monoterpenowych oraz występowanie chemotypów wśród badanych gatunków.
- Stwierdzono wpływ suszenia i długotrwałego przechowywania surowców pochodzących z badanych gatunków roślin szpilkowych na skład chemiczny frakcji monoterpenowej. Obecność uszkodzeń spowodowanych przez owady zdaje się nie mieć większego wpływu na związki monoterpenowe w długotrwanie przechowywanym materiale.

- Metoda headspace SPME/GC okazała się wystarczająca jako technika półilościowa stosowana do badań porównawczych składników olejków, na których opiera się niniejsza praca, umożliwiając jednocześnie wykonywanie analiz składników monoterpenowych nawet z bardzo niewielkich ilości surowców.
- Stworzone w wyniku realizacji pracy oprogramowanie ChromNET w znacznym stopniu ułatwia analizę i archiwizację dużych ilości danych analitycznych. Dostęp do kodu źródłowego stwarza praktycznie nieograniczone możliwości jego rozbudowy w ramach przyszłych projektów. Obsługa wielu niezależnych kont użytkowników może okazać się bardzo pomocna przy współpracy naukowo badawczej z innymi jednostkami lub do niezależnej obsługi wielu użytkowników z jednostki macierzystej autora. Wizualizacja i wizualna edycja danych chromatograficznych przy użyciu grafiki wektorowej w formacie Macromedia Flash oraz możliwość udostępniania wyników analiz chromatograficznych w sieci Internet stanowi unikalną cechę stworzonego oprogramowania.

PIŚMIENICTWO

- Angioni A, Barra A, Russo MT, Coroneo V, Dessi S, Cabras P., 2003, Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10):3073–3078
- Arimura G., Ozawa R., Nishioka T., Boland W., Koch T., Kuhnemann F., Takabayashi J., 2002, Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants, *The Plant Journal*, 29(1):87–98
- Arthur C.L., Pawliszyn J., 1990, Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, *Anal Chem*, 62:2145–2148
- Arunachalam, S., Gunasekaran A., Ngum S.M., Gill K.F., O'Sullivan J.M., 1999, Taguchi-Controlled Knowledge-Based Assistant for improving Quality of Hollow Cylindrical Sections, *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 15:503–508
- Asztemborska M, Ochocka J.R., 2002, Chiral monoterpenoids in plants—enantioselective chromatographic analysis and their bioactivity, *Studies in Natural Products Chemistry – Bioactive Natural Products*, part H (tom 27), red. Atta-ur-Rahman, Elsevier–Amsterdam, 361–391
- Atkinson L., 2000, PHP3, Wydawnictwo Helion, Gliwice
- Babiński J., 1974, Jałowiec pospolity i jego rola w lesie, PWRiL, Warszawa
- Baier P., Führer E., Kirisits T., Rosner S., , Defence reactions of Norway spruce against bark beetles and the associated fungus *Ceratocystis polonica* in secondary pure and mixed species stands, *Forest Ecology and Management*, 159:73–86
- Ball B., 1999, *Poznaj Linux*, Wydawnictwo Informatyczne Mikom, Warszawa
- Banhorpe D.V., Njar V.C.O., 1984, Light-dependent monoterpene synthesis in *Pinus radiata* cultures, *Phytochemistry*, 23:2:295–299
- Berrueta L., Gallo B., 1990, A review of solid phase extraction, *Chromatografia*, 40:474–483
- Bicchi C., D'Amato A., Rubiolo P., 1999, Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields, *Journal of Chromatography A*, 843:99–121
- Bichao H., Borg-Karlson A., Araujo J., Mustaparta H., 2003, Identification of plant odours activating receptor neurones in the weevil *Pissodes notatus* F. (*Coleoptera, Curculionidae*), *Journal of comparative physiology A*, 189:203–212
- Boczek J., Brzeski M., Kropczyńska-Linkiewicz D., 2000, *Wybrane działy zoologii*, PWN, Warszawa
- Bohlmann J., Crock J., Jetter R. Croteau R., 1998, Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound inducible (E)-alpha-bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*), *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:6756–6761
- Bonn B., Moortgat G.K., 2003, Sesquiterpene ozonolysis: origin of atmospheric new particle formation from biogenic hydrocarbons, *Geophysical Research Letters*, 30:1585
- Butzen F., Forbes D., 1999, *Linux – bazy danych*, Wydawnictwo Informatyczne Mikom, Warszawa

- Byers J.A., 1992, Attraction of bark beetles, *Tomicus piniperda*, *Hylurgops palliatus*, and *Trypodendron domesticum* and other insects to short-chain alcohols and monoterpenes, *Journal of Chemical Ecology*, 18:2385-2402
- Byers J.A., 1981, Pheromone biosynthesis in the bark beetle, *Ips paraconfusus*, during feeding or exposure to vapours of host plant precursors., *Insect Biochemistry*, 11:563-569
- Byers J.A., Birgersson G., Lufqvist J., Bergstrum G., 1988, Synergistic pheromones and monoterpenes enable aggregation and host recognition by a bark beetle, *Pityogenes chalcographus*., *Naturwissenschaften*, 75:153-155
- Byers J.A., Lanne B.S., Lufqvist J., Schlyter F., Bergstrum G., 1985, Olfactory recognition of host-tree susceptibility by pine shoot beetles, *Naturwissenschaften*, 72:324-326
- Cardé R.T., Millar J.G., 2004, *Advances in Insect Chemical Ecology*, Cambridge University Press, Cambridge
- Ceskoslovensky Lekopis- vydani ctvarte, 1987, tom 2, Praga
- Chalchat J.C., Garry R.P., Michet A., Remery A., 1986, The essential oils of two chemotypes of *Pinus sylvestris*, *Phytochemistry*, 24:2443-2444
- Chermanskaya T.D., 1999, Application of Biologically Active Compounds from Pine and Spruce Needles for Plant Protection, *Agricultural Chemistry*, 3:2:137-141
- Close D.C., McArthur C., 2002, Rethinking the role of many plant phenolics - protection form photodamage not herbivores?, *Oikos*, 99:166-172
- D. Sybilska, M. Asztemborska, J. Kowalczyk, J. R. Ochocka, G. Perez, L. Ossicini, 1994, Enantiomeric composition of terpenic hydrocarbons in essential oils from *Juniperus communis* L., *Journal of Chromatography*, 659:389-394
- Danesh A., 1997, JavaScript, Wydawnictwo Helion, Gliwice
- Dement W.A., Raven P.H., 1974, *Nature*, 252:705-706
- Deutsches Arzneibuch, 1998, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart
- Dolgin M.M., 1993, Biology of *Megastigmus bipunctatus* Sweed (*Hymenoptera*, *Torymidae*) in Komi Republic., *Энтомологическое Обозрение*, 3:543-548
- Dybkowski Z., 2001, PostgreSQL, Wydawnictwo Helion, Gliwice
- European Pharmacopoeia IV, 2002, Published in accordance with the convention of European Pharmacopoeia (European Treaty Series no 50)
- Farmakopea Polska tom VI, 2002, PTF, Warszawa
- Farmakopea Polska tom III, 1954, PZWL, Warszawa
- Fäldt J., Martin D., Miller B., Rawat S., Bohlmann J., 2003, Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): Methyl jasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and functional characterization of (+)-3-carene synthase, *Plant Molecular Biology*, 51:117-133
- Filipowicz N, Kamiński M., Kurlenda J., Asztemborska M., Ochocka J.R., 2003, Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected compounds, *Phytotherapy Research*, 17:227-231

- Frank Cheng-Yu Wang, 1997, An HTML Approach to Creating and Maintaining a Chromatography Database, *Analytical Chemistry*, 69:667A-671A
- Gang D.R., Kasahara H., Xia Z., Mijnsbrugge K.V., Bauw G., Boerjan W., Montagu M.V., Davin L.B., Lewis N.G., 1999, Evolution of Plant Defense Mechanisms, *The Journal of Biological Chemistry*, 274:11:7516-7527
- Garcia D., 1998, Interaction between juniper *Juniperus communis* and its fruit pest insects: pest abundance, fruit characteristics and seed viability., *Acta Oecologica*, 19 (6):517-525
- Halarewicz-Pacan A., Gabryś B., Dancewicz K., Wawrzeńczyk C., 2003, Enantiomeric effect of limonene and limonene-derived bicyclic lactones on settling and probing behaviour of the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.), *Journal of Plant Protection Research*, 43:2:133-142
- Harborne J. B., 1997, *Ekologia biochemiczna*, PWN, Warszawa
- Haynes K.F., Millar J.G., 2000, *Methods in Chemical Ecology – Bioassay Methods*, Kluwer Academic Publishers, Londyn
- Hilton C., Willis J., 2000, *PHP3 Internetowe aplikacje bazodanowe*, Wydawnictwo Helion, Gliwice
- Holopainen J. K., 2004, Multiple functions of inducible plant volatiles, *Trends in Plant Science*, 9:11:529-533
- Holopainen J.K., Kainulainen P., 2004, Reproductive capacity of the grey pine aphid and allocation response of Scots pine seedlings across temperature gradients: a test of hypotheses predicting outcomes of global warming, *Canadian Journal of Forest Research*, 34: 94-102
- Jambor J., 2001, Kierunki rozwoju krajowego rynku surowców i przetworów zielarskich, *Wiadomości Zielarskie*, 10: 1-7
- Jaśkiewicz B., 2000, Aphids colonising the shrubs of *Juniperus communis* L. and *Rosa canina* L. in urban conditions., *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 3;2 (<http://www.ejpau.media.pl/series/volume3/issue2/horticulture/art-02.html>)
- Kainulainen P., Utriainen J., Holopainen J.K., Oksanen J. Holopainen T., 2000, Influence of elevated ozone and limited nitrogen availability on conifer seedlings in an open-air fumigation system: effects on growth, nutrient content, mycorrhiza, needle ultrastructure, starch and secondary compounds, *Global Change Biology*, 6:345-355
- Kapuściński S., 1946, Znamionek jałowcowy *Megastigmus kuntzei* n. sp. szkodnik nasion jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.), Instytut Badawczy Leśnictwa, Rozprawy i sprawozdania, Kraków
- Khan M.B., Harborne J.B., 1991, A comparison of the effect of mechanical and insect damage on alkaloid levels in *Atropa acuminata*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 19:529-534
- Koehler W., Schnaider Z., 1972, *Owady naszych lasów*, PWRiL, Warszawa
- Kohlmünzer S., 1998, *Farmakognozja*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa
- Kołodziejczyk A., 2003, *Naturalne związki organiczne*, PWN, Warszawa
- Kordana S. i Kordana T., 1999, ABC... uprawowych roślin zielarskich, *Wiadomości Zielarskie* (seria artykułów)

- Koukos P. K., Papadopoulou K. I., 1997, P. K. Koukos, K. I. Papadopoulou Essential oil of *Juniperus communis* L. grown in Northern Greece: variation of fruit oil yield and composition., Journal of Essential Oil Research, 9:35-39
- Langa W., 2002, Wpływ wybranych czynników zewnętrznych na trwałość trans-anetolu - rozprawa doktorska, Akademia Medyczna w Gdańsku, Gdańsk
- Langenheim J.H., 1994, Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles, Journal of Chemical Ecology, 20:6:1223-1280
- Laurie B., Laurie P., 2000, Apache - przewodnik encyklopedyczny, Wydawnictwo Helion, Gliwice
- Li M.H.C., 2000, Quality Loss Function Based Manufacturing Process Setting Models for Unbalanced Tolerance Design, International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 16:39-45
- Llusia J., Penuelas J., 2000, Seasonal patterns of terpene content and emission from seven Mediterranean woody species in field conditions, American Journal of Botany, 87(1):133-140
- Lockwood G.B., 2001, Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices, Journal of Chromatography A, 936:23-31
- Loreto, F., Nascetti P., Graverini A., Mannozi M., 2000, Emission and content of monoterpenes in intact and wounded needles of the Mediterranean Pine, *Pinus pinea*, Functional Ecology, 14:589-595
- Loughrin J.H., Manukian A., Heath R.R., Turlings T.C.J., Tumlinson J.H., 1994, Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 91:11836-11840
- Marritt P.J., Shellie R., Cornwell C., 2001, Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, Journal of Chromatography A, 936:1-22
- Martin D.M., Gershenzon J., Bohlmann J., 2003, Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce, Plant physiology, 132(3):1586-1599
- McKay S.A.B., Hunter W.L., Godard K., Wang S.X., Martin D.M., Bohlmann J., Plant A.L., 2003, Insect Attack and Wounding Induce Traumatic Resin Duct Development and Gene Expression of (-)-Pinene Synthase in Sitka Spruce, Plant Physiology, 133:368-378
- Millar J.G., Haynes K.F., 2000, Methods in Chemical Ecology - Chemical Methods, Kluwer Academic Publishers, Londyn
- Mindrup R.F., 1995, New Applications for SPME/Capillary GC: Screening for Amphetamines in Urine; Identifying Tobacco Varieties; Monitoring Nitrogen-Containing Herbicides in Water, SUPELCO, 6:
- Miszta A., 1987, Volatile oils analysis of spruce galls caused by *Sacchiphantes viridis* Ratz, Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 6:3:447-453
- Moock C., 2003, ActionScript - przewodnik encyklopedyczny, Wydawnictwo Helion, Gliwice
- Moraczewski i in., 2000: Moraczewski I. R., Sudnik-Wójcikowska B., Dubielecka B., Rutkowski L., Nowak K. A., Borkowski W., Galera H., Flora Ojczysta - rośliny pospolite, chronione, ciekawe, 2000
- Musciano C., Kennedy B., 1998, HTML - podręcznik użytkownika, Oficyna Wydawnicza READ ME, Łódź

- Newall C.A., Anderson L.A., Phillipson J.D., 1996, Herbal Medicine – A Guide for Health-care Professionals, The Pharmaceutical Press, London
- Ngo S.P., Choo L.E.W., Pang F.Y., Huang Y., Kini M.R., Ho S.H., 1999, Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.), Pesticide Science, 54:3:261–268
- Noori H., 1998, The Taguchi methods: Achieving design and output quality, The Academy of Management Executive, 3:322–326
- Norin T., 1996, Chiral chemodiversity and its role for biological activity. Some observations from studies on insect/insect and insect/plant relationships., Pure and Applied Chemistry, 68:11:2043–2049
- Ochocka J.R., 1993, Nowe techniki analityczne w metodach standaryzacji olejków eterycznych – rozprawa habilitacyjna, Akademia Medyczna w Gdańsku, Gdańsk
- Ochocka J.R., Asztemborska M., Sybilska D., Langa W., 2002, The determination of enantiomers of terpenic hydrocarbons in essential oils obtained from the species of *Pinus* and *Abies*, Pharmaceutical Biology, 40:395–399
- Ochocka J.R., Asztemborska M., Zook D.R., Sybilska D., Perez G., Ossicini L., 1997, Enantiomers of monoterpenic hydrocarbons in essential oils from *Juniperus communis*, Phytochemistry, 44(5):439–445
- Paré P.W., Tumlinson J.H., 1999, Plant Volatiles as a Defence against Insect Herbivores, Plant Physiology, 121:325–331
- Persson M., Sjödin K., Borg-Karlson A., Norin T., Ekberg I., 1996, Relative amounts and enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in xylem and needles of *Picea abies*, Phytochemistry, 42:5:1289–1297
- Praca zbiorowa pod red. S. Pruszyńskiego, 2003, Zalecenia Ochrony Roślin na lata 2004/05, część IV (rośliny ozdobne, rośliny zielarskie), Instytut Ochrony Roślin, Poznań
- Priemé A., Knudsen T.B., Glasius M., Christensen S., 2000, Herbivory by the weevil, *Strophosoma Melanogrammum*, causes several-fold increase in emission of monoterpenes from young Norway spruce (*Picea abies*), Atmospheric Environment, 34:711–18
- Remmert H., 1985, Ekologia, PWRiL, Warszawa
- Renwick J.A., Hughes P.R., Krull I.S., 1976, Selective production of cis and trans-verbenol from (–)- and (+)-alpha-pinene by bark beetle., Science, 191(4223):199–201
- Restek Corporation, 1997, A Guide to the Analysis of Chiral Compounds by GC, Restek Corporation (www.restek.com)
- Rohmer M., 1999, The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants., Natural Product Research, 16:565–574
- Roques A., Skrzypczyńska M., 2003, Seed-infecting chalcids of the genus *Megastigmus* Dalman, 1820 (*Hymenoptera: Torymidae*) native and introduced to the West Palearctic region: taxonomy, host specificity and distribution, Journal of Natural History, 37:127–238

