

Zawartość formononetyny w wybranych polskich odmianach di- i tetraploidalnej koniczyny czerwonej

STANISŁAW BURDA, PIOTR M. GÓRSKI, MARIAN JURZYSTA
i MICHAŁ PŁOSZYŃSKI

Zakład Biochemii i Jakości Plonów, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, 24-100 Puławy

S. Burda, P. M. Górski, M. Jurzysta, M. Płoszyński (Department of Biochemistry and Crop Quality, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, 24-100 Puławy, Poland). Acta Agrobotanica 44 (1, 2): 81-85, 1991. *The formononetin content in some Polish di- and tetraploid red clover cultivars.*

(Otrzymano dn. 1989.03.31)

A b s t r a c t

The content of formononetin, the predominant estrogen, was analysed in four cultivars of red clover. Its highest content was found in cv. Jubilatka (tetraploid) – 0,57 % DM, next, in cv. Hruszowska (diploid) – 0,44%, Radyka (tetraploid) – 0,39 % and Skrzyszowicka (diploid) – 0,3 %. High variation from plant to plant was found in all of the analysed cultivars, which makes it possible to select for a low formononetin clover population. The content of formononetin in individual plants in two consecutive years was positively correlated. The content of biochemin A in two cultivars was also analysed employing a semi-quantitative TCL test. It was found that the content of these two estrogens in individual plants was positively correlated. However, some individual plants containing high amount of only one estrogen were also found. Because of that in the selection for low-estrogen red clover, after selection of low formononetin plants, an additional test for biochanin A is recommended.

WSTĘP

Koniczyna jest bardzo cenną rośliną pastewną wykorzystywaną w żywieniu zarówno bydła, jak i trzody chlewnej. Koniczyna zawiera dużo białka oraz innych składników pokarmowych, takich jak węglowodany, karoten, sole mineralne i witaminy. Zbierana we wczesnym stadium wzrostu zawiera niewiele włókna, dzięki czemu może być skarmiana przez zwierzęta jednożołądkowe.

W Polsce, w powszechnej uprawie znajduje się koniczyna czerwona (*Trifolium pratense* L.), biała (*T. repens* L.) oraz w mniejszym stopniu szwedzka (*T. hybridum* L.).

Ostatnio rozpoczęto w Polsce badania nad koniczyną podziemną (*T. subterraneum* L.). Wszystkie wymienione koniczyny zawierają izoflawony – naturalne składniki roślinne o działaniu estrogennym. Związki te powodują bezpłodność i poronienia u zwierząt (Bennetts in., 1946; Chang in., 1969; Shutt in., 1970). Oprócz działania estrogennego, izoflawony pogarszają prawdopodobnie smak paszy i obniżają jej spożycie przez zwierzęta (Francis in., 1973).

Najwyższą zawartością izoflawonów i aktywnością estrogenną charakteryzuje się koniczyna podziemna, dawne odmiany tej koniczyny zawierały ponad 3 % izoflawonów w suchej masie. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach (Jurzysta in., 1989) pozostałe koniczyny uprawiane w Polsce, z wyjątkiem koniczyny czerwonej, zawierają nieznaczne ilości izoflawonów. W koniczynie czerwonej występują: formononetyna, biochanina A, pratenseina, daidzeina i genisteina, z czego ok. 90 % stanowią formononetyna i biochanina A (Jurzysta in., 1989).

W piśmiennictwie brak jest jakichkolwiek danych na temat zawartości izoflawonów w polskich odmianach koniczyny czerwonej oraz zmienności międzysobniczej w zawartości izoflawonów.

Stwierdzenie takiej zmienności pozwoliłoby na izolację osobników o niskiej obecności izoflawonów celem otrzymania odmiany o wyższej jakości. Dlatego postanowiono przebadać zawartość formononetyny, głównego estrogennego czynnika w koniczynie czerwonej, w odmianach di- i tetraploidalnych oraz dodatkowo metodą półilościową zawartość biochaniny A w dwu badanych odmianach.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense* L.), odmian: Hruszowska (di-), Skrzyszowicka (di-), Radyka (tetra-) i Jubilatka (tetraploid) rosnących w Zakładzie Doświadczalnym IUNG Kępa w Puławach. Rośliny wysiano w rzędach po ok. 200 szt. każdej odmiany, ścinano w początkach kwitnienia, suszono w temp. 60°C i mielono.

