Zawartość izoflawonów w materiałach hodowlanych koniczyny czerwonej (*T. pratense* L.)

STANISŁAW BURDA¹, SZYMON SUCHECKI²

¹ Zakład Biochemii i Jakości Plonów, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa,
Osada Pałacowa, 24-100 Puławy,

² Przedsiębiorstwo Hodowlano Nasienne w Lublinie Spółka z o.o.,
Stacja Hodowli Roślin w Palikijach, 24-204 Wojciechów Lubelski

Otrzymano dnia 10.04.1996

Burda S.¹, Suchecki S.² (¹Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Biochemistry Department, Osada Pałacowa, 24-100 Puławy, Poland; ²Plant Breeding and Seed Production Company in Lublin, Plant Breeding Station Palikije, 24-204 Wojciechow Lubelski, Poland). Acta Agrobotanica 49 (1-2): 89-94, 1996.
The content of isoflavones in red clover (T. pratense L.) breeding material

Abstract

The contents of four isoflavones: daidzein, genistein, formononetin and biochanin A were analysed in breeding stocks of red clover with the purpose to find stocks with the highest and lowest levels of these compounds. The total content of the isoflavones in twenty nine stocks studied, varied within the range of 0.70 to 1.19% D.M.

WSTĘP

W organach zielonych koniczyny czerwonej występują izoflawony wykazujące działanie estrogenne (Jurzysta i in. 1988, Burda i in. 1991). Ich zawartość jest na tyle wysoka, że mogą powodować zaburzenia płodności i choroby u zwierząt (Burda i Ścibior 1992, Kallela i in. 1981, Petterson i in. 1984). Ponieważ uprawiane w Polsce odmiany koniczyny czerwonej są stosunkowo mało zróżnicowane pod względem zawartości izoflawonów przebadano zawartość tych substancji w 29 rodzajach hodowlanych, ze Stacji Hodowli Roślin Palikije, wyprowadzonych z krzyżówek odmian polskich i zagranicznych. Badania miały na celu poszukiwanie materiału o bardzo niskiej i bardzo wysokiej zawartości izoflawonów, mogącego stanowić materiał wyjściowy do wychodowania dwóch populacji skrajnie różniących się poziomem tych związków. Populacje takie byłyby bardzo przydatne

do badań wpływu izoflawonów na odporność koniczyny czerwonej, na choroby grzybowe oraz do ustalenia dopuszczalnej zawartości tych substancji w paszy.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał do badań stanowiły rody hodowlane koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense* L.) wymienione w tabeli 1. Są one wynikiem krzyżowania odmian i rodów hodowlanych polskich (Bryza, Parka, 4/6/89, 4/6/86), francuskich (1889F, 1896F, 1900F, 1986F), szwajcarskich (Chalgins, Leisi, Lero, Mont Calme, Renova, Resistenta, Rutinowa) i jednego rodu słowackiego (PS55). Rośliny wysiano na przełomie marca i kwietnia 1995 roku w szklarni i w maju wysadzono na poletka doświadczalne w rozstawie 0,5 x 0,5 m. Materiał do badań (po 10 roślin z każdego rodu) zebrano pod koniec sierpnia. Po oddzieleniu liści od łodyg i kwiatów próby wysuszono w temperaturze 60°C i zmielono. Zawartość izoflawonów oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej po autohydrolizie i ekstrakcji 70% metanolem. Około 0,5 g suszu odważano na wadze analitycznej, przenoszono do kolby miarowej na 25 ml, zwilżano 8 ml wody i pozostawiano na 2 godziny. W tym czasie pod wpływem zawartego w materiale roślinnym enzymu zachodzi pełny rozpad glikozydów izoflawonów do wolnych aglikonów. Następnie zawartość kolby uzupełniano do kreski metanolem, kilkakrotnie mieszano i pozostawiano do następnego dnia. Około 1 ml ekstraktu pobranego z nad osadu, sączono i analizowano na zawartość izoflawonów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Stosowano zestaw do HPLC firmy Knauer (Niemcy) składający się z dwóch pomp typ 364, urządzenia do odgazowania rozpuszczalników, mieszalnika, termostatu do kolumn, kolumny chromatograficznej, detektora UV o zmiennej długości fali (model 87) i automatycznego podajnika próbek (Spark Holland BV) oraz komputera sterującego układem i gromadzącego dane. Rozdział prowadzono w układzie faz odwróconych na kolumnie o długości 250 mm i średnicy 4 mm z wypełnieniem LiChrosorb RP-18 o średnicy ziarna 10 mikrometrów (Merck, Niemcy), w temperaturze 50°C. Stosowano gradient liniowy od 100% roztworu A do 100% roztworu B w czasie 80 min. Roztwór A – 1% (v/v) kwas ortofosforowy w wodzie, roztwór B – 40% (v/v) acetonitryl (Backer, USA), 1% kwas ortofosforowy w wodzie. Przepływ 1 ml/min. Identyfikację pików na chromatogramie przeprowadzono na podstawie porównania czasów retencji i kochromatografii ze wzorcami oznaczanych izoflawonów. Krzywe wzorcowe do obliczeń zawartości poszczególnych składników wykonano dla zakresu stężeń 0-40 µg/ml stosując wzorce wyodrębnione z koniczyny czerwonej (G ó r s k i i in. 1989).