- Rose A.H., Lindquist O.H., Nystrom K.L., 2000, Insects of Eastern Larch, Cedar and Juniper, National Resources Canadian Forest Service, Ottawa
- Ruzicka L., 1954, The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds., *Experientia*, 9(10): 357-67
- Sanchez de Medina F., Ganez M.J., Osuna J.I., Zarzuelo A., 1993, Hypoglycemic Activity of Juniper Berries, *Planta Medica*, 60:197-200
- Schäfer B., Henning P., Engewald W., 1995, Analysis of Monoterpenes from Conifer Needles using Solid Phase Microextraction, *J. High. Resol. Chromato.*, 18:587-592
- Schurig V., 2002, Chiral separations using gas chromatography, *Trends in Analytical Chemistry*, 21:647 - 661
- Seneta W., 1981, *Drzewa i krzewy iglaste*, PWN, Warszawa
- Shen B., Zheng Z., Dooner H.K., 2000, A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: characterization of wild-type and mutant alleles., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97(26):14807-14812
- Sigma-Aldrich Co., 1998, Solid Phase Microextraction: Solventless Sample Preparation for Monitoring Flavor Compounds by Capillary Gas Chromatography, *Sigma-Aldrich Bulletin* 869A:1-7
- Sjödín K., Persson M., Borg-Karlson A., Norin T., 1996, Enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in different tissues of four individuals of *Pinus sylvestris* L., *Phytochemistry*, 41;2:439-445
- Sjödín K., Persson M., Norin T., 1993, Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in the wood of healthy and top cut *Pinus sylvestris*, *Phytochemistry*, 32:53-56
- Skrzypczyńska M., 1983, Stan badań owadów uszkadzających nasiona drzew i krzewów leśnych w Polsce, *Wiadomości Entomologiczne*, 1-2:7-15
- Soika G., Kozłowski M., Szydło W., Łabanowski G., 1997, Pogromcy iglaków, *Kwiatnik*, 6 (http://www.ogrodnik.pl/choroby/choroby_03_09.asp)
- StatSoft Inc., 1995, STATISTICA for Windows - Podręcznik elektroniczny programu Statistica (<http://www.statsoft.com.pl/>)
- Steele C.L., Lewinsohn E., Croteau R., 1995, Induced oleoresin biosynthesis in grand fir as a defense against bark beetles., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92:4164-4168
- Steele C.L., Sadanobu K., Bohlmann J., Croteau R., 1998, Regulation of Oleoresinosis in Grand Fir (*Abies grandis*), *Plant Physiology*, 116:1497-1504
- Stocki J., Kinelski S., Dzwonkowski R., 2000, *Drzewa iglaste i owady na nich żerujące*, Multico, Warszawa
- Taguchi G., 1987, *System of experimental design*, UNIPUB/Kraus International, White Plains, NY.
- Thiéry D., Marion-Poll F., 1998, Electroantennogram responses of Douglas-fir seed chalcids to plant volatiles, *Journal of Insect Physiology*, 44:483-490
- Thompson WR, Meinwald J, Aneshansley D, Eisner T., 1972, Flavonols: pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide, *Science*, 177(48):528-530

- Trapp S., Croteau R., 2001, Defensive Resin Biosynthesis in Conifers, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:689–724
- Turlings T.C., Tumlinson J.H., 1992, Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89:8399–8402
- Turlings T.C.J., Loughrin J.H., McCall P.J., Rössler U.R.S., Lewis W.J., Tumlinson J.H., 1995, How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92:4169–4174
- Valterova I., Sjödin K., Vrkoc J., Norin T., 1995, Contents and Enantiomeric compositions of Monoterpene Hydrocarbons in Xylem Oleoresins from Four Pinus Species Growing in Cuba. Comparison of Trees Unattacked and Attacked by *Diorctria horneana*, , 1:1–15
- Vernin G., Boniface C., Metzger J., Ghiglione C., Hammoud A., Kim-Nuor suon, Fraisse D., Parkanyi C., 1998, GC-MS-Secma Bank Analysis of *Juniperus communis* Needles and Berries., *Phytochemistry*, 4:1061–1064
- von Frish K., 1950, Bees, Their vision, Chemical Senses and Language, Cornell, Itaca, New York
- Wang, X., Lui, Y-S., Nair, U.B., Armstrong, D.W., Ellis, B., Williams, K.M., 1997, Enantiomeric Composition of Monoterpenes in Conifer Resins, *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(23):3977–3984
- Weissmann G., Lange W., 1990, A Carene-free Chemotype of *Pinus sylvestris* L., *Phytochemistry*, 29; 9:2897–2898
- Wibe A., Borg-Karlson A.K., Persson M., Norin T., Mustaparta, H., 1998, Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in some conifers and receptor neuron discrimination of α -pinene and limonene enantiomers in the pine weevil, *Hylobius abietis*., *Journal of Chemical Ecology*, 24:273–287
- Witkiewicz Z., Hetper J., 2001, *Chromatografia gazowa*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa
- Wolley C., Mindrup R., 1996, Solid Phase Microextraction: Rapid and Versatile Extraction for GC or HPLC Applications, SUPELCO, 3 (www.sigmaaldrich.com)
- Wrzeciono U., Zaprutko L., 2001, *Chemia związków naturalnych - zagadnienia wybrane*, Dział Wydawnictw Uczelnianych Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań
- Yazdani R, Nillson J.E., Ericsson Y., 1985, Geographical variation in the relative proportion of monoterpenes in cortical oleoresin of *Pinus sylvestris* on Sweden, *Silvae Genetica*, 34:201–208
- Yazdani R. , Nillson J.E., 1986, Cortical monoterpene variation in natural populations of *Pinus sylvestris* in Sweden, *Scandinavian Journal of Forest Research*, 1:85–93
- Yazdani R., Rudin D., Alden T., Lindgren D., Harbom B., Ljung H., 1982, Inheritance pattern of five monoterpenes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), *Hereditas*, 97:261–272
- Zieliński S., 1997, Jałowiec pospolity, *Juniperus communis* L., interesująca roślina żywicielska, *Przegląd Zoologiczny*, XLI:3–4

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania tej pracy.

W szczególności chciałbym serdecznie podziękować:

- prof. dr hab. J. Renacie Ochockiej za opiekę merytoryczną, optymizm i zrozumienie dla wszystkich dziwnych rzeczy, którymi się zajmowałem.
- współpracownikom z Katedry i Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku za pomoc i radę, w szczególności mgr Magdalenie Smoleń, mgr Natalii Filipowicz, mgr Dariuszowi Markowi i dr Adamowi Bogdanowi – bez Waszej pomocy ciągle jeszcze byłoby daleko do końca.
- mojej rodzinie – szczególnie Mamie i Cioci, które zawsze starały się pomóc, na ile potrafiły.
- mgr Sylwii Wojciechowicz, mgr Zygmunta Jamrógiewiczowi, dr Michałowi Markuszewskiemu i dr Tomaszowi Bączkowi za pomoc w zrozumieniu istoty testów statystycznych.

Szczególnie serdecznie dziękuję mgr Annie Majewskiej za cierpliwość, zrozumienie, i za to, że zmarznięte ręce i przemoczzone nogi nie zniechęciły jej aby mi towarzyszyć podczas wypraw do lasu niezależnie od pogody i pory roku.

Bardzo dziękuję także naukowcom z innych uczelni, którzy mimo braku czasu, bezinteresownie okazali mi wiele pomocy przy identyfikacji owadów będących obiektem badań opisanych w niniejszej pracy:

- prof. dr hab. Małgorzacie Skrzypczyńskiej (Katedra Entomologii Leśnej, Wydział Leśny, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie) – zawsze chętnie odpowiadającej na wszelkie pytania związane ze znamionkiem jałowcowym.
- dr Jarmo Holopainenowi (Department Ecology and Environmental Science, University of Kuopio, Finland) – za nieocenioną pomoc w oznaczeniu gatunku mszyc będących obiektem tej pracy.
- Alpo Peltari (Laboratory of Electron Microscopy, University of Kuopio, Finland) – za wykonanie i udostępnienie zdjęć mikroskopowych w celu ostatecznego potwierdzenia identyfikacji gatunku mszycy miodownicy sosnowej.
- dr Wojciechowi Gilce (Katedra Zoologii Bezkręgowców, Uniwersytet Gdański) – za fachową konsultację entomologiczną.

Autor

DODATEK A - szczegółowe dane wejściowe

W dodatku tym zawarto szczegółowe dane wejściowe otrzymane w wyniku analiz chromatograficznych przeprowadzonych w toku niniejszej pracy. Dane te zostały wykorzystane przy analizach statystycznych, które były podstawą do sformułowania wniosków.

W dodatku tym zamieszczono zarówno dane otrzymane w wyniku realizacji głównych celów pracy jak i dane otrzymane przy testowaniu powtarzalności użytej metody. Uwzględniono dane uzyskane w wyniku analiz chromatograficznych przeprowadzonych w warunkach achiralnych jak i chiralnych.

1 Badania sezonowych zmian składu związków monoterpenowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)

Tabela nr 42 Wyniki analiz chromatograficznych składników monoterpenu liści szpilkowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) otrzymane w ramach badań zmienności sezonowej składu (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

osobnik	miesiąc zbioru	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	para-cymen + α -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
względna zawartość procentowa uzyskana na podstawie analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych														stosunek procentowy enancjomerów wyznaczony na podstawie analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych		
1A (droga)	I	55,7	6,81	0,67	2,44	2,67	0,08	27,64	1,07	0,32	2,59	0,02	0	[23/77]	[19/81]	[79/21]
	II	56,7	9,11	0,75	3,66	2,96	0,08	22,84	1,11	0,3	2,48	0,02	0	[24/76]	[17/83]	[76/24]
	III	55,52	8,01	0,85	2,97	2,86	0,08	25,62	1,07	0,32	2,69	0,02	0	[25 /75]	[16/84]	[75/25]
	IV	56,61	8,65	0,75	3,18	2,93	0,08	23,73	1,18	0,31	2,57	0	0	[25/75]	[17/83]	[79/21]
	V	58,36	9,17	0,78	3,44	2,95	0,08	21,63	1,11	0,29	2,18	0,02	0	[25/75]	[17/83]	[74/26]
	VII	57,89	9,15	0,72	3,21	2,89	0,08	22,44	1,08	0,26	2,23	0,05	0	[25/75]	[17/83]	[74/26]
	VIII	51,91	7,27	1,09	2,69	2,92	0,09	29,23	1,11	0,37	3,3	0,03	0	[21/79]	[23/77]	[84/16]
	IX	50,21	7,21	1,19	2,81	2,78	0,08	30,91	1,12	0,37	3,3	0,02	0	[23/77]	[21/79]	[81/19]
	X	53,43	8,77	1,02	3,21	3,05	0,09	25,8	1,19	0,35	3,06	0,03	0	[24/76]	[18/82]	[81/19]
	XI	48,87	6,45	1,11	2,41	2,69	0,09	33,37	1,17	0,38	3,45	0,02	0	[21/79]	[23/77]	[89/11]
	XII	53,05	7,3	0,92	2,67	2,68	0,08	28,98	1,09	0,34	2,87	0,03	0	[23/77]	[22/78]	[82/18]
	1B (las)	I	50,05	6,43	1	2,29	2,55	0,08	32,81	1,05	0,39	3,33	0,02	0	-	-
II		44,21	4,38	0,98	1,74	2,35	0,11	40,42	1,12	0,45	4,21	0,02	0	-	-	-
III		46,55	5,26	1,15	1,97	2,64	0,08	37,07	1,06	0,42	3,77	0,02	0	-	-	-
IV		52,63	7,21	0,98	2,54	2,76	0,09	29,02	1,14	0,37	3,23	0,04	0	-	-	-
V		55,1	7,21	0,85	2,52	2,79	0,09	27,3	1,03	0,3	2,78	0,03	0	-	-	-
VII		47,73	5,28	1,04	1,96	2,55	0,08	36,26	1,04	0,39	3,64	0,02	0	-	-	-
VIII		50,59	6,89	0,93	2,52	2,76	0,09	31,24	1,11	0,38	3,47	0,03	0	-	-	-
IX		47,13	4,94	0,88	1,85	2,27	0,08	37,81	1,02	0,38	3,64	0,02	0	-	-	-
X		45,06	4,88	0,93	1,9	2,55	0,09	38,89	1,1	0,44	4,13	0,03	0	-	-	-
XI		49,13	5,77	1,01	2,13	2,65	0,08	34,32	1,07	0,37	3,42	0,04	0	-	-	-
XII		51,09	5,9	0,79	2,37	2,56	0,09	32,57	1,14	0,36	3,1	0,03	0	-	-	-

osobnik	miesiąc zbioru	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	para-cymen + α -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
2	I	34,14	5,58	1,59	2,78	3,3	0,1	44,81	2,44	0,51	4,73	0,03	0	-	-	-
	II	35,14	5,51	1,53	2,6	3,05	0,09	44,73	2,45	0,48	4,4	0,02	0	-	-	-
	III	36,32	6,21	1,53	2,68	3,19	0,09	42,95	2,47	0,43	4,12	0	0	-	-	-
	IV	39,99	6,81	1,2	3,27	2,94	0,09	39,78	1,99	0,38	3,53	0,02	0	-	-	-
	V	35	5,86	1,43	2,56	3,06	0,09	46,02	1,92	0,36	3,66	0,04	0	-	-	-
	VII	34,5	5,17	1,61	2,43	2,99	0,09	46,41	2,13	0,42	4,21	0,04	0	-	-	-
	VIII	34,36	5,53	1,55	2,46	3,16	0,1	44,61	2,85	0,52	4,84	0,02	0	-	-	-
	IX	31,76	3,78	1,75	2,36	3,09	0,09	48,48	2,7	0,59	5,39	0,02	0	-	-	-
	X	32,22	4,64	1,71	2,14	3,21	0,1	47,87	1,91	0,6	5,57	0,03	0	-	-	-
	XI	33,63	5,07	1,67	2,24	3,18	0,11	46,54	1,87	0,56	5,1	0,03	0	-	-	-
	XII	31,91	4,58	1,59	2,19	2,98	0,1	49,01	1,98	0,56	5,08	0,03	0	-	-	-
	3	I	28,28	2,42	1,28	1,02	2,46	0,1	57,76	1,03	0,55	5,09	0	0	[19/81]	[26/74]
II		30,51	2,37	1,36	0,98	2,36	0,07	55,96	1,02	0,51	4,85	0,01	0	[20/80]	[23/77]	[89/11]
III		27,91	2,29	1,44	0,97	2,51	0,1	58	1,05	0,55	5,18	0	0	[20/80]	[16/84]	[89/11]
IV		31,85	2,34	1,11	0,97	2,23	0,07	55,27	1,02	0,49	4,65	0	0	[19/81]	[22/78]	[88/12]
V		33,26	4,03	1,35	1,53	2,79	0,08	50,11	1,19	0,5	5,16	0	0	[22/78]	[19/81]	[82/18]
VII		25,98	2,16	1,78	0,97	2,65	0,07	58,48	1,13	0,65	6,11	0,02	0	[18/82]	[28/72]	[89/11]
VIII		27,96	2,51	1,6	1,08	2,71	0,1	56,36	1,14	0,61	5,9	0,03	0	[17/83]	[21/79]	[90/10]
IX		28,35	2,65	1,59	1,14	2,59	0,08	56,18	1,11	0,58	5,71	0,02	0	[18/82]	[26/74]	[88/12]
X		29,81	3,02	1,48	1,25	2,63	0,08	54,15	1,15	0,58	5,78	0,06	0	[18/82]	[23/77]	[89/11]
XI		29,46	2,87	1,54	1,21	2,61	0,08	55,04	1,09	0,56	5,51	0,02	0	[18/82]	[30/70]	[89/11]
XII		31,13	3,32	1,29	1,33	2,58	0,09	53,34	1,16	0,53	5,2	0,03	0	[21/79]	[27/73]	[85/15]
4		I	43,4	7,9	0,72	3,31	3,55	0,1	35,77	2,2	0,27	2,62	0,03	0,13	-	-
	II	42,52	7,77	0,76	3,15	3,52	0,1	37,01	2,02	0,26	2,63	0,06	0,2	-	-	-
	III	40,49	7,16	0,79	3,21	3,68	0,1	38,75	2,42	0,3	2,89	0,05	0,17	-	-	-
	IV	45,26	7,39	0,76	3,08	3,39	0,09	35,2	2,15	0,21	2,14	0,09	0,24	-	-	-
	V	40,72	7,23	0,49	3,11	3,43	0,07	39,36	2,64	0,3	2,62	0,02	0	-	-	-
	VII	46,14	9,18	0,44	3,72	3,49	0,07	32,96	1,86	0,19	1,69	0,03	0,22	-	-	-
	VIII	37,11	5,54	1,25	2,66	3,43	0,11	42,69	2,21	0,48	4,53	0	0	-	-	-
	IX	36,36	6,26	1,14	2,84	3,94	0,11	41,91	2,63	0,47	4,35	0	0	-	-	-
	X	37,17	5,58	1,06	2,76	3,46	0,1	42,53	2,44	0,47	4,39	0,03	0	-	-	-
	XI	37,36	5,56	0,99	2,72	3,45	0,1	42,64	2,51	0,46	4,21	0	0	-	-	-
	XII	40,01	6,5	0,88	2,96	3,37	0,1	39,81	2,1	0,43	3,84	0	0	-	-	-

