Wpływ terminu zbioru na zawartość izoflawonów w liściach koniczyny czerwonej

STANISŁAW BURDA*, HALINA ŚCIBIOR**, STANISŁAW BAWOLSKI**

*Zakład Biochemii i Jakości Plonów, **Zakład Uprawy Roślin Pastewnych, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach, Osada Pałacowa 24-100, Puławy

(Otrzymano 17.09.1997)

Burda S.*, Ścibior H.**, Bawolski S.** (*Biochemistry Department, **Department of Forage Crop Production, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Osada Pałacowa, 24-100 Puławy, Poland). *Acta Agrobotanica* 50 (1-2): 87-92, 1997. *The influence of harvest term on the isoflavone content in red clover leaves.*

A b s t r a c t

Influence of the harvest term of red clover on content of five isoflavones in leaves was examined in microfields experiment. It was found that the content of these compounds in leaves of red clover collected in flowering stage was the same as in clover collected in the budding stage, in the first cut. In the second cut the isoflavone content was determined by phase of plant development. The level of formononetin, biochanin A and pratensein in the second cut was higher than in the first cut, but the content of daidzein and genistein was lower. The cutting date of the first cut can influence on the isoflavone content at the second cut. Tetraploid varieties accumulated more isoflavones than diploid varieties.

WSTĘP

Występujące w roślinach z rodzaju *Trifolium* izoflawony: formononetyna, biochanina A, daidzeina, genisteina i pratenseina wykazują działanie estrogenne, analogiczne do działania endogennych hormonów zwierzęcych. Z uprawianych w Polsce gatunków koniczyny tylko koniczyna czerwona (*Trifolium pratense* L.) zawiera tak znaczne ilości tych związków, że mogą one przy karmieniu zwierząt samą koniczyną być przyczyną zaburzeń płodności (Jurzysta i in. 1988, Burda i in 1991). Dedio i Clark (1968) sugerują, że poziom formononetyny i biochaniny A rośnie w toku wzrostu roślin, osiągając maksimum przed kwitnieniem. Zatem termin zbioru koniczyny czerwonej może wpływać na zawartość izoflawonów w paszy.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie mikropoletkowe przeprowadzono w latach 1986-1990 w dwóch trzyletnich cyklach, w Puławach, na madzie brunatnej średniej zaliczanej do kompleksu pszennego bardzo dobrego (kompleks 1). Powierzchnia poletka do zbioru wynosiła 3 m². Badano 3 odmiany diploidalne koniczyny czerwonej (Hruszowska, Parka, Nike), 3 odmiany tetraploidalne (Jubilatka, Radyka, Ulka) oraz jeden ród hodowlany PGR 184 (tetraploid). Koniczynę bez rośliny ochronnej wysiano w pierwszym cyklu 14.05.1986, w drugim 16.05.1988 r. Nasiona wysiewano siewnikiem jednorzędowym w ilości 6 mln szt./ha. Głębokość wysiewu 1-1,5 cm, rozstaw rzędów 12,5 cm. Przed-siewne nawożenie mineralne stosowano jednorazowo w dawkach 60 kg P₂O₅ i 100 kg K₂O w przeliczeniu na 1 ha. W latach pełnego użytkowania koniczynę nawożono fosforem i potasem wysiewając na wiosnę 80 kg/ha P₂O₅ w całej dawce i 100 kg/ha K₂O w dwóch równych dawkach po 50 kg/ha na wiosnę i po zbiorze pierwszego pokosu. Analizowano zawartość izoflawonów w liściach koniczyny z dwóch pokosów zbieranych w początkach pąkowania lub w początkach kwitnienia. Ponieważ uwzględniano wpływ terminu pierwszego pokosu na zawartość izoflawonów w drugim pokosie, rozróżniono pięć terminów zbioru oznaczanych dalej symbolami: 1P – pierwszy pokos zbierany w początkach pąkowania, 1K – pierwszy pokos zbierany w początkach kwitnienia, 2P(P) – drugi pokos zebrany w początkowej fazie pąkowania po pierwszym pokosie zebrany w początkach pąkowania, 2K(P) – drugi pokos zbierany w początkach kwitnienia po pierwszym pokosie zbierany w początkach pąkowania, 2K(K) – drugi pokos zbierany w początkach kwitnienia po pierwszym pokosie zebrany również w początkach kwitnienia. Nie badano kombinacji 2P(K) – drugi pokos zbierany w fazie pąkowania po pierwszym pokosie zbierany w fazie kwitnienia. Daty zbioru podano w tabeli 1. Po zbiorze oddzielono liście od łodyg i materiał roślinny suszono w 50°C. Zawartość izoflawonów oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej po autohydrolizie i ekstrakcji 70 % metanolem. Około 1 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 2 ml ekstraktu pobranego z nad osadu, sączono i analizowano na zawartość izoflawonów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych, na chromatografii cieczowym typ 302 produkcji IChF-PAN. Kolumna o długości 250 mm i średnicy 3,8 mm z wypełnieniem RP-18 o średnicy ziarna 10 mm. Detektor UV-254. Faza ruchoma metanol-woda-kwas octowy (50: 39: 1), szybkość przepływu 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 mg/ml stosując wzorce wyodrębnione z koniczyny czerwonej (Górski i in. 1989).

