



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Martina LAVRIČ

WAXY GEN V RASTLINAH

DIPLOMSKI PROJEKT

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Martina LAVRIČ

WAXY GEN V RASTLINAH

DIPLOMSKI PROJEKT
Univerzitetni študij – 1. stopnja

WAXY GENE IN PLANTS

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2012

Diplomski projekt je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala akad. prof. dr. Ivana Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marina Pintar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: akad. prof. dr. Ivan Kreft
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Zlata Luthar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 27. 09. 2012

Diplomski projekt je rezultat lastnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega projekta na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Martina LAVRIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 631.52: 547.917 (043.2)
- KG škrob/ amiloza/ amilopektin/ kmetijske rastline
- AV LAVRIČ, Martina
- SA KREFT, Ivan (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2012
- IN WAXY GEN V RASTLINAH
- TD Diplomski projekt (Univerzitetni študij – 1.stopnja)
- OP V, 18 str., 7 sl., 48 vir.
- IJ sl
- Ji sl/en
- AI *Waxy* gen v rastlinah vpliva na zmanjšano vsebnost amiloze v škrobu. Škrob, ki vsebuje samo amilopektin ali še nekaj nad 0 % amiloze, se imenuje waxy škrob. Do spremenjene sestave molekul škroba privede mutacija na genu, ki kodira zapis za protein GBSSI. Encim GBSSI sodeluje pri sintezi škroba in vpliva na koncentracijo amiloze v škrobu. *Waxy* gen vpliva na slabše izražanje ali inaktivacijo waxy proteina. Prvi je o tem poročal botanik Collins leta 1909, ko je na Kitajskem vzgojil prvo waxy koruzo. Njen neobičajen endosperm ga je spominjal na vosek, zato ga je poimenoval voskasti oz. waxy endosperm. Sprememba v sestavi škroba vpliva na njegove fizikalne, kemijske in strukturne lastnosti. To privede do lepljivega waxy fenotipa. Ta lastnost je v prehrani zelo razširjena in zaželjena na območju Azije, kjer so waxy rastline že dolgo znane. *Waxy* gen so našli pri mnogih rastlinskih vrstah: navadni pšenici, durum pšenici, rižu, ječmenu, baru, prosu, sirku, rastlini Jobove solze, ovsu, koruzi, krompirju, grahu in amarantu. V prihodnosti je pomembno, da se ljudem poda še več informacij o lastnostih waxy škroba, kar bo vodilo v večjo pridelavo in uporabo waxy rastlin v prehrani.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 631.52: 547.917 (043.2)
- CX starch/ amylose/ amylopectin/ crops
- AU LAVRIČ, Martina
- AA KREFT, Ivan (supervisor)
- PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2012
- TI WAXY GENE IN PLANTS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO V, 18 p., 7 fig., 48 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB *Waxy* gene in plants affects the reduced amylose content of starch. Starch, which contains only amylopectin or even slightly above 0% amylose, is called waxy starch. The changes in the starch molecules are the result of the mutation gene, which encodes a protein coding for GBSSI. GBSSI enzyme is involved in starch synthesis and has impact on the concentration of amylose in starch. *Waxy* gene affects the reduced expression or inactivation of waxy protein. The first report leads back to the botanist Collins in 1909, when he first described waxy maize from China. Its unusual endosperm reminded him to wax, so he called it waxy endosperm. Change in composition of starch affects its physical, chemical and structural properties. This leads to sticky waxy phenotype. This property is very widespread in the diet and desirable in the area of Asia, where the waxy plants have been known for long time. *Waxy* gene has been found in many plant species: wheat, durum wheat, rice, barley, foxtail millet, millet, sorghum, Job's tears, oats, corn, potatoes, peas and amaranth. In the future it is important to give people more information about the properties of waxy starch, which will lead to intense production and use of waxy plants in the diet.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	II
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	III
KAZALO VSEBINE.....	IV
KAZALO SLIK.....	V
1 UVOD	1
2 ŠKROB	1
2.1 SINTEZA ŠKROBA.....	2
2.2 LASTNOSTI AMILOPEKTINA	2
2.3 LASTNOSTI AMILOZE.....	3
3 FIZIKALNE IN STRUKTURNE LASTNOSTI WAXY ŠKROBA	3
3.1 UPORABA WAXY ŠKROBA V PREHRANI.....	5
4 ZGODOVINA IN IZVOR WAXY GENA	6
5 LASTNOSTI WAXY GENA	9
5.1 WAXY GEN V RASTLINAH	9
5.2 NAČIN DOLOČANJA WAXY GENA V RASTLINAH.....	13
6 ZAKLJUČEK	14
7 VIRI	15

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Prikaz molekule amilopektina (Moore in sod., 1998)	3
Slika 2: Molekula amiloze (Moore in sod., 1998)	3
Slika 3: Prikaz skeniranih elektronskih mikrostrukturnih posnetkov škrobnih zrn waxy škroba (A), sorte Kanto 107 (B), sorte Centura (C) in komercialnega (D) škroba pšenice (meritvena oznaka: 10 µm) (Yoo in Jane, 2002).	4
Slika 4: 'Four-row Wax', tipična domača sorta Kitajske waxy koruze izbrane iz Yunnan province na Kitajskem (Fan in sod., 2008).....	8
Slika 5: Struktura waxy gena pri koruzi. Škatlice predstavljajo eksone označene od 1 do 14, od 5' do 3' konca. Črte med eksoni pa predstavljajo introne (13) (Fan in sod., 2008; Huang in sod., 2010).	10
Slika 6: Organizacija kromosomov pri navadni pšenici (<i>Triticum aestivum</i> L.) in prikaz waxy lokusov (Graybosch, 1998).	10
Slika 7: Prikaz obarvanosti škrobnih zrn s KI-I ₂ raztopino navadnih (A, C) in waxy (B, D) rastlin diploidne pšenice (<i>Triticum monococcum</i> L.) (Fujita in sod., 2001).	13

1 UVOD

Waxy gen pri rastlinah vpliva na zmanjšano sintezo amiloze v škrobu. Imenujemo ga *waxy* škrob. Sestavljen je pretežno iz amilopektina in ima le malo ali nič amiloze. Njegov fenotip je lepljiv endosperm in to vpliva na njegove fizikalne in strukturne lastnosti. Do lepljivega fenotipa privede mutacija na genu za sintezo amiloze. Gen, ki se slabše oziroma se ne izraža pri sintezi amiloze, se imenuje *waxy* gen.

Prvi, ki je opisal *waxy* lastnost, je bil botanik G. N. Collins. Leta 1909 je v svoji knjigi opisal novo obliko indijske koruze s Kitajske. Endosperm te koruze je primerjal z vsemi že prej znanimi endospermi. Ugotovil je, da je podoben koruznemu endospermu, vendar so bile njegove fizikalne lastnosti presenetljivo drugačne. Ker je njegova tekstura vizualno spominjala na vosek, je predlagal za poimenovanje takšne zvrsti endosperma vošчени endosperm oziroma *waxy* endosperm. V naslednjih letih so sledila številna raziskovanja in študije na temo *waxy* lastnosti. Sredi 19. stoletja so znanstveniki Gris, Kreusler in Dafert našli na škrobnih zrnih različnih sort riža, rdeče madeže. Naslednje leto je Dafert poročal, da je našel enako obarvanje pri travah iz rodu *Panicum*, ki so izvirale s Kitajske. Nato je leta 1886 pri sortah iz rodu *Sorghum* Meyer opisal podoben tip škroba. Glede na podobnosti s škrobom koruze, ki jo je našel Collins, so jih poimenovali *waxy* sevi. Kasneje je bila *waxy* lastnost najdena tudi pri travah rodu *Coix* iz družine Poaceae in ponovno pri rodu *Sorghum*. Leta 1930 jo je Kasidawa prav tako odkril pri ječmenu. Uporaba rastlin z *waxy* škrobom takrat še ni bila razširjena in zanimiva. Se je pa med in po drugi svetovni vojni v Ameriki pojavil velik interes za gojenje *waxy* žit. Razlog za tako veliko zanimanje je bil v tem, da so bile zaloge tapioke omejene. *Waxy* škrob pa je bil v številnih lastnostih zelo podoben škrobu tapioke (Eriksson, 1969).

