



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Nauk Ogrodniczych

mgr inż. Paweł Orliński

**Zmienność chemiczna i plonowanie
wybranych gatunków roślin zielarskich
w polikulturze**

Chemical variability and yield of selected medicinal plant species
in polyculture

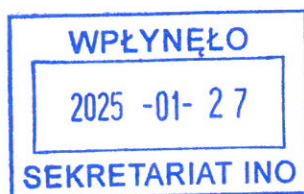
Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

prof. dr hab. Ewy Osińskiej

Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych



Elton'sradelsy

Warszawa 2025

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 27.01.2025

Czytelny podpis promotora Σ. Osiedo

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 27.01.2025

Czytelny podpis autora rozprawy P. Adamczyk

*Serdecznie dziękuję
Pani prof. dr hab. Ewie Osińskiej
za opiekę naukową, cenne wskazówki i pomoc
oraz za życzliwość i wyrozumiałość
podczas realizacji niniejszej pracy*

Serdecznie dziękuję

*Panu dr. Mirosławowi Angielczykowi
za udostępnienie materiału roślinnego
oraz cenne wsparcie w tym projekcie*

*Pracownikom i doktorantom
Katedry Roślin Warzywnych i Leczniczych
w szczególności*

Panu mgr inż. Łukaszowi Gontarowi

Pani mgr Monice Niedzińskiej

Pani dr Oldze Kosakowskiej

Pani dr Annie Pawelczak

Panu dr Jarosławowi Przybyłowi

Pani dr Izabeli Szymborskiej-Sandhu

Panu mgr inż. Pawłowi Żolnierczykowi

Panu Józefowi Dąbrowskiemu

Pani Mariannie Gzowskiej

Pani dr Katarzynie Mazur

Pani dr Monice Sitarek-Andrzejczyk

Pani mgr Zuzannie Jakubowskiej

Pani mgr Andżelice Drutowskiej

Pani mgr Paulinie Świdorskiej

Za pomoc w uprawie i wykonywaniu analiz laboratoryjnych

Dziękuję mojej żonie

dr Marcie Pudzianowskiej

za ogromne wsparcie jakiego mi udzieliła

Dziękuję również

moim Rodzicom, Bratu, Teściowi i Przyjaciółom

za wsparcie, motywację i troskę

Spis treści

1. Wstęp	13
2. Cel i zakres pracy	15
3. Przegląd literatury	16
3.1. Znaczenie badań nad zmiennością chemiczną roślin leczniczych	16
3.2. Metody badań zmienności chemicznej roślin leczniczych	24
3.3. Współrzędna uprawa roślin	27
3.4. Charakterystyka wybranych gatunków roślin leczniczych	34
3.4.1. Bez czarny (<i>Sambucus nigra</i> L.)	34
3.4.1.1. Pochodzenie, opis botaniczny i systematyka bzu czarnego.....	34
3.4.1.2. Wymagania klimatyczne i glebowe bzu czarnego	38
3.4.1.3. Znaczenie gospodarcze bzu czarnego.....	39
3.4.1.4. Związki biologicznie czynne, właściwości oraz wykorzystanie bzu czarnego	41
3.4.2. Miodunka miękkowłosa (<i>Pulmonaria mollis</i> Wulfen ex Hornem.)	45
3.4.3. Czosnek niedźwiedzi (<i>Allium ursinum</i> L.)	46
3.4.4. Kopytnik pospolity (<i>Asarum europaeum</i> L.).....	47
3.5. Wpływ czynników abiotycznych na gromadzenie się wybranych grup związków chemicznych	48
4. Materiał i metody	55
4.1. Charakterystyka materiału badawczego	55
4.2. Lokalizacja oraz warunki prowadzenia uprawy	56
4.2.1. Część I doświadczeń – Uprawa współrzędna bzu czarnego (2015-2018)	58
4.2.2. Część II doświadczeń – Zmienność chemiczna liści czosnku niedźwiedziego oraz miodunki miękkowłosej w zależności od warunków oświetlenia (2017-2019)	60
4.2.3. Część III doświadczeń – Zmienność chemiczna liści bzu czarnego oraz określenie ich przydatności jako surowca leczniczego (2016-2018)	61
4.3. Zbiór surowca zielarskiego do analiz chemicznych	61
4.3.1. Bez czarny	61
4.3.2. Kopytnik pospolity	62
4.3.3. Miodunka miękkowłosa	63
4.3.4. Czosnek niedźwiedzi	63
4.4. Metody prowadzenia pomiarów oraz analiz chemicznych	63
4.4.1. Materiał i metody prowadzenia ekstrakcji	63

4.4.2. Analiza profilu związków chemicznych w liściach bzu czarnego z zastosowaniem spektrofotometrii w podczerwieni	65
4.4.3. Analiza składu chemicznego przy zastosowaniu spektrofotometrii UV-Vis .	70
4.4.4. Analiza z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej	73
4.5. Analiza wyników	74
4.5.1. Analiza statystyczna wyników	74
4.5.2. Analiza chemometryczna wyników	75
5. Wyniki	76
5.1. Część I doświadczeń – Uprawa współrzędna bzu czarnego	76
5.1.1. Kwiat bzu czarnego.....	76
5.1.1.1. Plon.....	76
5.1.1.2. Zmienność chemiczna kwiatów bzu czarnego	77
5.1.2. Owoc bzu czarnego.....	80
5.1.2.1. Plon.....	80
5.1.2.2. Zmienność chemiczna owoców bzu czarnego	83
5.2. Część II doświadczeń – Zmienność chemiczna liści czosnku niedźwiedziego oraz ziela miodunki miękkowłosej w zależności od warunków oświetlenia.....	86
5.2.1. Czosnek niedźwiedzi	86
5.2.1.1. Plon liści.....	86
5.2.1.2. Zmienność chemiczna	88
5.2.1.2.1. Zawartość chlorofilu a i b	88
5.2.1.2.2. Ogólna zawartość karotenoidów	90
5.2.1.2.3. Zawartość flawonoidów	90
5.2.1.2.4. Zawartość związków polifenolowych ogółem.....	92
5.2.2. Miodunka miękkowłosa.....	92
5.2.2.1. Plon ziela	92
5.2.2.2. Wpływ odległości od pnia bzu czarnego na masę pojedynczych roślin miodunki miękkowłosej	95
5.2.2.3. Zmienność chemiczna	97
5.2.2.3.1. Zawartość chlorofilu a i b	97
5.2.2.3.2. Ogólna zawartość karotenoidów	98
5.2.2.3.3. Zawartość flawonoidów	98
5.2.2.3.4. Zawartość związków polifenolowych ogółem.....	99
5.3. Część III doświadczeń – Zmienność chemiczna liści bzu czarnego oraz określenie ich przydatności jako surowca leczniczego	101

5.3.1. Określenie zróżnicowania chemicznego liści bzu czarnego przy użyciu spektrometrii w podczerwieni z transformatą Fouriera.....	101
5.3.2. Określenie zróżnicowania chemicznego liści bzu czarnego przy użyciu spektrofotometrii UV-Vis	109
5.3.2.1. Analiza składowych głównych na podstawie analiz spektrofotometrycznych.....	109
5.3.2.2. Zawartość chlorofilu a	111
5.3.2.3. Zawartość chlorofilu b	114
5.3.2.4. Zawartość białka	117
5.3.2.5. Zawartość rozpuszczalnych węglowodanów	120
5.3.2.6. Zawartość związków polifenolowych ogółem	122
5.3.2.7. Zawartość flawonoidów	125
5.3.3. Analiza metabolomiczna liści bzu czarnego.....	131
5.4 Pozostałe wyniki	135
5.4.1. Analiza wartości plonu	135
5.4.2. Wpływ uprawy miodunki miękkowłosej na chwasty.....	136
6. Dyskusja wyników	139
7. Wnioski	156
8. Bibliografia	157
9. Aneks	172

Streszczenie

Zmienność chemiczna i plonowanie wybranych gatunków roślin zielarskich w polikulturze

Wraz ze wzrostem cen gruntów oraz brakiem zarejestrowanych produktów do chemicznej ochrony roślin przed szkodnikami rośnie zainteresowanie alternatywnymi metodami upraw. Jedną z nich jest uprawa współrzędna, która polega na jednoczesnym uprawianiu dwóch lub więcej gatunków na tym samym obszarze. Polska ma długą tradycję w wykorzystywaniu roślin leczniczych, w tym ich pozyskiwaniu z naturalnych stanowisk. Dotyczy to także ceniolubnych roślin leczniczych, które mają specyficzne wymagania środowiskowe. Choć ich uprawa jest możliwa, często wymaga kosztownych instalacji cieniujących, co czyni ją nieopłacalną w przypadku roślin o stosunkowo niskiej wartości rynkowej. Agroleśnictwo, będące szczególną formą uprawy współrzędnej wykorzystującą drzewa, może stanowić rozwiązanie, które pozwoli na wprowadzenie tych roślin do upraw komercyjnych. Dodatkowo agroleśnictwo oferuje korzyści takie jak: dodatkowy plon, dywersyfikacja produkcji czy naturalne zacienienie gleby, co ogranicza rozwój chwastów. Na świecie z powodzeniem stosowane są różne systemy agroleśne, choć zazwyczaj opierają się one na roślinach światłolubnych jako gatunkach podszytu.

Celem niniejszej pracy było zbadanie możliwości uprawy ceniolubnych roślin leczniczych w systemie agroleśnym z bzu czarnym (*Sambucus nigra* L.) jako gatunkiem drzewiastym oraz miodunką miękkowłosą (*Pulmonaria mollis* Wulfen ex Hornem.), czosnkiem niedźwiedzim (*Allium ursinum* L.) i kopytnikiem pospolitym (*Asarum europaeum* L.) jako gatunkami podszytu. Ponadto, biorąc pod uwagę, że taki system uprawy mógłby być najszybciej zaadaptowany przez producentów bzu czarnego, drugim celem było zbadanie wpływu tego typu uprawy na skład chemiczny kwiatów, owoców i liści bzu czarnego.

W ramach przeprowadzonych doświadczeń posadzono sto drzew bzu czarnego odmiany 'Samdal' wraz z trzema gatunkami podszytu oraz poletkami kontrolnymi w czterech powtórzeniach w układzie kwadratu łacińskiego. Ponadto dla każdego gatunku podszytu założono dodatkowe poletka, na których rośliny uprawiane były w pełnym nasłonecznieniu bądź pod siatkami cieniującymi, w celu określenia zacienienia na plon i skład chemiczny tych surowców. Wykorzystano do tego różne analizy chemiczne takie jak spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR),

analizy laboratoryjne metodami kolorymetrycznymi oraz wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). Aby sprawdzić czy uprawa gatunków podszytu wpływa na bez czarny zbierano i analizowano jego liście w kluczowych fazach: wczesną wiosną, podczas kwitnienia, owocowania i jesienią.

Spośród wszystkich badanych gatunków podszytu tylko miodunka miękkowłosa okazała się odpowiednia do uprawy w systemie agroleśnym bez dodatkowych nakładów. Zarówno czosnek niedźwiedzi, jak i kopytnik pospolity miały mocno ograniczony wzrost przez suszę oraz niewystarczające zacienienie. Miodunka miękkowłosa charakteryzowała się najwyższym plonem spośród badanych roślin i była jedynym gatunkiem zapewniającym całoroczne pokrycie gleby, co skutecznie ograniczało rozwój chwastów. Obserwacje sugerują, że miodunka może posiadać także właściwości allelopatyczne, co dodatkowo wspomaga tłumienie chwastów. Mimo że miodunka istotnie zmniejszyła plon bzu czarnego, łączna wartość plonu z obu tych gatunków była wyższa w porównaniu z monokulturą bzu czarnego.

Uogólniając, wpływ gatunków podszytu na skład chemiczny liści, kwiatów czy owoców bzu czarnego był znikomy, co nie dziwi, biorąc pod uwagę, że bez czarny często rośnie w sąsiedztwie różnych innych gatunków roślin. Zaobserwowano natomiast istotne zmiany w składzie liści w zależności od terminu ich zbioru. Liście wiosenne miały wyższą zawartość białka, podczas gdy liście jesienne cechowały się większą zawartością wosków, co wykazano metodą FTIR. Zaobserwowano wpływ gatunków podszytu na zawartość białek i flawonoidów w liściach bzu czarnego, szczególnie w okresie owocowania.

Przeprowadzone badania wykazały, że uprawa ceniolubnych roślin leczniczych w systemie agroleśnym z bzem czarnym może być ekonomicznie opłacalna, pod warunkiem starannego doboru gatunków podszytu. Taki system oferuje rolnikom dodatkowe źródło dochodu na początku sezonu, wspomagając dywersyfikację przychodów oraz zabezpieczając przed skutkami niekorzystnych warunków środowiskowych, takich jak susze czy powódzie. Dodatkowo potwierdzono, że metoda FTIR jest skutecznym, szybkim i niedestrukcyjnym narzędziem do rutynowej oceny jakości oraz zmian chemicznych w surowcach zielarskich.

Słowa kluczowe: bez czarny, agroleśnictwo, gatunki podszytu, uprawa współrzędna, miodunka miękkowłosa, czosnek niedźwiedzi, kopytnik pospolity

Abstract

Chemical variability and yield of selected medicinal plant species in polyculture

With increasing land prices and a lack of registered products for chemical pest management, there is a growing interest in alternatives to conventional cropping systems. One such alternative is intercropping, where two or more species are grown within the same area. Poland has a long history of utilizing medicinal plants, including harvesting them from natural sites. This includes shade-loving medicinal plants that naturally grow in forests and are challenging to cultivate due to their specific environmental requirements, which necessitate high inputs, making it economically unfeasible. An agroforestry system, considered a specific type of intercropping, can reduce these inputs as tree species provide the necessary environmental conditions for shade-loving medicinal plants and simultaneously offer an additional crop, thereby diversifying production. Various agroforestry systems have been tested worldwide, typically involving plants that can be grown in full sun, which are usually suitable in areas with higher sunlight.

The objective of this work was to assess the feasibility of growing shade-loving medicinal plants in an agroforestry system with European elderberry (*Sambucus nigra* L.) as the tree species, and lungwort (*Pulmonaria mollis* Wulfen ex Hornem.), wild garlic (*Allium ursinum* L.), and european wild ginger (*Asarum europaeum* L.) as understory species. Additionally, given that this system would likely be adopted by commercial elderberry producers, another aim was to determine the impact on the chemical constituents of elderberry flowers, fruits, and leaves to forecast long-term effects.

For this purpose, one hundred ‘Samdal’ elderberry trees and the three understory species were planted together with control plots in four replicates in a latin square design. Additionally, for each understory species, extra plots were established in full sun and under shading cloth nearby to further investigate changes in these plants. Yield data were collected for all species, along with various chemical analyses, including Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), laboratory analysis using colorimetric methods, and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). To predict the impact of this

system on elderberry plants, leaves were collected a total of nine times during critical phases: early spring leaves, at flowering, at fruiting, and in fall just before leaf senescence.

Among all tested understory species, only lungwort proved to be a viable species for agroforestry without additional inputs. Wild garlic was severely affected by drought, but some data suggest it could perform well with adequate soil moisture. European wild ginger also underperformed, likely due to a combination of insufficient shade and soil moisture. Lungwort had the highest yield among the understory species and was the only one providing season-long soil cover, which also suppressed weeds. Observations suggest lungwort might possess allelopathic potential, further suppressing weeds. While lungwort significantly affected elderberry yield, the combined yield of the system was more profitable compared to growing elderberry alone.

Overall, there was little to no effect of the understory species on the chemical composition of elderberry leaves, flowers, or fruits. This finding aligns with the understanding that elderberry plants in nature grow alongside various other plants and adapt to suboptimal conditions. However, significant changes in leaf composition were observed based on the season. Spring leaves had higher protein content, while fall leaves had higher wax content, as determined by FTIR. Some effects of understory species were noted on the protein and flavonoid content in leaves, particularly during the elderberry fruiting period.

This study demonstrated that cultivating shade-loving medicinal plants alongside elderberry can be successful, but careful selection of compatible species is essential. This system offers farmers additional income early in the season, helping to diversify income sources and buffer against unforeseen environmental impacts such as drought or flooding. Furthermore, the use of FTIR for assessing quality and chemical changes in herbal raw materials was confirmed to be a cost-effective, rapid, and non-destructive method suitable for routine analysis.

Key words: elderberry, agroforestry, understory species, intercropping, lungwort, wild garlic, european wild ginger

1. Wstęp

Współczesne rolnictwo przechodzi dynamiczną transformację, której kluczowym aspektem jest odchodzenie od tradycyjnych monokulturowych systemów upraw na rzecz bardziej zrównoważonych i ekologicznych metod. Monokultury, choć efektywne pod względem intensyfikacji produkcji, wiążą się z wieloma problemami, takimi jak zmniejszenie bioróżnorodności, wyczerpywanie zasobów gleby oraz rosnące zapotrzebowanie na chemiczne środki ochrony roślin. W odpowiedzi na te wyzwania, rośnie zainteresowanie alternatywnymi systemami upraw.

Polikultura, polegająca na równoczesnym uprawianiu różnych gatunków roślin na tej samej powierzchni, przynosi szereg korzyści. Przede wszystkim, poprzez strategiczne dobranie gatunków roślin, można znacznie ograniczyć presję szkodników, chorób i chwastów bez konieczności stosowania pestycydów. Uprawy takie tworzą często naturalne bariery i środowisko niekorzystne dla patogenów, co sprzyja zdrowiu roślin i zwiększa ich odporność. Ponadto, zróżnicowane systemy korzeniowe i różne potrzeby pokarmowe roślin pomagają w lepszym wykorzystaniu dostępnych zasobów gleby, co prowadzi do bardziej efektywnego zagospodarowania powierzchni rolnej.

W ostatnich latach, zarówno w Polsce jak i w całej Europie, rośnie zainteresowanie szczególnym typem uprawy wielogatunkowej, w której gatunkiem dominującym są drzewa. Ten typ uprawy, nazywany agroleśnictwem, posiada szereg zalet takich jak podwójne wykorzystanie powierzchni pola poprzez uprawę roślin bezpośrednio pod koroną drzew oraz lepsze wykorzystanie nawozów, zwłaszcza tych które łatwo wpłukiwane są do niższych warstw gleby. Większość systemów agroleśnych wykorzystywanych obecnie stosuje pod drzewami rośliny wymagające pełni nasłonecznienia tj. zboża, lawendę czy warzywa. Polska, z uwagi na długą tradycję wykorzystania, zbioru i uprawy roślin leczniczych ma szansę na wykorzystanie w pełni możliwości systemów agroleśnych, zwłaszcza wykorzystujących ceniolubne rośliny lecznicze. Dotyczy to w szczególności gatunków, w przypadku których wartość rynkowa nie uzasadnia instalowania drogich konstrukcji z siatkami cieniującymi, a które obecnie głównie pozyskiwane są ze stanowisk naturalnych.

W dobie rosnącej świadomości ekologicznej i zwiększającej się popularności żywności ekologicznej, polikultura może stać się atrakcyjną alternatywą dla rolników

dążących do produkcji zrównoważonej. Takie systemy uprawy nie tylko redukują zależność od chemicznych środków ochrony roślin, ale również sprzyjają zwiększaniu bioróżnorodności, poprawiają strukturę gleby oraz zmniejszają ryzyko erozji. Dodatkowo, w systemach agroleśnych, uprawa gatunków podszytu pozwala na lepsze zacienienie gleby, przez co w naturalny sposób zmniejszona jest presja chwastów.

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki doświadczeń polowych dotyczących plonowania oraz zmienności chemicznej bzu czarnego, uprawianego w systemie agroleśnym wraz z trzema gatunkami podszytu. Badania te mogą przyczynić się do popularyzacji tego typu upraw w Polsce oraz do lepszego rozumienia kompatybilności gatunków w uprawach wielogatunkowych.

2. Cel i zakres pracy

Niniejsza praca doktorska miała na celu określenie możliwości prowadzenia uprawy agroleśnej składającej się jedynie z roślin leczniczych, użytych zarówno jako gatunek zacieniający jak i jako gatunek podszytu. Cel ten realizowano poprzez cykl doświadczeń.

Pierwsza część doświadczeń dotyczyła bzu czarnego w uprawie agroleśnej. W części tej analizowano surowiec (kwiat oraz owoc bzu czarnego) pochodzący z upraw wraz z gatunkami towarzyszącymi: miodunką miękkowłosą, czosnkiem niedźwiedzim oraz kopytnikiem pospolitym w porównaniu do surowca pochodzącego z kombinacji kontrolnej, w której utrzymywany był ugór herbicydowy. W ramach tych badań (w latach 2017-2018) określany był plon surowca oraz jego zmienność chemiczna w zależności od kombinacji doświadczenia z wykorzystaniem analizy chemometrycznej na podstawie wyników uzyskanych z wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Druga część doświadczeń (w latach 2018-2019) związana była z określeniem plonu surowca oraz zmienności chemicznej liści czosnku niedźwiedziego oraz ziela miodunki miękkowłosej w zależności od warunków oświetlenia. W tym celu porównano plon oraz zawartość wybranych grup związków chemicznych w surowcu uzyskanym z uprawy pod koroną bzu czarnego a tym z uprawy w pełnym nasłonecznieniu oraz upraw pod siatką cieniującą.

Trzecia część doświadczeń (w latach 2016-2018) dotyczyła określenia zmienności chemicznej liści bzu czarnego oraz ich przydatności jako surowca leczniczego. Część ta realizowana była poprzez badanie liści bzu czarnego pochodzących z uprawy agroleśnej zebranych w czterech okresach fenologicznych: wczesną wiosną – tuż po rozwinięciu pierwszych liści po spoczynku zimowym, podczas pełni kwitnienia, podczas pełnej dojrzałości owoców oraz późną jesienią tuż przed wejściem roślin w spoczynek zimowy. Liście te zbierane były we wszystkich czterech okresach fenologicznych począwszy od jesieni 2016 r. Zmienność chemiczna analizowana była przy użyciu spektrometrii w podczerwieni z transformatą Fouriera, analizą wybranych grup związków chemicznych metodami kolorymetrycznymi oraz analizą chemometryczną na podstawie wyników uzyskanych z wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

3. Przegląd literatury

3.1. Znaczenie badań nad zmiennością chemiczną roślin leczniczych

Surowce zielarskie, pozyskiwane zarówno ze stanowisk naturalnych jak i te pochodzące z uprawy mogą charakteryzować się wysoką zmiennością pod względem zawartości substancji biologicznie aktywnych co bezpośrednio wpływa na ich właściwości lecznicze oraz przydatność dla przemysłu zielarskiego i farmaceutycznego. Do głównych źródeł zmienności chemicznej w roślinach leczniczych można zaliczyć:

1. **Czynniki genetyczne:** różnorodność genetyczna w obrębie i pomiędzy gatunkami roślin może prowadzić do znaczących różnic w składzie chemicznym roślin leczniczych. Zmienność ta wynika z różnych genotypów zdolnych do biosyntezy różnych ilości i typów metabolitów wtórnych, które odpowiadają za właściwości lecznicze roślin.
2. **Czynniki ontogenetyczne:** odnoszą się do zmian w składzie chemicznym, które zachodzą w miarę przechodzenia rośliny przez różne etapy wzrostu i rozwoju. Typ i stężenie związków bioaktywnych w roślinach leczniczych może znacznie różnić się w zależności od etapu rozwojowego, takiego jak faza wegetatywna, kwitnienie czy owocowanie.
3. **Czynniki środowiskowe:** warunki wzrostu roślin, w tym klimat, rodzaj gleby i dostępność wody oraz składników odżywczych, mogą znacząco wpływać na profil chemiczny roślin leczniczych. Stresy środowiskowe, takie jak susza, ekstremalne temperatury i niedobory składników odżywczych w glebie, również mogą indukować zmiany w syntezie metabolitów wtórnych.
4. **Czynniki pozbiornicze:** metody zbioru, przetwarzania i przechowywania surowców zielarskich mogą wpływać na ich stabilność chemiczną i skład. Niewłaściwe obchodzenie się i przechowywanie mogą prowadzić do degradacji związków bioaktywnych, podczas gdy specyficzne techniki przetwarzania mogą wzmacniać lub redukować niektóre składniki chemiczne (Y. Li i in., 2020; Nurzyńska-Wierdak, 2023).

Ad 1. Czynniki genetyczne

Podobnie jak w przypadku innych roślin użytkowych, także wśród roślin leczniczych czynniki genetyczne mają kluczowy wpływ na profil metabolitów wtórnych, a zatem również na jakość surowca zielarskiego. Nie tylko zresztą na jakość surowca, ale również na jego plon. W przypadku wielu gatunków roślin zaliczanych do leczniczych, możliwe jest określenie jednego lub kilku związków chemicznych odpowiedzialnych za przypisywane danej roślinie właściwości lecznicze. I tak np. w przypadku mięty pieprzowej, jest to mentol (jeden z głównych składników olejku eterycznego) natomiast w przypadku mięty zielonej – karwon. W badaniach de Sousa Barros i in. (2015) analizowało skład chemiczny oraz właściwości funkcjonalne olejków eterycznych pochodzących z różnych gatunków mięty, podkreślając ich szerokie zastosowanie w gastronomii, kosmetyce oraz medycynie. Badania te pozwoliły na identyfikację wysokich stężeń monoterpenów takich jak limonen, mentol i karwon w różnych olejkach miętowych. Analiza różnych populacji mięty pieprzowej i mięty zielonej ujawniła znaczne różnice nawet w obrębie tych samych gatunków, szczególnie pod względem zawartości mentolu i karwonu - związków o istotnej wartości komercyjnej i terapeutycznej. Z kolei Bączek i in. (2015) badając dwadzieścia populacji krwawnika pospolitego (*Achillea millefolium* L. *sensu lato*) ze wschodniej Polski zidentyfikowali występowanie trzech chemotypów na podstawie dominant w składzie olejku eterycznego: typ β -pinenowy, typ β -pinenowo-chamazulenowy oraz typ 1,8-cyneolowy. Autorzy ci, wzięli również pod uwagę zmienność środowiskową pomiędzy tymi populacjami i prowadzili badania na klonach uprawianych w jednolitych warunkach *ex situ* na polu doświadczalnym. Pomimo stwierdzenia zarówno dużej zmienności chemicznej, jak również zmienności morfologicznej, autorzy nie zaobserwowali korelacji pomiędzy tymi cechami. Tym bardziej pokazuje to, jak wysoka może być zmienność genetyczna pomiędzy populacjami, nawet jeśli występują w zbliżonych regionach. Takie badania mogą przyczynić się do wyselekcjonowania ras chemicznych oraz pomóc w hodowli nowych odmian o podwyższonej zawartości określonych związków chemicznych.

Innym przykładem może być hodowla lub selekcja w celu wyeliminowania związku lub związków chemicznych mających działanie toksyczne. Przykładem na to może być tujon – jeden z głównych składników olejku eterycznego pozyskiwanego z bylicy piołun (*Artemisia absinthium* L.). Tujon znany jest z działania przeciwpasożytniczego i przeciwbakteryjnego, ale równocześnie jest substancją

potencjalnie toksyczną. Wysokie dawki tujonu mogą prowadzić do poważnych problemów zdrowotnych, takich jak drgawki, halucynacje oraz uszkodzenia mózgu, co doprowadziło do zakazu używania tujonu w wielu krajach, szczególnie w kontekście produkcji absyntu. Oprócz tujonu, w bylicy piołun znajdują się także inne związki, takie jak absyntyna i anabsyntyna (laktony seskwiterpenowe), które mają działanie przeciwzapalne i stymulujące trawienie, a także flawonoidy i fenolowe związki kwasowe, które posiadają właściwości antyoksydacyjne (Batiha i in., 2020). W odpowiedzi na potencjalne zagrożenia zdrowotne związane z tujonem oraz w związku z regulacjami prawnymi ograniczającymi jego zawartość w produktach konsumenckich, naukowcy i producenci skoncentrowali się na identyfikacji naturalnie występujących populacji bylicy piołun, które charakteryzują się niższą zawartością tujonu. Dzięki wykorzystaniu naturalnej różnorodności genetycznej w tym gatunku, możliwe jest wyselekcjonowanie populacji z minimalnym stężeniem tego związku. Taki proces pozwala na korzystanie z terapeutycznych zalet bylicy piołun bez narażania się na ryzyko związane z tujonem, co ułatwia bezpieczne zastosowanie tej rośliny w medycynie oraz w produkcji alkoholi takich jak absynt, który spełnia obowiązujące normy dotyczące zawartości tujonu (Geszyrch i in., 2010; Nguyen i Németh, 2016). Ten sam związek chemiczny może być jednak regulowany przez wiele czynników i tak inni autorzy stwierdzili, że w przypadku wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare* L.) zawartość tujonu była w większym stopniu stymulowana przez wysokie nasłonecznienie, natomiast obecność kamfory była głównie regulowana przez czynniki genetyczne, gdyż jej zawartość była podobna w różnych warunkach środowiska (Nurzyńska-Wierdak i in., 2022).

Czasami, skład chemiczny rośliny może zostać znacząco zmieniony w stosunku do oryginalnych lub dzikich populacji. Przykładem może być tu Stewia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni), dla której w dziko rosnących populacjach występuje znacznie więcej stewiozydu niż rebaudiozydu A – dwóch najważniejszych glikozydów stewiolowych, stanowiących zwykle ponad 10% suchej masy liści stewii. W dziko rosnących populacjach średnio obserwuje się stosunek tych związków około 3:1 (stewiozyd do rebaudiozydu A) podczas gdy istnieją wyselekcjonowane a następnie rozmnażane wegetatywnie rośliny, u których stosunek tych związków wynosi 1:10, co przekłada się bezpośrednio na wartość surowca zielarskiego, jako że rebaudiozyd A posiada znacznie lepsze parametry smakowe i często używany jest w wyizolowanej formie (Orliński Paweł, 2014). Obecnie, wysiłki hodowlane skupione są na

podwyższeniu zawartości rebaudiozydu D oraz rebaudiozydu M, które charakteryzują się równie słodkim smakiem jak rebaudiozyd A, jednak niemal całkowicie pozbawione są charakterystycznej goryczki, często wiązanej z niechęcią konsumentów do stosowania stewii (Prakash i in., 2014; Al-Taweel i in., 2021).

Ad 2 Czynniki ontogenetyczne

Ontogeneza, czyli rozwój indywidualny rośliny, odgrywa kluczową rolę w przypadku wielu roślin leczniczych takich jak np. żeń-szeń (*Panax ginseng* C.A. Meyer) czy żeń-szeń amerykański (*Panax quinquefolius* L.). Poszczególne etapy życiowe rośliny, od fazy wegetatywnej, przez pregeneratywną do generatywnej, mają bezpośredni wpływ na jej właściwości farmakologiczne. W szczególności, czas rozwoju od etapu wegetatywnego do etapu generatywnego, który jest wyjątkowo długi w rozwoju żeń-szenia, ma zasadnicze znaczenie dla określenia optymalnego czasu uprawy i zbioru korzeni. Podczas wejścia w etap generatywny dochodzi do znaczących zmian w składzie chemicznym korzenia, co bezpośrednio wpływa na jego jakość i efektywność jako surowca zielarskiego. Wyniki badań wskazują na złożoność zmian w składzie chemicznym, które są związane z wiekiem roślin. Stwierdzono wzrost koncentracji ginsenozydów, kluczowych składników aktywnych korzeni, które nasilają się z wiekiem rośliny. Rezultaty badań wskazują, że koncentracja ginsenozydów jest stosunkowo niska przez pierwsze trzy lata życia rośliny i zaczyna znacząco wzrastać dopiero w czwartym roku. Potwierdzają to również zaawansowane techniki metabolomiczne, takie jak NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance* - Jądrowy rezonans magnetyczny) i UPLC-QTOFMS (ang. *Ultra Performance Liquid Chromatography* - Quadropole Time of Flight Mass Spectrometry - Ultrawydajna Chromatografia Cieczowa - Spektrometria Mas z Czasem Przelotu i Analizatorem Kwadrupolowym), które pozwoliły na identyfikację kluczowych metabolitów zależnych od wieku rośliny, mogących służyć jako biomarkery do określenia jakości korzeni żeń-szenia na podstawie jego wieku. Takie podejście ułatwia identyfikację próbek żeń-szenia i zapewnia ich jakość medyczną (Court i in., 1996; S. O. Yang i in., 2012).

Innym przykładem rośliny, u której można zaobserwować zmiany jakości surowca (liści) wraz z terminem jego zbioru jest miłorząb dwukłapowy (*Ginkgo biloba* L.). Wyniki badań przeprowadzonych przez Ding i in. (2007) wykazały, że liście

miłorzębu zbierane co miesiąc, od czerwca do listopada, wykazują znaczące zmiany w zawartości laktonów terpenowych, które są kluczowymi składnikami aktywnymi tych liści. Analizy wykazały, że zawartość tych związków na początku sezonu wegetacyjnego stopniowo rosła, osiągając szczyt w sierpniu, co sugeruje, że jest to optymalny czas na zbieranie liści miłorzębu pod kątem maksymalizacji ich właściwości leczniczych. Po sierpniu następował stopniowy spadek zawartości tych związków, co może wskazywać na obniżenie potencjału leczniczego liści zbieranych później w sezonie. Dodatkowo, badania te ujawniły, że liście pochodzące z młodszych drzew charakteryzowały się wyższą zawartością laktonów terpenowych w porównaniu do starszych, a także, że liście z drzew żeńskich posiadają więcej tych związków niż z drzew męskich. Te wyniki podkreślają znaczenie zrozumienia cykli biologicznych i ekologicznych miłorzębu w kontekście produkcji skutecznych i standaryzowanych ekstraktów fitofarmaceutycznych.

Istotny wpływ czynników ontogenetycznych został również stwierdzony w przypadku miodownika melisowatego (*Melittis melissophyllum* L.). Szyborska-Sandhu i in. (2020b) zbadali zawartość związków biologicznie czynnych w ziele tej rośliny w różnych fazach rozwoju (początek kwitnienia, pełnia kwitnienia oraz w fazie zawiązywania nasion). Dodatkowo, autorzy ci sprawdzili również jakość ziela z roślin w różnym wieku (od roku do czterech lat). Etap rozwoju rośliny oraz jej wiek w istotny sposób wpływały na zawartość związków biologicznie aktywnych. Na przykład w fazie pełni kwitnienia zaobserwowano najwyższą zawartość glikozydu 7-O-luteoliny oraz kumaryny, podczas gdy kwas chlorogenowy osiągał najwyższe stężenie w fazie zawiązywania nasion. Co więcej, rośliny dwuletnie charakteryzowały się największą zawartością flawonoidów i kwasów fenolowych w porównaniu z roślinami młodszymi i starszymi.

Ad 3 Czynniki środowiskowe

Czynniki środowiskowe mają istotny wpływ na zmienność chemiczną roślin leczniczych, co bezpośrednio wpływa na ich efektywność terapeutyczną. Jest to bardzo szeroka grupa obejmujące między innymi takie czynniki jak: temperatura (zarówno występowania ekstremów takich jak przymrozki czy fale upałów, jak również średnia temperatura powietrza), intensywność oświetlenia, dostępność wody, rodzaj stanowiska,

agrotechnika czy stosowanie nawozów. Czynniki te mogą mieć znaczny wpływ na zawartość aktywnych składników w roślinach.

Przykładowo, zacienienie i intensywności światła słonecznego ma wpływ na jakość roślin m.in. kawy. Wyniki niektórych badań wykazały, że w regionach o suboptymalnych warunkach dla uprawy kawy, takich jak nisko położone obszary o cieplejszym klimacie, drzewa zacieniające mogą polepszać zarówno fizyczne, jak i sensoryczne właściwości ziaren kawy. Główną zaletą zacienienia jest tu redukcja stresu cieplnego roślin oraz wydłużenie okresu dojrzewania owoców kawy, co z kolei zwiększa rozmiar ziaren i poprawia jakościowe cechy naparu, takie jak kwasowość i pełność smaku (Muschler, 2001; Bosselmann i in., 2009). Badania przeprowadzone w Kostaryce przez Muschler (2001) wykazały, że intensywniejsze zacienienie prowadzi do znaczących popraw w masie owoców, rozmiarze ziaren oraz wyglądzie zarówno zielonych, jak i palonych ziaren. Obserwowano także poprawę cech sensorycznych kawy, w tym kwasowości i pełności smaku, choć wpływ na aromat był różny w zależności od odmiany. W regionach położonych na większych wysokościach, gdzie klimat jest naturalnie chłodniejszy i bardziej odpowiedni dla uprawy kawy, korzyści wynikające z zacienienia nie są jednoznaczne, a czasami zacienienie może również wykazywać negatywny wpływ. Badania z południowej Kolumbii wykazały, że w takich warunkach cień mógł negatywnie wpływać na cechy sensoryczne, takie jak zapach, kwasowość i pełność smaku, zwłaszcza na wyższych wysokościach. Na niższych wysokościach natomiast, cień nie wpływał znacząco na cechy sensoryczne, ale skutecznie redukował liczbę małych ziaren (Bosselmann i in., 2009).

W przypadku roślin ściśle ceniolubnych, zacienienie ma kluczowe znaczenie poprawiając często zarówno plon, jak również jakość surowca uzyskanego z roślin leczniczych. Przykładami takich roślin leczniczych może być choćby turówka leśna (*Hierochloë australis* (Schrad.) Roem. i Schult.) czy marzanka wonna (*Galium odoratum* (L.) Scop.). Podyma i in. (2010) w swojej pracy wykazali, że plon turówki leśnej był najwyższy, gdy rośliny uprawiane były w częściowym zacienieniu (50%). Plon ten był istotnie wyższy od roślin uprawianych w pełnym nasłonecznieniu oraz roślin uprawianych w warunkach 70% zacienienia. Z kolei zawartość kumaryny, najważniejszego związku aktywnego turówki, była najwyższa u roślin rosnących w największym zacienieniu, natomiast najniższa u roślin rosnących w pełnym słońcu. Pełne nasłonecznienie istotnie zwiększyło zawartość bergaptenu, dodatkowo zmieniając

profil związków chemicznych w ziele turówki. Podobne wyniki uzyskała Wardziak (2010) dla marzanki wonnej. W tym przypadku jednak, zarówno plon jak i zawartość związków biologicznie czynnych były wyższe w warunkach większego zacienienia (pod podwójną cieniówką) w porównaniu do roślin uprawianych pod jedną cieniówką lub w pełnym nasłonecznieniu. Efekt zacienienia, może mieć jednak zarówno pozytywny jak i negatywny wpływ jednocześnie. Tak np. u miodownika melisowatego, zacienienie miało negatywny wpływ na plon roślin, prawdopodobnie przez zmniejszenie efektywności fotosyntezy, natomiast pozytywnie wpłynęło na zawartość metabolitów wtórnych takich jak kumaryny i kwasy fenolowe, w przypadku których (podobnie jak u turówki i marzanki) zawartość była wyższa w przypadku zacienienia 50% w stosunku do zacienienia 30% czy uprawy na pełnym słońcu (Szyborska-Sandhu i in., 2020a).

Innym przykładem dotyczącym wpływu czynników środowiskowych na jakość surowca zielarskiego może być uprawa Wasabi (*Eutrema japonica* (Miq.) Koidz.). Badania przeprowadzone przez Sultana i in. (2003) są przykładem na wpływ środowiska, a w szczególności różnic między uprawą wasabi w wodzie a w glebie, na plon oraz skład chemiczny kłączy wasabi. Wyniki tych badań pokazują, że wasabi uprawiane w wodzie wykazuje wyższą zawartość izotiocyanianów w porównaniu do roślin uprawianych w glebie. Szczególnie zauważalne jest to, że w mniejszych kłączach roślin uprawianych w wodzie stwierdzono wyższe poziomy izotiocyanianów w porównaniu z podobnymi rozmiarami kłączy uprawianymi w glebie. Co istotne, w przypadku wasabi uprawianego w środowisku wodnym obserwowano nieliniowy wzrost średniej zawartości izotiocyanianów wraz ze wzrostem rozmiaru kłącza. Oznacza to, że mniejsze kłącza szybko osiągają wysokie stężenie izotiocyanianów i różnica w wielkości kłącza nie ma wpływu na jakość tego surowca. Z kolei wasabi uprawiane w glebie charakteryzuje się liniowym wzrostem zawartości izotiocyanianów, co oznacza, że mniejsze rośliny charakteryzowały się niższą jakością niż rośliny większe.

Również nawożenie ma istotny wpływ na zawartość metabolitów wtórnych w roślinach leczniczych. Być może najlepszym przykładem, gdzie widoczny jest bezpośredni wpływ nawożenia azotem są surowce bogate w alkaloidy jak np. lulek czarny (*Hyoscyamus niger* L.). W badaniu dotyczącym nawożenia mocznikiem, zwiększanie poziomu azotu zwiększało zawartość alkaloidów tropanowych (hioscyjminy i skopolaminy), która była najwyższa zarówno w liściach jak i w korzeniach dla najwyższej dawki ($50 \text{ mg N} \cdot \text{l}^{-1}$) w porównaniu z dawkami niższymi. Istotne jest również,

że choć wysokie nawożenie azotem miało korzystny wpływ na skład chemiczny surowca zielarskiego, to jednocześnie negatywnie wpływało na plon korzeni, który był najwyższy dla niższych wartości nawożenia ($16.6 \text{ mg N}\cdot\text{l}^{-1}$) (Alaghemand i in., 2013).

Ad 4 Czynniki pozbiiorcze

Czynniki pozbiiorcze, takie jak suszenie i przechowywanie, odgrywają kluczową rolę w zachowaniu jakości surowców pozyskiwanych z roślin leczniczych. Nieodpowiednie procesy pozbiiorcze mogą znacznie obniżyć efektywność leczniczą roślin, prowadząc do degradacji kluczowych składników biologicznie aktywnych w nich występujących. Właściwe suszenie ma na celu zmniejszenie zawartości wody do poziomu, który zapobiega rozwojowi mikroorganizmów i procesom gnilnym, jednocześnie zachowując strukturę rośliny oraz jej cenne składniki, takie jak olejki eteryczne, alkaloidy, czy flawonoidy. Z kolei odpowiednie przechowywanie wymaga zapewnienia warunków, które zabezpieczają rośliny przed niekorzystnymi wpływami środowiskowymi, takimi jak wilgoć, temperatura czy światło. Działania te są niezbędne, aby maksymalnie przedłużyć czas, w którym surowce zachowują swoje właściwości lecznicze, co ma fundamentalne znaczenie zarówno dla zastosowań tradycyjnych, jak i współczesnych metod fitoterapii.

Temperatura suszenia ma istotny wpływ na jakość surowców olejkowych, które są wyjątkowo wrażliwe na jej zmiany. Podczas procesu suszenia, zbyt wysoka temperatura może prowadzić do parowania olejków eterycznych, które są kluczowymi składnikami aktywnymi w wielu roślinach leczniczych. Utrata tych cennych olejków obniża nie tylko aromat, ale także efektywność terapeutyczną surowca. Przykładowo badania przeprowadzone przez Blanco i in. (2000) dotyczące wpływu temperatury suszenia na zawartość i skład olejków eterycznych z rozmarynu (*Rosmarinus officinalis* L.) wykazało, że wyższe temperatury suszenia znacząco obniżają ilość uzyskiwanego olejku. Przy temperaturze 40°C zawartość olejku wynosiła 2,13%, która zmniejszyła się do 1,62% przy 60°C , a następnie do 1,09% przy 80°C . Obserwowano również zmiany w składzie chemicznym olejku, gdzie procentowy udział α -pinenu, β -myrcenu i kamfory w olejku eterycznym znacząco spadał w miarę wzrostu temperatury z 40°C do 80°C . Te wyniki podkreślają, że wysokie temperatury suszenia mogą prowadzić do dużych strat zarówno w ilości, jak i jakości olejków eterycznych.

Innym przykładem na wysoki wpływ czynników pozbiornych na jakość surowca jest kora kruszyny (*Frangula alnus* Mill.), której przechowywanie i suszenie odgrywa kluczową rolę w jej wykorzystaniu medycznym, szczególnie ze względu na obecność substancji drażniących, takich jak antrony i diantrony. Substancje te odpowiedzialne są za silne działanie przeczyszczające i potencjalne efekty uboczne kory kruszyny w jej świeżej formie. Tradycyjne kora kruszyny po wysuszeniu jest przechowywana przez minimum rok w celu degradacji silnie działających substancji. Podczas przechowywania antrony i diantrony ulegają utlenieniu do łagodniejszych form, takich jak antrachinony. Jednocześnie glukofranguliny ulegają przekształceniu do frangulin, a te następnie do frangulaemodyny, będącej aglikonem. Możliwe jest również podgrzanie już wysuszonej kory w celu przyspieszenia rozkładu drażniących substancji. Podgrzewanie kory do temperatury około 100°C przez 1-2 godzin znacznie przyspiesza degradację drażniących glikozydów i umożliwia zastosowania kory kruszyny jako surowca leczniczego wcześniej, bez konieczności długiego jej przechowywania (Alimova S i in., 2018; Ciępek i in., 2019).

Choć jest to jedynie kilka przykładów na to jak czynniki genetyczne, ontogenetyczne, środowiskowe i pozbiornicze wpływają na jakość, a w związku z tym również na przydatność leczniczą, surowców zielarskich, to wskazują one jak istotne jest ich poznanie i regulowanie w trakcie uprawy i po zbiorze. Niejednokrotnie, modyfikując metodę uprawy, modyfikowane jest wiele czynników wpływających na jakość roślin takich jak zacienienie czy konkurencja o wodę lub składniki pokarmowe.

3.2. Metody badań zmienności chemicznej roślin leczniczych

Mimo, że podstawy analizy chemicznej roślin są niezmiennie te same od wielu lat i obejmują, zbiór, suszenie, rozdrobnienie, ekstrakcję, analizę i interpretację wyników to jednak skala i wydajność tych procesów znacznie zmieniła się na przestrzeni lat. Przygotowanie próbek jest kluczowym etapem analizy roślin leczniczych, zapewniającym, że próbka odzwierciedla rzeczywisty profil chemiczny rośliny. Historycznie, proces ten pozostawał stosunkowo niezmienny: pobieranie reprezentatywnych próbek, suszenie lub liofilizowanie, a następnie mielenie na drobny proszek. Jednakże, efektywność i skala tych procesów uległy znaczącej poprawie na przestrzeni lat. W przeszłości, mielenie próbek było procesem ręcznym

i czasochłonnym, często wymagającym przygotowania jednej próbki naraz przy użyciu młynka ręcznego lub prostych mechanicznych młynków. Współczesne osiągnięcia technologiczne wprowadziły zautomatyzowane urządzenia do mielenia, zdolne do jednoczesnego przetwarzania dużej liczby próbek. Nowoczesne młynki zapewniają jednolity rozmiar cząstek, poprawiają konsystencję próbek i znacznie skracają czas oraz nakład pracy wymagany do ich przygotowania (Markert, 1995; Huie, 2002).

Metody ekstrakcji również ewoluowały znacząco. Tradycyjnie, ekstrakcja była długotrwałym procesem, wymagającym dużych ilości rozpuszczalników oraz intensywnej pracy ręcznej. Techniki takie jak ekstrakcja aparatem Soxhleta oraz maceracja wymagały od kilku godzin do kilku dni oraz znacznych ilości rozpuszczalników, co czyniło je nieefektywnymi i wymagającymi wielu zasobów. Ponadto, do uzyskania odpowiednich wydajności ekstrakcji konieczne były próbki o dużej masie. Współczesne metody ekstrakcji są szybsze, bardziej efektywne i zużywają znacznie mniejsze ilości rozpuszczalników. Techniki takie jak *Accelerated Solvent Extraction* (ASE) zrewolucjonizowały proces ekstrakcji. ASE wykorzystuje podwyższone temperatury i ciśnienie, aby zwiększyć penetrację rozpuszczalnika oraz efektywność ekstrakcji, znacznie skracając czas ekstrakcji nawet do kilku minut i wymaga przy tym znacznie mniejszych ilości rozpuszczalników. Tak zautomatyzowane systemy pozwalają jednocześnie przetwarzać większą liczbę próbek, zwiększając przepustowość, minimalizując ryzyko błędów ludzkich i tym samym poprawiając powtarzalność pomiaru (Huie, 2002; Azmir i in., 2013).

Analiza chemiczna roślin leczniczych również przeszła ewolucję od pracochłonnych, jakościowych testów do zaawansowanych, wysokoprzepustowych metod ilościowych. Historycznie, najczęściej proces analizy roślin leczniczych rozpoczynał się od analizy jakościowej, z zastosowaniem technik pozwalających jedynie na wykrycie czy dana grupa związków jest zawarta w roślinie. Rozwój spektrofotometrii oraz stosowanie automatycznych, precyzyjnych wag laboratoryjnych pozwolił na znaczne skrócenie czasu potrzebnego na analizę ilościową i tym samym niemal całkowite zastąpienie metod czysto jakościowych metodami ilościowymi. Metody te są wciąż rutynowo stosowane do badania zmienności chemicznej roślin leczniczych zwłaszcza do określenia całkowitej zawartości takich grup związków jak flawonoidy, polifenole czy barwniki fotosyntetyczne. Obecnie, wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) stała się standardowym narzędziem w laboratoriach do analizy

związków występujących w roślinach. HPLC jest nie tylko szybsze i dokładniejsze, ale także zużywa mniej rozpuszczalników w porównaniu do tradycyjnych metod. Dostępność i przystępność cenowa systemów HPLC wzrosła, czyniąc je podstawowym wyposażeniem współczesnej analizy fitochemicznej. Ponadto, różnica w kosztach między standardowymi, a bardzo czystymi rozpuszczalnikami (wymaganymi w analizie chromatograficznej) zmniejszyła się, co sprawia, że rozpuszczalniki o wysokiej czystości są bardziej dostępne i dodatkowo umożliwiają częstsze stosowanie analizy HPLC. Również technologie detekcji uległy znaczącym postępom, a spektrometria mas (MS) stała się obecnie złotym standardem w wykrywaniu i ilościowym oznaczaniu związków roślinnych. Wcześniej, detekcja opierała się w dużej mierze na mniej czułych i specyficznych metodach, takich jak spektrofotometria UV-Vis i detektory refraktometryczne. Metody te, choć użyteczne, posiadają znacznie mniejszą czułość i nie rzadko prawidłowa identyfikacja związków chemicznych jest z ich pomocą trudna. Dodatkowo, spektrometria mas pozwala na określenie wagowej zawartości związków chemicznych nawet bez ich znajomości co jest niemożliwe z zastosowaniem detektorów diodowych czy światła rozproszonego. Nowoczesne detektory MS zapewniają niezrównaną czułość i specyficzność, zdolne do identyfikacji i ilościowego oznaczania związków na poziomie śladowym. Integracja MS z HPLC (HPLC-MS) pozwala na szczegółowe profilowanie składników roślinnych, oferując wgląd w ich zmienność chemiczną i potencjalne działania biologiczne (Huie, 2002; Fitzgerald i in., 2019).

Pojawienie się technik metabolomicznych i chemometrycznych dodatkowo rozszerzyło możliwości analizy fitochemicznej roślin leczniczych. Metabolomika obejmuje kompleksowe profilowanie metabolitów w próbce biologicznej, dostarczając całościowego obrazu składu chemicznego rośliny. W połączeniu z analizą chemometryczną, która wykorzystuje metody statystyczne i matematyczne do interpretacji złożonych danych, badacze mogą teraz odsłaniać wzorce i korelacje, które wcześniej były niewidoczne. Rozwój tych metod znacznie zmienił podejście naukowe analizowania zmienności składu chemicznego, gdyż pozwolił na holistyczne analizowanie zmienności wszystkich związków w roślinie w przeciwieństwie do skupiania się jedynie na kilku związkach. Obecnie, obie metody wykorzystywane są często komplementarnie (Yi i in., 2016).

