

## BIOKEMIJSKE I GENETSKE OSOBINE ALKALOIDA BIJELE LUPINE (LUPINUS ALBUS.)

Zlatko ŠATOVIĆ<sup>1)</sup>Pregledni znanstveni rad  
Primljeno: 10.07.1993.

### SAŽETAK

Problem alkaloida kod bijele lupine (*Lupinus albus* L.) potpuno je riješiv oplemenjivanjem. U radu je dan pregled biokemijskih, fizioloških i genetskih svojstava kinolidinskih alkaloida koji bi se trebali uzeti u obzir u izradi programa oplemenjivanja slatkih kultivara bijele lupine.

Gljučne riječi: bijela lupina (*Lupinus albus* L.), alkaloidi

### BICHEMICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF WHITE LUPIN (*LUPINUS ALBUS* L.) ALKALOIDS

Z. ŠATOVIĆ

Scientific review  
Received: 10.07.1993.

### SUMMARY

The problem of alkaloids in white lupin (*Lupinus albus* L.) can be solved completely by breeding. The paper represents a review of biochemical, physiological and genetic characteristics of quinolizidine alkaloids which have to be considered in a breeding programme for 'sweet' lupin cultivars.

Key words: white lupin (*Lupinus albus* L.), alkaloids

### UVOD

Godine 1927/28 njemački je oplemenjivač von Sengbusch selekcionirao prve bezalkaloidne linije žute lupine (*Lupinus luteus* L.) i uskolisne lupine (*L. angustifolius* L.) te 1930/31. i prve bezalkaloidne linije bijele lupine (*L. albus* L.). Danas postoji više od 30 'slatkih' kultivara bijele lupine koji bi se mogli uspješno introducirati u naša proizvodna područja i upotrijebiti u oplemenjivačkim programima. Prije no što osmislimo sveobuhvatni oplemenjivački program s ciljem dobivanja visokoprinosnih 'slatkih' kultivara bijele lupine prilagođenih našim uvjetima potrebno je upoznati se s biokemijskim i genetskim osobinama alkaloida lupine. Biosinteza, fiziologija i biološka funkcija alkaloida lupine izuzetno je zanimljiva i stoga što pokazuje važnost spojeva sekundarnog metabolizma kod

<sup>1)</sup> RH 41000 Zagreb

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dipl. ing.  
Faculty of Agriculture University of Zagreb, B. S.

fabaceae poznatih pod općenitim nazivom antinutritivni čimbenici kao što su tanini, inhibitori tripsina, lecitini, fitati, oligosaharidi i glukozidi.

## BIKEMIJSKA SVOJSTVA

### Biosinteza i fiziologija

Alkaloidi su bazični biljni produkti s jakim fiziološkim djelovanjem. Alkaloidi koje možemo naći u rodu *Lupinus* pripadaju kinolizidinskoj skupini. Ovi se alkaloidi mogu naći i u nekim drugim rodovima tribusa Genisteeae kao što su *Cytasus*, *Genista*, *Retama*, *Spartium* i *Ulex*, drugim tribusima porodice Fabaceae i drugim porodicama kao što su *Chenopodiaceae*, *Berberidaceae*, *Solanaceae*, *Papaveraceae*, *Scrophulariaceae*, *Santalaceae* i *Ranunculaceae* (Harborne, 1991).

Dosad je otkriveno više od 80 alkaloida u 58 ispitivanih vrsta fabaceae (Wink, 1984). Budući da alkaloidi značajno pridonose preživljavanju i konkurenciji vrste tijekom evolucije Dunn (1984) procjenjuje da postoji više od 100 tipova alkaloida u različitim vrstama roda *Lupinus*.

S biokemijskog gledišta kinolizidinska jezgra se sastoji od dva šesteročlana ugljikova prstena koji dijele isti atom dušika. Većina alkaloida kinolizidinske grupe imaju bicikličku (lupinin), tricikličku (angustifolin, albin) ili tetracikličku (lupanin, spartein, multiflorin, anagirin) strukturu. Štoviše, alkaloidi se mogu naći kao aromatski esteri gdje je esterska grupa benzojeva, cinamična, p-hidroksiciniamična i ferulična kiselina. Alkaloidi kinolizidinske grupe mogu se naći u slobodnom stanju ili kao dušikovi oksidi i moguće je da su ove dvije forme u ravnoteži u biljci (Harborne, 1991). U tabeli 1. možemo vidjeti sadržaj alkaloida u nekim autohtonim populacijama i kultivarima bijele lupine (*L. albus* L.). Kvalitativno određivanje alkaloida uvelike ovisi o upotrebljenoj metodi i ispitivanom kultivaru. Rezultate nekih kvalitativnih određivanja možemo vidjeti u tabeli 2.

**Tabela 1. Sadržaj alkaloida u nekim populacijama i kultivarima bijele lupine**  
**Table 1. Alkaloid contents in some white lupin populations and cultivars**

Populacije i kultivari bijele lupine Populations and cultivars of white lupin	% alkaloida % of alcaloids	
	u lišću in leaves	u sjemenu in seed
Populacija iz Italije	1.6-2.0	1.8-2.9
Populacija iz Portugala	1.0-1.9	1.8-3.0
Populacija iz Egipta	1.2-1.9	2.2-2.5
Populacija s Balkanskog poluotoka	1.5-1.8	2.4-3.3
'Gorki' kultivari	1.1-1.4	2.4-2.8
'Slatki' kultivari	0.04-0.15	0.06-0.12
var. <i>graecus</i>	0.37	3.6

Tabela 2. Kvalitativno određivanje alkaloida bijele lupine  
Table 2. Qualitative determination of white lupin alkaloids

1)	Karlsson, 1982	Muzquiz 1988	Wysocka, 1988
2)	Multilupa	Kali	Bac
3)	Fotokolorimetrija	Plinska kromatografija	Plinska kromatografija
4)	4-hidroksilupanin	lupanin	lupanin
	(50.62 %)	(80.7 %)	(87 %)
	lupanin	dehidroangustifolin	13-hidroksilupanin
	(25.20%)	(10.2%)	(8%)
	neidentificiran	13-hidroksilupanin	multiflorin
	(17.46%)	(9.1%)	(1.2%)
	13-hidroksilupanin		seko (11-12)-12
	(9.05%)		dehidromultiflorin
			(1,5%)
	neidentificiran		albin
	(5.22%)		(tragovi)
	lupinin		13-hidroksimultiflorin
	(1.24%)		(tragovi)
			dehidromultiflorin
			(tragovi)

