

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Sabina LEVAČIĆ

**POLIMORFIZEM BELJAKOVIN ENDOSPERMA PRI
TATARSKI AJDI (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Sabina LEVAČIĆ

**POLIMORFIZEM BELJAKOVIN ENDOSPERMA PRI TATARSKI
AJDI (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**ENDOSPERM PROTEIN POLYMORPHISM IN THE
TARTARY BUCKWHEAT (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana 2010

Diplomsko delo je zaključek visokošolskega strokovnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo in fiziologijo rastlin Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so se shranjevali materiali in podatki, ter na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer je v laboratoriju potekala elektroforeza. Setev in poskus je bil izveden na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete (Oddelek za agronomijo).

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. Ivana KREFTA in za somentorico doc. dr. Mateja GERM.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc BATIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Mateja GERM
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora:

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

Sabina LEVAČIĆ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
DK UDK 633.12:631.527:543.545 (043.2)
KG ajda/beljakovine/endosperm/polimorfizem/SDS-PAGE/elektroforeza/
KK AGRIS F30
AV LEVAČIĆ, Sabina
SA KREFT, Ivan (mentor)/GERM, Mateja (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2010
IN POLIMORFIZEM BELJAKOVIN ENDOSPERMA PRI TATARSKI AJDI
(*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)
TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP IX, 19 str., 12 pregl., 27 sl., 12 vir.
IJ sl
JI sl/en
- AL S pomočjo SDS-PAGE elektroforeze smo poskušali ugotoviti, ali prihaja do razlik samo v intenzivnosti elektroforeznih črt. Iz rezultatov sl. 3 je razvidno tudi odsotnost elektroforezne črte, tekom rastne dobe tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). Ugotovili smo, da so v določenih rastnih stadijih elektroforezne črte bolj izrazite, predvsem takrat, ko ajda še nima nastavkov za cvet, ko je v polnem cvetenju in ko se oblikujejo semena. Z rezultati elektroforeze sovpadajo datumi merjenja listov, saj so v času polnega cvetenja listi občutno manjši, v širino 5,4 cm ter v dolžino 5,3 cm. Kot pa teden prej, ko so v širino merili 8,3 cm in v dolžino 7,7 cm ko je bila ajda na začetku cvetenja. Pri merjenju listov smo ugotovili, da so na koncu rastne dobe listi za skoraj polovico manjši, kot pa v svoji največji velikosti, ko je ajda komaj začela cveteti. Z metodo SDS-PAGE beljakovin endosperma smo dokazali, da se lahko razlikuje intenzivnost obarvanja in odsotnosti elektroforeznih črt preko rastne dobe. Dokazali smo tudi, da lahko z metodo SDS-PAGE elektroforeze ločimo beljakovine v listih tatarske ajde.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Vs
DC UDC 633.12:577.2:543.545 (043.2)
CX Buckwheat/proteins/endosperm/polymorphism/SDS-PAGE/electrophoresis
CC AGRIS F30
AU LEVAČIĆ, Sabina
AA KREFT, Ivan (supervisor)/ GERM, Mateja (co – supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2010
TI ENDOSPERM PROTEIN POLYMORPHISM IN THE TARTARY
BUCKWHEAT (*Fagopyrum tataricum* Gaertn)
DT Graduation thesis (Higher professional studies)
NO IX, 19 p., 12 tab., 27 fig., 12 ref.
LA sl
AL sl/en
- AB We made an attempt with use of SDS-PAGE analyses to find out if there is the difference only in intensity bands. The results on Figure 3 showed absence of electrophoretical line in the growth period of *Fagopyrum tataricum* Gaertn. The intensity of the bands depend of the growth period of the plants. We find out that more intensive bends appear at the time before the buds formation, between full blooming and at the time of the seeds formation. The analytical results are in coincidence with the leaf's size. Correlation between dates of leaves changing and electrophoretical results exist. In the time of full blooming the leaves are considerable smaller (5,5 cm wide and 5,3 cm long) as one week before. At the beginning of blooming the leaves are 7,7 cm long and 8,3 cm wide. At the end of the growth period the leaves are approximately half size comparing to the size at the beginning of the blooming. The capability of SDS-PAGE method to separate the endosperm proteins was well known. This work demonstrates the applicability of the electrophoresis to separate buckwheat's proteins. As well the correlation between intensity of the bands and plant's samples growth periods is studied.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	str. II
Key words documentation	III
Kazalo vsebine	IV
Kazalo preglednic	V
Kazalo slik	VI
Okrajšave in simboli	VIII
Pojmovnik	IX
1 UVOD	1
1.1 POVOD	1
1.2 HIPOTEZA	1
1.3 CILJ	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 OPIS AJDE	2
2.2 UPORABA	3
2.2.1 Uporaba v ljudskem zdravilstvu	3
2.3 KEMIČNA SESTAVA	4
2.4 LOČEVANJE BELJAKOVIN ZRN AJDE S POMOČJO ELEKTROFOREZE	4
3 MATERIALI IN METODE DE LA	5
3.1 DELO NA POLJU	5
3.2 DELO V LABORATORIJU	5
3.2.1 Opis listov	5
3.2.2 SDS-PAGE elektroforeza	6
3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	7
4 REZULTATI	8
4.1 BELJAKOVINE ENDOSPERMA V LISTIH TATARSKE AJDE	8
4.2 REZULTATI MERJENJA LISTOV	9
4.3 OPISI LISTOV	10
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	17
6 POVZETEK	18
7 VIRI	19
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Priprava 10 % T separacijskega gela (Laemmli, 1970).	6
Pregl. 2: Priprava koncentracijskega gela (Laemmli, 1970).	7
Pregl. 3: Sestava in molekulske mase molekulskega standarda širokega spektra SigmaMarker™ M 4038 (M.W. 6.500-205.000).	7
Pregl. 4: Podatki merjenja listov.	11
Pregl. 5: Podatki merjenja listov.	11
Pregl. 6: Podatki merjenja listov.	12
Pregl. 7: Podatki merjenja listov.	13
Pregl. 8: Podatki merjenja listov.	13
Pregl. 9: Podatki merjenja listov.	14
Pregl. 10: Podatki merjenja listov.	15
Pregl. 11: Podatki merjenja listov.	15
Pregl. 12: Podatki merjenja listov.	16

