

Žemdirbystė ir augalininkystė • Agriculture and Plant Growing

Individualių gliukozinolatų kaupimosi dėsningumai ir jų tarpusavio santykis rapsų sėklose

Bronislava Butkutė,

Zenonas Dabkevičius

Lietuvos žemdirbystės institutas,

Instituto al. 1, Akademija

LT-58344 Kėdainių r.

El. paštas: brone@lzi.lt,

dabkevicius@lzi.lt

Gliukozinolatai (GSL), kuriuos bastutiniai augalai sukaupia sėklose, skiriasi chemine sudėtimi. Individualūs gliukozinolatai ir jų skilimo produktai pasižymi nevienodu biologiniu aktyvumu ir toksiškumu.

Šio darbo tikslas – ištirti gliukozinolatų kompozicijas rapsų sėklose, įvertinti skirtingo toksiškumo gliukozinolatų kiekių įvairumą ir kaupimosi dėsningumą. Tam buvo įvertintas suminis bei aromatinių (tarp jų indolinių), alifatinių ir didesniais kiekiais aptinkamų individualių gliukozinolatų kiekis bei koncentracijų įvairavimas skirtingus GSL kiekius sukaupiančiose 0 ir 00 tipo veislių rapsų sėklose. Nustatyta, kad įvairių tipų veislių sėklose suminio GSL kiekio kitimą labiausiai nulemia alifatinių GSL ($y = 0,9682x - 3,2323$; $r = 0,998^{**}$) ir ypač progointrino ($y = 0,9848\ln(x) + 1,3034$; $r = 0,992^{**}$) kaupimasis. Panašus individualių gliukozinolatų ir suminio jų kiekio ir vienos 00 tipo veislės rapsų sėklose tarpusavio ryšys. Padidėjus suminiam gliukozinolatų kiekiui $1 \mu\text{mol g}^{-1}$, alifatinių gliukozinolatų koncentracija 00 tipo veislės rapsų sėklose padidėja $0,94 \mu\text{mol g}^{-1}$, progointrino – $0,64 \mu\text{mol g}^{-1}$, gliukonapino – $0,21 \mu\text{mol g}^{-1}$, o aromatinių – tik $0,06 \mu\text{mol g}^{-1}$. Procentinė toksiškų alifatinių dalis suminiame gliukozinolatų kiekyje didėja, o aromatinių – mažėja, didėjant suminiam gliukozinolatų kiekiui rapsų sėklose.

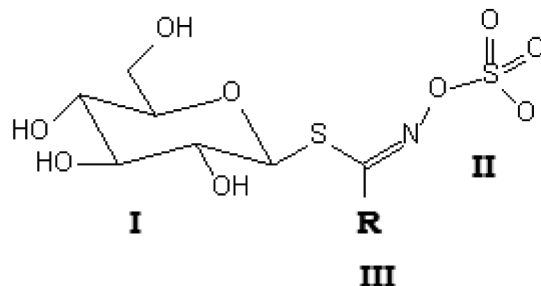
Raktažodžiai: rapsų sėklos, gliukozinolatai, suminis kiekis, alifatiniai, aromatiniai, individualūs

ĮVADAS

Gliukozinolatai – tai daugiau negu 120 skirtingos cheminės sudėties gamtinių junginių grupė. Juos sintetina daugelis dviskilčių augalų. Daugiausia gliukozinolatų randama *Capparales* augaluose, priklausančiuose *Tovariaceae*, *Resedaceae*, *Capparaceae*, *Moringaceae* ir *Brassicaceae* šeimoms (Brown, Morra, 2005; Fahey et al., 2001; Rodman et al., 1998). Gliukozinolatų sudėtyje yra siera, todėl jie svarbūs augalo savisaugai nuo kenkėjų, patogenų, nematodų ir piktžolių (Brown, Morra, 2005; Halkier, Gershenzon, 2006; Opinion..., 2008). Visa šių junginių grupė priskiriama tiogliukozidams: tai β -tiogliukozid-N-hidroksisulfatai arba cis-N hidroksiimino-sulfatų esteriai (Fahey et al., 2001).

Gliukozinolatų molekulė sudaryta iš trijų dalių (1 pav.): β -tiogliukozės arba β -D-tiogliukopiranozės, sulfonat-oksimo ir radikalo R, kurio pirmtakas – aminorūgštys (Fahey et al., 2001). Ši trečioji sudedamoji gliukozinolatų dalis yra skirtinga įvairiuose individualiuose junginiuose ir tuo sąlygoja gliukozinolatų įvairovę bei klasifikaciją. Radikalas gali būti alifatinis (pvz., alkil, alkenil, hidroksialkenil), aromatinis ar heteroaromatinis (pvz. benzil, feniletil, indolil). Paprastai kiekvienai augalų, kuriuose

aptinkama ši antrinių metabolitų klasė, rūšiai būdingi keli individualūs junginiai, kurie sudaro 50–90% suminio gliukozinolatų kiekio (Quinsac et al., 1995). Todėl gliukozinolatai gali būti specifiniais žymenimis augalų taksonomijos ir filogenijos tyrimuose (Fahey et al., 2001; Rodman et al., 1998) ar nustatant aliejinių augalų produkcijos, pvz., rapsų, užterštumą bastutinių šeimos piktžolėmis. Daugiausia rapsų sėklose randama progointrino, gliukonapino, gliukobrasikanapino, napoleiferino, 4-hidroksibrasicino. Suminis gliukozinolatų kiekis rapsų sėklose priklauso nuo metų sąlygų, šis veiksnys svarbus ir visų indivi-

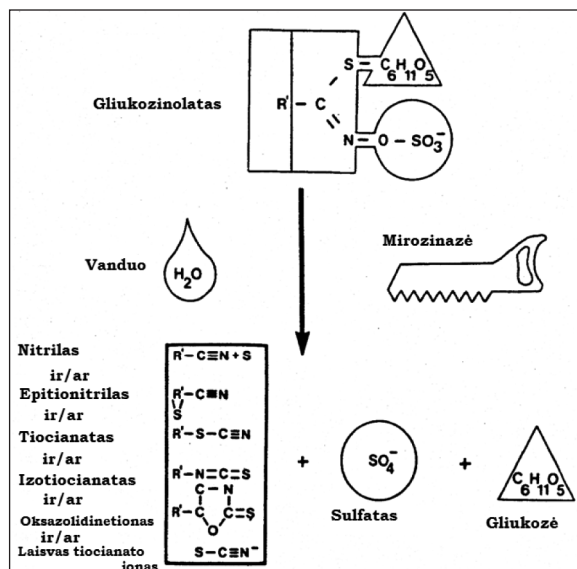


1 pav. Bendra gliukozinolatų struktūra

Fig. 1. The general structure of glucosinolates

dualių komponentų koncentracijoms (Werteker, Kramreither, 2002). Gliukozinolatų kompozicija rapsų sėklose įvairuoja taip pat dėl geografinių regionų ir auginimui naudotų technologijų (Taraz et al., 2006). Dar reikšmingesnis gliukozinolatų koncentracijos rapsų sėklose ir veislės ryšys. Akivaizdu, kad veislė turi didesnę įtaką alifatinųjų gliukozinolatų progoitrino ir gliukonapino koncentracijoms. Indolinių gliukozinolatų atstovo 4-hidroksigliukobrasicino koncentracijos mažiau priklauso nuo veislės (Werteker, Kramreither, 2002).