Legenda: 1) Autor, godina; 2) Kultivar; 3) Metoda određivanja; 4) Alkaloidi (% ukupnog sadržaja)  
Izvor: Karlsson, 1982; Muzquiz, 1988; Wysocka, 1988

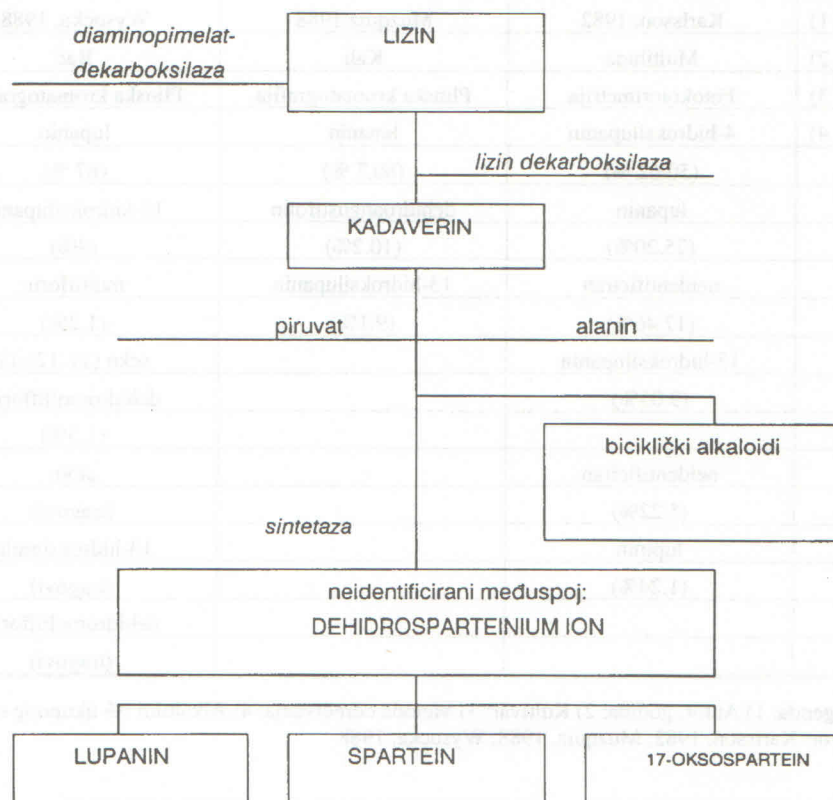
Aminokiselina lizin jedini je potrební supstrat za biosintezu kinolizidinskih alkaloida (Hartmann, 1988; Wink, 1984), te se vjeruje da je biosinteza alkaloida rezultat mutacije koja je utjecala na njegov metabolizam (Kinghorn et al., 1981).

Prvi korak u biosintezi alkaloida je dekarboksilacija lizina pomoću enzima lizin-dekarboksilaze. Kao rezultat ovog procesa nastaje kadaverin (grafikon 1).

Drugi je korak kondenzacije 3 molekule kadaverina u tetraciklički kinolizidinski prsten. Otkriveno je da se eliminacija 4 amino- grupe iz 3 molekule kadaverina provodi stehinometrijski pomoću transaminacije s piruvatom. Ovako se 4 molekule piruvata koji je specifičan amino-akceptor transformiraju u 4 molekule alanina. Ovaj prvi kinolizidinski proizvod je 17-oksosparteín i tvori se uz pomoć enzima 17-oksosparteín-sintetaza. Također se može dogoditi da se osobodi biciklički međuspoj koji služi kao prekursor za ostale bicikličke kinolizidinske spojeve.

Treći je korak izomerizacija 17-oksosparteína u lupanin. Lupanin služi kao prekursor za većinu ostalih alkaloida (Wink, 1984).

Grafikon 1. Biosinteza alkaloida lupine  
Graph 1. Biosynthesis of lupin alkaloids



Izvor: Wink, 1984; Hartmann, 1988; Keeler, 1989

Rezultati eksperimenata s molekulom kadaverina deuteriziranom na atomu C-1 pokazali su da 17-oksosparteina ne može biti intermedijarni spoj u procesu tvorbe alkaloida kao što su lupanin i spartein. Zato se pretpostavlja da bi intermedijar mogao biti dehidrosparteinium-ion od kojeg počinje biosinteza 17-oksosparteina, sparteina i lupanina (Hartmann, 1988).

Rezultati kasnijih eksperimenata također ukazuju na to da lupanin ne može biti prekursor sparteina jer je deuterij  $2H$  nađen i na atomu C-2 alfa i C-2 beta molekule sparteina (Keeler, 1989).

Ispitivanja na *Lupinus pollyphillus* Lindl. pokazuju da je proizvod biosinteze netaknute biljke uvijek lupanin. Ako kloroplast ima neki nedostatak (oštećena membrana) umjesto lupanina se proizvodi 17-oksosparteina (Wink, 1984).

U pokusima s kadaverinom označenim s  $14C$  uvidjelo se da se aktivna biosinteza alkaloida događa u listovima i peteljka. U slučaju korjena inkorpo-

racija kadaverina u lupanin nije primijećena (Wink, 1984). Tako je dokazano da je mjesto sinteze alkaloida na razini biljke njezini nadzemni, fotosintetski aktivni organi. Štoviše, postoji jaka pozitivna korelacija između količine klorofila i akumulacije alkaloida.

Rezultati pokazuju da se u izoliranim kloroplastima mogu naći sva tri ključna enzima za biosintezu alkaloida: diaminopimelat-dekarboksilaza (posljednji enzim u biosintezi lizina - enzim primarnog metabolizma), lizindekarboksilaza i oksosparteina-sintetaza (Wink, 1984).

Ispitivajući aktivnost ovih triju enzima otkriveno je da se 80% njihove aktivnosti može lokalizirati u stromi kloroplasta gdje se također odvija i biosinteza lizina (Wink, 1984). Aktivnost enzima lizin-dekarboksilaze i oksosparteina-sintetaze je mnogo manja od aktivnosti diaminopimelatdekarboksilaze (Hartmann, 1988).