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Ajda (<i>Fagopyrum tataricum</i> Gaertn.)	1
Sl. 2: SDS–PAGE elektroforeza. Molekule se v poliakrilamidnem gelu ločijo po velikosti.	6
Sl. 3: SDS-PAGE elektroferogram beljakovin endosperma v listih tatarske ajde	8
Sl. 4: Povprečna dolžina in širina listov glede na rastno dobo	9
Sl. 5: Povprečna teža listov glede na rastno dobo	9
Sl 6: Herbarij 03.06.2008	10
Sl 7: Ajda 03.06.2008	10
Sl 8: Herbarij 10.06.2008	10
Sl 9: Ajda 10.06.2008	10
Sl 10: Herbarij 19.06.2008	11
Sl 11: Ajda 19.06.2008	11
Sl 12: Herbarij 27.06.2008	12
Sl 13: Ajda 27.06.2008	12
Sl 14: Herbarij 7.07.2008	12
Sl 15: Ajda 7.07.2008	12
Sl 16: Herbarij 16.07.2008	13
Sl 17: Ajda 16.07.2008	13
Sl 18: Herbarij 23.07.2008	14
Sl 19: Ajda 23.07.2008	14
Sl 20: Herbarij 30.07.2008	14
Sl 21: Ajda 30.07.2008	14

SI 22: Herbarij 4.08.2008	str. 15
SI 23: Ajda 4.08.2008	15
SI 24: Herbarij 13.08.2008	16
SI 25: Ajda 13.08.2008	16
SI 26: Herbarij 20.08.2008	16
SI 27: Ajda 20.08.2008	16

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

SDS-PAGE: Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z dodatkom natrijevega dodecilsulfata.

SDS: Lavril sulfat.

d.: Dolžina lista tatarske ajde.

š.: Širina lista tatarske ajde.

