

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja CVETANOSKA

**PRIMERJAVA VSEBNOSTI TANINOV RAZLIČNIH
GENSKIH VIROV NAVADNE (*Fagopyrum esculentum*
Moench) IN TATARSKE (*Fagopyrum tataricum*
Gaerth.) AJDE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja CVETANOSKA

**PRIMERJAVA VSEBNOSTI TANINOV RAZLIČNIH GENSKIH
VIROV NAVADNE (*Fagopyrum esculentum* Moench) IN TATARSKE
(*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) AJDE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**COMPARISON OF TANNIN CONTENT IN VARIOUS GENETIC
SOURCES OF COMMON BUCKWHEAT (*Fagopyrum esculentum*
Moench) AND TARTARY BUCKWHEAT (*Fagopyrum tataricum*
Gaertn.)**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin v Ljubljani

Študijska komisija, Oddelka za agronomijo je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Zlato Luthar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Nataša Štajner
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Zlata Luthar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Marjana Regvar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Jana Murovec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maja CVETANOSKA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 633.12:547.98(043.2)
KG	tanini/genski viri/navadna ajda/tatarska ajda/poljščine/sorte/populacije
AV	CVETANOSKA, Maja
SA	LUTHAR, Zlata (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	PRIMERJAVA VSEBNOSTI TANINOV RAZLIČNIH GENSKIH VIROV NAVADNE (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.) IN TATARSKE AJDE (<i>Fagopyrum tataricum</i> Gaertn.)
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	IV, 32 str., 13 pregl., 9 sl., 5 pril., 41vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Vsebnost taninov pri različnih genskih virih ajde smo določili z vanilin-HCl metodo. V ta namen smo v letih 2013 in 2015 na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete razmnožili različne genske vire navadne in tatarske ajde. Od teh so bile 4 sorte in 4 populacije navadne ajde ter 24 populacij tatarske ajde. Kot primerjalni standard smo v analizo vključili še po en genotip izbranih poljščin pridelanih v letu 2015. Genotipi navadne ajde so v letu 2013 v povprečju vsebovali 1,33 mg/g s.s. vzorca, medtem ko so v letu 2015 vsebovali v povprečju 2,22 mg/g s.s. Genski viri tatarske ajde so v letu 2013 imeli v povprečju 1,21 mg/g s.s., medtem ko so v letu 2015 vsebovali 1,18 mg/g s.s. Potrdili smo tudi značilne razlike ($p < 0,001$) v vsebnosti taninov med navadno in tatarsko ajdo (1,78 in 1,17 mg/g s.s.). Pomembno je, da med obema letoma, tako pri navadni kot tatarski ajdi nismo zasledili, da bi se določen genotip pojavil v isti homogeni skupini, ampak so se med obema letoma razvrščali v različne skupine. Od izbranih devetih poljščin pri petih nismo potrdili prisotnosti taninov, pri ostalih je odstopal srek z vsebnostjo 2,08 mg/g s.s. Ugotovili smo, da je sinteza taninov kot produktov sekundnega metabolizma, zelo odvisna od vplivov okolja in v manjši meri od genotipa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
 DC UDC 633.12:547.98(043.2)
 CX tannins/ genotype/common buckwheat/tartary buckwheat/crops/sorts/populations
 AU CVETANOSKA, Maja
 AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
 PY 2016
 TI COMPARASION OF TANNIN CONTENT IN VARIOUS GENETIC SOURCES OF COMMON BUCKWHEAT (*Fagopyrum esculentum* Moench.) AND TARTARY BUCKWHEAT (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
 NO IV, 32 p., 13 tab., 9 fig., 5 ann., 41 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The tannins content of genetically different buckwheats was determined by using vanillin-HCl method. The analyses were performed on two different buckwheats, the common and the tartary, in 2013 and 2015 at the Biotechnical Faculty in Ljubljana, Slovenia. Eight of the common buckwheat were sorts, whilst 24 separate populations in the tartary buckwheat. As for a comparative standard we included an additional genotype of crops harvested in 2015. The genotypes of the common buckwheat in 2013 contained an average of 1.33 mg/g s.s. tannins, while in 2015 an average of 2.22 mg/g s.s. The genotypes of the tartary buckwheat in 2013 contained an average of 1.21 mg/g s.s. tannins, whereas in 2015 an average of 1.18 mg/g s.s. A significant difference ($p < 0.001$) in the levels of tannins in the common and the tartary buckwheat (1.78 and 1.17 mg/g s.s.) was observed. Importantly, in both years the genotypes of the common and tartary buckwheats were not present the same homogenous group, but rather formed a different groups. In five sorts we did not find presence of tannins, while in the tannins-present we identified sorghum of 2.08 mg/g s.s. We conclude that the tannins secondary metabolism mostly depends on environmental influences, yet to a lesser extent on the genotype.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VII
	KAZALO SLIK	VIII
	KAZALO PRILOG	IX
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1	UVOD	1
1.1	CILJ RAZISKOVANJA	2
1.2	DELOVNE HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	NAVADNA AJDA	3
2.1.1	Darja	3
2.1.2	Siva	4
2.1.3	Čebelica	4
2.1.4	Bamby	4
2.1.5	Črna gorenjska	4
2.2	TATARSKA AJDA (<i>Fagopyrum tataricu</i> Gaertn.)	5
2.3	SESTAVA IN PREHRANSKA VREDNOST AJDE	5
2.4	ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE	7
2.4.1	Antioksidanti	7
2.4.1.1	Fenolne spojine	8
2.4.1.2	Tanini	9
2.5	STANDARDNI ANTIOKSIDANTI	11
2.5.1	Katehin	11
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	RASTLINSKI MATERIAL	13
3.2	REAGENTI	13
3.3	METODE	13
3.3.1	Priprava vzorcev	13
3.3.2	Ekstrakcija	15
3.3.3	Vanilin-HCl metoda	15
3.3.3.1	Priprava reagentov	15
3.3.3.2	Priprava standarde katehinske krivulje	16
3.3.4	Statistična analiza	17

4	REZULTATI	18
4.1	HIDROMETEOROLOŠKI PODATKI V OBDOBJU POLSKEGA POSKUSA Z AJDO	18
4.2	VSEBNOST TANINOV	18
4.2.1	Vsebnosti taninov pri navadni ajdi	19
4.2.2	Vsebnost taninov pri tatarski ajdi	22
4.2.2.1	Primerjava vsebnosti taninov pri tatarski ajdi med leti 2013 in 2015	23
4.3	Primerjava vsebnosti taninov med navadno in tatarsko ajdo	23
4.4	Vsebnosti taninov v izbranih poljščinah	25
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	26
5.1	RAZPRAVA	26
5.1.1	Medvrstne in znotrajvrstne razlike v vsebnosti taninov	26
5.1.2	Primerjava vsebnosti taninov pri ajdi in izbranimi poljščinami	27
5.2	SKLEPI	27
6	POVZETEK	28
7	VIRI	29
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam ajd in drugih poljščin katerih semena so bila vključena v analizo vsebnosti taninov	14
Preglednica 2: Priprava standardnih katehinskih raztopin za izris standardne krivulje	16
Preglednica 3: Koncentracije katehina v metanolnih raztopinah od 0,1 do 2 mg/10 ml in vrednosti izmerjenih absorbanc	16
Preglednica 4: Podatki za povprečne temperature in količino padavin v Ljubljani za leti 2013 in 2015	18
Preglednica 5: Analiza variance vsebnosti taninov 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2013	19
Preglednica 6: Analiza variance vsebnosti taninov 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2015	20
Preglednica 7: Analiza variance vsebnosti taninov 24 genotipov tatarske ajde pridelani v letu 2013	21
Preglednica 8: Analiza variance vsebnosti taninov 24 genotipov tatarske ajde pridelanih v letu 2015	22
Preglednica 9: Tukeyev HSD test razlik v povprečni vsebnosti taninov pri navdni ajdi glede na leto pridelka 2013 in 2015	23
Preglednica 10: Analiza variance vsebnosti taninov med navadno in tatarsko ajdo	23
Preglednica 11: Tukey-ev HSD test razlik med vrstama ajde	23
Preglednica 12: Tukey-ev HSD test razlik med leti pridelka 2013 in 2015	23
Preglednica 13: Povprečna vsebnost taninov v izbranih poljščin	25

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba flavonoida, ki predstavlja osnovi monomer kondenziranega tanina	9
Slika 2: Zgradba tanina	10
Slika 3: Strukturna formula katehina	11
Slika 4: Grafični prikaz umeritvena krivulja katehina v vanilin-HCl metodi	18
Slika 5: Povprečne vsebnosti taninov z mejami zaupanja 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2013	19
Slika 6: Povprečne vsebnosti taninov z mejami zaupanja 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2015	20
Slika 7: Povprečne vsebnosti taninov z mejami zaupanja 24 genotipov tatarske ajde pridelanih v letu 2013	21
Slika 8: Povprečne vsebnosti taninov z mejami zaupanja 24 genotipov tatarske ajde pridelanih v letu 2015	22
Slika 9: Povprečne vsebnosti taninov z mejami zaupanja za vrsto ajde in letom pridelka	24

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Tukey-ev HSD test razlik za povprečno vsebnost taninov 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2013

PRILOGA B: Tukey-ev HSD test razlik za povprečno vsebnost taninov 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2015

PRILOGA C: Tukey-ev HSD test razlik za povprečno vsebnost taninov 24 genotipov tatarske ajde pridelanih v letu 2013

PRILOGA D: Tukey-ev HSD test razlik za povprečno vsebnost taninov 24 genotipov tatarske ajde pridelanih v letu 2015

PRILOGA E: Tukeyev HSD test razlik med vrsto ajde in letom pridelka

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ROS	reaktivne kisikove spijine
AOP	antioksidativni potencial
MeOH	metanol
HCl	klorovodikova kislina
ml	mililiter
g	gram
nm	valovna dolžina
mM	milimolarna koncentracija
št.	število
s.s	suhe snovi
Tukey HSD test	Tukey-ev test mnogoterih razlik
p vrednost	verjetnost

1 UVOD

V današnjem času je veliko večji poudarek na pridelkih, ki vsebujejo sestavine, katere so pomembne v prehrani ljudi oziroma imajo pozitiven vpliv na zdravje človeka. Ena izmed teh sestavin so antioksidanti. Rastlinski metaboliti - polifenoli so znani po svojem močnem antioksidativnem učinku. Tanini so skupina polifenolov, produkti sekundarnega metabolizma rastlin, ki so v primerni količini pomembni v prehrani človeka.

Ajdo danes po vsem svetu odkrivajo kot kulturno rastlino skromnih zahtev, predvsem kot zdravo in celo zdravilno živilo. Gojijo jo že več stoletij, sedaj pa je postala pomembno alternativno žito, za katero se v novejšem času po svetu večja povpraševanje, zaradi veliko hranilnih snovi, ki jih vsebuje v semenih, cvetovih in listih. V indijski zvezni državi Meghalaja, ki leži tik ob domnevni domovini ajde v vzhodni Himalaji in je po površini in številu prebivalcev primerljiva s Slovenijo, indijska vlada spodbuja gojenje in uživanje ajde, z namenom obogatitve prehrane, ki v večjem delu Indije temelji na rižu, pšenici ali koruzi. Prehranska kakovost in druge tehnološke lastnosti navadne in tatarske ajde kažejo na vedno večjo popularnost in priljubljenost ajde v prehrani (Kreft in sod., 2012; Sun in Ho, 2005).

Ajda po botaničnih lastnosti ni uvrščena med prava žita, ki so enokaličnice (Poaceae), ampak med dresnovke (Polygonaceae), ki so dvokaličnice. Po uporabni vrednosti in sestavi semen, saj je notrajnost trirobeta ploda podobna meljaku žit ter načinu pridelovanja, je podobna žitom (Kocjan Ačko, 2015). V jedrih somatskih celic ima ajda po šestnajst kromosomov, v jedrih jajčnih celic in pelodnih zrn pa osem kromosomov. Večina današnjih sort ajde je diploidnih, nekaj jih je tetraploidnih. Tetraploidna ajda ima manj semen, ki so bistveno večja od diploidnih ajd (Grušovnik in sod., 2012).

