

Vsebnost sekundarnih metabolitov – izoflavonov pri črni detelji (*Trifolium pratense* L.) za uporabo v farmaceutiki

Klavdija POKLUKAR¹, Lovro SINKOVIČ², Tanja ZADRAŽNIK², Vladimir MEGLIČ², Jelka ŠUŠTAR-VOZLIČ²

Uvod

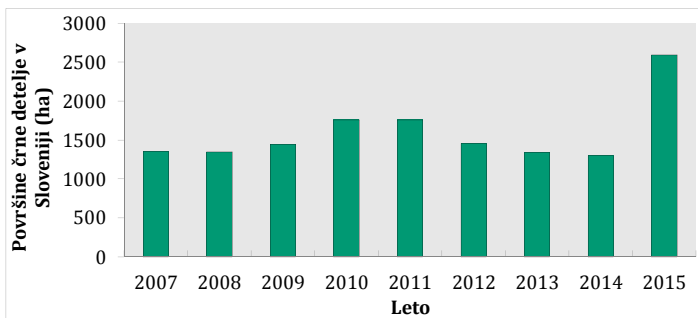
Črna detelja (*Trifolium pratense* L.) je pomembna krmna rastlina, ki v zadnjem času pridobiva na pomenu, saj vsebuje veliko surovih beljakovin, številne vitamine in minerale. Vsebuje pa tudi sekundarne metabolite, med katerimi so še posebej zanimivi izoflavoni, ki delujejo kot fitoestrogeni. Na Kmetijskem inštitutu Slovenije (KIS) poteka fenotipizacija in genotipizacija genskih virov črne detelje, ki jih hranimo v Slovenski rastlinski genski banki (SRGB) na KIS ter vrednotenje vsebnosti izoflavonov.

Informacije o vsebnosti izoflavonov v genskih virih črne detelje iz SRGB, ki so bili zbrani na različnih lokacijah po Sloveniji s specifičnimi rastnimi razmerami, bodo uporabne pri nadaljnjem žlahtnjenju novih sort.



Črna detelja v Sloveniji in Slovenski rastlinski genski banki (SRGB)

V zadnjih letih se pridelava črne detelje v Sloveniji povečuje (slika 1). K povečanju pridelave so precej pripomogli ukrepi kmetijsko-okoljsko-podnebnih plačil. V Slovenski rastlinski genski banki na KIS in Biotehniški fakulteti se trenutno hrani 114 genskih virov črne detelje. V Sloveniji so na Sortno listo poljščin, zelenjadnic, sadnih rastlin in trte za leto 2016 vpisane tri sorte črne detelje: 'Poljanka', 'Zoja' in 'Global'.



Slika 1: Površine zemljišč (ha) s črno deteljo v Sloveniji v obdobju 2007-2015 (Agencija RS..., 2007-2014; Agencija RS..., 2015)

Sklepi

Črna detelja je bogat vir fitoestrogenskih izoflavonov, zato so informacije o njihovi vsebnosti pomembne pri žlahtnjenju novih sort in za komercialno izkoriščanje v farmaceutiki. Vsebnost izoflavonov se razlikuje med posameznimi genskimi viri, odvisna je tudi od fenofaze v času vzorčenja. Na profil in vsebnost izoflavonov vpliva tudi način priprave vzorca. V naši raziskavi smo optimizirali metodiko priprave vzorcev, ki jo bomo uporabili v nadaljnji analizi izoflavonov slovenskih ekotipov črne detelje, ki jih hranimo v SRGB na KIS.