Alkaloidi su primijećeni u svim dijelovima biljke ali se njihova biosinteza odvija samo u zelenim dijelovima biljke što znači da se oni moraju translocirati u ostale dijelove biljke. Ova hipoteza bila je indirektno potvrđena analizirajući sadržaj alkaloida u parazitskim i hemiparazitskim biljkama koje napadaju lupinu. Castilleja linarifolia, parazit na korijenu, sadržavala je istih 5 alkaloida kao i biljka domaćin *Lupinus barreri* ssp. *ampluis* (Harborne, 1991). U drugom parazitu na korijenu, *Pedicularis racemosa* nađeni su alkaloidi domaćina *Lupinus argenteus* (Schneider, 1990). Eksperimenti s *Cuscuta reflexa* i *C. patyloba* pokazuju da obje vrste uzimaju alkaloide iz domaćina *L. albus* L. iz floema i ksilema i održavaju višu koncentraciju alkaloida nego što postoji u biljci domaćinu (Czygan et al., 1988).

Analiza soka floema pokazuje da je koncentracija alkaloida 5 mmol/l dok je koncentracija aminokiselina 60 mmol/l (Hartmann, 1988). Lupanin, najčešći alkaloid, predstavlja 8 % od sve količine dušika koja se transportira floemom (Wink, 1984).

Smanjenje koncentracije alkaloida u soku floema se može objasniti akumulacijom u organima. Najveća koncentracija alkaloida izmjerena je u zrelih mahunama i sjemenu. Akumulacija alkaloida na razini tkiva nije slučajna. U stabljici se alkaloidi ne akumuliraju u svim stanicama već samo u stanicama epiderme i u jednom ili dva subepidermalna sloja što predstavlja strategijski važne točke u obrani protiv parazita i herbivora. Na subcelularnoj razini alkaloidi se akumuliraju prvenstveno u vakuolama gdje su i koncentracije najveće.

Razlaganje alkaloida je uobičajen korak njihovog metabokizma pomoću kojeg se mobilizira dušik potreban biljci. Zrele sjemenke lupine sadrže do 200 mmol kinolizidinskih alkaloida po kg suhe tvari što čini približno 11 % ukupnog dušika u sjemencima. Dio alkaloida se razlaže tijekom klijanja i razvoja mlade biljke oslobađajući dušik. Razlaganje alkaloida je razlog dnevnog kolebanja sadržaja alkaloida u biljci. Sadržaj alkaloida u različitim organima biljke se mijenja tijekom rasta i razvoja. Koncentracija alkaloida se smanjuje tijekom klijanja zbog razlaganja i povećava razvojem fotosintetski aktivnih organa. Ovo potvrđuje teoriju da se biosinteza alkaloida odvija samo u nadzemnim, zelenim dijelovima biljke.

U početku cvjetovi kao i mahune imaju vrlo visok sadržaj alkaloida no početkom razvoja sjemenke započinje brza preraspodjela alkaloida prema sjemenu. Sjeme brzo povećava sadržaj alkaloida tako da na kraju vegetativnog perioda sadržava skoro u potpunosti prisutne alkaloidne dok se koncentracija u ostalim dijelovima biljke smanjuje. Ovo ukazuje na to da alkaloidi nisu nusprodukt već da se upotrebljavaju od strane biljke na vrlo ekonomičan način (Wink, 1984). Kako se sinteza alkaloida ne odvija u sjemenkama, koncentracija je u potpunosti određena genotipom majke (Jambrina, 1983).

Kako većina procesa koji se odvijaju u kloroplastima ovisi o svjetlosti ne iznenađuje što se i tvorba alkaloida pospješuje na svjetlu i potpuno prestaje u mraku. Pokusi s etioliranim lišćem pokazali su prekidanje biosinteze u mraku.

Drugi fenomen koji se primijetio je dnevno kolebanje sadržaja alkaloida u različitim organima biljke. U svim dijelovima biljke se tijekom noći smanjuje sadržaj alkaloida. U slučaju listova ovaj dnevni ritam predpostavlja konstantnu translokaciju alkaloida u druge biljne organe i tijekom noći. Objašnjenje dnevnog ritma primijećenog u mahunama i sjemenkama je konstantna degradacija alkaloida koja se odvija u ovim organima.

Enzimatska ispitivanja su ukazala na još neke čimbenike koji pospješuju tvorbu alkaloida na svjetlu. Optimalni pH enzima lizindekarboksilaza i oksosparteina sintetaza je približno 8 što se podudara s pH strome kloroplasta u uvjetima osvjetljenja dok je u mraku pH jednako 7. Oba enzima se aktiviraju pomoću enzima reduciranog tioredoksina, kontroliranog svjetlošću, koji također aktivira mnoge druge enzime kloroplasta. Koncentracija lizina koji je jedini potrebiti substrat za biosintezu alkaloida također ovisi o svjetlosti (Wink, 1984).

Johnson et al. (1991) kritiziraju ovu hipotezu zato što im izgleda malo vjerojatno da biljka lupine smanjuje sadržaj alkaloida tijekom noći kada se zna da samonikle lupine možemo naći u krajevima gdje su nastanjene velike, noćne herbivore kao što su jelen ili kunić. Pokusi s *L. succulentus* su pokazali da biljke koje fiksiraju atmosferski dušik ne pokazuju dnevna kolebanja sadržaja dok dobro pognojene biljke bez simbiotskih bakterija *Rhizobium lupini* smanjuju sadržaj alkaloida tijekom noći. Ovo održavanje visoke koncentracije alkaloida tijekom noći može se objasniti samo time da tijekom noći ne dolazi do njihove degradacije. Zašto dobro pognojene i neinkulirane biljke pokazuju dnevno kolebanje nije objašnjeno.

### **Toksikologija**

Toksikološki podaci o nekom kemijskom spoju na temelju kojih se mogu predvidjeti mogući štetni učinci na životinje i ljude i također odrediti dozvoljene koncentracije ovih sastojaka u hrani su akutna toksičnost, kronična toksičnost, mutagenost (genotoksičnost) i teratogenost (Priestly, 1986).