Rezonans magnetyczny (NMR) i spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) to potężne narzędzia również wykorzystywane w analizie

metabolomicznej. Choć techniki te są dostępne od dekad, ich popularność wzrosła dzięki znacznemu zwiększeniu mocy obliczeniowej urządzeń wykorzystywanych do analizy ich wyników. Nowoczesne komputery mogą obsługiwać duże zbiory danych generowane przez NMR i FTIR, ułatwiając bardziej efektywne przetwarzanie i interpretację danych. Ta zdolność uczyniła te techniki bardziej dostępnymi i praktycznymi do rutynowej analizy w wielu laboratoriach. Choć wynik tych analiz często nie pozwalają na określenie drobnych różnic w składzie poszczególnych związków chemicznych, znalazły one zastosowanie w analizie metabolomicznej przede wszystkim z uwagi na bardzo szybki czas analizy – trwający nawet kilka minut, możliwość analizowania składu chemicznego próbek bez ich uprzedniej ekstrakcji, możliwość szybkiego wykrycia zanieczyszczeń w próbce oraz fakt, że próbki nie ulegają zniszczeniu w tym procesie (Kim i in., 2011; Sahoo i Umashankara, 2022).

Podsumowując, metody analizy zmienności chemicznej w roślinach leczniczych ewoluowały znacząco, napędzane postępowaniem technologicznym i mocą obliczeniową. Od zautomatyzowanego przygotowania próbek i efektywnych metod ekstrakcji po zaawansowane techniki analityczne i analizę danych, współczesne podejście do analizy fitochemicznej jest szybsze, dokładniejsze i mniej pracochłonne, oferując głębszy wgląd w złożoną chemię roślin leczniczych. To z kolei umożliwiło analizę większej liczby próbek i kombinacji doświadczeń w badaniach biologicznych.

3.3. Współrzędna uprawa roślin

W dobie rosnących wyzwań związanych ze zrównoważonym rozwojem rolnictwa, takich jak zmiany klimatyczne, erozja gleby i utrata bioróżnorodności, metody uprawy współrzędnej zyskują na znaczeniu jako alternatywa dla tradycyjnych metod uprawy roślin. Warto przy tym zauważyć, że termin „uprawa współrzędna” często używany jest w języku polskim do określenia upraw wielogatunkowych, niekoniecznie uprawianych w jednym rzędzie. Być może wynika to z faktu, że wyrażenie to często używane jest jako przeciwieństwo monokultury (Internet 1-3).

Monokultura to praktyka rolnicza polegająca na uprawie jednego gatunku rośliny na dużym obszarze przez dłuższy okres czasu. Jest to powszechnie stosowana metoda w rolnictwie intensywnym, szczególnie w produkcji roślin takich jak pszenica, ryż,

kukurydza czy soja. Monokultura umożliwia mechanizację procesów rolnych, co prowadzi do zwiększenia efektywności pracy i obniżenia kosztów produkcji. Jednakże, taka forma uprawy wiąże się z wieloma ryzykami ekologicznymi, w tym z obniżeniem bioróżnorodności, wyczerpywaniem składników odżywczych w glebie oraz większą podatnością roślin na choroby i szkodniki, co często wymaga stosowania dużych ilości środków chemicznych (Internet 4-5).

Historycznie, najstarszą metodą radzenia sobie z negatywnymi skutkami monokultury był płodozmian. Płodozmian, znany również jako rotacja upraw, to metoda zarządzania rolniczego polegająca na systematycznym zmienianiu gatunków roślin uprawianych na tym samym polu w kolejnych sezonach rolnych. Praktyka ta ma na celu zapobieganie wyczerpywaniu składników odżywczych w glebie, ograniczenie rozprzestrzeniania się chorób roślin i szkodników, oraz poprawę struktury gleby.

Płodozmian może również przyczyniać się do zwiększenia wydajności upraw poprzez naturalne zarządzanie składnikami odżywczymi i ochronę przed chorobami. W tym modelu uprawy często stosuje się cykl, który obejmuje różne gatunki roślin, takie jak rośliny strączkowe (np. groch, fasola), które mają zdolność wiązania azotu z atmosfery, zboża oraz rośliny o głębokim systemie korzeniowym, które mogą poprawić strukturę gleby. Płodozmian, jest więc alternatywą dla monokultury, gdzie różne rodzaje roślin uprawiane są w różnym czasie. Współcześnie, zwłaszcza w rolnictwie ekologicznym, coraz częściej wykorzystywane są jednak modele upraw, w których kilka gatunków uprawianych jest w jednym czasie. Do upraw takich można zaliczyć np.: uprawy mieszane, uprawy międzyplonowe czy uprawy wielowarstwowe.

Uprawy mieszane polegają na jednoczesnym wzroście różnych gatunków roślin na tym samym polu. Takie podejście pozwala na wzajemne korzystanie roślin z dostępnych zasobów – na przykład w systemie znanym jako "Trzy Siostry", kukurydza, fasola i dynia wzajemnie się wspierają. Kukurydza dostarcza podpory dla pnącej fasoli, fasola wzbogaca glebę w azot, który jest korzystny dla innych roślin, a dynia ze swoimi dużymi liśćmi pomaga zachować wilgoć w glebie i ogranicza rozwój chwastów (Ngapo i in., 2021).

Uprawy międzyplonowe to metoda, gdzie rośliny o różnych terminach wzrostu i zbioru są sadzone w międzyrzędziach. Na przykład pomiędzy rzędami wysokich roślin, takich jak pomidory, można sadzić niższe rośliny, jak sałata. Takie rozmieszczenie

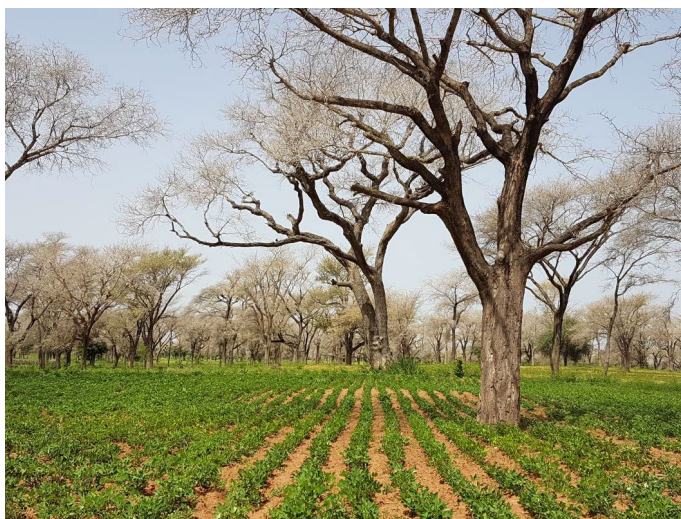
pozwała na lepsze wykorzystanie światła i przestrzeni oraz pomaga w ochronie przed erozją i zmniejsza ryzyko rozprzestrzeniania się chorób.

Uprawy wielowarstwowe polegają na wykorzystaniu różnych warstw przestrzeni pionowej na jednym polu. Na przykład, drzewa owocowe mogą być posadzone obok krzewów jagodowych, a pomiędzy nimi mogą rosnać rośliny zielne, takie jak zioła lub sałaty. Taka struktura upraw nie tylko efektywnie wykorzystuje dostępne światło, ale także sprzyja zachowaniu różnorodności biologicznej i tworzy mikroklimat korzystny dla poszczególnych roślin. Uprawy wielowarstwowe często określane są terminem systemów rolno-leśnych, uprawą agroleśną lub po prostu agroleśnictwem (Zajączkowski i in., 2021).

Agroleśnictwo to zintegrowana praktyka zarządzania terenami rolnymi, która włącza drzewa i krzewy do krajobrazów rolniczych, przynosząc liczne korzyści ekologiczne i ekonomiczne. Po raz pierwszy termin agroleśnictwo (ang. *agroforestry*) został użyty w raporcie IDRC (*International Development Research Centre*), kiedy to powołano *International Council for Research in Agroforestry*, przekształconą w 2002 roku w organizację *World Agroforestry*. W Europie w 2012 roku powołano Europejską Federację Agroleśnictwa (EURAF).

Wyróżnia się m.in. następujące systemy agroleśne:

1. Systemy drzewno-orne (ang. *silvoarable systems*) – te systemy łączące uprawę drzew z tradycyjnymi uprawami rolnymi na tych samych gruntach. Drzewa mogą być sadzone w regularnych odstępach między rzędami upraw rolnych, co umożliwia równoczesne



Rysunek 1 Orzeszki ziemne uprawiane w systemie agroleśnym w Senegalu z akacją białą (*Faidherbia albida*). Źródło: Internet 6

wykorzystanie terenu do produkcji drewna oraz roślin rolniczych. Taki układ

może poprawić strukturę gleby, zwiększyć bioróżnorodność i ograniczyć erozję. Przykład takiej uprawy przedstawiono na rysunku 1.

2. Systemy leśno-pastwiskowe (ang. *silvopastoral systems*) – w tych systemach drzewa są integrowane z pastwiskami dla zwierząt. Dostarczają one cienia i schronienia dla zwierząt, a także mogą przyczynić się do poprawy jakości pasz. Drzewa mogą pomóc w lepszym wykorzystaniu składników odżywczych, co przynosi korzyści zarówno dla drzew, jak i dla traw na pastwiskach (rysunek 2).



Rysunek 2 System leśno-pastwiskowy. Źródło: Internet 7

3. Rolnictwo leśne (ang. *forest farming*) – w tym systemie, rolnicy uprawiają specjalistyczne rośliny, które dobrze rosną w warunkach zacienionych, pod koronami drzew. Mogą to być rośliny lecznicze, grzyby czy inne rośliny preferujące zacienione lub pół-zacienione warunki. To pozwala na efektywne wykorzystanie terenów leśnych do produkcji roślinnej (rysunek 3).



Rysunek 3 Uprawa żeń-szenia (*Panax ginseng* C.A. Meyer) w systemie rolnictwa leśnego. Źródło: Internet 8

4. Ogrody leśne (ang. *forest gardens*) – są to wielowarstwowe, zróżnicowane systemy uprawne, które naśladują naturalne ekosystemy leśne. Ogrody te składają się z wielu typów roślinności, w tym drzew, krzewów, roślin pnących i wieloletnich roślin zielnych. Takie ogrody zapewniają zrównoważoną produkcję żywności w sposób, który także wspiera lokalną faunę i florę (Zajączkowski i in., 2021).

Drzewa odgrywają kluczową rolę w systemach agroleśnych, przynosząc korzyści zarówno ekologiczne, jak i ekonomiczne. Niezależnie od konkretnego typu systemu, ich wpływ na środowisko jest nieoceniony. Przede wszystkim, poprawiają one zdolność gleby do zatrzymywania wody, co jest szczególnie cenne w okresach suszy. Dodatkowo, wpływają na tworzenie korzystniejszego mikroklimatu, co sprzyja rozwojowi lokalnej flory i fauny, tworząc bogate siedliska dla wielu gatunków (Jose, 2009).

Z punktu widzenia zrównoważonego rozwoju rolnictwa, drzewa odgrywają kluczową rolę jako naturalne nawozy, które poprawiają cykl składników odżywczych w glebie. Dzięki głębokiemu systemowi korzeniowemu, drzewa są w stanie wykorzystać nawozy, które zostały wpłukane głębiej pod powierzchnię gleby, poza zasięg korzeni roślin niższych warstw. Ta zdolność drzew do absorbowania nawozów azotowych z głębszych warstw gleby przyczynia się do ochrony wód gruntowych przed

zanieczyszczeniem azotem, co jest korzystne zarówno dla środowiska, jak i ekonomii gospodarstwa rolnego (Jose, 2009).

Z ekonomicznego punktu widzenia, agroleśnictwo otwiera przed rolnikami nowe możliwości. Integracja drzew z tradycyjnymi uprawami rolnymi może znacząco zdywersyfikować źródła dochodów, a także zwiększyć odporność gospodarstw na skutki zmian klimatycznych, które stają się coraz bardziej odczuwalne. Dzięki różnorodnym formom wsparcia oferowanym przez Wspólną Politykę Rolną UE, rolnicy są zachęceni do wdrażania i rozwijania praktyk agroleśnych, co może przynieść długoterminowe korzyści zarówno dla ich gospodarstw, jak i dla środowiska (Olewnicki i Stangierska, 2020; Zajączkowski i in., 2021).

Utrzymywanie systemów agroleśniczych wymaga szczególnej uwagi i dbałości, zwłaszcza w zakresie technik sadzenia drzew i zarządzania ich koronami. Odpowiednie zarządzanie tymi aspektami pozwala uniknąć problemów takich jak nadmierne zacienianie upraw rolnych czy konkurencja o zasoby wodne i składniki odżywcze, zapewniając harmonijne współistnienie drzew i upraw. Efektywne zarządzanie tymi systemami jest kluczem do uzyskania maksymalnych korzyści zarówno ekonomicznych, jak i ekologicznych z agroleśnictwa (Zajączkowski i in., 2021). W ostatnich latach, rosnąca popularność tego typu upraw w Polsce wpłynęła również na zwiększenie się liczby publikacji naukowych dotyczących tego tematu. Pawicka-Józwiak i Józwiak (2020) w swojej publikacji wskazali możliwość wykorzystania obecnych już drzewostanów pochodzenia antropogenicznego, takich jak lasy, zadrzewienia śródpolne czy sady owocowe. Wykorzystanie już istniejących zadrzewień pozwala na łatwiejsze wprowadzenie upraw agroleśnych, gdyż koszt posadzenia drzew został już poniesiony w przeszłości i nie stanowi bariery ekonomicznej. Z kolei Bugajska (2020) wskazuje na choćby takie problemy prawne, jak brak dopłat (przyznawanych w ramach jednolitych płatności obszarowych w Programie Rozwoju Obszarów Wiejskich) do obszaru znajdującego się pod koronami drzew, gdyż nie jest on widoczny na zdjęciach satelitarnych. Wskazuje przy tym szereg korzyści środowiskowych związanych ze wprowadzeniem do powszechnego użycia ekstensywnych systemów leśno-pastwiskowych w stosunku do intensywnej produkcji zwierzęcej. Systemy takie mają znacznie niższy ślad wodny oraz są znacznie wydajniejsze w sekwestracji węgla. Ponadto, z uwagi na głęboki system korzeniowy, pomagają na zmniejszenie bądź

wyeliminowanie problemu zanieczyszczenia wód gruntowych związkami azotu. Ważnym aspektem takich systemów jest również korzystny wpływ na dobrostan zwierząt.

Wiele badań wskazuje również na możliwość wykorzystania roślin leczniczych, tradycyjnie pozyskiwanych z lasów takich jak np.: przetacznik leśny (*Veronica officinalis* L.), dąbrowka rozłogowa (*Ajuga reptans* L.), pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.), róża owocowa (*Rosa rugosa* Thunb), malina moroszka (*Rubus chamaemorus* L.), bez czarny (*Sambucus nigra* L.), miodunka ćma (*Pulmonaria obscura* Dumort.) czy babka większa (*Plantago major* L.) (Osińska i Baj-Wójtowicz, 2020).

3.4. Charakterystyka wybranych gatunków roślin leczniczych

3.4.1. Bez czarny (*Sambucus nigra* L.)

3.4.1.1. Pochodzenie, opis botaniczny i systematyka bzu czarnego

Bez czarny jest rośliną głęboko zakorzenioną w kulturze polskiej. Kielak (2024) badała etnolingwistyczne aspekty nazewnictwa bzu czarnego w języku polskim, odkrywając, jak te nazwy kumulują tradycyjną wiedzę i odzwierciedlają fizyczne oraz kulturowe aspekty tej rośliny. Ponad dwadzieścia różnych nazw używanych w różnych polskich dialektach świadczy o głębokim zakorzenieniu bzu czarnego w kulturze oraz jego znaczeniu. Nazwy takie jak "bez śmierdzący" akcentują charakterystyczny, intensywny zapach rośliny, podczas gdy "czarny bez" wskazuje na ciemne odcienie jego owoców. "Dziki biały bez" podkreśla naturalne środowisko wzrostu i barwę kwiatów. Inne nazwy, takie jak "psi bez", mogą sygnalizować mniej pożądane cechy lub zastosowania rośliny, w przeciwieństwie do "bez lekarski", który eksponuje jego znaczenie w tradycyjnych praktykach leczniczych. Różnorodność tych nazw, od opisujących wygląd po wskazujące na zastosowanie, ukazuje bogaty zasób słów, który wyewoluował z doświadczeń społeczności związanych z tą rośliną. W języku polskim czarny bez znany jest przede wszystkim jako bez, choć w różnych dialektach przyjmuje różnorodne formy, takie jak best, bezd, bezg, besz, bestek, bziak, baźnik, bzówka, bzianka czy bzica. Podobne nazewnictwo występuje w innych językach słowiańskich, takich jak czeskie bez, rosyjskie i ukraińskie без, bułgarskie въз, a także serbskie i chorwackie bazga/baza. Słowo to wiąże się również z łotewskim buzga, co oznacza "kij" oraz z litewskimi terminami bezdas, bezas, bezdis, bezdus, które również odnoszą się do tego krzewu. W polskiej tradycji ludowej bez czarny jest czasem postrzegany jako roślina o demonicznym rodowodzie. Określenia takie jak diaboli bez, stosowane na przykład w regionie Lubelskim, podkreślają te wierzenia. Uważano, że krzew ten został zasadzony przez diabła, stąd nazwy typu diabelskie nasienie. Ludowe podania mówią, że bżowi przypisuje się zamieszkiwanie przez różne demoniczne istoty, takie jak złe duchy, diabły czy czarownice. Z tego powodu na wschodzie Polski ludzie unikali zbierania jego owoców, a dzieciom radzono, aby nie rzucały jego gałęziami, by przypadkiem nie przyciągnąć na siebie nieszczęścia.

Bez czarny (*Sambucus nigra* L.) zaliczany jest do rodziny piżmaczkowatych (*Adoxaceae*), choć dawniej zaliczany by czasem do rodziny przewiertniowatych (*Caprifoliaceae*) lub bzuwaty (*Sambucaceae*). Istnieje wiele kontrowersji dotyczących systematyki rodzaju *Sambucus*. Według różnych autorów, rodzaj ten liczy od 9 do ponad



Rysunek 4 Bez czarny (*Sambucus nigra* L.) w formie drzewa. Źródło: Internet 9

30 gatunków. Najważniejsza reklasyfikacja tego rodzaju nastąpiła na podstawie pracy doktorskiej Richarda Bolli (1994) pt. „Revision of the Genus *Sambucus*”, w której zaproponował on włączenie *Sambucus canadensis* L., *Sambucus cerulea* Raf., *Sambucus peruviana* Kunth, *Sambucus maderensis* Lowe i *Sambucus palmensis* Link do gatunku *Sambucus nigra* jako podgatunki. Sprawę dodatkowo komplikuje fakt, że gatunki te często mogą się krzyżować dając

co prawda płodne potomstwo, ale płodność ta jest zwykle zmniejszona. Wszystkie te rośliny są niemal nierozróżnialne na podstawie budowy kwiatów i to właśnie to kryterium zaważyło na uznaniu przez Bolli’ego tych gatunków za podgatunki. Poza różnicami w morfologii części wegetatywnych oraz owoców występują również różnice w liczbie chromosomów. I tak *Sambucus nigra*, *Sambucus canadensis*, *Sambucus maderensis* i *Sambucus palmensis* mają liczbę chromosomów $2n = 36$; *Sambucus cerulea* – $2n = 38$; natomiast *Sambucus peruviana* $2n = 72$ i najprawdopodobniej jest tetraploidem (Ourecky, 1970; Applequist, 2013). W niniejszej pracy, jeśli nie będzie to w jasny sposób wyróżnione, określenie bez czarny odnosić się będzie do bzu czarnego *sensu stricto* określanego przez niektórych systematyków jako *Sambucus nigra* ssp. *nigra*.

Bez czarny to liściasty krzew lub niskie drzewo, które zwykle osiąga wysokość od 3 do 5 metrów, chociaż w optymalnych warunkach może dorastać do 7 metrów (rysunek 4). Roślina ta jest rodzima dla szerokiego zakresu regionów w Europie oraz części Azji, w tym regionu Kaukazu, i została szeroko naturalizowana w Ameryce Północnej, Azji Wschodniej, Nowej Zelandii oraz częściach Australii. Bez czarny dobrze rośnie w różnorodnych środowiskach od dolin rzecznych po równiny, regiony

międzygórskie. Występuje również w regionach górskich, jednak wysokość do jakiej go można spotkać zależy od regionu. Różne populacje spotykane były do 900 m w Tatrach, 1500 m w Alpach, 2200 m w Maroku oraz 1200 m na Kaukazie (Atkinson i Atkinson, 2002; Schmitzer i in., 2012).

Jego obecność jest widoczna w Europie Zachodniej i Środkowej, Skandynawii, Wielkiej Brytanii oraz sięga do Afryki Północnej, gdzie rośnie w klimatach oceanicznych do suboceanicznych, umiarkowanie chłodnych, a także w klimatach śródziemnomorskich zachodnich. Roślina ta występuje również wzdłuż północnego wybrzeża Turcji i aż do 63°N szerokości geograficznej w zachodniej Norwegii, z populacjami naturalizującymi się jeszcze dalej na północ aż do 68°N. Bez czarny preferuje umiarkowanie do wysoko eutroficzne



Rysunek 5 Liść bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.). Źródło: Internet 10

i zakłócone gleby, często rosnąc na terenach zalewowych, w zaroślach przybrzeżnych,



Rysunek 6 Kwiatostan bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.). Źródło: Internet 11

na obrzeżach lasów oraz w miejscach na które duży wpływ miała działalność człowieka, takich jak żywopłoty, opuszczone ogrody, wokół gospodarstw domowych i na nieużytkach przemysłowych. Roślina ta nie rośnie typowo w głębokim cieniu i rzadko jest spotykana w lasach, zwłaszcza w Europie Środkowej, gdzie preferuje dobrze oświetlone obszary

bogate w składniki odżywcze, o odczynie od neutralnego do zasadowego (Atkinson i Atkinson, 2002; Schmitzer i in., 2012; Horčínová Sedláčková i in., 2018; Bizera i in., 2019).

Bez czarny ma nieparzysto-pierzastozłożone liście, z których każdy składa się typowo z 5 - 7 owalnych, ząbkowanych listków. Listki te są jajowato-eliptyczne, ostro piłkowane, osiągają od 3 do 9 cm długości, przy czym najkrótsze znajdują się przy nasadzie, a najdłuższe dalej na liściu (rysunek 5). Pędy są mocne, z gładką do lekko



Rysunek 7 Dojrzałe owoce bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.). Źródło: Fot. własna

teksturowaną korą, która z wiekiem zmienia kolor z zielonego na szary. Kwiaty bzu czarnego są kremowo białe, drobne, zebrane w duże, płaskie baldachogrona o średnicy do około 20 cm (rysunek 6) Pojedyncze kwiaty mają średnicę około 5–7 mm, posiadają krótki kielich z pięcioma trójkątnymi, stępionymi łatkami oraz białokremową koronę, z pięcioma płatkami zrosniętymi w dolnej części w krótką rurkę. Słupek kwiatu jest pojedynczy z krótką szyjką i 3–5 znamionami, a pręciki mają białe nitki i jasnożółte pylniki. Kwitnie od późnej wiosny do wczesnego lata. Owoce to mięsiste, lśniące pestkowce, które po dojrzeniu przyjmują zwykle fioletowoczarny kolor, choć spotykane są również odmiany o owocach białych. Mają kulisty kształt i średnicę od 6 do 8 mm, zawierając od 3 do 5 nasion (rysunek 7). Nasiona mają jajowaty kształt, trójkątny przekrój z zaokrąglonymi kantami, a ich powierzchnia jest falista i jasnobrązowa do zaróżowionej (Atkinson i Atkinson, 2002; Schmitzer i in., 2012; Horčínová Sedláčková i in., 2018; Bizera i in., 2019).

2.4.1.2. Wymagania klimatyczne i glebowe bzu czarnego

Bez czarny jest gatunkiem charakterystycznym dla zespołu *Sambucetum nigrae*, w którym osiąga optimum rozwoju i często dominuje. Najczęściej występuje w zbiorowiskach klasy *Artemisietea vulgaris*, typowych dla terenów ruderalnych porośniętych roślinnością wieloletnią oraz w zbiorowiskach lasów liściastych rzędu *Fagetalia sylvaticae*, szczególnie w siedliskach mezo- i eutroficznych. Jest ważnym składnikiem nitrofilnych zarośli związanych ze związkami *Sambuco-Salicion*, które stanowią dalszy etap sukcesji w regenerujących się lasach (Zarzycki i in., 2002). Bez czarny jest idealnie przystosowany do klimatów oceanicznych do suboceanicznych, a jego optymalne warunki wzrostu obserwuje się w regionach o umiarkowanych zimach i łagodnych latach. Roślina ta wykazuje odporność na niskie temperatury i spotykana jest na obszarach nawet do strefy mrozoodporności 5 (średnia roczna temperatura minimalna powyżej $-28,9^{\circ}\text{C}$). Dane historyczne wskazują, że bez czarny najlepiej rośnie w miejscach, gdzie średnie temperatury w październiku wynoszą od około $7,2^{\circ}\text{C}$ do 15°C , co zaobserwowano w niektórych regionach Szkocji oraz Afryki Północnej. Zakres ten sprzyja odpowiedniej dojrzałości nasion i rozwijaniu się roślin w sezonie wegetacyjnym (Atkinson i Atkinson, 2002; Finn i in., 2008). Bez czarny charakteryzuje się także umiarkowaną tolerancją na zanieczyszczenia miejskie oraz wiatry morskie, co czyni go odpowiednim do uprawy w przybrzeżnych oraz umiarkowanie zanieczyszczonych środowiskach miejskich. Jednakże długotrwałe narażenie na ciężkie metale i zanieczyszczenia kwasowe może hamować jego wzrost i rozwój owoców. Rośliny te wymagają pełnego słońca do częściowego zacienienia do optymalnego wzrostu; nadmierna ilość cienia może znacząco ograniczyć kwitnienie i owocowanie (Atkinson i Atkinson, 2002).

Bez czarny preferuje przepuszczalne, żyzne gleby bogate w materię organiczną. Najlepiej rośnie na glebach gliniastych i ilastych, które zachowują wilgoć, choć roślina ta nie toleruje długotrwałego zalania systemu korzeniowego. Bez czarny może rosnąć na glebach o pH od kwaśnego do zasadowego (pH 4,5 do 8,7), z optymalnym wzrostem obserwowanym w zakresie pH od 5,5 do 7,5 (Atkinson i Atkinson, 2002). Nawożenie jest kluczowe dla maksymalizacji produkcji bzu czarnego. Nawozy organiczne, takie jak dobrze rozłożony obornik, poprawiają strukturę gleby, jej żyzność i zdolność zatrzymywania wody, co jest korzystne dla roślin bzu, szczególnie w regionach

podatnych na okresy suszy. Dodatkowo, mineralne nawozy, zwłaszcza przy niższej żyzności gleby, również mogą korzystnie wpłynąć na plonowanie roślin. W badaniu Mitre i in. (2022) stosowanie zbilansowanych nawozów NPK (16:16:16), w połączeniu z azotanem amonu i węglanem wapnia, wykazało znaczną poprawę plonów i wzrostu roślin, z zalecanym stosowaniem 50 kg obornika na drzewo, w połączeniu z 0,8 kg NPK 16:16:16, 0,8 kg NH_4NO_3 i 5 kg CaCO_3 na drzewo.

2.4.1.3. Znaczenie gospodarcze bzu czarnego

Bez czarny, dzięki uznawanym korzyściom zdrowotnym i wszechstronnym zastosowaniom, zdobywa znaczącą uwagę na globalnym rynku. Polska jest jednym z ważniejszych producentów bzu czarnego w Europie. Zarówno kwiaty jak i owoce tego gatunku są wysoko cenione za ich właściwości lecznicze, często wykorzystywane w produkcji syropów, herbat i innych produktów zdrowotnych mających na celu wzmacnianie funkcji immunologicznych oraz leczenie objawów przeziębienia i grypy. Bez czarny znajduje również zastosowanie w sektorze kulinarnym, gdzie stosuje się go do produkcji dżemów, soków i win. Szeroko zakrojona uprawa i zbieranie bzu czarnego w Polsce przyczyniają się do lokalnej gospodarki, ale także wspierają życie na wsi i tradycyjne praktyki. Brak szczegółowych danych rynkowych dla Polski znacznie utrudnia pełne zrozumienie wpływu ekonomicznego i potencjalnych możliwości wzrostu na polskim rynku.

Generalnie na rynku europejskim, Węgry bardzo rozwinęły produkcję bzu czarnego, z szybką ekspansją obserwowaną od końca lat 90. Powierzchnia upraw wzrosła do 4500 hektarów do 2010 roku, inspirowana zapotrzebowaniem na naturalne barwniki spożywcze oraz niskimi kosztami rozpoczęcia uprawy bzu czarnego. Pomimo okazjonalnych problemów produkcyjnych spowodowanych czynnikami środowiskowymi, takimi jak nadmierne opady deszczu, sektor ten wykazał odporność i rentowność, oferując atrakcyjny stosunek zysku do kosztów oraz szybkie zwroty z inwestycji (Apáti, 2014). Corocznie zbiera się około 107 milionów kg owoców bzu czarnego w całej Europie, na czele z Austrią, Włochami, Czechami, Polską i Węgrami, które przyczyniają się do największej części produkcji. Tak znacząca produkcja podkreśla wagę bzu czarnego w europejskim krajobrazie rolniczym. Wartość rynkowa bzu czarnego różni się znacznie w zależności od formy produktu – od świeżych owoców

sprzedawanych na lokalnych rynkach po wysoce przetworzone ekstrakty, na które jest zapotrzebowanie w przemyśle nutraceutyków (Gafner i Sudberg, 2021).

W Stanach Zjednoczonych wykorzystanie bzu czarnego wzrasta, szczególnie z uwagi na właściwości przeciwwirusowe i zastosowanie w różnych produktach, takich jak wina, dżemy, galaretki i suplementy diety. Popularne w Europie odmiany bzu czarnego nie są dobrze przystosowane do warunków w niektórych stanach, takich jak Missouri, dlatego wyhodowano tam takie odmiany jak 'Wyldeewood' i 'Bob Gordon' aby zwiększyć produkcję i dostosowanie do lokalnych klimatów. Branża stoi przed wyzwaniami, takimi jak ograniczona skala produkcji komercyjnej i potrzeba specjalistycznej wiedzy uprawowej, co utrudnia szeroką adopcję. Jednak istnieją znaczące możliwości ekspansji, szczególnie poprzez rozwój produktów o dodanej wartości i zwiększony nacisk na lokalną produkcję w celu zmniejszenia zależności od importu, który obecnie odbywa się głównie z Europy (Cernusca i in., 2009).

Rynek surowców pochodzących z bzu czarnego nie jest wolny od fluktuacji, które często są ściśle związane z zewnętrznymi wydarzeniami zdrowotnymi, takimi jak nasilenie chorób wirusowych o postaci epidemicznej lub pandemicznej. Na przykład, rynek suplementów diety z bzu czarnego odnotował znaczący wzrost sprzedaży podczas pandemii COVID-19, gdy konsumenci szukali produktów przeciwwirusowych oraz wspomagających odporność. Ten wzrost popytu był kontynuacją trendu obserwowanego podczas wcześniejszych kryzysów zdrowotnych, takich jak pandemia grypy H₁N₁ w 2009 roku, która również spowodowała wzrost sprzedaży bzu czarnego. Za każdym razem, gdy pojawiało się nowe zagrożenie wirusowe, zwłaszcza w obecności ograniczonych opcji leczenia czy zapobiegania, rynek produktów z bzu czarnego rósł, odzwierciedlając zaufanie społeczeństwa do tradycyjnej medycyny w czasach kryzysów zdrowotnych. Jednak w okresach bez takich kryzysów zdrowotnych, sprzedaż wykazywała spadki, odzwierciedlając wrażliwość rynku na percepcje konsumentów i zewnętrzne wydarzenia zdrowotne (Blumenthal i in., 2011). Dane ze sprzedaży w Głównych Wielobranżowych Kanałach sprzedaży (ang. *Mainstream Multi-Outlet Channel*) obejmujące dane sprzedaży z głównych punktów handlowych, takich jak supermarkety, sieciowe drogerie, wielobranżowi sprzedawcy detaliczni oraz inne duże formy sprzedaży obsługujące zróżnicowaną bazę konsumentów pokazują, że przez ostatnią dekadę widoczny jest konsekwentny wzrost sprzedaży suplementów diety zawierających bez czarny. Analizując dane od 2011 roku, kiedy to sprzedaż notowana

była na około 15 milionów dolarów amerykańskich, produkty te cieszyły się coraz większą popularnością notując stałe roczne wzrosty do około 50 milionów dolarów w 2014 roku. Wzrost ten utrzymywał się na umiarkowanym poziomie, osiągając około 110 milionów dolarów w 2018 roku. Dane sprzedaży w 2019 roku były stosunkowo stabilne, z niewielkimi zmianami w porównaniu z poprzednim rokiem. Jednak w 2020 roku nastąpił znaczny wzrost, gdy sprzedaż wzrosła do około 275 milionów dolarów, prawdopodobnie dzięki zwiększonemu zainteresowaniu konsumentów produktami wzmacniającymi odporność w trakcie pandemii COVID-19. W 2021 roku sprzedaż ustabilizowała się, utrzymując wysoki poziom osiągnięty w poprzednim roku. Nawet większe kontrasty zaobserwowano w sprzedaży w kanale naturalnym, obejmującym specjalistyczne sklepy ze zdrową żywnością i inne punkty, które kładą nacisk na naturalne i ekologiczne produkty. W tym wypadku wartość sprzedaży w 2011 roku wynosiła około 5 milionów dolarów amerykańskich i odnotowywała stały wzrost do poziomu około 10 milionów dolarów w 2019 roku. Na tym rynku natomiast, w 2020 roku odnotowano ponad pięciokrotny wzrost zainteresowania konsumentów osiągając wartość rynku na poziomie 54 milionów dolarów. Choć wartości te nie utrzymały się długo i w 2021, wartość ta wyniosła 31 milionów dolarów, pokazuje to jak cenny jest to surowiec leczniczy (Gafner i Sudberg, 2021).

W dużo bliższej nam gospodarce, w Czechach, zbieranie bzu czarnego jest częścią szerszej kategorii produktów leśnych nie będących drewnem, które odgrywają istotną rolę społeczno-ekonomiczną. Zapewniają one źródło dochodu i rekreacji, ale także przyczyniają się do dziedzictwa kulturowego obszarów wiejskich. Choć około 50% tych produktów to grzyby jadalne, pozostałe 50% stanowią różnego rodzaju owoce jadalne takie jak borówka czarna, malina, jeżyna czy właśnie bez czarny. Analizując wartość produktów leśnych skupowanych w Czechach w latach 1994 do 2013 wykazano, że bez czarny stanowił około 10% wartości zbieranych owoców lub około 5% wszystkich produktów leśnych z pominięciem drewna (Sisak i in., 2016).

2.4.1.4. Związki biologicznie czynne, właściwości oraz wykorzystanie bzu czarnego

Skład chemiczny bzu czarnego jest zróżnicowany i zależy od wielu czynników, takich jak odmiana, lokalizacja występowania lub uprawy, stadium dojrzałości oraz warunki klimatyczne. W kontekście zawartości węglowodanów, owoce bzu zawierają

od 7,86 do 11,50% cukrów ogółem, w tym od 2,8 do 8,55% cukrów redukujących. Głównymi cukrami są glukoza (33,33–50,23 g/kg ŚM – świeżej masy) i fruktoza (33,99–52,25 g/kg ŚM), natomiast sacharoza występuje w niewielkich ilościach (0,47–1,68 g/kg ŚM). Owoce bzu czarnego są również bogate w błonnik pokarmowy, w tym pektynę, kwas pektynowy, protopektynę, pektynian wapnia oraz celulozę (Veberic i in., 2009; Młynarczyk i in., 2018).

Zawartość białka w różnych organach rośliny różni się – wynosi od 2,7 do 2,9% w owocach, 2,5% w kwiatach i 3,3% w liściach. Białko to obejmuje szesnaście aminokwasów, z których dziewięć jest niezbędnych; całkowita zawartość niezbędnych aminokwasów wynosi około 9% w kwiatach i 11,5% w liściach. Tłuszcze są głównie akumulowane w nasionach bzu (zawartość tłuszczu: 22,4%) oraz w mące z nasion (zawartość tłuszczu: 15,9%). Dominującymi kwasami tłuszczowymi są wielonienasycone kwasy tłuszczowe, stanowiące 70,5% wszystkich kwasów tłuszczowych w nasionach. Stosunek kwasów tłuszczowych omega-6 do omega-3 wyniósł dla oleju z nasion bzu czarnego 1,19:1. Stosunek ten jest jednym z ważnych parametrów wartości zdrowotnych olejów i tłuszczów. Biorąc pod uwagę zarówno stosunek kwasów tłuszczowych nienasyconych do nasyconych (84,26%) jak i jakościową zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-6 do omega-3 można stwierdzić, że olej z nasion bzu czarnego ma jeden z korzystniejszych składów spośród olejów roślinnych (Fazio i in., 2013; Młynarczyk i in., 2018).

Owoce bzu czarnego zawierają również organiczne kwasy takie jak kwas cytrynowy, kwas jabłkowy, kwas szikimowy i kwas fumarowy, które stanowią od 0,4 do 0,64 % zawartości owoców. Głównym kwasem organicznym występującym w owocach jest kwas cytrynowy, który może stanowić nawet 75% wszystkich kwasów organicznych. Składniki mineralne występują zarówno w owocach, jak i w kwiatach bzu, przy czym zawartość substancji mineralnych wynosi od 0,90 do 1,55% masy owoców, w tym potas (2953–5494 mg·kg⁻¹ ś.m.), fosfor (735–1337 mg·kg⁻¹ ś.m.), wapń (574–1528 mg·kg⁻¹ ś.m.), sód (13–146 mg·kg⁻¹ ś.m.), magnez (396–739 mg·kg⁻¹ ś.m.), żelazo (12,4–84,7 mg·kg⁻¹ ś.m.), cynk (1,9–11,3 mg·kg⁻¹ ś.m.), mangan (3,6–9,5 mg·kg⁻¹ ś.m.) oraz miedź (1,7–2,9 mg·kg⁻¹ ś.m.). W wynikach różnych badań podano różne stężenia witaminy C, przy czym zawartość tej witaminy w owocach bzu jest zależna od odmiany i lokalizacji wzrostu roślin. Ponadto, nasiona bzu są również źródłem witaminy E, w tym α -tokoferolu i γ -tokoferolu. Zawartość α -tokoferolu wynosi 0,49 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ oleju, natomiast

γ -tokoferolu – 2,63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Oprócz tego, owoce i kwiaty bzu czarnego zawierają śladowe ilości olejków eterycznych, które składają się z około 53 związków w owocach i 58 w kwiatach (Veberic i in., 2009; Młynarczyk i in., 2018).

Dodatkowo, bez czarny zawiera glikozydy cyjanogenne, sambunigrinę i prunazyne, które mają działanie toksyczne, a ich stężenie jest najwyższe w liściach i niedojrzałych owocach, ale ulega degradacji podczas obróbki termicznej (Młynarczyk i in., 2018).

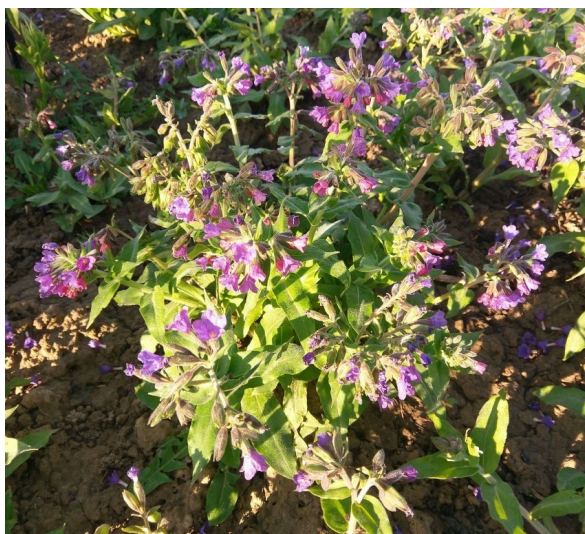
Owoc bzu czarnego zawiera szczególnie dużo związków antocyjanowych, takich jak cyjanidyna-3-glukozyd i cyjanidyna-3-sambubiozyd, a także w mniejszych ilościach cyjanidyna-3,5-diglukozyd oraz cyjanidyna-3-sambubiozyd-5-glukozyd. Antocyjany, znane ze swoich funkcjonalnych właściwości, są używane jako barwniki spożywcze oraz przyczyniają się do redukcji stresu oksydacyjnego poprzez usuwanie wolnych rodników, co czyni je potencjalnymi środkami chemoprewencyjnymi. Zawartość tych związków zależy od odmiany, etapu dojrzewania, sezonu wegetacyjnego oraz metody i sposobu ekstrakcji. Ponadto, inne polifenole występujące w owocach bzu czarnego to kwas chlorogenowy, neochlorogenowy, kryptochlorogenowy, kwercetyna, rutyna (kwercetyna-3-rutynozyd), izokwercytryna (kwercetyna-3-glukozyd), astragalina (kaempferol-3-glukozyd), oraz izoramnetyna-3-rutynozyd i izoramnetyna-3-glukozyd. Rutyna jest głównym flawonolem w tej roślinie, podczas gdy izokwercytryna i astragalina występują w mniejszych ilościach (Veberic i in., 2009; Młynarczyk i in., 2018).

Kwiaty i owoce bzu czarnego są znane jako tradycyjne środki lecznicze stosowane w różnych dolegliwościach i chorobach, często wykorzystywane w medycynie ludowej. Są przede wszystkim używane do leczenia typowych objawów związanych z przeziębieniem, gorączką, kaszlem, zatkanym nosem, wydzieliną śluzową oraz grypą, a także prewencyjnie do wzmacniania systemu immunologicznego. Oba te surowce były w przeszłości surowcami farmakopealnymi, jednakże owoc bzu czarnego (*Sambuci fructus*) po raz ostatni opisany był w Farmakopei Polskiej IV w 1970 r. Jedynie kwiat bzu czarnego (*Sambuci flos*) wciąż opisywany jest w Farmakopei Polskiej, według której są to wysuszone kwiaty, w których zawartość flawonoidów wynosi co najmniej 0,80% w przeliczeniu na izokwercytozyd. Dzięki obecności flawonoidów, kwiaty bzu wykazują przede wszystkim właściwości napotne, przeciwgorączkowe i moczopędne. Ponadto kwiaty bzu wykazują właściwości przeciwzapalne i antybakteryjne, stąd są stosowane

do płukania gardła lub jako kompresy na zapalenie spojówek. Najczęściej używa się ich w postaci naparów z suszonych kwiatów do stosowania wewnętrznego lub zewnętrznego. Owoce bzu czarnego, podobnie jak kwiaty, posiadają właściwości napotne, przeciwgorączkowe i moczopędne, ale ponadto działają jako środek przeczyszczający i detoksykujący, dlatego często są składnikiem ziołowych mieszanek stosowanych jako środek na zaparcia lub wspomagające odchudzanie. Ponadto owoce bzu wykazują umiarkowane działanie przeciwbólowe i mogą być używane jako środek wspomagający leczenie migreny, rwy kulszowej i bólów nerwowych (Mahboubi i in., 2012; Młynarczyk i in., 2018; Mahboubi, 2021; Nurzyńska-Wierdak i Krajewska, 2022; Farmakopea Polska XIII, 2023).

Nie tylko kwiaty i owoce bzu są korzystne dla zdrowia, ale również kora, korzeń, łodyga i liście bzu czarnego były używane, zwłaszcza przez ludność wiejską, jako lekarstwo lub pożywienie. Na przykład, kora bzu jest znana z właściwości moczopędnych i odchudzających, podczas gdy liście bzu mogą pomagać w zwiększeniu odporności na choroby zakaźne. Owoce i kwiaty bzu czarnego, często wykorzystywane są jako środki przeciwko przeziębieniu, grypie i innym chorobom zakaźnym. Są one używane jako składniki suplementów diety w formie syropów, kropli, tabletek, kapsułek, pastylek do ssania, aerozoli, emulsji lub zawiesin. W literaturze często zgłaszana jest antywirusowa aktywność owoców bzu czarnego. Bardzo popularnym suplementem o takich właściwościach, sprzedawanym jako środek profilaktyczny w wielu krajach, jest preparat Sambucol, opatentowany w Izraelu przez dr Madeleine Mumcuoglu (Młynarczyk i in., 2018).

3.4.2. Miodunka miękkowłosa (*Pulmonaria mollis* Wulfen ex Hornem.)



Rysunek 5 Miodunka miękkowłosa podczas kwitnienia. Źródło: Fot. własna

Miodunka miękkowłosa jest byliną należąca do rodziny ogórecznikowatych (*Boraginaceae*) (rysunek 8). Roślina ta preferuje cieniste, wilgotne i żyzne środowiska leśne. Jest gatunkiem rzadkim, występującym głównie na wschodzie i południowo-wschodzie Polski. Spotykana jest w widnych i suchych lasach (zwłaszcza świetlistych dąbrowach z rzędu *Quercetalia pubescenti-petraeae*, dla których jest gatunkiem charakterystycznym), a także w zaroślach; preferuje gleby zasadowe. Typowo osiąga wysokość od 20 do 40 cm. Wiosną, roślina ta wypuszcza pędy kwiatostanowe, które po zapyleniu i zawiązaniu nasion zamierają, a w ich miejsce pojawiają się duże liście i roślina utrzymuje wzrost wegetatywny aż do jesieni, kiedy liście te zamierają. Jej zasięg występowania obejmuje Europę Środkową, jednak jej obecność odnotowuje się również na rozległych terenach kontynentu euroazjatyckiego. Analizy filogenetyczne sugerują, że *P. mollis* prawdopodobnie wyewoluowała z grupy przodków w plejstocenie, migrując wraz z biocenozami dębowymi z południowo-wschodniej do środkowej Europy. Gatunek ten występuje przede wszystkim na glebach bogatych w wapń i składniki odżywcze oraz wilgotnych (Sauer, 1987; Zarzycki i in., 2002).

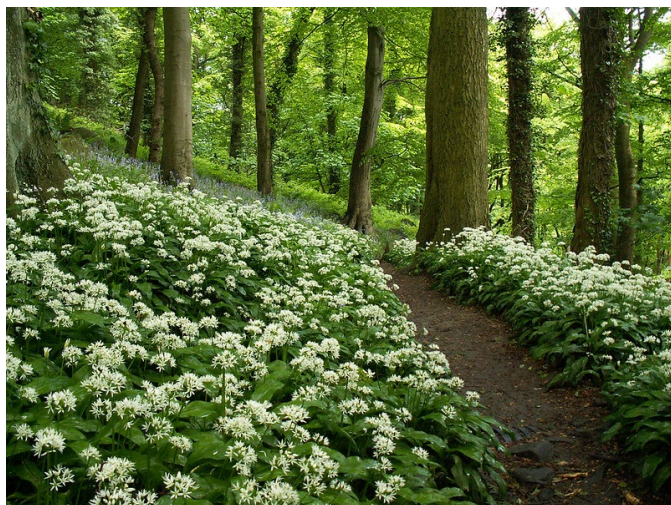
Gatunek ten nie został opisany w farmakopei, choć badania naukowe wskazują na miodunkę miękkowłosą jako na istotne źródło związków biologicznie czynnych, takich jak alantoina i kwas rozmarynowy. Dodatkowo, miodunka miękkowłosa zawiera szerokie spektrum innych związków biologicznie aktywnych, w tym polifenole, taniny oraz flawonoidy. Wysoka zawartość mikroelementów hematopoetycznych takich jak żelazo (Fe), mangan (Mn), miedź (Cu) i kobalt (Co), będąca nawet dwukrotnie wyższa niż w miodunce ćmej czy plamistej, może być związana z jej działaniem przeciw niedokrwistości. Te właściwości zostały potwierdzone w badaniach empirycznych, w których ekstrakty z miodunki miękkowłosej skutecznie przywracały poziomy

hemoglobiny u szczurów cierpiących na niedobory żelaza, osiągając efekty porównywalne z lekami syntetycznymi. Ponadto, gatunek ten odznacza się istotną aktywnością przeciwutleniającą i przeciwzakrzepową (Kruglov, 2012; Chauhan i in., 2022).

3.4.3. Czosnek niedźwiedzi (*Allium ursinum* L.)

Czosnek niedźwiedzi należy do rodziny amarylkowatych (*Amaryllidaceae*) i obejmuje dwa główne podgatunki różniące się morfologią i regionem występowania: *Allium ursinum* L. *subsp. ursinum* oraz *Allium ursinum subsp. ucrainicum* (Oksner) Kleopow. Pierwszy z nich jest rozpowszechniony w Europie Zachodniej, natomiast drugi głównie w Europie Wschodniej. Jest to gatunek charakterystyczny dla mezo- i eutroficznych lasów liściastych z rzędu *Fagetalia sylvaticae*. Czosnek niedźwiedzi posiada szerokie, lancetowate liście odziomkowe wyrastające bezpośrednio z cebuli (rysunek 9). Liście te osiągają zazwyczaj szerokość od 1,5 do 2,5 cm i wydzielają intensywny czosnkowy aromat po zgnieceniu. Roślina tworzy białe, gwiazdkowate kwiaty zebrane w baldach na bezlistnej łodydze, która wznosi się bezpośrednio z cebuli. Okres kwitnienia przypada na miesiące od kwietnia do czerwca i zależy od lokalnych warunków klimatycznych i geograficznych (Zarzycki i in., 2002; Rola, 2012).

Czosnek niedźwiedzi ceniony jest przede wszystkim ze względu na swoje właściwości kulinarne i lecznicze. Jest popularną rośliną dziko rosnącą w wielu częściach Europy, cenioną za liście o smaku czosnku. Leczniczo stosuje się je ze względu



Rysunek 6 Czosnek niedźwiedzi tworzący poszycie lasu liściastego. Źródło: Internet 12

na właściwości antybakteryjne i przypisuje się im korzyści w leczeniu nadciśnienia oraz jako środek wspomagający detoksykację organizmu. Mimo to, surowiec ten nie został opisany w Farmakopei Polskiej (Sobolewska i in., 2015). Czosnek niedźwiedzi wykazuje również silne właściwości allelopatyczne, wpływające

na bioróżnorodność runa leśnego, szczególnie w lasach bukowych i mieszanych. Roślina ta wydziela różnorodne związki fenolowe do gleby, hamujące kiełkowanie nasion i rozwój roślin sąsiadujących. Do związków tych należą między innymi flawonoidy i związki siarkowe (Djurdjevic i in., 2004).

3.4.4. Kopytnik pospolity (*Asarum europaeum* L.)

Kopytnik pospolity zaliczany jest do rodziny kielichowcowatych (*Aristolochiaceae*) w obrębie rzędu pieprzowców (*Piperales*), który obejmuje również rodzinę pieprzowatych (*Piperaceae*). Gatunek ten jest szeroko rozpowszechniony w strefach klimatu umiarkowanego półkuli północnej, w tym w Europie, Azji i Ameryce Północnej. Roślina jest gatunkiem rodzimym dla wschodniej i południowej Europy, stanowiącym znaczący komponent medycyny Unani (Akhlaq i in., 2022).



Rysunek 7 Kopytnik pospolity. Źródło: Internet 13

Kopytnik pospolity charakteryzuje się rozległym podziemnym kłączem i liśćmi o nerkowatym kształcie (rysunek 10). Tworzy on ukryte, dzwonkowate kwiaty o barwie zazwyczaj brązowej lub purpurowej. Typowa wysokość rośliny wynosi 5–10 cm, z pełzającą, owłosioną łodygą. Liście mają owalny kształt, są spiczaste i pokryte włoskami, co ułatwia adaptację do zacienionych, wilgotnych siedlisk leśnych (Saedi i in., 2020; Akhlaq i in., 2022).

Gatunek ten preferuje warunki cieniste pod koronami drzew w lasach liściastych i mieszanych, charakteryzując się wysokim stopniem adaptacji do ekosystemów leśnych z minimalną penetracją światła. Jest to gatunek charakterystyczny dla mezo- i eutroficznych lasów liściastych z rzędu *Fagetalia sylvaticae*. Kopytnik pospolity jest

dominującym gatunkiem w warstwie podszytu, gdzie poziom oświetlenia wynosi zwykle 10% pełnego nasłonecznienia (Zarzycki i in., 2002; Kovalenko i in., 2017).

Kłącze kopytnika pospolitego zawiera olejek eteryczny, w skład którego wchodzi m.in. azaron. Kłącze posiada także inne związki takie jak flawonoidy, związki fenolowe i seskwiterpeny, które odgrywają kluczową rolę w jego działaniu biologicznym i farmakologicznym (Saeedi i in., 2020; Akhlaq i in., 2022).