POJMOVNIK

- Amilaza:** je encim, ki pospešuje razkroj škroba v sladkor.
- Amiloza:** je polisaharid sestavljen iz α -D glukoze.
- Endosperm:** z rezervnimi snovmi napolnjen del semena rastlin, hranilno tkivo.
- Škrob:** je ogljikov hidrat iz glukoze, ki nastaja v zelenih listih rastlin.
- Polimorfizem:** pomeni obstoj dveh ali več gensko različnih skupin v neki populaciji. Če obstajajo razmerja med temi skupinami več generacij konstantna, govorimo o uravnoveženem polimorfizmu.
- Elektroforeza:** je tehnika, s katero lahko opazujemo gibanje nabitih molekul v električnem polju. Na gibanje molekul vpliva jakost električnega toka, nosilec, v katerem poteka elektroforeza, pa tudi velikost, oblika, naboj in kemijska sestava molekul, ki jih ločimo. Je relativno hitra tehnika, uporabna za analizo ali čiščenje najrazličnejših biomolekul, predvsem pa beljakovin in nukleinskih kislin.
- Determinantna rast:** končna rast.

1 UVOD

1.1 POVOD

Ajda (*Fagopyrum*) je dvokaličnica, zaradi oblike socvetja jo štejemo med nepravna prosasta žita. Uporaba je podobna kot pri žitih, lahko jo meljemo, da dobimo moko, ali pa semena termično obdelamo. Ker so ajdova zrna dober vir ogljikovih hidratov, proteinov, vlaknin, vitaminov in antioksidantov, so zelo hranljiva in uporabna pri prehrani ljudi. Proteini v endospermu ajde imajo pomembno vlogo in vpliv na končno prehrano in funkcijsko vrednost ajde. Ajda ima kratek čas dozorevanja ter ni zahtevna glede tal. Ima majhno porabo hranil in pri pridelovanju ne potrebujemo sredstev za varstvo rastlin in je zato primerna za ekološko pridelovanje. Do sedaj so ugotavljali koncentracije beljakovin v zrnju različnih sort ajde, to se da ugotoviti z elektroforezo beljakovin.

1.2 HIPOTEZA

Predvidevamo, da se v različnih rastnih stadijih tatarske ajde v listih pojavlja različna koncentracija beljakovin, potrebnih za sintezo škroba. Marija Gregori (osebna informacija) je z elektroforezo ugotovila, da se v listih tatarske ajde pojavljajo enake beljakovine kot v endospermu.

1.3 CILJ

Glavni cilj te diplomske naloge je ugotovitev pojava proteinov za sintezo škroba v listih tekom rastne dobe tatarske ajde. Podatke, ki jih bomo dobili o rasti in razvoju tatarske ajde bodo uporabni pri kasnejšem žlahtnjenju ter posledično povečano vsebnosti škroba v endospermu, kar bi lahko povečalo napolnjenost semen.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OPIS AJDE

Ajda je dvokaličnica iz družine dresnovk (Polygonaceae), uvrščamo jo med žita, čeprav botanično ne spada med trave (Poaceae), kamor spada večino ostalih žit. Pridelujemo in uporabljamo jo na podoben način kot žita. Žitom je podobna tudi po strukturi in sestavi semena. Najbližji sorodniki so dresni, med daljnimi pa špinača in amarant. Ajdo največkrat gojimo zaradi trirobeta zrnja, nekateri pa jo uporabljajo za zeleno gnojenje, sopoševke ali zastir.

Ajda ni zahtevna za pridelavo in daje lep pridelek tudi na bolj siromašnih tleh, ker pa za gojenje ne potrebujemo pesticidov, je ajda primerna za ekološko pridelavo. Zaradi hitrega vznika in rasti preprečuje rast plevelom. Zraste lahko do dva metra visoko, lahko pa ostane majhna, to je odvisno od dednosti in okolja. Pri ajdi poznamo končno rast (determinantna rast), ko po določenem času rastline nehajo rasti, ter nekončano rast (nedeterminantno rast) (Kreft, 1995).



Slika 1: Ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) (Wikispecies ..., 2010)

Poznamo navadno (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarsko ali zeleno ajdo (*Fagopyrum tataricum* Gaertn).