Na tem področju stalno odkrivajo nove rastline z *waxy* genom. Raziskujejo njihov izvor, uporabo različnih biotehnoloških tehnik za iskanje *waxy* lokusov, nove še neznane lastnosti in posledice delovanja *waxy* gena v rastlinah, uporaba *waxy* škroba v prehrani, vplivov na morfologijo *waxy* zrn in tudi pomena *waxy* škroba v prehrani za ljudi in živali.

2 ŠKROB

Škrob je sestavljen iz amiloze in amilopektina, ki sta polimera enot glukoze, ki so med seboj povezane z glikozidnimi vezmi. V škrobu rastlin je razmerje med amilozo in amilopektinom približno 20% - 80% (Flipse in sod., 1996).

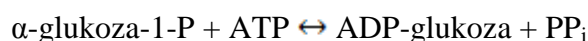
Škrob predstavlja največjo zalogo ogljikovih hidratov pri višjih rastlinah (Kulpers in sod., 1994). Nahaja se v dveh oblikah: prehoden in založni škrob. Prehoden škrob se čez dan sintetizira v fotosintetirajočih tkivih, kot so listi in prav tako v drugih organih rastline, kot je meristem in celice koreninske kapice. Ponoči se mobilizira v založne organe, kot so gomolji, endosperm, zarodki ali založne korenine, kjer je založni škrob shranjen dolgoročno (Martin in Smith, 1995; Mérida in sod., 1999).

Škrob je v rastlinah v obliki škrobnih zrn, v katerih sta molekuli amiloze in amilopektina organizirani v izmenično radialne plasti (Smith in sod., 1999). Struktura škrobnih zrn je določena s kristalinično organizacijo molekul amilopektina. Iz poskusov pri krompirju in koruzi je znano, da so molekule amiloze vrinjene med radialno razporejene amilopektinske molekule (Kulpers in sod., 1994). Škrobna zrna so različnih velikosti in oblik ter kemičnih in fizikalnih lastnosti, ter variirajo z njegovim izvorom. Najdemo jih v semenih, gomoljih, koreninah, steblih, listih, plodovih in celo v pelodu. Škrobno zrno se oblikuje v amiloplastu (Škrabanja, 2005). Na morfologijo škrobnih zrn ima okolje le majhen vpliv, lahko pa radikalne spremembe v njihovi morfologiji povzročijo genske mutacije (Gregori, 2009).

2.1 SINTEZA ŠKROBA

Naslednji encimi sodelujejo pri sintezi škroba, v kateri so pomembne tri reakcije (Škrabanja, 2005):

1. **ADP-glukoza pirofosforilaza; AGP** katalizira naslednjo reakcijo:

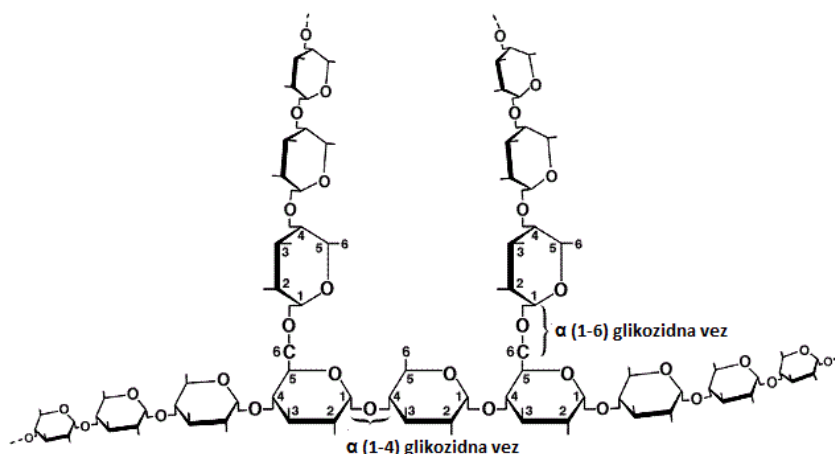


2. **Škrob sintaza** katalizira prenos ADP-glukoze na α -1,4 glukozni "primer" (=začetna veriga, nosilec) in podaljša α -1,4 glukozno verigo.
3. Encim, ki je odgovoren za prenos podaljšanih α -1,4 verig in tvorbo α -1,6 razvejitenih mest v amilopektinu (delno tudi v amilozi) (ang. **branching enzyme; BE**).

Sinteza amilopektina je katalizirana z encimom SSS (soluble starch synthase) in encimom za razvejanje škroba BE (branching enzyme) (Flipse in sod., 1996). Sintezo amiloze omogoča encim GBSSI (granule bound starch synthase I). GBSSI je izoformna oblika encima SS (starch synthase) in je velikosti do približno 60 kD (Patron in sod., 2002).

2.2 LASTNOSTI AMILOPEKTINA

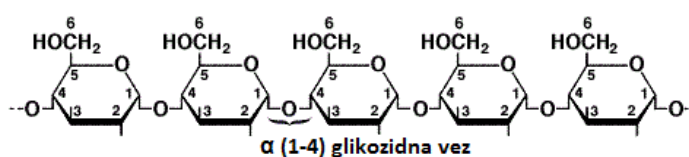
Amilopektin je velik, večkrat razvejan glukozni polimer in je glavna sestavina škroba. Preučitev natančne strukture je onemogočena zaradi njegove kompleksnosti in velikosti. Posamezne enote glukoze so med seboj povezane z α (1-4) vezmi. α (1-6) glikozidna vez pa povzroča razvejanost amilopektina (Gregori, 2009). Njegova molekulska masa znaša do 10^7 (Kulpers in sod., 1994).



Slika 1: Prikaz molekule amilopektina (Moore in sod., 1998)

2.3 LASTNOSTI AMILOZE

Amiloza je linearni polimer z nekaj stranskimi verigami. Glukozne enote so povezane z α -(1-4) vezjo in tvorijo linearno verigo (Hu in sod., 2010). Amiloza je navadno razvejana na nizki ravni, nekje na vsakih 1000 glukoznih ostankov z α -(1-6) vezjo (Martin in Smith, 1995). Njena molekulska masa je med 10^4 in 10^5 (Kulpers in sod., 1994). Amiloza sestavlja do 30% škroba. Ta delež se lahko razlikuje glede na vrsto rastline, sorto, organom rastline in njegovo starostjo ter rastnimi razmerami rastline (Martin in Smith, 1995). Običajna zrna vsebujejo približno 20 % amiloze, medtem ko obstajajo tudi zrna z manjšim odstotkom amiloze. Ta zrna imenujemo waxy (voščena) zrna. Obstajajo tudi genotipi z večjo vsebnostjo amiloze (Hu in sod., 2010).