W tradycyjnych systemach medycyny zielarskiej w Europie, kopytnik pospolity był stosowany do leczenia szeregu dolegliwości, od bólów głowy po nieżyt nosa i jako środek moczopędny. W tradycyjnej medycynie irańskiej używany jest do poprawy pamięci i funkcji poznawczych. Współczesne badania farmakologiczne podkreślają jego potencjał w zakresie działania neuroprotektynowego, przypisywanego inhibicji enzymów takich jak acetylocholinesterazy, zaangażowanych w rozkład neuroprzekazników w mózgu. W medycynie Unani, roślina ta stosowana jest w leczeniu chorób oddechowych, zaburzeń żołądkowo-jelitowych, schorzeń neurologicznych oraz jako środek profilaktyczny przeciwko infekcjom, takim jak ospa wietrzna czy dżuma. Ponadto, kopytnik pospolity wykorzystywany był w medycynie Unani, również w leczeniu takich chorób jak zapalenie oskrzeli, padaczka, zapalenie wątroby i inne. Stosowany jest w różnorodnych formach, w tym proszków, odwarów i olejków, zarówno jako pojedynczy lek, jak i w formułacjach złożonych z innych ziół, służąc jako środek profilaktyczny w chorobach wirusowych (Saeedi i in., 2020; Akhlaq i in., 2022).

3.5. Wpływ czynników abiotycznych na gromadzenie się wybranych grup związków chemicznych

Jak omówiono wcześniej, szereg czynników, takich jak czynniki genetyczne, środowiskowe czy agrotechniczne, mają istotny wpływ na syntezę i akumulację różnych metabolitów pierwotnych i wtórnych. W niniejszym rozdziale postanowiono skoncentrować się na roli czynników abiotycznych, które mają znaczący wpływ na akumulację wybranych grup związków biologicznie czynnych określanych w ramach tej pracy. Analiza obejmie następujące grupy związków chemicznych: chlorofil **a** i **b**, karotenoidy, związki polifenolowe (w tym flawonoidy i antocyjany), białko oraz zawartość rozpuszczalnych węglowodanów. Każda z tych grup związków odgrywa kluczową rolę w odpowiedziach roślin na zmieniające się warunki środowiskowe

i interakcje z innymi organizmami, co czyni je istotnymi zarówno z punktu widzenia biologicznego, jaki potencjalnych aplikacji praktycznych. Celem tego rozdziału jest omówienie, jak zmienne czynniki biotyczne i abiotyczne wpływają na te metabolity, oraz w efekcie, na właściwości prozdrowotne tych roślin.

Barwniki fotosyntetyczne

Dai i in. (2009) wykazali, że różne rodzaje nawozów, zarówno organiczne (obornik bydlęcy, obornik drobiowy), jak i nieorganiczne (nawóz NPK), mają istotny wpływ na poziomy (zawartość) chlorofilu w roślinach uprawnych. Autorzy ci zauważyli, że nawozy organiczne zwiększają zawartość chlorofilu bardziej znacząco niż nawozy nieorganiczne, co można przypisać poprawie zdrowia gleby oraz lepszej dostępności mikroelementów niezbędnych do syntezy chlorofilu. Jest to zgodne z publikacją Esteban i in. (2015), która wskazuje, że nawozy, szczególnie te bogate w azot, mają decydujący wpływ na proporcje i poziomy tych pigmentów. Zmiany w dostępności składników odżywczych nie tylko modyfikują ilość, ale także jakość tych pigmentów, co ma wpływ na optymalizację odpowiedzi roślin na warunki świetlne oraz na zwiększenie ich odporności na uszkodzenia fotooksydacyjne.

Adaptacja barwników fotosyntetycznych, takich jak chlorofile i karotenoidy, do zróżnicowanych warunków oświetleniowych jest fundamentalnym aspektem badań nad adaptacją roślin do ich środowiska. Barwniki te, odpowiedzialne za procesy fotosyntezy i fotoprotekcji, wykazują zdolność do dynamicznego dostosowywania swoich stężeń oraz proporcji w odpowiedzi na zmieniające się natężenie światła. W warunkach intensywnego światła, rośliny zazwyczaj zwiększają stosunek chlorofilu **a** do chlorofilu **b**, co ma na celu optymalizację efektywności fotosystemów bezpośrednio zaangażowanych w konwersję energii świetlnej. Mechanizm ten jest wspierany przez zmianę składu karotenoidów na formy lepiej zaadaptowane do funkcji fotoprotekcyjnych, takie jak β -karoten i ksantofile, które odgrywają kluczową rolę w neutralizacji reaktywnych form tlenu i bezpiecznym rozpraszaniu nadmiaru energii świetlnej (Esteban i in., 2015).

Z kolei w warunkach zacielenia, obserwuje się u roślin tendencję do zwiększania zawartości chlorofilu w celu maksymalizacji absorpcji światła, co jest niezbędne w środowiskach o ograniczonym dostępie do światła. Przykładem może tu być np. *Tetrastigma hemsleyanum* Diels i Gilg, pnącze z rodziny winoroślowatych (*Vitaceae*),

cenione w tradycyjnej medycynie chińskiej jako środek przeciwzapalny, przeciwwirusowy oraz wspomagający leczenie układu oddechowego. Roślina ta pochodzi z subtropikalnych lasów Chin, gdzie rośnie w wilgotnych i cienistych środowiskach, osiąga najwyższe stężenia chlorofilu **a** i **b** w warunkach 90-procentowego zacienienia, co jest typowym zjawiskiem w niskich warunkach świetlnych. Ponadto, liście adaptujące się do cienia wykazują modyfikacje w strukturze chloroplastów, które ułatwiają efektywniejszą pracę w warunkach zmniejszonego natężenia światła, takie jak zmiany w konfiguracji gran w chloroplastach (Lichtenthaler i in., 1981; Dai i in., 2009).

Procesy enzymatyczne odpowiedzialne za syntezę chlorofilu są wrażliwe na zarówno zbyt wysokie, jak i zbyt niskie temperatury, co może prowadzić do hamowania tych reakcji oraz degradacji chlorofilu już obecnego w tkankach roślinnych. Optymalna temperatura dla syntezy chlorofilu, wynosząca około 30°C, jest istotna dla zachowania wysokiej efektywności fotosyntezy (Y. Li i in., 2018). Z kolei niskie temperatury wpływają na skład karotenoidów, zwłaszcza na zwiększenie stosunku luteiny do chlorofilu, co sugeruje adaptacyjne mechanizmy roślin do ochrony w chłodniejszych warunkach (Esteban i in., 2015).

Związki polifenolowe

Obserwuje się, że niższe stężenia azotu często korelują z wyższą koncentracją związków polifenolowych. Taka zależność wynika z konkurencji azotu ze szlakami metabolicznymi fenylpropanoidów o wspólne substraty. W rezultacie, przy ograniczonej dostępności azotu, rośliny mogą intensyfikować alokację zasobów na syntezę fenolową, pełniącą funkcję mechanizmu obronnego. Na przykład, liczne badania dowodzą, że redukcja nawożenia azotem przyczynia się do zwiększenia zawartości polifenoli w sałacie i innych warzywach liściastych. W przeciwieństwie, nadmiar azotu może skutkować obniżeniem syntezy polifenoli, co jest wynikiem priorytetyzacji procesów wzrostu i rozwoju nad produkcją metabolitów wtórnych (Sofa i in., 2016). Interakcja azotu z innymi pierwiastkami, takimi jak potas (K) i fosfor (P), również wpływa na poziomy polifenoli. Przykładowo, w niektórych badaniach potas wykazał zdolność do łagodzenia negatywnych efektów wysokiego stężenia azotu na syntezę polifenoli w winogronach. Porównania systemów rolnictwa ekologicznego i konwencjonalnego często wykazują wyższą zawartość związków polifenolowych w roślinach uprawianych metodami ekologicznymi. Jest to przypisywane indukowanej przez stres syntezie

polifenoli, spowodowanej niższą dostępnością mineralnych nawozów i pestycydów w systemach ekologicznych (Heimler i in., 2017).

Intensywność światła bezpośrednio wpływa na biosyntezę flawonoidów oraz innych związków fenolowych, które odgrywają kluczową rolę w ochronie roślin przed promieniowaniem ultrafioletowym i atakami patogenów. Ponadto, związki te przyczyniają się do ogólnej kondycji roślin w różnorodnych warunkach środowiskowych. W przypadku roślin herbaty (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), zacienienie modyfikuje biosyntezę różnorodnych flawonoidów, w tym katechin oraz proantocyjanidyn. Obniżenie intensywności światła spowodowane zacienieniem prowadzi do znaczącego zmniejszenia stężenia tych polifenoli, co skutkuje redukcją cierpkości oraz potencjalną poprawą właściwości sensorycznych herbaty. Badania wykazały, że zacienienie roślin herbaty indukuje istotne obniżenie poziomu katechin i proantocyjanidyn, odpowiednio o 53,37% i 43,26% w porównaniu do roślin uprawianych w pełnym nasłonecznieniu. Spadek ten jest ściśle związany z redukcją ekspresji genów w ścieżce biosyntezy flawonoidów. Odnośnie imbiru, zacienienie wpływa w różny sposób na akumulację flawonoidów i kwasów fenolowych w zależności od części rośliny. Liście roślin zaciemnionych w 60% wykazywały wyższe stężenie flawonoidów, takich jak mirycetyna, która jest niemal nieobecna w warunkach pełnego światła słonecznego. Przeciwnie do tego, pewne kwasy fenolowe takie jak kwas kawowy, wykrywane były niemal wyłącznie w warunkach pełnego nasłonecznienia (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011; Wang i in., 2012).

Wpływ temperatury na zawartość polifenoli również nie jest jednoznaczny i zależy bardziej od odchylenia od temperatury optymalnej dla danego gatunku. W przypadku pomidorów, najwyższa akumulacja związków fenolowych została zaobserwowana przy 35°C, co znacząco przekracza optymalne warunki wzrostu dla tego gatunku. Jest to skorelowane z maksymalną aktywnością enzymu fenylalaniny amoniolazy (PAL), co sugeruje mechanizm obronny w odpowiedzi na stres termiczny. W umiarkowanej temperaturze 25°C, zarówno zawartość fenoli, jak i aktywność PAL osiągały najniższe wartości, natomiast w temperaturze 15°C, chociaż poziomy fenoli i aktywność PAL były wyższe niż przy 25°C, nie osiągnęły wartości zanotowanych przy 35°C, co wskazuje na obecność umiarkowanego stresu termicznego. W przypadku arbuza, odpowiedź na temperaturę była niemal odwrotna, co wynika z ich adaptacji do wyższych temperatur optymalnych. Najwyższe wartości akumulacji fenoli

i aktywności PAL zaobserwowano przy 15°C, podyktowane najprawdopodobniej intensywną reakcją obronną w odpowiedzi na niską temperaturę. Przy 25°C, obie te wartości były niższe niż przy 15°C, lecz wyższe niż przy 35°C, co jest zbliżone do optymalnych warunków wzrostu dla tego gatunku. Najniższe poziomy fenoli i aktywności PAL zanotowano przy 35°C, co odpowiada warunkom najbliższym optymalnemu środowisku wzrostu i wskazuje na minimalną potrzebę aktywacji mechanizmów obronnych (Rivero i in., 2001).

Stres wywołany suszą lub zasoleniem prowadzi do wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu w roślinach, co skutkuje wystąpieniem stresu oksydacyjnego. W odpowiedzi na to zjawisko, rośliny intensyfikują syntezę antyoksydantów, w tym polifenoli. Na przykład, w przypadku dziurawca oszronionego (*Hypericum pruinatum* L.) obserwuje się, że stres zasolenia znacząco zwiększa poziomy specyficznych związków fenolowych, takich jak kwas chlorogenowy i kwercetyna, podczas gdy stres spowodowany suszą nie wpływa w znaczący sposób na skład chemiczny tych roślin. W czosnku różowym (*Allium roseum* L.) natomiast, zarówno susza, jak i stres zasolenia prowadzą do wzrostu poziomów ogólnych polifenoli, cukrów rozpuszczalnych oraz witaminy C, nie wpływając jednocześnie negatywnie na parametry wzrostu, co sugeruje ogólne zwiększenie potencjału antyoksydacyjnego rośliny. Podwyższenie poziomu polifenoli jest związane z aktywacją enzymu amoniolaza fenylalaniny, kluczowego w szlaku fenylpropanoidowym, który odpowiada za produkcję polifenoli. Dodatkowo, zdolność polifenoli do eliminacji reaktywnych form tlenu przyczynia się do ich efektywności w zwiększaniu odporności roślin na stres (Reginato i in., 2015; Caliskan i in., 2017; Najjaa i in., 2018).

Białka

Nawożenie istotnie wpływa na zawartość białka w roślinach, co zostało zilustrowane np. w badaniu przeprowadzonym na Stewii. W badaniu tym porównywano efekty stosowania nawozów mineralnych i organicznych na wzrost i parametry biochemiczne roślin. Wyniki wskazały, że kombinacja obu typów nawozów nie tylko zwiększyła ogólny wzrost roślin, ale również istotnie podniosła poziom białek w porównaniu z próbami kontrolnymi. Obserwowany wzrost zawartości białka można przypisać optymalizacji dostępności składników odżywczych zarówno ze źródeł

organicznych, jak i nieorganicznych, co sprzyja zwiększonej aktywności metabolicznej i syntezie białek, kluczowych dla rozwoju roślin i ich adaptacji do stresu. Szczególnie istotny wpływ na zawartość białka ma nawożenie azotowe, gdyż ten pierwiastek jest kluczowy w budowie tych metabolitów (Patil, 2010).

Dostępność światła ma istotny wpływ na zawartość białka w roślinach, przy czym nasłonecznienie zazwyczaj zwiększa syntezę białka dzięki intensyfikacji procesów fotosyntezy i metabolizmu. W przeciwieństwie do tego, rośliny rosnące w warunkach zacienionych charakteryzują się niższą zawartością białka, co wynika z ograniczonej intensywności światła, a co za tym, ograniczającej dostępność energii potrzebnej do fiksacji węgla i syntezy białek. Rośliny przystosowane do pełnego nasłonecznienia adaptują swoją strukturę liści i ścieżki metaboliczne w celu wsparcia wyższej aktywności enzymów fotosyntetycznych, takich jak RuBisCO, co prowadzi do zwiększonej produkcji białka. Z kolei rośliny przystosowane do cienia kierują zasoby przede wszystkim na maksymalizację efektywności pochłaniania światła, co skutkuje mniejszym przydziałem zasobów na syntezę białka i niższą ogólną zawartością białka (Mathur i in., 2018).

Cukry

Wpływ czynników abiotycznych na zawartość rozpuszczalnych węglowodanów w roślinach jest dobrze udokumentowany przez liczne badania, które wskazują, że takie stresy jak susza, zasolenie i niedobór składników odżywczych zazwyczaj prowadzą do wzrostu stężenia rozpuszczalnych cukrów jako mechanizmu obronnego. To zwiększenie jest częścią procesu adaptacji osmotycznej, w ramach której wyższe poziomy cukru pomagają w utrzymaniu turgoru komórkowego oraz ochronie struktur komórkowych. Na przykład, badania wykazały, że stres suszy zwiększa zawartość rozpuszczalnych cukrów w liściach rumianku uprawianego w Niemczech, szczególnie gdy jest dodatkowo nawożony nawozami organicznymi, takich jak kompost dżdżownicowy. Analogicznie, niedobór azotu w roślinach *Labisia pumila* (Blume) Fern.-Vill. (roślina tropikalna z rodziny pierwiosnkowatych) skutkowało wyższym poziomem węglowodanów niestrukturalnych, w tym cukrów rozpuszczalnych, co jest wynikiem przekierowania zasobów z procesów wzrostu na produkcję wtórnych metabolitów

w warunkach ograniczonej dostępności składników odżywczych (Ibrahim i in., 2011; Salehi i in., 2016; W. Li i in., 2018).

4. Materiał i metody

4.1. Charakterystyka materiału badawczego

Materiał do badań stanowiły rośliny bzu czarnego, miodunki miękkowłosej, kopytnika pospolitego oraz czosnku niedźwiedziego:

Bez czarny

Do badań wykorzystano dwuletnie sadzonki bzu czarnego odmiany 'Samdal' zakupione w gospodarstwie znajdującym się w Rybczewicach Drugich. Odmiana ta, wyhodowana została w Danii w latach osiemdziesiątych dwudziestego wieku we współpracy Royal Veterinary and Agricultural University w Kopenhadze i Centrum badawczym w Årslev. Odmiana ta charakteryzuje się silnym wzrostem i szybkim wejściem w okres owocowania, co umożliwia jej uprawę zarówno w formie krzewu, jak i drzewa. 'Samdal' wyróżnia się średniej wielkości krzewami z wieloma pędami, średnimi rozmiarami baldachów i owoców, wysoką zawartością antocyjanów i niską zawartością kwasów. Owoce dojrzewają równomiernie w ciągu tygodnia. Ze względu na swoje właściwości, owoce odm. 'Samdal' są szczególnie cenione w produkcji napojów, w tym win owocowych i dżemów, dzięki swojemu doskonałemu smakowi i właściwościom organoleptycznym soku.

Miodunka miękkowłosa

Rośliny miodunki miękkowłosej zostały подарowane przez dr Mirosława Angielczyka z firmy Dary Natury w Korycinach. Materiał nasadzeniowy stanowiły wyrosnięte, wieloletnie rośliny pochodzące z uprawy.

Kopytnik pospolity

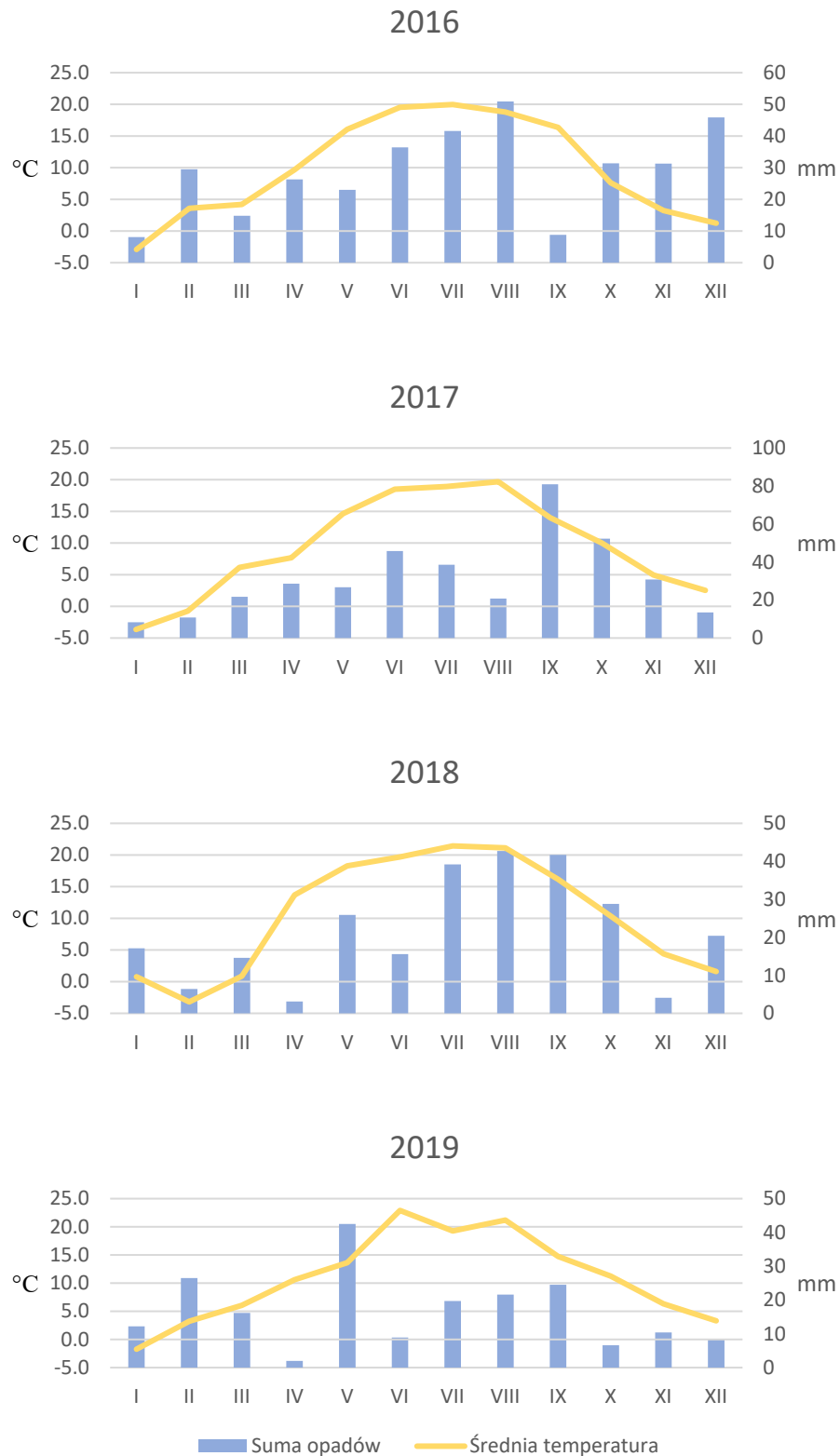
Rośliny kopytnika pospolitego zostały zakupione w szkółce roślin ozdobnych Skalniak w miejscowości Dobków. Rośliny stanowiły młode, ukorzenione sadzonki z 2-3 liśćmi.

Czosnek niedźwiedzi

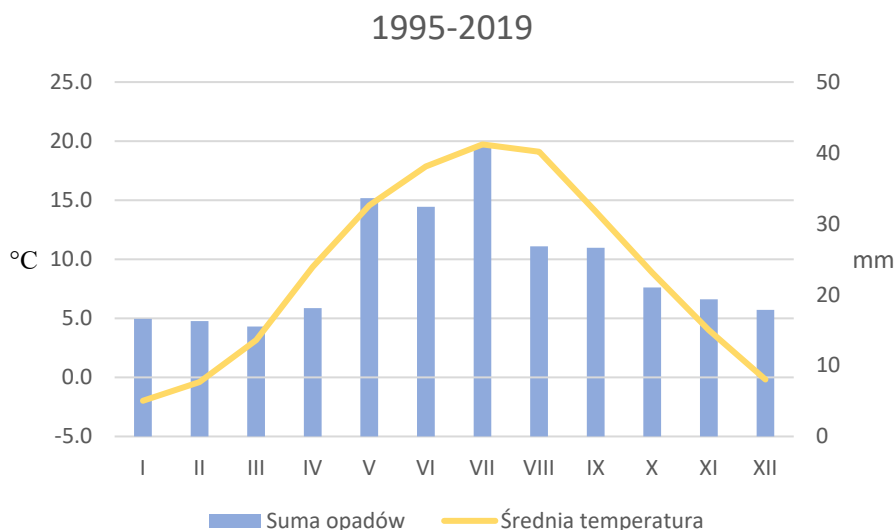
Materiał nasadzeniowy czosnku niedźwiedziego stanowiły cebule zakupione od prywatnej osoby za pośrednictwem internetu. Były to cebule 2-3 letnich roślin wykopane w okresie spoczynku.

4.2. Lokalizacja oraz warunki prowadzenia uprawy

Doświadczenia przeprowadzono na polu doświadczalnym Katedry Roślin Warzywnych i Leczniczych w Wilanowie-Zawadach (strefa mrozoodporności roślin USDA 6b; 80 m n.p.m.; gleba aluwialna – mada wiślana). Wiosną 2015 roku na miejscu prowadzenia uprawy wysiano gorczycę jako nawóz zielony w dawce 15 kg na hektar, która po osiągnięciu fazy kwitnienia została przyorana. Bezpośrednio przed rozpoczęciem doświadczenia wykonano nawożenie superfosfatem potrójnym w ilości 70 kg P₂O₅ na hektar oraz siarczanem potasu w ilości 100 kg K₂O na hektar. Dane dotyczące średniej miesięcznej temperatury powietrza i opadów w czasie trwania doświadczeń przedstawiono na rysunkach 11-12.



Rysunek 8 Średnie miesięczne temperatury oraz suma opadów w latach 2016-2019. Opracowanie własne na podstawie danych z European Climate Assessment & Dataset (ECA&D)



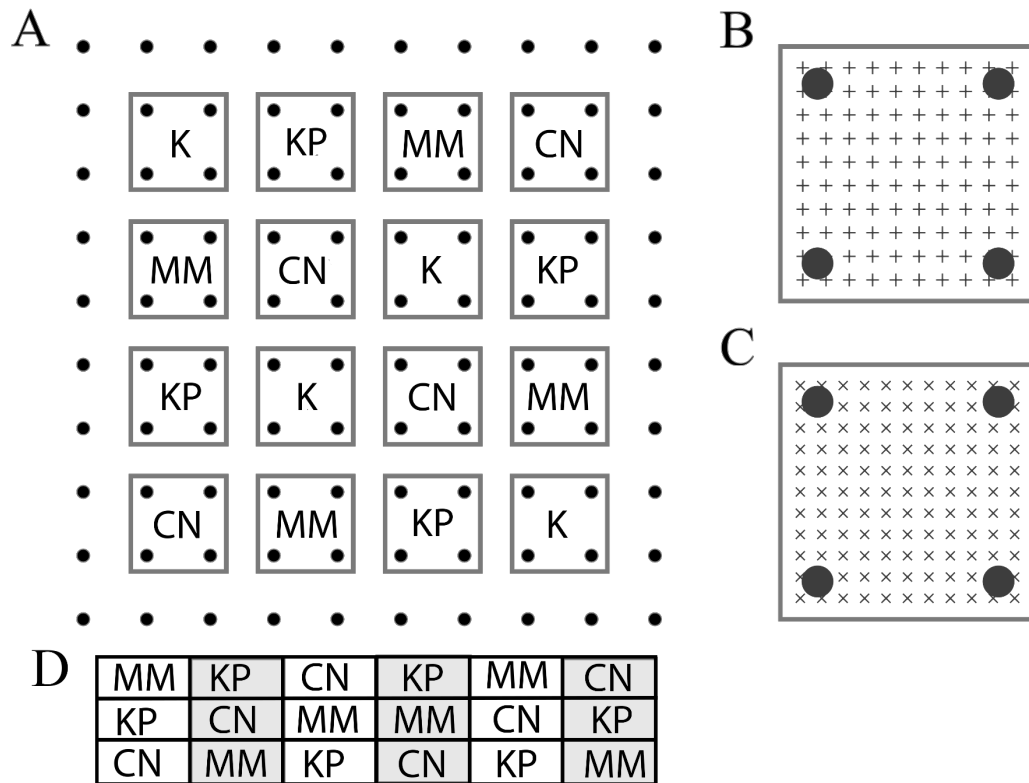
Rysunek 9 Średnie miesięczne temperatury oraz suma opadów w latach 1995-2019. Opracowanie własne na podstawie danych z European Climate Assessment & Dataset (ECA&D)

Badania stanowił cykl trzech doświadczeń realizowany w latach 2015-2019. Pierwszy cykl doświadczeń dotyczył plonowania i jakości surowców zielarskich (kwiatu i owocu) z bzu czarnego uprawianych w systemie agroleśnym w porównaniu z uprawą konwencjonalną. Drugi miał na celu scharakteryzowanie surowców pozyskanych z roślin podszytu, w zależności od warunków świetlnych, natomiast trzeci dotyczył określenia zmienności chemicznej liści bzu czarnego oraz ich przydatności jako surowca zielarskiego.

4.2.1. Część I doświadczeń – Uprawa współrzędna bzu czarnego (2015-2018)

Jesienią 2015 roku posadzono 100 dwuletnich sadzonek bzu czarnego odmiany 'Samdal' w rozstawie 2m × 2m. Wiosną 2016 roku, rośliny zostały przycięte tak, aby pozostał tylko jeden pęd, a od tego czasu rośliny były formowane na kształt drzewa z koroną zaczynającą się na wysokości około 2m. Otaczające 36 roślin wybrano jako ochronę przed nadmiernym nasłonecznieniem, które mogłoby spowodować efekt brzegowy, a pozostałe 64 wewnętrzne rośliny stanowiły materiał roślinny do badań. Te rośliny podzielono na 16 poletek w układzie kwadratu łacińskiego, a wczesną wiosną 2017 roku posadzono na nich rośliny podszytowe w rozstawie 0,3m × 0,3m (miodunka

miękkowłosa i kopytnik pospolity) lub 0,25m × 0,25m (czosnek niedźwiedzi), co skutkowało ostatecznymi wymiarami poletek 3m × 3m dla każdego gatunku rośliny podszytowej oraz kontrolą w 4 powtórzeniach. Schemat doświadczenia przedstawia rysunek 13, a przykład poletka z miodunką miękkowłosą rysunek 14. Podczas okresu ukorzeniania się rośliny były podlewane w miarę potrzeb, aby zapewnić właściwe ukorzenienie. Od tego czasu rośliny nie były ani nawożone, ani podlewane.



Rysunek 10 Schemat doświadczenia. A – obszar doświadczenia, każda kropka (●) obrazuje pojedynczą roślinę bzu czarnego. Poszczególne kwadraty reprezentują odpowiednie kombinacje doświadczenia w zależności od gatunku towarzyszącego: Kontrola (K), kopytnik pospolity (KP), miodunka miękkowłosa (MM) i czosnek niedźwiedzi (CN). B – pojedyncze poletko miodunki miękkowłosej lub kopytnika pospolitego, każdy (+) odpowiada pojedynczej roślinie. C pojedyncze poletko czosnku niedźwiedziego, każdy (×) odpowiada jednej roślinie. D – poletka gatunków towarzyszących w pełnym nasłonecznieniu (białe tło) oraz pod siatką cieniującą (szare tło)



Rysunek 11 Przykładowe poletko z miodunką miękkowłosą jako gatunek towarzyszący.
Źródło: Fot. własna

4.2.2. Część II doświadczeń – Zmienność chemiczna liści czosnku niedźwiedziego oraz miodunki miękkowłosej w zależności od warunków oświetlenia (2017-2019)

Schemat doświadczenia przedstawia rysunek 13D. Wiosną 2017 roku założono poletka doświadczalne sadząc rośliny gatunków podszytowych w układzie bloków podzielonych (split-plot). Gdzie głównymi blokami były warunki świetlne:

- uprawa w pełnym nasłonecznieniu
- uprawa pod siatką cieniującą – poletka przykryto siatką cieniującą o zacienieniu 50% uzyskując zacienienie względne na poziomie 75%

Bloki te zostały powtórzone trzykrotnie. Każdy z bloków został następnie podzielony na trzy części, gdzie posadzono gatunki podszytowe:

- Kopytnik pospolity
- Miodunka miękkowłosa
- Czosnek niedźwiedzi

Poletka te zostały zlokalizowane w bezpośrednim sąsiedztwie uprawy współrzędnej z bzem czarnym. Dla każdego z gatunków zostało posadzonych 15 roślin na powtórzenie w takiej samej rozstawie jak w uprawie współrzędnej z bzem czarnym.

4.2.3. Część III doświadczeń – Zmienność chemiczna liści bzu czarnego oraz określenie ich przydatności jako surowca leczniczego (2016-2018)

Do części III doświadczeń wykorzystano rośliny bzu czarnego z części I doświadczeń.

4.3. Zbiór surowca zielarskiego do analiz chemicznych

4.3.1. Bez czarny

Na każdym poletku z gatunkiem podszytowym w uprawie współrzędnej bzu czarnego posadzono cztery drzewa bzu czarnego. Spośród nich, dwa drzewa zostały wybrane do zbioru kwiatów bzu czarnego, a pozostałe dwa do zbioru owoców.

Kwiaty

Z każdego z wybranych drzew zebrano wszystkie kwiatostany, określono ich liczbę i określono ich masę z dokładnością do 1g. Następnie, pobrano próbę reprezentatywną świeżych kwiatów przez delikatne otrząsanie kwiatostanów. Pozostałe kwiatostany zostały następnie wysuszone w temperaturze 35°C w ciemności. Po zważeniu suchych kwiatostanów, kwiaty zostały oddzielone od baldachów przez ocieranie na sicie i ponownie zważone z dokładnością do 0,1g.

Kwiaty z próbki reprezentatywnej zostały zważone z dokładnością do 0,001g po czym zostały zamrożone w temperaturze -80°C, zliofilizowane oraz zmielone. Przed zmieleniem, kwiaty zostały ponownie zważone w celu określenia suchej masy kwiatów po liofilizacji. Tak przygotowane próbki, przechowywano w szczelnych opakowaniach plastikowych w ciemności do czasu wykorzystania ich do analiz chemicznych.

Ostateczny plon kwiatów świeżych i suchych określono z uwzględnieniem próby reprezentatywnej zebranej do analiz laboratoryjnych.

Owoce

Zbiór owoców bzu czarnego został przeprowadzony w ten sam sposób co zbiór kwiatów. Dodatkowo, w zebranej próbce reprezentatywnej owoców przed zmieleniem określono liczbę owoców, którą następnie wykorzystano do określenia świeżej i suchej masy 1000 owoców.

Liście

Zbiór liści bzu czarnego przeprowadzony został jesienią w 2016 roku oraz w czterech terminach na rok w latach 2017 - 2018. Terminy te zostały wybrane na podstawie faz fenologicznych roślin. Fazy te to:

- Wiosna – liście zebrane zostały po spoczynku zimowym roślin. Zbiór został dokonany, gdy pierwsze pojawiające się liście były w pełni rozwinięte.
- Kwitnienie – zbiór liści w tym terminie został dokonany podczas pełni kwitnienia bzu czarnego
- Owocowanie – zbiór liści w tym terminie został dokonany, gdy owoce bzu czarnego były w pełni dojrzałe
- Jesień – zbiór liści w tym terminie został dokonany tuż przed wejściem roślin w spoczynek zimowy, jednak kiedy liście jeszcze samoistnie nie opadały.

Liście zebrane zostały do worków strunowych, zamrożone w temperaturze -80°C , a następnie zliofilizowane. Po liofilizacji, oddzielono blaszkę liściową od ogonka liściowego i głównego nerwu. Do analiz wykorzystano jedynie blaszkę liściową.

4.3.2. Kopytnik pospolity

Z uwagi na bardzo słaby wzrost i rozwój roślin kopytnika pospolitego nie dokonano zbioru jego liści i kłaczy i tym samym nie były one przedmiotem dalszych badań.

4.3.3. Miodunka miękkowłosa

Zbiór ziela miodunki odbył się wiosną 2018 i 2019 roku. Każda roślina została zebrana oddzielnie do uprzednio oznakowanej torby papierowej, a następnie zważona z dokładnością do 1g. Z losowo wybranych toreb pobrano próbkę reprezentatywną do analiz laboratoryjnych. Na torbach zanotowano nową masę, uwzględniającą pobranie części materiału do analiz. Następnie rośliny zostały wysuszone, po czym określono powietrznie suchą masę każdej rośliny z dokładności do 0,1g. Próbkę reprezentatywną do analiz laboratoryjnych została poddana podobnej obróbce jak w przypadku kwiatów, owoców oraz liści bzu czarnego.

4.3.4. Czosnek niedźwiedzi

Z uwagi na wiosenną suszę, rośliny czosnku niedźwiedziego były drobne co nie pozwoliło na dokładne określenie masy pojedynczych roślin. W celu ustalenia plonu, zebrano więc rośliny z całego poletka i podobnie jak w przypadku miodunki przygotowano próbkę reprezentatywną do dalszych analiz oraz określono powietrznie suchą masę. Liście czosnku niedźwiedziego wazone były z dokładnością do 0,1g oraz 0,01g odpowiednio dla świeżej i powietrznie suchej masy.

4.4. Metody prowadzenia pomiarów oraz analiz chemicznych

4.4.1. Materiał i metody prowadzenia ekstrakcji

Materiał do ekstrakcji stanowił zliofilizowany, a następnie sproszkowany materiał roślinny. W zależności od gatunku były to:

- Bez czarny: liście, kwiaty, owoce
- Miodunka miękkowłosa: ziele
- Czosnek niedźwiedzi: liście

Bezpośrednio po zbiorze, materiał roślinny został zamrożony w temperaturze -80°C i przechowywany w ten sposób do czasu przeprowadzenia liofilizacji. Bezpośrednio po przeprowadzeniu liofilizacji, materiał roślinny został zmielony w młynku laboratoryjnym IKA M20 z kontrolą przed przegrzewaniem się, a następnie umieszczany

w szczelnie zamykanym pojemniku z tworzywa sztucznego do czasu przeprowadzenia ekstrakcji i analiz.

Określenie bezwzględnie suchej masy:

Bezwzględnie suchą masę określono z zastosowaniem metody suszarkowej. Do szklanych naczynek wagowych odważono 1g sproszkowanego surowca po liofilizacji i suszono w temperaturze 104°C do uzyskania stałej masy. Procentowy udział bezwzględnie suchej masy wykorzystano do wyliczenia zawartości substancji biologicznie aktywnych we wszystkich wymienionych poniżej analizach.

Sposób i warunki prowadzenia ekstrakcji:

Do ekstrakcji przygotowanych wcześniej ww. surowców wykorzystano przyspieszoną ekstrakcję rozpuszczalnikową (*Accelerated Solvent Extraction*) z wykorzystaniem aparatu ASE 350 firmy Thermo Scientific. Naważka do ekstrakcji wynosiła 500 mg. Ilość użytego ekstrahenta była zmienna w granicach 21-23 ml, natomiast po ekstrakcji każdy z ekstraktów został uzupełniony metanolem do 25 ml. Ekstrakcja prowadzona była w warunkach około 10 MPa w komorach ze stali nierdzewnej wyposażonych w filtr celulozowy. Szklane kulki o średnicy 1-2 mm zostały wykorzystane do wypełnienia pustej przestrzeni. Wykorzystano następujące parametry ekstrakcji:

- Ekstrahent: metanol 99,8%
- Temperatura: 100°C
- Czas nagrzewania komory ekstrakcyjnej: 5 min
- Czas ekstrakcji statycznej: 5 min
- Liczba cykli w ekstrakcji: 3
- Objętość rozpuszczalnika do przemycia próbki po ekstrakcji: 5 ml (50%)
- Czas wydmuchania próbki azotem: 45 sekund

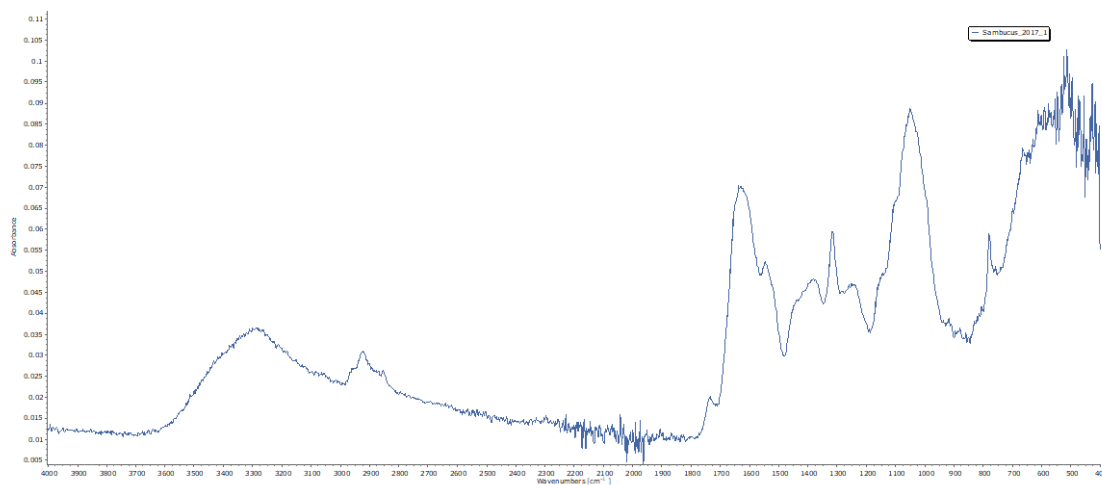
4.4.2. Analiza profilu związków chemicznych w liściach bzu czarnego z zastosowaniem spektrofotometrii w podczerwieni

Profilowanie związków chemicznych występujących w liściach bzu czarnego rozpoczęto od analizy zliofilizowanych, a następnie sproszkowanych próbek liści z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera przy użyciu osłabionego całkowitego odbicia - ATR-FTIR (*Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Technika ta charakteryzuje się czułością na szerokie spektrum związków chemicznych, jest niedestruktywna oraz jest bardzo szybka w przeprowadzeniu, przez co stanowi bardzo dobre narzędzie do wstępnej oceny zróżnicowania chemicznego pomiędzy wieloma próbkami.

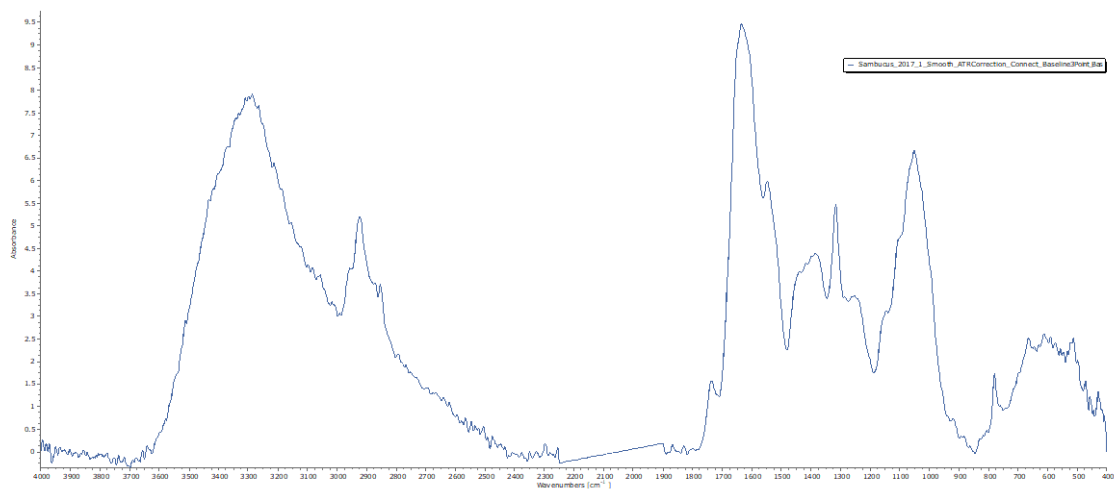
W ramach przeprowadzonych badań zastosowano spektrofotometr w podczerwieni IRSpirit (Shimadzu), wyposażony w nakładkę ATR z kryształem diamentowym, co pozwoliło na bezpośrednią analizę próbek bez konieczności ich wcześniejszego przygotowania. Pomiar spektralny przeprowadzono w zakresie od 4000 do 400 cm^{-1} przy rozdzielczości spektralnej wynoszącej 4 cm^{-1} . Dla każdej z analizowanych próbek wykonano 10 skanów, mając na celu optymalizację stosunku sygnału do szumu przy zachowaniu efektywności czasowej procesu badawczego. Z uwagi na potencjalny wpływ zmian środowiskowych na wyniki pomiarów, co dziesiąty pomiar wykonano jako pomiar bazowy, aby uwzględnić ewentualne zmiany atmosferyczne w laboratorium. Procedura ta pozwoliła na skorygowanie wyników pod kątem wpływu temperatury i innych czynników środowiskowych, zapewniając tym samym większą precyzję i powtarzalność otrzymanych danych. Do analizy zebranych danych spektralnych wykorzystano oprogramowanie LabSolutionsIR firmy Shimadzu oraz SpectraGryph (wersja 1.2.8; Menges 2018), które umożliwiły szczegółową obróbkę i interpretację wyników.

Surowe widmo sproszkowanych liści bzu czarnego przedstawia rysunek 15. Z uwagi na zastosowanie techniki osłabionego całkowitego odbicia, widmo takie musiało zostać poprawione, gdyż piki dla krótszych fal (wyższej liczby falowej) wychodzą niższe niż dla fal dłuższych (niższa liczba falowa). W tym celu zastosowano apodyzację Happ-Genzela. Poprawione widmo widoczne jest na rysunku 16. Proces ten powtórzono dla wszystkich zebranych widm liści bzu czarnego, dla wszystkich kombinacji doświadczenia oraz dla wszystkich terminów pomiędzy jesienią 2016, a jesienią 2017.

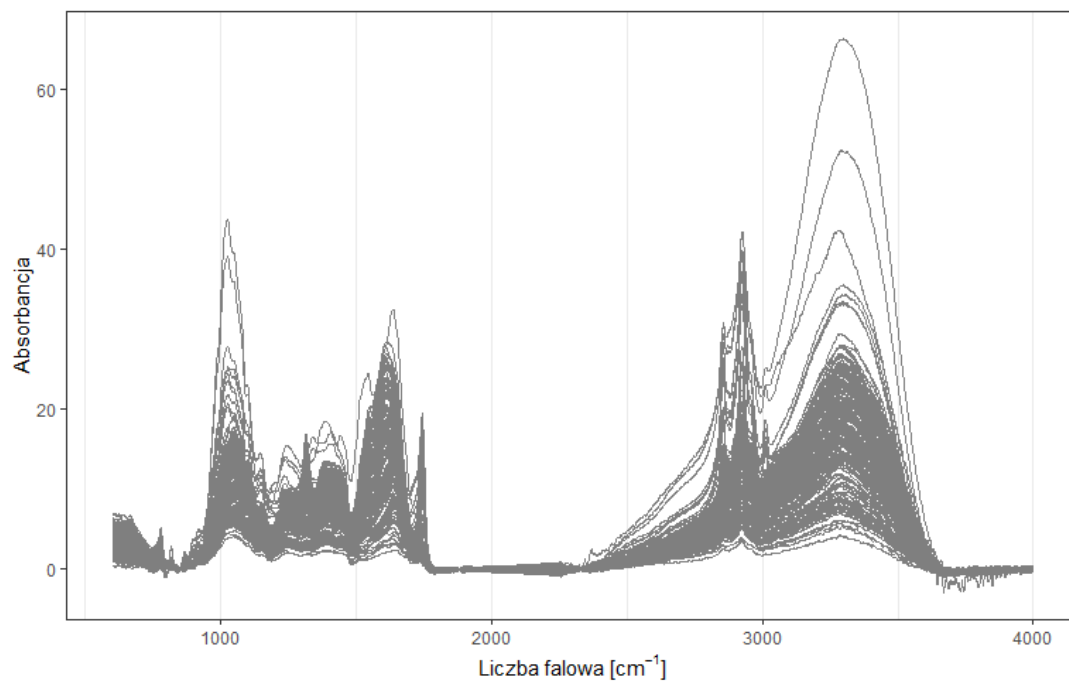
Wszystkie zebrane widma obrazuje rysunek 17. Po usunięciu regionów z wysoką zawartością szumów tj. początek i koniec widma (rysunek 18), widma zostały znormalizowane przy wykorzystaniu techniki PQN (*Probabilistic Quotient Normalization*) (rysunek 19). Normalizacja ta pozwoliła na wyeliminowanie różnic w intensywności widm wynikającą z różnicy w powierzchni jaka miała kontakt z diamentem w urządzeniu. Tak przygotowane widma przedstawiają sumę widm dla poszczególnych związków chemicznych występujących w liściach bzu. Wstępna analiza widma pozwoliła zidentyfikować celulozę jako główny składnik badanych proszków. Z uwagi na niemal przytłaczający wpływ tego związku, dalsza analiza wykonana została na widmach różnicowych, w których od widma po normalizacji (rysunek 19) usunięto widmo celulozy (rysunek 20). Tak przygotowane widma (rysunek 21) pozwoliły na zaobserwowanie różnic w zawartości związków o mniejszym udziale procentowym. Szczególnie wysoką zmienność pomiędzy widmami zaobserwowano dla regionu od 1500 do 1780 cm^{-1} (rysunek 22) i właśnie ten region został wybrany do dalszej analizy.