Tatarska ajda je precej podobna navadni ajdi, le da so listi bolj široki kot dolgi, listi in stebela so bolj izrazito zeleni. Spodnji listi so pecljati, zgornji pa sedeči. Steblo je sočno in žilavo, včasih vendar redko rdečkasto obarvano predvsem v redkem in nizkem posevku, obarvanost je večja na osončeni strani stebela in na višji nadmorski višini.

Cvetovi so v sestavljenih socvetjih, stranska socvetja pa so podobna klasom, s to razliko da so posamezni cvetovi na kratkih pecljih. Cvetno odevalo je enojno, sestavljeno iz petih cvetnih listov, ki so preobraženi čašni listi. Cvetovi so beli ali zeleni.

Semena tatarske ajde so rjava, nekatera so zelenkasta, triroba, dolga od 4 do 7 mm. Robovi so poudarjeni in zaokroženi nekoliko robati, površina ni ravna ampak hrapava. Tatarska je od navadne bolj odporna glede poleglosti rastline in na vremenske razmere. (Kreft, 1995).

Ajda je doma z jugozahodne Kitajske, pokrajine Junan, ki se je nato postopoma širila od Himalaje v Butan, Nepal, Indijo in Pakistan. Drugo še bolj pomembno širjenje je bilo proti severu Kitajske in Sibirije, kjer se je preko Rusije razširila v Evropo. V Slovenskih zapisih je ajda prvič omenjena leta 1426, verjetno pa je k nam prišla nekaj let prej (Kuhar, 1976). Pred 30 leti je bilo možno najti tatarsko ajdo kot posevek v nekaterih pokrajinah po Sloveniji, zdaj pa jo najdemo kot plevel med navadno ajdo (Kreft, 1995).

Ime ajda je prevzeta iz staronemškega jezika, *Heiden* – ajd pogan, to ime je dobila ko so jo v 12. stoletju križarji v Evropo prinesli s Kitajske. Latinsko *Fagopyrum* in angleško buckwheat pomeni »bukovo žito« saj naj bi bili ajdini semeni podobni bukovim (Kreft, 1995).

2.2 UPORABA

Pri ajdi uporabljamo predvsem semena, z luščenjem naredimo ajdovo kašo, ki jo lahko uživamo kuhano ali pečeno. Z mletjem pa dobimo ajdovo moko, iz katere lahko naredimo kruh, žgance, palačinke, rezance, štruklje, biskvite ter druge jedi (Kreft, 1995).

2.2.1 Uporaba v ljudskem zdravilstvu

Ker ajda ne vsebuje glutena, jo lahko uživajo bolniki z celiakijo. Iz posušenih cvetov si lahko pripravimo čaj, ki vsebuje veliko rutina. Uporablja se za zdravljenje krčnih žil. Po Sloveniji gojijo vse manj ajde, predvsem zaradi uničenega semenarstva. Kupujejo se slabi hibridi, ki so zgubili zdravilne učinke ter niso primerne za naše razmere. Stare sorte so te učinkovine vsebovale, predvsem tiste, ki so bile na višji nadmorski višini. V času cvetenja je bila odlična za pašo kranjske čebele, pa še lepo je dišala. V Aziji uživajo sveže mlade rastline, ki pa je zaradi vsebnosti fagopyrina ob izpostavljanju

svetlobi lahko povzroči kožne izpuščaje. Včasih pa so z ajdovimi luščinami polnili vzglavnike, kar pa je nekaterim povzročalo alergijo če luščine niso bile dobro očiščene (Kreft, 1995).

2.3 KEMIJSKA SESTAVA

Škrob je sestavljen iz 25 % amiloze in 75 % amilopektina. Glede na način toplotne obdelave lahko vsebuje od 7 do 37 % rezistentnega škroba. V različnih tipih moke je od 70 do 91 % škroba in 71 do 78 % v kaši (Kreft, 1995).

Velika biološka vrednost je posledica velike vsebnosti omejujočih aminokislin, predvsem lizina, treonina in triptofana. Seme vsebuje veliko mineralov, pomembni so železo, cink in selen (Kreft, 1995).