Tabela 1 – Table 1
 Daty zbioru koniczyny czerwonej
 Date of the red clover harvest

Termin zbioru Term of the cut	Data zbioru Date of the harvest			
	1987	1988	1989	1990
1P	15.06	31.05	30.05	28.05
1K	22.06	8.06	14.06	11.06
2P(P)	29.07	12.07	6.07	12.07
2K(P)	4.08	18.07	20.07	23.07
2K(K)	4.08	18.07	20.07	23.07

1P – pierwszy pokos zbierany w początkach pąkowania, 1K – pierwszy pokos zbierany w początkach kwitnienia, 2P(P) – drugi pokos zebrany w początkowej fazie pąkowania po pierwszym pokosie zebrany w początkach pąkowania, 2K(P) – drugi pokos zbierany w początkach kwitnienia po pierwszym pokosie zbieranym w początkach pąkowania, 2K(K) – drugi pokos zbierany w początkach kwitnienia po pierwszym pokosie zebrany również w początkach kwitnienia.

1P – first cut collected in budding stage, 1K – first cut collected in flowering stage, 2P(P) – second cut collected in budding stage after first cut collected in budding stage, 2K(P) – second cut collected in flowering stage after first cut collected in budding stage, 2K(K) – second cut collected in flowering stage after first cut collected in flowering stage.

WYNIKI I DYSKUSJA

Analiza ilościowa pięciu izoflawonów w badanych obiektach wykazała bardzo dużą zmienność w poziomie poszczególnych związków. Zawartość formononetyny wahała się w granicach 0,30-1,30 % s.m., biochaniny A od 0,16 do 0,95 %, a pozostałych trzech izoflawonów w granicach 0,03-0,25 %. Analiza statystyczna wyników wykazała istotny wpływ terminu zbioru na poziom izoflawonów w liściach koniczyny czerwonej (tabela 2). W pierwszym pokosie zawartość wszystkich pięciu związków była taka sama przy zbiorze w fazie kwitnienia (1K) jak przy zbiorze w fazie pąkowania (1P). Jeżeli pierwszy pokos był zebrany w fazie pąkowania to zawartość formononetyny i biochaniny A w roślinach z drugiego pokosu była istotnie wyższa przy zbiorze w początkach pąkowania 2P(P) niż przy zbiorze w fazie kwitnienia - 2K(P). D e d i o i C l a r c k (1968) znaleźli maksimum zawartości dominujących izoflawonów w koniczynie czerwonej przed kwitnieniem roślin, natomiast S c h u l t z (1965) podaje, że poziom tych związków w liściach jest stały. Ta rozbieżność wyników sugeruje, że na zmiany poziomu izoflawonów w liściach koniczyny czerwonej mogą wpływać warunki wegetacji roślin.