V primerjavi z drugimi žiti ima ajda sorazmerno več linearne škroba amiloze, ki je osnova za manj prebavljive oblike škroba, kar je pomembno za bolnike s sladkorno boleznijo. Ko ajda zraste je naraven herbicid, ker njivo odlično razplevel. Je nezahtevna poljščina, skromna glede potreb po hranilih. Iz tal lahko črpa mineralne snovi, ki so trdno vezane na koloidne delce, katere druge poljščine ne morejo izrabiti. Zaradi sposobnosti korenin, da lahko izkorišča snovi, ki drugim rastlinam niso dostopne gnojenje sploh ni potrebno. Je neobčutljiva na bolezni in škodljivce in jo lahko pridelamo brez uporabe sredstev za varstvo rastlin. Vsebuje pa določene snovi, ki so uvrščene med naravne antioksidante, ki jih druga žita nimajo ali v zelo zanemarljivih količinah (Kreft, 1995; Kreft. 2010).

Zule in Kozjan (2008) navajata, da so antioksidanti kemijske spojine, ki zaradi svoje specifične elektronske konfiguracije preprečujejo ali upočasnjujejo oksidacijo življenjsko pomembnih spojin v živih tkivih, ki so izpostavljena prostim radikalom. Med rastline z

veliko vsebnostjo antioksidantov sodi tudi ajda. Vse bolj so iskani viri naravnih antioksidantov. Zato v zadnjem obdobju poteka veliko raziskav na tem področju, ki omenjajo o vsebnosti antioksidantov znotraj različnih delov ajde.

Shallan in sod. (2014) v svoji raziskavi navajajo rezlike v vsebnosti antioksidantov, flavonoidov in taninov v ajdi v primerjavi s pšenico. Ugotovili so, da je vsebnost taninov 1.77-krat večja kot pri pšenici in skupnih polifenolov je 5-krat več ter antioksidativna aktivnost je 2-krat večja.

Antioksidativna aktivnost taninov je že dobro poznana, vendar interakcije, ki nastanejo med tanini in beljakovinami so bistvenega pomena za njihovo biološko aktivnost. Pri rastlinah, ki vsebujejo več beljakovin, med katerimi je tudi ajda, je za pričakovati te reakcije, saj se tanini z beljakovinami in sladkorji vežejo v večje komplekse. Zaradi tega bodo dodanta raziskovanja na tem področju omogočila boljše razumevanje in podala jasnejše razlage o biološki in farmakološki aktivnosti taninov. Zaenkrat obstaja majhno število raziskov o vsebnosti taninov v ajdi, zaradi tega so nadaljnje raziskave na tem področju pomembne (Stankovič in sod., 2012; Zych-Weyk in sod., 2012; Seo in sod. 2013).

Slovenija je od nekdaj poznana po ajdovih žgancih, kruhu, štrukljih in kaši ter zagotovo je ajda rastlina, s katero si lahko popestrimo vsakdanjo prehrano. Le pozabiti ne smemo nanjo. V zadnjih letih se počasi, a vztrajno vrača na slovenska polja. Poleg tega, da lahko njeno uživanje prispeva k ohranjanju našega zdravja, so cvetoča polja ajde ne samo paša za čebele, temveč tudi prispevek k ohranjanju lepe slovenske kulturne krajine.

1.1 CILJ RAZISKAVE

Glede na to, da so bili slovenski genski viri ajde na področju taninov le delno raziskani, je bil cilj te raziskave primerjati in kvantitativno ovrednotiti vsebnost taninov v semenih različnih genotipov navadne in tatarske ajde pridelanih v letih 2013 in 2015 na isti lokaciji ter ugotoviti vpliv genotipa in okolje na vsebnosti taninov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da obstajajo razlike v vsebnosti taninov med semeni različnih genskih virov navadne in tatarske ajde. Pričakovali smo tudi, da obstajajo razlike znotraj posamezne vrste in razlike med pridelki v letih 2013 in 2015 v vsebnosti taninov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NAVADNA AJDA (*Fagopyrum esculentum* Moench)

Znotraj rodu (*Fagopyrum*) obstaja veliko vrst ajde, vendar se za prehrano uporabljata dve vrsti: navadna ajda (*F. esculentum* Moench) in tatarska ajda (*F. tataricum* Gaertn.). Obe sta enoletnici in več se prideljuje navadno ajdo.

Ajda je enoletna rastlina, ki v nižinskih predelih z dovolj vlage in hranili lahko zraste od 120 do 150 cm. V skromnih razmerah njena višina doseže le približno 30 cm. Optimalna višina rastlin, ki daje zadovoljiv pridelek je 80 do 100 cm. Steblo ajde je votlo in pokončno, razvejano ali nerazvejano, ki se proti koncu rastne dobe obarva rdeče. Glavna korenina je sorazmerno plitva s številnimi stranskimi koreninami, ki skupaj pretstavljajo približno 3 do 4 % mase celotne rastline, kar je lahko v ekstremnih sušnih razmerah velik problem zlasti s kasnejšim dozorevanjem. Listi so srčasto puščasti, zgornji listi so manjši in brez peclja, spodnji praviloma s pecljem so večji. Cvetovi so pogosto združeni v belih ali rožnatih socvetjih z enojnim odevalom, sestavljenim iz petih cvetnih listov. Za ajdo je značilno, da ima dva tipa cvetov in zaradi tega je dimorfna rastlina. Prvi tip se imenuje venec 'thrum', cvetovi imajo dolge prašnike in kratke pestiče. Drugi tip je klin 'pin', ti imajo kratke prašnike in dolg vrat pestiča. Oblika je genetsko pogojena, rastlina lahko ima en ali drug tip cveta. Gen za heterostilijo je na lokusu S in heterozigotne rastline z alelno sestavo Ss, so 'thrum' in homozigotne rastline z alelno kombinacijo ss, so imenovane 'pin'. Pelod enega tipa cveta lahko oplodi plodnico pestiča drugega tipa, nikakor pa se ne more noben cvet oploditi s pelodom istega cveta ali s pelodom drugega cveta z iste rastline razen redkih izjem in to v zelo majhnem odstotku. Zaradi tega je ajda prava tujeprašnica in samooprašitev ji omejuje oziroma preprečuje opisan tip heterostilije (Kreft, 1995; Earp in sod., 1980; Seo in sod., 2013; Karamać in sod., 2015).

Ajda je zaradi skromnih zahtev po mineralnih snoveh in možnosti gojenja brez fitovarstvenih ukrepov primerna tudi za ekološko pridelavo po kateri je povpraševanje vedno večje. V letu 2012 so bile poleg sorte Darja v sortno listo vpisane še tri sorte navadne ajde, ki imajo v Sloveniji dovoljenje za trženje: dve slovenski sorti Čebelica in Črna gorenjska ter avstrijska sorta Bamby. V pridelavi je tudi Siva, ki predstavlja domačo populacijo ajde z Dolenjske, poleg nje pa so še nekatere druge avtohtone populacije ajde.

2.1.1 Darja

Darja je nastala s križanjem izbrank črne ajde in sort ajde ruskega izvora. Cvetovi so bele barve, semena imajo temnorjavo luščino in so nekoliko večja. Rastline so nedeterminantne (cvetoči poganjki se oblikujejo na stranskih brstih, medtem ko glavni poganjek neomejeno raste naprej). Posamezne rastline se med seboj razlikujejo po višini rasti. Darja je precej

odporna na sušo in visoke temperature, vendar nekoliko manj kot Čebelica. Odporna je na poleganje, občutljiva pa je na nizke temperature. Primerna je za setev v okolici Ljubljane in na nižinskih območjih Štajerske (Tehnologija ..., 2012).

2.1.2 Siva

Siva je nastala s selekcijo iz domačih populacij sive ajde na Dolenjskem. Ima determinantno rast in je zato odpornejša na poleganje. Ker imajo rastline genetsko determiniran zaključek rasti, manj pocvitajo in semena enakomerno dozorevajo, kar zelo ugodno vpliva na spravilo posevka. Semena Sive so srednje velika, dobro napolnjena, luščina je nežna, svetlo sive do srebrnkaste barve, pogosto z manjšimi temnimi prižami. Cveti belo, včasih je opazen rahlo rožnat odtenek. Siva daje pridelke do 1500 kg/ha. Slabše je odporna na sušo in visoke temperature (Tehnologija ..., 2012).

2.1.3 Čebelica

Čebelica je sorta, ki izvira z Gorenjske. Rastlina zgodaj cveti, po višini so nekoliko neizenečene, zraste pa do 70 cm visoko. Cvetovi Čebelice so beli, na spodnji strani rahlo rožnati. Zrnje je svetlo do temno rjavo z rahlim temnejšim vzorcem in srednje veliko. Sorta Čebelica je zelo odporna proti suši in poleganju, zaradi česar daje v sušnih letih večji pridelek. Je zelo medovita rastlina in ob primerni oskrbi nudi ustrezno čebeljo pašo v poletnih mesecih (Tehnologija ..., 2012).

2.1.4 Črna gorenjska

Črna gorenjska je sorta z območja Gorenjske. Rastlina je srednje velika, ima srednjo veliko socvetje, cvet je močno obarvan z rdečo barvo. Obarvanost cvetnega popka z rdečo barvo je močna. Rastlina cveti srednje zgodaj. Barva zrna je temno rjava. Zelo dobro medi, ne daje tako velikih pridelkov kot prej opisane, ki so jo postopoma izpodrinile v pridelavi (Tehnologija ..., 2012; Kreft, 1995).

2.1.5 Bamby

Bamby je avstrijska diploidna sorta. Začne zgodaj cveteti, njeni venčni listi pa so rožnati. Sorta Bamby je izredno medovita. Ko dozori, je semenska luščina srednje rjava (Tehnologija ..., 2012).

2.2 TATARSKA AJDA (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) je poljščina, ki izvira s Kitajske (Bonafaccia in sod., 2003), poleg Kitajske pa jo že dolgo gojijo tudi v Nepal. Podobno kot na Kitajskem jo tudi v Nepal gojijo na višjih nadmorskih višinah, kjer navadna ajda ne uspeva ali ne daje zanesljivega pridelka. Poleg ovsa je eden glavnih pridelkov ljudstva Yi in drugih ljudstev na sečuanski Jugozahodni planoti in v Vzhodnem Tibetu, vse do nadmorske višine okoli 2500 do 3000 m (Kreft in sod., 2012).

Vsaj v nekaterih botaničnih vrtovih je bila tatarska ajda v Evropi znana že okoli leta 1750 in je rastla tudi v botaničnem vrtu v Uppsali na Švedskem, omenjal pa jo je tudi švedski botanik Carl Linnaeus. Na območju Slovenije se je njena pridelava zelo razširila v času lakote (med leti 1815 in 1920), ki je nastopila v Evropi kot posledica vrste vulkanskih izbruhov na območju Tihega oceana v letih 1812 do 1815. Zaradi vulkanskega pepela, ki se je širil nad Evropo in vplival na zmanjšano sončno obsevanje, so bili pridelki gojenih rastlin močno zmanjšani. Baron Žiga Zois je ugotovil, da na Češkem uspeva tatarska ajda, ki daje zmeren pridelek tudi v neugodnih razmerah, zato je njeno pridelovanje omogočil in spodbujal tudi na območju Slovenije. Po njem so tatarsko ajdo poimenovali tudi »cojzla«. V Sloveniji so na Koroškem še sredi 20. stoletja pridelovali tatarsko ajdo tudi na nadmorski višini okoli 1200 m. V drugi polovici 20. stoletja pa so še bolj kot gojenje navadne ajde začeli opuščati pridelovanje tatarske ajde. Razlog za opuščanje obeh vrst ajde je bil predvsem v povečanju pridelovanja koruze, ki daje večje in zanesljivejše pridelke in je potrebna za živinorejo, po njej pa ni več možno sejati strniščnega posevka. Dodatno je k hitrejšemu opuščanju tatarske ajde prispevalo zaraščanje hribovskih območij, za katera je bila le-ta posebej primerna in pa grenkast okus ter nižji odstotek moke in večji delež luščin ter otrobov pri mletju v primerjavi z navadno ajdo. Ljudje se niso zavedali, da je grenek okus posledica velike vsebnosti flavonoidov, ki imajo pozitivne vplive na človekovo zdravje (Kreft in sod., 2012).