osobnik	miesiąc zbioru	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	para-cymen + α -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
5	I	84,52	6,86	0,2	3,15	2,6	0,05	0,08	1,7	0,09	0,67	0	0,09	[22/78]	[23,77]	[83/17]
	II	84	8,08	0,18	3,26	2,39	0,04	0,1	1,35	0,06	0,45	0,01	0,06	[24/76]	[20/80]	[76/24]
	III	84,15	6,95	0,15	3,81	2,54	0,05	0,13	1,58	0,07	0,5	0,02	0,06	[24/76]	[17/83]	[82/18]
	IV	85,41	6,32	0,28	2,87	2,43	0,05	0,18	1,53	0,09	0,74	0,02	0,09	[24/76]	[25/75]	[79/21]
	V	83,66	8,23	0,18	3,33	2,5	0,04	0,13	1,35	0,06	0,46	0,01	0,05	[24/76]	[20/80]	[74/26]
	VII	84,82	6,85	0,25	3,22	2,39	0,04	0,07	1,48	0,07	0,69	0,02	0,08	[23/77]	[22/78]	[63/37]
	VIII	85,07	6,47	0,27	3,11	2,44	0,04	0,14	1,69	0,07	0,57	0,03	0,1	[21/79]	[25/75]	[80/20]
	IX	84,51	6,58	0,29	3,44	2,44	0,05	0,2	1,53	0,09	0,73	0,02	0,11	[23/77]	[21/79]	[78/22]
	X	83,89	7,63	0,2	3,32	2,4	0,05	0,09	1,57	0,08	0,66	0,02	0,09	[24/76]	[21/79]	[80/20]
	XI	84	7,36	0,29	3,15	2,55	0,05	0,18	1,57	0,08	0,66	0,01	0,1	[22/78]	[21/79]	[80/20]
	XII	84,67	6,87	0,21	3,02	2,34	0,06	0,31	1,53	0,09	0,77	0,02	0,11	[23/77]	[26/74]	[83/17]
	6	I	67,65	4,85	0,56	1,96	2,15	0,06	18,73	1,22	0,29	2,48	0,04	0	-	-
II		65,32	3,97	0,65	1,71	2,06	0,06	22,24	1,21	0,29	2,46	0,03	0	-	-	-
III		70,07	3,62	0,33	1,61	1,81	0,05	19,36	1,03	0,22	1,87	0,02	0	-	-	-
IV		70,26	4,7	0,41	1,86	2,14	0,06	17,11	1,32	0,22	1,9	0,03	0	-	-	-
V		74,19	7,35	0,45	2,58	2,39	0,04	9,44	1,41	0,16	1,95	0,03	0	-	-	-
VII		61,21	3,59	0,89	1,76	2,16	0,07	25,06	1,58	0,36	3,28	0,04	0	-	-	-
VIII		67,11	4,66	0,75	1,99	2,26	0,06	18,96	1,27	0,29	2,61	0,05	0	-	-	-
IX		65,73	3,4	0,66	1,71	1,84	0,06	22,67	1,11	0,28	2,5	0,04	0	-	-	-
X		66,63	4,21	0,64	1,85	2,21	0,06	20,16	1,25	0,29	2,66	0,04	0	-	-	-
XI		68,4	4,6	0,62	2,01	2,03	0,07	18,33	1,3	0,26	2,33	0,04	0	-	-	-
XII		65,94	4,38	0,64	1,92	2,1	0,07	20,32	1,91	0,28	2,4	0,05	0	-	-	-

2 Badania wpływu żerowania mszycy miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) na związki monoterpenowe w pędach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)

Tabela nr 43 Wyniki analiz chromatograficznych składników monoterpenuowych młodych pędów sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) otrzymane w ramach badań wpływu żerowania mszycy miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej. Zestawienie obejmuje materiał zebrany w roku 2002 (wiersze tabeli oznaczone kolorem szarym) oraz w roku 2003 (bez wypełnienia). (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	β -pinen + sabinen	myrcen	α -felandren	3-karen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	para-cymen + α -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
	względna zawartość procentowa uzyskana na podstawie analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych											stosunek procentowy enantiomerów wyznaczony na podstawie analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych		
s01c	9,04	0,31	3,32	1,42	0,66	72,67	6,21	0,57	5,74	0,06	0	[24/76]	[60/40]	[88/12]
s01z	9,85	0,34	3,38	0,99	0,91	72,19	5,9	0,58	5,79	0,07	0	[20/80]	[51/49]	[88/12]
s02c	6,93	0,27	3,1	2,7	0	74,16	5,52	0,69	6,56	0,06	0	[23/77]	[0/100]	[92/8]
s02z	11,3	0,57	2,88	2,87	0	69,21	6,24	0,68	6,16	0,09	0	[22/78]	[0/100]	[93/7]
s03c	10,35	0,31	3,96	2,46	0	74,48	1,08	0,66	6,62	0,08	0	[15/85]	[3/97]	[83/17]
s03z	16,5	0,59	2,38	2,11	0,04	72,04	1,06	0,68	4,45	0,16	0	[13/87]	[10/90]	[79/21]
s04c	14,6	2,14	2,96	1,82	0,14	71,74	0,95	0,45	5,03	0,17	0	[32/68]	[9/91]	[92/8]
s04z	8,43	1,18	3,43	1,38	0,82	76,05	1,96	0,63	6,04	0,08	0	[34/66]	[9/91]	[93/7]
s05c	11,94	0,4	2,88	2,66	0,09	68,32	6,19	0,72	6,61	0,19	0	[22/78]	[5/95]	[88/12]
s05z	10,02	0,36	3,53	2,64	0	71,19	5,39	0,7	5,96	0,21	0	[15/85]	[21/79]	[88/12]
s06c	29,52	0,81	5,38	16,03	0	37,59	7,28	0,3	3,02	0,07	0	[24/76]	[9/91]	[77/23]
s06z	26,51	0,85	4,82	16,95	0	39,79	7,14	0,37	3,51	0,06	0	[21/79]	[9/91]	[75/25]
s07c	29,04	0,84	2,18	2,12	0	58,17	2,49	0,5	4,57	0,11	0	[11/89]	[0/100]	[81/19]
s07z	29,92	0,8	2,02	1,87	0	58,2	2,28	0,45	4,35	0,12	0	[13/87]	[0/100]	[80/20]
s08c	13,96	1,28	3,78	1,46	0,39	73,08	1,63	0,35	3,52	0,55	0	[30/70]	[15/85]	[95/5]
s08z	17,59	1,9	3,27	1,92	0,23	68,23	1,27	0,43	4,85	0,31	0	[29/71]	[15/85]	[94/6]
s09c	22,93	0,86	2,86	1,88	0,24	64,2	1,46	0,46	4,68	0,43	0	[13/87]	[15/85]	[36/64]
s09z	16,8	0,62	3,09	2,09	0,04	70,25	1,09	0,53	5,32	0,18	0	[15/85]	[9/91]	[89/11]
s10c	9,74	0,64	2,38	1,52	0,3	78,66	1,13	0,43	5,03	0,18	0	[26/74]	[0/100]	[88/12]
s10z	7,51	0,46	2,32	2,39	0,11	78,42	1,19	0,68	6,62	0,3	0	[23/77]	[0/100]	[87/13]
s11c	19,87	1,59	2,58	1,96	0,13	66,66	1,52	0,54	4,92	0,23	0	[37/63]	[50/50]	[90/10]
s11z	9,43	0,81	5,64	2,65	0	68,11	7,3	0,58	5,33	0,16	0	[37/63]	[40/60]	[90/10]
s12c	5,46	0,87	3,04	2	0,25	80,47	1,98	0,45	5,23	0,27	0	[67/33]	[0/100]	[95/5]
s12z	5,4	0,64	3,31	2,54	0	77,13	3,68	0,66	6,56	0,08	0	[77/23]	[0/100]	[94/6]
s13c	41,03	1,29	2,81	1,79	0,07	47,18	1,56	0,39	3,78	0,1	0	[16/84]	[6/94]	[87/13]
s13z	24,6	0,88	4,82	2,35	0	56,65	5,87	0,46	4,28	0,09	0	[16/84]	[41/59]	[87/13]
s14c	19,77	0,61	3,1	2,2	0	66,89	1,7	0,56	5,06	0,11	0	[9/91]	[32/68]	[88/12]
s14z	26,62	0,79	2,51	2,1	0	61,09	1,32	0,5	4,96	0,11	0	[9/91]	[25/75]	[87/13]
s15c	30,52	1,23	3,91	9,08	0,15	51,52	0,03	0,28	3,13	0,15	0	[31/69]	[12/88]	[92/8]

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	β -pinen + sabinen	myrcen	α -felandren	3-karen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	para-cymen + α -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
s15z	26,46	1,15	9,92	15,28	0	42,15	1,36	0,34	3,26	0,07	0	[33/67]	[9/91]	[91/9]
s16c	8,95	0,5	6,69	2,63	0	73,02	1,23	0,62	6,27	0,09	0	[23/77]	[0/100]	[89/11]
s16z	7,85	0,72	6,56	2,69	0	74,35	1,26	0,68	5,77	0,11	0	[27/73]	[0/100]	[88/12]
s17c	8,58	0,57	8,35	2,92	0	43,98	31,53	0,36	3,67	0,05	0	[92/8]	[1/99]	[98/2]
s17z	9,36	0,74	8,08	3,13	0	43,95	30,29	0,41	3,96	0,08	0	[91/9]	[2/98]	[98/2]
s19c	4,37	0,5	5,07	2,76	0	78,61	1,2	0,7	6,74	0,06	0	[54/46]	[45/55]	[83/17]
s19z	6,68	1,16	3,62	2,49	0	78,16	1,26	0,73	5,71	0,19	0	[37/63]	[22/78]	[92/8]
s20	19,59	0,82	6,96	1,67	0,17	63,92	3,44	0,23	2,92	0,28	0	[12/88]	[26/74]	[93/7]
s21	23,5	1,54	5,69	2,39	0	60,31	2,52	0,33	3,6	0,11	0	[83/17]	[14/86]	[95/5]
s22	19,24	1,46	12,51	25,99	0,16	38,78	1,34	0	0,47	0,05	0	[94/6]	[3/97]	[96/4]
s23	11,2	0,63	3,86	2,68	0	70,03	5,2	0,59	5,74	0,07	0	[33/67]	[0/100]	[92/8]
s24	51,92	1,92	2,63	1,08	0,38	35,42	1,85	1,45	2,04	0,25	1,06	[31/69]	[18/82]	[83/17]
s25	14,17	0,73	2,7	1,61	0,25	74,82	1,06	0,33	4,04	0,29	0	[20/80]	[0/100]	[84/16]
s26	26,28	2,1	3,22	2,21	0	59,02	1,85	0,48	4,72	0,12	0	[20/80]	[0/100]	[85/15]
s27	18,98	0,99	2,77	2,23	0	69,59	1,42	0,34	3,52	0,18	0	[16/84]	[0/100]	[89/11]
s28	11,21	0,91	3,35	2,57	0	73,51	1,42	0,67	6,3	0,06	0	[24/76]	[0/100]	[80/20]
s29	14,15	1,4	3,22	1,68	0	73,06	1,01	0,48	4,88	0,13	0	[21/79]	[0/100]	[92/8]
s30	18,65	0,73	2,88	1,64	0,32	69,02	0,04	0,41	4,59	0,67	1,04	[15/85]	[18/82]	[95/5]
s31	15,75	0,75	3,1	2,31	0	68,69	3,2	0,56	5,51	0,12	0	[12/88]	[0/100]	[74/26]
s32	13,26	1,02	3,04	1,04	0,42	75,51	1,55	0,19	2,06	0,57	1,32	[25/75]	[23/77]	[75/25]
s33	4,23	0,23	3,27	2,76	0	78,05	2,3	0,81	8,18	0,16	0	[18/82]	[7/93]	[86/14]
s34	7,33	0,55	2,26	2,01	0,06	80,26	1,12	0,56	5,52	0,33	0	[25/75]	[0/100]	[70/30]
s02'	11,78	0,83	3,14	2,96	0,05	65,27	5,05	0,97	9,88	0,09	0	[19/81]	[20/80]	[95/5]
s04'	4,52	0,85	3,67	3,35	0	73,67	2,21	1,06	10,56	0,11	0	[29/71]	[5/95]	[96/4]
s05'	13,72	0,75	3,69	3,18	0,04	61,28	7,19	0,91	9,15	0,09	0	[18/82]	[9/91]	[89/11]
s15'	21,52	1,55	4,42	17,56	0,05	45,7	1,68	0,67	6,8	0,05	0	[30/70]	[12/88]	[93/7]
s19'	8,44	1,23	3,61	3,28	0	71,66	1,58	0,94	9,21	0,05	0	[35/65]	[9/91]	[91/9]
s25'	11,59	1,01	3,38	3,09	0,05	68,65	1,41	0,97	9,8	0,07	0	[17/83]	[14/86]	[93/7]
s28'	10,4	1,43	3,92	3,18	0,05	68,42	2,05	1,04	9,44	0,07	0	[18/82]	[0/100]	[97/3]
s35	19,19	1,22	5,19	2,98	0,04	56,92	5,99	0,78	7,63	0,05	0	[17/83]	[0/100]	[91/9]
s36	15,31	1,31	6,29	3,27	0,06	42,87	24,56	0,58	5,72	0,03	0	[32/68]	[7/93]	[97/3]
s34'	16,99	0,82	2,77	2,79	0,04	65,17	1,35	0,89	9,08	0,08	0	[10/90]	[30/70]	[92/8]
s37	12,35	2,1	3,49	3,39	0,05	65,8	3,03	0,9	8,84	0,05	0	[26/74]	[6/94]	[97/3]
s38	23,84	2,21	3,36	3,06	0,13	39,32	21,22	0,59	6,22	0,06	0	[25/75]	[18/82]	[95/5]

