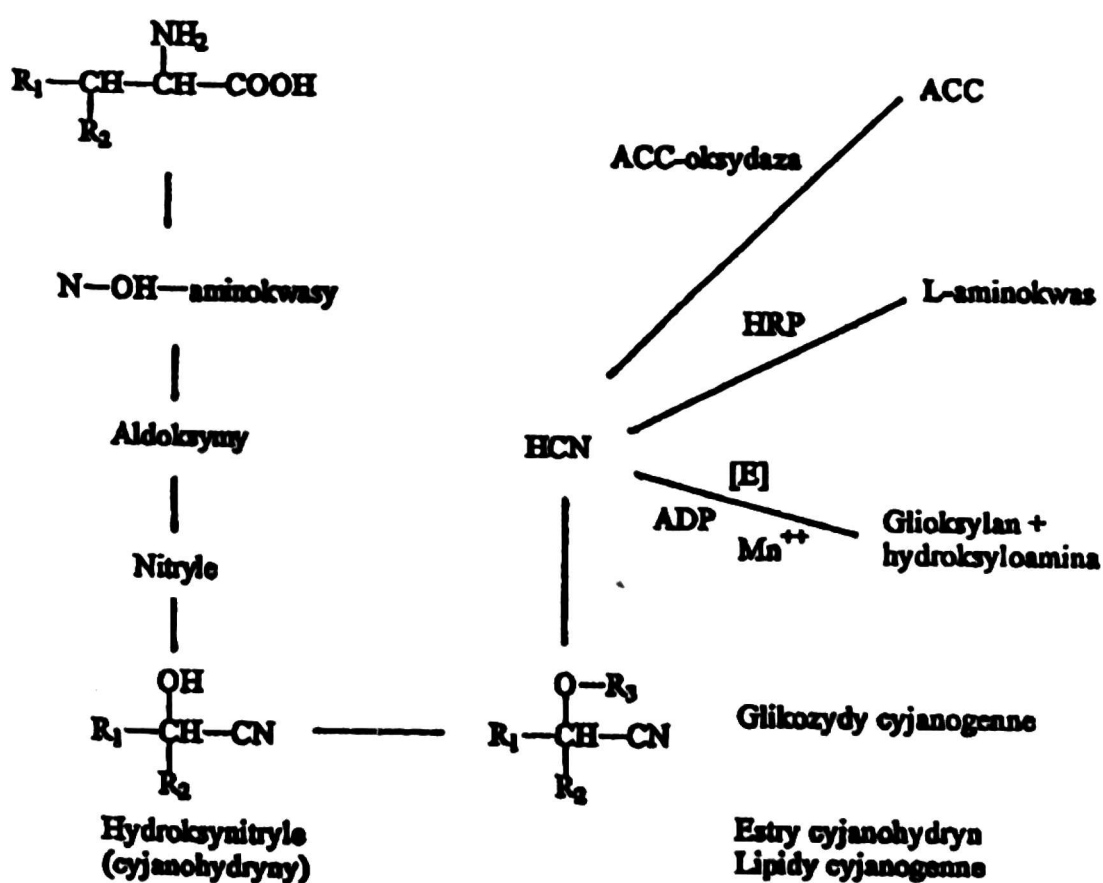


Związki cyjanogenne koniczyny białej (*Trifolium repens* L.)

Związki cyjanogenne występujące w roślinach

Terminu cyjanogeneza używa się do określania procesu wytwarzania cyjanowodoru (HCN) w warunkach fizjologicznych. Występowanie cyjanogenezy stwierdzono u około 2650 roślin, należących do ponad 550 rodzajów i 130 rodzin. Pomimo tak szerokiego występowania, związki odpowiedzialne za ten proces zidentyfikowano jedynie w 475 gatunkach [38]. Do chwili obecnej poznano około 60 związków cyjanogennych występujących w roślinach wyższych. Wszystkie te związki pochodzą od L-aminokwasów, takich jak fenyloalanina, tyrozyna, walina, izoleucyna i leucyna, jak również od niebiałkowego aminokwasu (2-cyklopentenilo) glicyny i kwasu nikotynowego [6]. W roślinach wyższych stwierdzono kilka możliwych dróg wytwarzania HCN. Najważniejsze z nich zostały przedstawione na rysunku 1.



Rysunek 1. Drogi powstawania cyjanowodoru w roślinach [30]

Niewielkie ilości cyjanowodoru mogą powstawać w roślinach podczas syntezy etylenu z kwasu 1-amino-cyklopropano-1-karboksyowego (ACC) [49], wskutek działania na aminokwasy peroksydazy z chrznanu (HRP) [34] oraz przez enzymatyczne utlenianie hydroksyloamin w obecności jonów manganu [21]. Główną drogą powstawania HCN w organizmach żywych jest hydroliza glukozydów cyjanogennych, rzadziej rozkład estrów cyjanohydryn oraz cyjanolipidów.