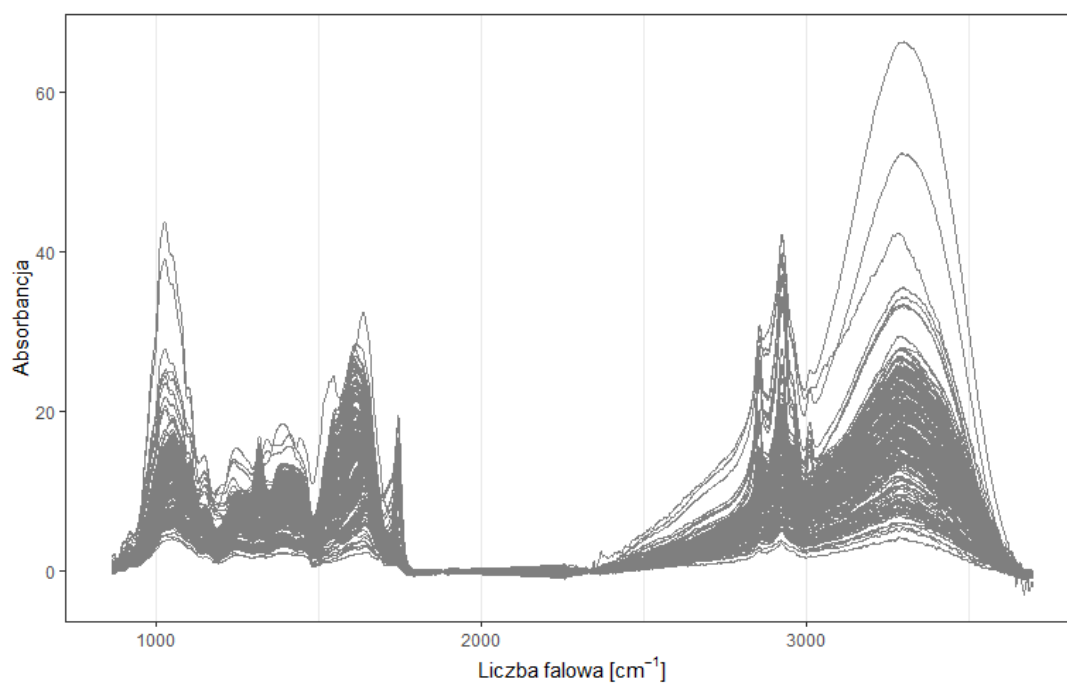
Rysunek 12 Surowe widmo liści bzu czarnego



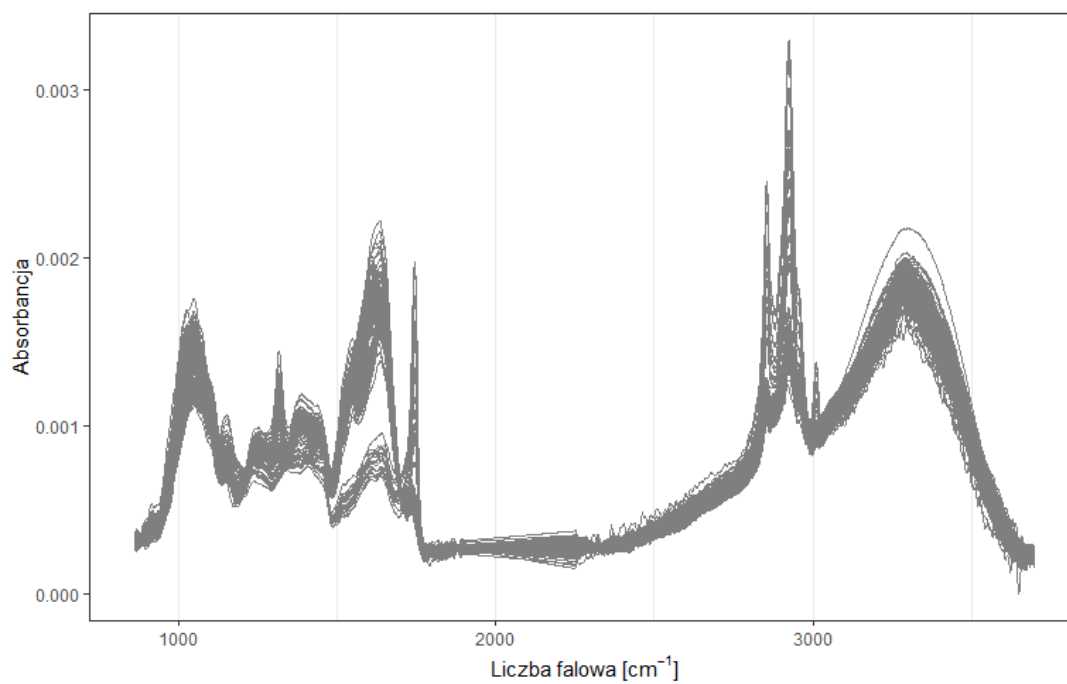
Rysunek 13 Widmo liści bzu czarnego po wstępnej obróbce



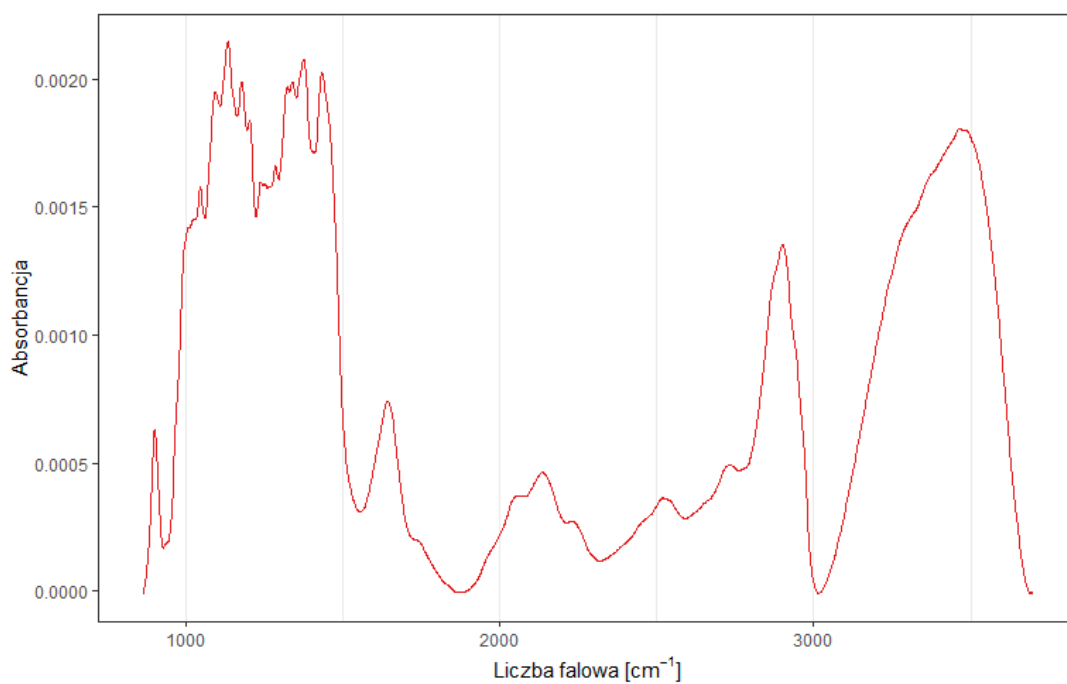
Rysunek 14 Wszystkie widma w analizie, przed eliminacją szumów i normalizacją



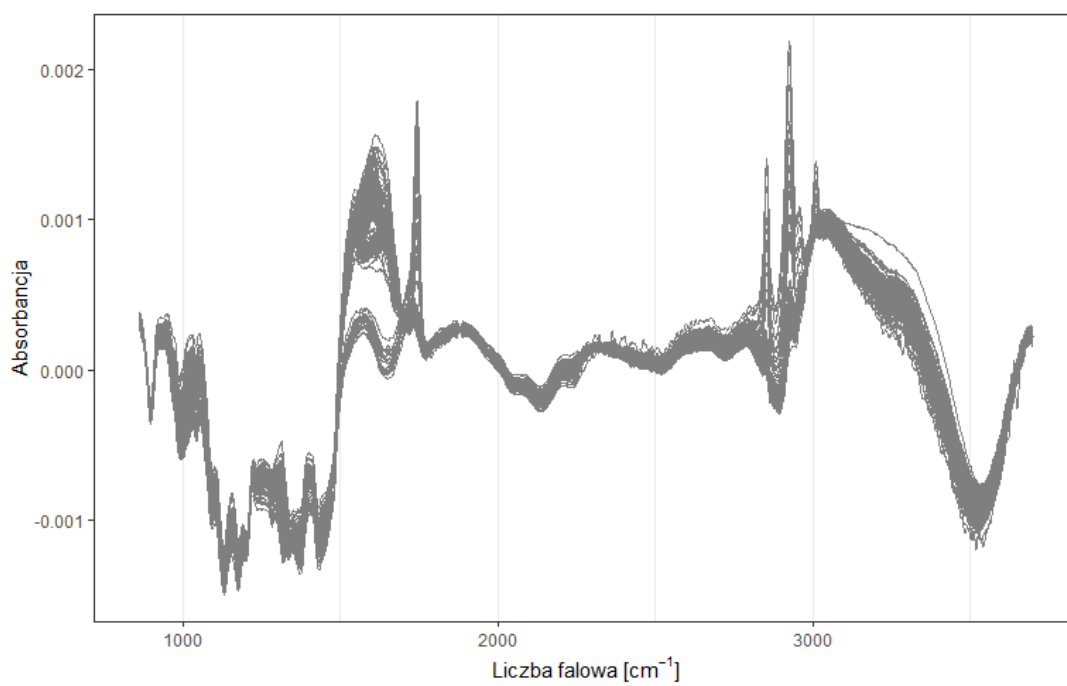
Rysunek 15 Widma po usunięciu regionów z dużą ilością szumu



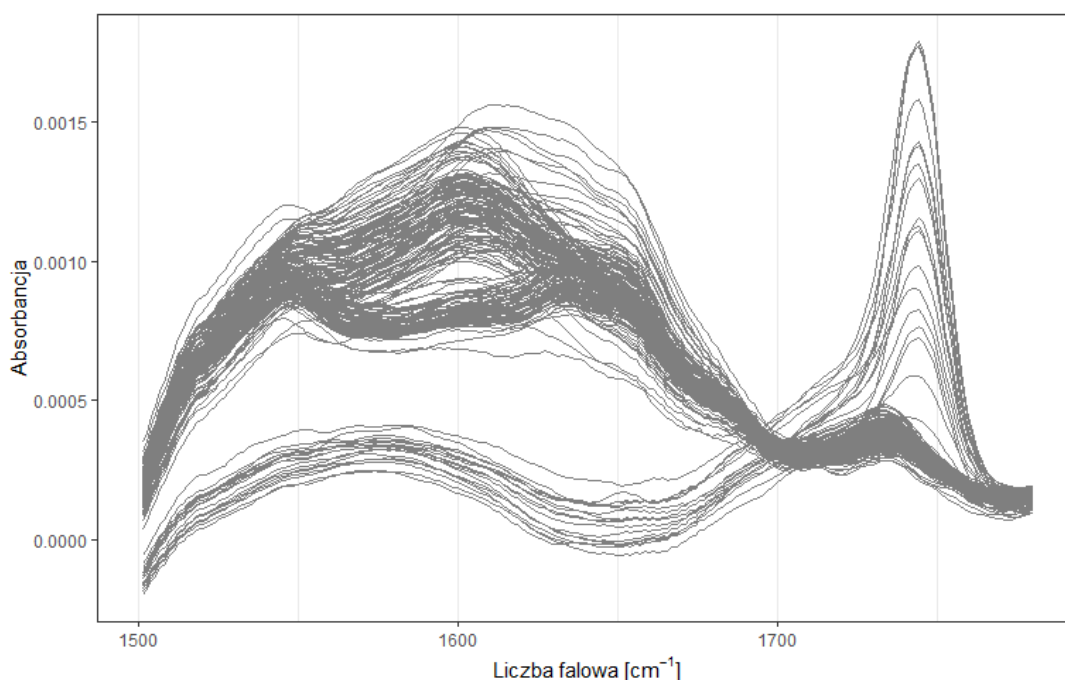
Rysunek 16 Widma po normalizacji metodą PQN



Rysunek 17 Spektrum celulozy po wstępnym oczyszczeniu w ten sam sposób co pozostałe spectra



Rysunek 18 Spektra po usunięciu widma celulozy



Rysunek 19 Zbliżenie na region o wysokiej zmienności

4.4.3. Analiza składu chemicznego przy zastosowaniu spektrofotometrii UV-Vis

Zawartość chlorofilu a i b

Zawartość chlorofilu **a** i **b** została określona z wykorzystaniem spektrofotometrii UV-Vis. Pomiar absorbancji dokonano przy długościach fali 652 nm oraz 665 nm na uprzednio przygotowanych ekstraktach metanolowych. Stężenie chlorofilu **a** i **b** w ekstraktach określono na podstawie wzorów zaproponowanych przez Amin i in. (2018):

$$\text{Chlorofil } \mathbf{a} = 16,29 \times A_{665} - 8,54 \times A_{652}$$

$$\text{Chlorofil } \mathbf{b} = 30,68 \times A_{652} - 13,58 \times A_{665}$$

Zawartość karotenoidów ogółem

Zawartość karotenoidów ogółem określona została za pomocą metody spektrofotometrycznej. Pomiar wykonany został na tych samych ekstraktach, które były wykorzystane do pomiaru zawartości chlorofilu **a** i **b**. Stężenie karotenoidów określono na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 470 nm z korektą na zawartość chlorofilu **a** i **b** (Sumanta i in., 2014)

Suma karotenoidów

$$= \frac{1000 \times A_{470} - 1.63 \times \text{Chlorofil } a - 104.96 \times \text{Chlorofil } b}{221}$$

Zawartość flawonoidów

Zawartość flawonoidów mierzona była dwiema metodami, różniącymi się selektywnością na różne grupy związków flawonoidowych (Pękal, 2014). Obie metody opierały się na analizie spektrofotometrycznej. Zawartość flawonoidów określona była w ekstraktach metanolowych.

Metoda 1:

W metodzie tej do 50 µl próbki dodawano 700 µl wody destylowanej oraz 500 µl 2% roztworu chlorku glinu. Całość była mieszana przez trzykrotne przepipetowanie i odstawione na 10 minut w ciemności. Pomiar absorbancji został mierzony przy długości 420nm a wynik określono jako ekwiwalent kwercetyny na podstawie krzywej kalibracyjnej. Metoda ta pozwala na wykrycie flawanoli (np. kwercetyna, rutyna, kempferol, moryna), flawonów (np. apigenina, luteolina, chryzyna) oraz flawanonów (np. naringenina, naringina, hesperetyna, hesperedyna) natomiast nie pozwala na stwierdzenie flawan-3-oli takich jak np. katechina i epikatechina.

Metoda 2:

W metodzie tej dodano kolejno: 50 µl próbki, 300 µl 5% roztworu azotynu sodu. Po 5 minutach dodano 500 µl 2% roztworu chlorku glinu. Ponownie odstawiono próbki na 6 minut po czym dodano 500 µl roztworu NaOH (1 mol/L). Pomiar absorbancji mierzono przy długości fali 510nm ponieważ dla tej długości fali metoda ta była selektywna dla rutyny w stosunku do kwercetyny, luteoliny w stosunku do apigeniny oraz pozwoliła na wykrycie flawan-3-oli takich jak katechina i epikatechina. Wyniki wyrażono jako ekwiwalent rutyny na podstawie krzywej kalibracyjnej.

Zawartość związków polifenolowych

Suma związków polifenolowych została określona w ekstraktach metanolowych na podstawie metody z odczynnikiem Folina-Ciocalteu. W kuwecie plastikowej

zmieszano kolejno: 1 ml 10% roztworu odczynnika Folina-Ciocalteu, 25 μ l ekstraktu oraz 1,4 ml 5% roztworu węglaanu sodu. Uzyskane ekstrakty pozostawiono w ciemności przez noc, po czym dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 725nm. Wynik przedstawiono jako ekwiwalent kwasu galusowego na podstawie krzywej kalibracyjnej (Vongsak i in., 2013).

Zawartość białka

Do oznaczenia zawartości białka wykonano ekstrakcję w środowisku zasadowym. Do fiolki typu eppendorf dodano kolejno 10 mg sproszkowanego surowca oraz 1 ml 0,1M roztworu NaOH. Następnie, każda fiolka została dokładnie wymieszana przy użyciu mieszadła typu vortex, pozostawiona na noc, ponownie wymieszana z wykorzystaniem mieszadła typu vortex i zwirowana przez 5 min w temperaturze pokojowej przy 20000 obrotach na minutę. Następnie pobrano 25 μ l tak uzyskanego ekstraktu i dodano w kuwecie plastikowej 2,5 ml odczynnika Bradforda. Pomiar dokonano przy długości fali 595nm po około 5-10 minutach od dodania odczynnika. Wynik przedstawiono w mg L^{-1} na podstawie krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem albuminy wołowej jako wzorca (Jones i in., 1989).

Zawartość rozpuszczalnych węglowodanów

Zawartość rozpuszczalnych węglowodanów określono z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej. Do kuwety spektrofotometrycznej o pojemności 4 ml wykonanej z polistyrenu dodano kolejno. 100 μ l ekstraktu metanolowego, 100 μ l 5% wodnego roztworu fenolu oraz 3 ml stężonego kwasu siarkowego. Po 10 minutach mierzono absorbancję przy długości fali 480nm a wynik przedstawiono w mg L^{-1} na podstawie krzywej kalibracyjnej w której wzorcem była glukoza (DuBois i in., 1956; Chow i Landhausser, 2004).

4.4.4. Analiza z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczonej

Analizę profilu związków polifenolowych przeprowadzono z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC) w ekstraktach metanolowych. Do rozdziału związków wykorzystano jako fazę stacjonarną kolumnę Kinetex 2,6 μm C18 100A 100 mm \times 4,6 mm firmy Phenomenex natomiast jako fazę ruchomą wykorzystano gradient wody zakwaszonej kwasem fosforowym i acetonitrylu z przepływem 1,1 ml/min w temperaturze 40°C. Parametry gradientu przedstawiono w tabeli 1. Dla wszystkich rozdzielonych pików wykrytych przez detektor diodowy SPD-M10A VP DAD określono pole powierzchni oraz wysokość.

Tabela 1 Parametry gradientu fazy ruchomej w analizie HPLC

Czas (min)	%	
	Woda	Acetonitryl
0,01	92	8
0,05	92	8
2	60	40
3	80	20
4	80	20
5,51	50	50
6,5	50	50
7,5	5	95
7,51	92	8
15	92	8

Określenie zawartości glukozy, fruktozy i sacharozy została przeprowadzona przy użyciu kolumny Luna® NH2 (250 \times 4,6 mm, 5 μm) w izokratycznym przepływie z mieszaniną acetonitrylu i wody (4:1) przy przepływie 3,0 mL min⁻¹. Całkowity czas analizy wynosił 5,5 minuty. Do wykrywania cukrów użyto detektora światła rozproszonego (ELSD) z temperaturą parowania 80°C i wzmocnieniem 3. Uzyskane piki zostały porównane do wzorców pod względem czasu retencji, a stężenie cukrów w ekstraktach wyznaczono na podstawie krzywej kalibracyjnej na podstawie powierzchni pików.

4.5. Analiza wyników

4.5.1. Analiza statystyczna wyników

Liniowe modele mieszane

Analiza statystyczna wyników została przeprowadzona w środowisku R (wersja 4.3.2.). Do analizy wykorzystano liniowe modele mieszane (LME) za pomocą pakietu ‘nlme’, co pozwoliło na uwzględnienie zarówno efektów stałych (traktowanie i rok), jak i losowych (powtórzenia) w celu dokładnego modelowania zmienności danych. Parametry modelu były wyznaczane za pomocą metody REML (*Restricted Maximum Likelihood*). Zastosowanie liniowych modeli mieszanych zamiast standardowej w tego typu badaniach analizy wariancji podyktowane było kilkoma czynnikami. Po pierwsze, z uwagi na powtarzanie pomiarów w czasie na tych samych obiektach (te same rośliny bzu czarnego) spodziewano się występowania wewnętrznej korelacji, na którą liniowe modele mieszane są odporne. Ponadto, metoda ta jest bardziej odporna na braki danych. Choć braki danych nie były wielkim problemem w przeprowadzonych badaniach, jednorazowo zdarzyło się, że nie było możliwości zebrania kwiatów z uwagi na uszkodzenie drzewa przez warunki atmosferyczne.

Istotność statystyczną efektów oceniano przy użyciu standardowego poziomu istotności $\alpha = 0.05$. W celu dokonania wielokrotnych porównań średnich, zastosowano test Rozsądnej Istotnej Różnicy Tukeya, wykorzystując pakiet ‘multcomp’ w połączeniu z pakietem ‘emmeans’.

Modelowanie statystyczne

Każda roślina miodunki została zebrana oddzielnie i określono jej świeżą i powietrznie suchą masę. Następnie, policzono odległość tych roślin do najbliższego drzewa (odległość minimalna) oraz średnią odległość do wszystkich drzew bzu czarnego w obrębie polatka (odległość średnia). Na podstawie obserwacji wykresu rozrzutu zdecydowano o przetestowaniu modelu funkcji sigmoidalnej pod kątem istotności statystycznej oraz współczynnika determinacji (R^2). Modelowanie statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania STATISTICA (wersja 13.1; Dell Inc., Tulsa, OK, USA) wykorzystując pakiet regresji nieliniowej.

4.5.2. Analiza chemometryczna wyników

Dane wielowymiarowe, a więc zarówno pochodzące z analizy spektrum w podczerwieni, jak i z klasycznej analizy chemicznej oraz analizy chromatograficznej, zostały przeanalizowane za pomocą analizy składowych głównych w środowisku R. Technika ta, służy do redukcji wymiarowości danych poprzez przekształcenie wielu zmiennych w mniejszą liczbę nieskorelowanych składowych głównych. Podstawą zastosowania tej techniki jest fakt, że każda zmienna niesie ze sobą informację wspólną i swoistą, i dzięki wyodrębnieniu części wspólnej na podstawie korelacji, możliwe jest znaczne zmniejszenie wymiarowości danych. Dzięki temu, możliwe jest przedstawienie danych w przestrzeni dwóch lub trzech składowych głównych bez znacznych strat w wyjaśnianej wariancji.

Na podstawie uzyskanych wyników analizy składowych głównych, dane zostały przedstawione w postaci biplotów, które obrazują zarówno poszczególne próbki (przedstawione w postaci punktów) jak również oryginalne zmienne użyte w analizie, co pozwala na interpretację wzajemnych zależności pomiędzy tymi zmiennymi.

5. Wyniki

5.1. Część I doświadczeń – Uprawa współrzędna bzu czarnego

5.1.1. Kwiat bzu czarnego

5.1.1.1. Plon

Plon kwiatów bzu czarnego podlegał zmianom w zależności od zastosowanych kombinacji doświadczenia. Stwierdzono istotny wpływ gatunku towarzyszącego, roku doświadczenia jak również interakcję obu tych czynników, zarówno na masę kwiatów świeżych jak i suchych (tabela 2-3). Najwyższy plon uzyskano, gdy pod koroną bzu czarnego uprawiany był kopytnik pospolity, choć plon ten różnił się istotnie jedynie w stosunku do roślin bzu uprawianych wraz z miodunką miękkowłosa. Plon kwiatów (zarówno świeżych jak i suchych) bzu czarnego uprawianego wraz z miodunką miękkowłosa, nie różnił się istotnie od kombinacji, w której gatunkiem towarzyszącym był kopytnik pospolity.

Tabela 2 Plon świeżych kwiatów bzu czarnego [$\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$] w zależności od gatunku uprawianego pod koroną w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	128,5 a	487,5 cd	308 ab
Kopytnik pospolity	175,0 ab	522,5 d	348,8 b
Miodunka miękkowłosa	81,8 a	330,0 bc	205,9 a
Czosnek niedźwiedzi	133,5 a	482,5 cd	308 ab
Średnia	129,7 a	455,6 b	

Tabela 3 Plon powietrznie suchych kwiatów bzu czarnego po otarciu [$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$] w zależności od gatunku uprawianego pod koroną w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	13,2 a	50,2 cd	31,7 ab
Kopytnik pospolity	18,5 ab	55,5 d	37,0 b
Miodunka miękkowłosa	8,5 a	34,1 bc	21,3 a
Czosnek niedźwiedzi	14,3 a	51,7 cd	33,0 ab
Średnia	13,6 a	47,9 b	

5.1.1.2. Zmienność chemiczna kwiatów bzu czarnego

Głównymi związkami chemicznymi odpowiedzialnymi za lecznicze właściwości kwiatów bzu czarnego są związki polifenolowe. W związku z tym, w pierwszej kolejności postanowiono przyjrzeć się ich profilowi w tym surowcu i na tej podstawie określić zasadność wykonania bardziej dokładnych, ale zarazem bardzo kosztownych analiz. Do tego celu wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z detektorem PDA bez zastosowania substancji wzorcowych. Dzięki temu możliwy był rozdział związków polifenolowych oraz określenie ich względnych zawartości bez wcześniejszej znajomości wszystkich związków polifenolowych znajdujących się w surowcu. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono obecność 20 związków polifenolowych, występujących w ilościach możliwych do wykrycia zastosowanym sprzętem. Pomimo zaobserwowanej zmienności pomiędzy surowcem pochodzącym z różnych drzew, przeprowadzona analiza nie pozwala na stwierdzenie istotnych różnic w profilu związków polifenolowych pochodzących z różnych kombinacji doświadczenia. Tym samym, brak podstaw do stwierdzenia wpływu gatunku uprawianego pod koroną drzew bzu czarnego na jakość surowca – suchych kwiatów bzu czarnego (rysunek 23).

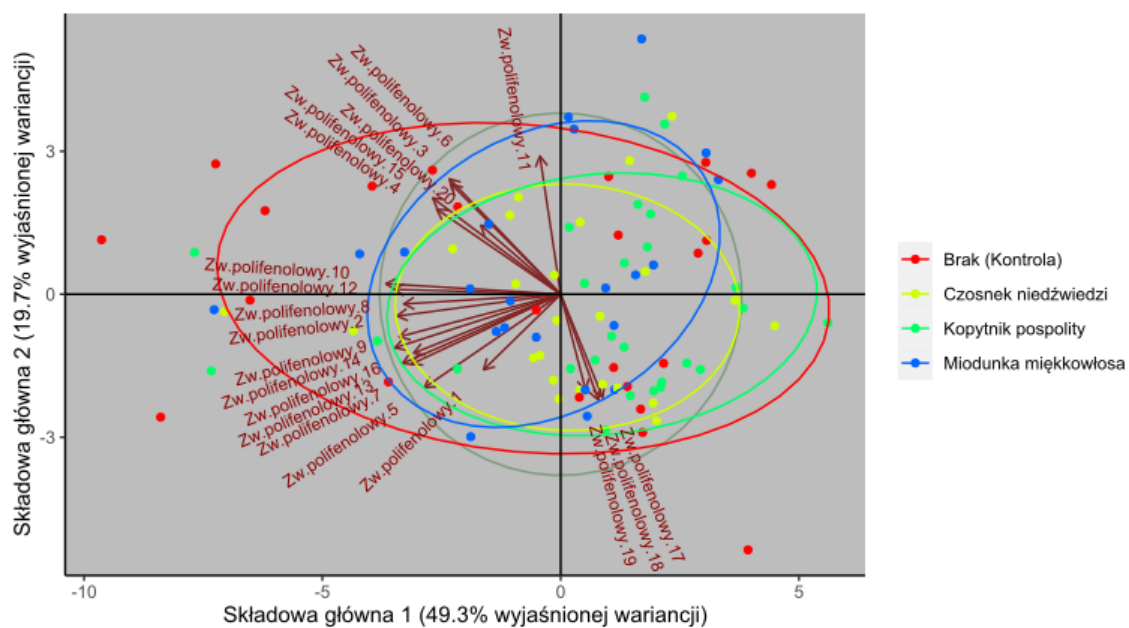
Przeprowadzone badanie pozwoliło jednak na stwierdzenie różnicy w profilu związków polifenolowych pomiędzy latami doświadczenia. Na rysunku 24 widoczne są dwie, niemal rozdzielone elipsy obrazujące próbki pochodzące z roku 2017 i 2018. Na rysunku tym, widać również, że elipsa obrazująca próbki zebrane w roku 2018 położona jest w przeciwnym kierunku niż wskazują wektory większości związków polifenolowych. Świadczy to o negatywnej korelacji, a zatem o znacznie niższej

zawartości większości badanych związków polifenolowych w 2018 roku w stosunku do roku 2017. Jedyne wyjątkiem zdaje się tu stanowić zw. polifenolowy 11, którego wektor zdaje się nie wskazywać na obecność korelacji zarówno z próbkami z 2017 jak i 2018 roku, co w konsekwencji oznacza brak istotnej zmienności w zawartości tego związku pomiędzy latami doświadczenia.

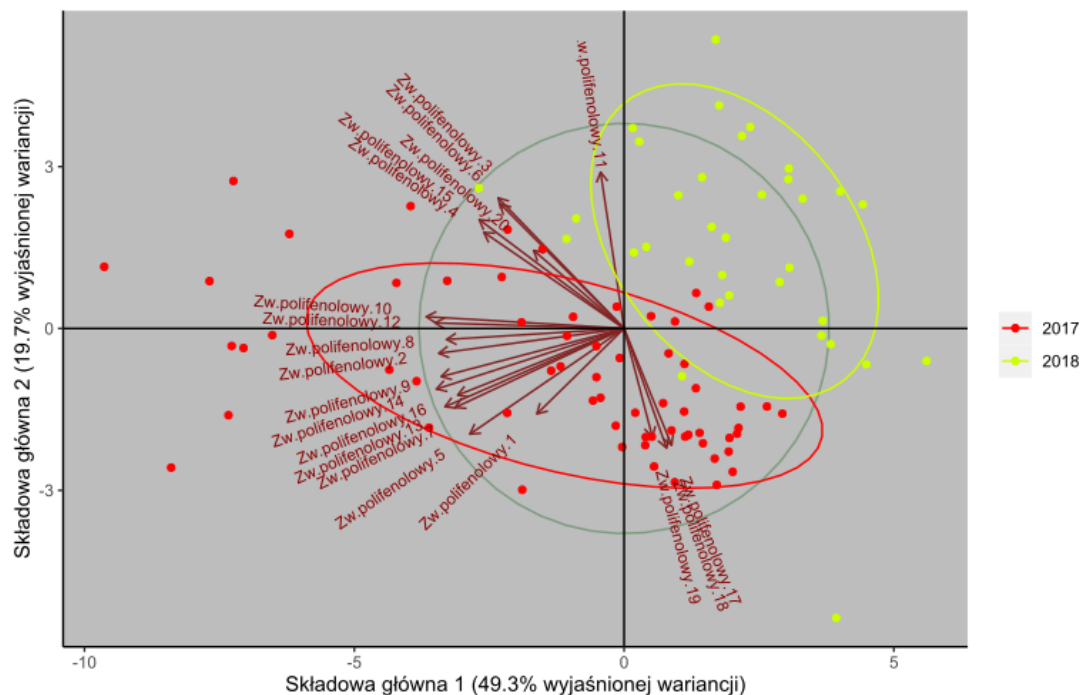
Dodatkowo, przeprowadzona analiza pozwoliła na określenie czterech grup, wewnątrz których związki polifenolowe są ze sobą silnie skorelowane. Te grupy to:

1. Związek polifenolowy 11
2. Związki polifenolowe 3, 4, 6, 15 i 20
3. Związki polifenolowe 1, 2, 5, 7-10, 12-14, 16
4. Związki polifenolowe 17-19

Istotna jest tu również obserwacja, że grupa 3, stanowiąca najliczniejszą grupę związków, nie wykazywała korelacji z żadną z pozostałych grup. Dodatkowo, grupa 1 i 2 były ze sobą słabo pozytywnie skorelowane, natomiast obie te grupy były negatywnie skorelowane z grupą 4 (rysunki 23-24).



Rysunek 20 Wykres rozrzutu na podstawie analizy składowych głównych wyników uzyskanych w chromatografii cieczowej kwiatów bzu czarnego. Kolory oznaczają kombinację doświadczenia



Rysunek 21 Wykres rozrzutu na podstawie analizy składowych głównych wyników uzyskanych w chromatografii cieczowej kwiatów bzu czarnego. Kolory oznaczają termin zbioru kwiatów bzu czarnego

5.1.2. Owoc bzu czarnego

5.1.2.1. Plon

Plon owoców bzu czarnego prowadzonego w formie drzewa w tym doświadczeniu podlegał istotnemu wpływowi gatunków uprawianych pod jego koroną. Z uwagi na względnie młody wiek drzew (4 lata, dwa lata po posadzeniu dwuletnich sadzonek) rok zbioru miał istotny wpływ na niemal wszystkie oceniane parametry, z wyjątkiem procentowego udziału suchej masy oraz masy 1000 świeżych owoców.

Rok prowadzenia badań miał istotny wpływ na plon świeżych i suchych owoców bzu czarnego co najprawdopodobniej było spowodowane bardzo młodym wiekiem roślin. Plon, zarówno owoców świeżych jak i suchych, był ponad trzykrotnie wyższy w roku

2018 w porównaniu do roku 2017. Nie zaobserwowano również istotnego wpływu gatunku towarzyszącego w uprawie bzu, choć wykazano istotną interakcję pomiędzy gatunkiem towarzyszącym, a rokiem doświadczenia. Plon owoców z drzew bzu czarnego pod którymi uprawiana była miodunka miękkowłosa był w obu latach niższy od kombinacji kontrolnej oraz w uprawie z kopytnikiem pospolitym, a w roku 2018 również od kombinacji, w którym gatunkiem towarzyszącym był czosnek niedźwiedzi. Choć brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy kombinacjami doświadczenia w żadnym z dwóch lat, plon z drzew bzu czarnego pod którymi uprawiana była miodunka miękkowłosa nie różnił się istotnie statystycznie również od kombinacji kontrolnej w 2017 roku (tabele 4, 6).

Tabela 4 Plon świeżych owoców bzu czarnego [$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$] w zależności od gatunku uprawianego pod koroną w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	421 ab	1293 c	857
Kopytnik pospolity	424 ab	1288 c	856
Miodunka miękkowłosa	275 a	970 bc	622
Czosnek niedźwiedzi	269 a	1240 c	755
Średnia	347 a	1198 b	

Nie zaobserwowano statystycznie istotnego wpływu gatunku uprawianego z bzem czarnym na masę 1000 świeżych czy suchych owoców bzu zarówno dla roku 2017 jak i 2018, choć masa 1000 świeżych owoców była zawsze wyższa liczbowo w 2018 roku w porównaniu do analogicznego wyniku w 2017 roku (tabela 5). Najprawdopodobniej, efekt ten w przypadku procentowego udziału suchej masy jak i masy 1000 świeżych owoców, nie był wystarczająco silny by równoważyć naturalne zróżnicowanie pomiędzy powtórzeniami doświadczenia i potrzeba by było więcej powtórzeń by potwierdzić jego istotność. Wpływ ten został natomiast zaobserwowany dla masy 1000 suchych owoców, gdzie wyniki uzyskane w 2018 roku były istotnie wyższe niż w 2017 roku (tabela 7).

Tabela 5 Masa 1000 świeżych owoców bzu czarnego [g] w zależności od gatunku uprawianego pod koroną w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	215	233	224
Kopytnik pospolity	222	224	223
Miodunka miękkowłosa	189	225	207
Czosnek niedźwiedzi	194	227	210
Średnia	205	227	

Tabela 6 Plon owoców bzu czarnego po wysuszeniu [$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$] w zależności od gatunku uprawianego pod koroną w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	73,6 ab	224,5 c	149,1
Kopytnik pospolity	75,7 ab	212,8 c	144,3
Miodunka miękkowłosa	48,9 a	165,4 bc	107,1
Czosnek niedźwiedzi	46,9 a	214,9 c	130,9
Średnia	61,3 a	204,4 b	

Tabela 7 Masa 1000 suchych owoców bzu czarnego [g] w zależności od gatunku uprawianego pod koroną w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	37,7	48,3	43,0
Kopytnik pospolity	39,9	45,8	42,9
Miodunka miękkowłosa	33,5	46,5	40,0
Czosnek niedźwiedzi	33,9	46,5	40,2
Średnia	36,3 a	46,8 b	

Pomimo braku statystycznie istotnych różnic w procentowym udziale suchej masy, wszystkie określone parametry były wyższe w roku 2018 w porównaniu do odpowiednich wartości wyników w roku 2017. Dodatkowo, porównując średnią zawartość suchej masy w owocach pomiędzy latami 2017 i 2018, była ona podobna

w przypadku kopytnika pospolitego, czosnku niedźwiedziego i kontroli (18,1-18,4%) natomiast była wyższa (choć nie była to różnica istotna statystycznie) dla miodunki miękkowłosej (20,4%) (tabela 8).

Tabela 8 Sucha masa (%) owoców bzu czarnego w zależności od gatunku uprawianego pod koroną w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	17,5	19,2	18,4
Kopytnik pospolity	18,0	18,4	18,2
Miodunka miękkowłosa	17,7	23,1	20,4
Czosnek niedźwiedzi	17,5	18,6	18,1
Średnia	17,7	19,8	

5.1.2.2. Zmienność chemiczna owoców bzu czarnego

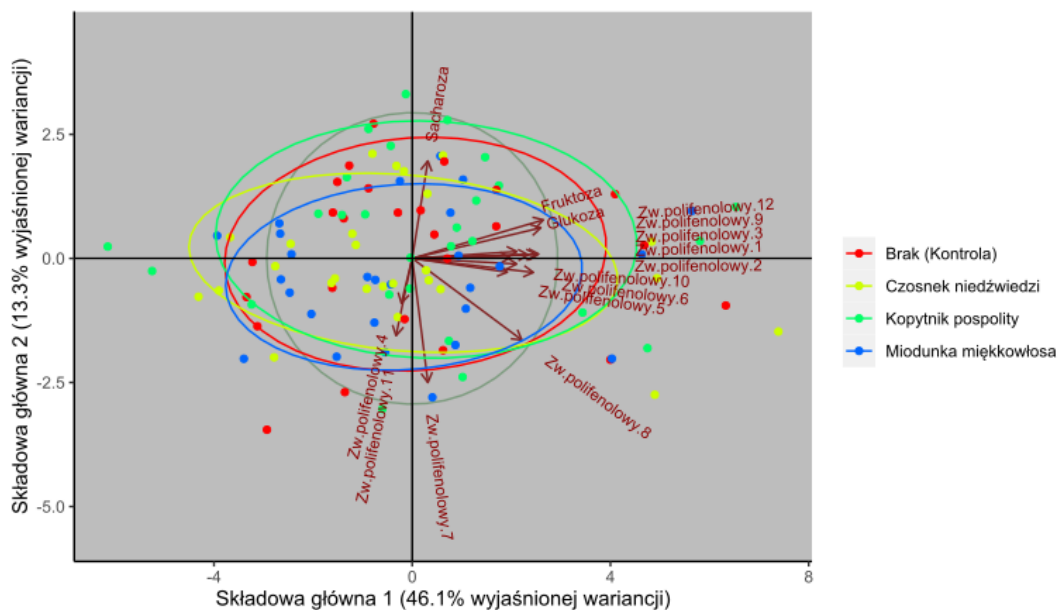
Podobnie jak w przypadku analizy zmienności chemicznej kwiatów bzu czarnego, również w przypadku analizy zmienności owoców bzu czarnego posłużono się analizą składowych głównych na podstawie danych uzyskanych przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej. W tym przypadku, poza określeniem związków polifenolowych określono również zawartość glukozy, fruktozy oraz sacharozy. Na podstawie przeprowadzonej analizy nie stwierdzono znacznych różnic z składzie chemicznym owoców bzu czarnego uzyskanych z różnych kombinacji doświadczenia (rysunek 25), natomiast zaobserwowano różnice na podstawie roku doświadczenia (rysunek 26). Brak tutaj jednak jednoznacznych trendów w profilu związków polifenolowych, natomiast owoce zebrane w 2017 roku charakteryzowały się wyższą zawartością sacharozy w stosunku do owoców zebranych w roku 2018.

Biorąc pod uwagę ogół określanych związków można je podzielić na sześć grup pod względem wzajemnej korelacji, są to:

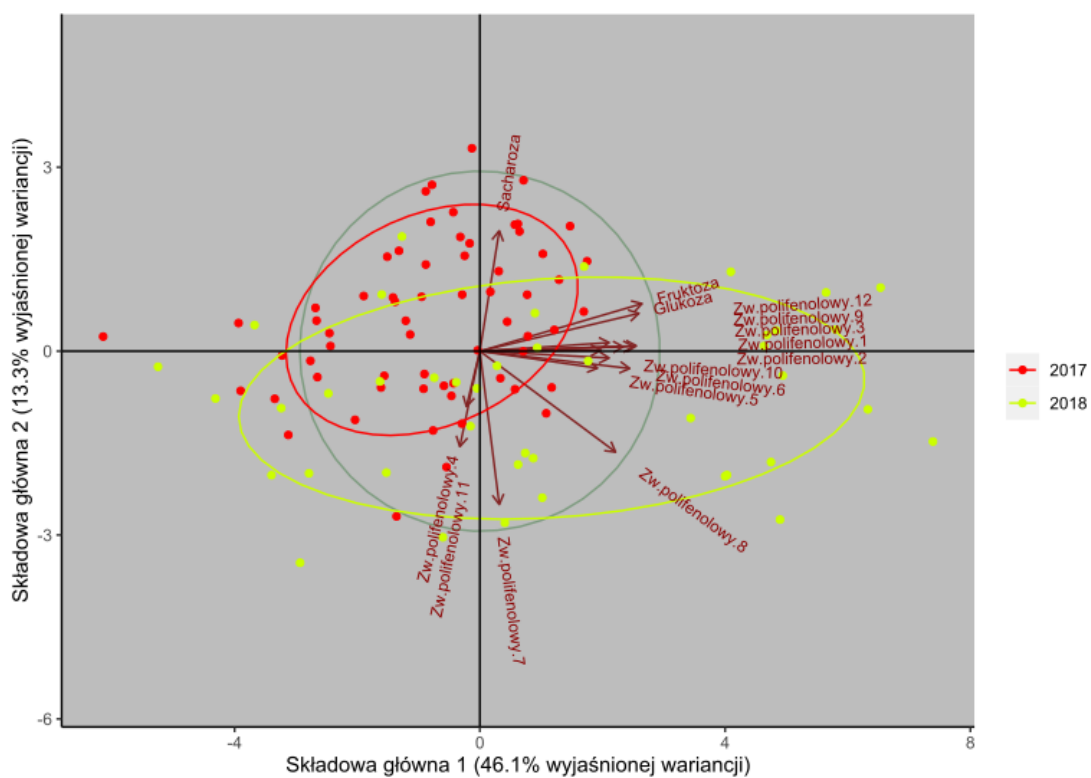
1. Sacharoza
2. Fruktoza i glukoza
3. Związki polifenolowe 1-3, 5-6, 9-10, 12
4. Związek polifenolowy 8
5. Związek polifenolowy 7

6. Związki polifenolowe 4 i 11

Na podstawie wykresu rozrzutu (ryunki 25-26) można zaobserwować niemal pełną negatywną korelację pomiędzy sacharozą, a związkami polifenolowymi 4 i 11 oraz silną negatywną korelację pomiędzy sacharozą, a związkiem polifenolowym 7. Zawartość związków polifenolowych z grupy 3, była nieskorelowana z zawartością sacharozy, natomiast była silnie pozytywnie skorelowana z zawartością fruktozy i glukozy.



Rysunek 22 Wykres rozrzutu na podstawie analizy składowych głównych z wyników uzyskanych w chromatografii cieczerwowej owoców bzu czarnego. Kolory oznaczają kombinację doświadczenia



Rysunek 23 Wykres rozrzutu na podstawie analizy składowych głównych z wyników uzyskanych w chromatografii cieczowej owoców bzu czarnego. Kolory oznaczają termin zbioru owoców bzu czarnego

5.2. Część II doświadczeń – Zmienność chemiczna liści czosnku niedźwiedziego oraz ziela miodunki miękkowłosej w zależności od warunków oświetlenia

5.2.1. Czosnek niedźwiedzi

5.2.1.1. Plon liści

Plon (zarówno świeży jak i suchy) liści czosnku niedźwiedziego, podobnie jak w przypadku masy pojedynczej rośliny, był najwyższy w uprawie pod siatką cieniującą w porównaniu z uprawą współrzędną czy w pełnym nasłonecznieniu. Generalnie, plon był również wyższy w 2018 roku niż w roku 2019. Pomimo niesprzyjających warunków wiosną 2019 roku, plon liści czosnku niedźwiedziego pod siatką cieniującą nie różnił się istotnie od roślin czosnku niedźwiedziego uprawianego współrzędnie lub w pełnym nasłonecznieniu w 2018 r. (tabele 9-10).

Tabela 9 Plon świeżych liści czosnku niedźwiedziego [$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$] w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	13,5 b	3,2 a	9,1 a
Pełne nasłonecznienie	14,7 b	4,4 a	9,5 a
Uprawa pod siatką cieniującą	39,4 c	18,4 b	28,9 b
Średnia	21,6 b	8,7 a	

Tabela 10 Plon suchych liści czosnku niedźwiedziego [$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$] w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	1,63 b	0,40 a	1,10 a
Pełne nasłonecznienie	1,21 ab	0,63 a	0,92 a
Uprawa pod siatką cieniującą	2,89 c	2,19 bc	2,54 b
Średnia	1,88 b	1,07 a	

Niewystarczające opady atmosferyczne (rysunek 11-12) wiosną 2019 r. wpłynęły na znaczny spadek masy pojedynczej rośliny czosnku niedźwiedziego. Rośliny uprawiane pod siatką cieniującą charakteryzowały się najwyższą masą (zarówno świeżą jak i po wysuszeniu) w porównaniu z roślinami uprawianymi współrzędnie oraz w pełnym nasłonecznieniu. W przeciwieństwie do surowców pozyskanych z bzu czarnego, świeża masa roślin czosnku niedźwiedziego była niemal o połowę niższa w roku 2019 w porównaniu do roku 2018. Najwyższą świeżą masą charakteryzowały się rośliny czosnku uprawiane pod siatką cieniującą w 2018 roku, natomiast najniższą świeżą masę posiadały rośliny uprawiane współrzędnie z bzem czarnym w 2019 r. (tabela 11).

Podobne trendy można zaobserwować odnośnie suchej masy pojedynczej rośliny czosnku niedźwiedziego, z tą różnicą, że sucha masa roślin czosnku niedźwiedziego uprawianego współrzędnie w 2018 r. nie różniła się istotnie ani od roślin uprawianych w pełnym nasłonecznieniu, ani od roślin uprawianych pod siatką cieniującą (tabela 12).

Tabela 11 Świeża masa pojedynczej rośliny czosnku niedźwiedziego [g] w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	1,72 b	0,68 a	1,27 a
Pełne nasłonecznienie	1,79 b	1,12 ab	1,46 a
Uprawa pod siatką cieniującą	3,94 c	1,95 b	2,94 b
Średnia	2,41 b	1,25 a	

Tabela 12 Sucha masa pojedynczej rośliny czosnku niedźwiedziego [g] w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	0,21 bc	0,09 a	0,16 a
Pełne nasłonecznienie	0,14 ab	0,16 ab	0,15 a
Uprawa pod siatką cieniującą	0,29 c	0,23 bc	0,26 b
Średnia	0,21 b	0,16 a	

Warunki uprawy, rok doświadczenia oraz interakcja tych dwóch czynników miała istotny wpływ na wszystkie badane parametry czosnku niedźwiedziego. Najwyższą suchą masę posiadały liście czosnku niedźwiedziego uprawiane pod koroną bzu czarnego (uprawa współrzędna). Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy czosnkiem niedźwiedzim uprawianym współrzędnie, a uprawianym w pełnym nasłonecznieniu, natomiast czosnek uprawiany współrzędnie miał istotnie wyższą suchą masę w porównaniu do czosnku uprawianego pod siatką cieniującą. Rośliny zebrane wiosną 2019 roku miały istotnie wyższą suchą masę od roślin zebranych wiosną 2018 r. Analizując interakcję czynników, wszystkie kombinacje doświadczenia w 2019 roku nie różniły się istotnie od uprawy współrzędnej w 2018 r., natomiast różniły się istotnie zarówno od roślin uprawianych pod siatką cieniującą, jak również od roślin uprawianych w pełnym nasłonecznieniu w 2018 r. Rośliny z uprawy współrzędnej charakteryzowały się najbardziej wyrównaną suchą masą liści w obu latach doświadczenia (tabela 13).

Tabela 13 Sucha masa (%) liści czosnku niedźwiedziego w zależności od warunków uprawy w latach 2018 i 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	12,1 b	12,5 b	12,3 b
Pełne nasłonecznienie	7,6 a	14,1 b	10,9 ab
Uprawa pod siatką cieniującą	7,3 a	12,0 b	9,7 a
Średnia	9,3 a	12,8 b	

5.2.1.2. Zmienność chemiczna

5.2.1.2.1. Zawartość chlorofilu *a* i *b*

Warunki uprawy miały istotny wpływ na zawartość chlorofilu *a* i *b* w liściach czosnku niedźwiedziego. Ogólnie, zawartość chlorofilu *a* była pozytywnie skorelowana z natężeniem światła słonecznego, natomiast zawartość chlorofilu *b* była z tą samą cechą skorelowana negatywnie. Efekt ten był bardziej widoczny dla chlorofilu *b*, gdzie najniższe wartości uzyskano dla roślin uprawianych w pełnym nasłonecznieniu, nieco wyższe dla roślin uprawianych współrzędnie z bzem czarnym, natomiast najwyższe – dla

roślin uprawianych pod siatką cieniującą. W przypadku chlorofilu **a**, nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy roślinami uprawianymi współrzędnie z bzem czarnym, a roślinami uprawianymi w pełnym nasłonecznieniu, choć oba te wyniki były istotnie wyższe w porównaniu do zawartości chlorofilu **a** w roślinach uprawianych pod siatką cieniującą. Nie stwierdzono istotnej różnicy w zawartości chlorofilu **a** pomiędzy latami doświadczenia. Zaobserwowano natomiast, że rośliny uprawiane pod siatką cieniującą w 2018 roku charakteryzowały się istotnie niższą zawartością chlorofilu **a** od wszystkich pozostałych kombinacji w obu latach doświadczenia. Zawartość chlorofilu **b** była istotnie wyższa w liściach czosnku niedźwiedziego w roku 2018 w porównaniu z rokiem 2019. Ponadto, zawartość ta była w obu latach wyższa w roślinach uprawianych pod siatką cieniującą w porównaniu do pozostałych kombinacji doświadczenia. Czosnek niedźwiedzi, uprawiany współrzędnie z bzem czarnym, charakteryzował się również wyższą zawartością chlorofilu **b** w stosunku do roślin uprawianych w pełnym nasłonecznieniu, choć jedynie w 2018 roku była to różnica istotna statystycznie (tabele 14-15).

Tabela 14 Zawartość chlorofilu **a** [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach czosnku niedźwiedziego w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	3.13 b	3.12 b	3.12 b
Pełne nasłonecznienie	3.19 b	3.1 b	3.14 b
Uprawa pod siatką cieniującą	2.83 a	3.1 b	2.97 a
Średnia	3.05 a	3.11 a	

Tabela 15 Zawartość chlorofilu **b** [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach czosnku niedźwiedziego w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	1,96 b	1,52 a	1,74 b
Pełne nasłonecznienie	1,47 a	1,19 a	1,33 a
Uprawa pod siatką cieniującą	3,90 c	2,31 b	3,11 c
Średnia	2,45 b	1,67 a	

5.2.1.2.2. Ogólna zawartość karotenoidów

Zawartość karotenoidów w liściach podlegała podobnym zmianom co zawartość chlorofilu **b**. Najwyższą zawartość związków karotenoidowych stwierdzono w roślinach uprawianych pod siatką cieniującą i był to wynik istotnie wyższy w stosunku do roślin uprawianych współrzędnie lub w pełnym nasłonecznieniu. W 2018 roku określono również istotnie wyższą zawartość karotenoidów w porównaniu z rokiem 2019 i choć trend ten widoczny był we wszystkich kombinacjach doświadczenia, jedynie w przypadku roślin uprawianych pod siatką cieniującą była to różnica istotna statystycznie (tabela 16).

Tabela 16 Zawartość karotenoidów ogółem [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach czosnku niedźwiedziego w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	1,01 ab	0,98 a	0,99 a
Pełne nasłonecznienie	0,98 a	0,96 a	0,97 a
Uprawa pod siatką cieniującą	1,22 c	1,09 b	1,15 b
Średnia	1,07 b	1,01 a	

5.2.1.2.3. Zawartość flawonoidów

W zależności od zastosowanego sposobu uprawy, zaobserwowano znaczną zmienność w zawartości flawonoidów, choć efekt ten wydaje się być bardziej podyktowany zmiennością osobniczą lub warunkami mikroklimatu niż badanymi kombinacjami doświadczenia. Istotnie wyższą zawartość flawonoidów (stwierdzonych przy wykorzystaniu metody 1.) zaobserwowano w roku 2018 w porównaniu z rokiem 2019. Brak jednoznacznego trendu w zawartości flawonoidów wrażliwych na tę metodę można wytłumaczyć obecnością istotnej interakcji pomiędzy warunkami uprawy, a rokiem doświadczenia. Rośliny czosnku niedźwiedziego uprawiane współrzędnie z bzem czarnym w roku 2018 charakteryzowały się najniższą zawartością flawonoidów w porównaniu z tymi z pozostałych kombinacji doświadczenia. Rośliny z tej samej kombinacji doświadczenia w roku 2019 charakteryzowały się najwyższą zawartością

flawonoidów, choć istotną różnicę stwierdzono jedynie w porównaniu z roślinami uprawianymi pod siatką cieniującą (tabela 17).

Wysoka zmienność pomiędzy roślinami czosnku niedźwiedziego nie pozwoliła na stwierdzenie istotnego wpływu zarówno warunków uprawy jak i roku doświadczenia na zawartość flawonoidów określanych metodą 2. Mimo to można stwierdzić, że czosnek niedźwiedzi uprawiany współrzędnie z bzem czarnym charakteryzował się liczbowo niższą zawartością flawonoidów w obu latach doświadczenia. Podobnie, w roku 2019 ilość flawonoidów mierzona metodą 2. była wyższa niż w roku 2018. Przeprowadzona analiza statystyczna, nie pozwoliła jednak na potwierdzenie występowania tych trendów (tabela 18).

Tabela 17 Zawartość związków flawonoidowych ogółem [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach czosnku niedźwiedziego w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019 określona metodą 1

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	22,43 a	25,31 b	23,87 a
Pełne nasłonecznienie	26,32 b	24,01 ab	25,16 a
Uprawa pod siatką cieniującą	26,49 b	22,77 a	24,63 a
Średnia	25,08 b	24,03 a	

Tabela 18 Zawartość związków flawonoidowych ogółem [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach czosnku niedźwiedziego w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019 określona metodą 2

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	50,94 a	61,26 a	56,10 a
Pełne nasłonecznienie	52,24 a	135,32 a	93,78 a
Uprawa pod siatką cieniującą	96,27 a	104,53 a	100,4 a
Średnia	66,48 a	100,37 a	

5.2.1.2.4. Zawartość związków polifenolowych ogółem

Analizując zawartość związków polifenolowych w liściach czosnku niedźwiedziego stwierdzono statystycznie istotny wpływ warunków prowadzenia uprawy, natomiast nie stwierdzono istotności wpływu roku doświadczenia. Pomimo tego, określono istotną interakcję obu tych czynników. Czosnek niedźwiedzi uprawiany współrzędnie z bzem czarnym lub też w pełnym nasłonecznieniu charakteryzował się wyższą zawartością związków polifenolowych w porównaniu do roślin uprawianych pod siatką cieniującą. Analizując interakcję warunków uprawy oraz roku doświadczenia można zaobserwować, że jedynie w roku 2018 zawartość związków polifenolowych była istotnie wyższa w roślinach uprawianych współrzędnie i w pełnym nasłonecznieniu w stosunku do roślin uprawianych pod siatką zacieniającą. W 2019 roku podobną różnicę stwierdzono jedynie pomiędzy roślinami uprawianymi współrzędnie, a roślinami uprawianymi pod siatką cieniującą, natomiast rośliny uprawiane w pełnym nasłonecznieniu nie różniły się istotnie od obu tych kombinacji (tabela 19).