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	β -pinen + sabinen	myrcen	α -felandren	3-karen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	para-cymen + α -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
s39	18,14	1,81	16,33	14,57	0,1	40,86	1,92	0,59	5,64	0,04	0	[47/53]	[3/97]	[92/8]
s40	9,6	1,56	3,22	2,98	0,05	69,52	2,53	0,96	9,48	0,09	0	[28/72]	[13/87]	[95/5]
s41	18,25	1,94	4,09	11,51	0,09	47,67	8,46	0,73	7,23	0,04	0	[70/30]	[12/88]	[91/9]
s42	16,71	1,86	4,08	17,05	0,08	46,09	7,12	0,63	6,29	0,07	0	[39/61]	[10/90]	[95/5]
s43	10,36	1,76	7,3	2,98	0,06	67	1,42	0,79	8,25	0,08	0	[29/71]	[8/92]	[83/17]
s44	13,65	0,99	2,94	2,82	0,05	67,76	1,52	0,93	9,26	0,07	0	[17/83]	[17/83]	[93/7]
s45	14,38	1,31	11,87	19,66	0,06	43,84	1,91	0,64	6,28	0,04	0	[60/40]	[4/96]	[96/4]
s46	14,87	0,87	2,8	2,76	0	68,08	1,27	0,85	8,45	0,07	0	[12/88]	[26/74]	[86/14]
s47	51,08	1,61	1,76	15,72	0,03	0,04	29,3	0,04	0,41	0,01	0	[17/83]	[35/65]	[93/7]
s48	43,35	1,45	2,12	42,15	0,05	0,15	10,14	0,07	0,45	0,03	0,06	[18/82]	[31/69]	[96/4]
s49	20,14	1,76	3,04	15,84	0,03	43,7	8,63	0,63	6,18	0,05	0	[68/32]	[15/85]	[96/4]
s50	29,12	1,16	7,25	2,83	0,03	33,75	20,7	0,47	4,67	0,03	0	[28/72]	[11/89]	[89/11]
s51	20,57	0,73	12,57	24,61	0,08	34,22	2,02	0,01	5,13	0,07	0	[21/79]	[4/96]	[76/24]
s52	12,68	1,64	4,07	3,27	0	66,84	3,18	0,74	7,53	0,05	0	[25/75]	[10/90]	[92/8]
s53c	10,61	0,63	2,78	2,61	0,06	70,08	1,47	1,09	10,56	0,12	0	[12/87]	[14/86]	[87/13]
s53z	18,88	1,25	2,7	2,65	0,07	62,22	1,59	0,99	9,55	0,11	0	[11/89]	[22/78]	[86/14]
s54c	28,61	1,06	3,3	64,49	0,05	0,1	2,12	0,04	0,21	0,01	0,01	[65/35]	[14/86]	[92/8]
s54z	29,37	1,69	4,64	61,66	0,05	0,08	2,17	0,06	0,27	0,01	0,01	[71/29]	[9/91]	[88/12]
s55c	4,11	0,16	3,21	3,04	0	71,1	7,2	0,99	10,13	0,06	0	[21/79]	[0/100]	[95/5]
s55z	7,26	0,57	2,76	3,05	0,04	71,72	3,03	1,03	10,49	0,05	0	[25/75]	[0/100]	[95/5]
s56c	9,78	0,98	2,98	3,1	0	70,26	2,56	0,99	9,26	0,07	0	[22/78]	[12/88]	[90/10]
s56z	10,6	1,23	2,93	3,11	0,04	68,81	2,42	1,03	9,74	0,1	0	[22/78]	[17/83]	[89/11]
s57c	13,04	0,4	12,3	2,58	0,08	60,46	1,67	0,85	8,54	0,08	0	[16/84]	[3/97]	[84/16]
s57z	22,36	0,67	6,75	2,39	0,07	57,55	1,49	0,79	7,83	0,1	0	[8/92]	[7/93]	[85/15]
s58c	27,14	1,25	3,2	3,93	0,23	37,71	20,25	0,56	5,66	0,06	0	[28/72]	[17/83]	[95/5]
s58z	26,26	1,28	3,09	3,88	0,17	38,67	19,83	0,6	6,17	0,07	0	[19/81]	[20/80]	[91/9]
s59c	14,04	0,78	3,88	3,22	0,05	45,85	25,12	0,64	6,34	0,08	0	[31/69]	[10/90]	[97/3]
s59z	17,76	0,94	3,55	3,33	0	44,45	23,75	0,6	5,57	0,05	0	[29/71]	[13/87]	[97/3]
s60c	15,2	0,83	13,64	20,74	0,05	38,58	5,25	0,54	5,14	0,03	0	[37/63]	[2/98]	[94/6]
s60z	20,37	1,66	7,83	14,4	0,05	43,01	6,2	0,59	5,83	0,05	0	[27/73]	[4/96]	[94/6]
s61c	12,44	0,73	3,12	2,99	0	68,59	2,73	0,85	8,51	0,05	0	[14/86]	[0/100]	[87/13]
s61z	9,1	0,6	3,1	2,97	0,04	69,69	3,4	0,97	10,06	0,07	0	[15/85]	[0/100]	[86/14]
s62c	3,25	0,52	3,16	3,06	0	77,27	1,32	1,02	10,34	0,06	0	[56/44]	[0/100]	[95/5]
s62z	3,14	0,65	3,06	3,1	0	77,32	1,32	1,01	10,35	0,06	0	[67/33]	[0/100]	[93/7]

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	β -pinen + sabinen	myrcen	α -felandren	3-karen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	para-cymen + α -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
s63c	15,12	1,01	3,02	2,85	0,07	65,97	1,74	0,91	9,26	0,05	0	[18/82]	[15/85]	[94/6]
s63z	10,7	0,71	3	2,92	0,06	69,09	1,96	1	10,51	0,05	0	[17/83]	[20/80]	[93/7]
s64c	15,85	1,17	2,78	3,12	0,06	39,77	31,19	0,55	5,51	0,02	0	[47/53]	[16/84]	[98/2]
s64z	15,53	1,15	2,76	3,07	0,05	39,6	31,8	0,56	5,44	0,03	0	[48/52]	[17/83]	[98/2]
s65c	21,6	0,79	3,19	26,07	0,08	27,21	16,4	0,45	4,18	0,03	0	[31/69]	[16/84]	[96/4]
s65z	29,19	1,41	3,59	22,2	0	25,5	13,6	0,43	4,04	0,04	0	[25/75]	[17/83]	[94/6]
s66c	9,98	0,76	4,33	2,93	0,06	69,53	1,39	0,97	10,01	0,05	0	[20/80]	[11/89]	[92/8]
s66z	8,98	0,7	5,3	2,67	0,05	70,03	1,39	0,96	9,87	0,04	0	[20/80]	[9/91]	[93/7]
s67c	4,77	0,2	8,53	2,96	0,04	46,98	29,21	0,65	6,59	0,07	0	[35/65]	[6/94]	[97/3]
s67z	18,69	1,22	8,54	3,08	0,05	45,99	15,34	0,66	6,4	0,03	0	[35/65]	[7/93]	[96/4]
s68c	26,58	1,67	5,66	2,87	0,06	37,72	19,75	0,53	5,11	0,04	0	[20/80]	[10/90]	[96/4]
s68z	30,12	2,11	3,96	2,9	0,06	37,78	17,2	0,54	5,29	0,04	0	[19/81]	[15/85]	[96/4]
s69c	13,55	1,62	8,3	11,12	0,05	55,69	1,71	0,74	7,19	0,04	0	[67/33]	[3/97]	[84/16]
s69z	10,6	1,35	7,79	13,03	0,05	57,09	1,73	0,76	7,57	0,04	0	[80/20]	[6/94]	[89/11]
s70c	11,29	0,46	3,2	2,88	0,06	67,44	4,93	0,9	8,71	0,13	0	[12/88]	[21/79]	[89/11]
s70z	17,82	0,73	2,98	2,64	0,04	62,27	4,45	0,81	8,12	0,12	0	[10/90]	[23/77]	[92/8]
s71c	9,67	0,42	15,54	7,24	0,09	46,64	12,13	0,7	7,51	0,04	0	[28/72]	[4/96]	[95/5]
s71z	20,47	1,12	10,54	5,6	0,06	46,48	8,14	0,68	6,86	0,05	0	[30/70]	[4/96]	[96/4]
s72c	16,2	0,75	2,81	2,85	0,04	65,07	1,73	0,99	9,49	0,08	0	[11/89]	[23/77]	[88/12]
s72z	9,2	0,39	3,96	2,93	0,05	69,56	2,37	1,07	10,42	0,06	0	[18/82]	[4/96]	[83/17]
s73c	11,45	0,84	2,59	3,34	0,06	37,83	37,49	0,57	5,76	0,07	0	[51/49]	[18/82]	[98/2]
s73z	19,13	1,98	3,17	3,47	0,08	40,51	24,87	0,64	6,04	0,11	0	[43/57]	[20/80]	[97/3]
s74c	25,52	1,66	1,26	2,94	0,08	42,8	18,84	0,62	6,24	0,04	0	[19/81]	[20/80]	[92/8]
s74z	18,69	1,3	2,54	2,86	0,05	42,51	25,27	0,6	6,14	0,05	0	[19,81]	[20/80]	[96/4]
s75c	24,43	1,11	3,76	2,51	0,07	56,95	2,9	0,72	7,44	0,1	0	[9/91]	[21/79]	[83/17]
s75z	13,98	0,65	5,93	2,68	0,04	63,23	4,56	0,78	8,1	0,07	0	[10/90]	[14/86]	[81/19]
s76c	13,53	0,66	2,63	2,89	0,07	66,91	1,46	1,04	10,77	0,05	0	[11/89]	[28/72]	[91/9]
s76z	16,69	0,89	2,66	2,85	0,05	64,32	1,47	0,97	10,05	0,05	0	[12/88]	[36/64]	[89/11]
s77c	16,75	0,64	3,11	2,54	0,03	66,89	1,29	0,77	7,94	0,05	0	[11/89]	[26/74]	[90/10]
s77z	14,07	0,57	3,35	2,55	0	69,14	1,35	0,79	8,11	0,08	0	[11/89]	[17/83]	[88/12]

3 Badania wpływu żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na związki monoterpenowe w szyszkojagodach jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.)

Tabela nr 44 Wyniki analiz chromatograficznych składników monoterpenowych szyszkojagód jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) otrzymane w ramach badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej. Zestawienie obejmuje materiał zebrany w roku 2002 (wiersze tabeli oznaczone kolorem szarym) oraz w roku 2003 (bez wypełnienia)(zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	para-cymen + α -terpinen	limonen	terpinolen	terpinen-4-ol	γ -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
	względna zawartość procentowa uzyskana na podstawie analiz chromatograficznych w warunkach achiralnych												stosunek procentowy enancjomerów wyznaczony na podstawie analiz chromatograficznych w warunkach chiralnych		
j01c	70,45	0,28	0,4	1,19	25,34	0,01	0,01	0,03	1,65	0,56	0,04	0,02	-	-	-
j01z	69,99	0,27	0,39	1,35	25,51	0,01	0,01	0,03	1,75	0,64	0,04	0,02	-	-	-
j02c	92,54	0,35	0,5	1,19	3,4	0,11	0,02	0,16	1,63	0,02	0,06	0	-	-	-
j02z	94,16	0,37	0,59	1,28	1,31	0,12	0,02	0,15	1,76	0,15	0,07	0,03	-	-	-
j03c	76,35	0,42	0,34	2,2	2,67	0,07	0,02	0,11	17,57	0,18	0,06	0,01	-	-	-
j03z	80	0,65	0,21	1,93	0	0,09	0,07	0,19	16,74	0,03	0,08	0,02	-	-	-
j04c	38,65	0,33	21,3	1,29	22,49	0,09	0,05	0,66	10,81	2,96	0,27	1,1	-	-	-
j04z	41,74	0,29	23,68	0,86	20,79	0,04	0,03	0,38	9,33	1,96	0,24	0,66	-	-	-
j05c	72,95	0,36	0,25	1,73	21,94	0,05	0,02	0,08	2,1	0,5	0,03	0,02	-	-	-
j05z	89,76	0,4	0,25	2,13	4,73	0,22	0,02	0,15	2,06	0,21	0,05	0,02	-	-	-
j06c	88,3	0,43	0,55	1,65	6,3	0,12	0,04	0,13	1,95	0,43	0,06	0,03	-	-	-
j06z	88,81	0,43	0,45	1,48	6,73	0,11	0,03	0,09	1,48	0,28	0,06	0,04	-	-	-
j07c	73,83	0,34	0,55	1,28	20,17	0,06	0,04	0,08	2,45	1,08	0,09	0,05	-	-	-
j07z	85,45	0,53	0,29	5,21	4,13	0,25	0,09	0,26	3,08	0,59	0,03	0,09	-	-	-
j08c	51,24	0,26	27,86	1	14,77	0,05	0,03	0,27	2,43	1,4	0,18	0,51	-	-	-
j08z	50,15	0,27	28,25	0,86	15,1	0,05	0,03	0,3	2,56	1,63	0,25	0,54	-	-	-
j09c	91,11	0,54	0,6	1,3	3,99	0,07	0,08	0,11	1,83	0,28	0,08	0,02	-	-	-
j09z	88,68	0,33	0,6	1,28	6,95	0,06	0,04	0,06	1,62	0,33	0,05	0,02	-	-	-
j10c	79,79	0,43	0	4,4	12,9	0,04	0,04	0,03	1,98	0,35	0,02	0,01	-	-	-
j10z	84,99	0,45	0,1	4,1	8,12	0,05	0,04	0,05	1,72	0,33	0,03	0,02	-	-	-
j11c	88,2	0,64	0,2	2,44	6	0,05	0,04	0,15	1,88	0,17	0,2	0,02	-	-	-
j11z	80,12	0,41	0,26	2,74	13,65	0,02	0,05	0,03	1,81	0,81	0,06	0,03	-	-	-
j12c	79,32	0,24	0	2,41	15,69	0,02	0,32	0,01	1,32	0,59	0,05	0,02	-	-	-
j12z	73,65	0,31	0,19	2,38	20,87	0,03	0,34	0,03	1,56	0,56	0,07	0,02	-	-	-
j13c	58,11	0,3	17,78	1	19,22	0,03	0,03	0,25	2,13	0,88	0,07	0,22	-	-	-
j13z	57,99	0,44	22,57	1,53	11,03	0,1	0,04	0,85	4,01	0,85	0,31	0,29	-	-	-
j14c	58,05	0,24	0,27	1,77	11,95	0,01	0,01	0,04	26,98	0,62	0,03	0,01	-	-	-
j14z	58,88	0,25	0,25	1,84	11,38	0,02	0,01	0,05	26,58	0,68	0,04	0,01	-	-	-