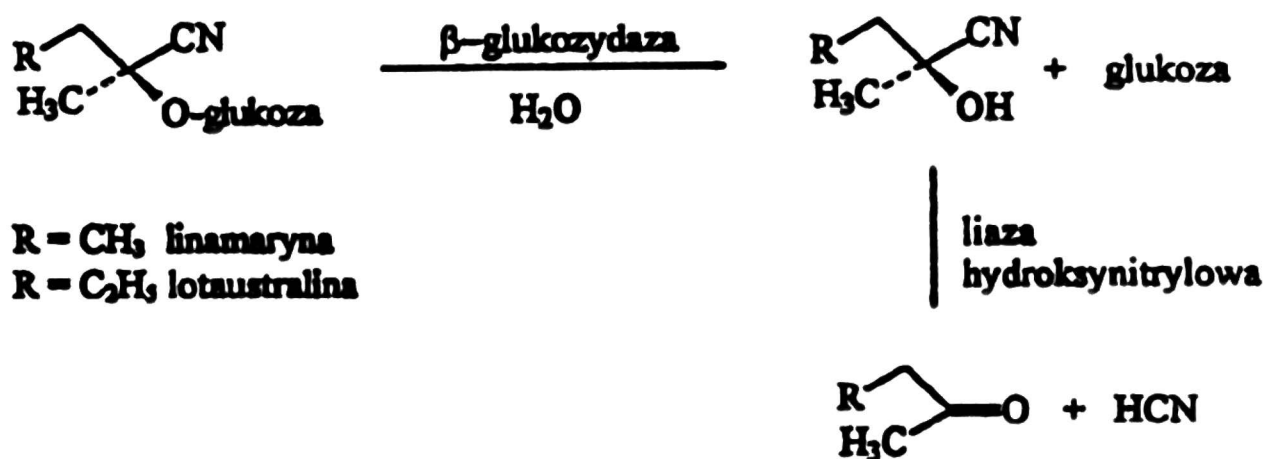
Glukozydy cyjanogenne

Glukozydy cyjanogenne są polarnymi, rozpuszczalnymi w wodzie związkami, akumulowanymi w wakuolach wielu komórek roślinnych. Związki te są zwykle O- β -glukozydami α -hydroksynitryli (cyjanohydryn), a sama glukozyzacja jest uważana za proces stabilizacji cyjanohydryn [38]. Najczęściej są to monoglukozydy, ale łańcuchy cukrowe w kilku przypadkach składają się z dwóch, trzech, a nawet czterech cząsteczek cukru. Monoglukozydy i diglukozydy występują razem u takich gatunków, jak len (*Linum usitatissimum* L.), kauczukowiec brazylijski (*Hevea brasiliensis* Muell.-Arg.) i u niektórych gatunków *Passiflora*, natomiast di-, tri- i tetraglukozydy występują u niektórych gatunków z rodziny *Asteraceae* (*Compositae*) [38]. Niektóre z nich mogą występować dodatkowo w postaci malonianów lub pochodnych acyloowych [31]. Istnieją teorie mówiące, że przyłączanie kolejnych cząsteczek cukru, kwasu malonowego, kawowego, kumarowego itp. jest mechanizmem zabezpieczania glukozydu w czasie transportu przed działaniem enzymów hydrolitycznych [39]. Ponieważ glukozydy zawierają oprócz optycznie aktywnych centrów należących do cukrów również chiralny węgiel cyjanohydryny, związki te mogą występować w postaci epimerów (*R*)- i (*S*)-. W komórkach roślinnych epimery te często występują razem w postaci mieszanin. Bardzo łatwo tworzą się także w rozcieńczonych roztworach alkalicznych [28].

Glukozydy cyjanogenne są łatwo hydrolizowane przez mniej lub bardziej specyficzne β -glukozydazy [35], w wyniku czego powstają cyjanohydryny i glukoza. W zależności od pH cyjanohydryny spontanicznie rozpadają się do HCN i związku karbonylowego. Na przykład, występujące w koniczynie białej linamaryna i lotaustrolina są hydrolizowane do HCN i acetonu lub metyloetyloketonu (rys. 2).

Proces ten może być także katalizowany przez liazę hydroksynitrylową i wtedy w normalnych warunkach fizjologicznych HCN powstaje 20-krotnie szybciej [40]. Stąd obecność liazy hydroksynitrylowej w roślinach zawierających glukozydy cyjanogenne efektywnie przyspiesza i w ten sposób optymalizuje system cyjanogeny, wskazując na duże biologiczne znaczenie szybkiego i skoncentrowanego wytwarzania HCN.

W literaturze niewiele jest informacji na temat β -glukozydaz w roślinach zawierających glukozydy cyjanogenne. Najlepiej poznana jest β -glukozydaza wyizolowana



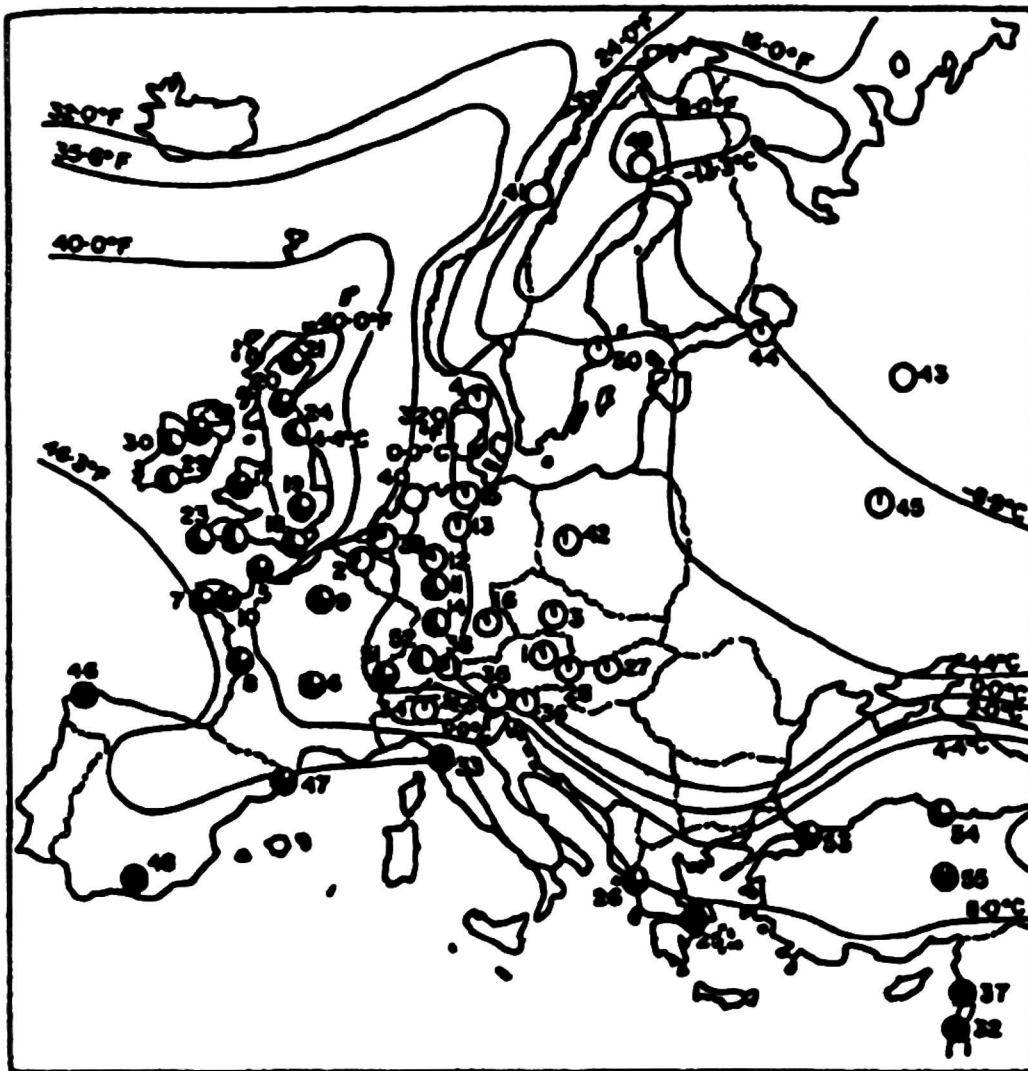
Rysunek 2. Hydroliza enzymatyczna linamaryny i lotaustraliny [30]

z migdałów. Jest ona dostępna w handlu i najczęściej stosowana w półilościowych testach oznaczania zawartości cyjanowodoru. W rzeczywistości glukozydaza ta jest mieszaniną β -glukozydaz i łatwo hydrolizuje amygdalinę, prunazynę i kilka innych glukozydów cyjanogennych, jednakże niektóre związki hydrolizuje słabo lub w ogóle ich nie rozkłada. Na przykład glukozydaza ta nie hydrolizuje w ogóle linamaryny, lotaustraliny i gynokardiny. Większość β -glukozydaz wykazuje wysoką specyficzność substratową i stąd nazwy potoczne poszczególnych glukozydaz wywodzi się od nazwy substratu, np. linamaraza [35].