Gliukozinolatai stabilūs sveikose sėklose, nes jie ir juos ardantis fermentas tiogliukozidų gliukohidrolazė arba mirozinazė (EC 3.2.3.1) yra skirtinguose audiniuose: gliukozinolatai vakuolėse, o mirozinazė – idioplastuose, vadinamosiose mirozin-celėse (myrosin cell) (Thangstad et al., 1990; Ueda et al., 2006). Vienaip ar kitaip suardžius sėklą, drėgmė ir išlaisvinta mirozinazė gali greitai hidrolizuoti gliukozinolatus. Gliukozinolatų skilimo metu susidaro stochiometriniai D-gliukozės ir hidrosulfato jono kiekiai bei įvairūs agliukonai, tokie kaip izotiocianatai, nitrilai, tiocianatai ir kt. (2 pav.). Skilimo junginių sudėtis priklauso nuo hidrolizuoto gliukozinolato cheminės struktūros ir reakcijos sąlygų. Pavyzdžiui, esant pH, artimam neutraliam, indukuojamas izotiocianatų išsiskyrimas, rūgštinėje terpėje daugiau susidaro nitrilų, pastarųjų susidarymą ypač indukuoja geležies jonai (Selmar, 2005).



2 pav. Gliukozinolatų skilimas, veikiant mirozinazei. Pagal R. K. Downey
Fig. 2. The breakdown of glucosinolates by myrosinase. According to R. K. Downey

Biologiniu aktyvumu pasižymi ne patys gliukozinolatai, o jų skilimo produktai. Dažniausiai jie daro neigiamą poveikį gyvūnams. Gliukozinolatų toksiškumas žmonėms ir gyvūnams susijęs su tiocianatų, oksazolidintionų ir nitrilų susidarymu, pažeidus audinius (įskaitant kramtymą ir virškinimą). Šie junginiai sutrikdo jodo apykaitą (tiocianatai) ir skydliaukės hormonų T3 ir T4 sintezę (oksazolidintionai). Tai ilgainiui skatina hipotirodizmą ir skydliaukės padidėjimą (Halkier, Gershenzon, 2006; Opinion..., 2008). Ypač toksiški yra alifatinųjų gliukozinolatų skilimo produktai. Didesnės jų koncentracijos gali sukelti žinduolių embrionų žūtį, sumažinti dedeklių produktyvumą (Nugon-

Baudon, Rabot, 1994). Progoitrino skilimo produktas goitrinas (5-viniloksazolidin-2-tionas) yra vienas toksiškiausių GSL skilimo produktų. Dėl jo poveikio padidėja žiurkių kepenys, inkstai ir skydliaukė. Jis modifikuoja trijodotironiną, slopina jodo jungimąsi su tiroksino pirmtakais ir silpnina tiroksino sekreciją (Nugan-Baudon, Rabot, 1994). Alifatinųjų gliukozinolatų skilimo produktai alilizotiocianatai, aliltiocianatai ir alilizocianatai veikia kvėpavimo sistemą ir gali būti naudojami kaip biofumigantai prieš vabzdžius (Tsao et al., 2002).

Teigiama, kad aromatiniai ir indoliniai gliukozinolatai pasižymi antivėžinėmis savybėmis, apsauginiu efektu prieš nitro junginių poveikį, aktyvina kai kurių fermentų veiklą, gerina apetitą (Rosa et al., 1997; Tripathi, Mishra, 2007). Nustatyta, kad benzilzotiocianatas ir tiocianatas slopina navikų vystymąsi gyvūnuose, pažeistuose kancerogenų. Heteroaromatinių, t. y. indolinių, gliukozinolatų skilimo produktas indol-3-karbinolas skatina fermentų, inhibuojančių kancerogenines medžiagas benzo[a]pirenį ir aflatoksiną B_1 , aktyvumą (Keck, Finely, 2004; Takahashi et al., 1995). Indoliniai GSL yra svarbių fitohormonų pirmtakai bastutiniuose augaluose (Fahey et al., 2001; Krzymanski et al., 1999; Ljung et al., 2005).

Kadangi ypač toksiški yra alifatiniai gliukozinolatai bei jų skilimo produktai, kai kuriose šalyse išskirtinis dėmesys kreipiamas ne į suminį GSL kiekį, bet į kenksmingiausių – alifatinųjų gliukozinolatų kiekį (Krzymanski, 1995; Raney, Rakow, 1995). Į nepageidaujamų medžiagų sąrašą direktyvos 2002/32/EC priede įrašyti ne tik gliukozinolatai (visų junginių visuma), bet ir alifatinųjų gliukozinolatų skilimo produktai – alilizotiocianatai ir goitrinas (5-viniloksazolidin-2-tionas arba 5-VOT), tuo tarpu apie būtinumą eliminuoti indolinius GSL iš rapsų sėklų ar išspaudų iki šiol duomenų nėra (Krzymanski et al., 1999).

Rapsai yra svarbūs kaip aliejaus, skirto maisto reikmėms ir biokuro gamybai (39–52% sausosios sėklų masės), ir baltymų (16–28% sausosios sėklų masės) šaltinis (Butkutė, 2003). Šalutinis tiek maistui, tiek biodegalams skirto aliejaus gamybos produktas yra išspaudos ir kaip baltyminis priedas su subalansuota aminorūgščių kompozicija – jose yra šiek tiek mažiau lizino negu sojos rupiniuose, tačiau pakankamas sierą turinčių amino rūgščių ir treonino kiekis naudojamas galvijų, paukščių, kiaušinių, žuvų pašarams (Burel et al., 2001; Jeroch et al., 2001; Leikus, 2001; Taraz et al., 2006; Tripathi, Mishra, 2007). Tačiau svarbiausias iš antimitybinių komponentų rapsų sėklose ir išspaudose yra gliukozinolatai, kurie riboja šios žaliavos panaudojimą gyvūnų, ypač monogastrinių, mitybai (Opinion..., 2008).

Mūsų duomenimis, iš Nepriklausomų valstybių sandraugos (NVS) šalių į Lietuvos rinką patenka įvairių rapsų genotipų sėklos, tarp jų ir su dideliais gliukozinolatų kiekiais (Butkutė, Dabkevičius, 2007). Po aliejaus spaudimo rapsų išspaudose ir rupiniuose GSL koncentracija dar padidėja, lyginant su ta, kuri buvo sėklose. Kaip jau minėta, ne visų gliukozinolatų skilimo produktai yra vienodai kenksmingi. Todėl reikalinga informacija ne vien apie suminį gliukozinolatų kiekį rapsų sėklose ir išspaudose, bet ir apie individualių junginių koncentracijas.

Šio darbo tikslas – ištirti gliukozinolatų kompozicijas, įvertinti skirtingomis toksinėmis savybėmis pasižyminčių individualių junginių kiekių įvairavimą bei kaupimosi dėsningumą rapsų sėklose.