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	para-cymen + α -terpinen	limonen	terpinolen	terpinen-4-ol	γ -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
j15c	90,83	0,6	0,21	4,85	0,68	0,05	0,06	0,08	2,23	0,36	0,01	0,04	-	-	-
j15z	89,81	0,6	0,24	4,99	1,14	0,06	0,08	0,1	2,44	0,49	0,01	0,04	-	-	-
j16c	67,71	0,34	0,45	1,98	26,05	0,02	0,02	0,04	2,35	0,95	0,07	0,03	-	-	-
j16z	78,17	0,38	0,58	1,77	16,03	0,02	0,02	0,05	2,44	0,44	0,09	0,02	-	-	-
j17c	86,06	0,34	0,25	2,75	6,61	0,53	0,03	0,09	2,74	0,56	0,03	0,02	-	-	-
j17z	85,38	0,37	0,24	2,88	7,09	0,45	0,03	0,1	2,81	0,59	0,04	0,02	-	-	-
j18c	81,36	0,39	0,23	2,22	12,33	0,03	0,02	0,06	2,99	0,32	0,02	0,02	-	-	-
j18z	79,53	0,4	0,3	2,4	14,18	0,03	0,03	0,07	2,63	0,38	0,03	0,02	-	-	-
j19c	87,96	1,7	0,12	3,31	3,73	0,17	0,62	0,17	1,4	0,42	0,38	0,02	[46/54]	[13/87]	[57/43]
j19z	80,83	1,45	0,09	3,01	11,99	0,09	0,58	0,14	1,45	0,22	0,16	0	[49/51]	[12/88]	[60/40]
j20c	88,66	0,46	0,35	1,82	5,6	0,03	0,26	0,12	2,35	0,25	0,08	0,01	[21/79]	[38/62]	[37/63]
j20z	87,61	0,41	0,35	1,94	7,1	0,02	0,32	0,07	1,88	0,24	0,04	0,01	[19/81]	[35/65]	[38/62]
j21c	68,33	0,48	1	0,5	25,01	0,12	0,11	0,28	2,49	1,05	0,54	0,09	[25/75]	[34/66]	[50/50]
j21z	81,89	0,76	1,38	0,53	11,17	0,15	0,1	0,26	2,74	0,63	0,32	0,07	[26/74]	[28/72]	[47/53]
j22c	88,81	0,69	0,12	3,12	4,71	0,03	0,04	0,09	1,91	0,36	0,11	0,01	[41/59]	[15/85]	[50/50]
j22z	87,48	0,4	0,09	3,11	7,31	0,02	0,03	0,04	1,22	0,25	0,04	0,01	[38/62]	[18/82]	[46/54]
j23c	91,6	0,8	0,13	2,77	0,59	1,1	0,15	0,91	1,66	0,04	0,21	0,04	[35/65]	[19/81]	[49/51]
j23z	93,04	0,83	0,12	2,67	0,48	0,69	0,11	0,59	1,26	0,04	0,14	0,02	[34/66]	[20/80]	[50/50]
j24c	68,19	0,57	12,4	3,69	0,43	0,93	0,25	4,34	4,67	0,38	2,95	1,21	[77/23]	[10/90]	[46/54]
j24z	64,61	1,42	8,85	2,96	2,01	0,63	0,64	5,94	4,91	1,19	4,59	2,26	[79/21]	[8/92]	[52/48]
j25c	91,32	0,72	0,16	1,75	1,38	0,13	0,07	0,31	2	0,14	2,01	0,02	[23/77]	[32/68]	[46/54]
j25z	87,03	1,38	0,15	1,61	4,14	0,03	0,04	0,21	2,59	0,69	2,11	0,02	[24/76]	[32/68]	[53/47]
j26c	77,06	0,38	0,13	2,3	17,38	0,02	0,06	0,09	1,78	0,69	0,07	0,03	[27/73]	[26/74]	[29/71]
j26z	81,5	0,62	0,22	2,54	12,04	0,05	0,04	0,18	2,09	0,6	0,09	0,03	[32/68]	[28/72]	[39/61]
j27c	91,83	0,78	0,1	1,62	1,53	0,77	0,23	0,64	2,15	0,08	0,21	0,06	[19/81]	[37/63]	[49/51]
j27z	88,47	0,77	0,19	2,22	3,21	0,09	0,14	0,37	3,85	0,32	0,35	0,02	[17/83]	[37/63]	[45/55]
j28z	84,99	0,55	0,54	1,47	9,7	0,04	0,02	0,09	1,96	0,55	0,05	0,05	[12/88]	[48/52]	[29/71]
j28c	80,37	0,53	0,29	1,27	14,93	0,07	0,06	0,08	1,71	0,58	0,08	0,03	[10/90]	[52/48]	[28/72]
j29z	91,06	0,74	0,77	2,8	0,78	0,14	0,1	0,68	2,21	0,32	0,36	0,05	[36/64]	[18/82]	[54/46]
j29c	90,6	1,38	0,29	2,17	0,27	0,27	0,37	1,32	2,58	0,17	0,57	0	[30/70]	[22/78]	[51/49]
j30z	91,13	1,51	0,27	3,23	0,14	0,27	0,66	0,22	1,72	0,04	0,81	0,02	-	-	-
j30c	89,02	1,63	0,14	2,7	0,16	0,31	2,12	0,26	1,74	0,15	1,73	0,03	-	-	-
j31z	87,93	1,26	0,21	1,38	0,14	0,24	2,17	0,23	2,23	0,21	4,01	0	-	-	-
j31c	90,53	1,37	0,11	1,02	0,23	0,37	3,06	0,23	0,74	0	2,34	0	-	-	-

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	para-cymen + α -terpinen	limonen	terpinolen	terpinen-4-ol	γ -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
j32z	94,57	0,64	0,18	1,11	0,15	0,36	0,77	0,3	1,29	0,02	0,55	0,05	[9/91]	[55/45]	[32/68]
j32c	91,49	0,35	0,29	1,39	3,88	0,09	0,47	0,13	1,23	0,29	0,37	0,03	[13/87]	[47/53]	[29/71]
j33z	86,07	1,72	0,06	4,15	0,98	0,2	2,3	0,26	2,13	0,14	1,99	0	[80/20]	[6/94]	[64/36]
j33c	85,04	1,18	0	3,75	0,33	0,6	4,3	0,4	1,09	0	3,31	0	[80/20]	[11/89]	[71/29]
j34z	90,31	0,44	0,17	2,14	5,54	0,05	0,19	0,07	0,77	0,16	0,17	0,01	[31/69]	[24/76]	[54/46]
j34c	82,5	0,49	0,12	2,2	12,81	0,02	0,17	0,05	1,21	0,27	0,13	0,03	[30/70]	[23/77]	[50/50]
j35c	36,31	0,21	0	3,18	43,11	0,04	0,04	0,11	15,82	0,82	0,29	0,07	[39/61]	[17/83]	[6/94]
j35z	39,39	0,24	0,02	3,58	43,38	0,05	0,04	0,15	11,8	0,84	0,42	0,08	[39/61]	[17/83]	[6/94]
j36c	48,29	0,41	23,33	1,44	18,54	0,06	0,03	1,07	2,99	1,67	1,37	0,8	[44/56]	[18/82]	[27/73]
j36z	44,67	0,52	24,42	1,32	19,3	0,17	0,03	1,16	3,09	2,03	0,73	1,51	[44/56]	[19/81]	[25/75]
j37c	40,33	0,31	0,19	2,09	53,13	0,09	0,03	0,07	3,01	0,62	0,08	0,04	[53/47]	[9/91]	[44/56]
j37z	38,9	0,39	0,21	2,24	54,06	0,06	0,03	0,08	3,19	0,64	0,15	0,05	[56/44]	[9/91]	[45/55]
j38c	46,46	0,88	0,18	1,63	43,75	0,19	0,09	0,76	3,71	0,51	1,8	0,05	[29/71]	[25/75]	[61/39]
j38z	37,78	0,46	0,11	1,14	56,31	0,09	0,1	0,25	2,24	0,65	0,83	0,03	[30/70]	[27/73]	[64/36]
j39c	76,6	0,56	6,52	1,93	9,41	0,09	0,18	0,9	2,63	0,28	0,72	0,19	[26/74]	[25/75]	[39/61]
j39z	58,96	0,32	6,51	1,47	29,64	0,03	0,02	0,14	1,77	0,84	0,16	0,14	[24/76]	[27/73]	[35/65]
j40c	61,77	0,36	0	3,28	31,66	0,04	0,06	0,05	2,05	0,64	0,07	0,03	[52/48]	[10/90]	[61/39]
j40z	59,96	0,38	0,12	3,32	32,78	0,03	0,05	0,05	2,39	0,83	0,07	0,03	[57/43]	[8/92]	[61/39]
j41c	61,05	0,43	6,11	1,92	14,64	0,07	0,03	0,22	13,77	0,87	0,75	0,16	[61/39]	[9/91]	[5/95]
j41z	68,41	0,52	3,92	3,85	9,97	0,08	0,04	0,17	11,76	0,79	0,31	0,16	[66/34]	[7/93]	[5/95]
j42c	65,4	0,42	0,32	3,12	27,8	0,03	0,05	0,03	1,9	0,59	0,3	0,03	[49/51]	[12/88]	[62/38]
j42z	70,49	0,36	0,16	2,83	23,87	0,02	0,04	0,04	1,62	0,39	0,17	0,02	[50/50]	[12/88]	[64/36]
j43c	69,76	0,29	0,24	1,98	21,39	0,03	0,03	0,05	5,61	0,55	0,04	0,02	[28/72]	[25/75]	[11/89]
j43z	67,64	0,43	0,27	2,24	21,07	0,11	0,05	0,11	6,92	0,85	0,27	0,03	[29/71]	[24/76]	[12/88]
j44c	52,88	0,35	28,46	1,25	9,77	0,05	0,82	0,52	2,87	1,97	0,33	0,71	[57/43]	[16/84]	[19/81]
j44z	52,16	0,36	30,07	1,31	7,93	0,05	0,63	0,66	3,17	2,32	0,47	0,88	[54/46]	[18/82]	[17/83]
j45c	69,6	0,39	0,31	2,36	24,43	0,03	0,04	0,06	2,2	0,48	0,07	0,03	[32/68]	[21/79]	[39/61]
j45z	78,01	0,38	0,29	2,24	16,9	0,03	0,04	0,06	1,64	0,35	0,04	0,02	[33/67]	[21/79]	[32/68]
j46c	70,23	0,5	0,09	2,64	22,86	0,03	0,08	0,06	2,85	0,34	0,29	0,03	[53/47]	[10/90]	[45/55]
j46z	71,86	0,45	0,14	3,1	21,34	0,02	0,04	0,1	2,33	0,42	0,19	0,02	[51/49]	[11/89]	[48/52]
j47c	77,56	0,56	0,43	1,58	16,68	0,12	0,06	0,12	2,02	0,55	0,29	0,04	[9/91]	[54/46]	[37/62]
j47z	81,28	0,55	0,56	1,46	13,07	0,06	0,05	0,16	2,29	0,32	0,16	0,04	[9/91]	[53/47]	[37/63]
j48c	73,79	0,38	0,48	1,33	21,55	0,03	0,02	0,04	1,53	0,65	0,19	0,03	[9/91]	[54/46]	[39/61]
j48z	78,77	0,95	0,49	1,43	13,6	0,04	0,02	0,32	2,35	0,48	1,51	0,03	[10/90]	[53/47]	[36/64]

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	para-cymen + α -terpinen	limonen	terpinolen	terpinen-4-ol	γ -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
j49c	75,35	0,53	0,35	1,18	20,02	0,02	0,02	0,06	1,4	0,56	0,48	0,02	[13/87]	[46/54]	[38/62]
j49z	79,11	0,65	0,45	1,6	13,99	0,06	0,03	0,28	2,34	0,37	1,05	0,05	[11/89]	[49/51]	[42/58]
j50c	77,97	0,39	0,41	1,68	17,11	0,06	0,04	0,09	1,78	0,26	0,21	0,02	[20/80]	[33/67]	[49/51]
j50z	65,44	0,3	0,26	1,68	29,11	0,13	0,05	0,14	2,15	0,37	0,36	0,01	[16/84]	[38/62]	[43/57]
j51c	74,98	0,35	0,48	1,16	20,42	0,02	0,01	0,03	1,54	0,89	0,09	0,03	[11/89]	[50/50]	[36/64]
j51z	76,62	0,42	0,51	1,42	18,05	0,05	0,02	0,08	1,91	0,75	0,13	0,05	[9/91]	[57/43]	[41/59]
j52c	54,76	0,32	0,3	1,77	39,03	0,04	0,1	0,05	2,55	0,92	0,13	0,03	[25/75]	[25/75]	[41/59]
j52z	55,71	0,31	0,27	1,86	38,05	0,03	0,1	0,06	2,51	0,91	0,16	0,03	[24/76]	[28/72]	[45/55]
j53c	59,54	0,37	0,31	1,55	34,83	0,03	0,06	0,09	2,22	0,75	0,19	0,04	[16/84]	[35/65]	[27/73]
j53z	58,71	0,35	0,42	1,7	35,07	0,07	0,05	0,05	2,54	0,84	0,15	0,04	[18/82]	[33/67]	[35/65]
j54c	55,87	0,55	0,16	1,85	36,66	0,03	1,5	0,16	2,03	0,75	0,41	0,03	[32/68]	[23/77]	[55/45]
j54z	61,12	0,51	0,27	2,05	30,57	0,06	2,23	0,11	1,85	0,96	0,21	0,06	[26/74]	[27/73]	[46/54]
j55c	68,95	0,37	0,24	3,12	23,17	0,02	0,05	0,03	3,08	0,74	0,19	0,03	[50/50]	[11/89]	[30/70]
j55z	63,42	0,37	0,12	3,19	28,58	0,03	0,06	0,04	3,28	0,67	0,23	0,03	[51/49]	[11/89]	[27/73]
j56c	69,14	0,35	0,34	1,54	22,13	0,03	0,09	0,06	5,38	0,76	0,14	0,04	[22/78]	[31/69]	[7/93]
j56z	64,71	0,34	0,4	1,57	24,36	0,03	0,09	0,07	7,3	0,89	0,19	0,04	[26/74]	[26/74]	[8/92]
j57c	80,33	0,96	0,3	2,11	14,3	0,03	0,04	0,04	1,2	0,53	0,14	0,03	[25/75]	[27/73]	[43/57]
j57z	80,87	1,44	0,28	2,35	13	0,04	0,07	0,05	1,22	0,5	0,17	0,03	[24/76]	[27/73]	[44/56]
j58c	54,22	1,38	0,69	4,53	35,69	0,07	0,07	0,06	2,38	0,59	0,29	0,04	[96/4]	[1/99]	[60/40]
j58z	56,14	1,4	0,54	4,45	33,94	0,07	0,08	0,14	2,36	0,43	0,42	0,04	[98/2]	[1/99]	[65/35]
j59c	74,04	2,47	0,19	2,52	18,24	0,06	0,11	0,05	1,61	0,61	0,07	0,02	[40/60]	[15/85]	[40/60]
j59z	71,96	2,23	0,21	2,67	19,62	0,07	0,15	0,07	2,3	0,59	0,11	0,03	[39/61]	[16/84]	[40/60]
j60c	69,66	1,67	0,29	1,35	24,08	0,05	0,12	0,12	1,84	0,62	0,16	0,04	[11/89]	[51/49]	[40/60]
j60z	61,61	1,49	0,39	1,13	32,24	0,06	0,11	0,1	2,07	0,59	0,18	0,04	[10/90]	[50/50]	[39/61]
j61c	69,97	3,58	0,18	1,29	18,37	0,08	0,08	0,75	2,75	0,39	2,53	0,04	[17/83]	[38/62]	[26/74]
j61z	73,84	1,72	0,31	1,78	18,16	0,1	0,1	0,22	3,05	0,39	0,3	0,03	[21/79]	[34/66]	[30/70]
j62c	66,47	2,65	0,04	3,94	24,66	0,04	0,06	0,06	1,48	0,41	0,17	0,02	[67/33]	[6/94]	[55/45]
j62z	63,07	2,23	0,11	3,89	27,51	0,04	0,08	0,12	1,95	0,44	0,54	0,02	[71/29]	[5/95]	[56/44]
j63c	69,74	1,18	6,44	2,42	16,36	0,04	0,02	0,41	2,65	0,43	0,11	0,19	[49/51]	[14/86]	[17/83]
j63z	62,72	1,65	8,17	2,13	19,44	0,05	0,02	0,37	4,46	0,52	0,23	0,24	[48/52]	[14/86]	[12/88]
j64c	64,13	1,9	3,79	3,14	19,31	0,07	3,51	0,54	2,59	0,69	0,18	0,15	[59/41]	[11/89]	[22/78]
j64z	54,09	0,5	4,39	2,04	30,6	0,1	2,95	0,33	3,55	0,75	0,44	0,27	[55/45]	[11/89]	[26/74]
j65c	62,4	0,36	8,16	1,97	21,42	0,04	0,02	0,4	4,01	0,78	0,23	0,21	[49/51]	[13/87]	[11/89]
j65z	64,14	1,43	5,26	2,65	21,92	0,05	0,03	0,29	3,13	0,72	0,16	0,22	[45/55]	[15/85]	[10/90]