Slika 2: Molekula amiloze (Moore in sod., 1998)

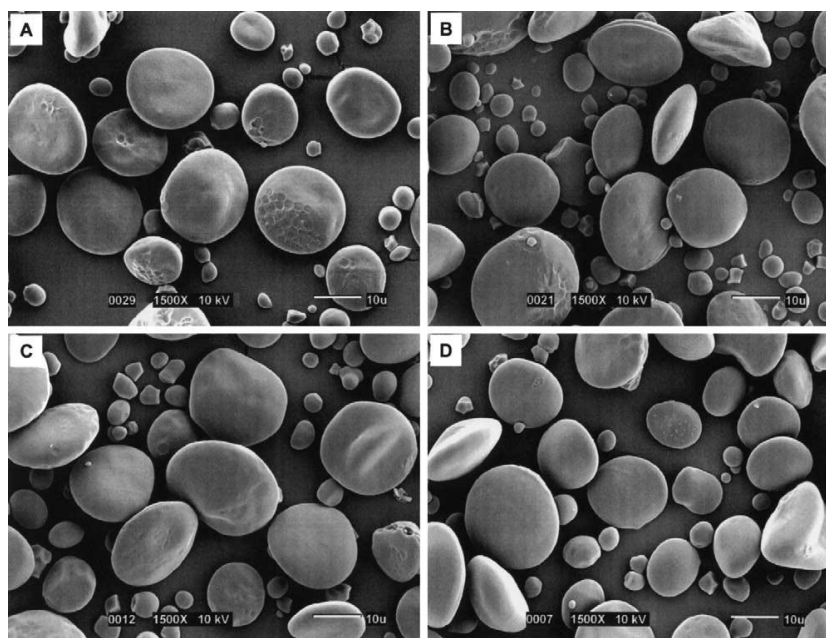
3 FIZIKALNE IN STRUKTURNE LASTNOSTI WAXY ŠKROBA

Škrobi iz različnih virov vsebujejo različna razmerja amiloze in amilopektina. To vpliva na fizikalno kemijske lastnosti škroba, kot so gelatinizacija, retrogradacija, viskoznost in absorpcija vode (Hoover in Ratnayake, 2001). Spremenijo se tudi njegove tehnološke in prehranske lastnosti (Mahmood in sod., 2007).

Waxy škrob sestavlja pretežno amilopektin in malo ali nič amiloze. Tak škrob ima neobičajne fizikalno-kemijske lastnosti. Ko ga segrejemo v vodi, waxy škrob postane lepljiv (Verhoeven in sod., 2004). Zaradi te lastnosti se sorte waxy rastlin pridelujejo le v določenih geografskih območjih. Največ jih gojijo v celinskih delih jugovzhodne Azije in v državah vzhodne Azije (Japonska, Koreja, Kitajska in Tajvan), kjer je lepljiva hrana tradicionalno zelo priljubljena (Fukunaga in sod., 2002).

Yoo in Jane (2002) sta raziskovala strukturne in fizikalne lastnosti škroba pri waxy pšenici in drugih pšenicah. Ugotovila sta, da odsotnost amiloze v škrobu waxy pšenice ni vplivala na kristalni polimorfizem, velikost škrobnega zrna, morfologijo in na temperaturo gelatinizacije. Je pa vplivala na povečano stopnjo kristaliničnosti. Tako kot škrob waxy ječmena, waxy krompirja in škrob drugih waxy žit, ima tudi škrob waxy pšenice najnižjo temperaturo lepljenja (62,5 °C) in največjo viskoznost med vsemi analiziranimi škrobi pšenice. Visoka koncentracija fosfolipidov v običajnem škrobu pšenice vpliva na velike razlike v lastnosti lepljenja med waxy in običajnim škrobom v pšenici. Amilozno-fosfolipidni kompleks omejuje nabrekanje škrobnih zrn. Pri waxy škrobu te omejitve ni in lahko nabrekne in razvije viskoznost pri veliko nižji temperaturi.

Izolirala sta tudi škrobna zrna iz štirih različnih virov pšeničnega škroba: waxy škroba, sorte Kanto 107, sorte Centura in komercialnega škroba. Na sliki 3 so prikazani skenirani elektronski mikrostrukturni posnetki izoliranih škrobnih zrn. Velika škrobna zrna so diskaste oblike in imajo premer med 18-33 µm. Manjša škrobna zrna so okrogle oblike s premerom 2-5 µm. Rezultati so pokazali, da ni bilo zaznavne razlike v velikosti in morfologiji škrobnih zrn med waxy škrobom in drugimi viri pšeničnega škroba.



Slika 3: Prikaz skeniranih elektronskih mikrostrukturnih posnetkov škrobnih zrn waxy škroba (A), sorte Kanto 107 (B), sorte Centura (C) in komercialnega (D) škroba pšenice (meritvena oznaka: 10 µm) (Yoo in Jane, 2002).

Ugotovila sta tudi, da ima amilopektin v waxy pšenici občutno večjo molekulsko maso in bolj razpršeno molekulsko gostoto, kot amilopektin v škrobu drugih pšenice. Amilopektin v škrobu waxy pšenice tudi ni vseboval posebej dolgih verig (ELC-extra-long chains), ki jih v škrobih navadne pšenice postopno sintetizira protein GBSSI.

3.1 UPORABA WAXY ŠKROBA V PREHRANI

Za pšenico je značilno, da je predelana v veliko različnih vrst industrijskih izdelkov. V vzhodno Azijskih državah, kot so Japonska, Koreja in Kitajska, je moka iz pšenice pogosto uporabljena pri izdelavi testenin. Cilj žlahtniteljev pšenice na Japonskem je vzgojiti kultivarje za pridelavo belih slanih pšeničnih t.i. udon rezancev z visoko prehransko kakovostjo. Kvantitativne in kvalitativne lastnosti škroba, kot so visoka viskoznost, nizka temperatura gelatinizacije in velika sposobnost nabrekanja (Hung in sod., 2006), so zelo pomembne in zaželjene pri pripravi in prehranski vrednosti rezancev, saj vplivajo na organoleptične lastnosti kuhanih rezancev. Rezultati raziskav potrjujejo, da je nizka vsebnost amiloze v škrobu pomemben dejavnik pri pripravi japonskih testenin (Miura in Tanii, 1994).

Raziskane so bile tudi lastnosti kruha narejenega iz moke waxy pšenice. Rezultati so pokazali, da vključitev škroba waxy pšenice v pripravo kruha prinaša pozitivne lastnosti. Volumen kruha je nekoliko večji, kot ga ima hlebec kruha iz navadne pšenične moke. Drobline dlje časa ostajajo vlažne, kruh se počasneje stara in posledično se mu podaljša njegova obstojnost. Na Japonskem so te lastnosti kruha zelo zaželjene (Hung in sod., 2006). Moka durum pšenice se uporablja predvsem pri izdelavi testenin. Sharma in sod. (2002) navajajo, da ima waxy durum pšenica prednost pred običajnimi vrstami v smislu manjših izgub pri kuhanju, kar se pogosto uporablja kot kazalnik kakovosti kuhanih testenin.

Uporaba waxy koruze v prehrani je najbolj razširjena v Aziji. Uporablja se tudi amilopektin waxy koruze v tekstilni industriji ter pri proizvodnji lepila in papirja. V nasprotju z običajno koruzo, ki vsebuje 25-28 % amiloze, je waxy koruza vsebuje samo 1 %. To vpliva na prehransko razpoložljivost škroba za živali. Raziskovalci so izmerili prebavljivost škroba iz različnih rastlinskih virov in ugotovili, da je prebavljivost waxy koruznega škroba pri živalih bistveno višja kot škroba amilozne koruze ali navadne koruze (Enes in sod., 2006). Uporaba pripravkov iz škroba waxy koruze je zelo razširjena tudi med uporabniki fitnesa, saj vpliva na hitro obnovitev zalog glikogena v telesu po treningu. Jimmy Smith (2009) v svojem članku navaja, da ima škrob waxy koruze višjo molekulsko maso in omogoča nižjo stopnjo krvnega tlaka kot dekstroza ali maltodekstroza, ki sta se zadnja leta uporabljala kot vir ogljikovih hidratov po vadbi. Tako se zelo hitro absorbira v tankem črevesu in v mišice hitreje prinese hranilne snovi (kreatin, itd.), ki so bile zaužite prej. Hranilne snovi zaužite z drugimi ogljikovimi hidrati pa porabijo več časa v želodcu in se hitreje razgradijo. Tako jih je manj dostopnih za obnovitev mišic po vadbi (Waxy maize guide, 2012).