Povečano zanimanje za ajdo, zlasti za tatarsko, v novejšem času temelji na prehranski kakovosti ajde in na tem, da jo lahko pridelujemo na ekološki način. Ajda nima glutena, vsebuje pa pomembno količino rutina (kvercetin-3-rutinosid, od 0,01 do 6 % na suho snov) in drugih polifenolnih snovi. Tatarska ajda vsebuje v vseh delih, zlasti pa v semenih, več rutina kot navadna ajda od 1 do 6 % (Vogrinčič in sod., 2010; Vombergar in sod., 2010).

2.3 SESTAVA IN PREHRANSKA VREDNOST AJDE

Ajda je nezahtevna za pedoklimatske razmere in lahko relativno dobro uspeva tudi v neprijaznih razmerah za rast drugih gojenih rastlin oziroma v slabi zemlji tako kot tudi v suši. Nekoč je bila ajda hrana kmečkih ljudi, danes je uvrščana med najbolj zdrava in hranljiva živila. Čeprav botanično ne spada med žita je glede na prehranski pomen in

obliko socvetja uvrščana med žitne kulture. Najbolj uporabni so ajdova semena/zrna, ki imajo piramidasto obliko obdano z vlakninsko luščino in vsebujejo približno 20-30 % vodotopne vlaknine. Visoka topnost prehranskih vlaknin predstavlja prednost in zaradi tega ima ajda pomembno vlogo v preventivi in pri zdravljenju povišanega krvnega tlaka ter ravni holesterola. Pod testo se nahaja beljakovinska plast, v notrajnosti je pa predvsem škrob. Proteini ajde so bogati z esencialno aminokislino lizin, ki je limitirajoča aminokislina v drugih rastlinah. Zaradi dobro uravnotežene aminokislinske sestave imajo proteini ajde visoko biološko vrednost, kljub nizki prebavljivosti (Kreft 1995; Vomberger in sod., 2012).

Ajda je tudi bogata z esencialnimi maščobnimi kislinami, pretežno nenasičenimi, med katerimi prevladujeta oljna in linolna kislina. Ajdova semena so bogat vir mnogih esencialnih elementov, ki jih moramo s prehrano pridobiti in so večinoma rastlinskega izvora. Za ugodno prehransko vrednost so pomembni predvsem Zn, Cu in Mn. Če ajda raste v okolju, kjer je Se dostopen rastlinam, je lahko tudi pomemben vir tega elementa (Vomberger in sod., 2012).

Kalček je bogat z minerali kot so kalij, magnezij, kalcij, železo, cink, baker, vitamini B1, B6 in E ter maščobami. Ker je ajda lahko prebavljiva je priporočljiva za otroke, ne vsebuje glutena kar pomeni, da je tudi sestavni del hrane za bolnike z celikalijo. Vendar je potrebna velika previdnost, ker ponavadi ajdo meljejo v istih mlinih kot žita.

Seme razen visokokakovostnih beljakovin vsebuje flavonoide in flavone, fitosterole, fagopirine ter proteine, ki vežejo vitamin tiamin. Flavonoidi se nahajajo v zunanjih plasteh ajdovega semena in predstavljajo glavno skupino naravnih antioksidantov. Zdravilni učinki ajde se pripisujejo vsebnosti rutina, ki je flavonoid in ga ni mogoče najti v žitih. Flavonoidi so znani po tem, da varujejo celice pred poškodbami in prav zaradi tega imajo pomemben vpliv na ožilje (Bonafaccia in sod., 2003; Korošec in sod., 2000).

Fitosteroli vplivajo na zmanjševanje holesterola v krvi. Fagopirin pretstavlja fluorescentni rdeč pigment, ki se nahaja v zelenih delih rastlin. V semenih ajde se nahaja v zelo malih količinah. Ajda vsebuje 2-5 krat več fenolnih spojin kot oves ali ječmena, medtem ko ajdovi otrobi in luščine imajo 2-7 krat višji antioksidativen učinek kot ječmen in oves (Holasova in sod., 2002).

Ajda vsebuje približno 9–15 % beljakovin, 1,6–3,25 % maščob in 65–75 % škroba oziroma nevlakninskih ogljikovih hidratov, 4,3–5 % vlaknin in 1,8–2,2 % pepela. Ajdova moka je eno redkih živil z izjemno visoko biološko vrednostjo beljakovin. Ima izjemno nizko vsebnost prolaminov in jo zato uporabljajo kot brezglutensko moko. Po kemijskih in imunoloških študijah je ajda zaradi nizke vsebnosti prolaminov (pa tudi ti so bistveno

drugačni od pšeničnih) vir dietnih beljakovin za posameznike, občutljive na gluten (Krkoškova in Mrazova, 2005).

Rezistentni škrob je prisoten v več ajdovih izdelkih, predvsem v ajdovi kaši. Ajdova kaša se lušči po hidrotermičnih postopkih. S hidrotermično obdelavo zrnja, ki je del tradicionalnega postopka luščenja ajde, pa se v ajdovi kaši pojavi tudi manj prebavljivega škroba v primerjavi s pšeničnim belim kruhom. Počasi razgradljiv ali celo nerazgradljiv škrob v ajdovi kaši ima lahko podobne lastnosti kot prehranske vlaknine. To je pomembno pri diabetesu, saj lahko uravnava glikemični status. Počasno sproščanje glukoze iz škroba lahko podaljša telesno oziroma fizično aktivnost, prav tako pa se podaljša tudi občutek sitosti (Kreft, 1995).

Z zaužitjem 100 g ajdove moke se lahko teoretično zagotovi 10 do 100 % priporočljivega dnevnega vnosa mineralnih snovi. Različni avtorji poročajo o sorazmerno visoki vsebnosti celokupnih flavonoidov v ajdovi moki in otrobih. Ajda ima pomembno količino rutina, kar je eno od izhodišč za uporabo ajde v zdravi prehrani. Med vrstami in sortami ajd so razlike v vsebnosti rutina. Tatarska ajda lahko vsebuje bistveno več rutina kot navadna ajda, lahko tudi do stokrat več (Vombergar in sod., 2012).

2.4 ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE

2.4.1. Antioksidanti

Oksidacija je eden izmed najpomembnejših procesov produkcije prostih radikalov v živilih, kemikalijah in celo v živih sistemih. Prosti radikali igrajo pomembno vlogo v razgradnji kemijskih in živilskih snovi. Visoko reaktivni prosti radikali in kisikove spojine v bioloških sistemih, lahko povzročijo oksidacijo nukleinski kislin, proteinov in maščob (Pisoschi in sod., 2009).

Antioksidanti so spojine, ki že v majhnih koncentracijah reagirajo v reaktivne kisikove spojine (ROS), jih zavirajo oziroma nevtralizirajo. Reagirajo z radikali in na ta način preprečujejo oksidacijske radikalske verižne reakcije (oksidativni stres) v bioloških sistemih. Sintetični antioksidanti so že dolgo časa v uporabi kot aditivi v živilih, vendar rezultati in poročila o njihovi vpletenosti v kronične bolezni so omejili njihovo uporabo kot dodatki živilom. Zaradi tega je bila mednarodna pozornost usmerjena na vire naravnih antioksidantov, predvsem rastlinskega izvora (Holasova in sod., 2002).

Rastline vsebujejo številne redoks aktivne antioksidante, kot so polifenoli, karotenoidi, tokoferoli, askrobinska kislina in encime, ki se borijo proti nevarnim oksidativnim poškodbam rastlinskih celic. V živalskih celicah je sinteza antioksidantov veliko bolj omejena in oksidativne poškodbe so vključene v patogenezo veliko kroničnih bolezni

vključno z rakom, boleznimi srca in staranjem (Pisoschi in sod., 2009). Zato v zadnjem času naravni antioksidanti pridobivajo na pomenu. Istočasno pa narašča zaskrbljenost potrošnikov glede varnosti sintetičnih antioksidantov v živilih (Sun in Ho, 2005).

V človeškem telesu so antioksidanti, ki varujejo telo in vzdržujejo ravnovesje prostih radikalov encimi, ki vključujejo katalaze, superoksid desmutazo, betakarotene, katehine, fenolne kisline in ne encimsko obrambo preko vitamina C (askrobinska kislina) in E (Arouma, 1998). Antioksidanti v organizmu delujejo na različne načine: odstarnjujejo in/ali popravljajo oksidativne molekule, reagirajo s prostimi radikali in jih inaktivirajo ter sodelujejo pri kelaciji s kovinskimi ioni (Korošec, 2000).

Razen tega, da so antioksidanti pomembne učinkovine pri ohranjanju zdravja človeka, imajo enako pomembno vlogo pri rastlinah. Ena izmed najpomembnejših vlog v rastlinah je, da jih ščitijo pred bakterijami, virusi, glivami in pred napadi rastlinojedih živali. Vsebnost antioksidantov v rastlinah ne sme biti prevelika, ker bi bila na ta način koncentracija antioksidantov škodljiva za samo rastlino. Zaradi tega se antioksidanti ne kopičijo v citoplazmi celic, ampak ločeno v vakuolah ali v tkivih v katerih ni več živih celic. Vsebnost antioksidantov je torej odvisna od genotipa kot tudi od zunanjih okoljskih dejavnikov (Kreft, 2010; Karamać in sod., 2015).

2.4.1.1 Fenolne spojine

Fenolne spojine ali polifenoli so zelo razširjeni v naravi. Vključujejo enostavne molekule kot so fenolne kisline, spojine s srednjo molekulsko maso kot so flavonoidi in dolge verige polimerov z veliko molekulsko maso, kot so kondenzirani in hidrolizajoči tanini. V naravi so polifenoli v glavnem povezani s privabljanjem žuželk in opraševanjem in obrambo rastline. Pri ljudeh pa so fenolne spojine povezane z antioksidativnim delovanju (Agostini-Costa in sod., 2015).

So obsežna in raznovrstna skupina sekundarnih metabolitov rastlin, ki se nahajajo v vakuolah ali pa se vežejo na strukturne elemente celične stene. V svoji kemijski strukturi vsebujejo aromatski obroč in vsaj eno hidroksilno skupino vezana neposredno na aromatski obroč. V naravi je vedno vezanih več skupin, zaradi tega jih imenujemo polifenolne spojine. Nahajajo se v vseh rastlinah, vendar zelo retko v prosti obliki, pogosto so vezani na amino skupine, sladkorje, lipide in terpenoide. Polifenoli čeprav se nahajajo v vseh rastlinah so med različnimi rastlinami tudi razlikujejo odvisno od sorte, načina pridelave, podnebnih razmer kot so temperatura, padavine. V rastlinah je bilo določenih že čez 8000 različni polifenolnih spojin. V vseh rastlinah pa imajo fenolne spojine skupni prekursor, to je bodisi šikimska kislina ali fenilalanin (Abramovič in sod., 2011).

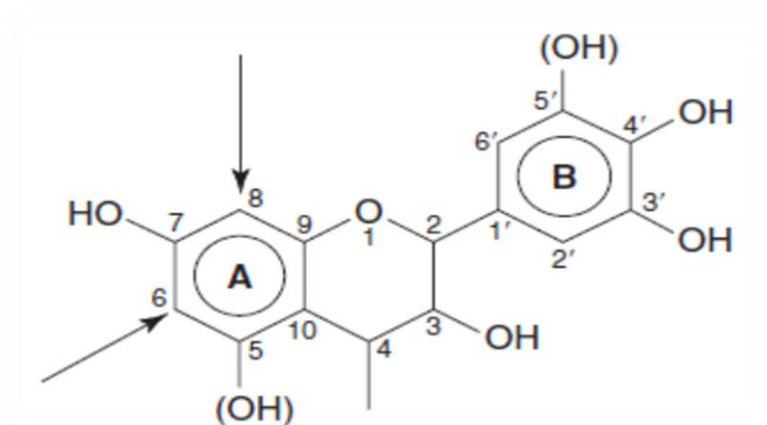
Antioksidativna aktivnost fenolov v rastlinah je posledica njihovih redukcijsko oksidacijskih lastnosti in kemijske strukture, ki imajo pomembno vlogo v inaktivaciji reaktivnih kisikovih spojin (ROS) in nevtralizaciji prosti radikalov (Chun in sod., 2005; Rice-Evans in sod., 1996).