Tabela 19 Zawartość związków polifenolowych ogółem [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach czosnku niedźwiedziego w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	54,51 bc	59,01 c	56,76 b
Pełne nasłonecznienie	58,77 c	52,67 abc	55,72 b
Uprawa pod siatką cieniującą	48,53 a	50,58 ab	49,55 a
Średnia	53,94 a	54,09 a	

5.2.2. Miodunka miękkowłosa

5.2.2.1. Plon ziela

W przeciwieństwie do roślin czosnku niedźwiedziego, w przypadku którego znacznie zmieniła się liczba i zagęszczenie roślin, liczba roślin miodunki miękkowłosej oraz jej zagęszczenie nie zmieniła się pomiędzy latami doświadczenia. W związku z tym nie przedstawiono wyników dla masy pojedynczej rośliny, a jedynie plonu z powierzchni. Analizując plon świeży i suchy ziela miodunki miękkowłosej nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy różnymi warunkami uprawy ani latami. Pomimo suchej wiosny, plon

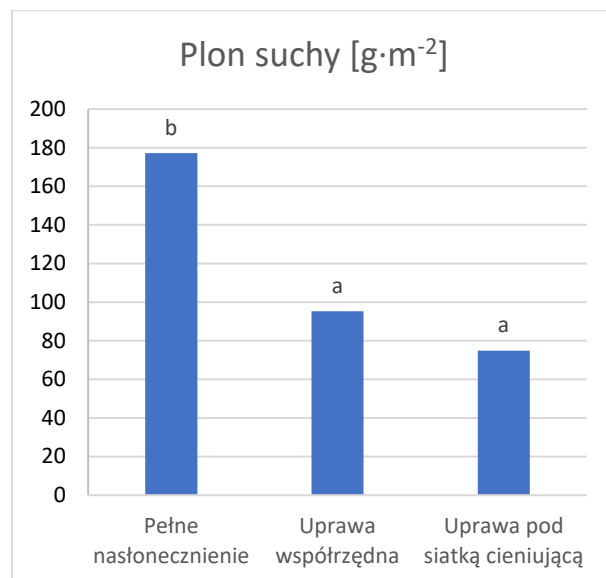
ziela miodunki miękkowłosej zwiększył się w roku 2019 w porównaniu z rokiem 2018, najprawdopodobniej z uwagi na starszy wiek roślin. W przeciwieństwie do czosnku niedźwiedziego, który jest geofitem i wchodzi w spoczynek na początku lata, rośliny miodunki rosną przez cały okres wegetacyjny. W związku z tym, pomimo suchej wiosny w 2019 roku, dobre warunki wegetacyjne w 2018 roku wpłynęły na korzystny rozwój roślin (tabele 20-21). Analizując plon suchego ziela miodunki miękkowłosej osobno dla roku 2018 i 2019, stwierdzono istotne różnice jedynie w roku 2018, kiedy to najwyższy plon ziela uzyskano dla roślin rosnących w pełnym nasłonecznieniu (rysunek 27).

Tabela 20 Plon świeżego ziela miodunki miękkowłosej [$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$] w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	884	892	887
Pełne nasłonecznienie	1668	1709	1688
Uprawa pod siatką cieniującą	1032	2745	1889
Średnia	1195	1863	

Tabela 21 Plon suchego ziela miodunki miękkowłosej [$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$] w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	95,2	147,3	117,6
Pełne nasłonecznienie	177,2	255,0	216,1
Uprawa pod siatką cieniującą	74,9	305,3	190,1
Średnia	115,8	243,9	



Rysunek 24 Plon suchego ziela miodunki miękkowłosej [g·m⁻²] w roku 2018

Podobnie jak w przypadku czosnku niedźwiedziego, rośliny miodunki miękkowłosej charakteryzowały się wyższą suchą masą w 2019 roku w porównaniu do roku 2018. Rośliny uprawiane współrzędnie posiadały w obu latach najwyższy procent suchej masy. Wynik ten różnił się istotnie od roślin uprawianych pod siatką cieniującą, natomiast nie różnił się od roślin uprawianych w pełnym nasłonecznieniu (tabela 22).

Tabela 22 Sucha masa (%) ziela miodunki miękkowłosej w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	10,7 b	16,7 c	13,3 b
Pełne nasłonecznienie	10,6 ab	14,3 c	12,4 b
Uprawa pod siatką cieniującą	7,3 a	9,7 ab	8,5 a
Średnia	9,5 a	13,3 b	

5.2.2.2. Wpływ odległości od pnia bzu czarnego na masę pojedynczych roślin miodunki miękkowłosej

Odległość od pnia bzu czarnego miała znaczący wpływ na świeżą masę ($\acute{S}M$) roślin miodunki. Chociaż odległość minimalna (odległość do najbliższego drzewa) nie była dobrym miernikiem odległości do przewidywania wzrostu roślin miodunki (wartości R^2 na poziomie 0,07), używając średnią odległość od wszystkich czterech roślin bzu czarnego w obrębie poletka pozwoliło na wyjaśnienie 54% wariacji masy roślin miodunki za pomocą funkcji sigmoidalnej z ogólnym równaniem: $\acute{S}M = A + \frac{B}{1 + C \times e^{-D \times \text{ODLEGŁOŚĆ}}}$ (tabela 23). Ponieważ parametr C miał wysoką wartość, a wynikająca funkcja nie była wygodna w użyciu, równanie zostało uproszczone do $\acute{S}M = A + \frac{B}{1 + e^{C - D \times \text{ODLEGŁOŚĆ}}}$. Zmiana równania zmieniła optymalne wartości parametrów, ale nie miała wpływu na % wyjaśnionej wariacji. W przypadku obu równań parametry A i B były statystycznie istotne, podczas gdy parametry C i D były od siebie zależne, co oznacza, że po zmianie jednego z nich na stałą wartość, drugi był statystycznie istotny. W tym drugim równaniu parametr A reprezentuje najniższe wartości świeżej masy pojedynczej rośliny miodunki (asymptota pozioma po lewej), parametr B reprezentuje różnicę między najwyższymi, a najniższymi wartościami świeżej masy pojedynczej rośliny miodunki (A+B jest asymptotą poziomą po prawej), parametry C i D są odpowiedzialne za kształt krzywej (C/D jest wartością ODLEGŁOŚCI w punkcie przegięcia krzywej, a 1/D jest parametrem skali na osi x). Zgodnie z wykresem obserwowanych wartości świeżej masy miodunki miękkowłosej z przewidywaną wartością na podstawie równania $\acute{S}M = 81.38 + \frac{53.35}{1 + e^{20.99 - 9.49 \times \text{ODLEGŁOŚĆ}}}$ można zauważyć, że rośliny miodunki wykazywały większą zmienność i oznaki silnego zahamowania wzrostu (zmniejszenie świeżej masy roślin) do około 2m średniej odległości od drzew bzu (wzrost świeżej masy pojedynczej rośliny z 81,38g dla 0m do 87,68g dla 2m) z dodatkowym umiarkowanym hamowaniem wzrostu na kolejnym 0,4-0,5m (wzrost świeżej masy rośliny z 87,68g dla 2m do 127,07g i 131,48g odpowiednio dla 2,4m i 2,5m) (rysunek 28).

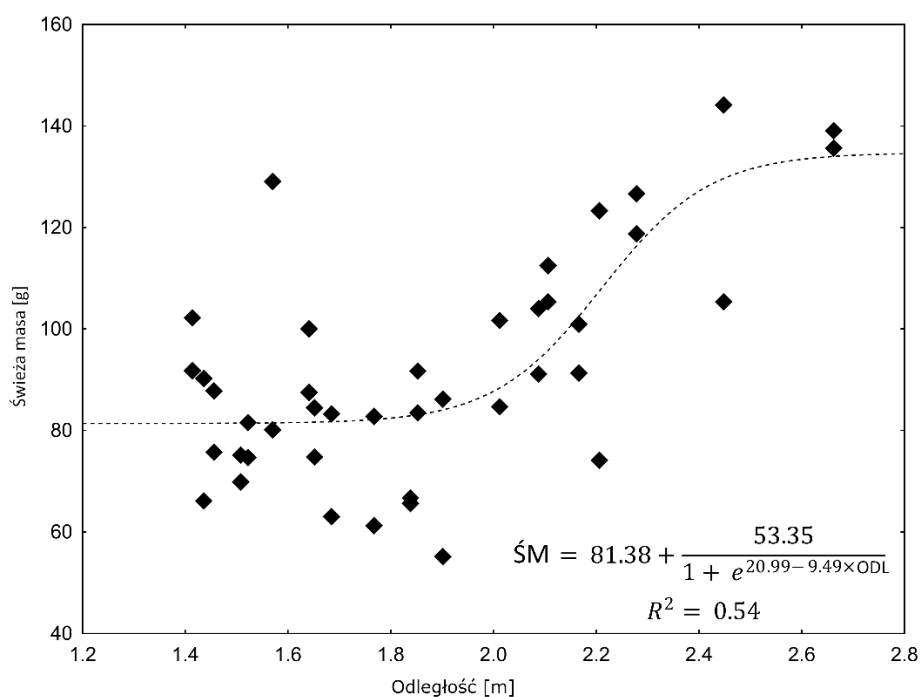
Tabela 23 Parametry równania (A, B, C i D) dla odległości do najbliższego drzewa oraz średniej odległości do wszystkich 4 drzew na poletku oraz ich R i ułamek wyjaśnionej wariancji (R^2) używane w modelowaniu średniej masy miodunki miękkołosej

Miara odległości	Parametry równania				R	R^2
	A	B	C	D		
Odległość minimalna	68,31	26,76	18,54	9,36	0,27	0,07
Odległość średnia	81,38	53,34	$1,33 \times 10^9$	9,50	0,74	0,54

ŚM – Świeża masa

Odległość minimalna – odległość do najbliższego drzewa

Odległość średnia – średnia odległość do wszystkich czterech drzew w obrębie poletka



Rysunek 25 Zaobserwowane (♦) i przewidywane wartości (- - -) na podstawie modelu sigmoidalnego świeżej masy miodunki w odniesieniu do średniej odległości do roślin bzu czarnego w obrębie poletka

5.2.2.3. Zmienność chemiczna

5.2.2.3.1. Zawartość chlorofilu *a* i *b*

Przeprowadzona analiza chemiczna pozwoliła na stwierdzenie istotnego wpływu warunków uprawy, roku doświadczenia jak również interakcji obu tych czynników na zawartość chlorofilu *a* i *b* w ziele miodunki miękkowłosej. Najwyższą zawartość chlorofilu *a* zaobserwowano w przypadku roślin uprawianych pod siatką cieniującą w porównaniu do roślin uprawianych współrzędnie z bzem czarnym lub w pełnym nasłonecznieniu. Większa ilość chlorofilu *a* występowała w roślinach zebranych w roku 2018 niż w 2019. Analizując interakcję tych czynników można zauważyć, że istotnie mniej chlorofilu *a* występowała w roślinach uprawianych współrzędnie lub w pełnym nasłonecznieniu w roku 2019 (tabela 24). Podobnie jak w przypadku chlorofilu *a*, najwyższą zawartość chlorofilu *b* stwierdzono u roślin miodunki miękkowłosej uprawianej pod siatką cieniującą w stosunku do roślin uprawianych współrzędnie z bzem czarnym lub w pełnym nasłonecznieniu. W przeciwieństwie natomiast do chlorofilu *a*, trend ten utrzymywał się w obu latach doświadczenia (tabela 25).

Tabela 24 Zawartość chlorofilu *a* [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w ziele miodunki miękkowłosej w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	2,67 b	1,51 a	2,09 a
Pełne nasłonecznienie	2,66 b	1,29 a	1,98 a
Uprawa pod siatką cieniującą	3,04 b	2,76 b	2,90 b
Średnia	2,79 b	1,86 a	

Tabela 25 Zawartość chlorofilu *b* [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w ziele miodunki miękkowłosej w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	0,90 ab	0,50 a	0,70 a
Pełne nasłonecznienie	0,83 ab	0,43 a	0,63 a
Uprawa pod siatką cieniującą	1,58 c	1,24 bc	1,41 b
Średnia	1,10 b	0,72 a	

5.2.2.3.2. Ogólna zawartość karotenoidów

Zawartość karotenoidów w ziele miodunki miękkowłosej podlegała podobnym trendom co zawartość chlorofilu **a**. Najwyższą zawartość karotenoidów stwierdzono w ziele miodunki miękkowłosej zebranych z uprawy pod siatką cieniującą. Również rośliny miodunki miękkowłosej zebrane w roku 2018 charakteryzowały się wyższą zawartością karotenoidów w porównaniu do roślin zebranych w roku 2019, jednak podobnie jak w przypadku zawartości chlorofilu **a**, statystycznie istotnie wyższą zawartość karotenoidów w roślinach uprawianych pod siatką cieniującą stwierdzono jedynie w 2019 roku (tabela 26).

Tabela 26 Zawartość karotenoidów ogółem [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w ziele miodunki miękkowłosej w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	0,67 b	0,42 a	0,54 a
Pełne nasłonecznienie	0,67 b	0,36 a	0,52 a
Uprawa pod siatką cieniującą	0,87 b	0,79 b	0,83 b
Średnia	0,74 b	0,52 a	

5.2.2.3.3. Zawartość flawonoidów

Na podstawie przeprowadzonych analiz nie stwierdzono istotnego wpływu warunków uprawy na zawartość flawonoidów, choć zawartość tych związków podlegała istotnemu wpływowi roku doświadczenia. Obie zastosowane metody analizy zgodnie wykazały wyższą zawartość flawonoidów w ziele miodunki zebranej w 2018 roku w porównaniu do ziela zebranego w roku 2019. Nie stwierdzono istotnego wpływu interakcji pomiędzy warunkami uprawy, a rokiem doświadczenia na podstawie metody 1. Metoda 2, pozwoliła na wykazanie interakcji obu tych czynników jednak jedyną różnicą wykrytą tu była istotnie wyższa zawartość flawonoidów w ziele miodunki uprawianej w pełnym nasłonecznieniu w roku 2018 w porównaniu do ziela miodunki uprawianej pod siatką cieniującą w roku 2019 (tabele 27-28).

Tabela 27 Zawartość związków flawonoidowych ogółem [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.] w ziele miodunki miękkowłosej w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019 oznaczona metodą 1

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	14,91 a	13,77 a	14,34 a
Pełne nasłonecznienie	14,58 a	12,64 a	13,61 a
Uprawa pod siatką cieniującą	15,44 a	12,13 a	13,78 a
Średnia	14,97 b	12,85 a	

Tabela 28 Zawartość związków flawonoidowych ogółem [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.] w ziele miodunki miękkowłosej w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019 oznaczona metodą 2

Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	128,93 ab	86,24 ab	107,58 a
Pełne nasłonecznienie	133,51 b	85,47 ab	109,49 a
Uprawa pod siatką cieniującą	128,73 ab	75,85 a	102,29 a
Średnia	130,39 b	82,52 a	

5.2.2.3.4. Zawartość związków polifenolowych ogółem

Zarówno warunki prowadzenia uprawy, rok doświadczenia jak również interakcja obu tych czynników miały istotny wpływ na ogólną zawartość związków polifenolowych w ziele miodunki miękkowłosej. Rośliny uprawiane współrzędnie z bzem czarnym lub w pełnym nasłonecznieniu miały istotnie wyższą zawartość związków polifenolowych w porównaniu z roślinami uprawianymi pod siatką cieniującą. Zawartość ta, była również istotnie wyższa w roku 2018 w porównaniu do roku 2019. Analizując interakcję obu tych czynników zaobserwowano, że jedynie w 2018 roku rośliny miodunki miękkowłosej uprawianej współrzędnie lub w pełnym nasłonecznieniu istotnie różniły się zawartością tych związków w porównaniu z roślinami uprawianymi pod siatką cieniującą. Choć trend był podobny w roku 2019, różnica ta nie była statystycznie istotna (tabela 29).

Tabela 29 Zawartość związków polifenolowych ogółem [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w ziele miodunki miękkowłosej w zależności od warunków uprawy w latach 2018 - 2019

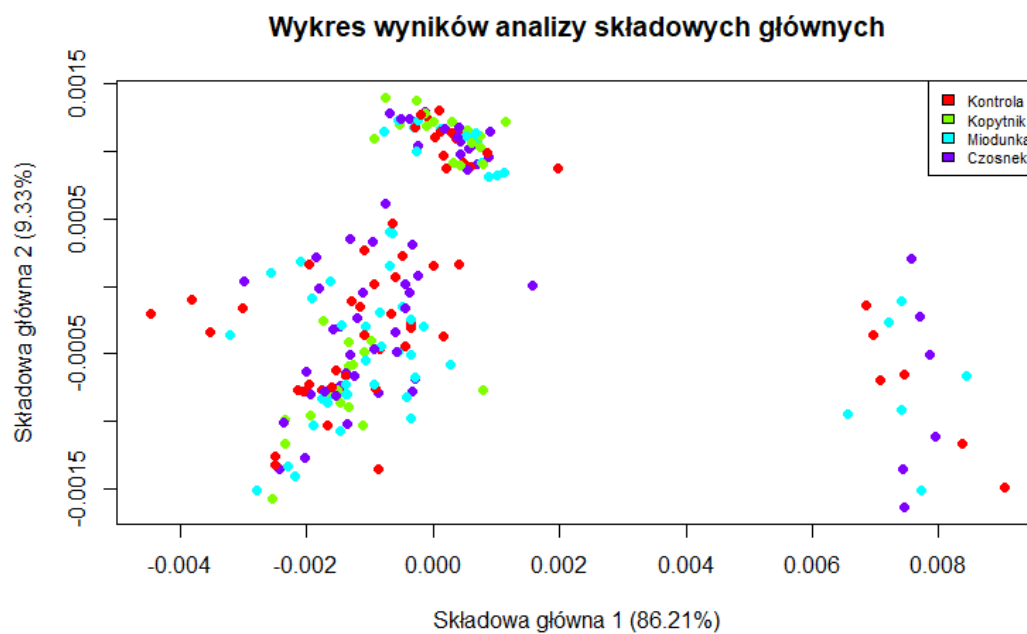
Warunki uprawy	Rok		Średnia
	2018	2019	
Uprawa współrzędna	89,12 c	17,48 a	53,30 b
Pełne nasłonecznienie	85,81 c	16,59 a	51,20 b
Uprawa pod siatką cieniującą	62,45 b	15,72 a	39,09 a
Średnia	79,13 b	16,59 a	

5.3. Część III doświadczeń – Zmienność chemiczna liści bzu czarnego oraz określenie ich przydatności jako surowca leczniczego

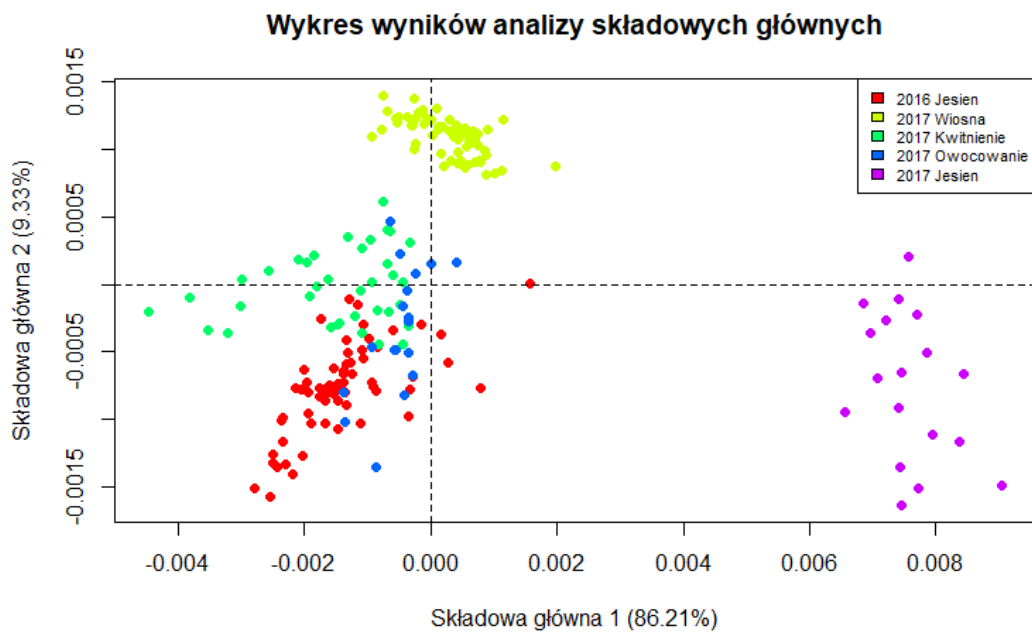
5.3.1. Określenie zróżnicowania chemicznego liści bzu czarnego przy użyciu spektrometrii w podczerwieni z transformatą Fouriera

Do analizy wyników spektrometrii w podczerwieni wykorzystano analizę składowych głównych, technikę chemometryczną, która pozwala na zredukowanie wymiarowości danych. Z uwagi na wysoką korelację absorbancji obserwowanej przy zbliżonych liczbach falowych, wyodrębniono trzy składowe główne pozwalające łącznie wyjaśnić 98,54% wariancji. Pierwsza składowa główna pozwoliła na wyjaśnienie 86,21% wariancji, druga składowa główna wyjaśniła dodatkowe 9,33% wariancji, natomiast trzecia składowa główna wyjaśniła dodatkowe 3% wariancji. Wykres rozrzutu punktów na przestrzeni składającej się z pierwszej i drugiej składowej głównej przedstawiono na rysunku 29. Na rysunku tym zaznaczono również kolorami próbki liści, w zależności od kombinacji doświadczenia tj. gatunku uprawianego pod koroną bzu czarnego. Choć zaobserwowano grupowanie się próbek w trzy klastry, nie zaobserwowano by wpływ ten powodowany był przez gatunek towarzyszący w uprawie współrzędnej bzu czarnego. Dalsza analiza pozwoliła na zidentyfikowanie czasu zbioru liści bzu czarnego jako czynnika różnicującego różne grupy (rysunek 30). Szczególnie w tym względzie wyróżniały się próbki zebrane jesienią 2017 roku (grupa fioletowa) oraz próbki zebrane wiosną tego samego roku (grupa żółtozielona). Pozostałe próbki, zebrane podczas kwitnienia (grupa zielona), owocowania (grupa niebieska) oraz te zebrane jesienią 2016 roku (grupa czerwona) również grupowały się razem jednak różnica odległości pomiędzy tymi trzema grupami była dość niewielka. Pierwsza składowa główna bardzo dobrze różnicowała próbki zebrane jesienią 2017 roku od wszystkich pozostałych próbek, natomiast druga składowa główna bardzo dobrze rozdzielała próbki zebrane wiosną 2017 roku od wszystkich pozostałych próbek. Rysunek 31 przedstawia ładunki poszczególnych składowych głównych. Widać na nim, że piki absorbancji pomiędzy 1700 a 1770 cm^{-1} wpływały dodatnio na wartości pierwszej składowej głównej, natomiast wartości absorbancji pomiędzy 1500 a 1700 cm^{-1} miały negatywny wpływ. Na wartości drugiej składowej głównej pozytywny wpływ miały wartości absorbancji przy liczbie falowej pomiędzy 1500 a 1560 cm^{-1} oraz 1620-1700 cm^{-1} , natomiast negatywny wpływ miała absorbancja dla liczb falowych w przedziałach 1560-1620 cm^{-1} oraz 1700-1780 cm^{-1} .

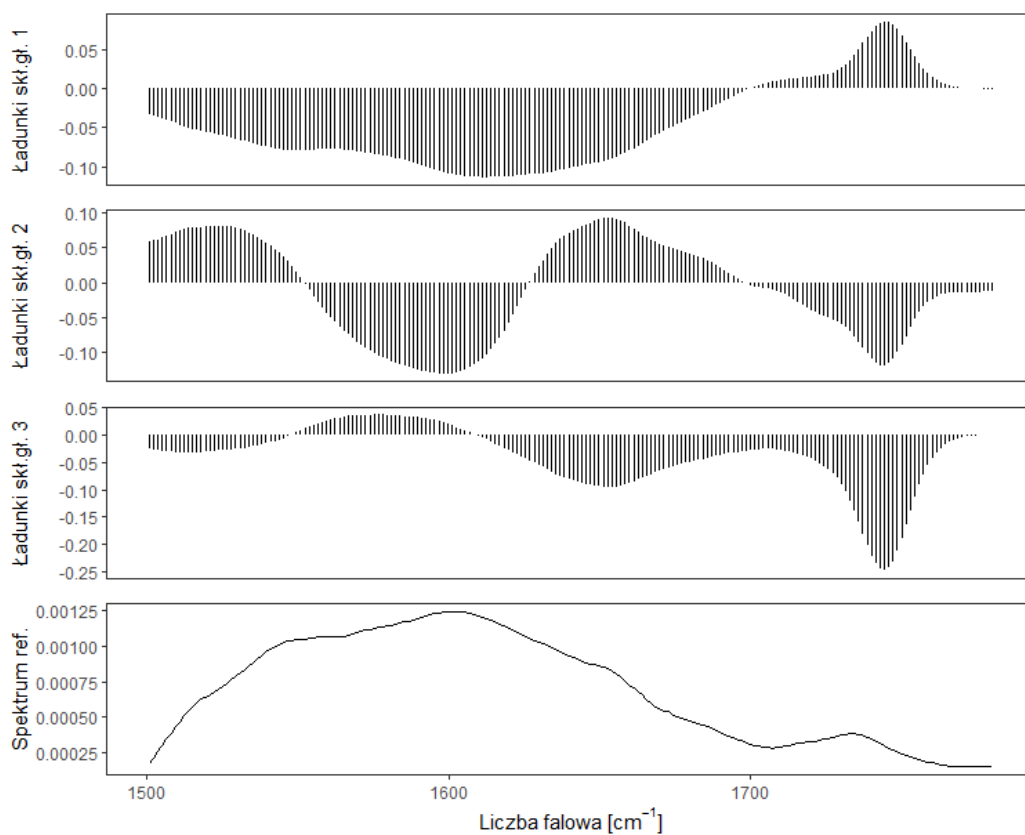
Wartości trzeciej składowej głównej były negatywnie skorelowane z wartościami absorbancji dla niemal całego badanego zakresu poza pasmem pomiędzy 1550 a 1610 cm^{-1} .



Rysunek 26 Wykres wyników analizy składowych głównych dla liści bzu czarnego. Kolory oznaczają gatunek towarzyszący



Rysunek 27 Wykres wyników analizy składowych głównych. Różne kolory oznaczają terminy zbioru liści

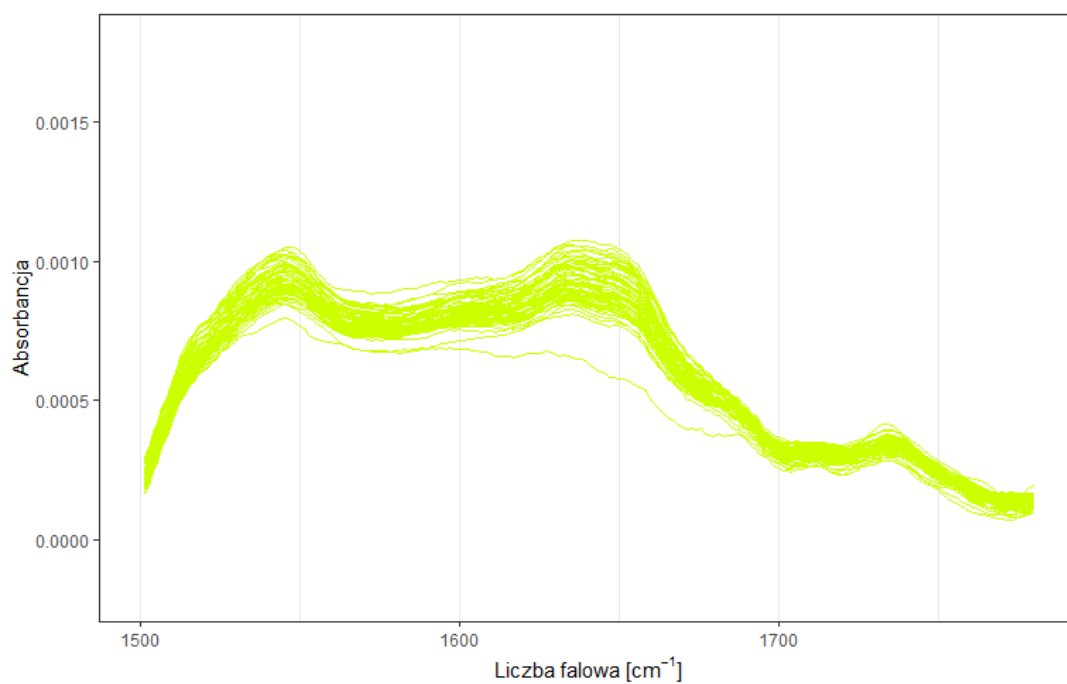


Rysunek 28 Wykres ładunków składowych głównych 1-3

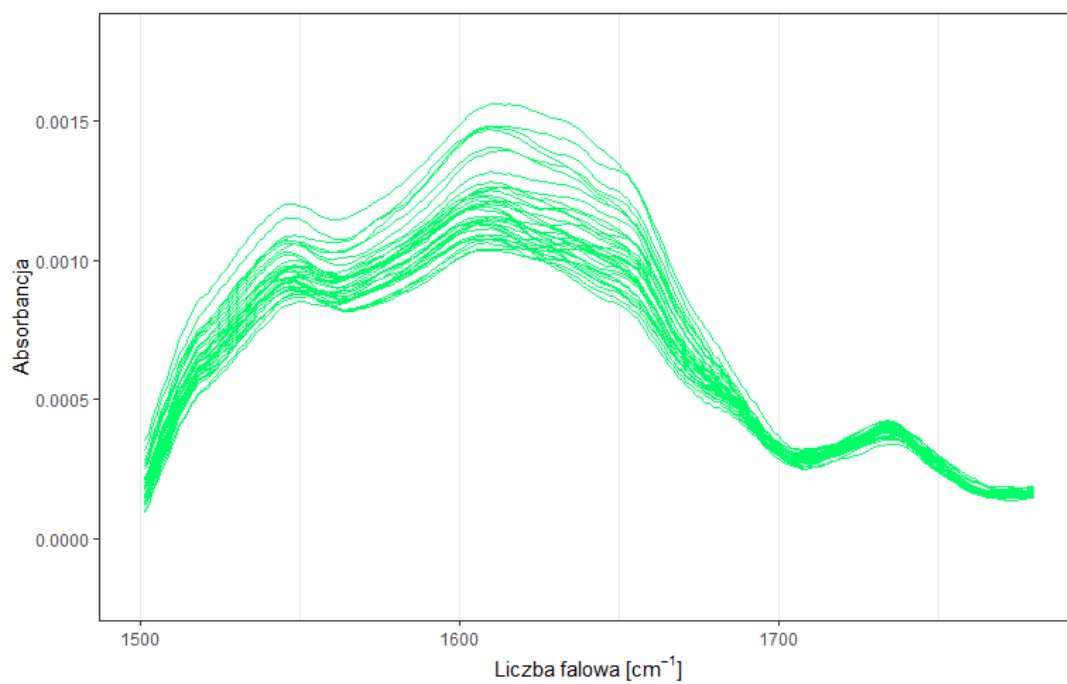
Powyższe informacje pozwalają na wysunięcie pewnych wniosków dotyczących zmienności chemicznej w analizowanych roślinach bzu czarnego. Jak wspomniano wyżej, pierwsza składowa główna była pozytywnie skorelowana z absorpcją przy liczbie falowej pomiędzy 1700 a 1770 cm^{-1} . W tym zakresie występują pasma drgań rozciągających wiązania C=O. W szczególności w zakresie 1735-1750 cm^{-1} występuje pasmo drgań rozciągających dla estrów nasyconych, wchodzących w skład tłuszczów czy wosków roślinnych. Podobnie, druga składowa główna wykazywała pozytywną korelację z wartościami absorpcji w zakresie liczby falowej 1500-1560 cm^{-1} oraz 1620-1700 cm^{-1} . W tych zakresach, pasmo 1500-1560 cm^{-1} odpowiada pasmu Amid II, które jest związane głównie z drganiami zginającymi N-H oraz rozciągającymi C-N w grupach amidowych, charakterystycznymi dla białek. To pasmo dostarcza informacji o zawartości i strukturze białek. Zakres 1620-1700 cm^{-1} obejmuje pasmo Amid I, przypisywane drganiom rozciągającym wiązanie C=O w amidach, biorącego udział w budowie wtórnych struktur białek. Negatywny wpływ na drugą składową główną miały wartości absorpcji w zakresach liczby falowej 1560-1620 cm^{-1} oraz 1700-1780 cm^{-1} . Zakres 1560-1620 cm^{-1} może być związany z drganiami charakterystycznymi dla związków aromatycznych, podczas gdy zakres 1700-1780 cm^{-1} zazwyczaj obejmuje drgania rozciągające wiązania C=O w różnych związkach organicznych, takich jak ketony, aldehydy czy kwasy karboksylowe. Wskazuje to na wrażliwość drugiej składowej głównej na zmiany w zawartości i strukturze białek, a także na obecność innych związków organicznych z wyraźnie zdefiniowanymi grupami funkcyjnymi. Wartości trzeciej składowej głównej były negatywnie skorelowane z wartościami absorpcji dla niemal całego badanego zakresu, poza charakterystycznym pasmem pomiędzy 1550 a 1610 cm^{-1} . Obecność tego szerokiego pasma w analizie spektroskopowej może wskazywać na kilka różnych zjawisk. Po pierwsze, dolna część tego zakresu, około 1550 cm^{-1} , może odpowiadać pasmu Amid II, które jest związane z białkami. Jednakże szerokość tego pasma sugeruje również obecność innych struktur, takich jak drgania pierścieni aromatycznych, które obejmują drgania rozciągające wiązania C=C. Może to wskazywać na istotną rolę związków aromatycznych w badanych próbkach. Po drugie, możliwa jest także obecność układów sprzężonych, charakteryzujących się naprzemiennymi podwójnymi i pojedynczymi wiązaniami, co może prowadzić do poszerzenia obserwowanych pików. Złożoność tego pasma może więc odzwierciedlać interakcje między różnymi trybami drgań lub obecność różnorodnych grup funkcyjnych w próbkach.

Rysunki 32-35 przedstawiają widma liści bzu w zależności od terminu zbioru. Na rysunku 32 widoczne są charakterystyczne dwa piki w okolicach 1540 cm^{-1} oraz 1630 cm^{-1} . Widma te tworzyły oddzielną grupę na rysunku 30 i jak wspomniano wyżej, grupa ta możliwa była do rozdzielenia dzięki drugiej składowej głównej. Te piki, tak jak w przypadku ładunków drugiej składowej głównej związane są najprawdopodobniej z podwyższoną zawartością białek. Kolejne dwa wykresy (rysunek 33-34), przedstawiające widmo podczas kwitnienia i owocowania roślin bzu, również posiadają piki charakterystyczne dla białek, natomiast pojawił się na nich również dodatkowy pik, związany najprawdopodobniej z podwyższoną zawartością związków aromatycznych, na co wskazywała również trzecia składowa główna. Rysunek 35 przedstawia widma liści bzu zebranych jesienią, tuż przed wejściem roślin w spoczynek zimowy. Na tym rysunku widoczne są dwie grupy widm przedstawionych oddzielnie na rysunku 36 (dla próbek zebranych jesienią 2016 roku) oraz rysunku 37 (dla próbek zebranych jesienią 2017 roku). Tak więc można zauważyć, że widmo próbek zebranych w roku 2016 było podobne do próbek zebranych podczas owocowania bzu w roku 2017, natomiast widmo próbek zebranych jesienią 2017 roku jest zupełnie różne od pozostałych widm. To właśnie te widma tworzyły odrębną grupę po prawej stronie na rysunku 30, rozdzielone przy udziale pierwszej składowej głównej. Rysunek 37 przedstawia również charakterystyczny pik zlokalizowany około 1740 cm^{-1} , który najprawdopodobniej symbolizuje podwyższoną zawartość tłuszczu i wosków w próbkach zebranych w tym terminie.

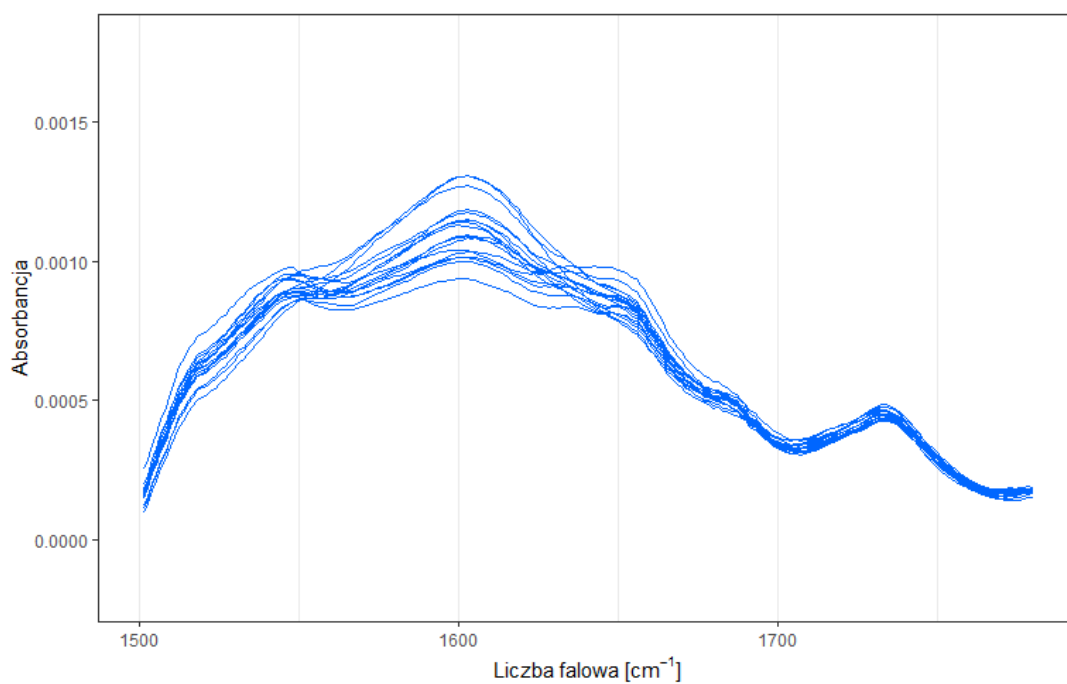
Choć analiza próbek z wykorzystaniem spektrometrii w podczerwieni nie dostarcza w pełni jednoznacznych odpowiedzi, stanowi ona skuteczne narzędzie do wstępnego badania zmienności chemicznej surowca. Jej zasadnicza przewaga nad klasycznymi technikami laboratoryjnymi oraz wysokosprawną chromatografią ciecząwą leży w możliwości analizy niemal wszystkich związków obecnych w próbce bez potrzeby ich uprzedniej ekstrakcji. To eliminuje ryzyko pominięcia kluczowych składników ze względu na dobór niewłaściwego rozpuszczalnika lub warunków ekstrakcji. Ponadto, spektrometria w podczerwieni jest techniką komplementarną, która pozwala z dużym prawdopodobieństwem określić, które związki chemiczne różnicują badane próbki. Dzięki temu możliwe jest przeprowadzenie ukierunkowanej ekstrakcji i dalszej analizy tych specyficznych składników.



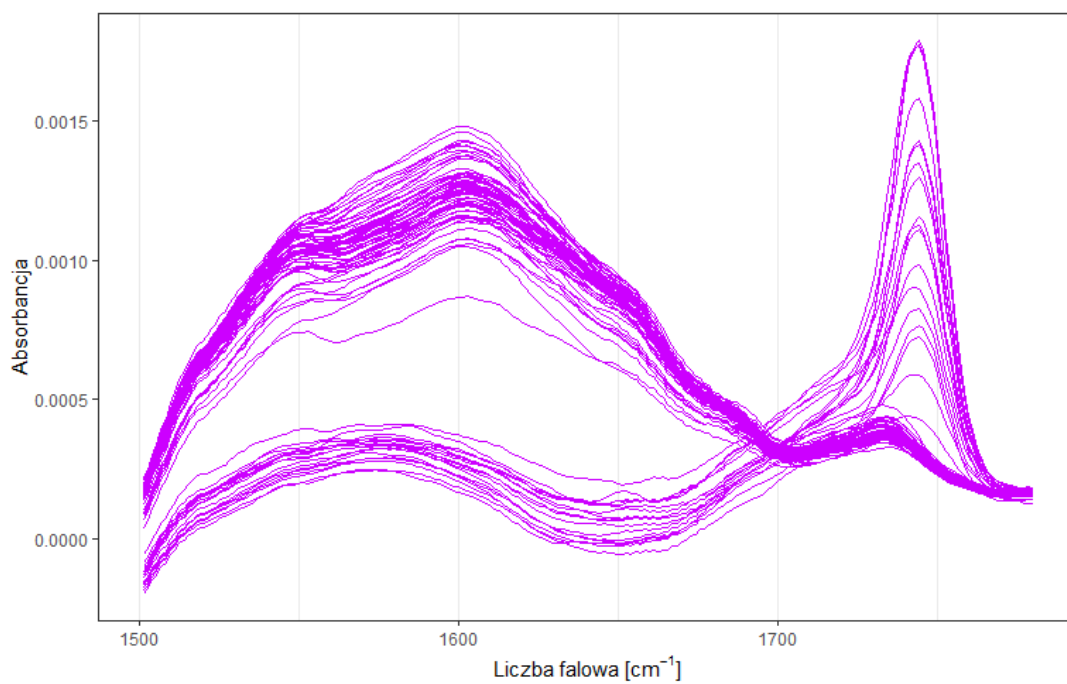
Rysunek 29 Widma FTIR liści bzu czarnego zebranych wiosną



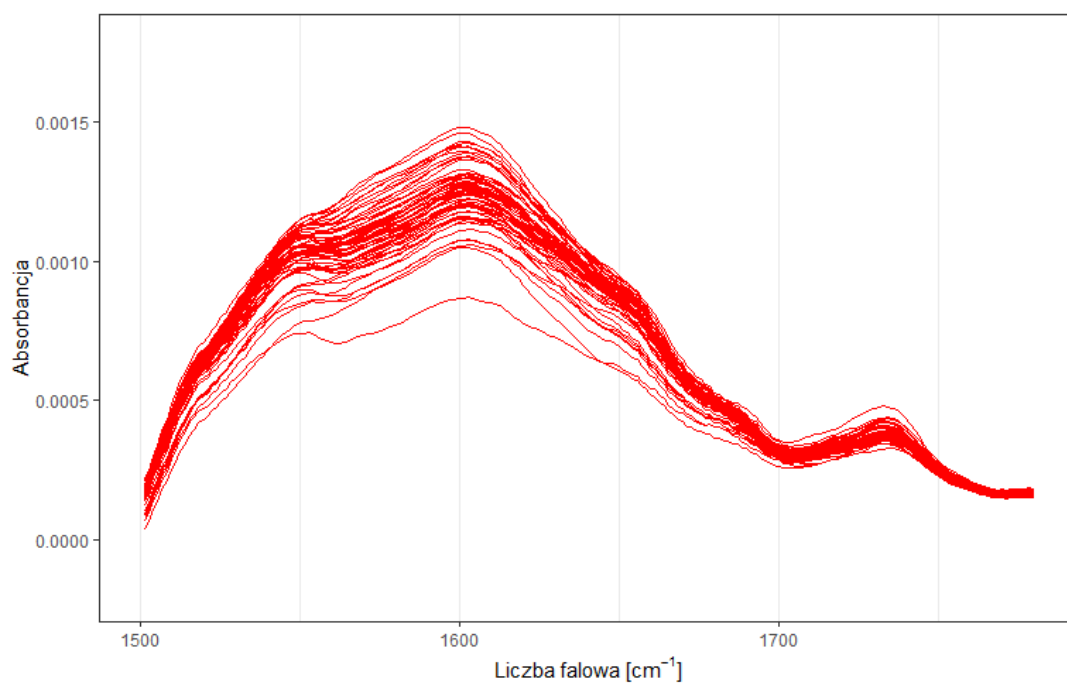
Rysunek 30 Widma FTIR liści bzu czarnego zebranych podczas kwitnienia



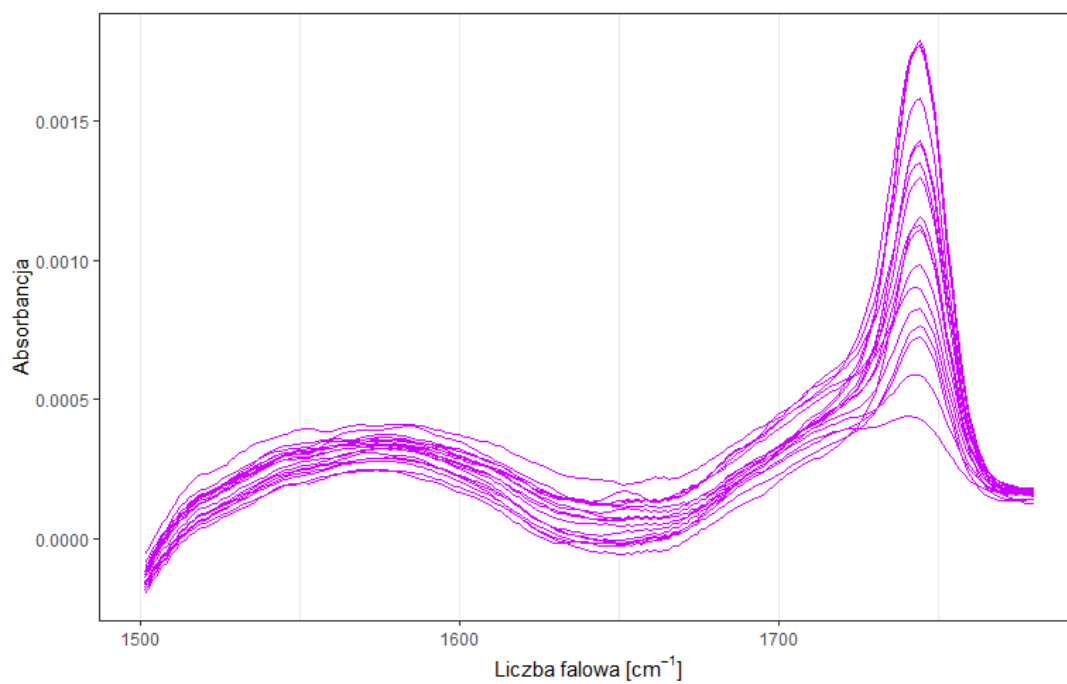
Rysunek 31 Widma FTIR liści bzu czarnego zebranych podczas owocowania



Rysunek 32 Widma FTIR liści bzu czarnego zebranych jesienią



Rysunek 33 Widma FTIR liści bzu czarnego zebranych jesienią 2016



Rysunek 34 Widma FTIR liści bzu czarnego zebranych jesienią 2017

5.3.2. Określenie zróżnicowania chemicznego liści bzu czarnego przy użyciu spektrofotometrii UV-Vis

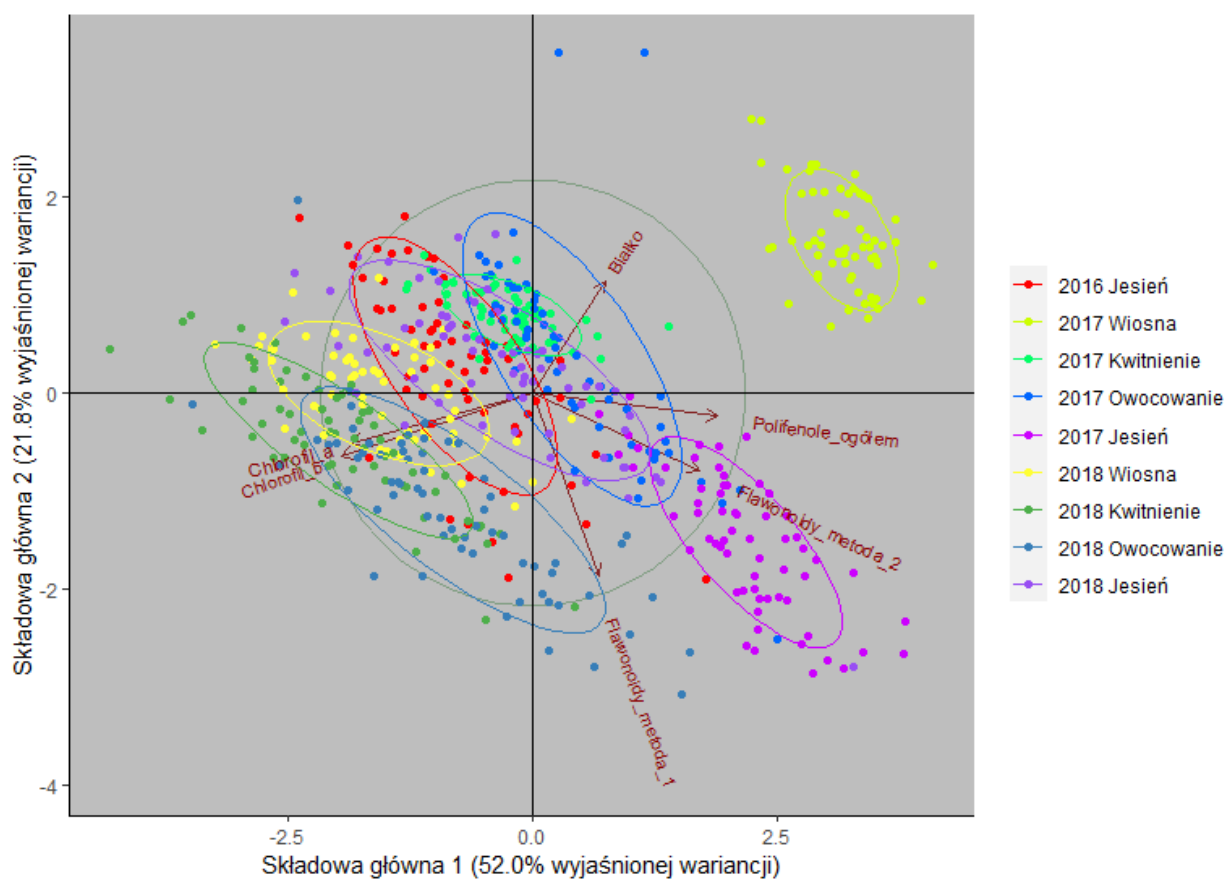
5.3.2.1. Analiza składowych głównych na podstawie analiz spektrofotometrycznych

Na wykresie rozrzutu na podstawie analizy składowych głównych (rysunek 38) można zaobserwować, że dwie główne osie - składowa główna 1 i składowa główna 2 - wyjaśniają łącznie 73,8% całkowitej zmienności chemicznej spośród wszystkich analizowanych próbek. Pierwsza składowa główna, pozwoliła na wyjaśnienie 52,0% zmienności. Wartości pierwszej składowej głównej były silnie negatywnie skorelowane z zawartością chlorofilu **a** i **b**, natomiast silnie pozytywnie skorelowane z zawartością związków polifenolowych ogółem. Składowa ta była również pozytywnie skorelowana z zawartością białka oraz z zawartością flawonoidów mierzonych metodą 2. Druga składowa główna, wyjaśniająca dodatkowe 21,8% zmienności w analizowanych próbkach, była negatywnie skorelowana z zawartością flawonoidów mierzonych metodą 1 oraz pozytywnie skorelowana z zawartością białka. Dodatkowo, na wykresie można zaobserwować, że zawartość obu chlorofilu była ze sobą silnie skorelowana (pozytywnie), natomiast zawartość obu tych związków była negatywnie skorelowana z zawartością związków polifenolowych oraz flawonoidów mierzonych metodą 2. Zawartość związków flawonoidowych mierzonych metodą 1 była negatywnie skorelowana z zawartością białka. Zawartość związków polifenolowych ogółem wykazywała dość silną korelację z zawartością flawonoidów mierzonych metodą 2, nie wykazywała natomiast korelacji z zawartością flawonoidów mierzonych metodą 1.