Pomimo że enzymy (β -glukozydazy i liazy hydroksynitrylowe) i substraty (glukozydy cyjanogenne) często występują razem w tym samym organie roślinnym, wolny HCN rzadko występuje w roślinach. Enzymy hydrolityczne i substraty są przestrzennie oddzielone. W niektórych wypadkach enzymy hydrolityczne znajdują się w jednym typie komórek, a substraty w innym. W innych rozdzielenie ma miejsce na poziomie komórkowym [35]. Na przykład w etiolowanych siewkach sorgo 95% duryny zlokalizowane jest w wakuolach komórek epidermy i, jak wykazano, synteza i magazynowanie tego związku odbywa się w tej samej komórce [15]. Tymczasem β -glukozydaza i liaza hydroksynitrylowa występują w komórkach mezofilowych. W momencie zmiżdżenia tkanki dochodzi do kontaktów enzymów z glukozydem i zachodzi cyjanogeneza. W liściach *Phaseolus lunatus* L. i w korzeniach manioku β -glukozydaza linamarynowa i odpowiednia liaza zlokalizowane są w przestrzeniach międzykomórkowych.

Polimorfizm biochemiczny cyjanogenezy w koniczynie białej (*Trifolium repens* L.)

W koniczynie białej cyjanogenność nie jest cechą jednorodną wszystkich osobników określonej populacji. W obrębie gatunku obserwuje się duże, międzyosobnicze różnicowanie zawartości związków cyjanogennych. Zjawisko to, określane mianem polimorfizmu biochemicznego cyjanogenezy, wykryte zostało już na początku obe-



Rysunek 3. Częstość występowania cyjanogenezy w europejskich populacjach koniczyny białej [16]

- — częstość występowania cyjanogenezy 100%
- — brak roślin cyjanogennych

cnego stulecia, a następnie badane w roślinach kozieradki i koniczyny białej. Cyjanogenność koniczyny białej warunkują dwie niezależne pary alleli. Jeden z genów (*Ac*) warunkuje syntezę glukozydów cyjanogennych — linamaryny i lotaustraliny, drugi zaś (*Li*) biosyntezę linamarazy — enzymu hydrolizującego te glukozydy. Naturalne populacje koniczyny mogą zatem zawierać cztery genotypy: *AcLi*, *Acli*, *acLi* i *acli*, które mogą być rozróżnione fenotypowo za pomocą testów chemicznych.

Częstość występowania cyjanogenezy jest cechą charakterystyczną różnych populacji koniczyny białej. Badania przeprowadzone na populacjach europejskich wykazały, że istnieje korelacja pomiędzy częstością występowania cyjanogenezy a średnią temperaturą stycznia, jak pokazano na rysunku 3 [16].

W populacjach brytyjskich, gdzie średnia izoterma stycznia jest wyższa niż 5°C, częstość cyjanogenezy waha się w granicach 70–90%, a niektóre populacje hiszpańskie i portugalskie zawierają 100% roślin cyjanogennych. Jednocześnie w centralnej Rosji, gdzie temperatura stycznia jest niska, populacje koniczyny białej nie zawierają roślin cyjanogennych. W populacjach środkowoeuropejskich, w tym w polskich, częstość cyjanogenezy waha się w granicach 20–50%.

Jak podają Nowacki i Blaim [32], "wszystkie polskie odmiany uprawne i dziko rosnące populacje zebrane na terenie Polski charakteryzują się bardzo niską częstotliwością występowania form cyjanogennych i to mimo częstych krzyżowań polskich form z importowanymi cyjanogennymi formami z Włoch i południowej Francji. Mimo braku w tym kierunku selekcji w krajowych odmianach, cecha wysokiej zawartości glukozydów cyjanogennych ginie".

Prawdopodobnie jedną z głównych przyczyn tej szczególnej korelacji między temperaturą stycznia a częstotliwością występowania cyjanogenezy jest preferencyjne zjadanie przez ślimaki młodych, niecyjanogennych siewek [23]. Przyczyną wysokiej częstotliwości występowania cyjanogenezy w populacjach brytyjskich, hiszpańskich czy śródziemnomorskich jest to, że naturalne szkodniki, takie jak ślimaki, wykazują aktywność przez cały rok. Wiosną, kiedy koniczyna kiełkuje, młode, niecyjanogenne siewki są zjadane, a HCN wydzielany z siewek cyjanogennych stanowi naturalną barierę odstraszącą. Natomiast niską częstotliwość występowania cyjanogenezy w populacjach rosyjskich można tłumaczyć tym, że niskie temperatury zmuszają większość szkodników roślinożernych do zimowania. Ich aktywność zaczyna się dopiero późną wiosną, kiedy siewki koniczyny wyprodukują wystarczająco dużą masę liściową i nie wymagają już ochrony przed szkodnikami roślinożernymi.

Innym wytłumaczeniem tego zjawiska może być mniejsze znaczenie fizjologiczne cyjanogenezy w strefach o niskich temperaturach. System gromadzenia glukozydów cyjanogennych i odpowiednich enzymów staje się w tych warunkach nieprzydatny i niestabilny. Niskie temperatury mogą powodować uszkodzenia roślin i uwalnianie HCN, który staje się autotoksyną [4]. Jednakże ten wpływ niskich temperatur mógłby ewolucyjnie zostać rozwiązany fenotypowo, tzn. rośliny mogłyby gromadzić mniej glukozydów cyjanogennych w niekorzystnych okresach sezonu wegetacyjnego. W rzeczywistości taki mechanizm można znaleźć w naturalnych populacjach *Lotus corniculatus* L. Również mrozoodporność była wskazywana jako cecha odpowiedzialna za różnice w częstotliwości występowania cyjanogenezy w populacjach krajowych [32].