Ajda je ena izmed najbogatejših virov polifenolnih snovi in flavonoidov (Inglett in sod. 2012; Li in sod., 2013). Največ fenolnih snovi pri ajdi je v zunajnih delih semen in so sestavljeni iz frakcije fenolnih kislin in flavonoidov v prosti obliki, ali obliki estrov ali bolj kompleksni obliki (Shallan in sod., 2014). V prehrani so najpomembnejši fenolne spojine, flavonoidi in tanini.

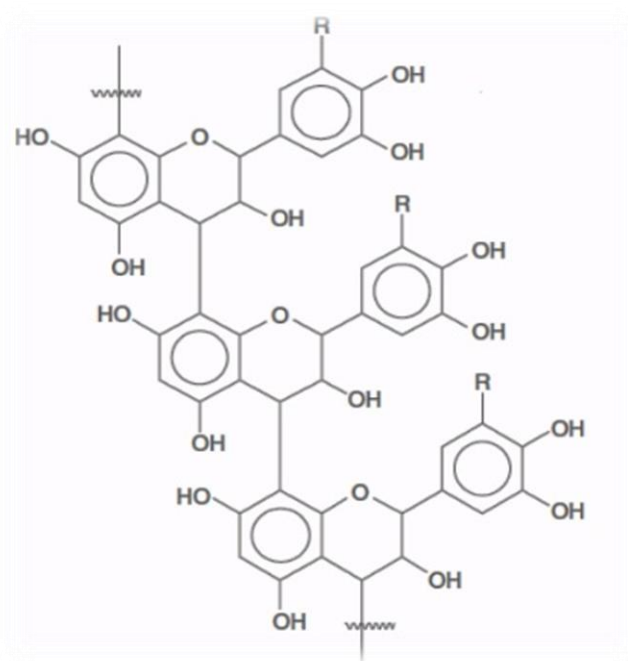
2.4.1.2 Tanini

Po definiciji Bate-Smith so tanini vodotopne fenolne spojine z molekulsko maso med 500 in 3000 Da, ki imajo sposobnost oboriti alkaloide (Karamać in sod., 2007). Tanini so razdeljeni v tri glavne skupine:

- kondenzirani tanini (proantocianidini) so flavan-3-ol biopolimeri (slika 1, slika 2)
- galotanini in elagitanini spadajo v skupino hidrolizirajočih taninov .
- kompleksni tanini



Slika 1: Zgradba flavonoida, ki predstavlja osnovni monomer kondenziranega tanina



Slika 2: Zgradba tanina

Celične poškodbe, ki nastajajo kot rezultat oksidativnega stresa in presežek prostih radikalov so povezane s staranjem, fiziološkimi in kliničnimi motnjami, vključno z boleznimi raka, srca in poškodbami jeter. Rastlinske spojine - polifenoli so znani po svoji močni antioksidativnosti (Gadžo in sod., 2010).

Antimikrobna aktivnost taninov je povezana s sposobnostjo, da lahko tvorijo stabilne komplekse z beljakovinami, škrobom in s tem motijo presnovno aktivnost bakterijskih encimov in ohranjajo funkcionalnost bioloških membran. O antioksidativnih lastnostih taninov je veliko napisanega, manj je znanega o interakciji med tanini in beljakovinami, ki imajo velik pomen pri njihovi biološki aktivnosti. Razumevanje teh interakciji bo omogočilo boljše poznavanje biološke in farmakološke aktivnosti taninov (Gadžo in sod., 2010). Frazier in sod. (2010) navajajo, da so interakcije med tanini in beljakovinami eksotermne v katere se vključi več vezavnih mest proteina.

Tanine v rastline se sintetizirajo kot sekundarne metabolite, ki niso vključeni v primarni metabolizem in niso neposredno povezani z normalno celično rastjo, razvojem ali razmnoževanjem rastline.

Tanine najdemo v celotnem kraljstvu rastlin. Največ jih je v golosemenkah in kritosemenkah. Glede na dele rastlin se nahajajo v vakuolah in v površinskem vosku rastlin. To so predeli, kateri običajno ne sodelujejo pri metabolizmu rastline, ampak se aktivirajo samo ob poškodbi celic.

V semenih ajde se taninske spojine nahajajo v periferni delih in se pri običanjem mletju odstranjujejo. Zaradi tega je vsebnost taninov v moki manjša kot v otrobih in celih semenih. Tanini so opredeljeni kot močni antioksidanti in njihova prisotnost v luščini in testi zavira procese staranja in kvarjenje semena in tako ugodno vplijo na kakovost ajdovih prehranskih izdelkov (Luthar, 2012).

Luthar (2012) je proučevala v katere dele semen se nalagajo tanini pri dveh diploidnih sortah Sivi in Darji ter pri dveh tetraploidnih sortah Petri in Bednji 4n. Rezultati so pokazali, da se tanini nahaja v luščini in testi. V testi se nahaja približno 75 % taninov in v luščini približno 25 %. Endosperm in kalček s kotiledonami ne vsebujejo taninov.

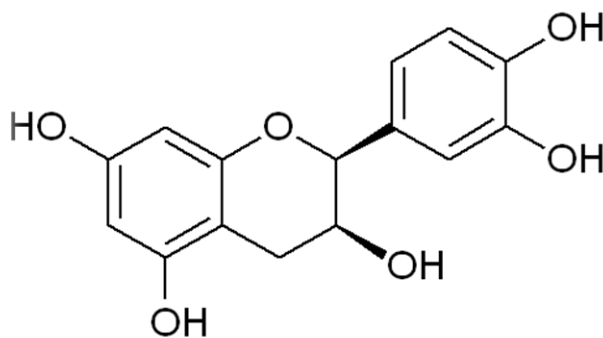
Vsebnost taninov v zunanjih delih semen je verjetno eden od razlogov za dobro ohranjanje kalivosti ajde. Ker se nahajajo v zunanji delih semen preprečujejo dostop kisiku v osrednje dele semen (Luthar, 2012).

2.5 STANDARDNI ANTIOKSIDANTI

Njihova uporaba z znano kemijsko strukturo olajša natančno preučevanje vsebnosti in delovanja antioksidantov (Lü in sod., 2010). V našem primeru je bil uporabljen katehin (slika 3).

2.5.1 Katehin

Katehin je antioksidativen polifenolski rastlinski sekundarni metabolit. Z izrazom katehi pogosto poimenujemo tudi sorodno družino flavonoidov in podskupino flavan-3-oli ali flavanole. Ime katehin izhaja iz družine Catechu, kar je sok oziroma kuhan ekstrakt drevesa *Acacia catechu*. Katehin je produkti sekundarnega metabolizma rastline in kot tak ima pomembno obrambno funkcijo, nima pa funkcije pri rasti in razvoju rastline. Sestavljen je iz treh obročev (slika 3).



Slika 3. Strukturna formula katehina

Če sta OH-skupina na obroču C in obroču B v trans položaju, se spojina imenuje katehin, če pa sta v trans konfiguraciji pa spojino imenujemo epikatehin. Zaradi večjega števila fenolnih skupin, ki lahko vstopijo v redoks reakcije, je potek oksidacije katehina kompleksen (Janeiro in Oliveira Brett, 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1. RASTLINSKI MATERIAL

V poskus so bile vključene 4 sorte in 4 populacije navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) ter 24 populacij tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*), ki smo jih pridelali v letih 2013 in 2015. Kot primerjalni standard smo v analizo na vsebnost taninov vključili še po en genotip izbranih poljščin pridelanih v letu 2015 (preglednica 1).

Večino semen rastlinskih genskih virov smo dobili iz Slovenske rastlinske genske banke Biotehniške fakultete, razen sort Darja, Čebelica, Črna gorenjska in Bamby, ki smo jih kupili ter jih razmnožili na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete Oddelka za agronomijo. Semena smo pred analizo hranili v hladilnici pri 4 °C.

3.2 REAGENTI

Topilo za ekstrakcijo:

- metanol (Sigma –Aldrich, Nemčija)

Standard:

- katehin (Sigma, Nemčija)

Ostale kemikalije:

- vanilin
- klorovodikova kislina - HCl

Aparature in laboratorijski pribor:

- laboratorijski mlin Waring 32BL79
- analizna tehtnica
- UZ kadička
- Centrifuga - Tehtnica Excentric 322A
- spektrofotometer Tecan
- mikrotitarske plošče 96F

3.3 METODE

3.3.1 Priprava vzorcev

Semena smo zmleli z laboratorijskim mlinom in zmlete vzorce do ekstrakcije shranili v 50 ml centrifugirkah v temi pri sobni temperaturi.

Preglednica 1: Seznam ajd in drugih poljščin katerih semena so bila vključena v analizo vsebnosti taninov

Vrsta ajde in izbrane poljščine	Leto pridelka semen in oznaka sort in populacij	
	2013	2015
Navadna ajda	Darja	Darja
	Čebelica	Čebelica
	Bamby	
	Črna gorenjska	
	Trdinova	Trdinova
	Siva	Siva
		Siva (Žurga
		Trdinova (II)
Tatarska ajda	26	26
	27	27
	29	29
	61	61
	63	63
	64	64
	65	65
	66	66
	69	69
	96	96
	104	104
	109	109
	115	115
	116	116
	137 ₁	137 ₁
	137 ₃	137 ₃
	137 ₄	137 ₄
	137 ₅	137 ₅
	151	151
	156	156
	216	216
	147	147
	3044	3044
	9093	9093
Poljščine		Pira
		Pšenica
		Proso
		Rž
		Koruza
		Ječmen
		Oves
		Sirek
		Konoplja

3.3.2 Ekstrakcija

Iz zmletih vzorcev smo s 96 % metanolom ekstrahirali tanine. V 12 ml steklene centrifugirke smo natehtali 3-krat po 400 mg vzorca, ker smo delali v treh ponovitvah. Vsakemu vzorcu smo dodali 10 ml 96 % metanola. Centrifugirke smo zatesnili s parafilmom in jih za 15 min. postavili v ultrazvočno kopel (Iskra). Začetna temperatura je bila 23 °C, ki se je postopoma v prvih petih minutah dvignila do 32 °C in smo jo nato vzdrževali do konca ekstrakcije. Po ekstrakciji smo vzorce centrifugirali 10 min. pri 4000 obratih/min. Po končanem centrifugiranju smo od vsake ponovitve previdno odpipetirali 5 ml supernatanta v čiste centrifugirke in s tem zaustavili morebitno nadaljnjo ekstrakcijo. Preostanek peleta in supernatanta smo zavrgli. Od supernatanta smo določen volumen odpipetirali v 96 valčno mikrotitersko ploščo ter dodali ustrezne reagente. Po določenem času smo s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri ustrezni valovni dolžini (500nm).

3.3.3 Vanilin-HCl metoda

Z vanilin-HCl metodo smo določili kondenzirane tanine. Metoda temelji na barvni reakciji med dodanim vanilinom in predhodno ekstrahiranimi kondenziranimi tanini pri kateri se razvije barvna reakcija. Razvita barva ima absorpcijski maksimum med 480 in 550 nm. Vsakemu vzorcu smo pripravili še slepo probo, da bi odšteli morebitno reakcijo med HCl in drugimi sestavinami v ekstraktu. Upoštevati je treba tudi da nekatere snovi, ki ne vsebujejo taninov, lahko dajo pozitivno reakcijo z vanilinom. Vendar v literaturi nismo zasledili, katere so te snovi, ki bi lahko prispevale k obarvanosti vzorca in niso kondenzirani tanini. Tako kot je navedeno v literaturi, se vanilin-HCL metoda zaradi svoje občutljivosti in specifičnosti ter enostavnosti pogosto uporablja za določanje koncentracije prisotni kondenziranih taninov oziroma antocijaninov, ki so flavan-3-oli (Hagerman, 2002; Perumalla in Nayeem, 2012).

3.3.3.1 Priprava reagentov

1. 1 % vanilin (0,5 g vanilina v 50 ml metanola), poimenovali smo ga reagent A
2. 8 % HCl v metanolu (4 ml HCl v 50 ml metanola), poimenovali smo ga reagent B
3. 4 % HCl v metanolu (2,8 ml HCl v 70 ml metanola), poimenovali smo ga reagent C

Neposredno pred uporabo smo dodali reagent A in B, reagent C pa smo uporabili za slepo probo. Od supernatanta ekstrahiranih vzorcev smo odpipetirali 50 µl v mikrotitersko ploščo in dodali še 100 µl reagenta A in 50 µl reagenta B. Za slepo probo smo prethodno odpipetirali 50 µl ekstrahiranega vzorca supernatanta in dodali 150 µl reagenta C. Mikrotitersko ploščo z vzorci smo inkubirali 15 min. pri sobni temperaturi v temi ter po 15 min izmerili absorbanco pri 500 nm.