2.4 LOČEVANJE BELJAKOVIN ZRN AJDE S POMOČJO ELEKTROFOREZE

O polimorfizmu elektroforeznega proteinskega vzorca pri različnih kultivarjih ajde so prvi pisali Kreft in sod. (1978). S pomočjo elektroforeze so ugotavljali razlike med sortami ajde glede na sestavo v vodi topnih beljakovin. Pri populaciji sive dolenjske ajde je bil ugotovljen visok polimorfizem elektroforeznih črt (Dolinšek 1980). Na podlagi elektroforeznega proteinskega vzorca je bil ugotovljen visok polimorfizem založnih proteinov (Rogel in Javornik, 1996). Ugotovljeno je bilo, da se proteini endosperma razporedijo v eno debelo proteinsko črto in na številne neizrazite črte. Pri vseh kultivarjih navadne ajde se elektroforezne črte pojavljajo na enakih mestih in s podobno močjo kot pri križancih navadne ajde, pri nekaterih pa se elektroforezna črta ne pojavi. Opazna razlika je tudi pri križancih tatarske ajde (Ličen, 2004). Ličen in sod. (2004) so s pomočjo SDS-PAGE elektroforeze pri navadni ajdi opisali visoko statistično značilen polimorfizem beljakovin endosperma med analiziranimi semeni. Z elektroforezo beljakovin semena so ugotavljali tudi identifikacijo šestih različnih trav in travniških metuljnic (Rogel, 2000). Z elektroforezo lahko analiziramo beljakovine v ajdovi moki ter ugotovimo, če je bilo ajdovi moki primešana pšenična moka, kot tudi katera sorta pšenice je bila primešana (Kreft, 1995). Do sedaj še ni bil ugotovljen polimorfizem proteinov endosperma v listih tatarske ajde.

3 MATERIALI IN METODE DELA

Ajdo smo posejali na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete. Tekom poskusa smo vodili dnevnik rasti in razvoja tatarske ajde, ter izdelali herbarij. Vsak teden smo liste obirali in jih shranili v zamrzovalnik. Pri tem smo slikali rastlino, nabrali list za izdelavo herbarija in vodili dnevnik rasti. Na pripravljeno gredico, ki je bila prekrita s črno folijo in pripravljenim namakalnim sistemom, smo posejali tatarsko ajdo. Na foliji smo naredili luknje na 25 cm razdalje, ter pri tem pazili da nismo poškodovali namakalnega sistema. V te luknje smo dali po 7-9 zrn tatarske ajde.

Ob zaključku poskusa se je s pomočjo elektroforeze ugotovilo pojavljanje encimov za sintezo škroba v listih, Uporabili smo Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker, No. SM 0431. Delo v laboratoriju je potekalo na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo in fiziologijo rastlin Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer smo shranjevali liste in na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer je v laboratoriju potekala elektroforeza. V poskusu smo uporabili domačo populacijo tatarske ajde. Elektroforezo je vodila in izvajala Marija Gregori.

3.1 DELO NA POLJU

Konec maja (22.05. 2008) smo na pripravljeno gredico, ki je bila prekrita z črno folijo in pripravljenim namakalnim sistemom, posejali tatarsko ajdo. Na foliji smo naredili luknje na 25 cm razdalje v katere smo dali 7-9 zrn tatarske ajde. V začetku junija (03.06) smo morali opleti plevel, med katerim je prevladoval slak. Takrat smo prvič slikali posevek in nabrali mlade rastline tatarske ajde za herbarij, to smo ponovili čez en teden (10.06). Od 19.06. pa do 20.08. smo vsak teden pobirali po tri liste z ene rastline v treh ponovitvah na različnih koncih, jih stehtali, zmerili v širino in dolžino, ter jih spravili v zamrzovalnik. Poleg tega smo vodili dnevnik o rasti rastlin. Vsakič smo posevek slikali, ter nabrali list za pripravo herbarija.

3.2 DELO V LABORATORIJU

V laboratoriju smo merili liste v širino, dolžino in njihovo težo, ter s pomočjo SDS-PAGE metode naredili elektroforezo.