Pri rižu je bila vsebnost amiloze v zrnju dolgo tradicionalno merilo za kvaliteto kuhanega in postreženega riža. Pri nizki vsebnosti amiloze (14-18 %) v škrobu so kuhana zrna riža bolj povezana, nežna, lepljiva in imajo sijaj. Za srednje amilozen (19-23 %) in visoko amilozen (>23 %) škrob pa je značilno, da riž absorbira več vode in se tako med kuhanjem bolj razširi. Kuhana zrna riža so tako ponavadi bolj posušena, čvrsta, puhasta in ločena (Mahmood in sod., 2007; Han in sod., 2004; Larkin in sod., 2003). Waxy riž se v Azijskih državah imenuje tudi glutinasti riž in se pripravlja na različne načine in v raznovrstnih oblikah, odvisno od kulture in njene tradicije, v kateri se uporablja. V južni Aziji je osnovno živilo v gorskih predelih posameznih regij. V vzhodni Aziji pa je zelo priljubljen pri pripravi sladice in na festivalih (Olsen in Purugganan, 2002).

Razmerje med amilozo in amilopektinom v endospermu zrnja je eden pomembnejših faktorjev zrnja pri ječmenu, saj vpliva na kakovost slada, hrane in krme (Ma in sod., 2010). Škrob waxy ječmena kaže odlično stabilnost pri zamrzovanju in odtajanju, kar pomembno vpliva na rok trajanja živil (Persson in sod., 1996). Uporaba prosa je razširjena v večjem delu Azije in se povečuje v Severni Ameriki, kjer je še posebej zaželen zaradi svoje lepljive teksture in večjega sprijemanja po kuhanju (Graybosch in Baltensperger, 2009). Kawase in sod. (2005) navajajo, da bar z waxy lastnostjo kot hrano, največ uživajo v naslednjih oblikah: obliki lepljivih zrn; v obliki tort, ki jih naredijo z uporabo pare, ki razbije zrna; v obliki cmokov, pri katerih testo pripravijo s pomočjo pare; v obliki pijač.

4 ZGODOVINA IN IZVOR WAXY GENA

Skozi zgodovino so se vrstila številna odkrivanja *waxy* gena v različnih rastlinah. Za nekatere waxy rastline so z današnjimi raziskavami tudi že določili njihov izvor. Ker pa je waxy lastnost zelo zaželjena in zanimiva, se še vedno iščejo nove rastline, ki nosijo *waxy* gen in še vedno se raziskuje njihov izvor.

Najstarejši zapisi o gojenju rastlin z waxy lastnostjo so najdeni pri rižu. Riž (*Oryza sativa* L.) je svetovno najpomembnejša rastlina, saj je osnovno živilo več kot tretjini svetovnega prebivalstva. Nove kultivarje riža morajo znanstveniki stalno razvijati, da bodo lahko izpolnjene zahteve rastočega prebivalstva (Larkin in sod., 2003). Sledenje izvoru glutinastega-waxy riža je zapleteno zaradi njegove dolge in pomembne uporabe v kulturah na zelo širokem geografskem območju vzhodne Azije, ki vključuje dele Kitajske, Japonske, Koreje in države jugovzhodne Azije. Legenda Laoškega budista postavlja izvor glutinastega riža približno 1100 let nazaj, čeprav Kitajska folklor trdi, da je bil njegov izvor v času, ko je umrl pesnik Qu Yuan, pred več kot 2000 leti. O času izvora razlagajo tudi etnografske študije, ki pravijo, da so začetki gojenja riža povezani s kmetijstvom v gorah celinskega dela jugovzhodne Azije, predvsem med Tai-govorečim ljudstvom, ki so prišli v to regijo pred 1100 in 1500 leti. Deli držav Laos, Mjanmar, Tajsko, Kambodža in Vietnam, ki obsegajo približno 200.000 kvadratnih kilometrov celinskega dela jugovzhodne Azije, se imenujejo 'območje glutinastega riža', kar odraža pomembnost glutinastega-waxy riža v njihovem gospodarstvu in kulturi. V raziskavi o izvoru glutinastega riža, sta znanstvenika ugotovila, da naj bi se mutacija na začetku pojavila v

jugovzhodni Aziji in naj bi se potem razširila proti severu vzhodne Azije (Olsen in Purugganan, 2002).

Po raziskavah sodeč, naj bi odkritju waxy riža sledilo odkritje waxy lastnosti pri ječmenu. Ječmen (*Hordeum vulgare* L.) je četrta najpomembnejša poljščina na svetu. Uporablja se predvsem v proizvodnji piva in v pridelavi živalske krme (Ma in sod., 2010). Avtohtone sorte waxy ječmena izvirajo iz vzhodne Azije in so bile v glavnem uporabljene za luksuzno hrano (Domon in sod., 2002). Patron in sod. (2002) navajajo, da so kultivarji waxy ječmena iz Azije verjetno potomci glutinastega (waxy) ječmena, ki je bil zabeležen na Kitajskem v 16. stoletju. Glutinasti ječmen naj bi bil nato prenešen na Japonsko iz Koreje v času pred 17. stoletjem. Evropski in severno Ameriški waxy ječmeni pa izhajajo iz žlahtniteljskih programov v ZDA. Sledilo je odkritje waxy lastnosti pri prosu. Proso (*Panicum miliaceum* L.) je ena najbolj starodavnih gojenih rastlin. Waxy oblike pri prosu obstajajo in so znanosti znane že od leta 1885. Nastale so najverjetneje po korakih z neodvisnimi mutacijami, ki izhajajo iz različnih okolij. Voskasta (waxy) oblika zrnja se je skozi čas ohranjala zaradi samooskrbnih kmetov, mogoče zato, ker jim je bila vseč lepljiva tekstura kuhanega zrna. V poznih 1990 letih je bil ustanovljen raziskovalni program namenjen razvoju novih waxy kultivarjev prosa, primerne za gojenje v Severni Ameriki. Razlog za to je bil, da imajo waxy tipi prosa iz Kitajske, za uspešno žetev v okoljih Severne Amerike, preveč pozno zrelost (Graybosch in Baltensperger, 2009).

Prvo odkritje waxy lastnosti in poročanje o tem v znanstvenih krogih, sega v leto 1909, ko je botanik Collins na Kitajskem vzgojil prvo waxy koruzo. Njegovo prvo opažanje je bilo, da je ta nova sorta koruze veliko bolj lepljiva od drugih sort. Kasneje so waxy koruzo našli tudi v drugih mestih v Aziji. Pri Kitajski waxy koruzi je bilo opaziti veliko genetske raznolikosti. Vsaj 767 različnih primerkov je bilo najdenih na Kitajskem. Večina od njih (525) je bila zbranih iz provinc Yunnan in Guangxi. Provinca Yunnan je izvorno območje številnih pomembnih rastlin in ima najbogatejšo število rastlinskih vrst na Kitajskem. Prav tam so leta 1970 raziskovalci našli lokalno sorto imenovano 'Four-row Wax'. 'Four-row Wax' je primitivna sorta, z mnogimi podobnimi znaki kot pri divjih nekultiviranih vrstah. Lokalna manjšina Dai jo je gojila v provinci že od leta 1890. Številne študije so pokazale, da kitajska waxy koruza izvira iz Yunnan-Guangxi regije. Po podatkih Inštituta za genske vire poljščin, ki deluje pod okriljem Kitajske Akademije kmetijskih znanosti, je sorta 'Four-row Wax' skupaj z drugimi tipičnimi domačimi sortami, kot so Yishannuo, Qiaojiabainuo in druge, iz Yunnan-Guangxi regije, pomemben genski material za evolucijske študije o kitajski waxy koruzi (Fan in sod., 2008).



Slika 4: 'Four-row Wax', tipična domača sorta Kitajske waxy koruze izbrane iz Yunnan province na Kitajskem (Fan in sod., 2008).