TYRIMO METODAI IR SĄLYGOS

Šiam tyrimui sudaryti du rapsų sėklų rinkiniai. Vienas jų (jungtinis) skirtas individualių, alifatinių ir aromatinių gliukozinolatų kaupimosi dėsningumui nustatyti skirtingų veislių rapsų sėklose ir sudarytas, atsižvelgiant į ankstesnio tyrimo rezultatus, vertinant tik suminį gliukozinolatų kiekį (Butkutė, Dabkevičius, 2007). Iš laboratorijoje kalibracinei bazei palaikyti saugomų rapsų sėklų atrinkti 79 skirtingų 0 ir 00 tipo veislių vasarinių ir žieminių rapsų sėklų mėginiai, užauginti gamybinuose plotuose ir instituto bandymų laukeliuose, esant skirtingoms meteorologinėms sąlygoms. Dalis mėginių gauta iš rapsų sėklų supirkėjų. Dauguma iš šalies rinką patekė iš NVS šalių.

Antrasis mėginių rinkinys skirtas įvertinti individualių, alifatinių ir aromatinių gliukozinolatų kiekių kitimo mastą vienos rapsų veislės sėklose. Šiam tikslui iš pirmojo jungtinio rapsų sėklų mėginių rinkinio buvo atrinkti 00 tipo žieminių rapsų *Kasimir* veislės mėginiai, $n = 21$. Šios sėklos buvo užaugintos skirtingai azoto trąšomis tręštuose bandymų laukeliuose, rapsai sėti nevienodu laiku. Keli mėginiai sudaryti iš skirtingose augalų vietose subrendusių sėklų: ankštarose ant pagrindinio stiebo ir šoninių augalo šakelių.

Gliukozinolatų kompozicijos rapsų sėklose tyrimas. Neturint galimybės ištirti alifatinių, aromatinių ir individualių gliukozinolatų (GSL) kiekį rapsų sėklose standartiniais efektyviosios skysčių chromatografijos metodais Lietuvos žemdirbystės institute (LŽI) ir kitose šalies laboratorijose, ši analizė ir suminio GSL kiekio rapsų sėklose analizė buvo atlikta Prancūzijoje CETIOM (Centre Technique Inter professionnel des Oleagineux Metropolitanains) Analizių laboratorijoje ISO/AWI 9167-3: Rapeseed – Determination of glucosinolate content – Part 3: Method using isocratic high-performance liquid chromatography metodu. Analizei į centrifuginį mėgintuvėlį atsverta 200 mg mikromalūnėliu sumalto tiriamų sėklų mėginio. Gliukozinolatai ekstrahuoti, užpylus verdančiu 70% v/v metanolio, išvirkšta vidinio standarto tirpalo. Vidinis standartas – gliukotropaeolinas (benzilgliukozinolatas). Mėgintuvėliai su turiniu 10 min. kaitinti 75°C vandens termostate, periodiškai maišant. Nucentrifuguoti ekstraktai valyti jonų mainų kolonėlėmis su DEAE Sephadex

A 25, desulfatuoti H1 tipo sulfataze iš *Helix pomatia*. Gliukozinolatų identifikavimas ir kiekybinis jų kompozicijos nustatymas atliktas, naudojant efektyviosios skysčių chromatografijos sistemą su UV detektoriumi. Matavimai atlikti esant 229 nm bangos ilgiui. Naudota chromatografinė kolonėlė su cianopropilo-silicio nuostoviąja faze, sorbento dalelių dydis – 3,5 µm, dimensijos 250 mm × 4,0 mm, termostatuota esant 30°C. Pasirinktas izokratinis režimas, judrioji fazė vanduo–acetonitrilas. Į chromatografinę sistemą išvirkšta 20 µl desulfogliukozinolatų tirpalo. Chromatografavimo trukmė 15 min. Analitės, t. y. individualūs gliukozinolatai, identifikuoti pagal desulfogliukozinolatų sulaikymo trukmę. Desulfogliukozinolatų eliuavimo tvarka tokia:

1. Desulfoprogoitrinas, desulfoepiprogoitrinas (PRO)
2. Desulfogliukonapoleiferinas (GNL)
3. Desulfogliukonapinas (GNA)
4. Desulfosinalbinas (SNB)
5. Desulfogliukobrasikanapinas (GBN)
6. Desulfogliukotopoeolinas (GTL)
7. Desulfo-4-hidroksigliukobrasicinas (4-OH)
8. Desulfogliukonasturtinas (GST)
9. Desulfogliukobrasicinas (GBS)
10. Desulfoneogliukobrasicinas (nGBS).

Individualių ir suminė visų gliukozinolatų koncentracija darbe pateikta mikromoliais grame orasausės sėklų masės ($\mu\text{mol g}^{-1}$). Bandyme nustatytųjų rodiklių verčių variacijos ir koreliacijos apskaičiuotos programa STAT ENG (Tarakanovas, Raudonius, 2003).

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Gliukozinolatų kiekybinė ir kokybinė sudėtis rapsų išspaudose yra svarbi pašarų ėdamumui ir gyvūnų sveikatingumui, todėl būtina žinoti, kaip susietas suminis gliukozinolatų kiekis su skirtingo toksiškumo individualių komponentų koncentracijomis pradinėje žaliavoje – į šalies rinką patenkančiose rapsų sėklose. Suminio visų gliukozinolatų kiekio, atskirų jų grupių ir individualių junginių koncentracijų įvairavimo 0 ir 00 tipo veislių sėklose duomenys pateikti 1 lentelėje. Rapsų sėklų mėginių

1 lentelė. Gliukozinolatų suminio kiekio, alifatinių, aromatinių bei individualių junginių koncentracijų ($\mu\text{mol g}^{-1}$) įvairavimas 0 ir 00 tipo veislių rapsų sėklose, $n = 79$

Table 1. The variation of the total content of glucosinolates and concentrations of aliphatic, aromatic and individual compounds ($\mu\text{mol g}^{-1}$) in rape seed of 0 and 00 varieties, $n = 79$