3.2.1 Opis listov

Vsak teden smo pobirali liste z ene rastline v treh ponovitvah na različnih koncih, jih stehtali, izmerili v širino in dolžino ter jih nato shranili v zamrzovalnik. Vedno smo nabirali zgornje mlajše liste. Vsakič pa smo enega nabrali za herbarij.

3.2.2 SDS-PAGE elektroforeza

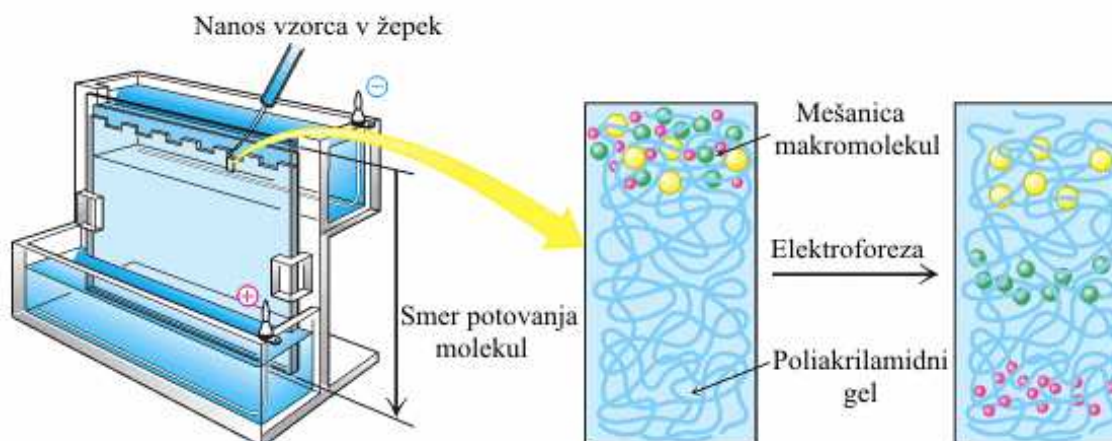
Elektroforeza je najpogostejša metoda za ločevanje proteinov. Pri SDS-PAGE elektroforezi se kot ločilec uporablja poliakrilamidni gel, ki deluje kot sito, čez katerega manjše molekule potujejo hitreje kot velike molekule. SDS se veže na protein in prekrije njegov negativni naboj. Peptidne verige postanejo negativno nabite. Elektroforezna mobilnost je razmerje med potjo proteina in potjo barvila na gelu. Ločeni proteini se po obarvanju pojavijo v obliki črt.

Preglednica 1: Priprava 10 % T separacijskega gela (Laemmli, 1970).

Sestavine gela	Količina	Končna koncentracija
Raztopina akrilamida	6,7 ml	10 % T
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5 ml	0,375 M
1 % SDS	2 ml	0,1 %
Destilirana voda	5,3 ml	-
1 % amonpersulfat	1 ml	0,05 %
Temed	10 μ l	-

Elektroforeza je potekala vertikalno na koncentracijskem in separacijskem gelu. Najprej je potekala eno uro pri električnem toku 40 mA, nato pa še tri ure pri 60 mA. V elektroforezno posodo damo elektroforetski pufer.

Za en potek SDS elektroforeze sta bila pripravljena dva gela, ki smo ju vlili med prej dobro očiščeni in fiksirani stekli, ki sta bili razmaknjena 0,1 cm. Na spodnji separacijski gel smo dan prej vlili 18 ml gelske raztopine in ga shranili preko noči v hladno omaro. Drugi dan smo med stekelci vstavili glavniki debeline 1 mm, ki nam je naredil žepke kamor bomo kasneje nanašali vzorce. Pri vstavitvi glavnika moramo paziti, da ne nastanejo mehurčki, ki bi motili potek elektroforeze. Zgornji koncentracijski gel smo vlili pred nanosom vzorcev ter ga pustili stati uro in pol.



Slika 2: SDS-PAGE elektroforeza. Molekule se v poliakrilamidnem gelu ločijo po velikosti (Elektroforeza ..., 2010).