Nakłady energetyczne na biosyntezę glukozydów cyjanogennych w koniczynie białej

Niektórzy autorzy badający procesy wtórnego metabolizmu roślinnego sugerują, że polimorfizm biochemiczny występuje w roślinach dla utrzymania równowagi pomiędzy nakładami energetycznymi i korzyściami, jakie roślina ponosi/uzyskuje z syntezy metabolitów wtórnych. Nakłady energetyczne dotyczą wydatków energii na syntezę metabolitów (włączając przekształcenia), gromadzenie, transport i zapobieganie samozatruciu. Należy się spodziewać, że te wydatki energetyczne hamują rozwój roślin, gdyż energia obok dostępności składników pokarmowych jest czynni-

kiem limitującym wzrost roślin. Liczne badania potwierdzają, że wzrost roślin i procesy reprodukcji są ujemnie skorelowane z zawartością metabolitów wtórnych i z odpornością roślin [23], chociaż w literaturze można także znaleźć liczne doniesienia nie stwierdzające takich zależności [46]. Szacowanie nakładów przeprowadza się na podstawie wzajemnych relacji między zawartością wtórnych metabolitów a dynamiką wzrostu i produkcją nasion. Uważa się, że jeśli roślina ma niewystarczające zaopatrzenie w energię lub składniki pokarmowe, wykorzystanie ich w procesach wzrostowych lub obronnych przez wytwarzanie metabolitów wtórnych stanowi problem optymalizacji dla samej rośliny. Można przypuszczać, że zwiększona synteza wtórnych metabolitów może prowadzić do zahamowania wzrostu. Jeśli natomiast tak nie jest, należy się spodziewać dodatniej korelacji lub jej braku między dynamiką wzrostu a zawartością metabolitów wtórnych [41].

Nakłady energetyczne na syntezę glukozydów cyjanogennych w koniczynie białej były przedmiotem wielu badań. Jak wynika z danych prezentowanych w tabeli 1 zdolność do syntezy glukozydów cyjanogennych jest skorelowana z liczbą kwiatów i odpornością na suszę, oraz częściowo z plonem zielonej masy i odpornością na zgryzanie, ale tylko w wieku młodocianym. W pozostałych wypadkach brak jest wyraźnej korelacji między np. zdolnością do syntezy enzymu i cechami rozwojowymi koniczyny. Jak podaje Kakes [23] kalkulacja nakładów w odniesieniu do liczby kwiatów też nie jest całkowicie jasna. Koszt syntezy jednego mola linamaryny z waliny wynosi 2 mole ATP, 1 mol NADH₂, 1 mol glukozy i 1 mol waliny. Całkowity nakład, włączając zużyte aminokwasy, w jednostkach ATP wynosi 109 moli lub 5476 kJ na 1 mol (247,2 g) linamaryny. Wartości dla lotaustraliny są takie same. W przeliczeniu na jedną roślinę, koszt syntezy glukozydów cyjanogennych wynosił 5 kJ, natomiast nakład energetyczny na syntezę jednej główki kwiatowej wynosił 18,8 kJ/g.

Tabela 1. Porównanie wpływu genu *Ac* i *Li* na cechy rozwojowe koniczyny białej (*Trifolium repens* L.)

Badana cecha	Gen odpowiedzialny	Wpływ
Liczba kwiatów [23]	<i>Ac</i>	<i>Ac</i> < <i>ac</i> przy niskich temperaturach
Liczba kwiatów [23]	<i>Ac</i>	<i>Ac</i> > <i>ac</i> w wysokich temperaturach
Liczba kwiatów [23]	<i>Ac</i> i <i>Li</i>	<i>Ac, Li</i> < <i>Acli, acli</i>
Plon wegetatywny [23]	<i>Ac</i> i <i>Li</i>	<i>AcLi</i> > <i>Acli, acLi acli</i> w wysokich temperaturach
Odporność na suszę [23]	<i>Ac</i>	<i>Ac</i> > <i>ac</i>
Powierzchnia liści [12]	<i>Li</i>	<i>Li</i> > <i>li</i>
Konkurencyjność [13]	<i>Li</i>	najwyższa w stanonowiskach mieszanych
Wzrost młodociany [13]	<i>Li</i> (+ <i>Ac</i> ?)	<i>Li</i> > <i>li</i>
Wzrost korzeni [10]	<i>Li</i>	<i>Li</i> > <i>li</i>
Odporność na zgryzanie [9]	<i>Ac</i> + <i>Li</i>	<i>AcLi</i> > <i>Acli, acli</i>

Wynika z tego, że nakłady na wytworzenie kwiatów znacznie przewyższają nakłady na syntezę glukozydów cyjanogennych, co może sugerować, że nie istnieje żadna zależność pomiędzy tymi dwoma procesami. Jednakże przedstawione wydatki energetyczne nie uwzględniają transportu, zabezpieczenia przed samozatruciem, czy też procesów przekształceń tych związków w roślinie.

Korzyści wynikające z syntezy glukozydów cyjanogennych

Jakkolwiek Hruška [19] w artykule przeglądowym krytycznie ustosunkował się do wielu prac donoszących o ochronnym znaczeniu glukozydów cyjanogennych w roślinach, to jednak wiele jest dowodów na to, że związki te są elementem systemu ochrony chemicznej, stosowanym przez wiele organizmów żywych [29]. W pracach przeprowadzonych na siewkach sorga (*Sorghum bicolor* Koern.) wykazano, że nie całkowita zawartość glukozydów cyjanogennych jest najważniejszym czynnikiem odporności na mszyce, lecz sprawność systemu wytwarzania HCN [20]. W skład tego systemu wchodzi glukozydy cyjanogenne, aktywne β -glukozydazy i liaza hydroksynitrylowa. Organizmy, które zoptymalizowały wydajność tego systemu, z całą pewnością wykorzystują go jako mechanizm obronny [29]. Należy przy tym podkreślić, że czynnikiem aktywnym tego systemu niekoniecznie musi być HCN. Inne związki, takie jak aldehydy lub ketony, wytwarzane w procesie cyjanogenezy mogą być bardziej aktywne niż HCN [33]. Wykazano, że aceton i 2-butanon, wytwarzane w czasie hydrolizy linamaryny i lotaustraliny są głównymi związkami odstraszającymi ślimaki od żerowania na *Lotus corniculatus* L. i *Trifolium repens* L. [22]. Jednoznaczne wskazanie czynnika odstraszającego lub antyżywnieniowego utrudnia często fakt, że istnieje ujemna korelacja pomiędzy zawartością glukozydów cyjanogennych i tanin, które również uważane są powszechnie za czynnik antyżywnieniowy lub obronny [29].

Obecność związków cyjanogennych może być także przyczyną wrażliwości rośliny na określony typ patogena. Na przykład, wysoka zawartość glukozydów cyjanogennych w *Hevea brasiliensis* Muell.-Arg. (*Euphorbiaceae*) sprawia, że rośliny te są bardziej wrażliwe na *Microcyclus ulei* [25]. Udowodniono, że podczas inwazji patogena uwalniany jest HCN, który z kolei hamuje syntezę skopoletyny — fitoaleksyny wytwarzanej w roślinie [26]. Podobnie epiheterodendryna [14] — glukozyd cyjanogenny występujący w komórkach epidermy jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) sprawia, że odmiany zawierające ten związek są wrażliwe na *Erysiphe graminis* DC f. sp. *hordei* [36].