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Poziom analizowanych izoflawonów w liściach 29 rodów hodowlanych koniczyny czerwonej podano w tabeli 1. Zawartość poszczególnych związków w suchej

Tabela 1 – Table 1

Zawartość izoflawonów w badanych rodach hodowlanych koniczyny czerwonej.
The content of isoflavones in the studied breeding stocks of red clover

Badany materiał Examined material			Zawartość w % suchej masy Content in % D.M.			
Numer rodu Stock Number	Roślina mateczna Maternal plant	Zapylacz Pollinator	Daidzeina Daidzein	Genisteina Genistein	Formononetyna Formononetin	Biochanina A Biochanin A
1/92	4/6/89	Bryza	0.009	0.011	0.326	0.452
2/92	PS55	Bryza	0.008	0.013	0.253	0.423
3/92	1889F	Bryza	0.006	0.014	0.305	0.420
4/92	1896F	Bryza	0.007	0.016	0.307	0.487
5/92	1900F	Bryza	0.005	0.013	0.343	0.522
6/92	Lero	Bryza	0.006	0.011	0.338	0.395
8/92	Mont Calme	Bryza	0.006	0.013	0.328	0.504
9/92	Renova	Bryza	0.012	0.017	0.471	0.563
10/92	Chalgins	Bryza	0.006	0.013	0.323	0.605
11/92	Rutinova	Bryza	0.013	0.017	0.379	0.475
12/92	Resistentia	Bryza	0.006	0.016	0.418	0.489
13/92	4/6/86	Parka	0.005	0.015	0.547	0.506
14/92	PS55	Parka	0.006	0.016	0.373	0.516
15/92	1889F	Parka	0.006	0.011	0.396	0.413
16/92	1896F	Parka	0.006	0.032	0.369	0.528
17/92	1900F	Parka	0.006	0.009	0.423	0.519
19/92	Leisi	Parka	0.005	0.014	0.507	0.668
20/92	Mont Calme	Parka	0.006	0.016	0.350	0.495
21/92	Renova	Parka	0.008	0.015	0.406	0.647
22/92	Chalgins	Parka	0.005	0.012	0.367	0.372
23/92	Rutinova	Parka	0.003	0.020	0.329	0.511
24/92	Resistentia	Parka	0.002	0.021	0.272	0.672
25/92	4/6/89	Renova	0.005	0.018	0.393	0.519
27/92	1889F	Renova	0.006	0.012	0.428	0.477
28/92	1986F	Renova	0.008	0.014	0.485	0.472
29/92	1900F	Renova	0.008	0.019	0.500	0.553
30/92	Rutinova	Renova	0.008	0.016	0.244	0.553
31/92	Lero	Rutinova	0.009	0.012	0.406	0.673
32/92	Leisi	Rutinova	0.004	0.016	0.267	0.602
NUR _{0,05} – LSD _{0,05}			0.002	0.002	0.021	0.032