Razmatrajući akutno toksičnost moramo znati simptome intoksikacije i letalnu dozu. Simptomi intoksikacije s različitim alkaloidima kinolizidinskog tipa uključuju depresiju i respiratornu paralizu, opću hipotenzivsku akciju, inhibiciju

muskularne transmisije, fibrilaciju i disneju. Pokusi na miševima i štakorima pokazuju da letalna doza za različite alkaloidne variraju između 100 i 700 mg po kilogramu težine intraperitonealno. Alkaloidi su 6 do 8 puta toksičniji intraperitonealno nego oralno. Primjećeno je da letalna doza za ljude varira između 10- 15 mg/kg težine kod djece i 30-45 mg/kg kod odraslih (Lope de Romana, 1984). Simptomi intoksikacije kod ljudi su: slabost, povraćanje, proširenje zjenica, respiratorne smetnje, poremećaji vida, ataksija, prekomjerno znojenje i koma (Keeler, 1989).

Kronična toksičnost se ispitivala u pokusima s štakorima hranjenim sjemenom *L. albus*, *L. angustifolius* i *L. luteus*. Količine koje odgovaraju koncentraciji alkaloida od 0.029 do 1.8% u režimu ishrane koji je trajao od 20 dana do 9 mjeseci su smanjile prirast životinja zbog nedostatka metionina u hrani, no nisu se primijetile anomalije uzrokovane kroničnom toksičnošću (Culvenor et al., 1986). Kada je koncentracija alkaloida u hrani prešla 1.8 % došlo je do smanjenja rasta uzrokovanog odbijanjem hrane zbog gorkog okusa alkaloida a ne zbog njihove toksičnosti. Alkaloidi ne pokazuju kroničnu toksičnost jer su slabo probavljivi (95 alkaloida se ne absorbira). Zato nemaju akumulativan učinak u organizmu i njihovo trošenje je ograničeno gorkim okusom (Lopez do Romana, 1984).

Mutagena aktivnost (mutagenost, genotoksičnost) se ispitivala upotrebom sistema *Salmonella typhimurium*-mikrosomi sisavaca pomoću kojeg se mogu pretpostaviti kancerogeni spojevi zato što većina takvih pobuđuje malignu transformaciju stanica. Takva aktivnost nije primijećena (Culvenor, 1986).

Jedini kinolizidinski alkaloid koji je pokazao teratogenost je anagirin. Anagirin se može naći u različitim divljim vrstama lupine Novog Svijeta (*L. caudatus* Kell., *L. latifolius* Agardh., *L. sericeus* Pursh., *L. leucophyllus* Dougl., *L. argenteus* Dougl., *L. parviflorus* Nutt. etc.) no nije izvodjen u: *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* niti u *L. mutabilis* (Williams, 1983). Uvidjelo se da ovaj alkaloid uzrokuje kongenitalne malformacije skeletnog sustava kod teladi krava koje su pasle lupine koje sadrže anagirin. U Australiji ova je bolest poznata pod imenom 'Crooked Calf Disease' (Keeler, 1989; Williams, 1983). Ispitivanje slučaja djeteta na sjeveroistoku Kalifornije, SAD rođenog s jakim deformacijama kostiju ruku pokazalo je da je uzrok deformiteta bilo kozje mlijeko koje je pila djetetova majka tijekom trudnoće. Kozje su pasle *L. latifolius* Agardh., vrstu koja sadrži vrlo visoku koncentraciju arginina (Kilgore et al., 1981).

### Biolška funkcija

Metabolizam biljaka podijeljen je na dva funkcionalna nivoa: primarni i sekundarni metabolizam. Pod primarnim metabolizmom podrazumjevamo sve metaboličke aktivnosti esencijalne za rast i razvoj određene individue. Procesi i spojevi primarnog metabolizma su univerzalni, uniformni, konzervativni i nužni za funkcioniranje biljke. Protivno tomu, sekundarni metabolizam se odnosi na kemijsku interakciju između organizma i njegove okoline. On je jedinstven i različit i nije prijeko potreban za rast i razvoj ali je nužan za preživljavanje

individue u svojoj okolini. Tako svaka vrsta roda *Lupinus* ima svoj vlastiti i jedinstven proces biosinteze i metabolizma alkaloida s velikom raznolikošću spojeva (Hartmann, 1988).

U različitim je biljnim vrstama nađen velik broj i visoke koncentracije spojeva sekundarnog metabolizma i intrigantno je pitanje njihove biološke funkcije.

U slučaju lupine je dokazano da alkaloidi igraju vrlo važnu ulogu u fiziologiji biljke kao spojevi za uskladištavanje i transport dušika. S druge strane ovi spojevi su nužni za kompeticijsku sposobnost (fitness) biljke u svojoj ekološkoj niši kao spojevi koji aktivno sudjeluju u interakcijama biljke s drugim organizmima (Wink, 1984).

U slučaju uskladištenja i transporta dušika situacija je slična onoj opisanoj kod mnogih drugih fabacea koje akumuliraju različite dušikove spojeve kao što su neproteinske amino- kiseline, inhibitori proeaze ili lecitini u sjemenu. Kao i alkaloidi ovi spojevi se razgrađuju tijekom klijanja i razvoja mlade biljke služeći kao izvor dušika.

Uloga alkaloida u poboljšanju kompeticijske sposobnosti biljke vidljiva je iz njihovog sudjelovanja u interakcijama biljka- herbivora, biljka-parazit, biljka-patogen i biljka-biljka.

Da bi smo neki spoj mogli smatrati aktivnim u ovim interakcijama moramo dokazati da ispunjava slijedeće uvjete:

1. čisti spoj je inhibitor ili repelent in vitro;
2. koncentracija spoja je viša u biljci nego inhibirajuće koncentracije mjerene in vitro;
3. spoj se nalazi u biljci u pravo vrijeme i na pravom mjestu;
4. biljka je zaštićena in vivo.

U slučaju interakcije biljka-herbivora primjećeno je da sisavci kao što su jelen i kunić općenito izbjegavaju jesti biljke koje sadrže alkaloida zato što su gorki i toksični.