Generalnie, w koniczynie z drugiego pokosu zawartość formononetyny, biochaniny A i pratenseiny była wyższa, natomiast zawartość genisteiny i daidzeiny istotnie niższa niż w pierwszym pokosie. Jedyny wyjątek stanowi średnia zawartość formononetyny w koniczynie zbieranej w terminie 2K(P). O ile zawartość biochaniny A i pratenseiny w każdym z czterech lat doświadczenia była zawsze w drugim pokosie wyższa lub taka sama jak w pierwszym, to zawartość formononetyny w drugim

Tabela 2 – Table 2

Wpływ terminu zbioru na zawartość izoflawonów w liściach koniczyny czerwonej (średnie z czterech lat)
The influence of harvest term on the isoflavone content in red clover leaves (means of four years)

Termin zbioru Term of the cut	Zawartość w % s.m. liści Content in % of D.M.				
	Formononetyna Formononetin	Biochanina A Biochanin A	Genisteina Genistein	Daidzeina Daidzein	Pratenseina Pratensein
1P	0,82 b	0,48 a	0,17 d	0,13 b	0,09 a
1K	0,82 b	0,45 a	0,15 cd	0,13 b	0,08 a
2P(P)	1,01 d	0,69 c	0,12 a	0,10 a	0,13 b
2K(P)	0,76 a	0,58 b	0,13 ab	0,11 a	0,13 b
2K(K)	0,90 c	0,62 b	0,14 bc	0,11 a	0,13 b

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

Objaśnienia symboli terminów zbioru jak w tabeli 1

For explanations of harvest term see table 1

pokosie zbieranym w terminie 2K(P) w latach 1988 i 1989 była istotnie niższa niż w pierwszym pokosie. W obu tych latach okres odrostu koniczyny po pierwszym pokosie zebrany w fazie pąkowania do zbioru drugiego pokosu w początkowej fazie kwitnienia był najkrótszy w całym doświadczeniu (36 i 40 dni). Szybkie przejście roślin do fazy generatywnej mogło być spowodowane niekorzystnymi warunkami siedliskowymi i wpłynąć depresyjnie na biosyntezę izoflawonów. Obserwowany w drugim pokosie wzrost zawartości formononetyny i biochaniny A przy równoczesnym obniżeniu zawartości daidzeiny i genisteiny sugeruje, że w roślinach odrastających po pierwszym pokosie metylacja daidzeiny i genisteiny prowadząca do powstania finalnych produktów biosyntezy – formononetyny i biochaniny A, zachodzi w większym stopniu niż przy wiosennym odroście pierwszego pokosu.

Tabela 3 – Table 3

Zawartość izoflawonów w badanych odmianach koniczyny czerwonej (średnie z czterech lat)
An average isoflavone content in the examined cultivars of red clover (means of four years)

Odmiana Cultivar	Zawartość w % s.m. liści Content in % of D.M.				
	Formononetyna Formononetin	Biochanina A Biochanin A	Genisteina Genistein	Daidzeina Daidzein	Pratenseina Pratensein
Hruszowska	0,72 a	0,48 a	0,13 ab	0,10 a	0,10 a
Parka	0,84 b	0,50 ab	0,13 ab	0,11 ab	0,10 a
Nike	0,87 bc	0,58 c	0,12 a	0,11 ab	0,12 abc
Jubilatka	0,93 cd	0,54 abc	0,16 b	0,12 bc	0,11 ab
Radyka	0,85 b	0,56 bc	0,14 ab	0,12 bc	0,11 abc
Ulka	0,88 bcd	0,59 c	0,14 ab	0,12 bc	0,12 bc
PGR 184*	0,94 d	0,67 d	0,16 b	0,13 c	0,13 c