Na funkcję ochronną glukozydów cyjanogennych w koniczynie białej wskazywało kilku autorów [7]. Stwierdzono, że niektóre gatunki ślimaków preferowały formy niecyjanogenne lub niskocyjanogenne koniczyny [2]. W warunkach laboratoryjnych i polowych stwierdzono, że cyjanogeneza była czynnikiem hamującym, ale nie

zapobiegającym całkowitemu żerowaniu ślimaków na koniczynie [9]. Natomiast Millar i in. [27] nie stwierdzili żadnych preferencji w zjadaniu roślin niecyjanogennych przez zwierzęta.

Według Spencera [43] traktowanie glukozydów cyjanogennych jako związków ochronnych przed owadami ma ograniczoną wiarygodność jeśli rozpatrujemy je w układzie odizolowanym od czynników środowiska. Ekstrapolacja wyników laboratoryjnych nad efektywnością glukozydów cyjanogennych jako substancji odstraszających w warunkach polowych do dnia dzisiejszego nie uzyskała dodatkowego potwierdzenia wynikami badań. Chociaż wiadomo, że glukozydy cyjanogenne są szkodliwe dla ludzi i zwierząt, istnieje potrzeba ponownego, opartego na bardziej precyzyjnych metodach określenia ich funkcji w warunkach naturalnych.

Wpływ glukozydów cyjanogennych na zwierzęta roślinożerne

Istnieją liczne dowody na to, że niehydrolizowane glukozydy cyjanogenne są wydzielane z organizmu zwierzęcego i nie wykazują żadnej toksyczności [5]. Aby wystąpił efekt toksyczny glukozydy cyjanogenne muszą ulec hydrolizie, co wymaga obecności β -glukozydazy. Istnieją rośliny zawierające glukozydy cyjanogenne, ale nie zawierające tego enzymu i w takim wypadku hydroliza glukozydów cyjanogennych w przewodzie pokarmowym zwierzęcia nastąpi wtedy, gdy zwierzę lub jego endosymbionty wytwarzają β -glukozydazę. Dla rozróżnienia roślin, które wytwarzają HCN w trakcie miążdżenia od tych, które wymagają dodatkowo β -glukozydazy wprowadzono odpowiednio pojęcia "rośliny cyjanoforowe" [17] i "rośliny cyjanogenne" [1].

Wpływ toksyczny roślin zawierających glukozydy cyjanogenne na zwierzęta zależy od wielu czynników, takich jak: wielkość zwierzęcia, zawartość glukozydów cyjanogennych w zjadanych roślinach, ilość zjedzonej masy roślinnej, a także tempo spożywania tej paszy. Ważne jest również czy zwierzę żuje masę roślinną, czy też bezpośrednio ją połyka. Miążdżone podczas żucia tkanki roślin cyjanoforowych wydzielają natychmiast HCN, zanim pokarm przejdzie do dalszych części przewodu pokarmowego. Jeśli zwierzę wyczuwa smakowo obecność HCN, może taką paszę odrzucić lub preferencyjnie ją zjadać.

Ważnym czynnikiem mającym wpływ na toksyczność roślin cyjanogennych dla zwierząt są warunki, jakie panują w żołądku. Większość glukozydaz wykazuje optymalną aktywność przy pH środowiska około 7. Dlatego też u zwierząt o kwaśnym trawieniu, np. u koni, enzymy te są dezaktywowane i nie występuje efekt zatrucia. Przeżuwacze w swoim przewodzie pokarmowym mają odczyn obojętny i stąd są wrażliwe na zatrucie [5].

Letalna dawka HCN dla człowieka i zwierząt waha się w granicach 0,5–3,5 mg/kg ciała przy pobraniu doustnym [42]. Ponieważ oszacowanie to zakłada, że cały HCN

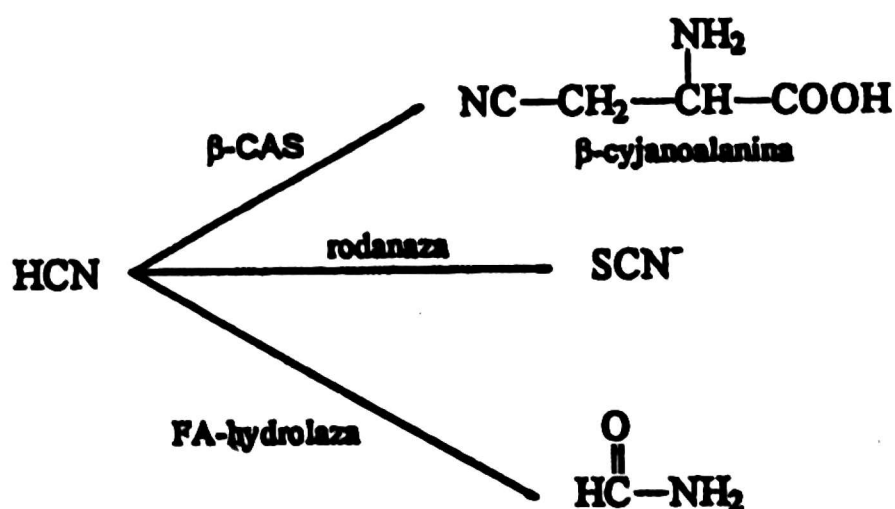
spożyty jest jednocześnie, praktycznie dawka letalna jest 10–20 krotnie wyższa [5]. Należy jednak podkreślić, że oprócz ostrych zatruc, mogą wystąpić objawy zatruc chronicznych powodowanych metabolitami detoksykacji HCN, a także produktami powstającymi przy hydrolizie glikozydów cyjanogennych, tj. aldehydami i ketonami. Wspominany aceton lub metyloetyloketon jest dla zwierząt również bardzo toksyczny.

HCN w organizmie zwierzęcym wykazuje zdolność tworzenia kompleksów z białkami hemu, głównie oksydazą cytochromową — enzymem katalizującym końcowy etap oddychania. Może to prowadzić do zakłóceń w pracy mózgu, tzw. kretynizmu [8]. Ponadto obecność SCN powstałego z HCN wykazuje aktywność goitrogenną [37]. Długotrwałe działanie cyjanowodoru może prowadzić do chorób systemu nerwowego [18] lub zaburzeń w metabolizmie selenu [11].