U interakcija biljka-parazit alkaloidi sudjeluju u mehanizmu odbijanja kao i u mehanizmu otpornosti (antibioza). Mekušci kao što su puževi obično se ne hrane 'gorkim' lupinama. Pokusi s *Helix pomatia* pokazuju da puž prestaje jesti lišće koje sadrži koncentraciju alkaloida veću od 0.7 do 7 mM (ED 50). U slučaju kukaca različiti pokusi su ukazali na to da alkaloidi odbijaju ili sprečavaju razvoj različitih vrsta.

Bentley et al. (1988) su dokazali da alkaloidi *L. polyphyllus* Lindl, odbijaju larve *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera; Tortricidae).

Johnson et al. (1988) je pokazao da lupanin i spartein smanjuju razvoj i preživljavanje *Spodoptera eridania* in vitro uključujući i u vrlo niskim koncentracijama.

Ekstrakt lupine se upotrebljavao kao sprej na lišću krumpira u laboratoriju te se uvidjelo da alkaloidi sprečavaju razvoj i uzrokuju smrtnost larva *Leptinotarsa decemlineata* koja je jela lišće. Najbolji rezultati su se postigli sa sprejem koji sadrži 1.6 do 3% alkaloida (Krzymanska et al., 1988).



Pokusi Winka (1984) pokazuju da koncentracije od 0.5 - 12 mM lupina odbijaju ili ubijaju uši (Plutella, Phaedon, Dyderus i Ceratitis).

Za razliku od navedenog primjećeni su neki paraziti koje alkaloidi ne odbijaju. U ovim se slučajevima radi o parazitima koji su se specijalizirali na 'gorkoj' lupini te su sposobni nadmašiti sistem obrane lupine. Vrlo je zanimljiv slučaj uši na lupini (Macrosiphum albifrons) koja akumulira alkaloidne lupine te ih upotrebljava za vlastitu obranu od Carabus problematicus (Wink., 1986) i Coccinella septempunctata (Gruppe et al., 1988).

U slučaju interakcije biljka-patogen radi se od mehanizmu otpornosti. Wink (1984) je dokazao da lupanin, spartein i 13- tigloiloksilupanin u koncentracijama od 0.3 do 7 mM (ED50) inhibiraju razvoj bakterija. Razvoj fitopatogenih gljiva se također zaustavlja na nešto većim koncentracijama (10-50 mM) (Wink, 1984).

Alkaloidi također sudjeluju u interakciji biljka-biljka (alelopatija). Koncentracije od 2 - 50 mM (ED50) alkaloida sprečavaju klijanje sjemena salate i različitih trava (Poaceae) (Wink, 1984). Primjetilo se da tijekom klijanja korjenčići izlučuju alkaloidne koje možemo naći u blizini sjemena lupine.

Ispitujući antigerminativnu sposobnost alkaloida ekstrahiranih iz L. albus L. i L. mutabilis Sweet. Muzquiz et al. (1988) je pokazala da ekstrakt lupanina kao i čisti lupanin smanjuje postotak klijanja sjemena Avena sterilis. Koncentracija od 14 mM ekstrakta lupanina potpuno zaustavlja klijanje A. sterilis.

Sažmemo li Winkove (1984) podatke možemo vidjeti da koncentracije alkaloida koje odbijaju ili sprečavaju rast različitih organizama (1-10 mM) su niže no postojeće u biljci in vivo. Štoviše, alkaloidi su koncentrirani u strategijskim točkama biljke kao što je epiderma stabljike i sjemena.

Da ovaj sustav obrane biljke nije samo pasivan dokazuje i podatak da u slučaju oštećenja listovi mogu povećati sadržaj alkaloida 2 do 4 puta u 2 do 4 sata (Wink, 1984). Metabolizam alkaloida reagira na okolišne podražaje što znači da se sinteza viših koncentracija alkaloida može potaknuti iz vana.

Buzuk et al. (1989) su uspjeli pospješiti biosintezu alkaloida kod L. pollyphilus Lindl. tretiranjem biljaka spojevima koji izazivaju stres (abscisinska kiselina i ethephon).

Johnson et al. (1991) su pokazali da biljke lupine koje fiksiraju atmosferski dušik povećavaju proizvodnju alkaloida u slučaju parcijalne defolijacije da bi tako postale manje jestive za hrbivore. Bez sumnje, ako je oštećenje veliko ili u dužem vremenskom razdoblju, gubitak fotosintetske površine lišća smanjuje fiksaciju dušika. Kao posljedicu možemo očekivati smanjenje rasta i razvoja kao i količine alkaloida.

## GENETSKA SVOJSTVA

### Genetska kontrola metabolizma alkaloida

Metabolizam alkaloida je vrlo kompliciran proces s visokom razinom spacialne i temporalne koordinacije.

Da bismo pretpostavili broj gena koji kontroliraju ovaj proces moramo imati na umu sve esencijalne korake za koje je potrebna genetska informacija. Ovi koraci mogli bi biti:

1. Biosinteza lupanina iz lizina;
2. Konverzija lupanina u druge alkaloida;
3. Transport alkaloida od mjesta biosinteze do drugih organa (sink);
4. Akumulacija alkaloida (poznavajući situaciju u drugim biljkama možemo očekivati da postoji specifična bjelančevina za transport alkaloida /carrier protein/ u membranama citoplazme i tonoplasta);
5. Degradacija alkaloida;
6. Sveopća kontrola i koordinacija navedenih procesa

Još uvijek ne možemo reći u čemu se sastoji razlika između 'slatkih' lupina koje akumuliraju vrlo nizak nivo alkaloida i 'gorkih'. Rezultati istraživanja stanice lupine pokazuju da i 'slatki' kultivari također imaju aktivirane enzime za biosintezu alkaloida ali im nedostaje sposobnost odlaganja alkaloida. Tako i 'slatiki' kultivari tvore alkaloida ali se oni degradiraju vrlo brzo pa je njihova koncentracija u različitim organima biljke puno niža (Wink, 1984).

#### **Nasljeđivanje sadržaja alkaloida**

Kao što smo prije vidjeli biosinteza alkaloida se odvija samo u zelenim dijelovima biljke te se tijekom dozrijevanja transportiraju u sjeme. Sjeme ne tvori vlastite alkaloida i embrio nema utjecaja na njihovu sintezu. Zato sadržaj alkaloida u sjemenu u potpunosti ovisi o genotipu majke (Wink, 1984).