3.3.3.2 Priprava standardne katehinske krivulje

Za standardno katehinsko krivuljo smo pripravili 0,2 % založno raztopino katehina v metanolu. Zatehtali smo 0,1 g katehina in ga stopili v 96 % metanolu ter prelili v 50 ml bučko in dopolnili do oznake z metanolom. Nato smo iz založne katehinske raztopine odpipetirali določene volumne in jih redčili do 10 ml z metanolom (preglednica 2). Posamezne koncentracije katehina in izmerjene absorbance pri 500 nm so podane v preglednici 3.

Preglednica 2: Priprava standardnih katehinskih raztopin za izris standardne krivulje

Koncentracija katehina (mg/10 ml)	Standardne raztopine						
0,0-10,00	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,00 ...	2
	0,50	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00 ...	10 ml

Preglednica 3: Koncentracije katehina v metanolnih raztopinah od 0,1 do 2 mg/10 ml in vrednosti izmerjenih absorbanc

Koncentracija (mg/10 ml)	Absorbanca A500
0,1	0,01
0,2	0,046
0,3	0,066
0,4	0,087
0,5	0,1
0,6	0,16
0,7	0,18
0,8	0,21
0,9	0,24
1	0,27
1,1	0,31
1,2	0,35
1,3	0,39
1,4	0,42
1,5	0,46
1,6	0,5
1,7	0,55
1,8	0,6
1,9	0,65
2	0,69

Standardno katehinsko krivuljo smo izrisali na podlagi absorbance standardnih katehinskih raztopin (preglednica 3). Rezultate smo prikazali v mg taninov/g suhe snovi vzorca, ki je ekvivalent katehina (slika 5).

Vsebnost ekvivalentov katehina oziroma taninov na osnovi suhe snovi vzorca smo izračunali po formuli (1). Upoštevali smo, da so vzorci vsebovali v povprečju 15 % vode.

$$\text{Ekvivalent katehina} = \frac{\text{konc. katehina} \cdot 100}{\text{g vzorca} \cdot (100 - \%H_2O)} \quad \dots (1)$$

3.3.4 Statistična analiza

Podatke analiz vanilin-HCl smo statistično obdelali z R-programom, verzija 3.3.1 z enosmerno analizo varjance in značilne razlike predstavili s Tukey-ev HSD testom mnogoterih primerjav.

Pri analizi variance smo upoštevali p vrednost (verjetnost), če je bila ta manjša ali enaka 0,05, obstajajo statistično značilne razlike med opazovanimi povprečji in zastavljeno ničelno hipotezo zavrnemo.

Za potrditev statističnih razlik smo upoštevali p vrednost, ki izraža skladnost dobljenih podatkov z zastavljeno ničelno hipotezo. Statistično značilnost smo označili z zvezdicami: *** pri stopnji tveganja 0,001, ** pri 0,01 in * pri 0,05. Statistično značilne razlike v vsebnosti taninov smo testirali s Tukey-evim HSD testom in jih v preglednicah označili z različnimi črkami.

4 REZULTATI

4.1 HIDROMETEOROLOŠKI PODATKI V OBDOBJU POLSKEGA POSKUSA Z AJDO

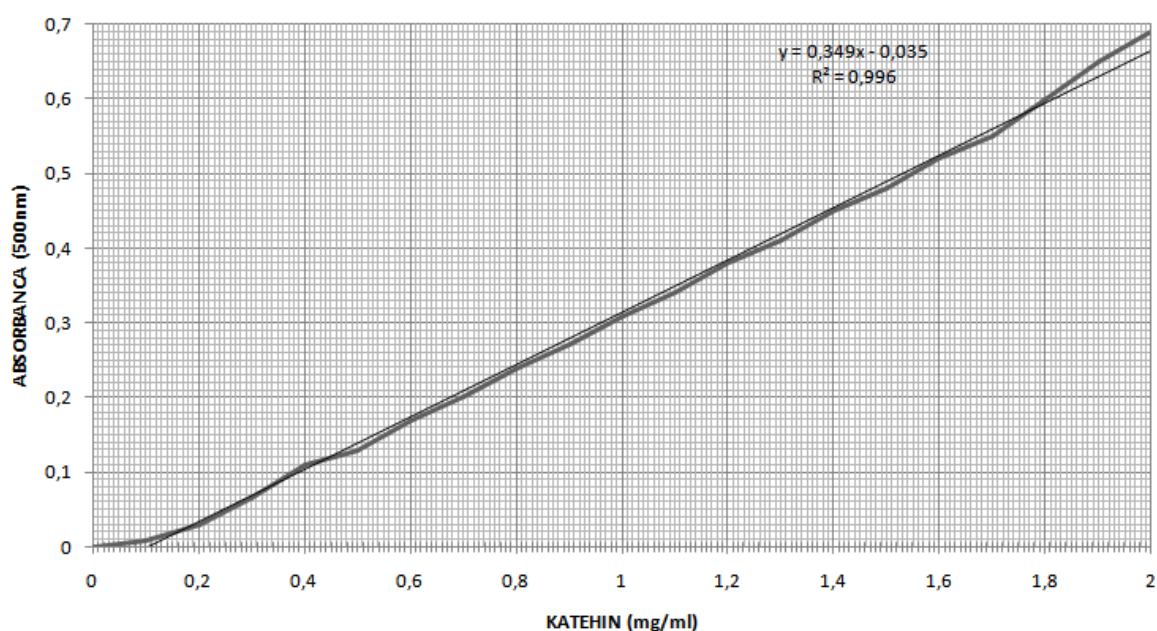
Iz državnega zavoda Republike Slovenije za okolje smo pridobili hidrometeorološke podatke za obdobje štirih mesecev v času rastne dobe ajde v letih 2013 in 2015. V preglednici 4 so prikazane povprečne vrednosti temperature in količine padavin za julij, avgust, september in oktober (ARSO, 2016).

Preglednica 4: Podatki za povprečne temperature v in količino padavin v Ljubljani za leti 2013 in 2015

Povprečje	Julij		Avgust		September		Oktober	
	2013	2015	2013	2015	2013	2015	2013	2015
mesečnih temperatur (°C)	23,5	24,3	22,5	22,3	16,2	16,5	16	16,24
mesečne količine padavin (mm/m ²)	22	118	105	96	217	163,66	227	151,1

4.2 VSEBNOST TANINOV

Na sliki 4 je grafični prikaz standardne katehinske krivulje, ki smo jo izrisali s pomočjo izmerjenih absorbanc različnih koncentracij standardnih raztopin (preglednici 2 in 3).



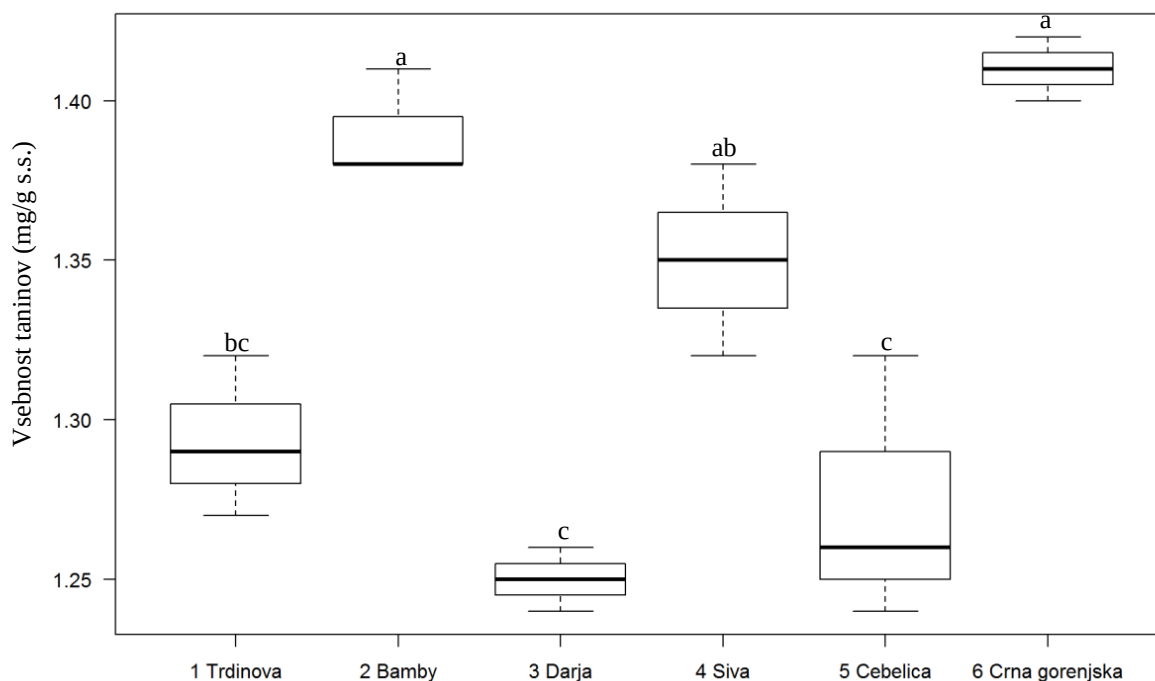
Slika 4: Standardna umeritvena katehinska krivulja

4.2.1 Vsebnost taninov pri navadni ajdi

Preglednica 5: Analiza variance vsebnosti taninov 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2013

Vir variabilnosti	VKO	SP	SKO	F-vrednost	p-vrednost
Genotip	0,06398	5	0,012796	20,38	0,000 ***
Ostanek	0,00753	12	0,000628		

Med genotipi navadne ajde, pridelanih v letu 2013, obstajajo statistično značilne razlike ($p < 0,001$) v vsebnosti taninov (preglednica 5). Med katerimi genotipi obstajajo značilne razlike smo potrdili s Tukey-ev HSD testom razlik oziroma mnogoternih primerjav.



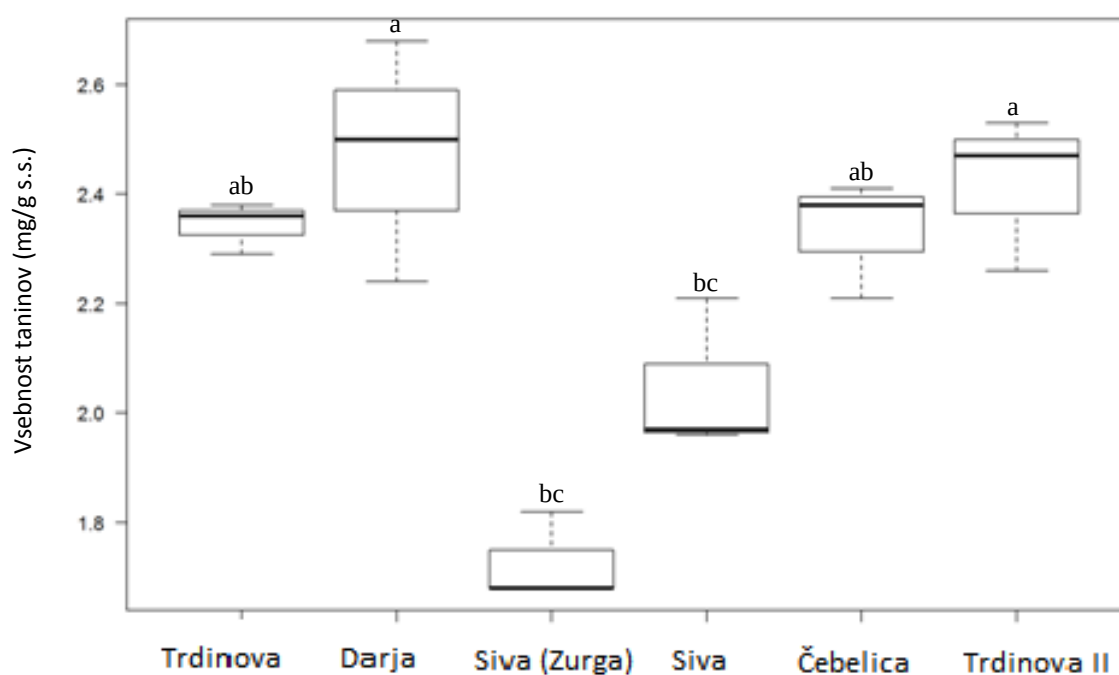
Slika 5: Povprečne vsebnosti taninov z mejami zaupanja 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2013

Vsebnost taninov genotipov navadne ajde se je razporedila v štiri homogene skupine, med katerimi obstajajo statistično značilne razlike ($p < 0,001$). V povprečju je bila vsebnost taninov največja pri ajdi Črna gorenjska (1,41 mg/g s.s.) in Bamby (1,39 mg/g s.s.), ki pa se med seboj značilno ne razlikujeta. Najmanjše vrednosti taninov sta imeli ajdi Čebelica (1,27 mg/g s.s.) in Darja (1,25 mg/g s.s.), a tudi med njima ni bilo statistično značilnih razlik. Ajda Črna gorenjska in Bamby se statistično značilno razlikujeta od Čebelice in Darje. V tretji skupini je bila ajda Siva, ki se značilno razlikuje od Čebelice in Darje. V četrti skupini je Trdinova, ki se značilno razlikuje od Črne gorenjske in Bamby (slika 5).