masie wahała się w granicach: daidzeiny od 0,002% do 0,013%, genisteiny od 0,009% do 0,032%, formononetyny od 0,253% do 0,547 % i biochaniny A od 0,372% do 0,668%. Aktywność estrogenna poszczególnych izoflawonów nie jest taka sama. Genisteina i daidzeina są bardziej aktywne niż ich metylowe pochodne formononetyna i biochanina A (B i c k o f f i in. 1962). Ponadto odmienny jest metabolizm w organizmie zwierzęcym 5-hydroksyzoflawonów (genisteiny i biochaniny A), a inny 5-deoksyzoflawonów (daidzeiny i formononetyny). Te ostatnie są przekształcane w związki o aktywności estrogennej znacznie większej niż wyjściowe izoflawony, w eugenol i dimetyloangolenseinę (S h u t t i in. 1970). Te właśnie metabolity są odpowiedzialne za objawy hiperestrogenizmu u zwierząt. Genisteina i biochanina A (5-hydroksyzoflawony) ulegają, w procesie detoksykacji zachodzącym w wątrobie, degradacji do prostych fenoli, całkowicie nieaktywnych estrogenie (B r a d e n i in., 1967). Mechanizm detoksykacji osiąga pełną sprawność po kilku dniach po podaniu fitoestrogenów. Przyjmując opisany wyżej model działania fitoestrogenów można założyć, że istotna, ze względu na zagrożenie hiperestrogenizmem zwierząt karmionych koniczyną czerwoną, jest zawartość daidzeiny i formononetyny. Dlatego ocenę badanych rodów koniczyny czerwonej przeprowadzono na podstawie zawartości tych dwóch izoflawonów. Najniższą sumę zawartości formononetyny i daidzeiny stwierdzono w rodach:

30/92 – Rutinowa x Renova	– 0.252% (0.244% formononetyny + 0.008% daidzeiny)
2/92 – PS55 x Bryza	– 0.261% (0.253% formononetyny + 0.008% daidzeiny)
32/92 – Leisi x Rutinowa	– 0.271% (0.267% formononetyny + 0.004% daidzeiny)
24/92 – Resistanta x Parka	– 0.274% (0.272% formononetyny + 0.002% daidzeiny)
a najwyższą w rodach:	
13/92 – 4/6/86 x Parka	– 0.552% (0.547% formononetyny + 0.005% daidzeiny)
19/92 – Leisi x Parka	– 0.512% (0.507% formononetyny + 0.005% daidzeiny)
29/92 – 1900F x Renova	– 0.508% (0.500% formononetyny + 0.008% daidzeiny)

Stwierdzona maksymalna różnica w zawartości formononetyny i daidzeiny wynosi ponad 100% jest jednak niższa niż oczekiwana. Do badań na zwierzętach i obserwacji odporności roślin na choroby korzystna byłaby zawartość formononetyny poniżej 0,2% w populacji o niskiej zawartości izoflawonów i około 1% w populacji o wysokiej koncentracji tych związków. W tabeli 2 podano wyniki analizy wariancji dotyczące wpływu formy matecznej na zawartość formononetyny w analizowanych krzyżówkach. Wynika z niej, że źródłem niskiej zawartości formononetyny może być 6 odmian (Rutinowa, Mont Calme, Chalgins, Resistanta, Lero i Leisi) i cztery

rody hodowlane (PS55, 1896F, 4/6/89 i 1889F). Tworzą one jednorodną statystycznie grupę. Źródół wysokiej zawartości formononetyny należy szukać w odmianie Renova i rodach hodowlanych 4/6/86, 1986F i 1900F. Rola zapylacza na podstawie przeprowadzonych badań trudna jest do jednoznacznego sformułowania.