Biosinteza koju kontroliraju vlastiti geni nove generacije počinje nakon nicanja i nakon 4 - 5 tjedana nakon klijanja, kada biljka razvije 4 lista može se ustvrditi sadržaj alkaloida bez materijskog utjecaja (Jambrina, 1983).

#### **Geni za nisku razinu alkaloida**

Niska razina alkaloida je kvalitativno svojstvo koje se nasljeđuje sa samo jednim recesivnim genom koji blokira biosintezu alkaloida. Nađeno je više od jednog alela na nevezanim lokusima koji kontroliraju različite razine koncentracije alkaloida (Hackbarth, 1957). Biljka je 'slatka' kada je homozigot za jedan od tih gena. Geni za nisku razinu alkaloida se nazivaju: pauper, exiguus, nutricius, reductus, mitis, suavis i minutus (Hackbarth, 1957; Troll, 1958; Hackbarth 1961; Porsche, 1964). Mikolaczyk spominje gene primus i tercius za koje se dokazalo da su sinonimi za gen pauper (Porsche, 1964). U tabeli 3 možemo vidjeti gene za nisku razinu alkaloida zajedno s razinom koju uzrokuju i prve linije i kultivare gdje su nađeni.

Tabela 3. Geni za nisku razinu alkaloida kod bijele lupine  
Table 3. Genes controlling low level of alcaloids in white lupin

Gen Gene	% Alkaloida % of alcaloids	Kultivar Cultivar	Godina Year	Oplemenjivač Breeder
pauper (pau)	0.01-0.05	Hadmersleben 387/51		Vettel
		Kraftquell	1949	Vettel
		K 703		Heuser
		Ultra	1950	Pflug
		Gela		Pflug
		Hansa		Pflug
		Kleinkornige		Pflug
		Blanca		Centmaier
-primus	0.01-0.03	Drobnonasienny		Mikolajczyk
-tercius	0.01-0.03	Przebedowski Wczesny		Mikolajczyk
exiguus (ex)	0.03-0.05	Neuland	1937	Ritterhaus
nutricius (nut.)	0,04-0,08	Hadmersleben 784/50		Vettel
		Hadmersleben 1401/50		Vettel
		Nahrquell	1949	Vettel
mits (mit)		Muncheberg 19	1930/31	v. Sengbusch
		Muncheberg 246	1930/31	v. Sengbusch
suavis (suav)		Peragis 749		Oberdorf
reductus (red)		Reuscher		Reuscher
minitus (min)	0.04-0.07	Gulzow 91	1945	Kress
		Gulzow883	1945	Kress

Izvor: Hackbarth, 1957; Troll, 1958; Hackbarth, 1961; Porsche, 1964

Svi navedeni geni su recesivni i niska razina alkaloida je dominantna. Zato su F1 generaciji iz križanja 'gorke' i 'slatke' biljke uvijek dobijamo 'gorke' biljke koje se u F2 generaciji razdvajaju na 3:1. U tabeli 4 vidimo da je to slučaj samo kada imamo samo jedan homozigotni recesivni lokus za 'slatko' svojstvo. Ako postoje dva homozigotna recesivna lokusa u F2 generaciji ćemo dobiti razdvajanje 9:7.

Ako križamo dvije 'slatke' biljke koje imaju isti gen za nisku razinu alkaloida, u F2 i svim daljnjim generacijama sve će biljke biti 'slatke'.

Naprotiv, ako križamo dvije 'slatke' biljke koje imaju različite gene za nisku razinu alkaloida u F1 generaciji ćemo dobiti 'gorke' biljke zato što su svi poznati geni komplementarni. Pretpostavimo da je genotip biljke s visokom razinom alkaloida u F1 generaciji AaBb dobijen iz križanja 'slatke' biljke s genotipom aaBB i 'slatke' s genotipom AaBb dobijen iz križanja 'slatke' biljke s genotipom aaBB i 'slatke' s genotipom AAbb. F2 generacija dobijena samooplodnjom ove

biljke dat će 4 'gorka' genotipa (AABB, AABb, AaBB i AaBb) i 5 'slatkih' genotipova (aaBB, aaBb, AAbb i aabb) s fenotipskom frekvencijom 9 'gorkih' : 7 'slatkih'.

**Tabela 4. Moguće fenotipsko rezdvajanje za 'slatko' svojstvo**  
**Table 4. Possible phenotypic segregation for 'sweet' character**

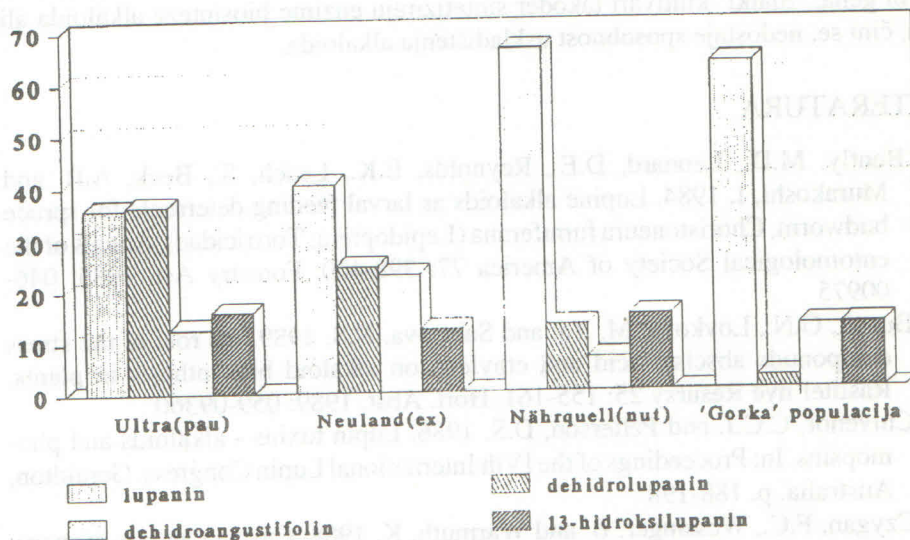
Roditeljski genotipovi Parental genotypes	Ekspresija 'slatkog svojstva u F <sub>1</sub> Expression of 'sweet' character in F <sub>1</sub>	Fenotipsko razdvajanje u F <sub>2</sub> Phenotypic segregation in F <sub>2</sub>
Križanja s 'gorkim' materijalom		
aa x AA	'gorki'	3:1
aabb x AABB	'gorki'	9:7
Križanja između jednog roditelja koji je recesivni homozigot i drugog koji je dvostruki recesivni homozigot za 'slatko' svojstvo		
aabb x aaBB	'slatki'	ne cijepa
aabbCC x AABBcc	'gorki'	27:37
Križanja između dvaju roditelja dvostrukih recesivnih homozigota za 'slatko' svojstvo		
aabb x aabb	'slatki'	ne cijepa
aabbCC x aaBBcc	'slatki'	ne cijepa
aabbCCDD x AABBccdd	'gorki'	81:175