Preglednica 6: Analiza variance vsebnosti taninov 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2015

Vir variabilnosti	VKO	SP	SKO	F-vrednost	p-vrednost
Genotip	1,2167	5	0,24334	13,34	0,000 ***
Ostane	0,2189	12	0,01824		

Med genotipi navadne ajde, pridelanih v letu 2015, prav tako kot v letu 2013, obstajajo statistično značilne razlike ($p < 0,001$) v vsebnosti taninov (preglednica 6).



Slika 6: Povprečne vsebnosti taninov z mejami zaupanja 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2015

Prav tako kot v letu 2013 se je vsebnost taninov pri genotipih navadne ajde pridelanih v letu 2015 razporedila v štiri homogene skupine, med katerimi obstajajo statistično značilne razlike ($p < 0,001$). Največjo povprečno vsebnost taninov sta imela genotipa Darja (2,47 mg/g s.s.) in Trdinova II (2,42 mg/g s.s.), ki se med seboj ne razlikujeta, se pa statistično značilno razlikujeta od Sive (Žurga), ki je imela najmanjšo vsebnost taninov (1,73 mg/g s.s.). V drugi homogeni skupini sta genotipa Trdinova in Čebelica, ki se prav tako značilno razlikujeta samo od Sive (Žurga). V tretji homogeni skupini je Siva, ki se statistično značilno razlikuje od Darje in Trdinova II (slika 6).

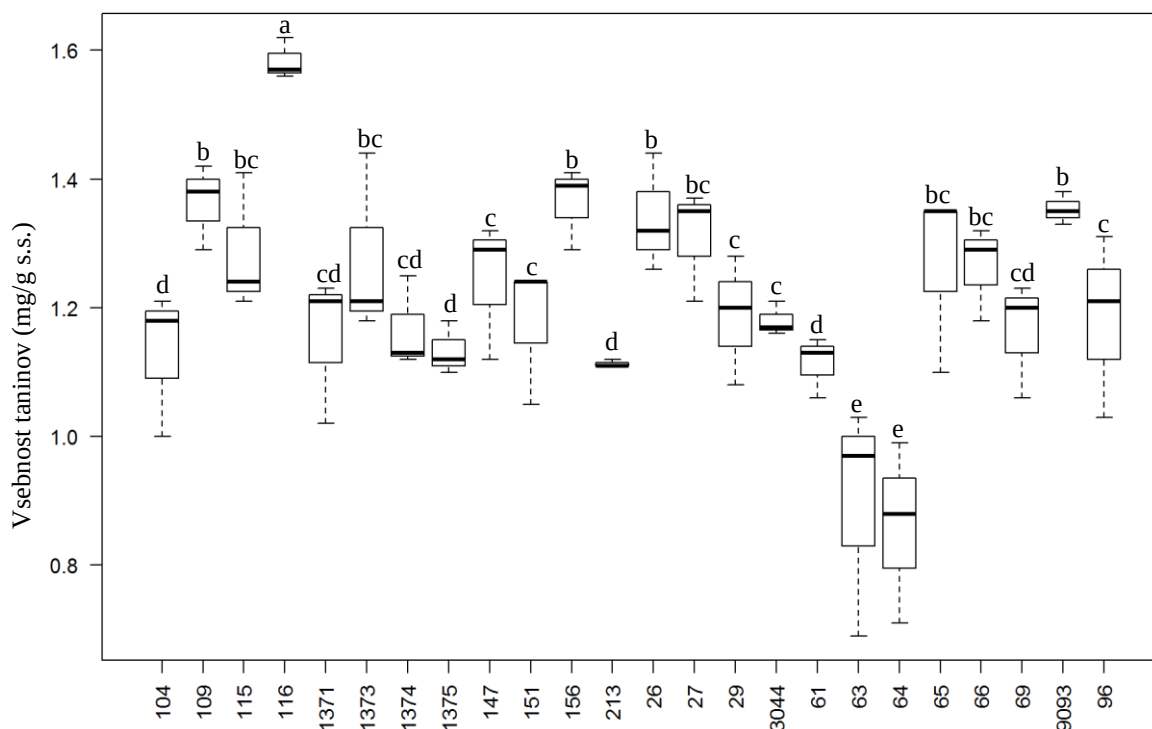
4.2.2 Vsebnost taninov pri tatarski ajdi

Preglednica 7: Analiza variance vsebnosti taninov 24 genotipov tatarske ajde pridelanih v letu 2013

Vir variabilnosti	VKO	SP	SKO	F-vrednost	p-vrednost
Genotip	1,5400	23	0,06696	6,82	0,000***
Ostane	0,4713	48	0,00982		

Med gemotipi tatarske ajde, pridelanih v letu 2013, obstajajo statistično značilne razlike ($p < 0,001$) v vsebnosti taninov (preglednica 7). Med katerimi genotipi obstajajo značilne razlike smo potrdili s Tukey-ev HSD testom razlik.

Največjo vsebnost taninov je imela tatarska ajda z oznako 116 (1,58 mg/g s.s.), ki se je statistično značilno razlikovala ($p < 0,001$) od več kot polovice genotipov z manjšimi vsebnostmi taninov. Tatarski ajdi z oznako 63 in 64 (0,9 in 0,86 mg/g s.s.) sta imeli najmanjšo vsebnost taninov, ki se je statistično značilno razlikovala od več kot polovice genotipov z večjimi vsebnostmi taninov (slika 7).



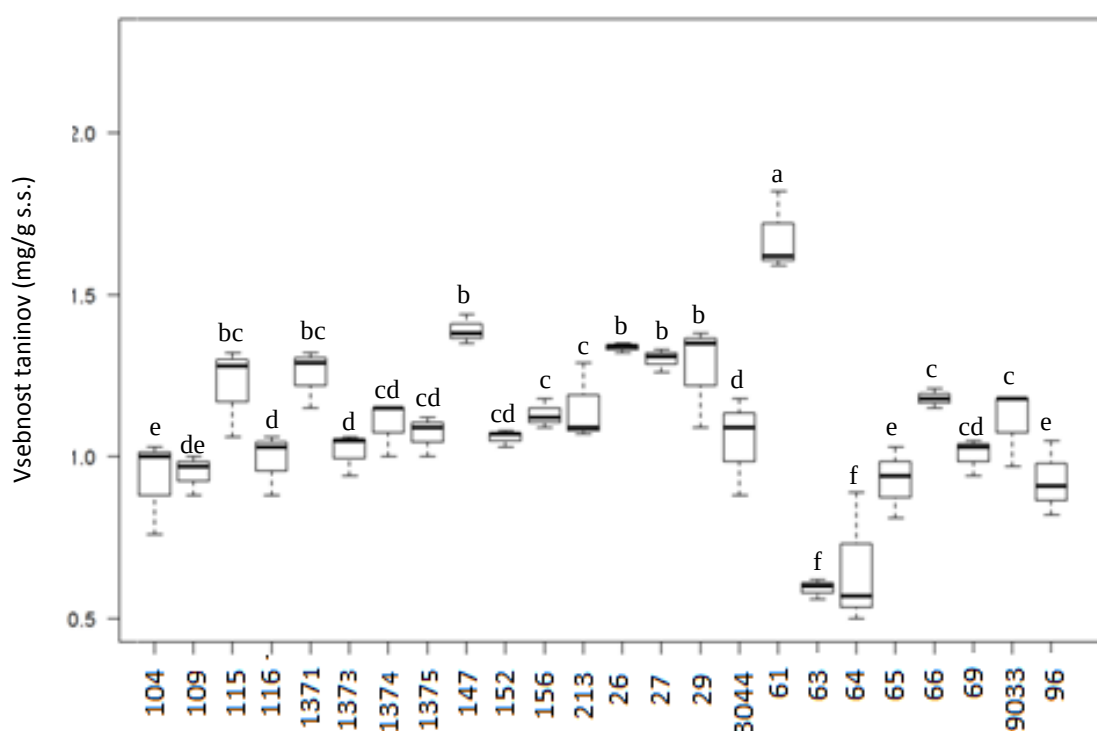
Slika 7: Povprečne vsebnosti taninov z mejami zaupanja 24 genotipov tatarske ajde pridelanih v letu 2013

Preglednica 8: Analiza variance vsebnosti taninov 24 genotipov tatarske ajde pridelanih v letu 2015

Vir variabilnosti	VKO	SP	SKO	F-vrednost	p-vrednost
Genotip	6,439	23	0,26828	23,67	0,000 ***
Ostanek	0,567	48	0,01133		

Med gemotipi tatarske ajde pridelanih v letu 2015 obstajajo, prav tako ko v letu 2013, statistično značilne razlike ($p < 0,001$) v vsebnosti taninov (preglednica 8). Med katerimi genotipi obstajajo značilne razlike smo preverili s Tukey-ev HSD testom razlik.

Genotipi tatarske ajde so se po vsebnosti taninov razvrstili v več homogenih skupin. Največ taninov sta imela genotipa z oznako 61 (1,68 mg/g s.s.) in 147 (1,39 mg/g s.s.), ki se med seboj v taninih nista značilno razlikovala, sta se pa od več kot polovice genotipov z manjšo vsebnostjo taninov. V zadnjo homogeno skupino z značilno najmanj tanini sta se uvrstila genotipa z oznako 64 (0,65 mg/g s.s.) in 63 (0,60 mg/g s.s.), med katerima ni bilo značilnih razlik, medtem ko sta se značilno razlikovala od vseh ostali (slika 8).



Slika 8: Povprečne vsebnosti taninov z mejami zaupanja 24 genotipov tatarske ajde pridelanih v letu 2015

4.2.2.1 Primerjava vsebnosti taninov pri tatarski ajdi med leti 2013 in 2015

Preglednica 9: Tukey-ev HSD test razlik v povprečni vsebnosti taninov pri tatarski ajdi glede na leto pridelka 2013 in 2015

Leto pridelka	Povprečna vsebnost taninov (mg/g s.s.)	Homogene skupine
2013	1,21	ab
2015	1,16	b

S Tukey-ev HSD testom razlik med genotipi tatarske ajde, pridelanih v letih 2013 in 2015, nismo zasledili statistično značilnih razlik. Oblikovali sta se skupini, ki se med seboj prekrivata (preglednica 9).

4.3 PRIMERJAVA VSEBNOSTI TANINOV MED NAVADNO IN TATARSKO AJDO

Preglednica 10: Analiza variance vsebnosti taninov med navadno in tatarsko ajdo

Vir variabilnosti	VKO	SP	SKO	F-vrednost	p-vrednost
Genotip	10,497	1	10,497	178,55	0,000 ***
Leto	0,597	1	0,597	10,15	0,0017 **
Interakcija	6,850	1	6,850	116,51	0,000 ***
Ostanek	10,524	179	0,059		

V vsebnosti taninov med vrstama ajde in letoma pridelka ter njunima interakcijama obstajajo statistično značilne razlike ($p < 0,001$) (preglednica 10).