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	para-cymen + α -terpinen	limonen	terpinolen	terpinen-4-ol	γ -terpinen	α -pinen [-/+]	β -pinen [+/-]	limonen [-/+]
j66c	62,26	0,33	1,26	2,81	30,27	0,07	0,04	0,07	1,72	0,96	0,14	0,06	[46/54]	[12/88]	[59/41]
j66z	61,64	0,31	1,05	2,44	32,32	0,03	0,02	0,06	1,44	0,57	0,09	0,03	[50/50]	[10/90]	[62/38]
j67c	73,06	2,38	9,44	2,15	10,16	0,05	0,03	0,3	1,64	0,49	0,16	0,14	[37/63]	[21/79]	[37/63]
j67z	77,41	3,14	6,16	2,52	4,67	0,2	0,03	1,6	2,34	0,22	1,42	0,3	[35/65]	[22/78]	[38/62]
j68c	73,85	2,72	0,18	2,95	16,36	0,05	1,29	0,12	1,64	0,62	0,19	0,02	[36/64]	[19/81]	[53/47]
j68z	76,85	2,42	0,22	2,96	13,97	0,03	1,47	0,11	1,5	0,4	0,04	0,01	[39/61]	[17/83]	[51/49]
j69c	66,46	5,61	0,24	3,33	20,08	0,04	0,32	0,09	2,73	0,86	0,21	0,04	[38/62]	[17/83]	[38/62]
j69z	69	8,96	0,05	2,15	14,3	0,13	0,7	0,45	2,39	0,43	1,44	0	[40/60]	[17/83]	[58/42]
j70c	71,93	11,67	0,19	1,68	10,08	1,99	0,04	0,12	1,22	0,61	0,42	0,05	[15/85]	[42/58]	[33/67]
j70z	77,52	12,43	0	1,86	5,65	1,1	0,05	0,16	0,74	0,35	0,11	0,03	[15/85]	[43/57]	[48/52]
j71c	48,02	1,96	0,15	1,62	44,19	0,02	0,04	0,07	2,24	0,94	0,71	0,03	[33/67]	[20/80]	[49/51]
j71z	48,19	1,4	0,17	1,55	45,75	0,02	0,05	0,05	2,08	0,61	0,1	0,03	[35/65]	[20/80]	[52/48]
j72c	74,47	6,36	0,15	2,1	14,49	0,04	0,33	0,09	1,11	0,58	0,26	0,02	[32/68]	[20/80]	[48/52]
j72z	75,58	6,42	0,15	2,44	13,14	0,03	0,29	0,07	1,13	0,65	0,07	0,02	[33/67]	[21/79]	[48/52]
j73c	81,33	0,38	0,07	2,17	13,63	0,01	0,66	0,03	0,97	0,71	0,02	0,02	-	-	-
j73z	80,06	0,34	0	2,27	15,13	0,01	0,33	0,03	1,15	0,63	0,02	0,02	-	-	-
j74c	73,11	2,94	0,24	1,56	19,88	0,03	0,08	0,05	1,09	0,8	0,18	0,04	[14/86]	[46/54]	[47/53]
j74z	70,86	2,32	0,28	1,5	22,54	0,05	0,06	0,08	1,37	0,63	0,27	0,04	[15/85]	[40/60]	[43/57]
j75c	48,84	1,84	0,14	2,18	31,26	0,05	11,22	0,44	2,25	1,33	0,39	0,06	[51/49]	[12/88]	[58/42]
j75z	50,55	1,67	0,15	2,23	31,97	0,05	8,49	0,29	2,36	1,33	0,83	0,07	[55/45]	[11/89]	[50/50]
j76c	72,32	8,71	0,16	1,57	10,29	1,5	3,67	0,56	0,93	0,21	0,07	0,02	[17/83]	[38/62]	[38/62]
j76z	70,06	8,81	0,16	1,54	8,88	1,2	4,22	0,72	1,7	0,3	2,37	0,03	[19/81]	[35/65]	[40/60]
j77c	71,78	0,89	0,34	1,8	17,39	0,07	4,48	0,18	2,29	0,47	0,3	0,03	[24/76]	[28/72]	[41/59]
j77z	72,56	1,9	0,1	1,58	6,33	0,13	6,9	0,62	3,66	0,63	5,54	0,04	[25/75]	[28/72]	[45/55]
j78c	65,25	0,84	0,35	1,42	23,92	0,07	4,07	0,13	2,05	0,8	1,07	0,01	[25/75]	[29/71]	[43/57]
j78z	61,47	0,82	0,27	1,38	26,84	0,05	5,28	0,15	2,02	0,78	0,93	0,03	[23/77]	[31/69]	[46/54]
j79c	42,67	0,28	0	1,77	51,34	0,03	0,04	0,08	3	0,58	0,17	0,03	[28/72]	[22/78]	[42/58]
j79z	40,09	0,3	0,17	1,59	53,61	0,02	0,03	0,09	3	0,69	0,38	0,03	[26/74]	[24/76]	[42/58]

4 Ocena metody headspace SPME/GC w analizie mieszanin lotnych związków

Tabela nr 45 Wyniki chromatograficznych **analiz achiralnych** składników monoterpenu z mieszaniny wzorcowej otrzymane w ramach testu powtarzalności metody (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nr	α -pinen	kamfen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	para-cymen + α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen
	[%]									
1	8,67	2,55	13	6,06	4,76	8,88	18,29	15,98	10,96	10,85
2	8,68	2,57	13,04	5,99	4,77	8,84	18,34	15,92	10,95	10,9
3	9,13	2,68	13,43	5,96	4,77	8,78	18,21	15,73	10,73	10,58
4	8,6	2,56	12,97	6,01	4,75	8,83	18,32	15,96	11,03	10,98
5	8,38	2,49	12,79	6,04	4,72	8,85	18,29	16,13	11,15	11,16
6	8,89	2,57	13,25	6,04	4,69	8,86	18,13	15,93	10,88	10,76
7	8,48	2,47	12,91	6,06	4,72	8,9	18,34	16,09	11,07	10,95
8	8,55	2,48	12,99	6,01	4,72	8,84	18,19	16,06	11,11	11,05
9	8,51	2,52	12,96	6	4,75	8,81	18,44	15,97	11,06	10,98
10	8,83	2,58	13,22	6	4,76	8,86	18,18	15,86	10,88	10,83
11	8,38	2,44	12,7	5,98	4,72	8,84	18,33	16,17	11,21	11,25
12	8,63	2,51	12,95	5,96	4,72	8,84	18,3	16	11,08	11
13	8,05	2,43	12,35	6,06	4,7	8,75	18,68	16,26	11,33	11,39

Tabela nr 46 Wyniki chromatograficznych **analiz chiralnych** składników monoterpenu z mieszaniny wzorcowej otrzymane w ramach testu powtarzalności metody (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	[-] α -pinen	[+] α -pinen	myrcen	[-]kamfen	3-karen	α -felandren + α -terpinen	[+] β -pinen	[-] β -pinen	para-cymen	[-] limonen	[+] limonen	γ -terpinen	terpinolen
	[%]												
1	7,85	3,65	5,94	1,51	9,34	8,51	8,35	5,82	12,1	5,91	9,7	10,84	10,48
2	9,22	4,32	5,69	1,76	9,71	8,38	9,2	6,4	10,94	5,7	9,39	9,91	9,4
3	7,8	3,67	5,88	1,57	9,24	8,47	8,36	5,77	12,38	5,88	9,61	10,83	10,55
4	8,04	3,71	5,89	1,57	9,31	8,48	8,38	5,83	12,32	5,77	9,54	10,74	10,43
5	8,03	3,72	5,94	1,56	9,31	8,42	8,43	5,77	12,27	5,87	9,59	10,65	10,46
6	7,73	3,64	5,88	1,51	9,18	8,42	8,27	5,77	12,48	5,85	9,59	10,93	10,75
7	7,61	3,49	5,89	1,48	9,09	8,3	8,19	5,59	13	5,82	9,68	10,92	10,93
8	7,8	3,63	5,87	1,51	9,27	8,47	8,34	5,68	12,56	5,85	9,54	10,82	10,66
9	7,64	3,55	5,91	1,53	9,25	8,51	8,25	5,76	12,45	5,92	9,5	10,96	10,76
10	7,61	3,59	5,93	1,56	9,16	8,46	8,16	5,7	12,77	5,88	9,52	10,91	10,76

Tabela nr 47 Wyniki chromatograficznych **analiz achiralnych** składników monoterpenu młodych pędów sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w roku **2002** (osobnik s20) w ramach badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	sabinen + β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol
	[%]									
1	11,37	0,6	3,97	1,49	0,18	75,21	2,34	0,42	4,16	0,25
2	10,72	0,46	2,81	1,6	0,18	76,79	2,29	0,42	4,42	0,29
3	11,12	0,56	5,15	1,46	0,24	78,03	2,72	0,36	0,05	0,32
4	12,41	0,66	4,73	1,21	0,29	74,91	2,02	0,32	3,06	0,39
5	10,64	0,53	3,18	1,62	0,17	75,96	2,57	0,44	4,64	0,25
6	9,38	0,46	2,75	1,6	0,18	77,63	2,53	0,44	4,77	0,25
7	10,92	0,46	3,23	1,88	0,11	74,58	3,05	0,47	5,1	0,2
8	11,2	0,5	2,61	1,58	0,13	76,3	2,47	0,43	4,47	0,3
9	11,97	0,54	2,76	1,62	0,16	75,53	2,54	0,41	4,22	0,26
10	13,41	0,61	3,22	1,52	0,19	74,42	2,11	0,37	3,85	0,29
11	10,13	0,44	3,44	1,67	0	76,71	2,73	0,41	4,25	0,21

Tabela nr 48 Wyniki chromatograficznych **analiz chiralnych** składników monoterpenu młodych pędów sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w roku **2002** (osobnik s20) w ramach badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	[-] α -pinen	[+] α -pinen	myrcen	sabinen	[-]kamfen	3-karen	[-] β -pinen	para-cymen	[-] limonen	[+] limonen	γ -terpinen	terpinolen
	[%]											
1	2,21	6,97	1,34	3,3	1,62	75,56	1,6	0,98	1,48	0,16	0,39	4,39
2	2,45	5,55	1,38	2,21	1,67	76,66	2,45	0,76	1,5	0,21	0,43	4,74
3	2,83	8,87	1,52	2,45	1,62	72,31	3,23	0,77	1,68	0,18	0,35	4,19
4	2,44	5,96	1,38	3,42	1,63	76,79	1,62	1,17	1,36	0,19	0,3	3,75
5	2,68	7,82	1,56	2,21	1,64	73,96	2,21	0,8	1,81	0,2	0,33	4,77
6	2,16	4,16	1,8	1,37	1,89	79,47	1,35	0,54	1,33	0,17	0,5	5,27
7	2,44	8,22	1,43	2,65	1,67	74,75	1,46	0,87	1,64	0,19	0,37	4,29
8	2,75	8,32	1,19	3,82	1,58	73,64	2,74	1,16	1,27	0,22	0,29	3,03
9	2,71	9,04	1,19	3,73	1,62	73,38	2,08	1,05	1,46	0,22	0,28	3,24
10	2,2	6,09	1,67	1,98	1,84	77,84	0,74	0,61	1,47	0,17	0,44	4,96
11	2,94	11,42	1,39	3,37	1,6	70,51	1,68	1,13	1,85	0,23	0,31	3,59

Tabela nr 49 Wyniki chromatograficznych **analiz achiralnych** składników monoterpenujących młodych pędów sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w roku **2003** (osobnik s25') w ramach badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	sabinen + β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	para-cymen + α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol
	[%]										
1	49,31	1,53	1,69	14,62	0,05	0,1	0,04	32,22	0,05	0,35	0,03
2	53,11	1,94	1,99	13,45	0,06	0,16	0,05	28,69	0,07	0,43	0,05
3	57,88	2,15	2,05	11,54	0,06	0,16	0,05	25,55	0,07	0,44	0,05
4	52,27	1,8	1,86	12,43	0,05	0,14	0,05	30,88	0,07	0,4	0,05
5	49,02	1,61	1,84	15,35	0,05	0,11	0,03	31,55	0,05	0,36	0,03
6	59,97	2,05	2,03	11,57	0,04	0,12	0,03	23,68	0,06	0,4	0,03
7	61,83	2,23	2,04	9,82	0,04	0,17	0,04	23,28	0,07	0,43	0,05
8	53,07	1,82	1,84	12,82	0,05	0,16	0,04	29,69	0,07	0,4	0,05
9	53,59	1,83	2,02	13,48	0,04	0,17	0,04	28,32	0,06	0,4	0,04
10	43,47	1,37	1,73	17,15	0,04	0,13	0,03	35,68	0,05	0,33	0,03
11	60,44	2,11	2,02	11,21	0,05	0,21	0,04	23,3	0,08	0,48	0,04

Tabela nr 50 Wyniki chromatograficznych **analiz chiralnych** składników monoterpenujących młodych pędów sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w roku **2003** (osobnik s25') w ramach badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej (*Cinara pini* L.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	[-] α -pinen	[+] α -pinen	myrcen	sabinen	[-]kamfen	3-karen	α -felandren + α -terpinen	[+] β -pinen	[-] β -pinen	[-] limonen	[+] limonen	γ -terpinen	terpinolen
	[%]												
1	10,68	33,61	16,43	0,3	0,96	0,12	0,06	0,51	1,09	34,96	0,91	0,04	0,33
2	10,75	38,59	14,44	0,4	1,11	0,14	0,07	0,58	1,12	30,15	2,29	0	0,35
3	11,82	39,07	14,95	0,3	1,08	0,08	0	0,53	1,13	29,65	0,96	0,04	0,37
4	10,85	39,81	14,37	0,34	1,14	0,08	0,05	0,55	1,12	30,39	0,9	0,03	0,38
5	11,45	37,82	12,59	0,29	1,03	0,07	0	0,5	1,1	33,9	0,92	0	0,34
6	11,88	43,29	12,8	0,33	2,1	0,09	0,07	0,6	1,21	26,33	0,87	0,03	0,37
7	10,62	41,16	13,36	0,32	1,09	0,1	0,03	0,54	1,1	30,36	0,94	0	0,38
8	10,82	52,17	9,95	0,4	1,32	0,11	0,05	0,63	1,13	22,04	0,96	0	0,41
9	12,34	24,84	19,36	0,26	0,76	0,09	0,04	0,44	1,18	39,39	0,92	0	0,38
10	12,73	37,45	14,69	0,36	1,11	0,08	0,06	0,54	1,24	30,49	0,88	0	0,36
11	11,58	42,83	13,07	0,33	1,19	0,12	0,05	0,56	1,15	27,64	1,07	0	0,43

Tabela nr 51 Wyniki chromatograficznych **analiz achiralnych** składników monoterpenowych liści szpilkowych szpilkowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału użytego w badaniach sezonowej zmienności składu (osobnik nr 1) (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol
	[%]										
1	54,18	7,29	0,81	2,63	2,77	0,1	27,85	1,17	0,34	2,83	0,03
2	55,07	7,18	0,78	2,6	2,66	0,09	27,48	1,14	0,32	2,65	0,04
3	54,03	7,17	0,8	2,64	2,7	0,1	28,32	1,15	0,33	2,72	0,03
4	54,14	7,09	0,8	2,65	2,7	0,1	28,25	1,18	0,36	2,7	0,04
5	55,31	7,25	0,79	2,63	2,67	0,08	27,07	1,09	0,33	2,77	0,02
6	55,87	7,25	0,75	2,65	2,6	0,1	26,89	1,13	0,29	2,44	0,03
7	56,3	7,26	0,75	2,65	2,59	0,08	26,56	1,04	0,29	2,46	0,02
8	55,17	7,44	0,82	2,68	2,77	0,09	26,86	1,13	0,33	2,69	0,02
9	55,53	7,21	0,76	2,7	2,7	0,09	27,08	1,09	0,31	2,52	0,03
10	56,03	7,08	0,71	2,61	2,59	0,08	26,95	1,07	0,31	2,55	0,01
11	56	7,18	0,72	2,65	2,64	0,08	26,79	1,09	0,31	2,51	0,03