Također se može dogoditi da neke biljke imaju nisku razinu alkaloida zbog dvaju homozigotnih recesivnih gena. Porche (1964) je izvjestio o križanju između dvije 'slatke' linije Gulzow 883 i Hadmersleben 13627/58 ima dva gena za nisku razinu alkaloida, pauper i nutricius u homozigotnom recesivnom stanju. Ova linija je imala manje od 0,01 % alkaloida dok su linije koje su imale samo gen pauper imale između 0.01 i 0.05% a linije koje su imale samo gen nutricius 0.04 i 0.08 %. U tabeli 4 vidimo ostale moguće segregacije za 'slatko' svojstvo u F<sub>2</sub> generaciji nakon križanja. Bez sumnje, malo je vjerojatan slučaj da imamo fiksirana dva homozigotna recesivna lokusa za nisku razinu alkaloida u nekoj čistoj liniji zato što s uobičajenim metodama selekcije ne možemo otkriti razliku između genotipova koji su homozigotni recesivi za dva ili za samo jedan gen.

Dominacija alela za visoku razinu alkaloida nije potpuno zato što obično kod 'gorkih' genotipova u F<sub>2</sub> generaciji možemo naći velik raspon različitih razina sadržaja alkaloida. Distribucija frekvencija koncentracija alkaloida unutar 'gorkih' genotipova ukazuje da heterozigoti često imaju intermediarnu koncentraciju zbog nepotpune dominacije gena.

Različiti aleli smanjuju sadržaj alkaloida biljke na različit način dajući tako specifične razine i profile najčešćih alkaloida (lupanin, dehidrolupanin, dehidroangustifolin i 13- hidroksilupanin) (grafikon 2) (Harrison et al., 1982).

Graf. 2. % alkaloida kod bijele lupine  
Graph. 2. % of alkaloids in white lupin



Izvor: Harrison et al., 1983

Aleli pauper i exiguus su vrlo učinkoviti u blokiranju biosinteze alkaloida i reduciraju sadržaj alkaloida do 0.03 - 0.05 % suhe težine biljke. Također, smanjuju relativni udio lupanina i povećavaju udio dehidrolupanina u odnosu na udjele u 'gorkim' biljkama. Relativni udio ovih dvaju alkaloida (lupanin i dehidrolupanin) ukazuje na to da je njihova sinteza međuovisna. Alel nutricius nije toliko efikasan u smanjivanju razine alkaloida kao pauper i exiguus, a i profil alkaloida je različit uz veći relativni udio lupanina i manji dehidrolupanina tako da slični na profil 'gorkih' lupina. Aleli exiguus se također razlikuje od alela pauper u koncentraciji dehidroangustifolina. Relativni udio 13-hidroksilupanina je konstantan kod sva tri mutanta kao i u 'gorkom' tipu (Harrison et al., 1982).

## ZAKLJUČAK

Alkaloidi lupine pripadaju kinolizidinskoj grupi alkaloida. Jedini supstrat za njihovu sintezu je aminokiselina lizin. Biosinteza se odvija u stromi kloroplasta zelenih dijelova biljke. Putem floema se translociraju u sve ostale biljne organe a naročito se akumuliraju u mahunama i sjemenkama. Degradacija alkaloida je normalan proces kojim se oslobađa dušik. Biološka funkcija alkaloida je skladištenje i transport dušika kao i povećanje kompeticijske sposobnosti sudjelovanjem u interakcijama biljke s patogenima, parazitima, herbivorama i drugim biljkama.

Nije poznat broj gena koji kontroliraju metabolizam alkaloida. Kako do

biosinteze ne dolazi u sjemenkama, koncentracija u potpunosti ovisi o genotipu majke. Poznato je sedam gena za niski nivo alkaloida (pauper, exiguus, nutricius, reductus, mitis, suavis i minutus). "Slatki" kultivari su recesivni za bar jedan od ovih gena. 'Slatki' kultivari također sintetiziraju enzime biosinteze alkaloida ali im, čini se, nedostaje sposobnost uskladištenja alkaloida.