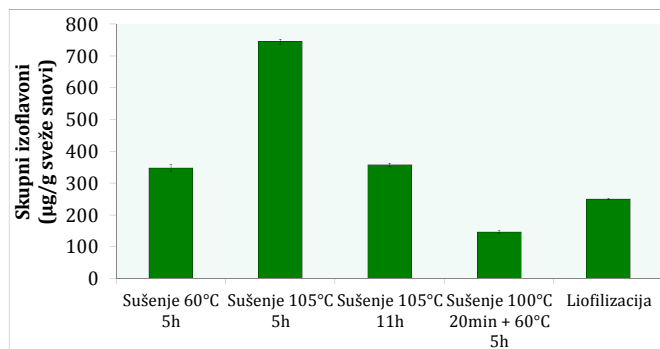
S poznavanjem genetske in morfološke raznolikosti črne detelje lahko določimo najbolj obetavne genske vire in lastnosti za bodoče žlahtnjenje. Na podlagi preliminarnih rezultatov raznolikosti slovenskih ekotipov črne detelje smo ugotovili, da je zaradi tujeprašne narave črne detelje morfološka in genetska raznolikost znotraj in med ekotipi ter sortami velika.

Morfološka in genetska raznolikost črne detelje

V letu 2013 je na KIS in Biotehniški fakulteti potekala raziskava genetske raznolikosti črne detelje iz SRGB z mikrosatelitnimi markerji. Genetska raznolikost znotraj populacij ekotipov iz različnih lokacij po Sloveniji je bila velika, medtem ko je bila raznolikost med populacijami manjša. V letu 2016 smo v raziskavo genetske raznolikosti vključili dodatne genske vire in začeli s fenotipizacijo 24 genskih virov črne detelje iz SRGB KIS.

Vsebnost sekundarnih metabolitov

Na KIS poteka vrednotenje vsebnosti izoflavonov v izbranih genskih virih črne detelje iz zbirke SRGB KIS. V preliminarni raziskavi smo preizkušali različne načine priprave vzorcev za nadaljnjo ekstrakcijo izoflavonov. Sorto 'Poljanka' smo vzorčili v vegetativni fenofazi pred prvim odkosom, preizkusili smo različne temperature in čas sušenja vzorcev. Izoflavone smo ekstrahirali s pomočjo 70 % metanola, njihovo vsebnost smo določili z LC-MS/MS analizo. Različni načini sušenja so se izkazali za ključen faktor pri določanju vsebnosti izoflavonov. Za najboljši način se je izkazalo **sušenje pri 105 °C/5 h**, kjer je bila vsebnost skupnih izoflavonov daleč najvišja (slika 2). Pri slovenskih ekotipih črne detelje so prevladovali naslednji izoflavoni: **formononetin, biochanin A in ononin**, v manjši meri so bili prisotni prunetin, daidzin ter genistin. Vsebnost daidzeina, genisteina in glicitina je bila pod mejo detekcije.



Slika 2: Vsebnost skupnih izoflavonov (µg/g sveže mase) pri sorti črne detelje 'Poljanka' v odvisnosti od načina sušenja oz. predpriprave vzorca

¹Dipl. bioteh. (UN), Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana; e-pošta: klavdijapoklukar@gmail.com

²Dr., Oddelek za poljedelstvo, vrtnarstvo, genetiko in žlahtnjenje, Kmetijski Inštitut Slovenije, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana, e-pošta: lovro.sinkovic@kis.si

³Dr., prav tam, e-pošta: tanja.zadraznik@kis.si

⁴Izr. prof., dr., prav tam, e-pošta: vladimir.meglic@kis.si

⁵Izr. prof., dr., prav tam, e-pošta: jelka.sustar-vozluc@kis.si

Zahvala: Zahvaljujemo se dr. Špeli Velikonja Bolta za pomoč pri izvedbi LC-MS/MS analiz. Raziskava je bila opravljena s pomočjo sredstev ARRS, PS 'Agrobiodiverziteta' (P4-0072) ter opreme IS 'Ekofiziologija in varstvo okolja'.

Literatura: Agencija RS za kmetijske trge in razvoj podeželja, baza Ukrepov, atributni podatki D obrazca zbirne vloge. 2007 – 2014

Agencija RS za kmetijske trge in razvoj podeželja, baza Zahtev, atributni podatki obrazca zbirne vloge za glavni posevek. 2015