Pri sirku (*Sorghum bicolor* L. Moench) Pedersen in sod. (2005) navajajo, da je waxy fenotip opisan že od leta 1933. Na to temo se opravljajo številne študije, ki bodo v prihodnosti dale zanimive rezultate o novih kultivarjih z waxy lastnostjo in o njihovem izvoru. Pri navadni pšenici (*Triticum aestivum* L.) so naravne mutacije, ki vodijo v waxy lastnost, zaradi njenega heksaploidnega genoma manj verjetne. Tako so Nakamura in sodelavci leta 1995 bili prvi, ki so s tradicionalnimi tehnikami križanja dobili prvo waxy pšenico. Prav tako so vzgojili waxy durum pšenico (Graybosch, 1998). Isto leto so Denyer in sod. (1995) poročali, da so pri grahu izolirali mutante, ki imajo nizko vsebnost amiloze v škrobu. Dve leti zatem so Kiribuchi-Otobe in sod. (1997) objavili, da so vzgojili novo waxy heksaploidno pšenico. V tem obdobju so znanstveniki razvili tudi nove linije waxy durum pšenice (Vignaux in sod., 2004). Naslednje leto so Nakayama s sod. (1998) poročali o razlikah v vsebnosti amiloze v baru [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]. Populacije bara z waxy endospermom gojijo predvsem v vzhodni Aziji in celinskemu delu jugovzhodne Azije (Fukunaga in sod., 2002). Verjetno se je razvil iz ne-waxy tipa po domestifikaciji. Divji prednik (*S.italica* ssp. *viridis*) ima ne-waxy oz. navaden endosperm. Tako je verjetno alel za nizko vsebnost amiloze nastal z mutacijo *Wx* alela divjega prednika (Kawase in sod., 2005). Leta 2001 so raziskovalci v italijanski populaciji odkrili en genotip vrste *Triticum dicoccum*, ki nosi ničelni alel na *Wx-A1* lokusu (Boggini in sod., 2001). Tri leta zatem so Verhoeven in sodelavci (2004) poročali, da so pri diploidnem ovsu (*Avena strigosa* Schreb.) prvi našli dva nizko amilozna mutanta s podobnimi lastnostmi kot druga waxy žita. Leta 2009 je Gregori (2009) poročala, da so bili prvi, ki so pri rastlinah navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) cv. Siva našli waxy mutante. S šestletno usmerjeno selekcijo in s tehniko obarvanja z jodovico, so našli rastline ajde cv. Siva, ki so kazale nizkoamilozne lastnosti. Glede na rezultate raziskave trdijo, da se s selekcijo lahko

razvijejo nove linije ajde cv. Siva, ki imajo zmanjšan delež skupne amiloze v endospermu. V letošnjem letu pa so Guzmán in sodelavci (2012) na molekulski ravni našli nov *waxy* alel v španskih linijah pire, ki je odgovoren za pomanjkanje amiloze v škrobu endosperma.

5 LASTNOSTI WAXY GENA

Waxy fenotip je značilen za rastline, ki imajo škrob z malo ali nič amiloze. Do tega privede pomanjkanje ali inaktivacija proteina GBSSI (Pedersen in sod., 2005). GBSSI (granule-bound starch synthase I) ali waxy encim deluje v procesu sinteze škroba. Odgovoren je za sintezo amiloze in je prav tako vključen v oblikovanje končne strukture molekule amilopektina (Mérida in sod., 1999). Obstaja več GBSSI oblik t.i. izooblik v rastlini. Ena od GBSSI izooblik se nahaja izključno v škrobnem zrnju. Verhoeven in sod. (2004) navajajo, da je pri žitih en GBSSI protein izražen v endospermu in zrnih cvetnega prahu, eden ali več ostalih GBSSI proteinov pa je izraženih v drugih organih rastline. Waxy žita imajo pomanjkanje amiloze ali so brez amiloze v škrobu le v endospermu in cvetnem prahu, medtem ko je v drugih organih, kot so listi, korenine, steblo in perikarp, škrob normalen in vsebuje običajno razmerje amiloze in amilopektina. Na delovanje encima GBSSI vplivajo mutacije na genih, ki kodirajo zapis za GBSSI izooblike, v žitih na *waxy* lokusu (Patron in sod., 2002; Hylton in sod., 1996). Dominantni waxy alel (*Wx*) vpliva na vsebnost amiloze, ki je navadno večja od 10 %. Recesiven waxy alel (*wx*) pa povzroča voskasti fenotip, pri katerem škrob ne vsebuje nič amiloze ali pa nekaj nad 0 % (Fukunaga in sod., 2002).

Waxy gen je bil izoliran pri mnogih različnih rastlinskih vrstah. Našli so ga v naslednjih vrstah žit: navadni pšenici (Nakamura in sod., 1995), durum pšenici (Vignaux in sod., 2004.), rižu (Olsen in Purugganan, 2002), ječmenu (Domon in sod., 2002), baru ali laškemu muhviču (Nakayama in sod., 1998), prosu (Graybosch in Baltensperger, 2009), sirku (Pedersen in sod., 2005), ovsu (Verhoeven in sod., 2004) in koruzi (Eriksson, 1969). Waxy lastnost je bila odkrita tudi pri krompirju (Flipse in sod., 1996), grahu (Denyer in sod., 1995), rastlini Jobove solze (*Coix lacryma-jobi*) in amarantu (*Amaranthus hypochondriacus*).

5.1 WAXY GEN PRI RASTLINAH

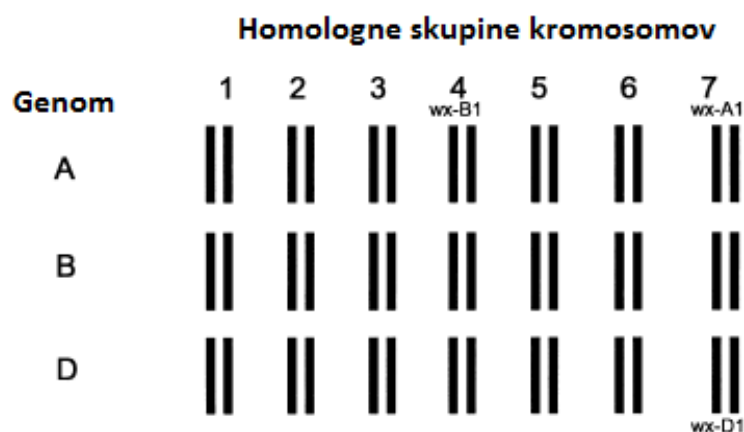
Pri koruzi (*Zea mays* L.) je za waxy endosperem odgovoren recesivni gen (*wx*), ki je na kromosomu 9 (Fan in sod., 2008). Bao in sod. (2012) navajajo, da sta bila odkrita dva *wx* alela: *wx-D7* in *wx-D10*. Strukturne analize alelov so pokazale pomembno vlogo DNA insercij in delecij pri spontanah *wx* mutacijah (Huang in sod., 2010). Ker je waxy mutacija zelo dobro vidna in prepoznavna v fenotipu koruze, je bila ta tema eden glavnih predmetov genetskih raziskav v zadnjem stoletju pri koruzi. DNA zaporedje *waxy* lokusa pri gojeni koruzi, je bilo določeno že pred dvajsetimi leti. Sestavljen je iz 14 eksonov in 13 intronov (Slika 5). V zadnjih študijah so bila v številnih *Zea* linijah tudi določena zaporedja na *waxy* lokusu (Fan in sod., 2008). Huang in sod. (2010) navajajo, da so bile na *waxy* lokusu

koruze opažene višje stopnje genetske raznolikosti v primerjavi z rižem. Insercije in delecije se na *waxy* lokusu koruze pojavljajo pogosto in se tako lahko tudi uporabljajo kot zelo informativni genski markerji. Rezultati njihove raziskave tudi kažejo, da ima Kitajska *waxy* korusa unikatne tipe mutantov, mehanizme mutacij in edinstveno pot evolucije.



Slika 5: Struktura *waxy* gena pri koruzi. Škatlice predstavljajo eksone označene od 1 do 14, od 5' do 3' konca. Črte med eksoni pa predstavljajo introne (13) (Fan in sod., 2008; Huang in sod., 2010).

Navadna pšenica (*Triticum aestivum* L.) je aloheksaploid in ima tri skoraj identične sete kromosomov podedovanih od treh diploidnih prednikov: A, B in D genome. Kromosomi so znotraj teh treh genomov razdeljeni v sedem homolognih skupin.