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

* Ród hodowlany

* Breeding stock

Stwierdzono również istotne różnice w zawartości izoflawonów między badanymi odmianami (tabela 3). Ogólnie odmiany tetraploidalne nagromadzają więcej tych związków niż diploidalne. Ponadto, obserwowany w drugim pokosie wzrost zawartości izoflawonów posiadających w pierścieniu B grupę metoksylową był większy w przypadku odmian tetraploidalnych niż w przypadku odmian diploidalnych. Średni wzrost poziomu formononetyny, biochaniny A i pratenseiny wynosił dla odmian diploidalnych odpowiednio 0,22, 0,08 i 0,02%, a dla odmian tetraploidalnych 0,36, 0,31 i 0,06% s.m. Najniższą zawartość izoflawonów obserwowano w najstarszej polskiej odmianie – Hruszowska. Pozostałe dwie odmiany diploidalne Parka i Nike wpisane do rejestru odmian w roku 1978 zawierają w liściach wyraźnie więcej tych substancji. Ród hodowlany PGR 184 charakteryzował się najwyższym poziomem wszystkich pięciu izoflawonów. Aczkolwiek stwierdzone w doświadczeniu różnice między badanymi odmianami w zawartości izoflawonów są statystycznie istotne to badania innych autorów wykazują, że zróżnicowanie międzyodmianowe koniczyny czerwonej pod względem tej cechy może być znacznie większe (S a c h s e 1974, D e d i o i C l a r c k 1968).

Wyniki doświadczenia wykazały, że poziom izoflawonów w liściach koniczyny czerwonej charakteryzuje duża zmienność. Uwarunkowana genetycznie zawartość tych związków jest silnie modyfikowana przez warunki wegetacji. Pierwszy pokos daje paszę mniej estrogenną niż drugi, w którym można się spodziewać wyższej zawartości formononetyny, biochaniny A i pratenseiny.

Izoflawony uważane są za substancje pełniące w roślinach funkcję ochronną przed porażeniem patogenami grzybowymi (N a i m i i n. 1974). Dlatego możliwe jest w toku hodowli odpornościowej niezamierzone podwyższanie ich zawartości w nowych odmianach. Przebadany w doświadczeniu materiał jest zbyt skąpy do jednoznacznego potwierdzenia takiej tezy, jednak znacznie wyższy poziom izoflawonów w odmianach Nike i Parka w porównaniu z najstarszą badaną odmianą diploidalną-Hruszowską, oraz bardzo wysoka zawartość tych związków w rodzie hodowlanym PGR 184 sugerują możliwość występowania takiej tendencji w hodowli krajowych odmian koniczyny czerwonej.

Streszczenie

W doświadczeniu mikropoletkowym badano wpływ terminu zbioru na zawartość estrogennych izoflawonów w liściach sześciu odmian i jednego rodu hodowlanego koniczyny czerwonej. Stwierdzono, że w pierwszym pokosie zawartość tych związków jest taka sama przy zbiorze w fazie pąkowania jak i w fazie kwitnienia. W drugim pokosie poziom formononetyny, biochaniny A i pratenseiny jest wyższy, natomiast poziom daidzeiny i genisteiny niższy niż w pierwszym pokosie. Termin zbioru pierwszego pokosu może nieznacznie wpływać na zawartość izoflawonów w drugim pokosie. Odmiany tetraploidalne nagromadzają więcej izoflawonów niż diploidalne.

Podziękowanie: Autorzy serdecznie dziękują pani Barbarze Wojewódka za pomoc techniczną w realizacji niniejszej pracy.

LITERATURA

- 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.
- Dedio J., Clark K. W. 1968. Biochanin A and formononetin content in red clover varieties at several stages. *Can. J. Plant Sci.* 48:175
- 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. *Acta Agrobotanica* 41: 77-90.
- Naim M., Gestetner B., Zilkah S., Birk Y., Bondi A. 1974. Soybean Isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity. *J. Agr. Food Chem.* 22: 806-810.
- Sachse J. 1974. Die bestimmung östrogenen Isoflavone und Cumöstrol in Klee (*Trifolium pratense* L. und *Trifolium repens* L.). *J. Chromatography* 96: 123-136.
- Schultz G. 1965. Oestrogenwirksame Isoflavone in *Trifolium pratense* (Rotklee). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 72: 246-251.