Preglednica 2: Priprava koncentracijskega gela (Laemmli, 1970).

Sestavine gela	Količina	Končna koncentracija
Raztopina akrilamida	2,6 ml	4 % T 1,3 % C
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	5 ml	0,125 M
Destilirana voda	9,2 ml	-
1 % SDS	2 ml	0,1 %
1 % amonpersulfat	1 ml	0,05 %
Temed	20 µl	-

Glavnik po določenem času, ko se koncentracijski gel strdi, počasi in zelo previdno vzamemo ven ter prazne prostorčke zalijemo z nekaj pufru. V te žepke smo nanegli 15 µl vzorca. Na našem gelu smo zapolnili 9 prostorčkov, v enega smo nanegli beljakovine semena sorta Siva, na drugega pa molekulski standard širokega spektra StigmaMarker™ M 4038. Po nanosu vzorcev smo vse skupaj postavili v posodo v kateri je bil pufer in pognali elektroforezo. Shema aparata za elektroforezo je predstavljena na sliki 2. Elektroforeza je končana ko je barvilo na gelu (ekstrakcijskemu purfu smo dodali bromfenol modro) pripotovalo do spodnjega roba gela. Gel smo preko noči barvali v zato pripravljenem barvilu (0,05 % Commasie Brilliant Blue R-250; 5 % etanol in 12 % trikloroacetna kislina). Drugi dan smo odvečno barvilo splaknili z namakanjem gela preko noči v deionizirani vodi.

Za določitev molskih mas proteinov endosperma, ki so se pojavili na elektroferogramu, smo uporabili molekulski standard širokega spektra StigmaMarker™ M 4038 (M.W. 6.500-205.00).

Preglednica 3: Sestava in molekulske mase beljakovin molekulskega standarda širokega spektra SigmaMarker™ M 4038 (M.W. 6.500-205.000) (Laemmli, 1970).

Protein	Molekulska masa	Protein	Molekulska masa
Miozin (HC)	205.000	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	36.000
b-galaktozidaza	116.000	Karbonska anhidraza	29.000
Fosforilaza b	97.000	Tripsinogen	24.000
Fruktoza-6-fosfat kinaza	84.000	Tripsin inhibitor	20.000
Albumin	66.000	α-lactalbumin	14.200
Glutamin dehidrogenaza	55.000	Aprotinin	6.500
Ovalbumin	45.000	-	-

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

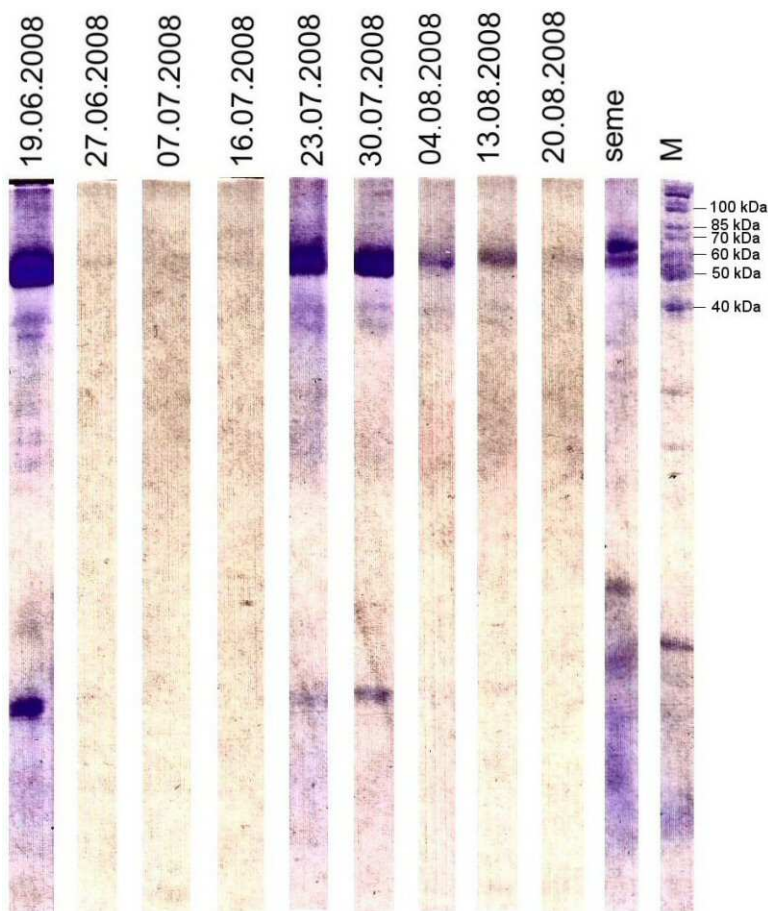
Statistično analizo velikosti listov smo naredili s pomočjo Excel (Microsoft Co., USA), ter jo prikazali na grafu.