Tabela nr 52 Wyniki chromatograficznych **analiz chiralnych** składników monoterpenowych liści szpilkowych szpilkowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału użytego w badaniach sezonowej zmienności składu (osobnik nr 1) (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	[-] α -pinen	[+] α -pinen	myrcen	sabinen	[-]kamfen	3-karen	[+] β -pinen	[-] β -pinen	[-] limonen	[+] limonen	γ -terpinen	terpinolen
	[%]											
1	11,45	41,8	2,76	2,05	6,82	27,34	0,46	2	1,74	0,41	0,35	2,82
2	11,91	43,17	2,66	2,05	6,99	25,99	0,46	1,99	1,64	0,4	0,25	2,49
3	11,59	42,46	2,59	2,04	6,85	26,86	0,51	2	1,67	0,43	0,31	2,69
4	12,25	43,25	2,59	2,22	7,31	25,14	0,53	2,11	1,5	0,38	0,25	2,47
5	12,09	43	2,1	2,2	7,18	25,92	0,55	2,09	1,59	0,41	0,3	2,57
6	12,01	42,83	2,61	2,22	7,21	25,63	0,49	2,15	1,59	0,44	0,33	2,49
7	12,24	42,92	2,68	2,21	7,31	25,33	0,46	2,09	1,57	0,41	0,28	2,51
8	12,08	42,8	2,68	2,21	7,08	25,71	0,46	2	1,59	0,42	0,45	2,53
9	11,27	41,99	2,54	2,03	6,76	27,72	0,53	1,98	1,74	0,41	0,33	2,69
10	11,86	43,05	2,65	2,15	7,08	25,83	0,49	1,99	1,51	0,44	0,3	2,65
11	11,84	42,21	2,74	2,1	7,08	26,56	0,49	2,06	1,6	0,37	0,27	2,67

Tabela nr 53 Wyniki chromatograficznych **analiz achiralnych** składników monoterpenu szyszkojagód jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w ramach badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (materiał zebrany w roku 2002, przechowywany przez rok w temperaturze pokojowej, osobnik j20) (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	para-cymen + α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol
	[%]											
1	82,33	0,89	0,35	1,54	11,05	0,14	0,32	0,2	2,6	0,03	0,26	0,3
2	77,86	0,54	0,44	1,69	15,82	0,04	0,3	0,09	2,49	0,03	0,61	0,1
3	82,94	0,81	0,56	1,83	9,03	0,05	0,45	0,15	3,56	0,02	0,42	0,17
4	76,76	0,71	0,33	1,62	16,85	0,05	0,21	0,09	2,73	0,02	0,45	0,18
5	84,4	0,72	0,33	1,61	9,25	0,04	0,41	0,11	2,59	0,02	0,33	0,2
6	80,59	0,51	0,36	1,63	13,55	0,02	0,25	0,08	2,28	0,02	0,49	0,23
7	79,49	0,92	0,87	2,57	6,98	0,13	1,34	0,48	5,42	0,11	0,57	1,13
8	91,24	0,74	0,41	1,75	2,01	0,04	0,43	0,13	2,77	0,01	0,16	0,31
9	87,97	0,47	0,4	1,88	6,21	0,02	0,26	0,08	2,31	0,01	0,29	0,09
10	87,17	0,5	0,4	1,68	7,32	0,03	0,24	0,09	2,16	0,02	0,32	0,09
11	88,1	0,88	0,41	1,96	3,19	0,04	0,26	0,2	4,25	0,02	0,31	0,37

Tabela nr 54 Wyniki chromatograficznych **analiz chiralnych** składników monoterpenu szyszkojagód jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w ramach badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (materiał zebrany w roku 2002, przechowywany przez rok w temperaturze pokojowej, osobnik j20) (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	[-] α -pinen	[+] α -pinen	myrcen	sabinen	[-]kamfen	3-karen	[+] β -pinen	[-] β -pinen	para-cymen	[-] limonen	[+] limonen	γ -terpinen	terpinolen
	[%]												
1	17,24	70,78	7,18	0,43	0,2	0,45	0,58	1	0,06	0,67	1,13	0,02	0,28
2	22,1	67,37	5,5	0,38	0,26	0,4	0,52	1,17	0,08	0,79	1,18	0	0,27
3	19,43	67,45	8,36	0,43	0,2	0,27	0,56	1,18	0,05	0,65	1,09	0,01	0,32
4	17,88	72,68	4,49	0,48	0,2	0,34	0,62	1,11	0,08	0,69	1,2	0,01	0,21
5	19,34	70,39	5,17	0,46	0,22	0,34	0,58	1,15	0,07	0,77	1,23	0,03	0,26
6	18,74	74,33	2,22	0,33	0,3	0,3	0,57	0,97	0,14	0,72	1,24	0	0,14
7	20,12	65,92	9,06	0,46	0,21	0,29	0,55	1,18	0,06	0,7	1,19	0,02	0,25
8	21,7	70,78	2,39	0,44	0,23	0,3	0,58	1,24	0,07	0,81	1,31	0	0,15
9	19,98	71,83	3,15	0,47	0,22	0,32	0,59	1,21	0,06	0,75	1,24	0	0,18
10	19,18	70,98	5,15	0,45	0,2	0,27	0,6	1,18	0,06	0,64	1,11	0	0,19
11	19,87	66,6	8,59	0,44	0,22	0,25	0,59	1,21	0,06	0,73	1,16	0,02	0,26

Tabela nr 55 Wyniki chromatograficznych **analiz achiralnych** składników monoterpenu szyszkogagód jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w ramach badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (materiał zebrany w roku 2003, zamrożony bezpośrednio po zbiorze, osobnik j37) (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	myrcen	α -felandren	3-karen	para-cymen + α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol
[%]												
1	40,08	0,46	0,2	2,37	52	0,14	0,04	0,14	3,68	0,05	0,66	0,18
2	44,21	0,49	0,13	2,41	47,75	0,07	0,04	0,14	3,34	0,05	0,67	0,71
3	41,35	0,39	0,1	2,11	51,98	0,07	0,03	0,08	3,06	0,04	0,58	0,2
4	38,55	0,41	0,15	2,19	54,31	0,15	0,04	0,1	3,32	0,05	0,58	0,15
5	38,9	0,36	0,1	2,22	54,4	0,07	0,03	0,1	3,13	0,04	0,5	0,15
6	48,62	0,42	0,17	2,41	44,85	0,08	0,03	0,09	2,73	0,03	0,46	0,1
7	46,6	0,37	0,17	2,34	46,68	0,1	0,03	0,04	2,89	0,04	0,6	0,15
8	48,39	0,35	0,14	2,39	44,8	0,1	0,03	0,11	2,87	0,03	0,55	0,23
9	42,06	0,29	0,13	2,1	51,67	0,06	0,03	0,07	2,84	0,04	0,58	0,12
10	47,44	0,37	0,17	2,26	46,02	0,1	0,05	0,08	2,83	0,04	0,51	0,13

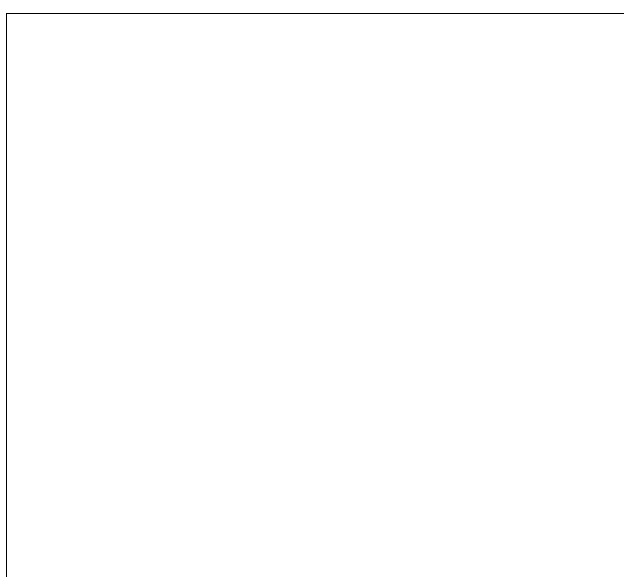
Tabela nr 56 Wyniki chromatograficznych **analiz chiralnych** składników monoterpenu szyszkogagód jałowca pospolitego (*Juniperus communis* L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w ramach badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (*Megastigmus bipunctatus* Swed.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (materiał zebrany w roku 2003, zamrożony bezpośrednio po zbiorze, osobnik j37) (zestawienie danych otrzymane przy pomocy oprogramowania ChromNET).

nazwa próbki	[-] α -pinen	[+] α -pinen	myrcen	sabinen	[-]kamfen	3-karen	[+] β -pinen	[-] β -pinen	para-cymen	[-] limonen	[+] limonen	γ -terpinen	terpinolen	α -felandren + α -terpinen
[%]														
1	21,37	18,19	54,31	0,28	0,31	0,02	0,19	1,75	0,06	1,09	1,37	0,48	0,48	0,1
2	25,1	19,73	48,69	0,3	0,34	0,04	0,22	2,19	0,07	1,16	1,38	0,03	0,65	0,09
3	19,8	17,76	55,94	0,36	0,31	0,02	0,2	1,82	0,07	1,3	1,64	0,07	0,61	0,1
4	20,35	17,24	56,11	0,23	0,32	0,02	0,19	1,83	0,09	1,26	1,59	0,06	0,6	0,12
5	22,42	19,46	51,75	0,1	0,34	0,06	0,23	1,99	0,1	1,21	1,49	0,06	0,64	0,15
6	21,67	18,16	54,13	0,23	0,34	0	0,19	1,84	0	1,17	1,48	0,09	0,59	0,11
7	20,2	17,4	54,77	0,23	0,35	0,05	0,22	1,92	0,13	1,34	2,46	0,05	0,68	0,19
8	22,86	18,84	51,55	0,26	0,33	0,03	0,21	2,1	0,1	1,29	1,54	0,06	0,67	0,16
9	18,72	14,93	59,62	0,24	0,31	0,03	0,18	1,85	0,09	1,39	1,76	0,06	0,69	0,14
10	23,72	18,11	51,85	0,24	0,33	0,03	0,19	1,98	0,12	1,21	1,44	0,04	0,59	0,14
11	20,17	16,29	57,48	0,26	0,31	0	0,14	1,77	0,05	1,23	1,58	0,05	0,59	0,08

DODATEK B – kod źródłowy oprogramowania ChromNET

W dodatku tym zamieszczono kompletny kod źródłowy oprogramowania ChromNET stworzonego w ramach jednego z celów pochodnych niniejszej pracy.

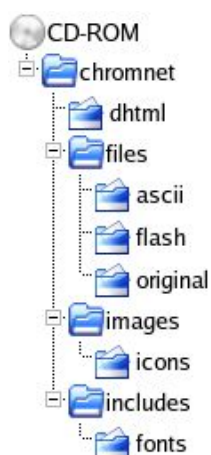
Ponieważ kod ten stanowi około 15700 linii i jego załączenie w formie wydruku zwiększyłoby objętość niniejszego opracowania o dodatkowe 157 stron¹⁷, zdecydowano się na zamieszczenie kodu oprogramowania w postaci elektronicznej, utrwalonej na płycie Mini-CD.



Na załączonej płycie Mini-CD odwzorowano strukturę katalogów wykorzystywaną przez oprogramowanie w trakcie jego działania.

Załączony kod źródłowy obejmuje około 15700 linii i zawarty jest w 32 plikach.

Załączony kod źródłowy zawiera głównie polecenia w następujących językach programowania: PHP, JavaScript, Macromedia Flash ActionScript, SQL i HTML oraz komentarze pozostawione w celu zwiększenia czytelności kodu.



Rys. 27 Schemat obrazujący strukturę katalogów na załączanej płycie Mini-CD. Kod źródłowy oprogramowania ChromNET zawarty jest w 32 plikach o rozszerzeniach *.php lub *.js. znajdujących się w katalogach „chromnet”, „dhtml”, oraz „includes”. W katalogu „ascii” umieszczono kilka przykładowych plików tekstowych z danymi chromatograficznymi. W katalogu „flash” umieszczono kilka przykładowych, wygenerowanych przez program, plików graficznych w formacie Macromedia Flash.

¹⁷ – ilość przybliżona, oszacowana przy założeniu użycia najmniejszej standardowej wielkości czcionki i pojedynczych odstępów pomiędzy wierszami.

DODATEK C – współpraca naukowa

W Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku prowadzone są kompleksowe badania chemizmu roślin szpilkowych. W celu uniknięcia powtarzania wykonanych już badań oraz w celu zapewnienia strukturalnej i logicznej integralności niniejszego opracowania zdecydowano się na zamieszczenie wyników badawczych realizowanych w ramach współpracy przez innych pracowników Katedry. Poniższa tabela prezentuje zakres współpracy przy realizacji niektórych celów tej pracy:

Cel niniejszej pracy	wyniki uzyskane w ramach innych projektów, udostępnione przez autorów	Dane o autorach i projektach, z których pochodzą wykorzystane wyniki
Optymalizacja metody headspace SPME pod kątem jej wykorzystania w analizach lotnych substancji roślin szpilkowych	dane dotyczące części procesu optymalizacji obejmującej materiał pozyskany z gatunku <i>Juniperus communis</i> L.	badania wykonywane w ramach pracy doktorskiej mgr Natalii Filipowicz , Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej AMG

Wszystkie zamieszczone wyniki zostały włączone za zgodą autorki: mgr Natalii Filipowicz.