Slika 6: Organizacija kromosomov pri navadni pšenici (*Triticum aestivum* L.) in prikaz *waxy* lokusov (Graybosch, 1998).

Waxy lokusi, na katerih so geni, ki kodirajo zapis za GBSSI, se nahajajo na kromosomih 7A (*wx-A1*), 4A (*wx-B1*) in 7D (*wx-D1*). Lokus *wx-B1* se je prvotno nahajal na kromosomu 7B, vendar se je med evolucijo pšenice zgodila recipročna translokacija, kar je vodilo v izmenjavo genetskega materiala med kromosomoma 7B in 4A. Tako se lokus še vedno imenuje *wx-B1*, kljub temu da je na kromosomu A. Prisotnost enega ali dveh ničelnih, nedelujočih *waxy* alelov vpliva na zmanjšano sintezo amiloze. Take rastline so dobile poimenovanje 'partial waxy' oz. 'delni waxy', in so tudi bolj pogoste. Pšenica s tremi ničelnimi *waxy* aleli se imenuje waxy pšenica. Leta 1995 so bili Nakamura in sodelavci prvi, ki so s tradicionalnimi tehnikami hibridizacije dobili prvo *waxy* pšenico. Prvo *waxy* heksaploidno pšenico so dobili s križanjem 'delnih waxy' mutantov, Japonske sorte Kanto 107 in Kitajske sorte Bai-Huo. Kanto 107 je sorta pšenice z zmanjšano vsebnostjo amiloze,

ki ima ničelne alele na dveh (*wx-A1* in *wx-B1*) od treh *wx* lokusov. Bai-Huo pa ima en ničelen alel na D1 *waxy* lokusu (*wx-D1*). Tako so s križanjem dveh 'delno waxy' pšenice ustvarili novo, ne-amilozno linijo waxy pšenice (Graybosch, 1998; Yoo in Jane, 2002).

Fujita in sodelavci (2001) navajajo, da jim je uspelo vzgojiti waxy mutanta iz diploidne pšenice (*Triticum monococcum* L.). Semena *Triticum monococcum* var. *flavescens* so bila tretirana z 1% mutageno snovjo EMS (ethyl methanesulfonate). Izmed semen mutiranih rastlin so s tehniko obarvanja z jodovico izbrali tista, ki so kazala manjšo vsebnost amiloze oziroma so se obarvala rjavo rdeče. Ta semena so bila nato uporabljena v poskusih, s katerimi so potrdili, da so izolirali waxy mutanta iz diploidne pšenice (*Triticum monococcum* L.). Ugotovili so, da je ta mutant nadzorovan z enim samim *waxy* genom in nima popolnoma nič amiloze.

Durum pšenico (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) sestavljata le A in B genoma (Graybosch, 1998). Pri durum pšenici sta prisotna dva waxy proteina GBSSI in se nahajata na *wx-A1* ter *wx-B1* lokusu (Monari in sod., 2005), ki sta na kromosomu 7A in 4A (Sharma in sod., 2002). Waxy durum pšenico so vzgojili že Nakamura in sod. leta 1995. Razvoj novih waxy linij durum pšenice pa poteka od leta 1997 na Univerzi Severne Dakote. Njihov dolgoročni cilj je razviti waxy in delno waxy kultivarje durum pšenice, ki bodo prilagojeni na okolje v Severni Dakoti. Nove linije waxy durum pšenice so dobili z vnosom *waxy* genov. Kultivar delno waxy heksaploidne pšenice Ike je bil donor *waxy* genov. Križali so ga s sorto durum pšenice Ben in tako dobili waxy durum F2 linijo. Nato so opravili povratno križanje s kultivarjem Ben durum pšenice, da so vnesli starševske gene. S fenotipsko selekcijo, ki je temeljila na obarvanju cvetnega prahu in polovičk zrnja z jodovico, so dokončno določili waxy rastline in heterozigotne linije, ki so vsebovale *wx* alele. Nove waxy in delno waxy rastline durum pšenice so potrdili z uporabo genskih markerjev (Vignaux in sod., 2004).

Guzmán in sodelavci (2012) navajajo, da so na molekularni ravni našli nov waxy *Wx-A1* alel (*Wx-A1g* prej znan kot *-Wx-A1a*) v španskih linijah pire (*Triticum spelta* L.), ki je odgovoren za pomanjkanje *Wx-A1* proteina v endospermu. Opisana mutacija ni povezana z najdenimi *Wx-A1* mutacijami, ki so bile odkrite prej pri pšenici in durum pšenici. Lahko pa najdba opisane mutacije pomaga pri novih raziskavah koncentracije amiloze v pšenici ali vzgoji nove pšenice z manjšo vsebnostjo amiloze.

Pri rižu (*Oryza sativa* L.) je glutinasti fenotip kontroliran s strani enega recesivnega *wx* gena (Mikami in sod., 1999), ki se nahaja na kromosomu 6 (Lin in sod., 2011). Lokus na tem genu je odgovoren za videz, izgled zrnja in tudi za vsebnost amiloze v endospermu med ne-waxy linijami riža. Odkrita sta bila dva alela: *Wx^a* in *Wx^b* (Mikami in sod., 1999). Han in sod. (2004) navajajo, da alel *Wx^a* drastično poveča stopnjo GBSSI, kar vodi v visoko amilozna zrna. Alel *Wx^b* pa vpliva na zmanjšano sintezo amiloze. Alel *Wx^a* je v glavnem prisoten v *O. sativa indica* rižu, medtem ko je alel *Wx^b* prevladujoč v *O. sativa japonica* rižu. Znanstveniki so na molekularni ravni ugotovili, da je razlika v vsebnosti amiloze v zrnju posledica post-transkripcijske ureditve *Wx* alela. Kultivarji z visoko vsebnostjo amiloze so razširjeni predvsem v južni Aziji, medtem ko so nizko amilozne sorte bolj značilne v vzhodni Aziji (Olsen in Purugganan, 2002). Obstajajo tudi vrste 'tropical japonica' ali 'javanica', ki predstavljajo večino sort, ki rastejo na jugu ZDA. Ti kultivarji so,

glede na vsebnost amiloze, med visoko amiloznim *indicas* in nizko amiloznimi *japonicas* kultivarji. Fenotip dolgozrnatega kuhanega riža pa je podoben visoko amiloznim sortam (Larkin in sod., 2003). Obstaja tudi kultivar z motnim-neprosojnim (opaque) endospermom v zrnju riža, ki je bil prvič najden v Nepal. Za to naravno mutacijo je odgovoren alel na *Wx* genu. Zrnje z motnim endospermom ima enak izgled kot waxy zrnje, toda vseeno vsebuje ~10 % amiloze. Podobne kultivarje z motnim endospermom so našli tudi v Indiji, Mjanmaru in Indoneziji (Mikami in sod., 1999).

Pri avtohtonih sortah waxy ječmena iz Japonske, so na *waxy* lokusu, ki je na kromosomu 1, našli alel *glx1a*, ki je odgovoren za zmanjšano vsebnost amiloze (Domon in sod., 2002). Posebnost waxy mutantov pri ječmenu je, da imajo waxy rastline med 0 % in 13 % amiloze v škrobu, medtem ko imajo waxy kultivarji drugih vrst med 0,4 % in 9 % amiloze v škrobu (Patron in sod., 2002).

Denyer in sod. (1995) navajajo, da so pri grahu (*Pisum sativum* L.) izolirali mutante z nizko vsebnostjo amiloze v škrobu. Recesivna mutacija na lokusu *lam*, vpliva na 59 kDa veliko GBSSI, ki je zaradi te mutacije odsotna ali je njena prisotnost močno zmanjšana.