Połączenie wyników z obu głównych składowych na wykresie umożliwiło wizualizację zróżnicowania próbek zebranych w różnych sezonach i latach. Elipsy prawdopodobieństwa, otaczające klastry punktów, informują o rozprzestrzenieniu i konsystencji grup próbek. Szerokość elips wskazuje na zmienność wewnątrzgrupową, a ich orientacja odzwierciedla relacje między składnikami chemicznymi, a zmiennością sezonową. Możemy tu zaobserwować, że większość próbek grupuje się dość dobrze na podstawie terminu zbioru. Choć większość grup wydaje się grupować blisko siebie, dwie grupy odstają. Są to próbki zebrane wiosną i jesienią 2017 roku. Obie te grupy wydają się charakteryzować wyższą zawartością związków polifenolowych, przy czym próbki wiosenne charakteryzują się wyższą zawartością białka i niższą zawartością flawonoidów

mierzonych przy użyciu metody 1, natomiast próbki jesienne charakteryzują się niską zawartością białka oraz wysoką zawartością flawonoidów określanych metodą 1.

Wartości ładunków dla różnych metod analizy flawonoidów również zasługują na uwagę, gdyż różne metody mogą dostarczać informacji o różnych frakcjach flawonoidów w liściach. W szczególności metoda druga wykazuje specyficzność w stosunku do flawan-3-oli (do których zaliczane są katechiny) jak również luteoliny i rutyny. Metoda pierwsza natomiast, w dobry sposób oznacza zawartość flawonoidów z grup flawonoli, flawonów i flawanonów choć nie wykrywa, bądź też wykrywa słabo, flawan-3-oli (Pękal, 2014).



Rysunek 35 Wykres rozrzutu na podstawie analizy składowych głównych z wyników analiz spektrofotometrycznych liści bzu czarnego

5.3.2.2. Zawartość chlorofilu *a*

Zawartość chlorofilu *a* w liściach bzu czarnego podlegała zmianom w czasie trwania doświadczenia. Najniższe wartości zaobserwowano dla liści zebranych wiosną 2017 roku (średnio $1,24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m}$) natomiast najwyższe wartości obserwowano wiosną 2018 roku ($5,85 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m}$). Największa zmienność pomiędzy kombinacjami doświadczenia wystąpiła jesienią 2017 oraz wiosną 2018 roku. Zmienność pomiędzy terminami zdaje się mieć charakter kierunkowy. Generalnie, liście młodsze charakteryzują się wyższą zawartością chlorofilu *a* i w miarę starzenia się liści, zawartość chlorofilu *a* spada. Widać to bardzo dobrze, gdy liście zebrane były w 2018 roku, gdzie zebrane wiosną odznaczają się najwyższą ilością chlorofilu *a* ($5,85 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m}$), następnie mniej zebrane odpowiednio podczas kwitnienia, owocowania oraz jesienią. Podobny trend można zaobserwować dla liści zebranych w roku 2017 pozyskanych podczas kwitnienia, owocowania oraz jesienią (rysunek 39).

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej nie zaobserwowano różnic w zawartości chlorofilu *a* pomiędzy kombinacjami doświadczenia dla próbek zebranych wiosną (tabela 30), podczas kwitnienia (tabela 31), podczas owocowania (tabela 32) oraz jesienią (tabela 33). Dla wszystkich tych faz rozwojowych zaobserwowano natomiast statystycznie istotną różnicę w zawartości chlorofilu *a* pomiędzy latami doświadczenia. Dla terminu wiosennego, podczas kwitnienia i owocowania była to różnica pomiędzy liśćmi zebranymi w roku 2017 i 2018. W przypadku terminu jesiennego nie zaobserwowano różnic pomiędzy liśćmi zebranymi w latach 2017 i 2018, różniły się one natomiast zawartością chlorofilu *a* od tych zebranych w roku 2016.



Rysunek 36 Zmiana zawartości chlorofilu a w liściach bzu w latach 2016-2018

Tabela 30 Zawartość chlorofilu a [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$] w liściach bzu czarnego zebranych wiosną w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	1,21 b	6,03 a	3,62 a
Kopytnik pospolity	1,27 b	5,58 a	3,43 a
Miodunka miękkowłosa	1,21 b	5,61 a	3,41 a
Czosnek niedźwiedzi	1,25 b	6,18 a	3,71 a
Średnia	1,24 b	5,85 a	

Tabela 31 Zawartość chlorofilu a [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych podczas kwitnienia w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	3,43 b	5,19 a	4,31 a
Kopytnik pospolity	3,18 b	5,26 a	4,22 a
Miodunka miękkowłosa	3,52 b	4,99 a	4,25 a
Czosnek niedźwiedzi	3,53 b	5,30 a	4,41 a
Średnia	3,41 b	5,18 a	

Tabela 32 Zawartość chlorofilu a [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych podczas owocowania w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	2,73 b	4,23 a	3,48 a
Kopytnik pospolity	2,86 b	4,38 a	3,62 a
Miodunka miękkowłosa	2,64 b	4,26 a	3,45 a
Czosnek niedźwiedzi	2,86 b	4,39 a	3,63 a
Średnia	2,77 b	4,32 a	

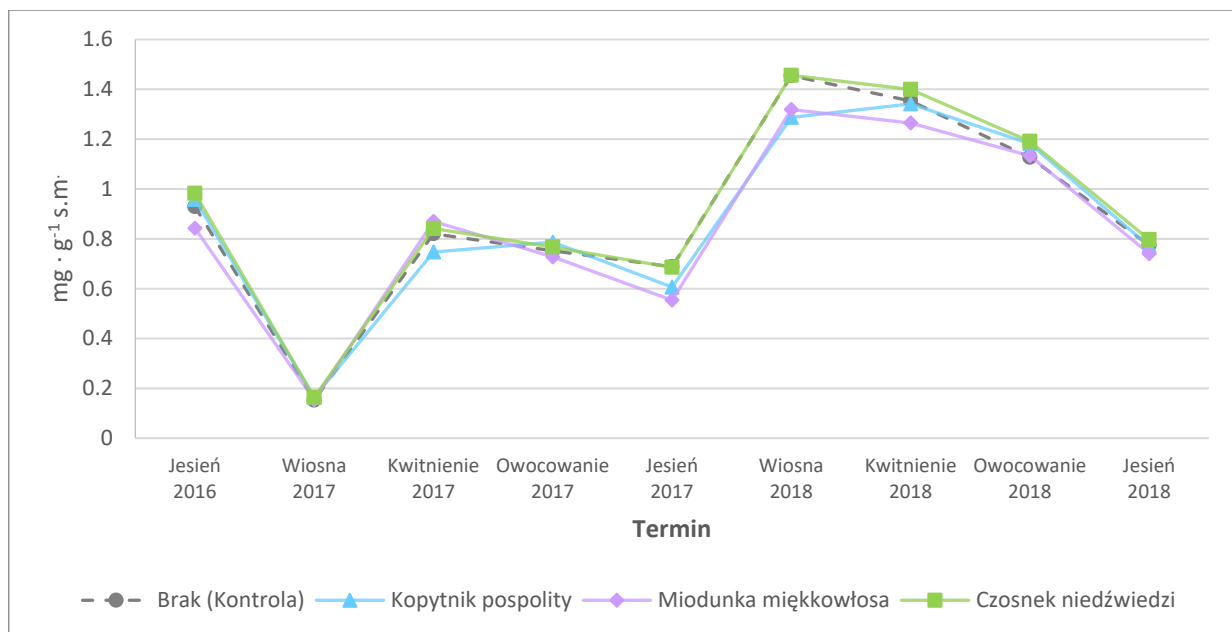
Tabela 33 Zawartość chlorofilu a [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych jesienią w latach 2016-2018

Gatunek towarzyszący	Rok			Średnia
	2016	2017	2018	
Brak (Kontrola)	3,78 a	2,61 b	2,47 b	2,95 a
Kopytnik pospolity	3,74 a	2,21 b	2,51 b	2,82 a
Miodunka miękkowłosa	3,46 a	2,02 b	2,43 b	2,64 a
Czosnek niedźwiedzi	3,59 a	2,63 b	2,53 b	2,92 a
Średnia	3,64 a	2,37 b	2,49 b	

5.3.2.3. Zawartość chlorofilu **b**

Jak wynika z analizy składowych głównych (rysunek 38), zawartość chlorofilu **a** i **b** była ze sobą silnie skorelowana co najprawdopodobniej oznacza znacznie większą zmienność w liczbie chloroplastów, nie zaś w samej proporcji chlorofilu **a** i **b**. Podobnie jak w przypadku chlorofilu **a**, można zaobserwować, że dla chlorofilu **b** najwyższe wartości uzyskiwane były w przypadku zbioru wiosennego i ulegały zmniejszeniu wraz z upływem czasu. W przeciwieństwie natomiast do chlorofilu **a**, zaobserwować można tu nieco inny przebieg. Szczególnie dla 2018 roku, chlorofil **a** miał względnie podobne tempo spadku pomiędzy wiosną, a owocowaniem, które następnie przyspieszyło dopiero na jesieni. W przypadku chlorofilu **b** natomiast, zaobserwować można obecność „garbu”. Spadek zawartości chlorofilu **b** pomiędzy wiosną, a kwitnieniem był słabszy niż pomiędzy kwitnieniem a owocowaniem, a najszybsze tempo spadku zaobserwowano pomiędzy owocowaniem, a jesienią. Warto również zwrócić uwagę, że inną dynamiką zmian charakteryzowały się rośliny bzu w których gatunkiem towarzyszącym był kopytnik pospolity. W tym przypadku możliwy był do zaobserwowania wzrost zawartości chlorofilu **b** pomiędzy kwitnieniem, a owocowaniem w 2017 roku oraz pomiędzy wiosną a kwitnieniem w roku 2018 (rysunek 40).

Podobnie jak w przypadku zawartości chlorofilu **a**, nie zaobserwowano różnicy zawartości chlorofilu **b** pomiędzy kombinacjami doświadczenia w żadnym z terminów, natomiast zaobserwowano różnice pomiędzy liśćmi zebranymi w różnych latach (tabele 34-37). W szczególności, zauważono różnicę pomiędzy liśćmi zebranymi na jesieni każdego roku. Liście zebrane jesienią 2016 roku miały najwyższą zawartość chlorofilu **b**, natomiast najniższą zawartość odnotowano dla tych zebranych w roku 2017 (tabela 37).



Rysunek 37 Zmiana zawartości chlorofilu **b** w liściach bzu w latach 2016-2018

Tabela 34 Zawartość chlorofilu **b** [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$] w liściach bzu czarnego zebranych wiosną w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (kontrola)	0,15 b	1,45 a	0,80 a
Kopytnik pospolity	0,16 b	1,29 a	0,73 a
Miodunka miękkowłosa	0,15 b	1,32 a	0,74 a
Czosnek niedźwiedzi	0,16 b	1,46 a	0,81 a
Średnia	0,16 b	1,38 a	

Tabela 35 Zawartość chlorofilu **b** [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$] w liściach bzu czarnego zebranych podczas kwitnienia w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (kontrola)	0,82 b	1,35 a	1,09 a
Kopytnik pospolity	0,74 b	1,34 a	1,04 a
Miodunka miękkowłosa	0,87 b	1,26 a	1,07 a
Czosnek niedźwiedzi	0,84 b	1,40 a	1,12 a
Średnia	0,82 b	1,34 a	

Tabela 36 Zawartość chlorofilu **b** [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych podczas owocowania w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	0,75 b	1,13 a	0,94 a
Kopytnik pospolity	0,79 b	1,18 a	0,98 a
Miodunka miękkołosa	0,73 b	1,13 a	0,93 a
Czosnek niedźwiedzi	0,77 b	1,19 a	0,98 a
Średnia	0,76 b	1,16 a	

Tabela 37 Zawartość chlorofilu **b** [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych jesienią w latach 2017 - 2018

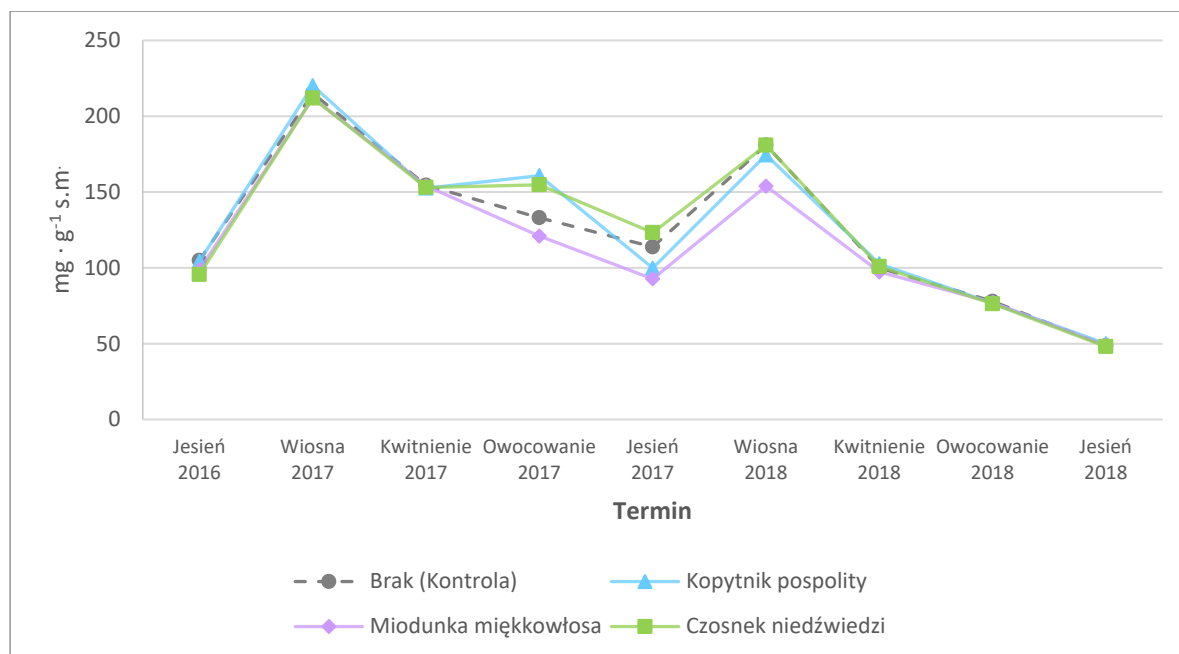
Gatunek towarzyszący	Rok			Średnia
	2016	2017	2018	
Brak (Kontrola)	0,93 ab	0,69 cde	0,77 abcd	0,80 a
Kopytnik pospolity	0,96 a	0,61 de	0,77 abcd	0,78 a
Miodunka miękkołosa	0,85 abc	0,55 e	0,74 bcde	0,71 a
Czosnek niedźwiedzi	0,98 a	0,69 cde	0,80 abcd	0,82 a
Średnia	0,93 a	0,63 c	0,77 b	

5.3.2.4. Zawartość białka

Zawartość białka w liściach bzu czarnego podlegała zmianom w trakcie trwania doświadczenia. Generalnie, zawartość białka była najwyższa, gdy liście zbierano wiosną i systematycznie spadała aż do zbioru jesiennego. Najszybszy spadek ilości białka był zawsze obserwowany pomiędzy liśćmi zebranymi wiosną, a tymi zebranymi podczas kwitnienia. Zawartość białka obserwowana w przypadku roku 2018 była niższa niż w roku 2017. Generalnie, ilość białka w liściach była wyższa u roślin bzu czarnego uprawianych wraz z czosnkiem niedźwiedzim a najniższa dla roślin uprawianych z miodunką miękkowłosą, choć różnice te były obserwowane jedynie pomiędzy owocowaniem w 2017 roku a wiosną roku 2018 (rysunek 41).

Analizując liście zebrane wiosną, zawartość białka była istotnie wyższa w liściach zebranych w 2017 roku w stosunku do 2018 r. W przeciwieństwie do zawartości chlorofilu, stwierdzono istotny wpływ kombinacji doświadczenia oraz interakcji pomiędzy kombinacją doświadczenia a rokiem. Liście roślin bzu czarnego uprawianego wraz z miodunką miękkowłosą charakteryzowały się niższą zawartością białka. Wpływ ten widoczny jest jednak tylko dla roku 2018, gdyż liście zebrane w roku 2017 nie różniły się istotnie co do zawartości białka (tabela 38). Choć ilość białka w liściach bzu uległa zmniejszeniu w stosunku do tych zebranych wiosną, obserwowane są jedynie istotne różnice pomiędzy latami doświadczenia i nie stwierdzono różnic pomiędzy kombinacjami doświadczenia w tym terminie (tabela 39). Zawartość białka w liściach bzu czarnego zebranych podczas owocowania różniła się istotnie pomiędzy rokiem 2017 a 2018. Pomimo braku stwierdzenia istotności różnic pomiędzy kombinacjami doświadczenia, można zauważyć interakcję pomiędzy kombinacją doświadczenia a rokiem. Wszystkie liście zebrane w 2017 roku istotnie różniły się od tych samych kombinacji z roku 2018, zaobserwowano ponadto, że liście zebrane w 2017 roku z poletek w których gatunkiem towarzyszącym była miodunka miękkowłosa nie różniły się istotnie od poletek kontrolnych oraz w kombinacji z kopytnikiem pospolitym w 2018 roku (tabela 40). Patrząc na zawartość białka w liściach zebranych jesienią, zaobserwowano istotny wpływ roku doświadczenia oraz interakcji pomiędzy rokiem doświadczenia, a kombinacją doświadczenia. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu samej kombinacji doświadczenia. Liście zebrane na jesieni w latach 2016 i 2017 nie różniły się istotnie od siebie, natomiast różniły się istotnie od tych zebranych w roku 2018. Zarówno kombinacja kontrolna, kombinacja z kopytnikiem pospolitym oraz kombinacja

z miodunką miękkowłosa nie różniły się istotnie pomiędzy rokiem 2016 a 2017. Jedyne kombinacja z czosnkiem niedźwiedzi wykazywała różnice w zawartości białka pomiędzy rokiem 2016 a 2017. Wszystkie liście z roku 2016 oraz 2017 istotnie różniły się od liści zebranych w 2018 roku w obrębie kombinacji (tabela 41).



Rysunek 38 Zmiany w zawartości białka w liściach bzu w latach 2016-2018

Tabela 38 Zawartość białka [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych wiosną w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	215,07 a	181,00 b	198,03 a
Kopytnik pospolity	220,23 a	174,51 b	197,37 a
Miodunka miękkowłosa	212,10 a	153,90 c	183,00 b
Czosnek niedźwiedzi	211,98 a	180,86 b	196,42 a
Średnia	214,85 a	172,57 b	

Tabela 39 Zawartość białka [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych podczas kwitnienia w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	154,51 a	99,96 b	127,24 a
Kopytnik pospolity	152,75 a	102,66 b	127,71 a
Miodunka miękkowłosa	154,00 a	97,35 b	125,67 a
Czosnek niedźwiedzi	153,03 a	100,93 b	126,98 a
Średnia	153,57 a	100,23 b	

Tabela 40 Zawartość białka [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych podczas owocowania w latach 2017 - 2018

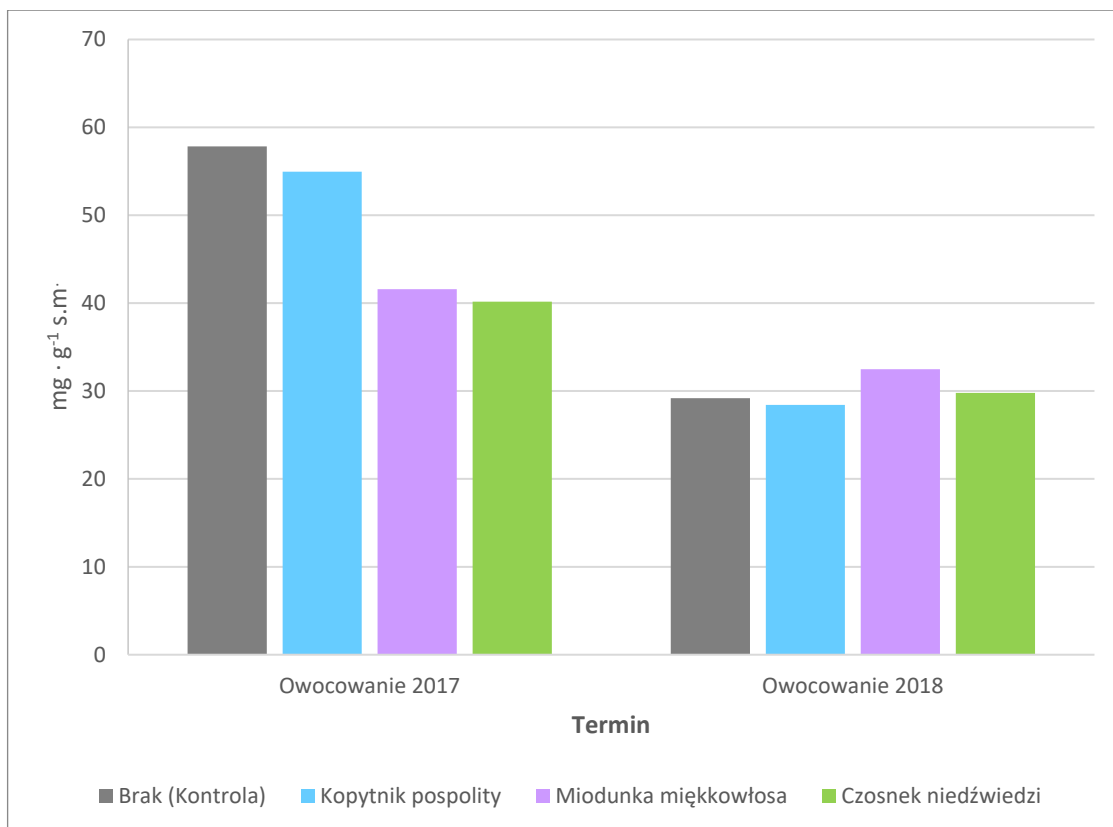
Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	133,06 a	77,88 bc	105,47 a
Kopytnik pospolity	160,81 a	76,70 bc	118,75 a
Miodunka miękkowłosa	120,99 ab	77,14 c	99,06 a
Czosnek niedźwiedzi	154,79 a	76,34 c	115,57 a
Średnia	142,41 a	77,01 b	

Tabela 41 Zawartość białka [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych jesienią w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok			Średnia
	2016	2017	2018	
Brak (Kontrola)	104,87 ab	113,81 ab	48,64 c	89,10 a
Kopytnik pospolity	104,39 ab	99,84 ab	49,99 c	84,74 a
Miodunka miękkowłosa	98,72 b	92,72 b	48,74 c	80,06 a
Czosnek niedźwiedzi	95,65 b	123,25 a	48,06 c	88,98 a
Średnia	100,91 a	107,4 a	48,86 b	

5.3.2.5. Zawartość rozpuszczalnych węglowodanów

Całkowita zawartość węglowodanów określana była w liściach bzu czarnego jedynie w trakcie owocowania. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy kombinacjami doświadczenia, zauważono natomiast statystycznie istotne różnice pomiędzy liśćmi zebranymi w roku 2017 w porównaniu z rokiem 2018. Istotna była również interakcja czynników: roku i kombinacji doświadczenia. W roku 2017 liście zebrane z roślin kontrolnych miały istotnie wyższą zawartość rozpuszczalnych węglowodanów w porównaniu z kombinacją, w której gatunkiem uprawianym pod koroną drzew był czosnek niedźwiedzi. Dodatkowo, liście z 2017 roku dla kombinacji kontrolnej oraz kombinacji, w której gatunkiem towarzyszącym był kopytnik pospolity, były istotnie różne od tych występujących we wszystkich kombinacjach w roku 2018 (rysunek 42, tabela 42).



Rysunek 39 Zmiany w zawartości rozpuszczalnych węglowodanów w liściach bzu zebranych podczas owocowania roślin w latach 2017 - 2018

Tabela 42 Zawartość rozpuszczalnych węglowodanów [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych wiosną w latach 2017 - 2018

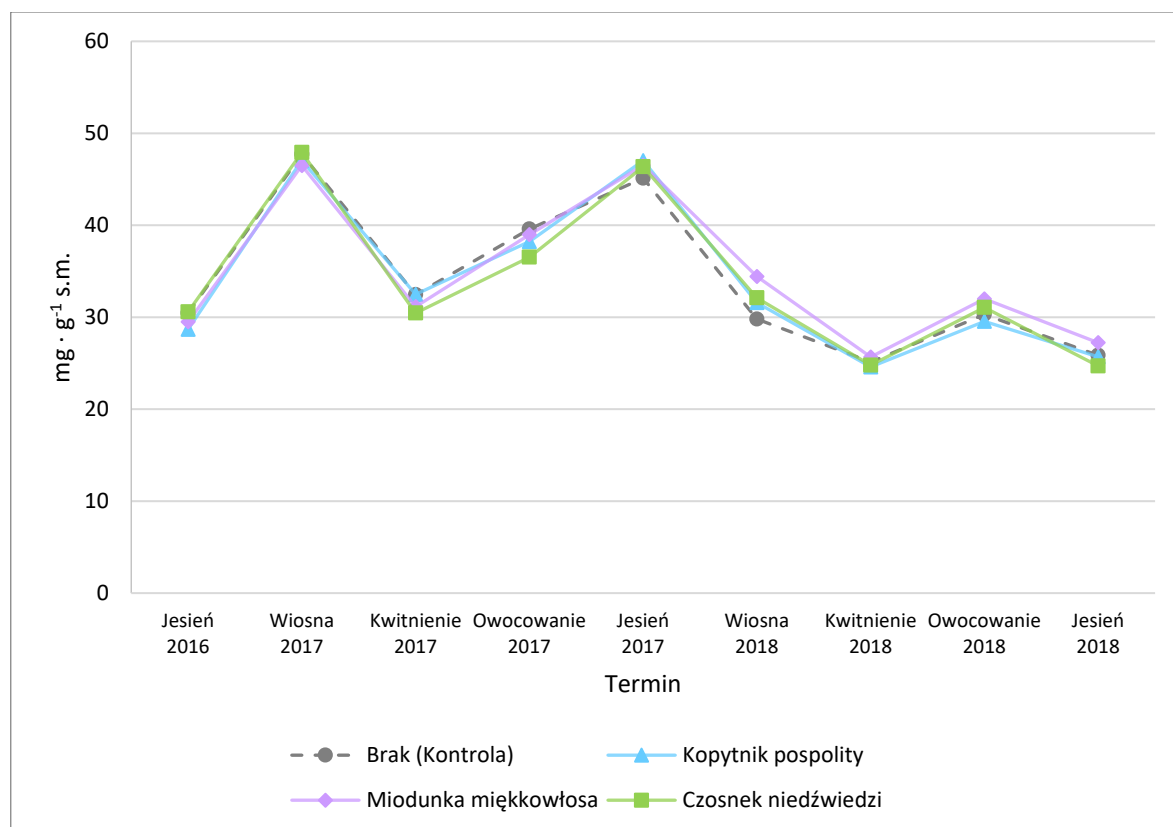
Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	57,83 a	29,18 c	43,51 a
Kopytnik pospolity	54,95 ab	28,42 c	41,69 a
Miodunka miękkowłosa	41,58 abc	32,48 c	37,03 a
Czosnek niedźwiedzi	40,17 bc	29,79 c	34,98 a
Średnia	48,64 a	29,97 b	

5.3.2.6. Zawartość związków polifenolowych ogółem

Analiza zmienności chemicznej liści bzu czarnego w czasie nie wykazała wyraźnego trendu zmian ogólnej zawartości związków polifenolowych w liściach bzu czarnego w trakcie trwania badań. Zaobserwowano, że najniższa ilość związków polifenolowych występowała podczas kwitnienia roślin bzu czarnego. Począwszy od wiosny 2018 roku, rośliny bzu czarnego w których gatunkiem towarzyszącym była miodunka miękkowłosa miały liczbowo wyższą zawartość związków polifenolowych. Choć trend ten utrzymywał się przez wszystkie cztery pomiary w roku 2018, przeprowadzona analiza statystyczna nie stwierdziła występowania statystycznie istotnych różnic (rysunek 43).

Przeprowadzona analiza statystyczna nie pozwoliła również na stwierdzenie istotnego wpływu gatunku podszytu na zawartość związków polifenolowych w liściach bzu czarnego zebranych wiosną. Zaobserwowano natomiast istotny wpływ roku doświadczenia. Liście bzu czarnego zebrane wiosną charakteryzowały się wyższą zawartością związków polifenolowych w roku 2017 w porównaniu z rokiem 2018. Dodatkowo, choć zmiana ta nie była istotna statystycznie, liście bzu uprawianego bez gatunku podszytu w 2018 roku miały najniższą zawartość związków polifenolowych, natomiast te, w której gatunkiem towarzyszącym była miodunka miękkowłosa – najwyższą (tabela 43). W przypadku liści zebranych podczas kwitnienia bzu czarnego nie zaobserwowano istotnego wpływu gatunku towarzyszącego, natomiast istotny wpływ miał rok uprawy. Liście te charakteryzowały się również najniższą zawartością związków polifenolowych, która wyniosła średnio $27,62 - 28,79 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. w porównaniu do pozostałych terminów, gdzie wartość ta wyniosła $33,8 - 40,46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. (tabela 44). W liściach bzu czarnego zebranych podczas owocowania również nie stwierdzono istotnego wpływu kombinacji doświadczenia, natomiast wpływ roku doświadczenia był istotny statystycznie. Zaobserwowano również istotny wpływ interakcji kombinacji doświadczenia oraz roku uprawy. Liście bzu czarnego zebrane z kombinacji kontrolnej oraz z kombinacji, w której kopytnik pospolity uprawiany był jako gatunek towarzyszący, miały istotnie wyższą zawartość związków polifenolowych podczas owocowania w 2017 roku w porównaniu z rokiem 2018. Różnicy tej, nie zaobserwowano dla kombinacji, w której gatunkiem uprawianym pod koroną bzu czarnego była miodunka miękkowłosa lub czosnek niedźwiedzi (tabela 45). W liściach zebranych jesienią, również jedynym

istotnym czynnikiem był rok ich zbioru. Liście bzu pozyskane jesienią roku 2017 charakteryzowały się najwyższą zawartością związków polifenolowych, natomiast te zebrane jesienią roku 2018 – najniższą. Dla większości kombinacji doświadczenia, liście zebrane jesienią 2016 i 2018 roku nie różniły się istotnie statystycznie. Jedynym odstępstwem była tutaj kombinacja, w której gatunkiem towarzyszącym był czosnek niedźwiedzi, w której to występowały statystycznie istotne różnice pomiędzy wszystkimi latami doświadczenia (tabela 46).



Rysunek 40 Zmiany w zawartości związków polifenolowych w liściach bzu w latach 2016-2018

Tabela 43 Zawartość związków polifenolowych [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych wiosną w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	47,72 a	29,80 b	38,76 a
Kopytnik pospolity	47,06 a	31,59 b	39,32 a
Miodunka miękkowłosa	46,49 a	34,43 b	40,46 a
Czosnek niedźwiedzi	47,92 a	32,11 b	40,01 a
Średnia	47,29 a	31,98 b	

Tabela 44 Zawartość związków polifenolowych [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych podczas kwitnienia w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	32,45 a	25,13 b	28,79 a
Kopytnik pospolity	32,48 a	24,60 b	28,54 a
Miodunka miękkowłosa	31,15 a	25,68 b	28,41 a
Czosnek niedźwiedzi	30,45 a	24,79 b	27,62 a
Średnia	31,64 a	25,05 b	

Tabela 45 Zawartość związków polifenolowych [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych podczas owocowania w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	39,59 a	30,30 c	34,95 a
Kopytnik pospolity	38,22 ab	29,55 c	33,88 a
Miodunka miękkowłosa	38,98 a	31,99 abc	35,48 a
Czosnek niedźwiedzi	36,53 abc	31,07 bc	33,80 a
Średnia	38,33 a	30,73 b	

Tabela 46 Zawartość związków polifenolowych [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.] w liściach bzu czarnego zebranych jesienią w latach 2017 - 2018

Gatunek towarzyszący	Rok			Średnia
	2016	2017	2018	
Brak (Kontrola)	30,46 b	45,12 a	25,86 bc	33,81 a
Kopytnik pospolity	28,69 bc	47,03 a	25,70 bc	33,81 a
Miodunka miękkowłosa	29,51 bc	46,65 a	27,24 bc	34,46 a
Czosnek niedźwiedzi	30,59 b	46,36 a	24,70 c	33,88 a
Średnia	29,81 b	46,29 a	25,87 c	

5.3.2.7. Zawartość flawonoidów

Zawartość flawonoidów w liściach bzu czarnego określana była dwiema metodami charakteryzującymi się różną wrażliwością na różne grupy flawonoidów. Ogólnie, metoda 1 pozwoliła stwierdzić niższą zawartość flawonoidów ($6,00 - 12,33 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. ekwiwalent kwercetyny) w porównaniu do metody 2 ($58,35 - 143,36 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. ekwiwalent rutyny). Choć przebieg zmienności zawartości flawonoidów był podobny dla obu metod, metoda 1 okazała się lepsza w różnicowaniu pomiędzy różnymi kombinacjami doświadczenia. Poczynając od jesieni 2017 roku, liście bzu czarnego z kombinacji, w której gatunkiem towarzyszącym była miodunka miękkowłosa charakteryzowały się najwyższą zawartością flawonoidów określanych metodą 1. (rysunki 44-45).

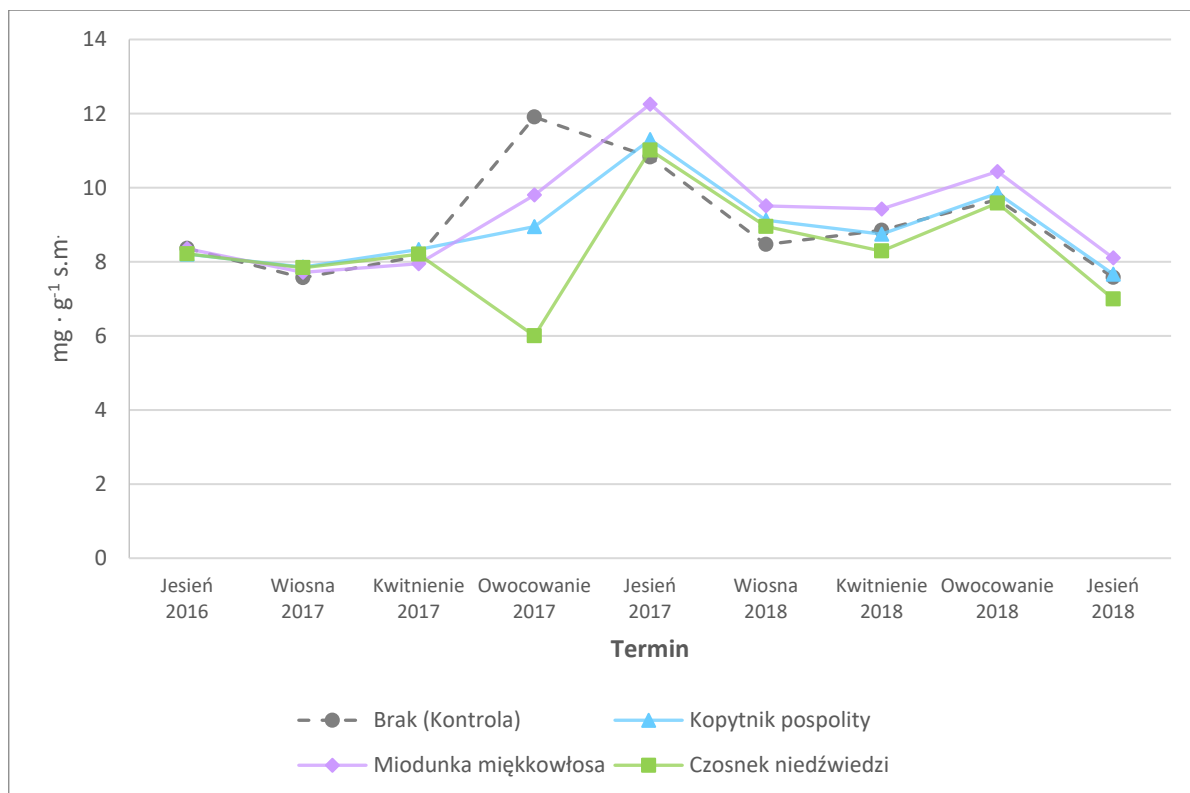
Przeprowadzona analiza statystyczna pozwoliła na stwierdzenie istotnego wpływu gatunku towarzyszącego, roku oraz interakcji tych czynników na zawartość flawonoidów w liściach zebranych wiosną określanych metodą 1, podczas gdy na podstawie metody 2 jedynie rok okazał się istotnym czynnikiem. Wyniki uzyskane metodą 1 wykazały, że ilość flawonoidów była wyższa w roku 2018 w porównaniu do roku 2017. Zawartość ta była również istotnie wyższa dla kombinacji, w której gatunkiem uprawianym była miodunka miękkowłosa w porównaniu z kombinacją kontrolną. Różnica ta była jedynie obserwowana w 2018 roku. Na podstawie metody 2 określającej ilość związków flawonoidowych w liściach bzu czarnego, jedynie rok był czynnikiem istotnie różnicującym liście bzu czarnego. W tym przypadku jednak, to liście zebrane w 2017 roku miały istotnie wyższą zawartość flawonoidów w porównaniu do tych zebranych w 2018 roku (tabele 47-48).

Liście bzu czarnego zebrane podczas kwitnienia charakteryzowały się dużo mniejszą zmiennością zawartości związków flawonoidowych. Na podstawie analizy metodą 1, stwierdzono istotny wpływ roku na zawartość tych związków i tak liście zebrane w 2018 roku miały istotnie wyższą zawartość flawonoidów w porównaniu do roku 2017. Ilość flawonoidów określona metodą 2 nie pozwoliła na stwierdzenie istotnego wpływu zarówno kombinacji doświadczenia, jak również roku. Warto jednak zwrócić uwagę, że w tym przypadku niemal dla wszystkich kombinacji wyższą zawartość flawonoidów określono w przypadku liści zebranych w roku 2017. Jediną kombinacją,

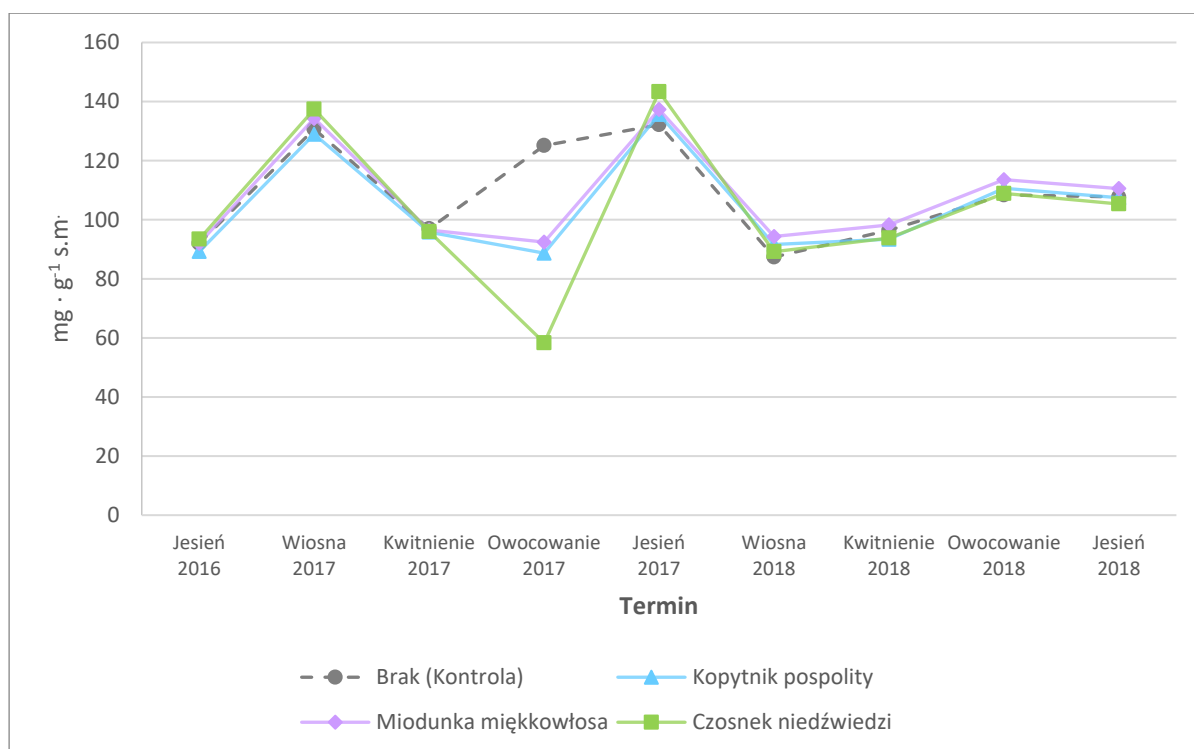
w której stwierdzono wyższą zawartość flawonoidów mierzonych tą metodą była ta, w której gatunkiem towarzyszącym była miodunka miękkowłosa (tabele 49-50).

Przeprowadzona analiza statystyczna nie pozwoliła na stwierdzenie istotnego wpływu roku czy kombinacji doświadczenia na zawartość tych związków w liściach bzu czarnego zebranych podczas owocowania. Warto jednak zwrócić uwagę, że w przeciwieństwie do dwóch poprzednich terminów zbioru liści, obie metody analizy wykazały wyższą zawartość flawonoidów w liściach w roku 2018 w porównaniu z rokiem 2017. W przypadku obu tych metod, w roku 2017 najwyższą zawartość flawonoidów charakteryzowały się liście roślin zebrane z bzu czarnego uprawianego bez gatunku towarzyszącego, natomiast w 2018 roku – w kombinacji z miodunką miękkowłosą (tabele 51-52).

Liście bzu czarnego zebrane jesienią charakteryzowały się dużą zmiennością pod względem zawartości flawonoidów. Choć na podstawie przeprowadzonych analiz nie można było stwierdzić istotnego wpływu kombinacji doświadczenia, stwierdzono natomiast istotny wpływ roku oraz interakcji roku oraz kombinacji doświadczenia. Wyniki uzyskane przy zastosowaniu obu metod analizy, zgodnie wskazały, że najwyższą zawartość flawonoidów miały liście zebrane w roku 2017 i różniły się one od pozostałych lat. Na podstawie metody 1, określono istotnie wyższą zawartość flawonoidów w roku 2016 w porównaniu do roku 2018, natomiast na podstawie metody 2, to w roku 2018 była istotnie wyższa zawartość flawonoidów w porównaniu z rokiem 2016 (tabele 53-54).



Rysunek 41 Zmiany w zawartości flawonoidów określanych metodą 1. w liściach bzu w latach 2016 - 2018



Rysunek 42 Zmiany w zawartości flawonoidów określanych metodą 2. w liściach bzu w latach 2016 - 2018

Tabela 47 Zawartość flawonoidów [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. ekwiwalent kwercetyny] w liściach bzu czarnego zebranych wiosną w latach 2017-2018 określanych metodą 1

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	7,57 c	8,47 bc	8,02 b
Kopytnik pospolity	7,86 c	9,12 ab	8,49 ab
Miodunka miękkowłosa	7,71 c	9,51 a	8,61 a
Czosnek niedźwiedzi	7,84 c	8,95 ab	8,40 ab
Średnia	7,75 b	9,01 a	

Tabela 48 Zawartość flawonoidów [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. ekwiwalent rutyny] liściach bzu czarnego zebranych wiosną w latach 2017-2018 określanych metodą 2

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	130,71 a	87,38 b	109,04 a
Kopytnik pospolity	128,93 a	91,63 b	110,28 a
Miodunka miękkowłosa	134,32 a	94,32 b	114,32 a
Czosnek niedźwiedzi	137,43 a	89,21 b	113,32 a
Średnia	132,85 a	90,64 b	

Tabela 49 Zawartość flawonoidów [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. ekwiwalent kwercetyny] w liściach bzu czarnego zebranych podczas kwitnienia w latach 2017-2018 określanych metodą 1

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	8,15 b	8,85 ab	8,50 a
Kopytnik pospolity	8,34 ab	8,74 ab	8,54 a
Miodunka miękkowłosa	7,95 b	9,42 a	8,69 a
Czosnek niedźwiedzi	8,20 b	8,29 ab	8,25 a
Średnia	8,16 b	8,83 a	

Tabela 50 Zawartość flawonoidów [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. ekwiwalent rutyny] w liściach bzu czarnego zebranych podczas kwitnienia w latach 2017-2018 określanych metodą 2

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	96,94 a	96,43 a	96,69 a
Kopytnik pospolity	95,97 a	93,39 a	94,68 a
Miodunka miękkowłosa	96,50 a	98,26 a	97,38 a
Czosnek niedźwiedzi	96,01 a	93,80 a	94,90 a
Średnia	96,35 a	95,47 a	

Tabela 51 Zawartość flawonoidów [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. ekwiwalent kwercetyny] w liściach bzu czarnego zebranych podczas owocowania w latach 2017-2018 określanych metodą 1

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	11,91 a	9,68 a	10,79 a
Kopytnik pospolity	8,95 a	9,85 a	9,40 a
Miodunka miękkowłosa	9,80 a	10,44 a	10,12 a
Czosnek niedźwiedzi	6,00 a	9,58 a	7,79 a
Średnia	9,16 a	9,89 a	

Tabela 52 Zawartość flawonoidów [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. ekwiwalent rutyny] w liściach bzu czarnego zebranych podczas owocowania w latach 2017-2018 określanych metodą 2

Gatunek towarzyszący	Rok		Średnia
	2017	2018	
Brak (Kontrola)	125,13 a	108,41 a	116,77 a
Kopytnik pospolity	88,69 a	110,62 a	99,65 a
Miodunka miękkowłosa	92,41 a	113,55 a	102,98 a
Czosnek niedźwiedzi	58,35 a	108,89 a	83,62 a
Średnia	91,15 a	110,37 a	

Tabela 53 Zawartość flawonoidów [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. ekwiwalent kwercetyny] w liściach bzu czarnego zebranych jesienią w latach 2017-2018 określanych metodą 1

Gatunek towarzyszący	Rok			Średnia
	2016	2017	2018	
Brak (Kontrola)	8,36 b	10,83 a	7,58 b	8,92 a
Kopytnik pospolity	8,21 b	11,30 a	7,67 b	9,06 a
Miodunka miękkowłosa	8,35 b	12,33 a	8,10 b	9,60 a
Czosnek niedźwiedzi	8,21 b	11,01 a	6,99 b	8,74 a
Średnia	8,28 b	11,37 a	7,59 c	

Tabela 54 Zawartość flawonoidów [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. ekwiwalent rutyny] w liściach bzu czarnego zebranych jesienią w latach 2017-2018 określanych metodą 2

Gatunek towarzyszący	Rok			Średnia
	2016	2017	2018	
Brak (Kontrola)	92,05 bc	132,16 a	107,69 bc	110,63 a
Kopytnik pospolity	89,26 c	135,65 a	107,47 bc	110,79 a
Miodunka miękkowłosa	92,28 bc	137,03 a	110,59 b	113,30 a
Czosnek niedźwiedzi	93,43 bc	143,36 a	105,34 bc	114,04 a
Średnia	91,75 c	137,05 a	107,77 b	

5.3.3. Analiza metabolomiczna liści bzu czarnego

Również w przypadku liści bzu czarnego postanowiono, jak w przypadku kwiatów i owoców, sprawdzić zmiany w profilu związków polifenolowych z wykorzystaniem analizy składowych głównych na podstawie danych z wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Przeprowadzony rozdział chromatograficzny pozwolił na określenie względnych ilości 22 związków polifenolowych.

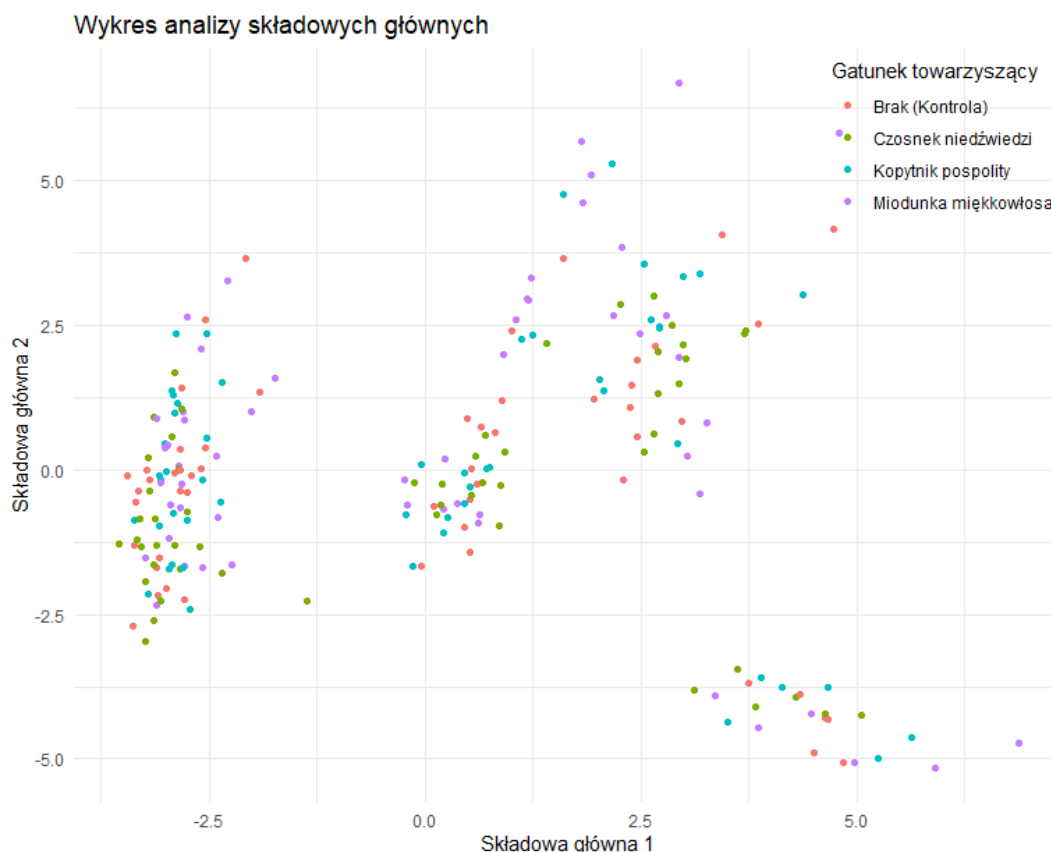
Rysunek 46 przedstawia wykres rozrzutu na podstawie analizy składowych głównych. Nie stwierdzono grupowania się punktów na podstawie kombinacji doświadczenia, a więc gatunku towarzyszącego uprawianego pod koroną drzew. Tym samym, brak podstaw do potwierdzenia tezy jakoby gatunek towarzyszący miał znaczny wpływ na profil związków polifenolowych w liściach bzu czarnego.