DODATEK D – spisy fotografii, rycin i tabel

Spis fotografii

Fot. 1 Młodnik sosnowy na terenie lasu w okolicach miejscowości Otomin. Obszar ten stanowi także miejsce liczego występowania mszycy – miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.)	32
Fot. 2 Zgrupowanie jałowców pospolitych (<i>Juniperus communis</i> L.) przy skraju lasu w okolicach wsi Cisy na terenie Kociewia. Obszar ten stanowi także miejsce liczego występowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.)	33
Fot. 3 Miodownica sosnowa (<i>Cinara pini</i> L.), osobnik bezskrzydły (A), osobnik uskrzydłony (B) – strzałką zaznaczono wydłużony, kłująco-ssący aparat gębowy	38
Fot. 4 Znamionek jałowcowy (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.): Samiec (A) różni się od samicy (B) między innymi mniejszym odwłokiem pozbawionym żeńskich przydatków płciowych (pokładelko) oraz kształtem i wielkością znamion skrzydłowych	41
Fot. 5 Budowa skrzydeł (A) i zewnętrznych narządów płciowych żeńskich (B) samicy znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.)	41
Fot. 6 Samica znamionka jałowcowego podczas składania jaja do wnętrza szyszkojagody jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.)	43
Fot. 7 Cechy diagnostyczne wybranych struktur mszycy z gatunku <i>Cinara pini</i> L.	111
Fot. 8 A – kolonia miodownic na młodym pędzie sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.), B – każdej kolonii mszyc towarzyszy zwykle grupa mrówek	116
Fot. 9 Uszkodzenia szyszkojagód i nasion jałowca pospolitego powodowane przez znamionka jałowcowego	118
Fot. 10 Szyszkojagody jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.) z otworami wylotowymi pozostawionymi przez znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.)	118
Fot. 11 Uszkodzenia szyszkojagód jałowca dostępnych w handlu spowodowane przez owady	122

Spis rycin

Rys. 1 Schemat obrazujący udział gatunków owadopylnych wśród roślin leczniczych w poszczególnych rodzinach	13
Rys. 2 Schemat budowy przyrządu do SPME	50
Rys. 3 Schemat obrazujący zasadę działania przyrządu do SPME na przykładzie badania headspace SPME	52
Rys. 4 Schemat budowy udostępnionej w sieci Internet bazy danych	56
Rys. 5 Schemat obrazujący sposób wykonania i strukturę niniejszej pracy	66
Rys. 6 Chromatogram przedstawiający rozdział badanych związków monoterpenowych na kolumnie HP 101	93
Rys. 7 Chromatogram przedstawiający rozdział badanych związków monoterpenowych z uwzględnieniem ich form enancjomerycznych na kolumnie HP Chiral (20% Permethyated B-Cyclodextrin)	94
Rys. 8 Chromatogram przedstawiający rozdział związków monoterpenowych na kolumnie HP 101. Chromatogram otrzymano przez analizę headspace SPME/GC substancji lotnych z liści szpilkowych sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	94

Rys. 9 Chromatogram przedstawiający rozdział związków monoterpenowych z uwzględnieniem ich form enancjomerycznych na kolumnie HP Chiral (20% Permethylated B-Cyclodextrin). Chromatogram otrzymano przez analizę headspace SPME/GC substancji lotnych z liści szpilkowych sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	95
Rys. 10 Chromatogram przedstawiający rozdział związków monoterpenowych na kolumnie HP 101. Chromatogram otrzymano przez analizę headspace SPME/GC substancji lotnych z pojedynczej szyszkojagody jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.)	95
Rys. 11 Chromatogram przedstawiający rozdział związków monoterpenowych z uwzględnieniem ich form enancjomerycznych na kolumnie HP Chiral (20% Permethylated B-Cyclodextrin). Chromatogram otrzymano przez analizę headspace SPME/GC substancji lotnych z pojedynczej szyszkojagody jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.)	96
Rys. 12 Schemat struktury oprogramowania do archiwizacji i analizy porównawczej danych chromatograficznych ChromNET	102
Rys. 13 Szybkie oznaczanie pików chromatograficznych poprzez nadanie im nazw w oprogramowaniu ChromNET	107
Rys. 14 Schemat obejmujący rejestrację i początkowe etapy analizy danych chromatograficznych oraz użyte oprogramowanie	108
Rys. 15 Aspirator użyty do chwytania znamionków	109
Rys. 16 Wykresy sezonowych zmian względnej zawartości procentowej badanych związków monoterpenowych w liściach szpilkowych <i>Pinus sylvestris</i> L.	126
Rys. 17 Wykres rozrzutu obrazujący wyniki analizy głównych składowych w odniesieniu do wszystkich prób pobranych z sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	131
Rys. 18 Wykres rozrzutu obrazujący wyniki analizy głównych składowych wszystkich prób pobranych z jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.)	135
Rys. 19 Wykres obrazujący różnice we względnych zawartościach analizowanych monoterpenów w młodych pędach sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) w zależności od sposobu przechowywania materiału	140
Rys. 20 Wykres obrazujący różnice we względnych zawartościach analizowanych monoterpenów w szyszkojagodach jałowca (<i>Juniperus communis</i> L.) w zależności od sposobu przechowywania materiału	141
Rys. 21 Schemat obrazujący sposób pobierania prób oraz przeprowadzania analiz porównawczych	144
Rys. 22 Główne okno programu ChromNET	163
Rys. 23 Kolejne etapy tworzenia matrycy w programie ChromNET	165
Rys. 24 Zarządca próbek i chromatogramów pozwala na przenoszenie lub kopiowanie danych chromatograficznych pomiędzy projektami	167
Rys. 25 Główne okno podglądu krzywej chromatograficznej prezentuje nie tylko graficzną reprezentację chromatogramu, ale także inne dotyczące go dane (m. in. opis, data przeprowadzenia analizy) oraz szczegółowe dane o integrowanych pikach (udział procentowy, wysokość, powierzchnia)	168
Rys. 26 Raport dotyczący projektu pozwala na dynamiczną zmianę sposobu integracji oraz typu prezentowanych danych	170
Rys. 27 Schemat obrazujący strukturę katalogów na załączanej płycie Mini-CD	205

Spis tabel

Tabela nr 1 Częstość występowania różnych form zapylania wśród roślin na podstawie bazy danych programu „Flora Ojczysta” [Moraczewski i in., 2000]	13
Tabela nr 2 Zestawienie barw kwiatów roślin leczniczych na tle wszystkich gatunków roślin uwzględnionych w komputerowym kluczu do oznaczania roślin Flora Ojczysta [Moraczewski i in., 2000]	14
Tabela nr 3 Częstość występowania kwiatów grzbiecistych u roślin leczniczych na tle wszystkich gatunków uwzględnionych w komputerowym kluczu do oznaczania roślin Flora Ojczysta [Moraczewski i in., 2000]	15
Tabela nr 4 Owady drapieżne i pasożytnicze - zestawienie najważniejszych grup	16
Tabela nr 5 Najczęściej uprawiane gatunki roślin leczniczych oraz owady mogące powodować szkody w ich uprawach (na podstawie serii artykułów „ABC... uprawowych roślin zielarskich” [Kordana i Kordana, 1999] oraz zaleceń ochrony roślin Instytutu Ochrony Roślin [Pruszyński i in., 2003])	22
Tabela nr 6 Przykłady toksyn roślinnych zawierających azot [Harborne, 1997]	25
Tabela nr 7 Przykłady bezazotowych toksyn roślinnych [Harborne, 1997]	26
Tabela nr 8 Zestawienie i charakterystyka dostępnych rodzajów ziół używanych w metodzie SPME	50
Tabela nr 9 Dokładne położenia miejsc pozyskiwania materiału wyznaczone przy pomocy obrotownika GPS	70
Tabela nr 10 Charakterystyka poszczególnych osobników z gatunku sosna zwyczajna (<i>Pinus sylvestris</i> L.) objętych badaniami sezonowej zmienności składu związków monoterpenowych	71
Tabela nr 11 Charakterystyka poszczególnych osobników z gatunku jałowiec pospolity (<i>Juniperus communis</i> L.) objętych badaniami wpływu żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) na związki monoterpenowe w szyszkogagodach jałowca	72
Tabela nr 12 Charakterystyka poszczególnych osobników z gatunku sosna zwyczajna (<i>Pinus sylvestris</i> L.) objętych badaniami wpływu żerowania miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.) na związki monoterpenowe w młodych pędach sosnowych	75
Tabela nr 13 Zestawienie ilości materiału roślinnego używanego do pojedynczej analizy	83
Tabela nr 14 Zakresy wartości optymalizowanych zmiennych użyte przy optymalizacji procedury headspace SPME	84
Tabela nr 15 Wygląd tablicy ortogonalnej L ¹⁶	85
Tabela nr 16 Plan optymalizacji metody SPME oparty na tablicy ortogonalnej L ¹⁶	86
Tabela nr 17 Wyniki optymalizacji parametrów analizy SPME dla liści szpilkowych sosny (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	88
Tabela nr 18 Wyniki optymalizacji parametrów analizy SPME dla liści szpilkowych świerka (<i>Picea abies</i> (L.) H. Karst.)	88
Tabela nr 19 Wartości optymalne parametrów w analizie SPME olejku eterycznego z liści szpilkowych sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.), świerka pospolitego (<i>Picea abies</i> (L.) H. Karst.) i jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.)	89
Tabela nr 20 Wartości optymalne parametrów poszczególnych etapów SPME wybrane na podstawie przeprowadzonych badań materiału pochodzącego z wybranych gatunków roślin szpilkowych	89
Tabela nr 21 Zastosowane metody fragmentacji surowca w zestawieniu z rodzajem materiału	90

Tabela nr 22 Zestawienie warunków rozdziałów achiralnych i chiralnych przeprowadzonych w odniesieniu do wszystkich materiałów roślinnych analizowanych w niniejszej pracy.....	92
Tabela nr 23 Zestawienie materiałów użytych przy badaniu powtarzalności metody.....	97
Tabela nr 24 Zestawienie wyników badań powtarzalności achiralnych analiz chromatograficznych (headspace SPME/GC) dla roztworu substancji wzorcowych i różnych materiałów roślinnych wykorzystywanych w czasie realizacji pracy.....	99
Tabela nr 25 Zestawienie wyników badań powtarzalności chiralnych analiz chromatograficznych (headspace SPME/GC) dla roztworu substancji wzorcowych i różnych materiałów roślinnych wykorzystywanych w czasie realizacji pracy.....	99
Tabela nr 26 Zawartości procentowe szyszkojagód jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.) wykazujących ślady żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) w surowcu, który stanowiły szyszkojagody jałowca (<i>Juniperi fructus</i>) pochodzącym od różnych producentów.....	120
Tabela nr 27 Wybrane, ważne pod względem występowania owadów, dopuszczalne normy jakości, dotyczące szyszkojagód jałowca pospolitego <i>Juniperus communis</i> L.....	123
Tabela nr 28 Zbiorcze zestawienie występowania najwyższych zawartości (kolor czerwony) i najniższych zawartości (kolor niebieski) wybranych związków monoterpenowych u poszczególnych osobników na przestrzeni okresu badawczego.....	125
Tabela nr 29 Zakresy zawartości głównych składników frakcji monoterpenowej uzyskane w wyniki sezonowych badań składu sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.).....	125
Tabela nr 30 Różnice we średniej względnej zawartości procentowej poszczególnych związków monoterpenowych zawartych w liściach szpilkowych pochodzących z różnych części korony osobnika nr 1.....	127
Tabela nr 31 Podstawowe składniki monoterpenowe stwierdzone w młodych pędach sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) i ich względna zawartość procentowa.....	132
Tabela nr 32 Wzajemne proporcje procentowe form enancjomerycznych α -pinenu, β -pinenu i limonenu zaobserwowane wśród poddanych badaniom osobników sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.).....	134
Tabela nr 33 Podstawowe składniki monoterpenowe stwierdzone w szyszkojagodach jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.).....	136
Tabela nr 34 Wzajemne proporcje form enancjomerycznych α -pinenu, β -pinenu i limonenu zaobserwowane wśród poddanych badaniom osobników jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.).....	137
Tabela nr 35 Porównanie względnej zawartości procentowej podstawowych składników monoterpenowych stwierdzonych w młodych pędach zaatakowanych przez mszyce drzew sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) obejmujące pędy zasiedlone przez kolonie mszyc z gatunku miodownica sosnowa (<i>Cinara pini</i> L.) oraz pędy, na których nie stwierdzono obecności mszyc.....	145
Tabela nr 36 Porównanie względnej zawartości procentowej podstawowych składników monoterpenowych stwierdzonych w młodych pędach sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) obejmujące pędy zasiedlone przez kolonie mszyc z gatunku miodownica sosnowa (<i>Cinara pini</i> L.), pędy, na których nie stwierdzono obecności mszyc pobrane z roślin zaatakowanych oraz pędy roślin całkowicie wolnych od mszyc.....	146
Tabela nr 37 Porównanie względnej zawartości procentowej podstawowych składników monoterpenowych stwierdzonych w młodych pędach sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) obejmujące surowiec zamrożony bezpośrednio po zbiorze oraz surowiec przechowywany przez rok w stanie suchym.....	148

Tabela nr 38 Wzajemne proporcje procentowe form enancjomerycznych α -pinenu, β -pinenu i limonenu zaobserwowane wśród poddanych badaniom osobników sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	150
Tabela nr 39 Porównanie względnej zawartości procentowej podstawowych składników monoterpenowych stwierdzonych w szyszkogagodach jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.) obejmujące szyszkogody wykazujące oznaki żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) i szyszkogody nieuszkodzone	151
Tabela nr 40 Porównanie względnej zawartości procentowej podstawowych składników monoterpenowych stwierdzonych w szyszkogagodach jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.) obejmujące szyszkogody wykazujące oznaki żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) i szyszkogody nieuszkodzone	153
Tabela nr 41 Wzajemne proporcje form enancjomerycznych α -pinenu, β -pinenu i limonenu zaobserwowane wśród poddanych badaniom osobników jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.) – porównanie szyszkogod nie wykazujących śladów żerowania owadów oraz uszkodzonych przez znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.)	155
Tabela nr 42 Wyniki analiz chromatograficznych składników monoterpenowych liści szpilkowych sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) otrzymane w ramach badań zmienności sezonowej składu	184
Tabela nr 43 Wyniki analiz chromatograficznych składników monoterpenowych młodych pędów sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) otrzymane w ramach badań wpływu żerowania mszycy miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej. Zestawienie obejmuje materiał zebrany w roku 2002 (wiersze tabeli oznaczone kolorem szarym) oraz w roku 2003 (bez wypełnienia)	188
Tabela nr 44 Wyniki analiz chromatograficznych składników monoterpenowych szyszkogod jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.) otrzymane w ramach badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej. Zestawienie obejmuje materiał zebrany w roku 2002 (wiersze tabeli oznaczone kolorem szarym) oraz w roku 2003 (bez wypełnienia)	193
Tabela nr 45 Wyniki chromatograficznych analiz achiralnych składników monoterpenowych z mieszaniny wzorcowej otrzymane w ramach testu powtarzalności metody	199
Tabela nr 46 Wyniki chromatograficznych analiz chiralnych składników monoterpenowych z mieszaniny wzorcowej otrzymane w ramach testu powtarzalności metody	199
Tabela nr 47 Wyniki chromatograficznych analiz achiralnych składników monoterpenowych młodych pędów sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w roku 2002 (osobnik s20) w ramach badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej	200
Tabela nr 48 Wyniki chromatograficznych analiz chiralnych składników monoterpenowych młodych pędów sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w roku 2002 (osobnik s20) w ramach badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej	200
Tabela nr 49 Wyniki chromatograficznych analiz achiralnych składników monoterpenowych młodych pędów sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w roku 2003 (osobnik s25') w ramach badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej	201

Tabela nr 50 Wyniki chromatograficznych analiz chiralnych składników monoterpenowych młodych pędów sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w roku 2003 (osobnik s25') w ramach badań wpływu żerowania miodownicy sosnowej (<i>Cinara pini</i> L.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej.....	201
Tabela nr 51 Wyniki chromatograficznych analiz achiralnych składników monoterpenowych liści szpilkowych sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału użytego w badaniach sezonowej zmienności składu (osobnik nr 1).....	202
Tabela nr 52 Wyniki chromatograficznych analiz chiralnych składników monoterpenowych liści szpilkowych sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i> L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału użytego w badaniach sezonowej zmienności składu (osobnik nr 1).....	202
Tabela nr 53 Wyniki chromatograficznych analiz achiralnych składników monoterpenowych szyszkojagód jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w ramach badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (materiał zebrany w roku 2002, przechowywany przez rok w temperaturze pokojowej, osobnik j20).....	203
Tabela nr 54 Wyniki chromatograficznych analiz chiralnych składników monoterpenowych szyszkojagód jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w ramach badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (materiał zebrany w roku 2002, przechowywany przez rok w temperaturze pokojowej, osobnik j20).....	203
Tabela nr 55 Wyniki chromatograficznych analiz achiralnych składników monoterpenowych szyszkojagód jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w ramach badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (materiał zebrany w roku 2003, zamrożony bezpośrednio po zbiorze, osobnik j37).....	204
Tabela nr 56 Wyniki chromatograficznych analiz chiralnych składników monoterpenowych szyszkojagód jałowca pospolitego (<i>Juniperus communis</i> L.) otrzymane w ramach testu powtarzalności metody dla materiału zebranego w ramach badań wpływu żerowania znamionka jałowcowego (<i>Megastigmus bipunctatus</i> Swed.) na skład chemiczny rośliny żywicielskiej (materiał zebrany w roku 2003, zamrożony bezpośrednio po zbiorze, osobnik j37).....	204