Tabela 2 – Table 2

Analiza wariancji – wpływ formy matecznej na zawartość formononetyny w krzyżówkach
The analysis of variance – the influence of maternal form on the formononetin content in cross-breeding forms

Forma mateczna Maternal form	Średnia zawartość formononetyny w % s.m. Average content of formononetin in % D.M.	NUR, $\alpha = 0.05$ LSD, $\alpha = 0.05$
PS55	0.313a	0.059
Rutinova	0.317a	0.049
1896F	0.338ab	0.059
Mont Calme	0.339ab	0.059
Chalgins	0.345abc	0.059
Resistenta	0.345abc	0.059
4/6/89	0.360abc	0.059
Lero	0.372abc	0.059
1889F	0.377abc	0.049
Leisi	0.387abc	0.059
1900F	0.422bcd	0.049
Renova	0.439bcd	0.059
1986F	0.485cd	0.084
4/6/86	0.547d	0.084
Liczby oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy $P = 0,05$ Numbers followed by the same letters don't differ at 5 % level of significance		

Streszczenie

Analizowano zawartość czterech izoflawonów: daidzeiny, genisteiny, formononetyny i biochaniny A w dwudziestu dziewięciu rodach hodowlanych koniczyny czerwonej w celu wytypowania rodów o najniższym i najwyższym poziomie tych związków do dalszych prac hodowlanych. Suma zawartości izoflawonów w badanym materiale wahała się w granicach od 0,70 do 1,19% s.m.

Podziękowanie. Autorzy składają serdeczne podziękowania pani Barbarze Wojeńsk za pomoc techniczną w realizacji niniejszej pracy.

LITERATURA

- Bickoff E.M., Livingston A.L., Hendrickson A.P., Booth A.N., 1962. Relative potencies of several oestrogen-like compounds found in forages. J. Agric. Food Chem. 10: 410-412.
 Braden A.W.H., Hart N.K., Lamberton J.A., 1967. The oestrogenic activity and metabolism of certain isoflavones in sheep. Aust. J. Agric. Res. 18: 348-355.
 Burda S., Górski P.M., Jurzysta M., Płoszyński M., 1991. Zawartość formononetyny w wybranych odmianach di- i tetraploidalnej koniczyny czerwonej. Acta Agrobotanica 44: 81-85.

- Burda S., Scibior H., 1992. Zawartość izoflawonów w polskich odmianach koniczyny czerwonej. Materiały 49 Zjazdu PTBot., Kielce 1992.
- Górski P.M., Burda S., Jurzysta M., Płoszyński M. 1989. Metoda wyodrębniania izoflawonów z koniczyny czerwonej jako standardów analitycznych. Acta Agrobotanica 42: 191-196.
- Jurzysta M., Burda S., Żurek J., Płoszyński M., 1988. Występowanie izoflawonów w krajowych gatunkach koniczyny. ibid. 41 (1): 77-90.
- Kallala K., Heininen K., Saloniemä H., 1981. Plant oestrogens; the cause of decreased fertility in cows. A case report. Nordisk Veterinärmedicin 36: 124-129.
- Petterson H., Holmberg T., Kiessling K.H., Rutqvist L., 1984. Vaxtostrogener i foder och reproduktionsstörningar hos idisslare. Svensk Veterinärtidning 36: 677-683.
- Shutt D.A., Weston R.A., Hogan J.P., 1970. Quantitative aspects of phyto-oestrogen metabolism in sheep fed on subterranean clover (*Trifolium subterraneum*, cultivar Clare) or red clover (*Trifolium pratense*). Aust. J. Agric. Res. 21: 713-722.