Dalsza analiza wykresu pozwoliła na określenie terminu zbioru jako głównego czynnika powodującego grupowanie się próbek na podstawie profilu związków polifenolowych (rysunek 47). Na tej podstawie wyodrębniono cztery grupy:

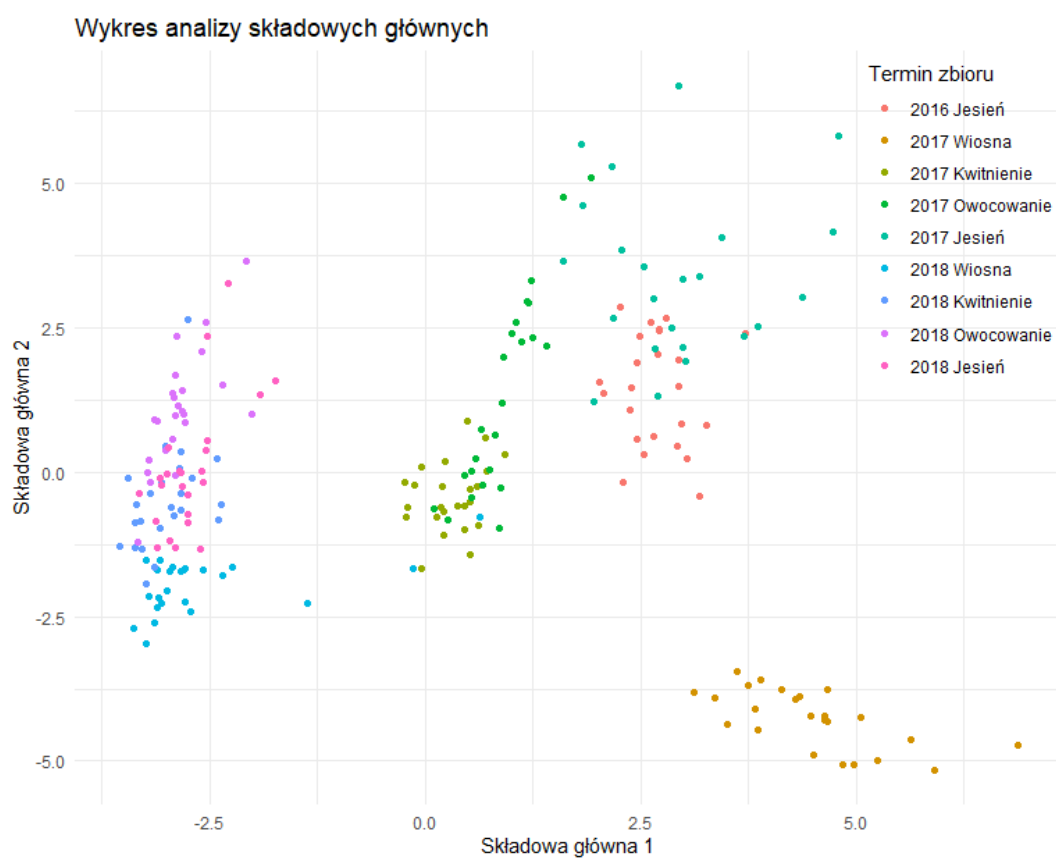
1. Liście zebrane w 2018 roku – charakteryzujące się negatywnymi wartościami składowej głównej pierwszej.
2. Liście zebrane podczas kwitnienia i owocowania w 2017 roku – zlokalizowane w okolicy środka układu, a zatem przy wartościach składowej głównej pierwszej i drugiej bliskich zeru.
3. Liście bzu zebrane jesienią 2016 i 2017 roku – charakteryzujące się dodatnimi wartościami składowej głównej pierwszej i drugiej.

4. Liście bzu zebrane wiosną 2017 roku – charakteryzujące się dodatnimi wartościami składowej głównej pierwszej oraz ujemnymi wartościami składowej głównej drugiej.

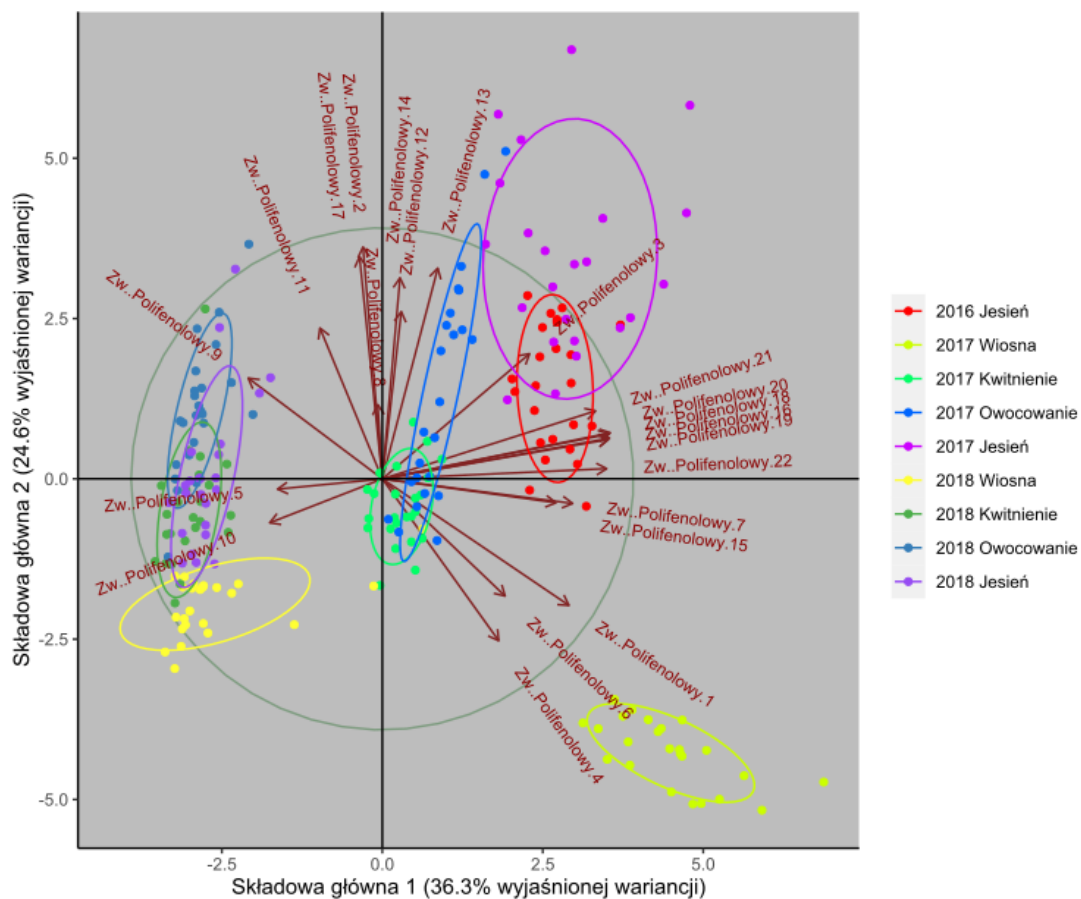
Wyodrębnione grupy różniły się profilem związków polifenolowych. Na podstawie rysunku 48 można stwierdzić, że grupa pierwsza, a więc wszystkie liście zebrane w 2018 roku miały wyższą zawartość związków polifenolowych 5,9 i 10. Grupa trzecia (liście zebrane jesienią 2016 i 2017) charakteryzowała się wyższą zawartością związku polifenolowego 3, natomiast grupa czwarta (liście zebrane wiosną 2017 roku) charakteryzowała się podwyższoną zawartością związków polifenolowych 1, 4 i 6. Dodatkowo, zarówno grupa trzecia jak i czwarta charakteryzowały się wyższą zawartością związków polifenolowych 7, 15, 16, 18-22.



Rysunek 43 Wykres rozrzutu uzyskany z analizy składowych głównych na podstawie związków stwierdzonych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej w zależności od kombinacji doświadczenia



Rysunek 44 Wykres rozrzutu uzyskany z analizy składowych głównych na podstawie związków stwierdzonych z wykorzystaniem chromatografii cieczonej w zależności od terminu zbioru liści



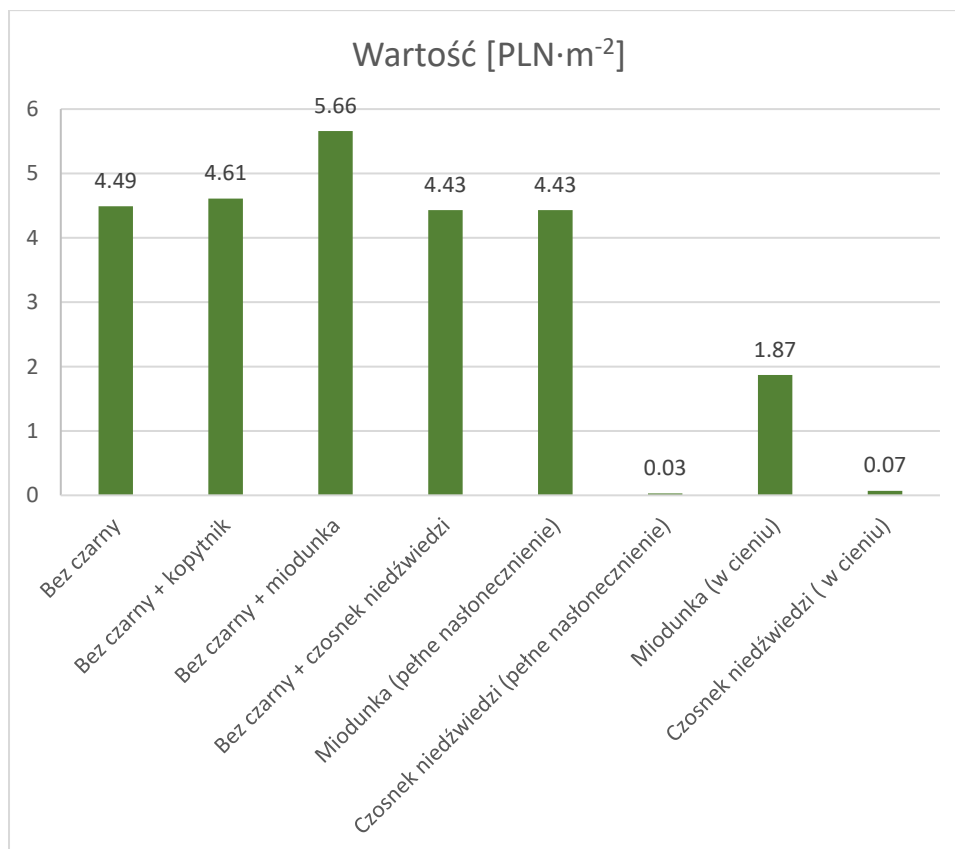
Rysunek 45 Wykres rozrzutu uzyskany z analizy składowych głównych na podstawie związków stwierdzonych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej z liści bzu czarnego. Kolory oznaczają termin zbioru liści bzu czarnego

5.4 Pozostałe wyniki

W niniejszym rozdziale opisano dodatkowo uzyskane wyniki: analizę wartości plonu w uprawie agroleśnej oraz obserwacje dotyczące konkurencji roślin miodunki miękkowłosej z chwastami.

5.4.1. Analiza wartości plonu

Dane uzyskane z niniejszych doświadczeń nie są wystarczające, aby możliwe było wykonanie wnikliwej analizy ekonomicznej opłacalności produkcji. Z najważniejszych czynników uniemożliwiających taką analizę jest przede wszystkim wielkość produkcji, która była za mała by możliwe było wnioskowanie o opłacalności uprawy wielkoobszarowej. Dodatkowo, z uwagi na niszowość takich gatunków jak miodunka, czosnek niedźwiedzi czy kopytnik pospolity, trudno jest uzyskać dużą liczbę taniego materiału rozmnożeniowego czy choćby oszacować koszt takiej produkcji. Niewątpliwie, dodatkowy koszt związany z zakupem lub wyprodukowaniem sadzonek czy rozsady roślin podszytu, zwiększałby początkowe koszty produkcji. Z drugiej strony, do korzyści z takiej uprawy należy wliczyć wcześniejszy plon, gdyż zwłaszcza w przypadku miodunki miękkowłosej już w drugim roku uzyskano wysoki plon surowca. Dodatkowo, zaobserwowano również znacznie niższą liczbę chwastów obecnych w uprawie współrzędnej miodunki i bzu czarnego, co niewątpliwie wpłynęłoby na zmniejszenie kosztów siły roboczej, potrzebnej do ręcznego usuwania ich. Analizując jednak jedynie wartość plonu uzyskanego z takich upraw na podstawie cen surowców zielarskich oferowanych w skupach, można zaobserwować że uprawa taka może być opłacalna, gdyż wartość produkcji uzyskanej z uprawy współrzędnej bzu czarnego wraz z miodunką miękkowłosą wyniosła $5,66 \text{ zł} \cdot \text{m}^{-2}$ w porównaniu do $4,49 \text{ zł} \cdot \text{m}^{-2}$ dla uprawy bzu czarnego w monokulturze i to pomimo znacznie wyższego plonu samego bzu czarnego w monokulturze w porównaniu z uprawą współrzędną (rysunek 49). W analizie tej wykorzystano jedynie dane dostępne ze skupów roślin zielarskich dostępnych w 2024 roku, kiedy to cena suchego ziela miodunki, suchych liści czosnku niedźwiedziego oraz suchych i otartych kwiatów bzu czarnego wyniosła $25 \text{ zł} \cdot \text{kg}^{-1}$ natomiast dla świeżych owoców bzu czarnego $2,50 \text{ zł} \cdot \text{kg}^{-1}$ (na podstawie rozmów telefonicznych).



Rysunek 46 Wartość plonu uzyskanego z upraw jednogatunkowych bzu czarnego, miodunki miękkowłosej i czosnku niedźwiedziego oraz upraw współrzędnych

5.4.2. Wpływ uprawy miodunki miękkowłosej na chwasty

W uprawie współrzędnej bzu czarnego z miodunką miękkowłosą zaobserwowano znaczne zahamowanie wzrostu chwastów. Efekt ten był zapewne połączeniem znacznego zacienienia gleby (wpierw przez kwitnące ziele, a następnie przez rozety liści wegetatywnych), konkurencji o wodę i składniki pokarmowe oraz allelopatii. Na rysunku 50 przedstawiono jak dobrze miodunka miękkowłosa jest w stanie zacienić glebę na wiosnę. Na zdjęciu tym widoczne jest niemal całkowite pokrycie poletka roślinami miodunki, podczas gdy pozostałe poletka mają niemal w pełni odsłoniętą glebę.

Widok wegetatywnych rozet liściowych miodunki miękkowłosej zaprezentowano na rysunku 51, natomiast na rysunku 52 pokazano jak właściwości hamujące wzrost i kiełkowanie chwastów przez miodunkę miękkowłosą zanikają wraz z odległością od granicy poletka.



Rysunek 47. Zacienienie gleby przez kwitnącą zielę miodunkę miękkowłosą
Warszawa, 16 kwietnia 2018 r. Źródło: Fot. własna



Rysunek 48. Zacienienie gleby przez rozety liści wegetatywnych miodunki
miękkowłosej Warszawa, 2 października 2018. Źródło: Fot. własna



Rysunek 49. Zbliżenie na prawdopodobną strefę oddziaływania allelopatycznego
miodunki miękkowłosej Źródło: Fot. własna

6. Dyskusja wyników

Celem niniejszej pracy było określenie możliwości prowadzenia uprawy w systemie agroleśnym z wykorzystaniem cieniolumbnych gatunków roślin leczniczych jako podszytu. Rośliny te, przystosowane do wzrostu w cieniu drzew, wydają się być naturalnym wyborem przy rozważaniu uprawy agroleśnej. Dodatkowo, w tego typu uprawach, z uwagi na występowanie dwóch warstw roślin, następuje większe zacienienie gleby co wpływa hamująco na rozwój chwastów i w konsekwencji, zmniejsza zapotrzebowanie na chemiczną bądź mechaniczną walkę z nimi. Choć agroleśnictwo, zwłaszcza w ostatnich latach, jest przedmiotem wielu publikacji naukowych, to jednak literatura w zakresie wykorzystania w nich roślin cieniolumbnych bądź też roślin leczniczych jest dość uboga. Z tego powodu uzyskane w niniejszej pracy wyniki często można porównać jedynie z rezultatami z innych upraw agroleśnych oraz z publikacjami dotyczącymi plonowania i jakości roślin leczniczych w warunkach zacienienia.

Ważnym aspektem niniejszej pracy było sprawdzenie czy uprawa roślin cieniolumbnych pod koroną drzew może mieć wpływ na jakość chemiczną surowca leczniczego (kwiatów i owoców) bzu czarnego. Jest to o tyle ważne, że grupą która najszybciej mogłaby wprowadzić tego typu uprawę są sadownicy już uprawiający bez czarny i ewentualna zmiana jakości surowca leczniczego, choć mało prawdopodobna, mogłaby spowodować znaczną utratę wartości plonu. Analiza dotycząca zawartości związków polifenolowych w kwiatach bzu czarnego wykazała znaczną różnorodność oraz zmienność tych związków w surowcu pochodzącym z różnych lat uprawy i różnych drzew. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic w zależności od gatunku roślin uprawianych pod koroną drzew bzu czarnego. Dzięki zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem PDA, bez użycia wzorców, udało się stwierdzić obecność 20 związków polifenolowych w kwiatach bzu czarnego. Z całą pewnością nie obejmuje to całego spektrum tych związków. Uzlasir i in. (2021) stwierdzili 16 związków fenolowych w wodnych, metanolowych i etanolowych ekstraktach z kwiatów bzu czarnego. Inne badania, takie jak te prowadzone przez Vujanović i in. (2019), ujawniły jeszcze większą liczbę związków — 23, podczas gdy Mikulic-Petkovsek i in. (2015b) zidentyfikowali aż 33 związki polifenolowe, choć 5 z nich zostało zidentyfikowanych podwójnie, co sugeruje, że mogą to być izomery, różniące się czasem retencji. Mimo zauważalnych różnic w zawartości polifenoli między surowcem pozyskanym z różnych

drzew, analiza chemometryczna nie wykazała znaczących różnic w profilach polifenolowych w zależności od gatunku roślin uprawianych pod drzewami bzu. Sugeruje to, że mikroklimat pod koroną drzew bzu czarnego ma minimalny lub nieistotny wpływ na zawartość polifenoli w ich kwiatach bzu czarnego. Literatura dotycząca wpływu zabiegów agrotechnicznych na jakość kwiatów bzu czarnego jest dość uboga. Większość publikacji koncentruje się na zabiegach pozbiornych i metodach ekstrakcji. Papagrighiou i in. (2023) zauważyli, że genotyp ma znacznie większy wpływ niż nawożenie na całkowitą zawartość flawonoidów w owocach. Tym bardziej tłumaczy to brak wpływu sprawdzanych kombinacji doświadczenia, na jakość surowca uzyskanego z bzu czarnego, gdzie wszystkie rośliny były jednolite genetycznie.

Analiza profili polifenolowych kwiatów bzu czarnego wykazała różnice między rokiem 2017 a 2018. Kwiaty zebrane w 2018 roku charakteryzowały się generalnie niższą zawartością większości związków polifenolowych w porównaniu do 2017 roku, co może sugerować wpływ specyficznych warunków środowiskowych lub agronomicznych w danym roku. Wyjątkiem był związek polifenolowy oznaczony jako 11, który nie wykazywał istotnej zmienności między latami. Brak korelacji tego związku z innymi może wskazywać, że jego zawartość jest mniej podatna na zmiany warunków uprawy lub środowiskowych, co czyni go potencjalnie bardziej stabilnym markerem jakości surowca. Drapeau i Charlebois (2012) również zauważyli, że genotyp, rok uprawy i lokalizacja mają znaczny wpływ na zawartość antocyjanów w owocach bzu czarnego, co podkreśla znaczenie zmian temperatury, nasłonecznienia i innych warunków atmosferycznych na jakość owoców.

Podobnie jak w przypadku kwiatów bzu, w ocenie chemicznej owoców nie stwierdzono znaczącego wpływu gatunku roślin uprawianych pod koroną drzew na ich skład chemiczny. Zauważono natomiast różnice w profilu polifenolowym owoców między rokiem 2017 a 2018, choć efekt ten nie był tak wyraźny jak w przypadku kwiatów. W owocach określono 12 związków fenolowych. Podobnie jak w kwiatach, w owocach również występuje znaczna rozbieżność w liczbie wykrytych związków fenolowych. Domínguez i in. (2020) zidentyfikowali 13 związków polifenolowych w owocach bzu, podczas gdy Mikulic-Petkovsek i in. (2015a), analizując różne gatunki i mieszańce międzygatunkowe, stwierdzili łącznie 54 związki polifenolowe, z czego 22 w bzie czarnym.

Zawartość fruktozy i glukozy w owocach była znacznie wyższa niż sacharozy, co jest zgodne z danymi uzyskanymi przez innych autorów (Veberic i in., 2009). Te dwa cukry proste były ze sobą również bardzo silnie skorelowane. Wykazywały także silną korelację ze związkami polifenolowymi oznaczonymi jako 1 i 3, które na podstawie widma zostały zidentyfikowane jako antocyjany. Jest to zgodne z wynikami badań na owocach winogron, gdzie wyższa zawartość cukrów pozytywnie koreluje z zawartością i kumulowaniem się związków antocyjanowych (Zheng i in., 2009).

Uprawa gatunków towarzyszących pod koroną bzu czarnego istotnie wpłynęła na plon uzyskanego z niego surowców. Statystycznie istotnie niższy plon stwierdzono dla kwiatów (świeżych i suchych) uprawianych z miodunką miękkowłosą. Również w przypadku owoców plon był liczbowo niższy dla tej kombinacji doświadczenia co sugeruje negatywny wpływ. W tym przypadku jednak, znaczna wariancja w wynikach sprawiła, że nie można stwierdzić statystycznej istotności tych różnic.

Plonowanie świeżych kwiatów bzu czarnego ulegało zmianom w zależności od gatunków towarzyszących. Najwyższe plony uzyskano, gdy pod koronami drzew uprawiano kopytnik pospolity, choć plon ten różnił się statystycznie istotnie jedynie w stosunku do kombinacji, w której uprawiano miodunkę miękkowłosą. Rok doświadczenia miał istotny wpływ na plon świeżych kwiatów, który był wyższy w 2018 roku niż w 2017, co związane jest z wiekiem roślin. Podobnie jak w przypadku świeżych kwiatów, zaobserwowano istotne różnice w plonie suchych kwiatów bzu czarnego w zależności od gatunku towarzyszącego. W tym przypadku również jedyna istotna różnica była stwierdzona pomiędzy roślinami bzu uprawianymi wraz z kopytnikiem pospolitym a tymi uprawianymi z miodunką miękkowłosą. Uzyskane w tej pracy wyniki wskazują, że również plon suchych kwiatów był wyższy w roku 2018 w porównaniu z rokiem 2017, potwierdzając obserwacje dotyczące plonów świeżych kwiatów. Pomimo tego, zauważyć można pewien trend, w którym plon kwiatów bzu czarnego był liczbowo niższy dla kombinacji, w której gatunkiem towarzyszącym była miodunka miękkowłosa. Plon ten (zarówno świeżych jak i suchych kwiatów) był średnio niższy o 33% biorąc pod uwagę oba lata doświadczenia. Analizując tę różnicę oddzielnie dla roku 2017 i 2018 zaobserwować można, że plon był odpowiednio niższy o 36% i 32%.

Obserwacje te nie dziwią, zwłaszcza, że plon miodunki miękkowłosej był znacznie wyższy niż czosnku niedźwiedziego, natomiast kopytnik pospolity nie rósł

w ogóle. Wskazuje to na prawdopodobną konkurencję o wodę i składniki pokarmowe pomiędzy bzem czarnym, a miodunką miękkowłosą. Efekt ten, wpływający obniżająco na plon kwiatów bzu czarnego mógł się dodatkowo nałożyć z oddziaływaniem allelopatycznym kopytnika pospolitego. Choć rośliny kopytnika, nie rozwijały się zbyt dobrze i nie wykazywały wzrostu wegetatywnego, to sama ich obecność mogła doprowadzić do zmniejszenia liczby obecnych chwastów, co tłumaczyłoby liczbowo wyższy plon w stosunku do kombinacji kontrolnej, gdzie stosowany był ugor herbicydowy. Należy przy tym przypuszczać, że wpływ allelozwiązków wydzielanych przez kopytnika pospolitego miał wpływ jedynie na kiełkujące chwasty i nie oddziaływał negatywnie na wieloletnie rośliny takie jak bez czarny. Choć niewiele jest badań na temat allelopatii kopytnika pospolitego, Marian i in. (2011) wykazali, że gatunek ten ma potencjał do hamowania kiełkowania nasion roślin dwuliściennych bardziej niż roślin jednoliściennych i ma również negatywny wpływ na wzrost siewek.

W przeciwieństwie do kwiatów bzu czarnego, w przypadku plonu owoców nie wykazano statystycznie istotnego wpływu gatunku towarzyszącego na plon świeżych i suchych owoców bzu czarnego, masę 1000 owoców czy procentowy udział suchej masy. Stwierdzono natomiast statystycznie istotny wpływ roku uprawy na plon świeżych i suchych owoców bzu czarnego oraz na masę 1000 suchych owoców. Plonowanie świeżych owoców bzu czarnego było ponad trzykrotnie wyższe w roku 2018 w porównaniu z rokiem 2017. Wzrost ten wyniósł odpowiednio 345% i 333% dla plonu owoców świeżych i suchych. Silny wzrost produktywności bzu czarnego pomiędzy latami jest normalnym procesem, tym bardziej, że korona drzew została wyprowadzona dopiero w 2016 roku. W 2018 roku rośliny były zatem w drugim roku owocowania, a bez czarny uzyskuje pełnię owocowania (przynajmniej w tradycyjnej produkcji) w trzecim lub czwartym roku (Schmitzer i in., 2012). Podobnie jak w przypadku plonu kwiatów, również w przypadku owoców bzu czarnego, stwierdzono najniższe ich plony dla kombinacji, w której bez czarny uprawiany był wraz z miodunką miękkowłosą. Plon ten był o 25% niższy w stosunku do kombinacji kontrolnej dla owoców świeżych oraz o 26% niższy w przypadku owoców suszonych. Dodatkowo, nie zaobserwowano korzystnego wpływu kopytnika pospolitego na plon owoców bzu i plon ten był niemal identyczny dla tej kombinacji w stosunku do kontroli. Nie zaobserwowano również istotnego wpływu zarówno na masę 1000 świeżych i suchych owoców jak również na procentowy udział suchej masy.

Choć bez czarny jest czasem polecany do systemów agroleśnych, brakuje danych dotyczących wpływu gatunków podszytowych na uzyskane z niego plony surowców (Nerlich i in., 2013). Na podstawie wyników doświadczeń upraw agroleśnych innych gatunków można wnioskować, że pomniejszenie ich plonu często wynika z konkurencji o wodę i składniki pokarmowe. W doświadczeniu Zuazo i in. (2008), w którym uprawiano migdały (*Prunus dulcis* [Miller] D.A. Webb) wraz z takimi roślinami leczniczymi jak szałwia, rozmaryn oraz tymianek stwierdzono redukcję plonu migdałów w porównaniu z konwencjonalną metodą uprawy. Ta obniżka plonu była zależna od gatunku uprawianego w podszytcie drzewa i wyniosła od 16% dla tymianku, przez 29% dla rozmarynu, do 47% dla szaławii. Choć w każdym z tych przypadków spadek plonu migdałów był znaczący, to w konsekwencji zysk z hektara był o 59% wyższy dla uprawy migdałów wraz z tymiankiem i o 32% wyższy dla uprawy migdałów wraz z rozmarynem w stosunku do konwencjonalnej uprawy, z uwagi na drugi plon z tej samej powierzchni. Z kolei badania innych autorów nie wskazują na istotny wpływ uprawy tymianku na plon migdałów, a w przypadku uprawy granatu (*Punica granatum* L.) zauważono nawet wzrost plonu handlowego spowodowany zmniejszeniem pęknięcia owoców, co z kolei najprawdopodobniej było powodowane wyższą wilgotnością powietrza w uprawie wielogatunkowej (Elmasry i Abdelkader, 2019; Sánchez-Navarro i in., 2022; Almagro i in., 2023; Marotti i in., 2023). Wyniki tych autorów są zbieżne z wynikami uzyskanymi w ramach niniejszej pracy, gdzie plon uzyskany z uprawy agroleśnej bzu czarnego z miodunką miękkowłosą charakteryzował się najwyższą wartością uzyskanego plonu z powierzchni. Niewątpliwą zaletą jednak, jest również dywersyfikacja produkcji co znacznie zmniejsza ryzyko uzyskania bardzo niskiej ceny za pozyskane surowce z kilku gatunków roślin w tym samym roku uprawy. Ponadto, z uwagi na różny czas zbioru ziela miodunki, kwiatów bzu czarnego i owoców bzu czarnego poprawieniu może ulec również płynność finansowa gospodarstwa, ponieważ nie musi ono polegać jedynie na wpływie w jednym okresie w roku (Zuazo i in., 2008; T. Yang i in., 2019). Warto przy tym również zaznaczyć, że z tych samych roślin możliwy jest zbiór zarówno kwiatów jak i owoców. Jak wykazały badania McGowan (2017) zbiór do 39% kwiatów nie obniżał plonu owoców bzu z rośliny, choć wbrew przypuszczeniu autorów, nie wpływał również pozytywnie na wielkość pojedynczych owoców.

Zarówno w przypadku czosnku niedźwiedziego jak i miodunki miękkowłosej uprawa w systemie agroleśnym z bzem czarnym nie stanowiła optymalnych warunków

wzrostu tych roślin. Czosnek niedźwiedzi rósł znacznie lepiej pod siatką cieniującą, natomiast miodunka miękkowłosa wykazywała najwyższy plon w pełnym nasłonecznieniu.

Analizując plon surowców z gatunków podszytu można zaobserwować, że przynajmniej liczbowo, plon ten był najniższy w uprawie współrzędnej zarówno dla czosnku niedźwiedziego jak i miodunki miękkowłosej, w porównaniu z uprawą w pełnym nasłonecznieniu i uprawą pod siatką cieniującą. Sugeruje to, że konkurencja o wodę i składniki pokarmowe miała znaczący wpływ na obniżenie plonu, ponieważ zacienienie w uprawie współrzędnej było niższe niż pod siatką cieniującą natomiast zdecydowanie wyższe, niż w uprawie w pełnym nasłonecznieniu. Rośliny kopytnika pospolitego całkowicie wypadły z uprawy na poletkach z pełnym nasłonecznieniem i miały niemal całkowicie zahamowany wzrost w uprawie współrzędnej. Jedynie w uprawie pod siatką cieniującą, rośliny tego gatunku rosły w zadowalającym tempie. Z uwagi na obecność roślin kopytnika pospolitego w uprawie współrzędnej, zarówno plonowanie jak i skład chemiczny surowca uzyskanego z bzu czarnego był analizowany z uwzględnieniem tej kombinacji. Gatunek ten nie był jednak analizowany pod względem plonowania i składu chemicznego, ponieważ surowcem w tym przypadku jest kłącze, a jego zbiór, biorąc pod uwagę słaby stan roślin, doprowadziłby do całkowitego zniszczenia poletek. Należy przypuszczać, że stopień zacienienia, jaki był wytworzony przez młode drzewka bzu czarnego był niewystarczający. O ile rośliny tego gatunku rosły w zadowalającym tempie w warunkach 75% zacienienia, to zgodnie z literaturą radzą sobie najlepiej w warunkach 90% zacienienia (Kovalenko i in., 2017).

Czosnek niedźwiedzi uprawiany pod siatką zacieniającą charakteryzował się ponad trzykrotnie wyższym plonem w porównaniu z uprawą współrzędną lub w pełnym nasłonecznieniu, co prawdopodobnie w dużym stopniu wiązało się nie tylko z lepszymi warunkami świetlnymi, ale również ze znacznie wyższą wilgotnością gleby. Siatka cieniująca, tradycyjnie używana w rolnictwie i ogrodnictwie do ograniczania ilości światła słonecznego, może również służyć do zbierania mgły. Kiedy mgła przechodzi przez drobną strukturę siatki, jej cząsteczki osadzają się na powierzchni, kondensując się w krople wody. Te krople stopniowo łączą się w większe strugi, które spływają na dół siatki i wsiąkają w glebę. Takie metody zbierania mgły wykorzystywane są do efektywnego pozyskiwania wody w regionach, gdzie mgła jest powszechna, ale dostęp do innych źródeł wody jest ograniczony jak wysoko położone tereny pustynne.

Choć współcześnie siatki tworzone do zbierania mgły są wykonane nieco inaczej to jednak historycznie do tego celu wykorzystywane były również siatki cieniujące używane w rolnictwie (Ghosh i Ganguly, 2018). Lepsze warunki wodne tym bardziej tłumaczą bardzo dużą różnicę w plonie czosnku niedźwiedziego, ponieważ zarówno w roku 2018 jak również w 2019 kwiecień był miesiącem bardzo suchym, w którym suma opadów wyniosła jedynie 2-3 mm. Jest to tym bardziej istotne, że najważniejsze fazy wzrostu czosnku niedźwiedziego przypadają właśnie na kwiecień i brak wody w tym terminie wpływa nie tylko na przeżywalność nowych siewek, ale również na słabsze tworzenie cebul oraz na słabe kwitnienie i późniejsze zawiązywanie nasion (Oborny i in., 2011). Niskie wartości opadów w kwietniu 2018 roku miały również wysoce negatywny wpływ na plonowanie roślin czosnku niedźwiedziego w 2019 roku, które w porównaniu z rokiem 2018 spadło o 60% dla liści świeżych i 43% dla liści suszonych.

Miodunka miękkowłosa również charakteryzowała się najniższym plonem, gdy uprawiana była współrzędnie z bzem czarnym. Średnio pomiędzy latami 2018 i 2019 plon świeżego ziela z uprawy współrzędnej był około dwukrotnie niższy w porównaniu z uprawą w pełnym nasłonecznieniu lub pod siatką cieniującą. Choć nie ma podstaw do stwierdzenia statystycznie istotnych różnic, to plon świeżego ziela liczbowo był najwyższy dla kombinacji, w której miodunka uprawiana była pod siatką cieniującą. Podobnie, plon suchego ziela miodunki miękkowłosej dla uprawy współrzędnej był najniższy, choć w tym przypadku, to plon z uprawy w pełnym nasłonecznieniu był najwyższy. Tak samo jak w przypadku plonu świeżego ziela, różnice między powtórzeniami były na tyle duże, że nie pozwoliły na stwierdzenie statystycznie istotnych różnic. Zamianę w kombinacji, dla której uzyskano najwyższy plon w różnych latach doświadczeń, pomiędzy miodunką uprawianą pod siatką cieniującą, a miodunką uprawianą w pełnym nasłonecznieniu tłumaczą znaczne różnice w procentowym udziale suchej masy, który dla miodunki uprawianej pod siatką cieniującą wyniósł tylko 8,5%. Wynik ten istotnie odbiegał od zawartości suchej masy w świeżym ziele miodunki miękkowłosej uprawianej współrzędnie lub w pełnym nasłonecznieniu. Największe różnice pomiędzy latami stwierdzono zarówno dla świeżego jak i suchego ziela miodunki miękkowłosej uprawianej pod siatką cieniującą, który był odpowiednio ponad dwa i pół oraz ponad cztery razy wyższy w 2019 roku w porównaniu z rokiem 2018. Dla porównania, plon świeżego ziela był dużo bardziej stabilny w uprawie współrzędnej i w pełnym nasłonecznieniu i różnica pomiędzy latami wyniosła jedynie 1-2%. Z uwagi

na różnice w procentowej zawartości suchej masy, plon suchego ziela nie był już tak stabilny pomiędzy latami i różnice wyniosły odpowiednio 31% i 35%. Badania dotyczące miodunki plamistej (*Pulmonaria officinalis*) przez Szöke (1988) wykazały znaczne zmiany w budowie oraz ultrastrukturze chloroplastów, zależnie od pory roku i intensywności światła. Wiosenne liście wystawione na pełne światło słoneczne rozwijały chloroplasty typu słonecznego, charakteryzujące się niewielkimi granami, rzadkim systemem błon oraz wyraźną akumulacją skrobi i lipidów. W miarę zmniejszania się intensywności światła, chloroplasty przekształcały się w formę ceniolubną, z mniejszą liczbą, lecz szerszymi granami i gęstszym układem błon. Letnie liście w odmienny sposób dostosowywały się do wysokich i średnich natężeń światła, rozwijając duże globule plazmatyczne, zmieniając konfigurację gran i tylakoidów wraz z obniżaniem intensywności światła. Liście letnie, wykazujące tolerancję na cień, posiadały szersze grana o zwiększonej liczbie tylakoidów w porównaniu do liści wiosennych, co było podyktowane ich morfologiczną adaptacją do niskiego poziomu światła. Ultrastruktura chloroplastów wyraźnie zmienia się w zależności od natężenia światła, prezentując zwiększoną objętość chloroplastów, zagęszczone systemy tylakoidowe oraz szersze grana w warunkach cienistych, co umożliwia efektywniejszą fotosyntezę. Wyższa intensywność światła sprzyja wzmożonemu procesowi fotosyntezy, skutkując bujnym wzrostem i zwiększoną zawartością suchej masy, podnosząc wskaźnik fotosyntezy do określonego progu, co prowadzi do wyższej produkcji biomasy. Miodunka plamista rośnie w bardzo zbliżonych warunkach co miodunka miękkowłosa i choć brakuje dokładnych badań przeprowadzonych na miodunce miękkowłosej, to na podstawie bliskiego pokrewieństwa między tymi roślinami można wnioskować, że wyższa akumulacja suchej masy w roślinach uprawianych w pełnym nasłonecznieniu oraz w sposób średni, jest właśnie spowodowana wyższą wydajnością fotosyntezy (Szöke, 1988; Chauhan i in., 2022).

Odległość od pnia bzu czarnego znacząco wpływała na świeżą masę (ŚM) roślin miodunki. Choć minimalna odległość do najbliższego drzewa nie była dobrym wskaźnikiem wzrostu ($R^2 = 0,07$), to średnia odległość do wszystkich czterech roślin bzu w obrębie poletka wyjaśniała 54% wariacji masy miodunki. Uzyskana na podstawie badań funkcja sigmoidalna pozwalała na przewidzenie wartości masy w zależności od średniej odległości do wszystkich drzew w obrębie poletka. Analiza wykazała, że miodunka wykazuje zahamowanie wzrostu do ok. 2 m średniej odległości

do wszystkich drzew bzu w obrębie poletka, po czym świeża masa rośliny rośnie nawet o 66%. Taki wpływ konkurencji pomiędzy roślinami w systemach agroleśnych był już obserwowany przez innych autorów. W systemie agroleśnym złożonym z drzew jujube i pszenicy, plon pszenicy znacznie różnił się w zależności od odległości od drzew. Pszenica posadzona najbliżej linii drzew (90 cm) charakteryzowała się najniższym plonem ziarna, głównie z powodu mniejszej liczby kłosów, liczby ziaren w kłosie oraz masy tysiąca ziaren. Wraz ze zwiększaniem się odległości od drzew do 110 cm i 130 cm, plony pszenicy rosły. Najwyższy plon uzyskano jednak w przypadku pszenicy uprawianej w monokulturze, niezależnej od konkurencji ze strony drzew. Pomimo tych spadków plonów w pobliżu drzew, ogólny system upraw mieszanych okazał się korzystny, osiągając wyższą efektywność użytkowania ziemi niż monokultura (T. Yang i in., 2019). W innych europejskich systemach rolno-leśnych również wykazano, że plony upraw maleją wraz ze zmniejszającą się odległością od linii drzew, szczególnie w systemach alejowych (ang. *alley cropping*). Tradycyjne systemy Dehesa w Europie Południowej, charakteryzujące się niższą gęstością drzew, nie wykazały jednak negatywnego wpływu na plony, prawdopodobnie ze względu na korzystne interakcje między drzewami, a uprawami (Ivezić i in., 2021).

Miodunka miękkowłosa okazała się najlepszym z testowanych gatunków do uprawy agroleśnej z bzem czarnym. Wegetatywne pędy miodunki miękkowłosej szybko wyrastają wczesną wiosną, gdy drzewa nie mają jeszcze liści. Jest to przystosowanie do wzrostu w lasach liściastych, gdzie bardzo ograniczone jest światło słoneczne w ciągu roku. Rośliny te są w stanie zakwitnąć i w dużej mierze zawiązać nasiona jeszcze przed warunkami wysokiego zacielenia w lesie. W późniejszym okresie, rośliny te przechodzą we wzrost wegetatywny i wytwarzają duże rozety liściowe mogące pozyskiwać energię słoneczną nawet w warunkach dużego zacielenia (Gaberščik i in., 2001). Choć brak doniesień o właściwościach allelopatycznych miodunki miękkowłosej to aktywność ta została określona dla blisko spokrewnionego gatunku – miodunki pstrej (*Pulmonaria saccharata* Mill.) czasami uznawanego za podgatunek miodunki plamistej. Dla tego gatunku stwierdzono działanie allelopatyczne związków fenolowych wymywanych z liści przez deszcz. Związki te stymulowały kiełkowanie chwastów, natomiast później znacznie ograniczały wzrost siewek wpływając na ich obumarcie i w efekcie, długotrwale zmniejszając presję chwastów (Chernyaeva i Viktorov, 2022).

Tłumaczy to, czemu na poletkach z bzem czarnym i miodunką miękkowłosą niemal nie występowały chwasty.

Analiza laboratoryjna pozyskanych surowców wykazała, że warunki uprawy mają istotny wpływ na zawartość różnych związków chemicznych w liściach czosnku niedźwiedziego, w tym chlorofilu, karotenoidów, flawonoidów i polifenoli. Zawartość chlorofilu **a** w liściach była pozytywnie skorelowana z intensywnością światła słonecznego. Rośliny uprawiane w pełnym nasłonecznieniu oraz współrzędnie z bzem czarnym posiadały wyższe ilości chlorofilu **a** w porównaniu do roślin uprawianych pod siatką cieniującą. Nie stwierdzono znaczących różnic w zawartości chlorofilu **a** pomiędzy latami prowadzenia doświadczeń, z wyjątkiem niższych wartości w 2018 roku dla roślin uprawianych pod siatką cieniującą. Chlorofil **b** wykazywał odwrotną zależność względem intensywności światła, z wyższymi wartościami w warunkach ograniczonego światła, takich jak pod siatką cieniującą. Najwyższe ilości chlorofilu **b** stwierdzono w roślinach uprawianych pod siatką cieniującą, podczas gdy najniższe w pełnym nasłonecznieniu. Ponadto, zawartość chlorofilu **b** była wyższa w 2018 roku w porównaniu do 2019 roku. Uzyskane wyniki dotyczące zawartości chlorofilu **b** są w zgodzie z badaniami Huang i in. (2016), którzy wykazali znacznie wyższą zawartość chlorofilu **b** w roślinach uprawianych w cieniu w stosunku do kontroli. Autorzy ci zaobserwowali jednak również wzrost, choć minimalny, również zawartości chlorofilu **a**. Jest to jednak w zgodzie z badaniami Lichtenthaler i in. (2007), którzy zaobserwowali znaczne zmniejszenie stosunku zawartości chlorofilu **a** do chlorofilu **b** oraz zwiększenie ogólnej zawartości chlorofilu w liściach zacienionych w stosunku do liści wystawionych na pełne słońce.

Podobne zmiany zaobserwowano w przypadku karotenoidów. Najwyższą zawartość tych związków stwierdzono w roślinach uprawianych pod siatką cieniującą, a zawartość tych związków była również wyższa w 2018 roku w porównaniu do 2019 roku. Trendy te były zbliżone do obserwacji dotyczących chlorofilu **b**, co sugeruje, że ograniczone światło sprzyja wyższej zawartości zarówno chlorofilu **b**, jak i karotenoidów. Lichtenthaler i in. (2007) również zaobserwowali znaczne zwiększenie ilości karotenoidów w liściach zacienionych. Pomimo tego, rośliny zacienione wykazywały się wyższym stosunkiem chlorofilu do karotenoidów, co nie dziwi biorąc pod uwagę, że autorzy ci stwierdzili większy wzrost chlorofilu **a** + **b** niż karotenoidów ogółem.

Badania dotyczące ilości flawonoidów wykazały znaczną zmienność wyników w zależności od metody pomiaru oraz roku badań. Przy wykorzystaniu metody 1, w 2018 roku określono istotnie wyższą zawartość flawonoidów w porównaniu do 2019 roku. Rośliny uprawiane współrzędnie z bzem czarnym w 2018 roku miały najniższą zawartość flawonoidów, natomiast w 2019 roku odznaczały się najwyższą zawartością, co wskazuje na znaczną zmienność i interakcję pomiędzy rokiem badań a warunkami uprawy. Natomiast gdy zastosowano metodę 2 nie stwierdzono istotnych różnic w zależności od warunków uprawy, choć zaobserwowano liczbowo wyższą zawartość flawonoidów w roślinach uprawianych pod siatką cieniującą w obu latach. Song i in. (2012) stwierdzili wyższą zawartość katechin (co do których metoda 2 jest bardziej selektywna) w liściach herbaty uprawianej w warunkach wyższego zacienienia w stosunku do kontroli, choć nie zawsze możliwa była do ustalenia jednoznaczna korelacja. W tych samych badaniach autorzy wykazali, że choć umiarkowane zacienienie powodowało wzrost zawartości katechin, to nadmierne zacienienie było pozbawione tego efektu. Być może tłumaczy to również znaczne różnice w zawartości flawonoidów pomiędzy latami doświadczenia, gdzie zacienienie w roku 2019 było wyższe niż w roku 2018.

Analiza dotycząca zawartości związków polifenolowych wykazała, że warunki uprawy mają znaczący wpływ na ich ilość w surowcach. Rośliny uprawiane w pełnym nasłonecznieniu oraz współrzędnie z bzem czarnym posiadały wyższą zawartość polifenoli niż te uprawiane pod siatką cieniującą. W 2018 roku różnica ta była bardziej wyraźna, podczas gdy w 2019 roku istotna różnica występowała tylko pomiędzy roślinami uprawianymi współrzędnie a pod siatką cieniującą. Rośliny uprawiane w pełnym nasłonecznieniu nie różniły się istotnie od pozostałych kombinacji. Te wyniki są w zgodzie z badaniami przeprowadzonymi na czterech populacjach czosnku niedźwiedziego w Chorwacji, gdzie autorzy stwierdzili wyższą zawartość polifenoli ogółem na stanowiskach z wyższą liczbą dni słonecznych (Voća i in., 2022).

Badania dotyczące miodunki miękkowłosej wykazały istotny wpływ warunków jej uprawy, roku doświadczenia oraz interakcji tych czynników na zawartość chlorofilu, karotenoidów, flawonoidów i polifenoli w ziele tej rośliny. Analiza chemiczna dotycząca zawartości chlorofilu **a** i **b** wykazała, że najwyższą zawartością chlorofilu **a** charakteryzują się rośliny uprawiane pod siatką cieniującą. Była ona znacznie wyższe niż w roślinach uprawianych współrzędnie z bzem czarnym lub w pełnym nasłonecznieniu. Dodatkowo, rośliny zebrane w 2018 roku miały więcej chlorofilu **a** w porównaniu do tych

z 2019 roku. W przypadku chlorofilu **b**, również rośliny uprawiane pod siatką cieniującą posiadały więcej tego związku, a trend ten utrzymywał się w obu latach prowadzenia badań. Jest to zgodne z badaniami Huang i in. (2016), którzy również zaobserwowali wzrost zarówno chlorofilu **a** jak i chlorofilu **b** w roślinach uprawianych w cieniu. Najwięcej karotenoidów w ziele miodunki miękkowłosej było w roślinach uprawianych pod siatką cieniującą. Rośliny zebrane w 2018 roku miały wyższą zawartość karotenoidów niż te z 2019 roku, jednak więcej karotenoidów było w roślinach uprawianych pod siatką cieniującą i była to ilość statystycznie istotna tylko w 2019 roku. Podobny trend został zaobserwowany w przypadku czosnku niedźwiedziego oraz jest w zgodzie z badaniami Lichtenthaler i in. (2007).

Jeśli chodzi o flawonoidy, nie stwierdzono istotnego wpływu warunków uprawy na ich zawartość, chociaż wyraźnie zauważono wpływ roku prowadzenia doświadczeń. Obie metody pomiaru tych związków wykazały wyższą zawartość flawonoidów w roślinach zebranych w 2018 roku niż w 2019 roku. Nie zaobserwowano istotnych interakcji między warunkami uprawy a rokiem doświadczenia na podstawie metody 1, ale zastosowana metoda 2 wykazała, że rośliny uprawiane w pełnym nasłonecznieniu w 2018 roku charakteryzowały się wyższą ilością flawonoidów niż te uprawiane pod siatką cieniującą w 2019 roku. Metoda 2 jest nie tylko bardziej wrażliwa na zawartość katechin, ale również jest bardziej selektywna w stosunku do rutyny w porównaniu z metodą 1. Być może tłumaczy to różnice pomiędzy użytymi metodami, tym bardziej że rutyna była stwierdzona jako jeden z głównych flawonoidów występujących w mioduncie, a badania nad zawartością tego flawonoidu z uprawie szparagów wskazują na korzystny wpływ światła słonecznego na biosyntezę rutyny (Kohmura i in., 2008; Chauhan i in., 2022).

Analiza laboratoryjna związana z określeniem zawartości związków polifenolowych pokazała, że zarówno warunki uprawy, rok doświadczenia, jak i interakcja tych czynników miały znaczący wpływ na ich zawartość w ziele miodunki miękkowłosej. Podobnie jak w czosnku niedźwiedzim, również rośliny miodunki miękkowłosej uprawiane współrzędnie z bzem czarnym lub w pełnym nasłonecznieniu posiadały wyższą zawartość związków polifenolowych niż te uprawiane pod siatką cieniującą. Choć brakuje badań dotyczących wpływu zacienienia na rośliny miodunki, to badania w tym zakresie na innych roślinach ceniolubnych są zgodne z prezentowanymi tu wynikami (Voća i in., 2022). Zawartość polifenoli w ziele była także

wyższa w 2018 roku niż 2019 roku. Interakcje między warunkami uprawy a rokiem doświadczenia wykazały, że w 2018 roku rośliny uprawiane współrzędnie lub w pełnym nasłonecznieniu odznaczały się istotnie wyższą zawartością związków polifenolowych niż te uprawiane pod siatką cieniującą. Choć trend ten był widoczny również w 2019 roku, różnice nie były statystycznie istotne.

W badaniach nad chemicznym składem liści bzu czarnego analizowano wpływ różnych czynników, takich jak czas ich zbioru oraz obecność roślin towarzyszących, na zawartość kluczowych związków chemicznych w tych liściach. Analiza ta obejmowała spektrometrię w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR), chromatografię cieczową (HPLC) oraz klasyczną analizę fitochemiczną. Założeniem tych badań było regularne sprawdzanie składu chemicznego liści bzu czarnego w celu monitorowania stanu roślin, podobnie jak to ma miejsce w przypadku regularnych badań krwi u człowieka oraz określenie przydatności liści bzu czarnego jako potencjalnego surowca leczniczego.

Spektrometria w podczerwieni z transformatą Fouriera pozwoliła na zbadanie szerokiego zakresu związków chemicznych obecnych w liściach bzu czarnego bez potrzeby ich uprzedniej ekstrakcji. W badaniach zastosowano analizę składowych głównych (PCA), aby zredukować wymiarowość danych i lepiej zrozumieć zmienność chemiczną próbek. Analiza PCA ujawniła, że trzy składowe główne wyjaśniają łącznie 98,54% wariacji w danych, przy czym pierwsza składowa główna tłumaczy 86,21% wariacji, druga 9,33%, a trzecia dodatkowe 3%. Wykorzystanie spektrometrii w podczerwieni, nie jest nową techniką i często wykorzystywana jest do rutynowych analiz paszy, w celu określenia procentowego udziału białek, węglowodanów i tłuszczów (Berauer i in., 2020). Wykorzystane jest w tym przypadku pasmo bliskiej podczerwieni (powyżej 4000 cm^{-1}), w którym absorbancja pewnych regionów widma bardzo dobrze koreluje z grupami funkcyjnymi tych grup związków. Innym regionem, wykorzystywanym w analizie FTIR, jest region grup funkcyjnych ($4000\text{ cm}^{-1} - 1500\text{ cm}^{-1}$) oraz region odcisku palca ($1500\text{ cm}^{-1} - 500\text{ cm}^{-1}$). Regiony te, choć nie dają tak dużych możliwości w dokładnym określeniu ilościowym różnic w poszczególnych związkach, to mogą być wykorzystane do analizy względnych różnic i ich niewątpliwą zaletą jest bardzo szybki czas analizy (od kilkunastu sekund do kilku minut) oraz wrażliwość na wszystkie związki organiczne występujące w próbce jednocześnie, dlatego jest

wykorzystywane do holistycznego badania różnic pomiędzy próbkami, w tym również do stwierdzenia występowania oddziaływania pomiędzy roślinami (Gidman i in., 2003).