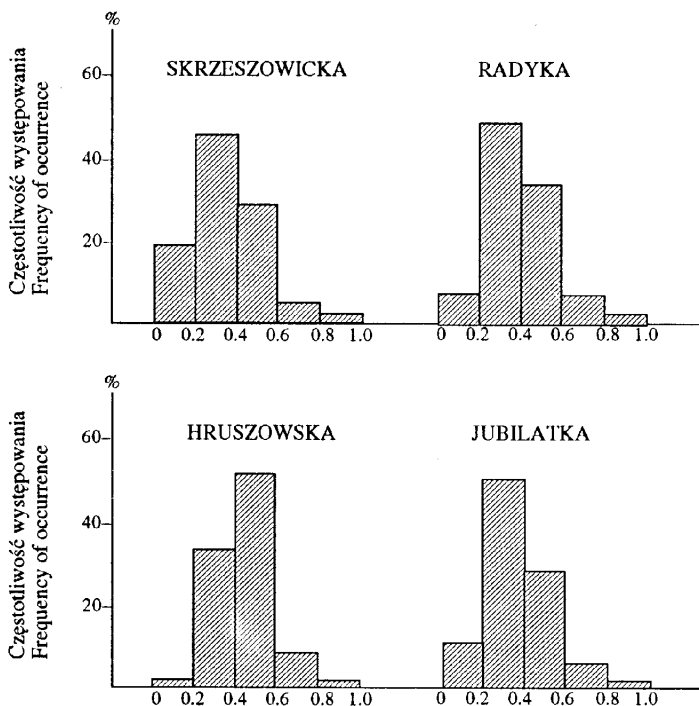
Zawartość formononetyny oznaczono metodą fluorymetryczną w ekstraktach alkoholowych po autohydroлизie enzymatycznej (Górski in., 1988).

Zawartość biochaniny A określono testem półilościowym przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej (Górski in., 1988). Do obliczeń statystycznych zawartość biochaniny A oznaczono w skali trzypunktowej: 1 – bardzo niska zawartość, 2 – średnia i 3 – wysoka. Odziedziczalność policzono według Kempthorne (1969).

WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

Po przebadaniu około 200 roślin z każdej odmiany stwierdzono, że najwyższą zawartością formononetyny charakteryzuje się odmiana Jubilatka (0,57 % w s.m.), następnie odmiany Hruszowska (0,44 %), Radyka (0,39 %) i Skrzyszowicka (0,34 %).

Nie stwierdzono zależności zawartości formononetyny od stopnia ploidalności. Stwierdzono natomiast dużą zmienność międzyosobniczą we wszystkich badanych odmianach (rys. 1). Krzywa zmienności zawartości formononetyny jest we wszystkich odmianach zbliżona do krzywej normalnej. Najwięcej osobników o niskiej zawartości formononetyny spotyka się w odmianach Skrzyszowickiej i Radyce. Najmniej osobników o niskiej zawartości formononetyny występuje w odmianie Jubilatka. Zmienność międzyosobnicza we wszystkich badanych odmianach pozwala na prowadzenie selekcji w kierunku uzyskania populacji o niskiej zawartości formononetyny.



Rys. 1. Częstotliwość występowania roślin o określonej zawartości formononetyny w czterech odmianach koniczyny czerwonej.

Frequency of formononetin content distribution in individual plants of four red clover cultivars

Koniczyna, jako roślina wieloletnia, użytkowana jest w kilku kolejnych latach. Przebadano więc zawartość formononetyny w wybranych pojedynczych roślinach wszystkich badanych odmian w dwu kolejnych latach. W tym celu przeanalizowano ponad 100 osobników. Wykazano, że zawartość formononetyny w roślinach w obu latach jest istotnie skorelowana $r = 0,46$ ($r_{0,01} = 0,25$). Niezbyt wysoka wartość współczynnika korelacji świadczy o znacznym wpływie modyfikującym środowiska. Przykładowe wyniki podano w tab. 1. Stwierdzono, że pomimo wahań w latach, cecha wysokiej lub niskiej zawartości formononetyny utrzymuje się. Pozwala to na

prowadzenie selekcji w oparciu o wyniki analiz tylko jednego roku, dobrze jest również powtórzyć analizy w roku następnym, celem eliminacji osobników wykazujących wahania.

Tabela 1 – Table 1

Zawartość formononetyny w wybranych pojedynkach koniczyny czerwonej w latach 1984 i 1985
Formononetin content in individual plants of red clover of 1984 and 1985

| Odmiana Cultivar | Nr rośliny Plant number | Zawartość formononetyny % s.m. Formononetin content % D.M. | |
|---------------------|----------------------------|---|------|
| | | 1984 | 1985 |
| Radyka | III /9 | 0.19 | 0.38 |
| Radyka | XI /5 | 0.11 | 0.09 |
| Radyka | VIII /3 | 0.81 | 0.70 |
| Radyka | I /4 | 0.71 | 0.58 |
| Hruszowska | XI /7 | 0.17 | 0.10 |
| Hruszowska | V /15 | 0.16 | 0.16 |
| Hruszowska | V /17 | 0.17 | 0.26 |
| Hruszowska | XII /2 | 0.74 | 0.63 |
| Skrzeszowicka | VII /13 | 0.13 | 0.14 |
| Skrzeszowicka | III /17 | 0.11 | 0.27 |
| Jubilatka | VIII /12 | 0.28 | 0.29 |
| Jubilatka | VIII /3 | 0.58 | 0.33 |