Preglednica 11: Tukey-ev HSD test razlik med vrstama ajde

Vrsta ajde	Povprečna vsebnost taninov (mg/g s.s.)	Homogene skupine
Navadna	1,78	a
Tatarska	1,17	b

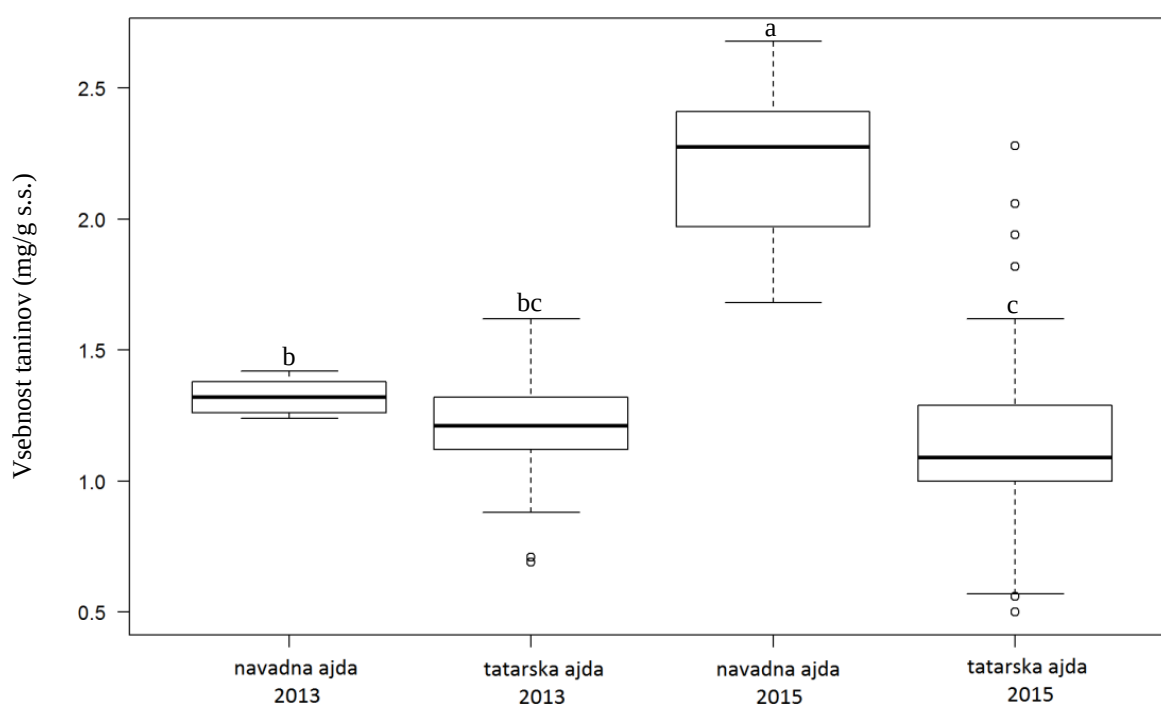
Med navadno in tatarsko ajda obstaja statistično značilna razlika ($p < 0,001$) v vsebnosti taninov. Značilno večjo vsebnost taninov je imela navadna ajda (1,78 mg/g s.s.), medtem ko je imela tatarska ajda značilno manj taninov (1,17 mg/g s.s.) (preglednica 11).

Preglednica 12: Tukey-ev HSD test razlik med leti pridelka 2013 in 2015

Leto pridelka	Povprečna vsebnost taninov (mg/g s.s.)	Homogene skupine
2015	1,35	a
2013	1,23	b

Vsebnost taninov se je značilno razlikovala med leti pridelka 2013 in 2015 ($p < 0,001$). V letu 2015 so genotipi ajd vsebovali značilno več taninov (1,35 mg/g s.s.) v primerjavi z letom 2013 (1,23 mg/g s.s.) (preglednica 12).

Največjo vsebnost taninov je imela navadna ajda pridelana v letu 2015, ki se je statistično značilno razlikovala od vseh ostalih interakcij. Značilno manjšo vsebnost taninov je imela navadna ajda pridelana v letu 2013 in tatarska ajda pridelana v letu 2013, med katerima ni značilnih razlik, saj se skupini med seboj prekrivata. Sledi tatarska ajda pridelana v letu 2015, ki se statistično značilno razlikuje v vsebnosti taninov od navadne ajde pridelane v obeh letih (slika 9).



Slika 9: Povprečne vsebnosti taninov z mejami zaupanja za vrsto ajde in letom pridelka

4.4 VSEBNOST TANINOV V IZBRANIH POLJŠČINAH

Preglednica 13: Povprečna vsebnost taninov v izbranih poljščinah

Poljščina	Povprečna vsebnost taninov (mg/g s.s.)
Pira	0,09
Pšenica	/
Proso	/
Rž	/
Koruza	0,2
Ječmen	/
Oves	/
Sirek golec	2,08
Sirek plevenc	0,96
Konoplja	0,23

Pri nekaterih poljščinah: pira, koruza, sirek in konoplja smo z vanilin-HCl metodo določili vsebnost taninov, medtem ko pri pšenici, prosu, rži, ječmenu in ovsu nismo potrdili prisotnost taninov (preglednica 13).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V nalogi smo proučevali vsebnost kondenziranih taninov v semenih različnih genskih virov navadne in tatarske ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench. in *Fagopyrum tataricum* Gaertn.) pridelanih v letih 2013 in 2015. Kot primerjalni standard smo vključili v poskus še izbrane poljščine pridelane v letu 2015. Semena vseh genotipov so bila pridelana na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete Oddelka za agronomijo in analizirana na vsebnost taninov z vanilin-HCl metodo.

5.1.1 Medvrstne in znotrajvrstne razlike v vsebnosti taninov

Genotipi navadne ajde so v letu 2013 vsebovali od 1,25 do 1,41, v povprečju 1,33 mg taninov/g s.s. vzorca, medtem ko so v letu 2015 vsebovali od 1,73 do 2,47, kar je v povprečju 2,22 mg/g s.s. vzorca. Z analizo variance smo potrdili statistično značilne razlike ($p < 0,001$) med genotipi znotraj vrste navadne ajde pridelanih v različnih letih. Na podlagi tega lahko zaključimo, da je vsebnost taninov pri navadni ajdi odvisna od vplivov okolja.

Genski viri tatarske ajde so v letu 2013 vsebovali od 0,86 do 1,58, v povprečju 1,21 mg taninov/g s.s. vzorca, medtem ko so v letu 2015 vsebovali od 0,60 do 1,68, v povprečju 1,18 mg/g s.s. vzorca. Genotipi tatarske ajde pridelani v letu 2013 so vsebovali za samo 0,03 mg taninov več kot pridelani v letu 2015. Kar nakazuje, da je v vsebnosti taninov med leti pri tatarski ajdi manjša razlika kot pri navadni. Da bi to ugotovitev lahko zanesljivo potrdili, bi potrebovali rezultate večletnih poljskih poskus oziroma opravljenih analiz.

Pri skupni obdelavi obeh vrst smo ugotovili, da je imela navadna ajda pridelana v letu 2015 značilno največ taninov (2.22 mg/g s.s.) od vseh ostalih vrednosti. Značilno najmanjšo vsebnost taninov je imela tatarska ajda pridelana v letu 2015 (1,16 mg/g s.s.).

Na nivoju vrst lahko potrdimo, da obstajajo v vsebnosti kondenziranih taninov statistično značilne razlike ($p < 0,0017$) med navadno in tatarsko ajdo. V povprečju je navadna ajda vsebovala za 0,61 mg več taninov kot tatarska ajda. O razlikah v vsebnosti taninov in antioksidativnem učinku med različnimi genskimi viri med obema vrstama ajd navajajo tudi Luthar (2012) in Li in sod. (2013).

Pri proučevanju znotraj vrstnih razlik smo ugotovili prav tako značilne razlike v vsebnosti taninov. Med obema letoma tako pri navadni kot pri tatarski ajdi nismo zasledili, da bi se isti genotip pojavili v isti homogeni skupini, ampak so se med obema letoma uvrščali v različne homogene skupine. Kar nam nakazuje, da je sinteza taninov kot produktov sekundnega metabolizma zelo odvisna od vplivov okolja in v manjši meri od genotipa.

Podobne ugotovitve glede interakcij med genotipom in okoljem za skupne antioksidante, katerih del so tudi tanini, navajajo Guo in sod. (2011). Izpostavljajo, da na vsebnost antioksidantov v tatarski ajdi pomembno vplivajo tudi rastne razmere. Vollmanova in sod. (2013) kljub temu, da je vsebnost antioksidantov med njimi tudi taninov zelo odvisna od trenutnih okoljskih razmer, pripisujejo tatarski ajdi zelo visoke antioksidativne zmogljivosti.

5.1.2 Primerjava vsebnosti taninov pri ajdi in izbranimi poljščinami

Ugovili smo, da vsebnost taninov lahko med leti pri istih genotipih ajde zelo varira, je pa njihova prisotnost v primernih količinah dobrodošla, saj so eden izmed virov naravnih antioksidantov, ki se lahko pojavljajo v semenih določenih vrst. Pri analizi vsebnosti taninov pri izbranih poljščinah, ki smo jih izbrali, glede njihove prehranske uporabnosti smo ugotovili, da jih pet od devetih izbranih poljščin sploh ne vsebuje. Shallan in sod. (2014) so analizo taninov opravili z isto metodo in navajajo, da ajda v primerjavi s pšenico vsebuje 1,77 krat več taninov. V naši raziskavi pri navadni pšenici nismo zasledili taninov, medtem ko smo jih pri piri (0,09 mg/g s.s.). Omenjeni avtorji poročajo, da je vsebnost skupnih antioksidantov pri ajdi 2-krat večja kot pri pšenici in 5-krat večja v vsebnosti skupnih polifenolov.

Na področju, ki obravnava vsebnost taninov v semenih različnih genskih virov ajde, je število objav zelo skromno.

5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da ajda vsebuje zadovoljive količine taninov v primerjavi z ostalimi poljščinami. Velike količine taninov, glede na njihove lastnosti niso zaželeni, ker lahko negativno vplivajo na človeški metabolizem.

Pri navadni ajdi smo določili statistično značilno večje vsebnosti taninov (1,78 mg/g s.s.) kot pri tatarski ajdi (1,17 mg/g s.s.).

Vsebnost taninov pri genotipih tatarske ajde je bila značilno večja v letu 2013 (1,21 mg/g s.s.) kot pri genotipi tatarske ajde v letu 2015 (1,16 mg/g s.s.). Značilne razlike v vsebnosti taninov smo portdili tudi znotaj obeh vrst ajde.

Od devetih izbranih poljščin so samo štiri katere vsebovale tanine. Med njimi je izstopal sirek z 2,08 mg/g s.s.

Isti genotipi, tako pri navadni kot tatarski ajdi, pridelani v obeh letih so imeli značilno različne vsebnosti taninov, kar nakazuje, da ima okolje velik vpliv na sintezo taninov.

6 POVZETEK

Vsebnost taninov pri različnih genskih virih ajde smo določali z vanilin-HCl metodo, ki jo odlikuje specifičnost analize kondenziranih taninov, občutljivost in enostavnost. V ta namen smo v letih 2013 in 2015 posejali na laboratorijsko polje Biotehniške fakultete različne genske vire navadne in tatarske ajde. Od teh so bile 4 sorte in 4 populacije navadne ajde ter 24 populacij tatarske ajde. Kot primerjalni standard smo v analizo vključili še po en genotip izbranih poljščin pridelanih v letu 2015. Do analize smo semena hranili pri 4 °C. Nato smo jih zmleli z laboratorijskim mlinom in po 0,4 g vzorca vključili v ekstrakcijo z 96 % metanolom. Po ekstrakciji smo supernatantu dodali reagent z vanilinom, kateri je reagiral s kondenziranimi tanini. Na podlagi reakcije se je razvila barva, kateri smo spektrofotometrično izmerili absorbanco pri 500 nm. Dobljene absorbance smo s pomočjo standardne katehinske krivulje izrazili kot ekvivalent tanina.

Na podlagi naših raziskav smo ugotovili, da obstajajo značilne razlike v vsebnosti taninov med navadno in tatarsko ajdo ter tudi znotraj posamezne vrste.