Gliukozinolatai Glucosinolate	Koncentracija / Concentration, $\mu\text{mol g}^{-1}$			Standartinis nuokrypis Standard deviation
	Vidutinė ± st. paklaida Mean ± st. error	Mažiausia Min	Didžiausia Max	
Suminis kiekis / Total amount	20,02 ± 2,30	2,68	88,84	20,45
Alifatiniai / Aliphatic	16,15 ± 2,23	0,65	84,71	19,83
Progoitrinas / Progoitrin	9,98 ± 1,42	0,65	54,15	12,58
Gliukonapoleiferinas / Gluconapoleiferin	0,88 ± 0,12	0,00	4,19	1,06
Gliukonapinas / Gluconapin	4,03 ± 0,58	0,00	23,31	5,11
Gliukobrasikanapinas / Glucobrassicinapin	1,16 ± 0,21	0,00	6,45	1,49
Aromatiniai / Aromatic	3,87 ± 0,16	1,87	9,36	1,38
Sinalbinas / Sinalbin	0,33 ± 0,10	0,00	6,67	0,88
4-hidroksigliukobrasicinas / 4-hydroxyglucobrassicin	3,27 ± 0,10	1,66	5,84	0,90
Gliukobrasicinas / Glucobrassicin	0,09 ± 0,01	0,00	0,27	0,08
Gliukonasturtinas / Gluconasturtin	0,17 ± 0,04	0,00	1,41	0,31
Neogliukobrasicinas / Neoglucobrassicin	0,02 ± 0,00	0,00	0,20	0,04

rinkinyje, kuriame suminė gliukozinolatų koncentracija kito nuo 2,68 iki 88,84 $\mu\text{mol g}^{-1}$, alifatiniai gliukozinolatai, itin toksiškų skilimo produktų pirmtakai, sudarė vidutiniškai per 67% visų gliukozinolatų kiekio. Tuo tarpu aromatinių (indolinių) GSL buvo 2 kartus mažiau – 33%. Didžiąsą dalį iš visų gliukozinolatų sudarė alifatinis gliukozinolatas progoitrinas, t. y. vidutiniškai beveik pusę visų gliukozinolatų, tos pačios GSL grupės atstovas gliukonapinas – vidutiniškai 1/5 visų GSL kiekio. Iš aromatinių gliukozinolatų rapsų sėklose vyravo 4-hidroksigliukobrasicinas (4-OH), tačiau šio gliukozinolato koncentracija sudarė vidutiniškai tik 1/6 absoliutaus suminio GSL kiekio.

Aromatinių GSL suminio kiekio įvairavimas daug mažesnis negu suminio GSL kiekio ar alifatinų GSL sumos. Atskirų individualių GSL kiekiai įvairavo plačiame koncentracijų diapazone: progoitrino koncentracija kito nuo 0,65 iki net 54,5 $\mu\text{mol g}^{-1}$, gliukonapino – nuo 0 iki 23,31 $\mu\text{mol g}^{-1}$, 4-hidroksigliukobrasicino – nuo 1,66 iki 5,84 $\mu\text{mol g}^{-1}$.

Ryšium su genotipo ypatumais suminio gliukozinolatų kiekio kitimą labiausiai lemia alifatinų gliukozinolatų, ypač jų atstovo – progoitrino, kaupimasis. Tokią išvadą patvirtina koreliacinių ryšių analizė (2 lentelė).

Nors visų individualių GSL koncentracijos skirtingų genotipų rapsų sėklose patikimai $P < 0,01$ tikimybės lygmenyje tiesiogiai koreliuoja tarpusavyje ir su suminiu GSL kiekiu, ryšiai nėra vienodai glaudūs: skirtingus GSL kiekius sukaupiančiame rapsų sėklų mėginių rinkinyje suminis GSL kiekis labiausiai priklauso nuo alifatinų GSL atstovų progoitrino ($r = 0,992^{**}$), gliukonapino ($r = 0,976^{**}$) ir visų alifatinų gliukozinolatų sumos ($r = 0,998^{**}$) kaupimosi. Tuo tarpu aromatinių GSL sumos įtaka gerokai mažesnė ($r = 0,471^{**}$), kaip ir pagrindinio šios grupės gliukozinolato 4-hidroksigliukobrasicino ($r = 0,476^{**}$). Genotipo svarba suminiam gliukozinolatų kiekiui rapsų sėklose ir alkenilgliukozinolatų progoitrino ir gliukonapino koncentracijai nustatyta ir kitų tyrėjų (Werteker et al., 1999). Šie mokslininkai taip pat pateikia duomenų, kad 4-hidroksigliukobrasicinas mažiau priklauso nuo veislės.

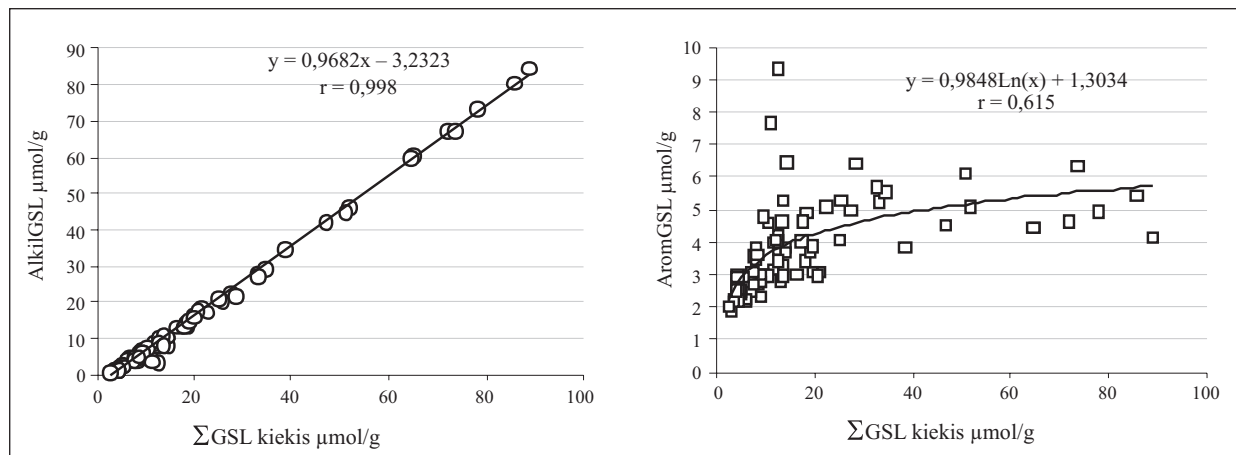
Alifatinų gliukozinolatų (AlkilGSL) kiekį ir suminių GSL (ΣGSL) kiekį sieja labai glaudi tiesinė priklausomybė, išreikšta tokia regresijos lygtimi: $y = 0,9682x - 3,2323$; $r = 0,998$; čia x yra suminis GSL kiekis, y – AlkilGSL (3 pav.). Aromatinių GSL (AromGSL) santykį su visų GSL suma geriau aprašo silpnesnė, bet patikima $P < 0,01$ tikimybės lygmenyje, logaritminė priklausomybė: $y = 0,9848\text{Ln}(x) + 1,3034$; $r = 0,615$.