Organizmy żywe mają zdolność przekształcania HCN do mniej toksycznych związków. Na przykład lemur (*Haplemur aureus*) zjada jako swoje podstawowe pożywienie młode pędy bambusa, zawierające olbrzymie ilości związków cyjanogennych i dotychczas nie wiadomo, w jaki sposób unika on zatrucia. Możliwe znane drogi przekształceń HCN przedstawia rysunek 4.

Jednym z najważniejszych procesów detoksykacji HCN w roślinach i u owadów jest przeniesienie CN do seryny lub cysteiny i wytworzenie β -cyjanoalaniny [48], związku o właściwościach neurotoksycznych [29]. Katalizująca ten proces syntaza β -cyjanoalaninowa (β -CAS) występuje również u wielu roślin nie akumulujących glikozydów cyjanogennych i jej funkcją w tych wypadkach jest katalizowanie wiązania HCN powstającego przy syntezie etylenu [50].

Główną drogą detoksykacji HCN w organizmach zwierzęcych, ale występującą również u roślin i u owadów, jest reakcja cyjanowodoru i tiosiarczanu, katalizowana przez rodanazę (EC 2.8.1.1), w wyniku której powstaje tiocyjanian i tiosiarczyn [3]. Tiocyjanian może powstawać również z glukozynolanów i, jak wykazały liczne badania, proces jego usuwania z organizmu przebiega powoli; związek ten powoduje powiększenie tarczycy i zakłócenia w organicznym wiązaniu jodu w organizmie.



Rysunek 4. Metody detoksykacji HCN [30]

Przypuszcza się, że związek ten jest w głównej mierze odpowiedzialny za chroniczną toksyczność glukozydów cyjanogennych [47].

Inną drogą detoksykacji, potwierdzoną u grzybów, ale kwestionowaną u roślin wyższych, jest hydroliza cyjanowodoru do formamidu za pomocą hydrolazy formamidowej [24].

Występowanie glukozydów cyjanogennych w krajowych odmianach koniczyny białej

Zawartość glukozydów cyjanogennych w częściach nadziemnych koniczyny białej oznaczano za pomocą nowo opracowanej oryginalnej metody chromatografii cieczowej [44, 45].

Z krajowych odmian koniczyny białej jedynie Podkowa nie zawiera glukozydów cyjanogennych. Pozostałe odmiany można podzielić na dwie grupy (tab. 2): wysokocyjanogenne (powyżej 370 mg HCN/kg suchej masy), do których należą Anda, Armena i Santa oraz o średniej zawartości, takie jak: Astra, Rema i Romena.

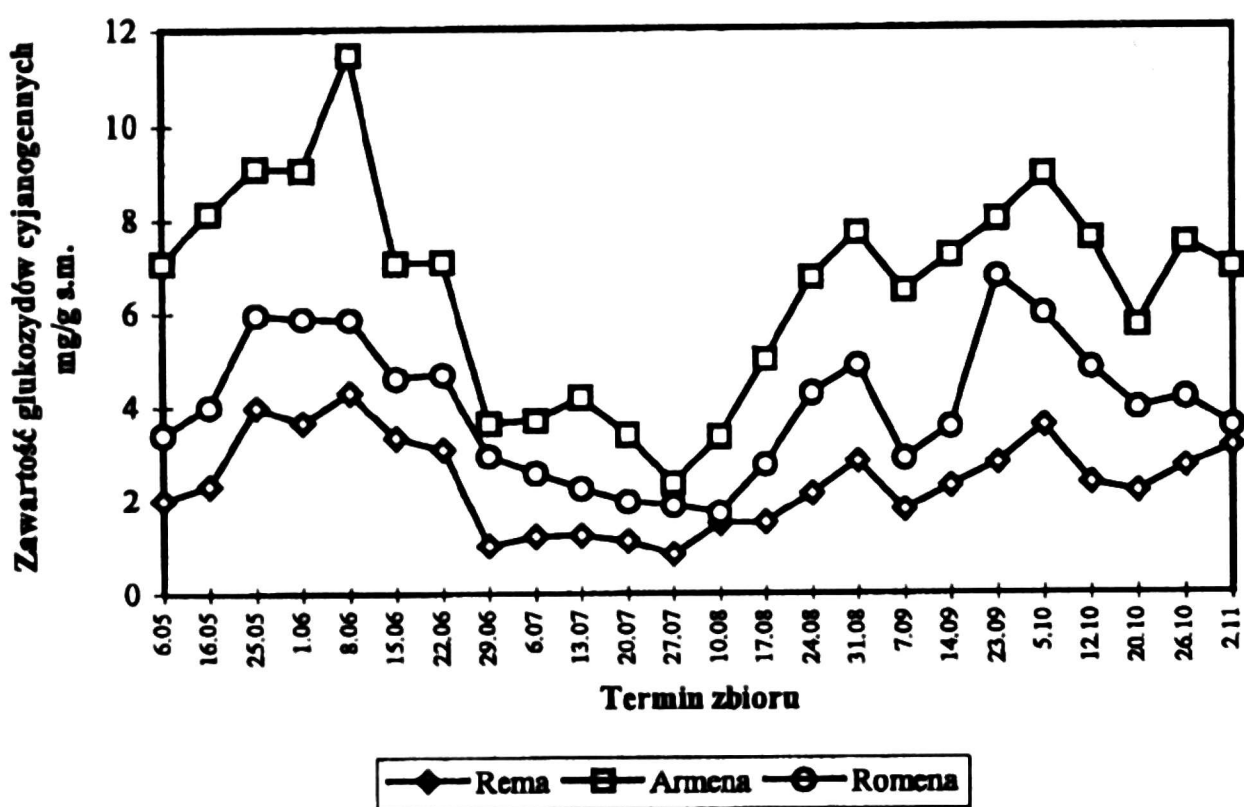
Zawartość glukozydów cyjanogennych wykazuje dużą zmienność w czasie sezonu wegetacyjnego (rys. 5). Wszystkie odmiany reagują tak samo, bez względu na początkową zawartość glukozydów. Wiosną i jesienią poziom glukozydów jest wysoki (440–1204 mg HCN/kg suchej masy) i wszystkie odmiany można zakwalifikować jako wysokocyjanogenne. W lecie zawartość glukozydów drastycznie spada i wszystkie odmiany zawierają "bezpieczną", z punktu widzenia żywieniowego, ilość tych związków.

Zawartość glukozydów w czasie sezonu wegetacyjnego jest skorelowana ze średnią dobowych temperatur z dnia pobrania próby i czterech dni poprzedzających. Gdy średnia dobowych temperatur spada poniżej 15°C to zawartość glukozydów wzrasta do poziomu wysokiego. Wszystkie odmiany krajowe są w tych warunkach

Tabela 2. Zakres zmienności zawartości glukozydów cyjanogennych w odmianach koniczyny białej (*Trifolium repens* L.)