Genotipi navadne ajde so v letu 2013 v povprečju vsebovali 1,33 mg taninov/g s.s. vzorca, medtem ko so v letu 2015 vsebovali v povprečju 2,22 mg/g s.s. vzorca. Genotipi ajde pridelani v letu 2015 so vsebovali za približno 0,9 mg več taninov, kot pridelani v letu 2013. Genski viri tatarske ajde so v letu 2013 imeli v povprečju 1,21 mg taninov/g s.s. vzorca, medtem ko so v letu 2015 v povprečju vsebovali 1,18 mg/g s.s. vzorca. Razporeditev vsebnosti taninov med leti je bila obratno sorazmerna med genotipi navadne in tatarske ajde. Pri združeni statistični analizi obeh vrst smo ugotovili, da je imela navadna ajda pridelana v letu 2015 značilno največ taninov (2,22 mg/g s.s.) od vseh ostalih ajd pridelanih v letu 2013 in 2015. Najmanjšo vsebnost taninov je imela tatarska ajda pridelna v letu 2015 (1,16 mg/g s.s.).

Med obema letoma tako pri navadni kot pri tatarski ajdi nismo zasledili, da bi se določen genotip pojavil v isti homogeni skupini, ampak so se med obema letoma razvrščali v različne homogene skupine. To nam potrjuje, da je sinteza taninov kot produktov sekundnega metabolizma zelo odvisna od vplivov okolja in v manjši meri od genotipa.

Analiza vsebnosti taninov pri poljščinah, ki smo jih izbrali, glede na njihova prehransko uporabnost smo ugotovili, da jih pet (pšenica, proso, rž, ječmen in oves) od devetih sploh ne vsebuje taninov.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da ajda vsebuje zadovoljive količine taninov v primerjavi z ostalimi poljščinami. Velike količine taninov, glede na njihove lastnosti niso zaželjene, ker lahko negativno vplivajo na človeški metabolizem.

7 VIRI

ARSO 2016. Agencija Republike Slovenije za okolje in prostor.

<http://www.arso.gov.si/vreme/napovedi%20in%20podatki/> (07.07.2016)

Abramovič H., Abram V., Vidrih R. 2011. Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitosti. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.

Agostini-Costa T.S., Teodoro A.F.P., Alves R.B.N., Braga L.R., Ribeiro I.F., Silva J.P., Quintana L.G., Burle M.L. 2015. Total phenolics, flavonoids, tannins and antioxidant activity of Lima Beans conserved in a Brazilian Genebank. *Ciencia Rural*, 45: 335–341

Aruoma O.L. 1998. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75: 199-212

Bonafaccia G., Marocchini M., Kreft I. 2003. Composition and technological properties of the flour and bran from common and Tartary buckwheat. *Food Chemistry*, 80: 9-15

Chun S.S., Vatter D., Lin Y.T., Shetty K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40: 809-816

Earp C.F., Akingbala J.O., Ring S.H., Rooney L.W. 1980. Evaluation of Several Methods to Determine Tannins in Sorghums with Varying Kernel Characteristics. *American Association of Cereal Chemists*, 58, 3: 234-238

Frazier R.A., Deaville E.R., Green R.J., Stringano E., Willoughby I., Plant J., Mueller-Harvey I. 2010. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51: 490-495

Gadžo D., Djukič M., Gavrič T., Štrekelj P. 2010. Comparison of tannin concentration in young plants of common and tartary buckwheat. *Acta agriculturae Slovenica*, 95-1: 75-78

Grušovnik T., Lidiya M., Štrukelj J., Utroša K. 2012. Ajda Požen! Zaključno poročilo 1., 2. in 5. sklopa projekta. Ljubljana: 42 str.

Guo X.D., Ma Y.J., Parry J., Gao J.M., Yu L.L., Wang M. 2011. Phenolics Content and Antioxidant Activity of Tartary Buckwheat from Different Locations. *Molecules*, 16: 9850-9867

- Hagerman A.E. 2002. Vanillin assay. *Journal of Agrocultural and Food Chemistry*, 26: 1214-1218
- Holasova M., Fiedlerova V., Smrcinova H., Orsak M., Lachman J., Vavreinova S. 2002. Buckwheat-the source of antioxidant activity in functional food. *Food Research International*, 35: 207-211
- Inglett G.E., Chen D., Berhow M., Lee S. 2011. Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Journal of Food Chemistry*, 125: 923-929
- Janeiro P., Oliveira Brett A.M. 2004. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta*, 518, 1-2: 109-115
- Karamać M., Biskup I., Kulczyk A. 2015. Fractionation of Buckwheat Seed Phenolics Analysis of Their Antioxidant Activity. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 4: 243-249
- Karamać M., Kosińska A., Rybarczyk A., Amarowicz R. 2007. Extraction and chromatographic separation of tannin fraction from tannin-rich plant material. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57, 4: 471-474
- Kocjan Ačko, D. 2015. Poljščine: pridelava in uporaba. Ljubljana, ČZD, Kmečki glas: 200 str.
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*, 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo: 10-21
- Kreft I. 1995. Ajda. Ljubljana, ČZD, Kmečki glas: 112 str.
- Kreft I. 2010. Pridelovanje in uporaba tatarske ajde- nov izziv v Slovenij. V: *Simpoziji Novi izzivi v poljedelstvu*, Rogaška Slatina 2. in 3. december. 2010. Kocjan-Ačko D., Čeh B. (ur.) Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 155-159
- Kreft I., Vombergar B., Germ M., Vogrinčič M. 2012. Tatarska ajda v kulturi prehranjevanja v Aziji in Evropi. V: *Trendi in izzivi v živilstvu, prehrani, gostinstvu in turizmu. Proceedings of the 2th international professional conference*, Ljubljana, Slovenija. November 16-17. Ljubljana, IBRA: 107-110

- Krkoškova B., Mrazova Z. 2005. Prophylactic components of buckwheat. *Food Research International*, 38: 561-568
- Li F.H., Yuan Y., Yang X.I., Tao S., Ming J. 2013. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) and *Fagopyrum tartaricum* L. Gaertn.) Hulls, Brans and Flours. *Journal of Integrative Agriculture*, 12, 9: 1684-1693
- Lü J.M., Lin P.H., Yao Q., Chen C. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 4: 840-860
- Luthar Z. 2012. Genska banka ajde - vir slovenske genetske variabilnosti. *Acta agriculturae Slovenica*, 99-3: 307-316
- Perumalla S., Nayeem N. 2012. Determination of Total phenolic acids, condensed tannins and flavonoids in the leaves of *Caesalpinia pulcherrima* (Linn.). *International Journal of Phytotherapy Research*, 16-19
- Pisoschi A.M., Cheregi M.C., Danet A.F. 2009. Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches. *Molecules*, 14: 480-493
- R Development Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN <http://www.R-project.org/> (14.08.2016)
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 933-956
- Seo J.M., Lee D.B., Arasu M.V., Wu. Q., Suzuki T., Yoon Y., Lee. S.W., Park S.U., Kim S.J. 2013. Quantitative differentiation of phenolic compounds in different varieties of buckwheat cultivars from China, Japan and Korea. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 4: 109-116
- Shallan M.M.A.A., Fayed S.S.A.K., Gazzar M.M.S. 2014. Protective Effects of Wheat Bran and Buckwheat Hull Extracts against Hypercholesterolemia in Male Rats. *International Journal of Advanced Research*, 4: 724-736
- Stankovic M.S., Niciforovic N., Mihailovic V., Topuzovic M., Solujic S. 2012. Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different

plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 81, 2: 117-122

Sun T., Ho Ch.T. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extract. Journal of Food Chemistry, 90: 743-749

Tehnologija pridelave ajde. 2012. Kmetijsko gospodarska zbornica Slovenije.
<http://www.kgzs.si/Portals/0/Gradiva/Tehnologija%20pridelave%20ajde-KGZS.pdf>
(08.07.2016)

Vollmanova, E. Margitanova, T. Toth, M. Timoracka, D. Urminska, T. Bojnanska, I. Čicova. 2013. Cultivar influence on total polyphenol and rutin contents and total antioxidant capacity in buckwheat, amaranth, and quinoa seeds. Czech Journal of Food Sciences, 31, 6: 589–595

Vombergar B., Kreft I., Germ M., Vogrinčič M. 2012. Comparison of nutritional value of common and tartary buckwheat and possibilities for their use in nutrition. V: First scientific conference with international participation. Izola, Slovenija. Oktober 25. 167: 143-149

Vugrinčič M., Timoracka M., Melichacova S., Vollmannova A., Kreft I. 2010. Degradation of Rutin and Polyphenols during the Preparation of Tartary Buckwheat Bread. Journal of Agrocultural and Food Chemistry, 58: 4883-4887

Zule J., Kozjan G. 2008. Polifenoli v različnih vrstah macesna (*Larix* spp.). Zbornik gozdarstva in lesarstva, 86: 51-58

Zych-Weyk I., Krzepilko A. 2012. Determination of total phenolic compound content and antioxidant properties of edible buckwheat sprouts. Ecological Chemistry and Engineering, 19, 4-5: 441-449

ZAHVALA

Za vso strokovno pomoč, spodbudo in razumevanje pri izdelavi magistrske naloge se zahvaljujem cenjeni mentorici prof. Zlata Luthar.

Za hiter in temeljiti pregled naloge se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Marjani Regvar.

Hvala profesorjem in asistentom študija Biotehnologije Biotehniške fakultete, za pridobljeno kvalitetno znanje in vso pomoč tekom študija. Velika zahvala gre tudi sošolcem za pomoč in družabne trenutke.

Posebna zahvala za vsestransko pomoč in oporo tekom študija gre mojim najbližjim, še posebej bratu, teti, stricu, Simoni in Eleni.

Mami, najlepša ti hvala za neprecenljivo podporo, za pomoč in pozitivne misli, ker mi vedno stojiš ob strani in verjameš vame.

PRILOGA A

Tukey-ev HSD test razlik za povprečno vsebnost taninov 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2013.

Genotip	Povprečna vsebnost taninov (mg/g s.s.)	Homogene skupine
Črna gorenjska	1,41	a
Bamby	1,39	a
Siva	1,35	ab
Trdinova	1,30	bc
Čebelica	1,27	c
Darja	1,25	c

PRILOGA B

Tukey-ev HSD test razlik za povprečno vsebnost taninov 6 genotipov navadne ajde pridelanih v letu 2015.

Genotip	Povprečna vsebnost taninov (mg/g s.s.)	Homogene skupine
Darja	2,47	a
Trdinova II	2,42	a
Trdinova I	2,34	ab
Čebelica	2,33	ab
Siva	2,05	bc
Siva (Žurga)	1,73	c

PRILOGA C

Tukey-ev HSD test razlik za povprečno vsebnost taninov 24 genotipov tatarske ajde pridelanih v letu 2013.

Genotip	Povprečna vsebnost taninov (mg/g s.s.)	Homogene skupine
116	1,58	a
109	1,36	b
156	1,36	b
9093	1,35	b
26	1,34	b
27	1,31	bc
137 ₃	1,28	bc
65	1,27	bc
115	1,27	bc
66	1,26	bc
147	1,24	c
29	1,19	c
96	1,18	c
151	1,18	c
3044	1,18	c
137 ₄	1,17	cd
69	1,16	cd
137 ₁	1,15	cd
104	1,13	d
137 ₅	1,13	d
61	1,11	d
213	1,11	d
63	0,90	e
64	0,86	e

PRILOGA D

Tukey-ev HSD test razlik za povprečno vsebnost taninov 24 genotipov tatarske ajde pridelanih v letu 2015.

Genotip	Povprečna vsebnost taninov (mg/g s.s.)	Homogene skupine
61	1,68	a
147	1,39	b
26	1,34	b
27	1,30	b
29	1,27	b
137 ₁	1,25	bc
115	1,22	bc
66	1,18	c
213	1,15	c
156	1,13	c
9093	1,11	c
137 ₄	1,10	cd
69	1,07	cd
137 ₅	1,07	cd
152	1,06	cd
3044	1,05	d
137 ₃	1,02	d
116	0,99	d
109	0,95	de
65	0,93	e
96	0,93	e
104	0,93	e
64	0,65	f
63	0,60	f

PRILOGA E

Tukeyev HSD test razlik med vrsto ajde in letom pridelka.

Interakcija vrsta/leto	Povprečna vsebnost taninov (mg/g s.s.)	Homogene skupine
Navadna/2015	2,22	a
Navadna/2013	1,33	b
Tatarska 2013	1,21	bc
Tatarska 2015	1,16	c