Pri krompirju (*Solanum tuberosum* L.) so z obsevanjem monohaplida z rentgenskimi žarki, izolirali brez amiloznega mutanta. Mutacija je monogenska in recesivna. Posledica je, da mu v škrobnih zrnih primankuje encima GBSSI. Breamilozni fenotip *amf* lokusa je rezultat točkovne mutacije, pri kateri se je zgodila delecija enega baznega para na strukturnem genu, ki kodira zapis za protein GBSSI. Razlika v sestavi škroba je zelo lepo vidna, ko škrob obarvamo z jodovico. Škrob *amf* mutanta se obarva rdeče, medtem ko se običajni škrob obarva modro (Flipse in sod., 1996).

Proso (*Panicum miliaceum* L.) je opisano kot alotetraploid. Presentljiva je duplikatna narava waxy lokusa, saj je v teh vrstah skoraj nepričakovana. Ugotovljeno je bilo, da je waxy lastnost pod kontrolo duplikatnih recesivnih alelov *wx-1* in *wx-2*, ki se nahajata na dveh lokusih. Waxy mutanti pri prosu vsebujejo le 3,5 % amiloze v škrobu zrnja (Graybosch in Baltensperger, 2009).

Pri diploidnem ovsu (*Avena strigosa* Schreb.) so Verhoeven in sodelavci (2004) prvi našli dva nizko amilozna mutanta, *lam-1* in *lam-2*, ki kažeta podobne lastnosti kot druga waxy žita. Genetske študije kažejo, da bi združevanje obstoječih linij z različnimi ničelnimi aleli za GBSSI, lahko vodilo do heksaploidnega waxy ovsa. Medtem pa so lahko škrob, moka in zrnje diploidnih nizko amiloznih mutantov pri ovsu uporabni pri testiranju morebitne industrijske aplikacije waxy ovsa na splošno.

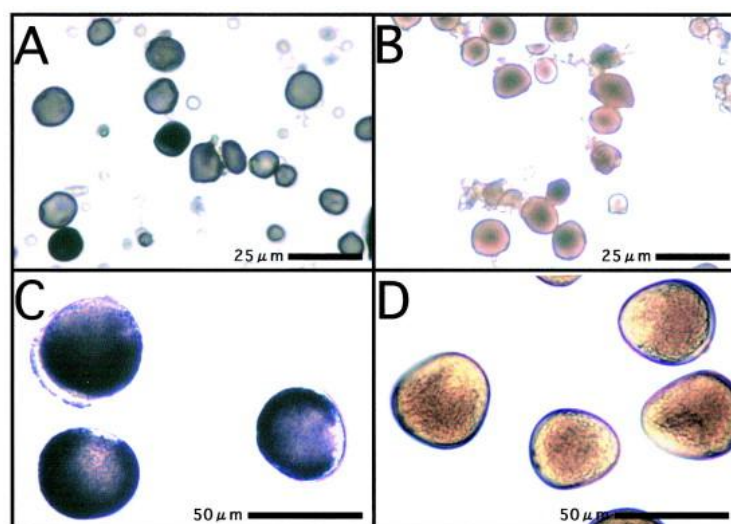
Pri baru [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.] so Nakayama in sod. (1998) poročali o razlikah v vsebnosti amiloze. Njihova genetska analiza je opredelila tri tipe alelov: ne-waxy (17,0-31,9 %), nizko amilozni (7,8-16,0 %) in waxy tip (0 do 3,5 %).

Pedersen in sod. (2005) navajajo, da je pri sirku (*Sorghum bicolor* L. Moench) za waxy lastnost odgovoren en *wx* alel. V raziskavi pa so našli dva izrazito različna waxy alela. Waxy GBSSI- alel, ki vpliva na odsotnost GBSSI, so poimenovali wx^a ; waxy GBSSI+ alel, ki vpliva na prisotnost proteina GBSSI, ta pa je neaktiven, pa se imenuje wx^b . Ta dva alela

sta na *waxy* lokusu zelo blizu skupaj. Alel wx^b je dominanten nad alelom wx^a v smislu GBSSI sinteze. Oba pa sta recesivna v primerjavi z navadnimi tipi sirka (*Wx*), glede vsebnosti amiloze.

5.2 NAČIN DOLOČANJA WAXY GENA V RASTLINAH

Ali rastline nosijo *waxy* lastnost ali ne, lahko določimo s preprosto tehniko obarvanja pelodnih ali škrobnih zrn z jodovico ($KI-I_2$ raztopino). Pelodna ali škrobna zrna običajnih, ne-*waxy* (*Wx*) rastlin, ki vsebujejo običajno koncentracijo amiloze v škrobu, se obarvajo s temno modro črno bravo. Škrob nizkoamiloznih *waxy* (*wx*) rastlin se obarva rdeče rjavo (Graybosch, 1998). Rastline, ki so heterozigotne za *waxy* gen (*Wx, wx*), pa se obarvajo v obeh odtenkih. Polovica pelodnih zrn se obarva temno modro črno, polovica pa rdeče rjavo (Eriksson, 1962). Tako lahko že v začetku cvetenja izločimo rastline, ki ne kažejo nizkoamiloznih lastnosti.



Slika 7: Prikaz obarvanosti škrobnih zrn s $KI-I_2$ raztopino navadnih (A, C) in *waxy* (B, D) rastlin diploidne pšenice (*Triticum monococcum* L.) (Fujita in sod., 2001).

6 ZAKLJUČEK

Waxy rastline so na območju držav Azije že dolgo znane. *Waxy* gen vpliva na sestavo škroba, ki je spremenjen in lahko vsebuje samo amilopektin in nič amiloze ali pa je delež amiloze blizu 0 %. To vpliva na njegove fizikalne, kemične in strukturne lastnosti. Ker je škrob prevladujoča sestavina v sestavi semen pri žitih in drugih rastlinah, ima pomembno vlogo pri kvaliteti, izgledu in strukturi prehranskih izdelkov. Lepljiv fenotip waxy škroba je tradicionalno zelo priljubljen pri kulturah na območju Azije. Zato je tam razširjeno raziskovanje vpliva waxy škroba za njihovo prehrano. Pomembno je, da bi se v prihodnosti njegova uporaba razširila tudi na druge dele sveta. Ljudem bi se moralo približali waxy rastline in predstaviti njihove lastnosti, tako bi se povečala njihova pridelava in njihova uporaba v prehrani.

7 VIRI

- Bao J., Yao J., Zhu J., Hu W., Cai D., Li Y., Shu Q., Fan L. 2012. Identification of glutinous maize landraces and inbred lines with altered transcription of *waxy* gene. *Molecular Breeding*, http://ibi.zju.edu.cn/bioinplant/Publication/Bao_MolBreed_2012.pdf (11.09.2012)
- Boggini G., Cattaneo M., Paganoni C., Vaccino P. 2001. Genetic variation for waxy proteins and starch properties in Italian wheat germplasm. *Euphytica*, 119: 111-114
- Denyer K., Barber L. M., Burton R., Hedley C. L., Hylton C. M., Johnson S., Jones D. A., Marshall J., Smith A. M., Tatge H., Tomlinson K., Wang T. L. 1995. The isolation and characterization of novel low-amylose mutants of *Pisum sativum* L.. *Plant, Cell and Environment*, 18: 1-8
- Domon E., Fujita M., Ishikawa N. 2002. The insertion/deletion polymorphisms in the waxy gene of barley genetic resources from East Asia. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 132-138
- Enes P., Panserat S., Kaushik S., Oliva-Teles A. 2006. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 143: 89-96
- Eriksson G. 1969. The waxy character. *Here*, 63, 7: 180-204
- Eriksson G. 1962. Radiation induced reversions of a waxy allele in barley. *Radiation Botany*, 2: 35-39
- Fan L., Quan L., Leng X., Guo X., Hu W., Ruan S., Ma H., Zeng M. 2008. Molecular evidence for post-domestication selection in the *Waxy* gene of Chinese waxy maize. *Molecular Breeding*, 22: 329-338
- Flipse E., Keetels C. J. A. M., Jacobsen E., Visser R. G. F. 1996. The dosage effect of the wildtype GBSS allele is linear for GBSS activity but not for amylose content: absence of amylose has a distinct influence on the physico-chemical properties of starch. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 121-127
- Fujita N., Hasegawa H., Taira T. 2001. The isolation and characterization of a *waxy* mutant of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). *Plant Science*, 160: 595-602
- Fukunaga K., Kawase M., Kato K. 2002. Structural variation in the *Waxy* gene and differentiation in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]: implications for multiple origins of the waxy phenotype. *Molecular Genetics and Genomics*, 268: 214-222
- Graybosch R. A. 1998. Waxy wheats: Origin, properties and prospects. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 135-142