Odmiana	Zawartość minimalna		Zawartość maksymalna	
	mg/g s.m.	mg HCN/kg s.m.	mg/g s.m.	mg HCN/kg s.m.
Anda	2,573	267	9,428	996
Armena	2,337	245	11,462	1204
Santa	2,169	229	7,620	804
Astra	0,847	90	5,161	547
Rema	0,846	89	4,276	453
Romena	1,708	181	6,754	716
Podkowa	*	*	*	*

* Poniżej wykrywalności metody.



Rysunek 5. Zmiany sumarycznej zawartości linamaryny i lotaustraliny w czasie sezonu wegetacyjnego trzech odmian koniczyny białej (*Trifolium repens* L.)

niebezpieczne dla zwierząt, a szczególną uwagę należy zwracać na odmiany wysokocyjanogenne.

Wiosną wszystkie odmiany zawierają więcej glukozydów w blaszkach liściowych niż w ogonkach liściowych. W lecie i jesienią zależność ta jest odwrotna; ogonki są bogatsze w glukozydy niż blaszki liściowe.

Stosunek linamaryny do lotaustraliny waha się w granicach 0,4–0,8 i jest wyższy dla odmian o mniejszej zawartości glukozydów cyjanogennych. Stosunek linamaryny do lotaustraliny jest wyższy w blaszkach liściowych niż w ogonkach. Dla odmian o średniej zawartości glukozydów, w niektórych okresach sezonu wegetacyjnego, może on nawet wynosić 2,0.

W trakcie suszenia zielonki koniczyny białej w warunkach naturalnych i w suszarce w temperaturze 50°C następuje częściowy rozkład glukozydów cyjanogennych. W zależności od odmiany tak wysuszone próby zawierają 50–70% glukozydów w stosunku do materiału liofilizowanego.

Należy zachować dużą ostrożność przy spasaniu szczególnie odmian wysokocyjanogennych koniczyny białej w okresach wiosennym i jesiennym na pastwiskach, na których stanowi ona więcej niż 30% runi. Odmiany te nie powinny być zalecane do wykorzystania pastwiskowego, a raczej do uprawy w mieszankach z trawami i do użytkowania kośnego.

Powyższe wyniki powinny być uwzględnione przez hodowców przy kreowaniu nowych odmian, a zawartość glukozydów cyjanogennych powinna być parametrem jakościowym uwzględnianym przy ocenie odmian w postępowaniu rejestrowym.

- [1] Andersen H. 1988. Null hypotheses and species composition in the Galapagos Islands. W: Diversity and pattern in plant communities. (wyd. During H.J., Werger M.J., Willems H.J.), SPB Acad. Publ. The Hague: 37–46.
- [2] Angseesing J.P.A. 1974. Selective eating of the acyanogenic forms of *Trifolium repens*. *Heredity* 32: 73–83.
- [3] Beesley S.G., Compton S., Jones D.A. 1985. Rhodanese in insect. *J. Chem. Ecol.* 11: 45–50.
- [4] Brighton F., Horne M.T. 1977. Influence of temperature on cyanogenic polymorphisms. *Nature* 265: 437–438.
- [5] Conn E.E. 1978. Cyanogenesis, the production of hydrogen cyanide by plants. W: Effects of poisonous plants on livestock. (wyd. Keeler R.F., Kampen K.R., James L.F.), Academic Press, Orlando FL: 310–330.
- [6] Conn, E.E. 1988. Biosynthetic relationship among cyanogenic glycosides, glucosinolates and nitro compounds. W: Biologically active natural products: potential use in agriculture, ACS Symposium Series No 380 (wyd. H.G. Cutler), ACS, New York: 144–153.
- [7] Daday H. 1955. Cyanogenesis in strains of white clover (*Trifolium repens* L.). *J. Brit. Grass. Soc.* 10: 266–274.
- [8] Delange F., Bordoux P., Colinet E., Courtois P., Hennart P., Lagasse R., Mafuta M., Seghers P., Thilly C., Vanderpas J., Yunga Y., Ermans A.M. 1983. Nutritional factors involved in the goitrogenic action of cassava. W: Cassava toxicity and thyroid: Research and public health issues. (wyd. Delange F., Ahluwalia F) IDRC, Ottawa, Canada: 17–26.
- [9] Dirzo R., Harper J.L. 1982. Experimental studies on slug-plant interactions. III. Differences in the acceptability of individual plants of *Trifolium repens* to slugs and snails. *J. Ecol.* 70: 101–117.
- [10] Dommee B., Brakefield P.M., Macnair M.R. 1980. Differential root growth of the cyanogenic phenotypes of *Trifolium repens*. *Oecol. Plant* 1: 367–370.
- [11] Elzubeir E., Davis R. 1988. Effect of dietary sodium nitro-prusside as a source of cyanide on the selenium status of chicks given diets of varying selenium concentration. *British Poultry Sci.* 29: 769–777.
- [12] Ennos R.A. 1981. Manifold effects of the cyanogenic loci in white clover. *Heredity* 45: 127–132.
- [13] Ennos R.A. 1981. Detection of selection in populations of white clover. *Biol. J. Linn. Soc.* 15: 75–82.
- [14] Erb N., Zinsmeister H.D., Lehmann G., Nahrstedt A. 1979. Epiheterodendrin a new cyanogenic glucoside from *Hordeum vulgare*. *Phytochemistry* 18: 1515.
- [15] Halkier B.A., Moller B.L. 1989. Biosynthesis of cyanogenic glycoside dhurrin in seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and partial purification of the enzyme system involved. *Plant Physiol.* 90: 1552–1559.
- [16] Harborne J.B. 1992. Introduction to ecological biochemistry. Academic Press, London.
- [17] Hegnauer R. 1977. Cyanogenic compounds as systematic markers in Tracheophyta. *Plant Syst. Evol. Suppl.* 1: 191–201.
- [18] Howlett W.P., Brubaker G.R., Mlingi N., Rosling H. 1990 Konzo, an epidemic upper motor neuron disease studied in Tanzania. *Brain* 113: 223–235.
- [19] Hruška A.J. 1988. Cyanogenic glycosides as defense compounds. A review of the evidence. *J. Chem. Ecol.* 14: 2213–2217.
- [20] Hsieh J.S. 1989. Cyanogenesis and aphid resistance in sorghum. *Chem. Abstr.* 111(74934).
- [21] Hucklesby D.P., Dowling M.J., Hewitt E.J. 1982. Cyanide formation from glyoxylate and hydroxylamine catalyzed by extracts of higher-plant leaves. *Planta* 156: 487–491.
- [22] Jones D.A. 1988. W: Cyanide compounds in biology. (Ciba Symposium vol. 140 (wyd. D. Evered i S. Harnett), Wiley Chichester: 151–165.
- [23] Kakes P. 1989. An analysis of the costs and benefits of the cyanogenic system in *Trifolium repens* L. *Theor. Appl. Genet.* 77: 111–118.