## LITERATURA

1. Bently, M.D., Leonard, D.E., Reynolds, E.K., Leach, S., Beck, A.B. and Murakoshi, I. 1984. Lupine alkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera; Tortricidae). *Annals of the entomological Society of America* 77: 398-400. *Forestry Ast.* 1985: 046-00975
2. Buzuk, G.N., Lovkova, M. Ya. and Sabirova, N.S. 1989. the role of the stress componuds abscisic acid and ethylene on alkaloid biosynthesis in plants. *Rastitel'nye Resursy* 25: 155-161. *Hort. Abst.* 1989: 059-09360
3. Culvenor, C.C.J. and Petterson, D.S. 1986. Lupin toxins - alkaloids and phomopsins. In: *Proceedings of the IVth International Lupin Congress*. Geraldton, Australia. p. 188-198
4. Czygan, F.C., Wessinger, B. and Warmuth, K. 1988. *Cuscuta* and its property to take up and to accumulate alkaloids of the host plant. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 183:495-501. *Weed Abst.* 1989: 038-01403
5. Dunn, D.B. 1984. Cytotaxonomy and distribution of New World lupin species. In: *Proceedings of the III rd International Lupine Congress*. La Rochelle, France. p. 67-86
6. Gruppe, A. and Romer, P. 1988. The lupin aphid (*Macrosiphum albifrons* Essig, 1911, Hom. Aphididae) in West Germany: its occurrence, host plants and natural enemies. *Journal of Applied Entomology* 106: 135-143. *Review of Applied Entomology. Series A.* 1989: 077-01007
7. Hackbarth, J. 1957. Die Gene der Lupinenarten III. Weisse Lupine (*L. albus*). *Z. Pflanzenzuchtg.* 37: 185-191
8. Hackbarth, J. 1961. Untersuchungen uber die Vererbung der Alkaloidarmut bei der Weisslupine (*L. albus*). *Z. Pflanzenzuchtg.* 45: 334-344
9. Harborne, J.B. 1991. Alkaloids and other toxins of lupin. In: *Toxic factors in crop plants. Proceedings of the second spring conference*, Edinburgh, 22 March 1991, D'Mello, J.P.F. and Duffue, C.M. (eds.), *Scottish Agricultural College, Edinburgh, UK*
10. Harrison, J. M. and Williams, W. 1983. The control of alkaloid by mutant alleles in *L. albus* and *L. angustifolius*. *Z. Pflanzenzuchtg.* 90:32-41
11. Hartmann, T. 1988 Secondary metabolism of lupins: biosynthesis, translocation and accumulation of the quinolizidine alkaloids. In: *Proceedings of the Vth International Lupin Congress*. Poznan, Poland. p. 64-78
12. Jach. K. 1983. Alkaloids in the white lupin (*Lupinus albus* L.). *Lupone Newsletter* 5:6-7

13. Jambrina Alonso, J. L. 1983. La genetica de los alcaloides en el genero *Lupinus*. Com. INIA Prod. Veg. No. 51
14. Johnson, N.D. and Bentley, B.L. 1988. Effects of dietary protein and lupine alkaloids on growth and survivorship of *Spodoptera eridania*. *Journal of Chemical Ecology* 14:1391-1403. *Review of Applied Entomology. Series A* 1989: 077-04261
15. Johnson, N.D. and Bentley, B.L. 1991. Symbiotic N<sub>2</sub>-fixation and the elements of plant resistance to herbivores: Lupine alkaloids and tolerance to defoliation. In: *Microbial mediation of plant-herbivore interactions*. Barbola, P., Krischik, V.A. and Jones, C.G.(eds.) John Wiley and sons, Inc., New York, Ny, USA p. 195-148
16. Karlsson, E.M. 1982. Quantitative analysis of lupine alkaloids by fluorescence measurements. *Agricultural and Nutritional Aspects of Lupines*. Gross, R. and Bunting, E.S. (eds.) Proceedings of the 1st International Lupine Workshop. Lima, Peru, 1980. GTZ, Eschborn, Germany.p. 503-520
17. Keeler, R.F. 1989. Quinolizidine alkaloids in range and grain lupins. In: *Toxicants of plant origin. Volume 1. Alkaloids*. Cheeke, P.R. (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl., USA
18. Kilgore, W.W., Crosby, D.G. Craigmill, A.L. and Poppen, N.K. 1981. Toxic plants as possible human teratogens. *California Agriculture* Vol. 35 No. 11-12:6
19. Kinghorn, A.D. and Smolenski, S.J. 1981. Alkaloids of Papilionoideae. In: *Advances in legume systematics*. Polhill, E. and Raven, P.H. (eds.) Proceedings of the International legume conference, Kew, (eds.) Proceedings of the International legume conference, Kew, 24-29 July 1978, Royal Botanic Gardens, Kew, England. p. 585-598
20. Kryzmsanska, J., Waligora, D., Michalski, Z., Peretiatkowicz, M. and Gulewicz, K. 1988. Observation on the influence of spraying potatoes with lupine extract on the feeding and development of potato-beetle population (*Letinotarsa decemlineata*). *Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Science* 36:45-52. *Review of Agricultural Entomology* 1990:078-08747
21. Lopez de Romana, G. 1984. La utilizacion del *Lupinus* en la alimentacion humana. In: *Proceedings of the IIIrd International Lupine Congress*. La Rochelle, France. p. 453-464
22. Muzquiz, M. 1988a. Factores antinutritivos y toxicos que afectan a la utilizacion de las semillas del *Lupinus hispanicus* Boss. et Reut. para su uso alimentario. Tesis Doctoral, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid, Spain
23. Muzquiz, M. and de la Cuadra, C. 1988b. Antigerminating capacity of *Lupinus* (L.) alkaloids. In: *Proceedings of the Vth International Lupin Congress*. Poznan, Poland. p. 541-557

24. Porsche, W. 1964. Untersuchungen über die Vererbung der Alkaloidarmut und die Variabilität des Restalkaloidgehaltes bei *Lupinus albus* L. *Zuchter* 34: 251-256
25. Priestly, B. 1986. Lupins for human consumption - toxicological and regulatory issues. In: proceedings of the IVth International Lupin Congress. Geraldton, Australia. p. 240-243
26. Schneider, M.J. and Stermitz, F.R. 1990. Uptake of host plant alkaloids by root parasitic *Pedicularis*. *Phytochemistry* 29:6. *Weed Abst.* 1991:040-02847
27. Troll, H.J. 1958. Erbgänge des Alkaloidgehaltes und Beobachtungen über Heterosiswirkung bei *Lupinus albus*. *Z. Pflanzenzuchtg.* 39:35-46
28. Williams, M. C. 1983. Poisonous Plants, Part III, Poisonous alkaloids in plants. *Weeds Today* 14:6-7
29. Williams, W., Harrison, J.E.M. and Jayasekera, S. 1984. Genetical control of alkaloid production in *Lupinus mutabilis* and the effect of a mutant allele mutal isolated following chemical mutagenesis. *Euphytica* 33:811-817
30. Wink, M. 1984. Biochemistry and chemical ecology of lupin alkaloids. In: Proceedings of the IIIrd International Lupine Congress. La Rochelle, France. p. 325-344
31. Wysocka, W. and Brukwicki, T. 1988. The composition of alkaloids from *Lupinus albus* (cultivar Bac). The structure and stereochemistry of seco-(11-12)-dehidromultiflorina. In: Proceedings of the Vth International Lupin Congress. Poznan, Poland. p. 606-610