2 lentelė. Gliukozinolatų suminio kiekio, alifatinų, aromatinių bei individualių junginių koncentracijų 0 ir 00 tipo veislių rapsų sėklose ($n = 79$) tiesinės tarpusavio koreliacijos koeficientai r

Table 2. The coefficients of linear correlation r among the concentrations of total glucosinolates, aliphatic, aromatic and individual glucosinolates

	ΣGSL	AlkilGSL	AromGSL	PRO	GNL	GNA	GBN	4OH	GBS
AlkilGSL	0,998**								
AromGSL	0,471**	0,416**							
PRO	0,992**	0,994**	0,403**						
GNL	0,875**	0,865**	0,538**	0,842**					
GNA	0,976**	0,980**	0,380**	0,962**	0,798**				
GBN	0,885**	0,883**	0,423**	0,838**	0,898**	0,866**			
4OH	0,476**	0,437**	0,761**	0,408**	0,647**	0,396**	0,521**		
GBS	0,432**	0,402**	0,622**	0,401**	0,461**	0,357**	0,393**	0,734**	
GST	0,925**	0,919**	0,496**	0,917**	0,840**	0,877**	0,827**	0,494**	0,449**

ΣGSL – suminis gliukozinolatų kiekis / total amount of glucosinolates, AlkilGSL – alifatiniai gliukozinolatai / aliphatic glucosinolates, AromGSL – aromatiniai gliukozinolatai / aromatic glucosinolates, PRO – progoitrinas / progoitrin, GNL – gliukonapoleiferinas / gluconapoleiferin, GNA – gliukonapinas / gluconapin, GBN – gliukobrasikanapinas / glucobrassicinapin, 4-OH – 4-hidroksigliukobrasicinas / 4-hydroxyglucobrassicin, GBS – gliukobrasicinas / glucobrassicin



3 pav. Alifatinų (AlkilGSL) ir aromatinių (AromGSL) gliukozinolatų koncentracijų priklausomumas nuo suminio gliukozinolatų kiekio (ΣGSL) rapsų sėklose
Fig. 3. Aliphatic (AlkilGSL) and aromatic (AromGSL) glucosinolate concentrations in relation to the total glucosinolate content (ΣGSL) in rape seed

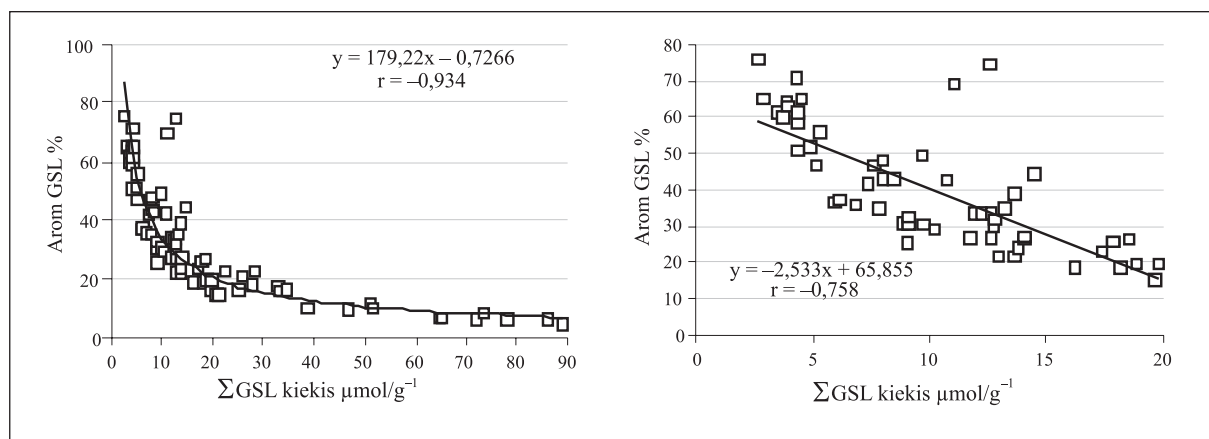
Dar glaudžiau su visų gliukozinolatų suma (Σ GSL) koreliuoja aromatinųjų GSL masės dalis visų GSL sumoje, tačiau ši koreliacija neigiama: $y = 179,22x^{-0,7266}$, $r = -0,934$ (4A pav.). Tai reiškia, kad rapsų sėklose, didėjant suminiam GSL kiekiui, aromatinųjų GSL dalis jame mažėja.

Aromatinių gliukozinolatų masės dalis ypač sparčiai mažėja iki kol suminis gliukozinolatų kiekis rapsų sėklose pasiekia $20 \mu\text{mol g}^{-1}$. Iš įvairių tipų veislių rinkinio atrinkus tik tuos mėginius, kuriuose suminis gliukozinolatų kiekis yra $<20 \mu\text{mol g}^{-1}$, $n = 59$, aromatinųjų (AromGSL) gliukozinolatų masės dalį suminiame GSL kiekyje ir suminių gliukozinolatų kiekį (Σ GSL) sieja neigiama tiesinė priklausomybė, kurią aprašo regresijos lygtis $y = -2,5255x + 65,794$, o $r = -0,769^{**}$ (4B pav.). Neigiamą, bet tiesinę priklausomybę tarp aromatinųjų gliukozinolatų masės dalies ir suminio jų kiekio nustatė Schumann (Schumann, 2003), atlikęs užsakomuosius GSL kontrolės tyrimus Vokietijos aliejaus spaudyklose 2000–2002 m.

Individualių, alifatinių ir aromatinųjų gliukozinolatų įvairavimas ir jų tarpusavio santykis vienos 00 tipo rapsų veislės sėklose ištirtas žieminių rapsų veislės *Kasimir* sėklų rinkinyje. Nustatėme, kad netgi vienos veislės sėklose suminis GSL kie-

kis dėl įvairių veiksnių (tręšimo azotu, sėjos laiko ir kt., žr. metodinę dalį) kito plačiame koncentracijų diapazone: nuo $2,68$ iki $19,67 \mu\text{mol g}^{-1}$, variacijos koeficientas – 72% (3 lentelė). Atlikus išsamią individualių gliukozinolatų analizę nustatyta, kad didžiausią dalį 00 tipo *Kasimir* rapsų sėklų rinkinyje, kaip ir visų tipų veislių rinkinyje, vidutiniškai sudarė progointrinas ($3,76 \mu\text{mol g}^{-1}$). Vidutinė heteroaromatinių gliukozinolatų 4-hidroksigliukobrasicino koncentracija ($2,51 \mu\text{mol g}^{-1}$) *Kasimir* rapsų sėklose buvo didesnė negu likusių alifatinių gliukozinolatų gliukonapoleiferino ($0,17 \mu\text{mol g}^{-1}$), gliukonapino ($1,24 \mu\text{mol g}^{-1}$), gliukobrasikanapino ($0,38 \mu\text{mol g}^{-1}$). Kitų gliukozinolatų (gliukobrasicino, gliukonasturtino, 4-metoksigliukobrasicino, neogliukobrasicino) kiekiai buvo labai maži arba jų neaptikta.