- [24] Knowles C.J. 1988. Cyanide utilization and degradation by micro-organisms. W: Cyanide compounds in biology. CIBA foundation, Wiley, Chichester: 3–15.
- [25] Lieberei R. 1988. Relationship of cyanogenic capacity (HCN-c) of the rubber tree *Hevea brasiliensis* to susceptibility of *Microcyclus ulei*, the agent causing South American leaf blight. *J. Phytopath.* 122: 54–67.
- [26] Lieberei R., Biehl B., Giesemann A., Junqueira N.T.V. 1989. Cyanogenesis inhibits active defense reactions in plants. *Plant Physiol.* 90: 33–36.
- [27] Millar J.D., Gibson P.G., Cope W.A., Knight W.E. 1975. Herbivore feeding on cyanogenic and acyanogenic white clover seedlings. *Crop Sci.* 15: 90–91.
- [28] Nahrstedt A. 1981. Isolation and structure elucidation of cyanogenic glycosides. W: Cyanide in biology. (wyd. Kennesland B., Conn E.E., Knowles C.J., Westley J., Wissing F.) Academic Press, London: 146–181.
- [29] Nahrstedt A. 1985. Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms. *Plant System. Evol.* 150: 35–47.
- [30] Nahrstedt A. 1992. The biology of the cyanogenic glycosides: new developments. W: Nitrogen metabolism of plants. (wyd. Mengel K., Pilbeam D. J.) Clarendon Press, Oxford: 249–269.
- [31] Nahrstedt A., Jensen P.S., Wray V. 1990. Prunasin-6'-malonate, a cyanogenic glucoside from *Merremia dissecta*. *Phytochemistry* 28: 623–624.
- [32] Nowacki E., Blaim H. 1979. Próba zmiany częstotliwości występowania glukozydów cyjanogennych w *Lotus corniculatus* i *Trifolium repens*. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Roślin* 134: 127–132.
- [33] Peterson S.C. 1986. Breakdown products of cyanogenesis. Repelency and toxicity to predatory ants. *Naturwissenschaften* 73: 627–628.
- [34] Porter D.J.T., Bright H.J. 1987. The cyanogenic substrate for horseradish peroxidase is a conjugated enamine. *J. Biol. Chem.* 262: 9154–9159.
- [35] Poulton J.E. 1988. Localization and catabolism of cyanogenic glycosides. W: Cyanide compounds in biology. (wyd. CIBA foundation), Wiley, Chichester: 67.
- [36] Pourmohseni H. 1989. Cyanoglycoside in der Epidermis von Sommergerste und ihre Bedeutung für die quantitative Resistenz bzw. Anfalligkeit gegenüber dem Echten Mehltau (*Erysiphe graminis* DC f. sp. hordei Marchal). Praca doktorska, Gottingen.
- [37] Rudert C., Oliver J. 1976 The effect of thiocyanate on the occurrence of goitre in new born lambs. *Rhod. J. Agric. Res.* 14: 67–72.
- [38] Seigler D.S. 1991. Cyanide and cyanogenic glycosides. W: Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites. Vol. I. The chemical participants. (Wyd. Rosenthal G.A., Berenbaum M.R.), Academic Press, Inc.: 124–157.
- [39] Selmar D., Lieberei R. 1988. Mobilization and utilization of cyanogenic glycosides — the linustatin pathway. *Plant Physiol.* 86: 711–716.
- [40] Selmar D., Lieberei R., Biehl B., Conn E.E. 1989. α -Hydroksynitrile lyase in *Hevea brasiliensis* and its significance for rapid cyanogenesis. *Physiology of Plants* 75: 97–102.
- [41] Simms E.L. 1992. The evolution of plant resistance and correlated characters. Proc. 8th Int. Symp. on Insect–plant relation: 15–26.
- [42] Solomonson L.P. 1981. Cyanide as metabolic inhibitor. W: Cyanide in biology (wyd. Vennesland B., Conn E.E., Knowles C.J., Westley J., Wissing F.) Academic Press, London: 11–28.
- [43] Spencer K. 1988. Chemical Mediation of Coevolution (wyd. Spencer K.) Academic Press, Orlando, Florida: 167–240.
- [44] Stochmal A., Oleszek W. 1994. Determination of cyanogenic glucosides in white clover (*Trifolium repens* L.) by high performance liquid chromatography. *Phytochemical analysis* 5: 271–272.
- [45] Stochmal A., Oleszek W. 1995. Zastosowanie chromatografii cieczowej do oznaczania glukozydów cyjanogennych w roślinach krajowych odmian koniczyny białej (*Trifolium repens* L.). *Pam. Puł.* 106: 119–130.
- [46] Vrieling K., van Wijk C.A.M. 1994. Estimating costs and benefits of the pyrrolizidine alkaloids of *Senecio jacobaea* under natural conditions. *Oikos* 70: 449–454.

- [47] Westley J. 1988. W: Cyanide compounds in biology. CIBA symposium (wyd. Evered D., Harnett S.) Wiley, Chichester: 201–212.
- [48] Witthohn K., Naumann C.M. 1984. Die Verbreitung des β -Cyanoalanin bei cyanogenen Lepidopteren. *Zeitschrift für Naturforschung* 39c: 837–842.
- [49] Yang S.F., Hoffmann N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 155.
- [50] Yip W.K., Yang S.F. 1988. Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissue. *Plant Physiol.* 88: 473–476.

Cyanogenic glycosides of white clover (*Trifolium repens* L.)

Summary

Cyanogenic glucosides, linamarin and lotaustralin occurring in white clover, are the secondary metabolites which during enzymatic cleavage or hydrolysis release cyanide, acetone and metylethylketon. These compounds may cause chronic or acute poisoning in animals. Thus, from a nutritional point of view the cyanogens are recognised as antinutritive factors.

In the present review, recent literature data on the occurrence of cyanogens and the enzymes hydrolysing them in plants as well as biochemical polymorphism of cyanogenesis in white clover are presented. Some problems of the costs and benefits of cyanogen synthesis in plant and their possible ecological function have also been discussed. Since cyanogens are recognised by many authors as a compounds protecting plants against herbivores, some aspects of their influence on animal are summarised.

It was thought until recently that Polish varieties of white clover contain trace amounts of cyanogenic glucosides. Our recent studies showed, however, that some varieties recommended in 1993 contain high amounts of these compounds and that this concentration may drastically change during the growing season. The presented data clearly show that at least some of these varieties should not be recommended to be used as pasture sward components.