Uzyskane w tej pracy wyniki pokazały, że liście bzu czarnego pod względem chemicznym grupowały się w trzy klastry, które nie były bezpośrednio związane z obecnością gatunków towarzyszących w uprawie współrzędnej. Zamiast tego, kluczowym czynnikiem różnicującym okazał się termin zbioru liści. Szczególnie widoczne było rozróżnienie liści odnośnie składu chemicznego zebranych wiosną oraz jesienią 2017 roku. Pierwsza składowa główna (PC1) różnicowała próbki zebrane jesienią od wszystkich innych, natomiast druga składowa główna (PC2) skutecznie oddzielała próbki wiosenne. Analiza ładunków składowych głównych wykazała, że wartości absorpcji pomiędzy 1700 cm^{-1} a 1770 cm^{-1} miały dodatni wpływ na wartości PC1, co wskazuje na obecność wiązań C=O, charakterystycznych dla tłuszczu i wosków roślinnych. Z kolei wartości absorpcji pomiędzy 1500 a 1700 cm^{-1} były związane z pasmem Amid I i Amid II, które są charakterystyczne dla białek. Absorbancja w zakresie $1560\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ mogła być powiązana z drganiami związków aromatycznych, podczas gdy zakres $1700\text{-}1780\text{ cm}^{-1}$ obejmował drgania wiązań C=O w różnych związkach organicznych, takich jak ketony i aldehydy. Analiza składowych głównych umożliwiła także zidentyfikowanie innych pasm absorpcji, które mogły wskazywać na obecność złożonych struktur, takich jak układy sprzężone, charakteryzujące się naprzemiennymi podwójnymi i pojedynczymi wiązaniami. W ten sposób spektrometria FTIR okazała się skutecznym narzędziem do analizy chemicznej zmienności w liściach bzu czarnego, pozwalając na zidentyfikowanie kluczowych zmian w ich składzie chemicznym w zależności od terminu zbioru. Wyniki spektrometrii FTIR w połączeniu z analizą składowych głównych wykazały wyraźne różnice w składzie chemicznym liści bzu czarnego w zależności od czasu zbioru. Próbki zebrane wiosną 2017 roku wykazywały wysoką zawartość białek, co potwierdzały piki absorpcji związane z pasmem Amid I i Amid II. Jesienne próbki z tego samego roku, jak i próbki zebrane w okresie kwitnienia i owocowania, miały zwiększoną zawartość związków aromatycznych i tłuszczów, co mogło być wynikiem akumulacji tych związków w miarę dojrzewania liści. Analiza spektrometrii FTIR dostarczyła szczegółowych informacji na temat zmian chemicznych zachodzących w liściach bzu czarnego w różnych okresach ich rozwoju, co ma kluczowe znaczenie dla oceny ich potencjalnych właściwości leczniczych. Wyniki te zgadzają się z badaniami innych autorów. Zhang i in. (2021)

wykazali zwiększoną zawartość wosków jesienią w liściach dębu ostrokrzewolistnego (*Quercus aquifolioides* Rehder i E.H.Wilson) natomiast Veselá i in. (2021) zaobserwowali wyższe stężenie białka w liściach roślin wiosennych, które wraz z upływem sezonu wegetacyjnego malało.

Analiza laboratoryjna związków chemicznych w liściach bzu czarnego wykazała znaczącą zmienność w zależności od różnych czynników. Zawartość chlorofilu **a** i **b** była najwyższa w liściach młodych, a następnie spadała w miarę starzenia się liści, co jest często obserwowanym trendem w wielu badaniach (Veselá i in., 2021). W szczególności, liście zebrane wiosną 2018 roku miały najwyższą zawartość chlorofilu **a**, która sukcesywnie malała podczas kwitnienia, owocowania i jesienią. Podobne trendy zaobserwowano dla chlorofilu **b**, choć spadek jego zawartości był bardziej wyraźny w niektórych fazach fenologicznych. Zawartość białka w liściach również podlegała sezonowym zmianom, z najwyższymi wartościami wiosną i systematycznym spadkiem do jesieni. Potwierdzają to również opisane wyżej badania z użyciem spektrometrii FTIR oraz badania innych autorów (Veselá i in., 2021). Liście bzu czarnego uprawianego z czosnkiem niedźwiedzim charakteryzowały się wyższą zawartością białka w porównaniu do tych uprawianych z miodunką miękkołosą. Zawartość rozpuszczalnych węglowodanów była mierzona podczas owocowania i wykazała wyraźne różnice pomiędzy rokiem 2017 a 2018, z wyższymi wartościami w liściach zebranych w 2017 roku. Analiza związana z zawartością związków polifenolowych i flawonoidów pokazała, że te związki chemiczne również podlegają znacznym zmianom w zależności od terminu zbioru i roku badań. Zawartość polifenoli była najniższa podczas kwitnienia bzu czarnego, a najwyższa jesienią, natomiast zawartość flawonoidów różniła się w zależności od zastosowanej metody pomiaru i była wyższa w próbkach zebranych w roku 2017 według jednej z metod. Badania Kiprovska i in. (2021) również potwierdziły znacznie obniżoną zawartość związków polifenolowych w liściach zebranych podczas kwitnienia, natomiast autorzy ci stwierdzili najwyższą zawartość tych związków w fazie dojrzewania owoców, która nie była badana w ramach niniejszej pracy. Przeciwnie Nurzyńska-Wierdak i in. (2022a) stwierdzili najwyższą zawartość związków polifenolowych w liściach bzu na początku kwitnienia roślin, choć zawartość zarówno flawonoidów jak i kwasów fenolowych w liściach była w tym badaniu najwyższa przed kwitnieniem po czym systematycznie spadała aż do fazy owocowania.

Analiza metabolomiczna z użyciem wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) pozwoliła na dokładne zbadanie zmienności poszczególnych związków chemicznych w liściach bzu czarnego. Chromatografia ciekowa umożliwiła rozdzielenie i identyfikację 22 różnych związków polifenolowych obecnych w próbkach. Jest to podobna wartość do wcześniej prowadzonych prac, gdzie wykryto 20 związków polifenolowych (Kiprovski i in., 2021). Analiza składowych głównych (PCA) wykazała, że głównym czynnikiem różnicującym profile związków polifenolowych w liściach był czas zbioru, a nie obecność roślin towarzyszących, co znajduje potwierdzenia zarówno w przeprowadzonej wcześniej analizie spektrometrii w podczerwieni jak również badań laboratoryjnych. Liście zebrane w 2018 roku charakteryzowały się wyższą zawartością niektórych związków polifenolowych. Próbki zebrane podczas kwitnienia i owocowania w 2017 roku znajdowały się blisko środka układu, co sugeruje, że miały one bardziej zrównoważony profil chemiczny. Choć na podstawie przeprowadzonych analiz nie można określić, jakimi dokładnie związkami chemicznymi te próbki się różniły, to badania te wskazują, że skład liści bzu czarnego podlega ogromnym zmianom sezonowym i jeśli ten surowiec zostałby włączony do powszechnego użycia w praktykach zielarskich, konieczne by było określenie również optymalnego czasu zbioru.

Na podstawie uzyskanych wyników cyklu doświadczeń niniejszej pracy można stwierdzić, że uprawa agroleśna w oparciu o bez czarny oraz cieniolutne gatunki roślin leczniczych może stanowić bardzo dobrą okazję dla rolników specjalizujących się w uprawie roślin leczniczych. O ile w przypadku roślin cieniolutnych o wysokiej wartości surowca możliwe jest wykorzystanie albo półuprawy leśnej lub siatek zacieniających, o tyle w przypadku mniej wartościowych roślin leczniczych nie jest to ekonomicznie opłacalne. W takim wypadku agroleśnictwo jest w stanie umożliwić uprawę tych gatunków w sposób opłacalny, a przy tym z dodatkowymi korzyściami takimi jak zadarnienie gleby co znacznie ogranicza występowanie chwastów, poprawia mikroklimat, a także chroni glebę przed erozją (Burgess i in., 2022). Uprawy tego typu wciąż wymagają wielu dodatkowych badań mających na celu przede wszystkim określenie innych gatunków kompatybilnych z uprawami. Konieczne jest również sprawdzenie możliwości uprawy tych gatunków w sadach owocowych wykorzystujących gatunki ważne ekonomicznie w Polsce takie jak jabłoń, wiśnia, czereśnia czy śliwa, tym bardziej, że obecnie w sadownictwie stosuje się żywe ściółki jako alternatywę dla ugoru

herbicydowego (Licznar-Małańczuk, 2020). Wykorzystanie w tym celu roślin leczniczych mogłoby pomóc uzyskać wyższą opłacalność takich upraw jak również zdywersyfikować źródła dochodu.

7. Wnioski

1. Uprawa cieniolutnych gatunków roślin leczniczych takich jak miodunka miękkowłosa, czosnek niedźwiedzi czy kopytnik pospolity współrzędnie z bzem czarnym nie ma wpływu na jakość kwiatów i owoców bzu czarnego.
2. Uprawa współrzędna bzu czarnego z miodunką miękkowłosą istotnie zmniejszyła plon kwiatów i owoców bzu czarnego, choć wartość plonu uzyskanego z uprawy dwóch gatunków jednocześnie była wyższa.
3. Uprawa miodunki miękkowłosej i czosnku niedźwiedziego w systemie agroleśnym nie zapewnia optymalnych warunków do wzrostu tych roślin w porównaniu do uprawy pod siatką cieniującą lub w pełnym nasłonecznieniu.
4. Miodunka miękkowłosa okazała się najlepszym gatunkiem do uprawy współrzędnej z bzem czarnym
5. Analiza FTIR pozwala na szybką analizę składu chemicznego liści i może posłużyć do określenia jakości surowca.
6. Skład chemiczny liści bzu czarnego podlega istotnym zmianom sezonowym i pomiędzy latami uprawy w wyższym stopniu niż z uwagi na gatunek uprawiany z nim współrzędnie
7. Liść bzu czarnego charakteryzuje się wysoką jakością pod względem substancji biologicznie aktywnych.

8. Bibliografia

1. Akhlaq, S., Ara, S. A., Fazil, M., Ahmad, B., Akram, U., Haque, M., Khan, A. A. 2022. Ethno pharmacology, phytochemical analysis, safety profile, prophylactic aspects, and therapeutic potential of *Asarum europaeum* L. in Unani medicine: An evidence-based appraisal. *Phytomedicine Plus*, 2(2), 100226.
2. Alaghemand, A., Ghorbanpour, M., Asli, D. E., Moghaddasian, B. 2013. Influence of urea fertilization on tropane alkaloids content of Henbane (*Hyoscyamus niger* L.) under hydroponic culture conditions. *Advances in Environmental Biology*, 7(2), 301-307.
3. Alimova S., Baishanbo A., Yessimsiitova Z., Ablaihanova N., Ydyrys A. 2018. A brief overview on medicinal plant *Frangula alnus*. *Eurasian Journal of Ecology*, 53(4), 4-11.
4. Almagro, M., Díaz-Pereira, E., Boix-Fayos, C., Zornoza, R., Sánchez-Navarro, V., Re, P., Fernández, C., Martínez-Mena, M., 2023. The combination of crop diversification and no tillage enhances key soil quality parameters related to soil functioning without compromising crop yields in a low-input rainfed almond orchard under semiarid Mediterranean conditions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 345
5. Al-Taweel, S. K., Azzam, C. R., Khaled, K. A., Abdel-Aziz, R. M. 2021. Improvement of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) and steviol glycoside through traditional breeding and biotechnological approaches. *Sabrao J. Breed. Genet*, 53(1), 88-111.
6. Amin, M., Chetpattananondh, P., Khan, M. N., Mushtaq, F., Sami, S. K. 2018. Extraction and Quantification of Chlorophyll from Microalgae *Chlorella* sp. *IOP Conference Series.m.aterials Science and Engineering (Online)* 414(1).
7. Apáti, F. 2014. Farm economic evaluation of elderberry production. *International Journal of Horticultural Science*, 20(3-4), 57-60.
8. Applequist, W. L. 2013. A brief review of recent controversies in the taxonomy and nomenclature of *Sambucus nigra sensu lato*. *I International Symposium on Elderberry* 1061:25-33.
9. Atkinson, M. D., Atkinson, E. 2002. *Sambucus nigra* L. *Journal of Ecology*, 90(5), 895-923.

10. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
11. Batiha, G. E. S., Olatunde, A., El-Mleeh, A., Hetta, H. F., Al-Rejaie, S., Alghamdi, S., Rivero-Perez, N. 2020. Bioactive compounds, pharmacological actions, and pharmacokinetics of wormwood (*Artemisia absinthium*). *Antibiotics*, 9(6), 353.
12. Bączek, K., Kosakowska, O., Przybył, J. L., Kuźma, P., Ejdys, M., Obiedziński, M., Węglarz, Z. 2015. Intraspecific variability of yarrow (*Achillea millefolium* L. *sl*) in respect of developmental and chemical traits. *Herba Polonica*, 61(3), 37-52.
13. Berauer, B. J., Wilfahrt, P. A., Reu, B., Schuchardt, M. A., Garcia-Franco, N., Zistl-Schlingmann, M., Jentsch, A. 2020. Predicting forage quality of species-rich pasture grasslands using vis-NIRS to reveal effects of management intensity and climate change. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 296, 106929.
14. Bizera, M., Mîndrilă, G., Botu, M. 2019. Identification of black elderberry (*Sambucus nigra* L.) valuable biotypes from the spontaneous flora of Oltenia Region.
15. Blanco, M. C. S. G., Ming, L. C., Marques, M. O. M., Bovi, O. A. 2000. Drying temperature effects in rosemary essential oil content and composition. *I Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants* 569:99-103.
16. Blumenthal, M., Lindstrom, A., Lynch, M. E., Rea, P. 2011. Market Report. Herb Sales Continue Growth--Up 3.3% in 2010. *HerbalGram*, (90).
17. Bolli, R. 1994. Revision of the genus *Sambucus*. *Dissertationes botanicae*, 223, 1-227.
18. Bosselmann, A. S., Dons, K., Oberthur, T., Olsen, C. S., Ræbild, A., Usma, H. 2009. The influence of shade trees on coffee quality in small holder coffee agroforestry systems in Southern Colombia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 129(1-3), 253-260.
19. Bugajska, K. 2020. Zastosowanie systemów agroleśnych w chowie i hodowli zwierząt - silvopastoralizm. W *Agroleśnictwo - najważniejsza innowacja w rolnictwie* (s. 88–100). *Agroleśnictwo - najważniejsza innowacja w rolnictwie*.

20. Burgess, A. J., Cano, M. E. C., Parkes, B. 2022. The deployment of intercropping and agroforestry as adaptation to climate change. *Crop and Environment*, 1(2), 145-160.
21. Caliskan, O., Radusiene, J., Temizel, K. E., Staunis, Z., Cirak, C., Kurt, D., Odabas, M. S. 2017. The effects of salt and drought stress on phenolic accumulation in greenhouse-grown *Hypericum pruinatum*. *Italian Journal of Agronomy*, 12(3).
22. Cernusca, M., Gold, M., Godsey, L. 2011. Elderberry market research. The center for agroforestry, University of Missouri. Str, 3.
23. Chauhan, S., Jaiswal, V., Cho, Y. I., Lee, H. J. 2022. Biological Activities and Phytochemicals of Lungworts (Genus *Pulmonaria*) Focusing on *Pulmonaria officinalis*. *Applied Sciences*, 12(13), 6678.
24. Chernyaeva, E. V., Viktorov, V. P. 2022. Interference of factors in the competitive interaction of the alien species *Pulmonaria saccharata* (Mill) with a seed bank in the conditions of introduction. *Biology Bulletin*, 49(4), 271-281.
25. Chow, P. S., Landhäusser, S.M. 2004. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree physiology*, 24(10), 1129-1136.
26. Çiçek, S. S., Ugolini, T., Girreser, U. 2019. Two-dimensional qNMR of anthraquinones in *Frangula alnus* (*Rhamnus frangula*) using surrogate standards and delay time adaption. *Analytica Chimica Acta*, 1081, 131-137.
27. Court, W. A., Reynolds, L. B., Hendel, J. G. 1996. Influence of root age on the concentration of ginsenosides of American ginseng (*Panax quinquefolium*). *Canadian journal of plant science*, 76(4), 853-855.
28. Dai, Y., Shen, Z., Liu, Y., Wang, L., Hannaway, D., Lu, H. 2009. Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. *Environmental and experimental botany*, 65(2-3), 177-182.
29. de Sousa Barros, A., de Moraes, S.M., Travassos Ferreira, P. A., Gusmão Pinto Vieira, Í., Aragão Craveiro, A., Oliveira dos Santos Fontenelle, R., Silva Alencar de Menezes, J. E., Ferreira da Silva, F. W., Araújo de Sousa, H. 2015. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*, 76, 557–564.
30. Ding, C., Chen, E., Lindsay, R. C. 2007. Natural accumulation of terpene trilactones in *Ginkgo biloba* leaves: variations by gender, age and season. *European Food Research and Technology*, 224, 615-621.

31. Djurdjevic, L., Dinic, A., Pavlovic, P., Mitrovic, M., Karadzic, B., Tesevic, V. 2004. Allelopathic potential of *Allium ursinum* L. *Biochemical systematics and ecology*, 32(6), 533-544.
32. Domínguez, R., Zhang, L., Rocchetti, G., Lucini, L., Pateiro, M., Munekata, P. E., Lorenzo, J. M. 2020. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) as potential source of antioxidants. Characterization, optimization of extraction parameters and bioactive properties. *Food chemistry*, 330, 127266.
33. Drapeau, R., Charlebois, D. 2012. American elder cultivation under cold climates: Potential and limitations. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(3), 473-484.
34. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
35. Elmasry, S., Abdelkader, M. A. 2019. Response of productivity and competitive indices of pomegranate trees and sweet basil and rosemary to different intercropping systems. *International Journal of Environmental*, 8(1), 32–42.
36. Esteban, R., Barrutia, O., Artetxe, U., Fernández-Marín, B., Hernández, A., García-Plazaola, J. I. 2015. Internal and external factors affecting photosynthetic pigment composition in plants: a meta-analytical approach. *New Phytologist*, 206(1), 268-280.
37. Farmakopea Polska XIII. 2023. Farmakopea Polska. Warszawa: Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych.
38. Fazio, A., Plastina, P., Meijerink, J., Witkamp, R. F., Gabriele, B. 2013. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food chemistry*, 140(4), 817-824.
39. Finn, C. E., Thomas, A. L., Byers, P. L., Serçe, S. 2008. Evaluation of American (*Sambucus canadensis*) and European (*S. nigra*) elderberry genotypes grown in diverse environments and implications for cultivar development. *HortScience*, 43(5), 1385-1391.
40. Fitzgerald, M., Heinrich, M., Booker, A. 2020. Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1480.

41. Gaberščik, A., Novak, M., Trošt, T., Mazej, Z., Germ, M., Björn, L. O. 2001. The influence of enhanced UV-B radiation on the spring geophyte *Pulmonaria officinalis*. *Responses of Plants to UV-B Radiation*, 49-56.
42. Gafner, S., Bush, M., Sudberg, S., Feuillere, N., Tenon, M., Jolibois, J., Stewart, J. 2021. Tales from the elder: Adulteration issues of elder berry. *HerbalGram*, 130, 24-32.
43. Geszprych, A., Przybył, J. L., Kuczerenko, A., Węglarz, Z. 2010. Diversity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) growing wild in Poland in respect of the content and composition of essential oil and phenolic compounds. *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): A New Look at Medicinal and Aromatic Plants Seminar 925* (s 123-129).
44. Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N. 2011. Effects of shading on synthesis and accumulation of polyphenolic compounds in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) varieties. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(11), 2435-2442.
45. Ghosh, R., Ganguly, R. 2018. Harvesting water from natural and industrial fogs—opportunities and challenges. *Droplet and spray transport: paradigms and applications*, 237-266.
46. Gidman, E., Goodacre, R., Emmett, B., Smith, A. R., Gwynn-Jones, D. 2003. Investigating plant–plant interference by metabolic fingerprinting. *Phytochemistry*, 63(6), 705-710.
47. Heimler, D., Romani, A., Ieri, F. 2017. Plant polyphenol content, soil fertilization and agricultural management: A review. *European Food Research and Technology*, 243, 1107-1115.
48. Sedláčková, V. H., Grygorieva, O., Fatrcová-Šramková, K., Vergun, O., Vinogradova, Y., Ivanišová, E., Brindza, J. 2018. The morphological and antioxidant characteristics of inflorescences within wild-growing genotypes of elderberry (*Sambucus nigra* L.). *Potravinárstvo*, 12(1).
49. Huang, C. J., Wei, G., Jie, Y. C., Xu, J. J., Anjum, S. A., Tanveer, M. 2016. Effect of shade on plant traits, gas exchange and chlorophyll content in four ramie cultivars. *Photosynthetica*, 54(3), 390-395.
50. Huie, C. W. 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 373, 23-30.

51. Ibrahim, M. H., Jaafar, H. Z., Rahmat, A., Rahman, Z. A. 2011. Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kacang fatimah (*Labisia pumila* Blume). *International journal of molecular sciences*, 12(8), 5238-5254.
52. Ivezić, V., Yu, Y., Werf, W. V. D. 2021. Crop yields in European agroforestry systems: a meta-analysis. *Frontiers in sustainable food systems*, 5, 606631.
53. Jones, C. G., Daniel Hare, J., Compton, S. J. 1989. Measuring plant protein with the Bradford assay: 1. Evaluation and standard method. *Journal of chemical ecology*, 15, 979-992.
54. Jose, S. 2009. Agroforestry for ecosystem services and environmental benefits: an overview (s 1-10). Springer, Dordrecht.
55. Kielak, O. 2024. From the name to the popular image of the plant: the Polish names for the black elder (*Sambucus nigra*). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 20(1), 12.
56. Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R. 2011. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go?. *Trends in biotechnology*, 29(6), 267-275.
57. Kiprovski, B., Malenčić, Đ., Ljubojević, M., Ognjanov, V., Veberic, R., Hudina, M., Mikulic-Petkovsek, M. 2021. Quality parameters change during ripening in leaves and fruits of wild growing and cultivated elderberry (*Sambucus nigra*) genotypes. *Scientia Horticulturae*, 277, 109792.
58. Muto, N., Kohmura, H., Watanabe, Y. 2005. Polyphenol content, antioxidant activity and surface colour of asparagus spears cultivated under different conditions of sunlight. *XI International Asparagus Symposium 776* (s 255-260).
59. Kovalenko, I. M., Klymenko, H. O., Hozhenko, K. H. 2017. Population analysis of *Asarum europaeum* in the Northeast of Ukraine. *Biosystems diversity*, 25(3), 210-215.
60. Kruglov, D. 2012. Trace element structure of the most widespread plants of genus *Pulmonaria*. *Chronicles of Young Scientists*, 3(3), 223-223.
61. Li, W., Hartmann, H., Adams, H. D., Zhang, H., Jin, C., Zhao, C., Wu, J. 2018. The sweet side of global change—dynamic responses of non-structural carbohydrates to drought, elevated CO₂ and nitrogen fertilization in tree species. *Tree Physiology*, 38(11), 1706-1723.

62. Li, Y., He, N., Hou, J., Xu, L., Liu, C., Zhang, J., Wu, X. 2018. Factors influencing leaf chlorophyll content in natural forests at the biome scale. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, 64.
63. Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., Wu, H. 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant physiology and biochemistry*, 148, 80-89.
64. Lichtenthaler, H. K., Ač, A., Marek, M. V., Kalina, J., Urban, O. 2007. Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. *Plant physiology and biochemistry*, 45(8), 577-588.
65. Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Döll, M., Fietz, H. J., Bach, T., Kozel, U., Meier, D, Rahmsdorf, U. 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis research*, 2, 115-141.
66. Licznar-Malanczuk, M. 2020. Occurrence of weeds in an orchard due to cultivation of long-term perennial living mulches. *Acta Agrobotanica*, 73(2).
67. Mahboubi, M. 2021. *Sambucus nigra* (black elder) as alternative treatment for cold and flu. *Advances in Traditional medicine*, 21(3), 405-414.
68. Mahboubi, M., Kazempour, N., Mahboubi, A. 2012. Total Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Sambucus nigra* L. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2(5), 275-283.
69. Menges, F. (2018). Spectragryph Optical Spectroscopy Software, Version 1.2.8. Oberstdorf, Germany 2018. Dostępne online: <https://www.effemm2.de/spectragryph>.
70. Marian, M., Nicula, C., Peter, A., Matei, G., Spatar, C. 2011. Allelopathic potential of *Asarum europaeum* toward *Lycopersicon esculentum*. *Studia Universitatis "Vasile Goldis" Arad. Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)*, 21(1), 59.
71. Markert, B. 1995. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. *Science of the total environment*, 176(1-3), 45-61.
72. Marotti, I., Whittaker, A., Bağdat, R. B., Akin, P. A., Ergün, N., Dinelli, G. 2023. Intercropping perennial fruit trees and annual field crops with aromatic and medicinal plants (MAPs) in the Mediterranean Basin. *Sustainability*, 15(15), 12054.

73. Mathur, S., Jain, L., Jajoo, A. 2018. Photosynthetic efficiency in sun and shade plants. *Photosynthetica*, 56, 354-365.
74. McGowan, K. G., Byers, P. L., Jose, S., Gold, M., Thomas, A. L. 2018. Flower production and effect of flower harvest on berry yields within six American elderberry genotypes. *XXX International Horticultural Congress IHC2018: III International Berry Fruit Symposium* 1265 (s 99-106).
75. Mikulic-Petkovsek, M., Ivancic, A., Todorovic, B., Veberic, R., Stampar, F. 2015a. Fruit phenolic composition of different elderberry species and hybrids. *Journal of food science*, 80(10), C2180-C2190.
76. Mikulic-Petkovsek, M., Samoticha, J., Eler, K., Stampar, F., Veberic, R. 2015b. Traditional elderflower beverages: A rich source of phenolic compounds with high antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(5), 1477-1487.
77. Mitre, V., Szabó, Á. I., Lukács, L., Andreacan, A. F., Rózsa, S., Negrușier, C., Borsai, O. 2022. The influence of different fertilizer schemes on 'haschberg' European elderberry growth and fruit production. *Romanian Journal of Horticulture* 3:139-146
78. Młynarczyk, K., Walkowiak-Tomczak, D., Łysiak, G. P. 2018. Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *Journal of functional foods*, 40, 377-390.
79. Muschler, R. G. 2001. Shade improves coffee quality in a sub-optimal coffee-zone of Costa Rica. *Agroforestry systems*, 51, 131-139.
80. Najjaa, H., Boubakri, A., Arfa, A. B., Zouari, N., Neffati, M. 2018. Salinity and drought stresses improve antioxidant potential of *Allium roseum* L., an edible medicinal plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(11), 195.
81. Nerlich, K., Graeff-Hönninger, S., Claupein, W. 2013. Agroforestry in Europe: a review of the disappearance of traditional systems and development of modern agroforestry practices, with emphasis on experiences in Germany.
82. Ngapo, T. M., Bilodeau, P., Arcand, Y., Charles, M. T., Diederichsen, A., Germain, I., Liu, Q., MacKinnon, S., Messiga, A. J., Mondor, M., Villeneuve, S., Ziadi, N., Gariépy, S. 2021. Historical indigenous food preparation using produce of the three sisters intercropping system. *Foods*, 10(3), 524.
83. Nguyen, H. T., Németh, Z. É. 2016. Sources of variability of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oil. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 3(4), 143-150.

84. Nurzyńska-Wierdak, R. 2023. Chemical Diversity, Yield, and Quality of Aromatic Plants. *Agronomy*, 13(6), 1614.
85. Nurzyńska-Wierdak, R., Krajewska, A. 2022. Aktywność biologiczna bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.). *Annales Horticulturae*, 31(1).
86. Nurzyńska-Wierdak, R., Najda, A., Sałata, A., Krajewska, A. 2022a. Bioactive compounds and antioxidant properties of black elderberry (*Sambucus nigra* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 21(2), 143-156.
87. Nurzyńska-Wierdak, R., Sałata, A., Kniaziewicz, M. 2022b. Tansy (*Tanacetum vulgare* L.)—A wild-growing aromatic medicinal plant with a variable essential oil composition. *Agronomy*, 12(2), 277.
88. Oborny, B., Botta-Dukat, Z., Rudolf, K., Morschhauser, T. 2011. Population ecology of *Allium ursinum*, a space-monopolizing clonal plant. *Acta Botanica Hungarica*, 53(3-4), 371-388.
89. Olewnicki, D., Stangierska, D. 2020. Gospodarcze aspekty i uwarunkowania rozwoju agroleśnictwa. W E. Osińska, B. Baj-Wójtowicz (Red.), *Agroleśnictwo - najważniejsza innowacja w rolnictwie* (s. 101–112). Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie.
90. Orliński Paweł. 2014. Wpływ zróżnicowanych metod uprawy *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni na plon i jakość surowca. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.
91. Osińska, E., Baj-Wójtowicz, B. 2020. Agroleśnictwo - najważniejsza innowacja w rolnictwie. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie.
92. Ourecky, D. K. 1970. Chromosome morphology in the genus *Sambucus*. *American Journal of Botany*, 57(3), 239-244.
93. Papagrigoriou, T., Iliadi, P., Mitić, M. N., Mrmošanin, J. M., Papanastasi, K., Karapatzak, E., Maloupa, E., Gkourogianni, A. V., Badeka, A. V., Krigas, N., Lazari, D. 2023. Wild-growing and conventionally or organically cultivated *Sambucus nigra* germplasm: Fruit phytochemical profile, total phenolic content, antioxidant activity, and leaf elements. *Plants*, 12(8), 1701.
94. Patil, N. M. 2010. Biofertilizer effect on growth, protein and carbohydrate content in *Stevia rebaudiana* var Bertoni. *Recent Research in Science and Technology*, 2(10).
95. Pawicka-Józwiak, K., Józwiak, P. 2020. Możliwości wykorzystania agroleśnictwa w drzewostanach pochodzenia antropogenicznego. W E. Osińska, B. Baj-

- Wójtowicz (Red.), *Agroleśnictwo - najważniejsza innowacja w rolnictwie* (s. 101–112). Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie.
96. Pękał, A. J. 2014. Wpływ doboru procedury analitycznej na wyznaczenie właściwości antyutleniających próbek żywności. Uniwersytet Warszawski, Warszawa.
97. Podyma, W., Bączek, K., Angielczyk, M., Przybył, J. L., Węglarz, Z. 2010. The influence of shading on the yield and quality of southern sweet-grass (*Hierochloë australis* (Schrad.) Roem. i Schult.) raw material. *Herba Polonica*, 56(4).
98. Prakash, I., Markosyan, A., Bunders, C. 2014. Development of next generation *stevia* sweetener: Rebaudioside M. *Foods*, 3(1), 162-175.
99. Reginato, M., Varela, C., Cenzano, A. M., Luna, V. 2015. Role of polyphenols as antioxidants in native species from argentina under drought and salinization. *Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress*, 247-267.
100. Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Garcia, P. C., Lopez-Lefebre, L. R., Sánchez, E., Romero, L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant science*, 160(2), 315-321.
101. Rola, K. 2012. Taxonomy and distribution of *Allium ursinum* (*Liliaceae*) in Poland and adjacent countries. *Biologia*, 67(6), 1080-1087.
102. Saeedi, M., Vahedi-Mazdabadi, Y., Rastegari, A., Soleimani, M., Eftekhari, M., Akbarzadeh, T. 2020. Evaluation of *asarum europaeum* L. Rhizome for the biological activities related to Alzheimer's disease. *Research Journal of Pharmacognosy*, 7(3), 25-33.
103. Sahoo, M. R., Umashankara, M. S. 2023. FTIR based metabolomics profiling and fingerprinting of some medicinal plants: An attempt to develop an approach for quality control and standardization of herbal materials. *Pharmacognosy Research*, 15(1).
104. Salehi, A., Tasdighi, H., Gholamhoseini, M. 2016. Evaluation of proline, chlorophyll, soluble sugar content and uptake of nutrients in the German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) under drought stress and organic fertilizer treatments. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(10), 886-891.
105. Sánchez-Navarro, V., Shahrokh, V., Martínez-Martínez, S., Acosta, J. A., Almagro, M., Martínez-Mena, M., Zornoza, R. 2022. Perennial alley cropping contributes to decrease soil CO₂ and N₂O emissions and increase soil carbon sequestration in a Mediterranean almond orchard. *Science of the Total Environment*, 845, 157225.

106. Sauer, W. (1987). The *Pulmonaria dacica* group: its affinities with central and south-east European allies and with the genus *Paraskevia* (*Boraginaceae*). *Plant systematics and evolution*, 155, 257-276.
107. Schmitzer, V., Veberic, R., Stampar, F. 2012. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) and American Elderberry (*Sambucus canadensis* L.): Botanical, chemical and health properties of flowers, berries and their products. *Berries: properties, consumption and nutrition*, 127-148.
108. Sisak, L., Riedl, M., Dudik, R. 2016. Non-market non-timber forest products in the Czech Republic—Their socio-economic effects and trends in forest land use. *Land Use Policy*, 50, 390-398.
109. Sobolewska, D., Podolak, I., Makowska-Wąs, J. 2015. *Allium ursinum*: botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry reviews*, 14, 81-97.
110. Sofu, A., Lundegårdh, B., Mårtensson, A., Manfra, M., Pepe, G., Sommella, E., De Nisco, M., Tenore, G. C., Campiglia, P., Scopa, A. 2016. Different agronomic and fertilization systems affect polyphenolic profile, antioxidant capacity and mineral composition of lettuce. *Scientia Horticulturae*, 204, 106-115.
111. Song, R., Kelman, D., Johns, K. L., Wright, A. D. 2012. Correlation between leaf age, shade levels, and characteristic beneficial natural constituents of tea (*Camellia sinensis*) grown in Hawaii. *Food Chemistry*, 133(3), 707-714.
112. Sultana, T., Porter, N. G., Savage, G. P., McNeil, D. L. 2003. Comparison of isothiocyanate yield from wasabi rhizome tissues grown in soil or water. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(12), 3586-3591.
113. Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., Suprakash, R. 2014. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res J Chem Sci*, 2231, 606X.
114. Szöke, Z. A. 1988. Effect of light intensity on chloroplast ultrastructure during growth of two forest herbs. *Abstracta Botanica*, 103-116.
115. Szymborska-Sandhu, I., Przybył, J. L., Kosakowska, O., Bączek, K., Węglarz, Z. 2020a. Chemical diversity of Bastard Balm (*Melittis melisophyllum* L.) as affected by plant development. *Molecules*, 25(10), 2421.
116. Szymborska-Sandhu, I., Przybył, J. L., Pióro-Jabrucka, E., Jędrzejuk, A., Węglarz, Z., Bączek, K. 2020b. Effect of shading on development, yield and quality of bastard balm herb (*Melittis melissophyllum* L.). *Molecules*, 25(9), 2142.

117. Uzlasir, T., Kadiroglu, P., Selli, S., Kelebek, H. 2021. LC-DAD-ESI-MS/MS characterization of elderberry flower (*Sambucus nigra*) phenolic compounds in ethanol, methanol, and aqueous extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(8), e14478.
118. Veberic, R., Jakopic, J., Stampar, F., Schmitzer, V. 2009. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*, 114(2), 511-515.
119. Veselá, H., Lhotáková, Z., Albrechtová, J., Frouz, J. 2021. Seasonal changes in tree foliage and litterfall composition at reclaimed and unreclaimed post-mining sites. *Ecological Engineering*, 173, 106424.
120. Voća, S., Šic Žlabur, J., Fabek Uher, S., Peša, M., Opačić, N., Radman, S. 2021. Neglected potential of wild garlic (*Allium ursinum* L.)—Specialized metabolites content and antioxidant capacity of wild populations in relation to location and plant phenophase. *Horticulturae*, 8(1), 24.
121. Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., Gritsanapan, W. 2013. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial crops and products*, 44, 566-571.
122. Milena, V., Tatjana, M., Gökhan, Z., Ivana, B., Aleksandra, C., Mohammad, M. F., Marija, R. 2019. Advantages of contemporary extraction techniques for the extraction of bioactive constituents from black elderberry (*Sambucus nigra* L.) flowers. *Industrial Crops and Products*, 136, 93-101.
123. Wang, Y., Gao, L., Shan, Y., Liu, Y., Tian, Y., Xia, T. 2012. Influence of shade on flavonoid biosynthesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Scientia horticulturae*, 141, 7-16.
124. Wardziak, O. Z. 2010. Środowiskowe i rozwojowe uwarunkowania zmienności marzanki wonnej *Galium odoratum* (L.) Scop. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu.
125. Yang, S. O., Shin, Y. S., Hyun, S. H., Cho, S., Bang, K. H., Lee, D., Choi, S. P., Choi, H. K. 2012. NMR-based metabolic profiling and differentiation of ginseng roots according to cultivation ages. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 58, 19-26.
126. Yang, T., Duan, Z. P., Zhu, Y., Gan, Y. W., Wang, B. J., Hao, X. D., Xu, W. L., Zhang, W., Li, L. H. 2019. Effects of distance from a tree line on photosynthetic

- characteristics and yield of wheat in a jujube tree/wheat agroforestry system. *Agroforestry Systems*, 93, 1545-1555.
127. Yi, L., Dong, N., Yun, Y., Deng, B., Ren, D., Liu, S., Liang, Y. 2016. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Analytica chimica acta*, 914, 17-34.
128. Zajączkowski, J., Wójcik, M., Malusa, E., Tartanus, M., Furmańczyk, E., Jędrejek, A., Kozyra, J., Kozak, M., Borek, R., 2021. Agroleśnictwo (systemy rolno-leśne): poradnik dla rolników i doradców rolnych. Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa Państwowy Instytut Badawczy w Puławach.
129. Zarzycki, K., Trzcńska-Tacik, H., Różański, W., Szelaż, Z., Wołek, J., Korzeniak, U. 2002. Ecological indicator values of vascular plants of Poland. Ekologiczne liczby wskaźnikowe roślin naczyniowych Polski. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences.
130. Zhang, X., Xu, B., Günther, F., Gleixner, G. 2021. Seasonal variation of leaf wax n-alkane $\delta^{2}H$ values: Differences between *Quercus aquifolioides* (an evergreen tree) and *Stipa bungeana* (a perennial grass) from the southeastern Tibetan Plateau. *Global and Planetary Change*, 207, 103674.
131. Zheng, Y., Tian, L., Liu, H., Pan, Q., Zhan, J., Huang, W. 2009. Sugars induce anthocyanin accumulation and flavanone 3-hydroxylase expression in grape berries. *Plant Growth Regulation*, 58, 251-260.
132. Zuazo, V. H. D., Pleguezuelo, C. R. R., Martínez, J. R. F., Raya, A. M., Panadero, L. A., Rodríguez, B. C., Moll, M. C. N. 2008. Benefits of plant strips for sustainable mountain agriculture. *Agronomy for Sustainable Development*, 28, 497-505.

Strony Internetowe:

- 1) Gardeninka. (2023, sierpień 11). *Po co nam uprawa współrzędna?* <https://www.nowytydzien.pl/po-co-nam-uprawa-wspolrzedna/>. (dostęp 5 czerwca 2024)
- 2) Wernicki Paweł. (2019, kwiecień 5). *Uprawa współrzędna - większe zyski z rolnictwa i korzyści dla środowiska.* <https://naukawpolsce.pl/aktualnosci/news%2C33474%2Cuprawa-wspolrzedna-wieksze-zyski-z-rolnictwa-i-korzysci-dla-srodowiska.html>. (dostęp 5 czerwca 2024)
- 3) Wikifarmer.com. (2023). *Co to jest uprawa współrzędna i dlaczego jest lepsza od monokultury?* <https://wikifarmer.com/pl/co-to-jest-uprawa-wspolrzedna-i-dlaczego-jest-lepsza-od-monokultury/>. (dostęp 5 czerwca 2024)
- 4) Pwn.pl. (2024). monokultura. <https://sjp.pwn.pl/sjp/monokultura;2568345>. (dostęp 5 czerwca 2024)
- 5) Wikipedia.org. (2024). Monokultura. <https://pl.wikipedia.org/wiki/Monokultura>. (dostęp 5 czerwca 2024)
- 6) Orzeszki ziemne uprawiane w systemie agroleśnym w Senegalu z akacją białą (*Faidherbia albida*). © Autor: C. Dangleant, Cirad <https://www.cirad.fr/espace-presse/communiqués-de-presse/2019/semaine-de-l-agroforesterie-a-montpellier-du-19-au-23-mai-2019> (dostęp 19 listopada 2024)
- 7) System leśno-pastwiskowy. <https://overshoot.footprintnetwork.org/portfolio/silvopasture/> (dostęp 19 listopada 2024)
- 8) Uprawa żeń-szenia (*Panax ginseng* C.A. Meyer) w systemie rolnictwa leśnego <https://pasafarming.org/resources/forest-farming-ginseng/> (dostęp 19 listopada 2024)
- 9) Bez czarny w formie drzewa Autor: JR P, CC BY-NC 2.0 <https://www.flickr.com/photos/ugardener/3374354945> (dostęp 22 listopada 2024)
- 10) Liść bzu czarnego. Autor: Varmin, CC BY-SA 4.0 https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sambucus_nigra-leaves01.jpg (dostęp 22 listopada 2024)

- 11) Kwiatostan bzu czarnego Autor: Matthew Beziat CC BY-NC 2.0
<https://www.flickr.com/photos/109690096@N08/41721759554/> (dostęp 24 listopada 2024)
- 12) Czosnek niedźwiedzi tworzący poszycie lasu liściastego. Autor: pluralzed, CC BY-NC 2.0 <https://www.flickr.com/photos/pluralzed/156412873> (dostęp 21 listopada 2024)
- 13) Kopytnik pospolity. Autor: Smirnof, Creative Commons CC0 1.0 Universal Public Domain Dedication.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Asarum_europaeum_Kiev1.jpg (dostęp 20 listopada 2024)
- 14) ECA&D. (2024) <https://www.ecad.eu>. Uznajemy wkład dostawców danych w ramach projektu ECA&D. Klein Tank, A.M.G. i współautorzy, 2002. Dzienny zbiór danych dotyczących temperatury powietrza przy powierzchni i opadów atmosferycznych w XX wieku dla Europejskiej Oceny Klimatycznej. International Journal of Climatology, 22, 1441-1453. Dane i metadane dostępne na stronie: <https://www.ecad.eu> (dostęp 2 lutego 2024)

9. Aneks

Tabela A1 Stwierdzone związki w ekstraktach z kwiatów bzu czarnego przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Wykryty związek	Kolumna	Czas retencji	Długość fali przy oznaczaniu (nm)	Maksima absorpcji (nm)
Zw. Polifenolowy 1	Kinetex	0.877	254	248
Zw. Polifenolowy 2	Kinetex	1.171	315	195, 324
Zw. Polifenolowy 3	Kinetex	1.686	320	217, 325
Zw. Polifenolowy 4	Kinetex	1.851	320	324
Zw. Polifenolowy 5	Kinetex	2.294	225	195, 225
Zw. Polifenolowy 6	Kinetex	2.483	315	224, 311
Zw. Polifenolowy 7	Kinetex	2.847	350	254, 349
Zw. Polifenolowy 8	Kinetex	3.446	254	190, 264
Zw. Polifenolowy 9	Kinetex	3.522	254	190, 252
Zw. Polifenolowy 10	Kinetex	3.685	350	203, 255, 353
Zw. Polifenolowy 11	Kinetex	3.981	350	200, 255, 352
Zw. Polifenolowy 12	Kinetex	4.449	254	264, 344
Zw. Polifenolowy 13	Kinetex	4.615	350	202, 254, 353
Zw. Polifenolowy 14	Kinetex	4.746	325	217, 326
Zw. Polifenolowy 15	Kinetex	4.941	350	254, 352
Zw. Polifenolowy 16	Kinetex	5.249	325	215, 243, 326
Zw. Polifenolowy 17	Kinetex	5.506	190	190
Zw. Polifenolowy 18	Kinetex	5.712	190	190
Zw. Polifenolowy 19	Kinetex	5.827	190	190
Zw. Polifenolowy 20	Kinetex	5.972	320	190, 317

Tabela A2 Związki stwierdzone w ekstraktach z owoców bzu czarnego przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Wykryty związek	Kolumna	Czas retencji	Długość fali przy oznaczaniu (nm)	Maksymalna absorpcja (nm)
Zw. Polifenolowy 1	Kinetex	1.241	515	196, 278, 513
Zw. Polifenolowy 2	Kinetex	1.769	220	196, 280
Zw. Polifenolowy 3	Kinetex	2.148	515	203, 280, 516
Zw. Polifenolowy 4	Kinetex	2.17		
Zw. Polifenolowy 5	Kinetex	2.996	220	204, 279
Zw. Polifenolowy 6	Kinetex	4.234	355	208, 248, 336
Zw. Polifenolowy 7	Kinetex	4.438	355	202, 255, 353
Zw. Polifenolowy 8	Kinetex	4.762	355	205, 253, 347
Zw. Polifenolowy 9	Kinetex	5.459	220	203, 277
Zw. Polifenolowy 10	Kinetex	5.638	280	190, 317
Zw. Polifenolowy 11	Kinetex	5.844	203	190
Zw. Polifenolowy 12	Kinetex	6.778	355	190, 336
Fruktoza	NH2	2.655		
Głukoza	NH2	3.302		
Sacharoza	NH2	4.891		

Tabela A3 Związki stwierdzone w ekstraktach z liści bzu czarnego przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Wykryty związek	Kolumna	Czas retencji	Długość fali przy oznaczaniu (nm)	Maksymalna absorpcja (nm)
Zw. Polifenolowy 1	Kinetex	0.703	198	198, 280
Zw. Polifenolowy 2	Kinetex	1.045	325	200, 285
Zw. Polifenolowy 3	Kinetex	1.15	325	196, 289, 323
Zw. Polifenolowy 4	Kinetex	1.394	225	197, 216, 282
Zw. Polifenolowy 5	Kinetex	1.491	325	190, 325
Zw. Polifenolowy 6	Kinetex	1.589	278	197, 278
Zw. Polifenolowy 7	Kinetex	1.662	325	217, 325
Zw. Polifenolowy 8	Kinetex	2.023	310	308
Zw. Polifenolowy 9	Kinetex	2.142	366	315
Zw. Polifenolowy 10	Kinetex	2.749	225	190
Zw. Polifenolowy 11	Kinetex	2.836	225	190
Zw. Polifenolowy 12	Kinetex	3.659	366	203, 255, 353
Zw. Polifenolowy 13	Kinetex	3.958	366	254, 351
Zw. Polifenolowy 14	Kinetex	4.422	366	264, 347
Zw. Polifenolowy 15	Kinetex	4.74	325	190, 327
Zw. Polifenolowy 16	Kinetex	4.998	198	190
Zw. Polifenolowy 17	Kinetex	5.339	310	190, 308
Zw. Polifenolowy 18	Kinetex	5.499	198	190
Zw. Polifenolowy 19	Kinetex	5.636	198	190
Zw. Polifenolowy 20	Kinetex	5.702	198	190
Zw. Polifenolowy 21	Kinetex	5.814	198	190
Zw. Polifenolowy 22	Kinetex	6.9	240	190, 238

Tabela A4 Pole pod powierzchnią pików w stwierdzonych związkach chemicznych w ekstraktach z kwiatów bzu czarnego w zależności od kombinacji doświadczenia w chromatografii cieczowej. Wynik przedstawia średnią zawartość z lat 2017-2018

Gatunek towarzyszący	Brak (Kontrola)	Czosnek niedźwiedzi	Kopytnik pospolity	Miodunka miękkołosa	Wartość p
Zw. Polifenolowy 1	37925	38242	36860	35850	0.65
Zw. Polifenolowy 2	53397	48225	44623	51748	0.199
Zw. Polifenolowy 3	432872 a	377394 ab	354081 b	415381 ab	0.008
Zw. Polifenolowy 4	7159 a	5895 b	5653 b	6621 ab	0.003
Zw. Polifenolowy 5	43405	43465	38448	41775	0.463
Zw. Polifenolowy 6	43710 a	39018 a	37981 a	42136 a	0.066
Zw. Polifenolowy 7	16156	15625	15068	16314	0.878
Zw. Polifenolowy 8	4741	4118	4342	4439	0.617
Zw. Polifenolowy 9	5029	3994	4175	4573	0.564
Zw. Polifenolowy 10	362770	348180	320550	356797	0.152
Zw. Polifenolowy 11	56784	53241	54632	54811	0.943
Zw. Polifenolowy 12	96524	92492	88104	93311	0.393
Zw. Polifenolowy 13	118770	119312	106994	117124	0.529
Zw. Polifenolowy 14	445455	436790	397013	429098	0.492
Zw. Polifenolowy 15	42348	40405	38687	42223	0.479
Zw. Polifenolowy 16	55924	55820	52817	51504	0.832
Zw. Polifenolowy 17	1243268	1155644	1171477	1162113	0.693
Zw. Polifenolowy 18	818692	774096	787530	773511	0.632
Zw. Polifenolowy 19	271275	260323	264500	258804	0.49
Zw. Polifenolowy 20	35053 ab	29911 b	31193 ab	38170 a	0.017

* Wartości w rzędzie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie przy poziomie istotności $p < 0.05$

Tabela A5 Pole pod powierzchnią piku w związkach chemicznych w ekstraktach z owoców bzu czarnego w zależności od kombinacji doświadczenia w chromatografii cieczowej. Wynik przedstawia średnią zawartość z lat 2017-2018

Gatunek towarzyszący	Brak (Kontrola)	Czosnek niedźwiedzi	Kopytnik pospolity	Miodunka miękkowłosa	Wartość p
Zw. Polifenolowy 1	201638	178982	213425	182129	0.518
Zw. Polifenolowy 2	415885	264162	300273	228003	0.508
Zw. Polifenolowy 3	1583585	1421725	1632032	1433463	0.57
Zw. Polifenolowy 4	182268	174108	177529	192526	0.682
Zw. Polifenolowy 5	127639	125106	128918	129555	0.915
Zw. Polifenolowy 6	24688	25665	25725	24887	0.848
Zw. Polifenolowy 7	195172	202709	182062	209580	0.273
Zw. Polifenolowy 8	94254	93435	90161	100090	0.409
Zw. Polifenolowy 9	88025	87965	92459	87470	0.819
Zw. Polifenolowy 10	17000	17723	17594	17939	0.881
Zw. Polifenolowy 11	165293	173490	175539	170644	0.945
Zw. Polifenolowy 12	16800	16971	17649	16381	0.63
Fruktoza	1570371	1541166	1592978	1504177	0.802
Głukoza	1782533	1714469	1794233	1725461	0.835
Sacharoza	87289	84866	97492	83870	0.686

* Wartości w rzędzie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie przy poziomie istotności $p < 0.05$

Tabela A6 Pole pod powierzchnią piku w związkach chemicznych w ekstraktach z liści bzu czarnego w zależności od kombinacji doświadczenia w chromatografii cieczowej.

Wynik przedstawia średnią zawartość z lat 2016-2018

Gatunek towarzyszący	Brak (Kontrola)	Czosnek niedźwiedzi	Kopytnik pospolity	Miodunka miękkwłosa	Wartość p
Zw. Polifenolowy 1	533552	537311	514986	515515	0.96
Zw. Polifenolowy 2	5433	5182	5830	6382	0.171
Zw. Polifenolowy 3	20813	19824	20779	21782	0.812
Zw. Polifenolowy 4	18371	16325	16881	21196	0.526
Zw. Polifenolowy 5	23926	25251	25942	26442	0.885
Zw. Polifenolowy 6	82426	74162	102717	101155	0.656
Zw. Polifenolowy 7	461631	464308	479385	490984	0.81
Zw. Polifenolowy 8	6081	5951	6098	6085	0.977
Zw. Polifenolowy 9	2721	2710	2798	2891	0.802
Zw. Polifenolowy 10	5930	5254	6350	6512	0.387
Zw. Polifenolowy 11	4579 ab	3647 b	4894 ab	5400 a	0.064
Zw. Polifenolowy 12	119006 ab	114822 b	126911 ab	133978 a	0.008
Zw. Polifenolowy 13	5491 ab	4621 b	6086 ab	7328 a	0.002
Zw. Polifenolowy 14	16722 ab	15895 b	17612 ab	18568 a	0.039
Zw. Polifenolowy 15	2056 a	1849 a	2289 a	2822 a	0.095
Zw. Polifenolowy 16	338710	340324	339978	342128	0.997
Zw. Polifenolowy 17	2222	2064	2250	2382	0.682
Zw. Polifenolowy 18	628075	628906	629820	635611	0.993
Zw. Polifenolowy 19	83430	83667	84066	85122	0.973
Zw. Polifenolowy 20	436804	437636	438850	442563	0.987
Zw. Polifenolowy 21	170483	169744	169336	171417	0.988
Zw. Polifenolowy 22	13272	13250	13361	13526	0.988

* Wartości w rzędzie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie przy poziomie istotności $p < 0.05$