Akivaizdu, kad tokiems skirtumams vienos veislės rapsų sėklose ir duomenų įvairavimui didžiausią įtaką turėjo alifatinių gliukozinolatų kitimas: šio rodiklio verčių įvairovė siekė net 100%, o kiekiai kito nuo $0,65$ iki $16,59 \mu\text{mol g}^{-1}$. Aromatinių GSL pokyčiai tirtuosiuose mėginiuose buvo daug mažesni ($1,87$ – $3,69 \mu\text{mol g}^{-1}$), nei alifatinių GSL. Apskaičiuotojo rodiklio, aromatinųjų gliukozinolatų procentinės dalies reikšmės įvairavo nuo $15,66$ iki $75,75\%$ suminio GSL kiekio. Alifatinių



4 pav. Aromatinių (AromGSL%) gliukozinolatų masės dalies suminiame GSL kiekyje ir suminis visų gliukozinolatų koncentracijos (Σ GSL) rapsų sėklose tarpusavio ryšys

Fig. 4. Relationship between mass percentage of aromatic (AromGSL%) glucosinolates in the total glucosinolate amount and the total concentration of glucosinolates (Σ GSL) in rape seed

3 lentelė. Gliukozinolatų suminio kiekio, alifatinių, aromatinųjų bei individualių junginių koncentracijų ($\mu\text{mol g}^{-1}$), taip pat alifatinių (AlkilGSL % Σ GSL) ir aromatinųjų (AromGSL % Σ GSL) gliukozinolatų masės dalies suminiame visų GSL kiekyje įvairavimas 00 tipo *Kasimir* rapsų sėklose, $n = 21$

Table 3. Variation of the concentrations of total, aliphatic, aromatic and individual glucosinolates ($\mu\text{mol g}^{-1}$) and mass percentage of aliphatic (AlkilGSL % Σ GSL) and aromatic (AromGSL % Σ GSL) glucosinolates in the total glucosinolate amount in rape seed of 00 variety *Kasimir*, $n = 21$

Gliukozinolatai Glucosinolate	Koncentracija / Concentration, $\mu\text{mol g}^{-1}$			Variacijos koeficientas Coefficient of variation %
	Vidutinė \pm st. paklaida Mean \pm st. error	Mažiausia Min	Didžiausia Max	
Suminis kiekis / Total amount	8,27 \pm 1,30	2,68	19,67	71,9
Alifatiniai / Aliphatic	5,55 \pm 1,22	0,65	16,59	100
Aromatiniai / Aromatic	2,72 \pm 0,10	1,87	3,69	17,7
Progointrinas / Progointrin	3,76 \pm 0,83	0,65	11,43	101
Gliukonapoleiferinas / Gluconapoleiferin	0,17 \pm 0,05	0,00	0,57	134
Gliukonapinas / Gluconapin	1,24 \pm 0,27	0,00	3,53	99,6
Gliukobrasikanapinas / Glucobrassicinapin	0,38 \pm 0,08	0,00	1,06	97,1
4-hidroksigliukobrasicinas / 4-hydroxyglucobrassicin	2,51 \pm 0,11	1,66	3,47	19,6
AlkilGSL % Σ GSL	53,96 \pm 4,46	24,25	84,34	37,9
AromGSL % Σ GSL	46,06 \pm 4,47	15,66	75,75	44,5

individualių gliukozinolatų (progoitrino, gliukonapoleiferino, gliukonapino, gliukobrasikanapino) įvairavimas *Kasimir* veislės rapsų sėklose buvo didesnis negu aromatinio GSL 4-hidroksigliukobrasicino.

Koreliacinė-regresinė analizė parodė, kad individualių GSL ir jų grupių (alifatinių bei aromatinių) tarpusavio ryšys bei atskirų komponentų įtakos reikšmingumas suminio GSL kiekio susikaupimui vienos 00 tipo veislės sėklose yra panašus, kaip ir skirtingų genotipų sėklose (2, 4 lentelės). Padidėjus suminiam gliukozinolatų kiekiui $1 \mu\text{mol g}^{-1}$, alifatinių gliukozinolatų indėlis į šį padidėjimą *Kasimir* sėklose buvo $0,94 \mu\text{mol g}^{-1}$, individualių šios gliukozinolatų grupės junginių progoitrino – $0,64 \mu\text{mol g}^{-1}$, gliukonapino – $0,21 \mu\text{mol g}^{-1}$, o aromatinių – tik $0,06 \mu\text{mol g}^{-1}$ (4 lentelė, 5 pav.).

Kaip ir skirtingų veislių bei jų tipų rapsų sėklų mėginių rinkinyje, *Kasimir* veislės sėklose suminių GSL kiekį siejo glaudesnė priklausomybė su alifatiniais gliukozinolatais ir jų suminiu kiekiu, negu su aromatiniais GSL (5 pav.). Kad aromatinių gliukozinolatų kiekis mažiau priklauso nuo agronominių veiksnių, pastebėta ir kitų mokslininkų (Bilsborrow, Evans, 1995; Szulc et al., 2003). Tinkamas augalų aprūpinimas siera labiausiai skatina progoitrino, mažiau gliukonapino ir, galiausiai, gliukobrasikanapino koncentracijų didėjimą (Wielebski et al., 1999).

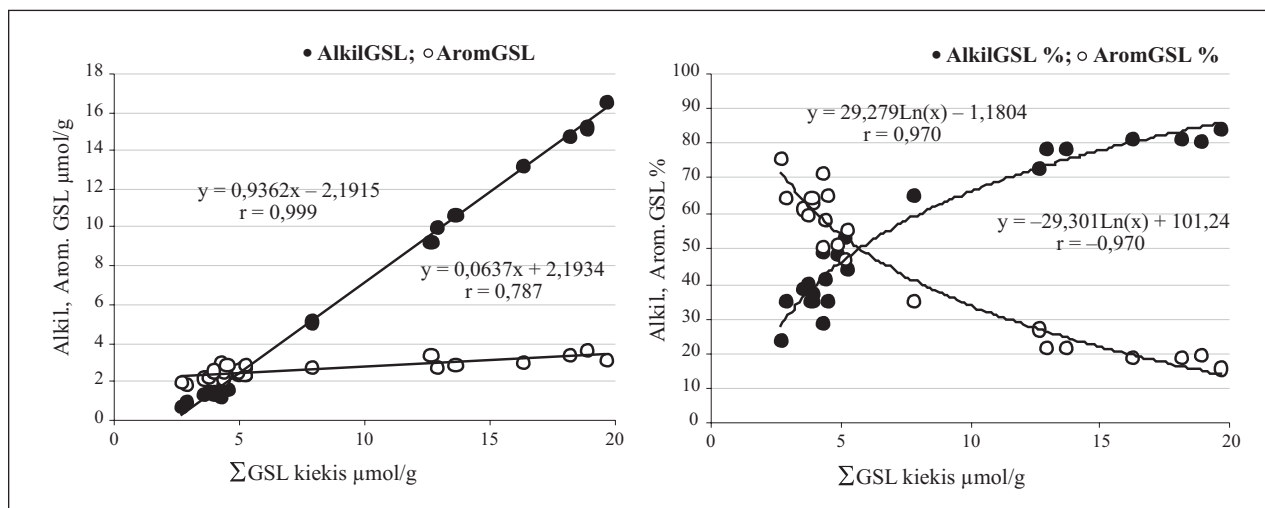
Aromatinių gliukozinolatų masės dalies ryšys su suminiu GSL kiekiu buvo neigiamas, tačiau glaudesnis, negu aromatinių ir suminės visų gliukozinolatų koncentracijų ryšys. Šį ryšį geriausiai išreiškė logaritminė regresija $y = -29,301\text{Ln}(x) + 101,24$; $r = -0,970^{**}$. *Kasimir* veislės rapsams sėklose sukaupus mažiau negu $5 \mu\text{mol g}^{-1}$ gliukozinolatų, vyrauja aromatiniai gliukozinolatai: jų masės dalis suminiame GSL kiekyje sudaro 52–76%. Tos pačios veislės sėkloms sukaupus daugiau gliukozinolatų, kai suminis jų kiekis siekia $15\text{--}20 \mu\text{mol g}^{-1}$, aromatinių daliai tenka mažiau negu 20%.