Drugim pod względem zawartości izoflawonem w koniczynie czerwonej jest biochanina A. Oznaczenia zawartości biochaniny A wykazano w dwu odmianach: Hruszowskiej i Skrzeszowickiej. Analiza statystyczna wyników (badanie korelacji między zawartością formononetyny i biochaniny A wyrażonej w skali trzypunktowej) wykazały istotną, chociaż stosunkowo słabą, korelację zawartości obu badanych estrogenów w pojedynczych roślinach, $r = 0,21$ ($r_{0,01} = 0,13$). Dzięki występowaniu tej korelacji wstępną selekcję osobników o niskiej zawartości estrogenów można prowadzić w oparciu o analizę zawartości formononetyny (metoda ta jest szybka i nie wymaga skomplikowanej aparatury). Spotyka się jednak również osobniki o dużej zawartości tylko jednego z dwu badanych estrogenów. Prowadzi to do wniosku, że po wstępnej analizie zawartości formononetyny i wyborze osobników o niskiej zawartości, należy przeprowadzić również test na zawartość biochaniny A. Koniczyna czerwona odgrywa bardzo ważną rolę w żywieniu zwierząt, dlatego też poprawa jakości paszy uzyskanej z tej rośliny jest sprawą dużej wagi. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość prowadzenia selekcji polskich odmian (duża zmienność międzypersoniczna) celem uzyskania odmiany o mniejszej zawartości estrogennych izoflawonów. Jednak stosunkowo niska odziedziczalność ($h^2 = 17,2$) wyliczona dla badanych odmian wskazuje na silny wpływ środowiska na badaną cechę oraz sugeruje potrzebę sięgnięcia po nowe źródła zmienności, które należałoby wykorzystać w dalszej hodowli.

Streszczenie

Oznaczano zawartość formononetyny – dominującego estrogenu w pojedynczych roślinach czterech odmian koniczyny czerwonej. Najwyższą zawartość formononetyny stwierdzono w odmianie tetraploidalnej Jubilate – 0,57 % w s.m., następnie w diploidalnej odmianie Hruszowskiej – 0,44 %, tetraploidalnej Radyce – 0,39 % i diploidalnej Skrzyszowskiej – 0,34 %. We wszystkich odmianach stwierdzono dużą zmienność międzysobniczą pozwalającą na selekcję osobników o niskiej zawartości formononetyny. Wykazano, że zawartość formononetyny w pojedynczych roślinach koniczyny w dwu kolejnych latach jest dodatnio skorelowana $r = 0,46$ ($r_{0,01} = 0,25$). Przebadano również testem półilościowym zawartość biochaniny A w pojedynczych roślinach dwu badanych odmian koniczyny. Wykazano, że zawartość tych dwu estrogenów jest skorelowana dodatnio $r = 0,21$ ($r_{0,01} = 0,13$). Występują jednak osobniki o wysokiej zawartości tylko jednego z dwu badanych estrogenów. Dla celów selekcyjnych należy więc po wstępnej selekcji osobników o niskiej zawartości formononetyny, przeprowadzić również test na zawartość biochaniny A.

LITERATURA

- Bennetts M. W., Underwood C. J., Shier F. L., 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 22: 2-8.
- Chang C., Suzuki A., Kumi S., Tamura S., 1969. Chemical studies on "Clover sickness". *Agr. Biol. Chem.*, 24: 398-408.
- Francis C. M., 1973. The influence of isoflavone glycosides on the taste of subterranean clover. *J. Sci. Fd. Agric.* 24: 1235-1240.
- Górski P. M., Burda S., Jurzysta M., Płoszyński M., 1988. Izolacja wzorców oraz metody oznaczania zawartości izoflawonów w koniczynie czerwonej. Instrukcja Wdrożeniowa 151/88, Wyd. IUNG, Puławy.
- Jurzysta M., Burda S., Żurek J., Płoszyński M., 1988. Występowanie izoflawonów w krajowych gatunkach koniczyny. *Acta Agrobot.* 44: 77-90.
- Kemphorne O., 1969. An introduction to genetic statistics. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa.
- Shutt D. A., Weston R. H., Hogan J. P., 1970. Quantitative aspects of phyto-oestrogen metabolism in sheep fed on subterranean clover (*Trifolium subterraneum* cult. Clare) or red clover (*Trifolium pratense*). *Aust. J. Agric. Res.*, 21: 713-722.