- Graybosch R. A., Baltensperger D. D. 2009. Evaluation of the waxy endosperm trait in proso millet (*Panicum miliaceum*). *Plant Breeding*, 128: 70-73
- Gregori M. 2009. Pleiotropni vpliv gena za sintezo škroba pri ajdi (*Fagopyrum esculentum* Moench), doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 89 str.
- Guzmán C., Caballero L., Yamamori M., Alvarez J. B. 2012. Molecular characterization of a new *waxy* allele with partial expression in spelt wheat. *Planta*, 235: 1331-1339
- Han Y., Xu M., Liu X., Yan C., Korban S. S., Chen X., Gu M. 2004. Genes coding for starch branching enzymes are major contributors to starch viscosity characteristics in waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 166: 357-364
- Hoover R., Ratnayake W. S. 2001. Determination of total amylose content of starch. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, E2.3.1-E2.3.5
- Hu G., Burton C., Yang C. 2010. Efficient measurement of amylose content in cereal grains. *Journal of Cereal Science*, 51: 35-40
- Huang B., Tian M., Zhang J., Huang Y. 2010. *Waxy* locus and its mutant types in maize *Zea mays* L.. *Agricultural Sciences in China*, 9, 1: 1-10
- Hung P. V., Maeda T., Morita N. 2006. Waxy and high-amylose wheat starches and flours-characteristics, functionality and application. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 448-456
- Hylton C. M., Denyer K., Keeling P. L., Chang M., Smith A. M. 1996. The effect of *waxy* mutations on the granule-bound starch synthases of barley and maize endosperms. *Planta*, 198: 230-237
- Kawase M., Fukunaga K., Kato K. 2005. Diverse origins of waxy foxtail millet crops in East and Southeast Asia mediated by multiple transposable element insertions. *Molecular Genetics and Genomics*, 274: 131-140
- Kiribuchi-Otobe C., Nagamine T., Yanagisawa T., Ohnishi M., Yamaguchi I. 1997. Production of hexaploid wheats with waxy endosperm character. *Cereal Chemistry*, 74, 1: 72-74
- Kulpers A. G. J., Jacobsen E., Visser R. G. F. 1994. Formation and deposition of amylose in the potato tuber starch granule are affected by the reduction of granule-bound starch synthase gene expression. *The Plant Cell*, 6: 43-52
- Larkin P. D., McClung A. M., Ayres N. M., Park W. D. 2003. The effect of the *Waxy* locus (Granule Bound Starch Synthase) on pasting curve characteristics in specialty rices (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 131: 243-253

- Lin J., Singh H., Chang Y., Chang Y. 2011. Factor analysis of the functional properties of rice flours from mutant genotypes. *Food Chemistry*, 126: 1108-1114
- Ma J., Jiang Q., Wei Y., Andre L., Lu Z., Chen G., Liu Y., Zheng Y. 2010. Molecular characterization and comparative analysis of two *waxy* alleles in barley. *Genes and Genomics*, 32: 513-520
- Mahmood T., Turner M. A., Stoddard F. L. 2007. Comparison of methods for colorimetric amylase determination in cereal grains. *Starch/Stärke*, 59: 357-365
- Martin C., Smith A. M. 1995. Starch biosynthesis. *The Plant Cell*, 7: 971-985
- Mérida A., Rodríguez-Galán J. M., Vincent C., Romero J. M. 1999. Expression of the granule-bound starch synthase I (*waxy*) gene from snapdragon is developmentally and circadian clock regulated. *Plant Physiology*, 120: 401-409
- Mikami I., Aikawa M., Hirano H., Sano Y. 1999. Altered tissue-specific expression at the *Wx* gene of the opaque mutants in rice. *Euphytica*, 105: 91-97
- Miura H., Tanii S. 1994. Endosperm starch properties in several wheat cultivars preferred for Japanese noodles. *Euphytica*, 72: 171-175
- Monari A. M., Simeone M. C., Urbano M., Margiotta B., Lafiandra D. 2005. Molecular characterization of new waxy mutants identified in bread and durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 1481-1489
- Moore R., Clark D., Vodopich D. 1998. Botany visual resource library. <http://www.mhhe.com/biosci/pae/botany/uno/graphics/uno01pob/vrl/> (4.07.2012)
- Nakamura T., Yamamori M., Hirano H., Hidaka S., Nagamine T. 1995. Production of waxy (amylose-free) wheats. *Molecular Genetics and Genomics*, 248: 253-259
- Nakayama H., Afzal M., Okuno K. 1998. Intraspecific differentiation and geographical distribution of *Wx* alleles for low amylose content in endosperm of foxtail millet, *Setaria italica* (L.) Beauv.. *Euphytica*, 102: 289-293
- Olsen K. M., Purugganan M. D. 2002. Molecular evidence on the origin and evolution of glutinous rice. *Genetics*, 162: 941-950
- Patron N. J., Smith A. M., Fahy B. F., Hylton C. M., Naldrett M. J., Rossnagel B. G., Denyer K. 2002. The altered pattern of amylose accumulation in the endosperm of low-amylose barley cultivars is attributable to a single mutant allele of granule-bound starch synthase I with a deletion in the 5'-non-coding region. *Plant Physiology*, 130: 190-198

Pedersen J. F., Bean S. R., Graybosch R. A., Park S. H., Tilley M. 2005. Characterization of waxy grain sorghum lines in relation to granule-bound starch synthase. *Euphytica*, 144: 151-156

Persson G., Ståhl Å., Johansson L. Å., Johansson H. 1996. Korn som stärkelseråvara för livsmedelsindustrin. *Sveriges Utsädesförenings Tidskrift*, 3: 79-86

Sharma R., Sissons M. J., Rathjen A. J., Jenner C. F. 2002. The null-4A allele at the *waxy* locus in durum wheat affects pasta cooking quality. *Journal of Cereal Science*, 35: 287-297

Smith A. M., Denyer K., Zeeman S. C., Edwards A., Martin C. 1999. The synthesis of the starch granule. *Plant Carbohydrate Biochemistry*, 7: 79-89

Smith J. 2009. Waxy maize review.

<http://ezinearticles.com/?Waxy-Maize-Review&id=2220602> (23.07.2012)

Škrabanja V. 2005. Genetske in biotehnoške osnove kakovosti škroba v rastlinskih pridelkih in živilih. *Acta agriculturae Slovenica*, 85, 2: 419-427

Verhoeven T., Fahy B., Leggett M., Moates G., Denyer K. 2004. Isolation and characterization of novel starch mutants of oats. *Journal of Cereal Science*, 40: 69-79

Vignaux N., Doehlert D. C., Hegstad J., Elias E. M., McMullen M. S., Grant L. A., Kianian S. F. 2004. Grain quality characteristics and milling performance of full and partial waxy durum lines. *Cereal Chemistry*, 81, 3: 377-383

Waxy maize guide. 2012. Bodybuilding.

<http://www.bodybuilding.com/store/waxymaize.html> (23.07.2012)

Yoo S., Jane J. 2002. Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches. *Carbohydrate Polymers*, 49: 297-305

ZAHVALA

Za strokovne nasvete, pomoč in razumevanje se zahvaljujem mentorju akademiku prof. dr. Ivanu Kreftu in recenzentki prof. dr. Zlati Luthar.

Za vsestransko pomoč in podporo med študijem ter pri pisanju diplomskega projekta se iz srca zahvaljujem partnerju Markotu, prijateljici Jurki in svoji družini.