Literatūros apžvalgoje aptarti tyrimų rezultatai apie skirtingą atskirų gliukozinolatų toksiškumą ir mūsų gautų tyrimų duomenys rodo, kad norint išvengti pašarų saugos rizikos, nepakanka kontroliuoti vien suminių gliukozinolatų kiekį rapsų sėklose ir išspaudose; taip pat reikia sekti ypač toksiškus junginius produkuojančių alifatinių gliukozinolatų koncentracijas. Kai kuriose šalyse išskirtinis dėmesys kaip tik ir kreipiamas ne tik į suminių GSL kiekį, bet ir į kenksmingiausių – alifatinių gliukozinolatų kiekį (Krzyszowski et al., 1999; Opinion..., 2008; Raney, Rakow, 1995; Rosa et al., 1997). Kanados selekcininkai vykdo rapsų selekciją alifatinių gliukozinolatų mažinimo kryptimi ir jau yra sukūrę linijų, turinčių tik $1 \mu\text{mol}$ alkenilgliukozinolatų grame išspaudų (Raney, Rakow, 1995).

4 lentelė. Regresijos lygtys ir tiesinės porinės koreliacijos tarp suminio gliukozinolatų kiekio (x) ir pagrindinių individualių gliukozinolatų (y) 00 tipo *Kasimir* rapsų sėklose koeficientai, n = 21

Table 4. Equations of regression and coefficients of linear pair-correlation r between the concentrations of total glucosinolates (x) and major individual glucosinolates (y) in rape seeds of 00 variety *Kasimir*, n = 21

Gliukozinolatai Glucosinolate	Tiesinės koreliacijos koeficientas r Coefficient of linear correlation r	Tiesinės regresijos lygtys / Equation of linear regression $y = ax + b$, kur / where $x = \Sigma\text{GSL } \mu\text{mol g}^{-1}$
Progoitrinas / Progoitrin	0,998**	$0,64x - 1,50$
Gliukonapoleiferinas / Gluconapoleiferin	0,977**	$0,04x - 0,14$
Gliukonapinas / Gluconapin	0,994**	$0,21x - 0,47$
Gliukobrasikanapinas / Glucobrassicinapin	0,913**	$0,06x - 0,09$
4-hidroksigliukobrasicinas / 4-hydroxyglucobrassicin	0,812**	$0,07x + 1,96$



5 pav. Alifatinių (AlkilGSL) ir aromatinių (AromGSL) koncentracijų ir jų masės dalies suminiame GSL kiekyje priklausomumas nuo suminės visų gliukozinolatų koncentracijos (ΣGSL) kitimo *Kasimir* veislės rapsų sėklose, n = 21

Fig. 5. Aliphatic (AlkilGSL), aromatic (AromGSL) glucosinolates ($\mu\text{mol g}^{-1}$), mass percentage of aliphatic (AlkilGSL%) and aromatic (AromGSL%) glucosinolates in the total amount of glucosinolates in relation to the total concentration of glucosinolates (ΣGSL) in rape seed of 00 variety *Kasimir*, n = 21

IŠVADOS

1. Suminio gliukozinolatų kiekio kitimą tiek skirtingų genotipų, tiek vienos 00 tipo veislės rapsų sėklose labiausiai sąlygoja alifatinių gliukozinolatų (atitinkamai $r = 0,998$ ir $0,999$) ir ypač progoitrino (atitinkamai $r = 0,992$ ir $0,998$) sankaupa.

2. Padidėjus suminiam gliukozinolatų kiekiui $1 \mu\text{mol g}^{-1}$, alifatinių gliukozinolatų koncentracija 00 tipo veislės rapsų sėklose padidėja $0,94 \mu\text{mol g}^{-1}$, progoitrino – $0,64 \mu\text{mol g}^{-1}$, gliukonapino – $0,21 \mu\text{mol g}^{-1}$, o aromatinių – tik $0,06 \mu\text{mol g}^{-1}$.

3. Procentinė toksiškų alifatinių gliukozinolatų dalis suminiame gliukozinolatų kiekyje didėja, o aromatinių – mažėja, didėjant suminiam jų kiekiui rapsų sėklose. Aromatinių gliukozinolatų dalis ypač sparčiai mažėja, suminiam gliukozinolatų kiekiui didėjant iki $20 \mu\text{mol g}^{-1}$.

PADĖKA

Dėkojame Valstybiniam Lietuvos mokslo ir studijų fondui ir Lietuvos žemės ūkio ministerijai, rėmusiems projektą „Kenksmingos medžiagos žemės ūkio produkcijoje: rizikos veiksniai ir prevencija“, akronimas KENKSMEDA (registracijos Nr.M-07002).

Gauta 2008 03 17

Priimta 2008 04 14

Literatūra

- Bilborrow E., Evans E. J. Changes in the individual glucosinolate profile of double low oilseed rape as influenced by spring nitrogen application // Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress. Cambridge, UK, 1995. Vol. 2. P. 553–555.
- Brown J., Morra M. J. Glucosinolate-containing seed meal as a soil amendment to control plant pests // Subcontract Report NREL/SR-510-35254. 2005, 99 p. <http://www.nrel.gov/docs/fy05osti/35254.pdf> [žiūrėta 2007 m. spalį].
- Burel C., Boujard T., Kaushik S. et al. Effects of rapeseed meal-glucosinolates on thyroid metabolism and feed utilization in rainbow trout // General and Comparative Endocrinology. 2001. Vol. 124. Iss. 3. P. 343–358.
- Butkutė B. Lithuania-grown 00 rapeseed quality variation in relation to the cultural practices, climatic and genotypic peculiarities // Proceedings of the 11th International Rapeseed Congress. Copenhagen, Denmark, 2003. Vol. 3. P. 879–881.
- Butkutė B., Dabkevičius Z. Agropriemonių bei genotipo įtaka gliukozinolatų kaupimuisi rapsų sėklose ir jų kiekio įvairavimas išspaudose // Gyvulininkystė. Mokslo darbai. 2007. T. 49. P. 40–55.
- Downey R. K. Rapeseed to Canola: Rags to Riches // The National Agricultural Biotechnology Council's Eighteenth Annual Meeting. Ithaca and Geneva, NY, 2006. www.nabc.cals.cornell.edu/pubs/nabc_18/NABC18_Downey.pdf [žiūrėta 2007 m. spalį].
- Fahey J. W., Zalcmann A. T., Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants // Phytochemistry. 2001. Vol. 56. P. 5–51.
- Halkier B. A., Gershenzon J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates // Annual Review of Plant Biology. Vol. 57. Iss. 1. P. 303–333.
- Jeroch H., Kracht W., Dänicke S. Feeding value of rape products and its improvement for broilers and laying hens // European Journal of Lipid Science and Technology. 2001. Vol. 103. No. 1. P. 7–11.
- Keck A.-S., Finely J. W. Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium // Integrative Cancer Therapies. 2004. Vol. 3. P. 5–12.
- Krzymanski J. A., Pietka T., Michalski K. et al. Studies of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) very low in aliphatic glucosinolate content // Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress. Canberra, Australia, 1999. CD-ROM.
- Krzymanski J. Standartization of glucosinolate content in seed of double low oilseed rape cultivars problem of indolyl glucosinolate // Proceedings of the 9th International Rape seed Congress. Cambridge, UK, 1995. Vol. 3. P. 914–916.
- Leikus R. Rapsų išspaudos veislinėms kiaulėms šerti // Veterinarija ir zootechnika. 2001. T. 15(37). P. 67–71.
- Ljung K., Hull A. K., Celenza J. et al. Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots // The Plant Cell (The Plant Cell Online). 2005. 15 p. www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/teaching/PDFlists/2005_PDFs/Ljung2005.pdf [žiūrėta 2008 m. vasarį].
- Nugon-Baudon L., Rabot S. Glucosinolates and glucosinolate derivatives: implications for protection against chemical carcinogenesis // Nutrition Research Reviews. 1994. Vol. 7. P. 205–231.
- Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on glucosinolates as undesirable substances in animal feed // The EFSA Journal. 2008. Vol. 590. P. 1–76.
- Quinsac A., Chahours X., Krouti M. et al. Analyse par Chromatographie en phase liquide des glucosinolates dans les Cruciferes adventices du colza en France // Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress. Cambridge, UK, 1995. Vol. 3. P. 919–921.
- Raney P., Rakow G. A new *Brassica napus* genotype with superior yellow seed colour and very low alkenyl glucosinolate content // Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress. Cambridge, UK, 1995. Vol. 4. P. 1154–1156.
- Rodman J. E., Soltis P. S., Soltis D. et al. Parallel evolution of glucosinolate biosynthesis inferred from congruent nuclear and plastid gene phylogenies // American Journal of Botany. 1998. Vol. 85. Iss. 7. P. 997–1006.
- Rosa E. A. S., Heaney R. K., Fenwick G. R. et al. Glucosinolates in Crop Plants // Horticultural Reviews. 1997. Vol. 19. P. 99–121.
- Schumann W. Untersuchungen zum Glucosinolatgehalt von in Deutschland erzeugten und verarbeiteten Rapsaaten und Rapsfuttermitteln. 2003. 69 p. www.ufop.de/downloads/Glucosinolatgehalt_Bericht.pdf [žiūrėta 2007 m. lapkritį].
- Selmar D. Metabolism and catabolism of glucosinolates // Landbauforschung Volkenrode. 2005. Special Iss. 283. P. 137–148.

23. Szulc P. M., Drozdowska L., Kachlicki P. Effect of sulphur on the yield and content of glucosinolates in spring oilseed rape seeds // *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Agronomy*. 2003. Vol. 6. Iss. 2. 11 p. Available <http://www.ejpau.media.pl> [žiūrėta 2008 m. vasarį].
24. Takahashi N., Dashwood R. H., Bjeldanes L. F. et al. Mechanisms of indole-3-carbinol (I3C) anticarcinogenesis: inhibition of aflatoxin B₁-DNA adduction and mutagenesis by I3C acid condensation products // *Food and Chemical Toxicology*. 1995. Vol. 33. Iss. 10. P. 851–857.
25. Tarakanovas P., Raudonius S. Agronominių tyrimų duomenų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, SPLIT-PLOT iš paketo SELEKCIJA ir IRRISTAT. Akademija, 2003. 56 p.
26. Taraz Z., Jalali S. M. A., Rafeie F. Effects of replacement of soybean meal with rapeseed meal on organs weight, some blood biochemical parameters and performance of broiler chicks // *International Journal of Poultry Science*. 2006. Vol. 5. Iss. 12. P. 1110–1115.
27. Thangstad O. P., Iversen T.- H., Slupphaug G. et al. Immunocytochemical localization of myrosinase in *Brassica napus* L. // *Planta*. 1990. Vol. 180. P. 245–248.
28. Tripathi M. K., Mishra A. S. Glucosinolates in animal nutrition: A review // *Animal Feed Science and Technology*. 2007. Vol. 132. Iss. 1. P. 1–27.
29. Tsao R., Peterson C. J., Coats J. R. Glucosinolate breakdown products as insect fumigants and their effect on carbon dioxide emission of insects // *BMC Ecology*. 2002. Vol. 2. P. 1–7.
30. Ueda H., Nishiyama C., Shimada T. et al. AtVAM3 is required for normal specification of idioblasts, myrosin cells // *Plant and Cell Physiology*. 2006. Vol. 47. No. 1. P. 164–175.
31. Werteker M., Kramreither G. Influence of variety and environment on the spectrum of glucosinolates in rape-seed // *Die Bodenkultur*. 2002. Vol. 53. Iss. 3. P. 153–160.
32. Wielebski F., Wójtowicz M., Krzymański J. Influence of sulphur fertilization on glucosinolate quality and quantity in seeds of two double low oilseed rape varieties (*Brassica napus* L.) // *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress*. Canberra, Australia, 1999. CD-ROM.

Bronislava Butkutė, Zenonas Dabkevičius

ACCUMULATION REGULARITIES OF INDIVIDUAL GLUCOSINOLATES AND THEIR INTERRELATION IN RAPE SEED

Summary

Glucosinolates (GSL) accumulated by *Brassicaceae* family plants in seed differ in chemical composition. Individual glucosinolates and their breakdown products are characterized by different biological activity and toxicity. The objective of the present study was to examine glucosinolate composition, to estimate the variation of individual compounds differing in toxicity characteristics, and the regularities of their accumulation in rape seed. To this end, we estimated the total and aromatic (including indolic), aliphatic and major individual GSL contents and the variation of the concentrations in the seed of 0 and 00 type varieties differing in the GSL contents accumulated. The variation of the total GSL content in the seed of various-type varieties was found to be mostly influenced by the accumulation of aliphatic GSL ($y = 0.9682x - 3.2323$; $r = 0.998^{**}$) and especially progoitrin ($y = 0.9848\ln(x) + 1.3034$; $r = 0.992^{**}$). A similar correlation was identified among individual glucosinolates and their total content in the seed of one 00 rape variety. With an increase in the total glucosinolate content by $1 \mu\text{mol g}^{-1}$, the concentration of aliphatic glucosinolates in the seed of 00 varieties increased by $0.94 \mu\text{mol g}^{-1}$, of progoitrin by $0.64 \mu\text{mol g}^{-1}$, of gluconapin by $0.21 \mu\text{mol g}^{-1}$, and that of aromatic compounds by as little as $0.06 \mu\text{mol g}^{-1}$. The mass percentage of toxic aliphatic glucosinolates in the total content of glucosinolates increased and that of aromatic compounds declined with an increase in the total glucosinolate content in seed. The share of aromatic glucosinolates was found to sharply decline with an increase in the total glucosinolate content up to $20 \mu\text{mol g}^{-1}$.

Key words: rape seed, glucosinolates (GSL), total, aliphatic, aromatic, individual