4 REZULTATI

4.1 BELJAKOVINE ENDOSPERMA V LISTIH TATARSKE AJDE

Beljakovina endosperma tatarske ajde v listih so na elektroferogramu vidne obarvane elektroforezne črte različnih intenzivnosti obarvanja. Pri naši raziskavi smo se osredotočili na dobro vidno glavno elektroforezno črto beljakovin endosperma, ki je 50 do 60 kDa molekulske mase. Rezultati polimorfizma endosperma v listih tatarske ajde so vidni na sliki 3. Elektroforezne črte so lepo vidne pri nekaterih vzorcih, od devetih vzorcev se pri treh zelo dobro vidijo, dva vzorca sta slabše vidna, pri treh vzorcih pa se elektroforetske črte skoraj ne vidijo. Dne 19.06. so elektroforezne črte endosperma zelo opazne, nato se 27.06., 07.07., 16.07., elektroforezne črte sploh ne pokažejo oziroma so slabo vidne. Z dnem 23.07. pa se elektroforezne črte spet pokažejo in se nato počasi zmanjšujejo dokler niso 20.08. komaj še opazne.

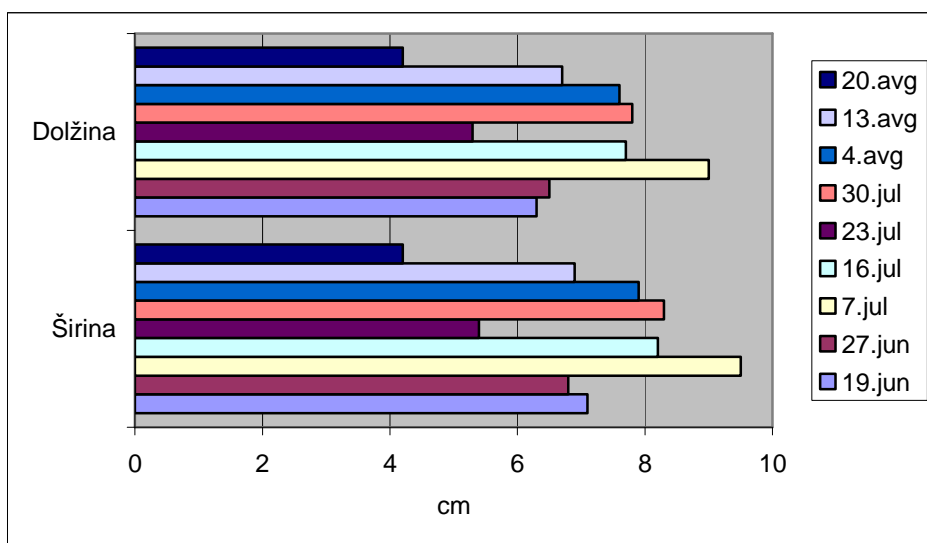
Prvi dan 19.06. ajda še ne cveti, zato je elektroforezna črta bolj vidna kot pa 27.06., ko so že prvi nastavki cvetov. Podobno je tudi z naslednjima dvema datumoma, dokler ajda polno ne zacveti (23.07), takrat je elektroforetska črta spet bolj vidna. Lepo je vidna še 30.07. ko je cvetenje pri koncu. Po tem datumu se razvijajo semena zato so elektroforetske črte manj opazne, saj gre veliko beljakovin iz listov za rast semen.



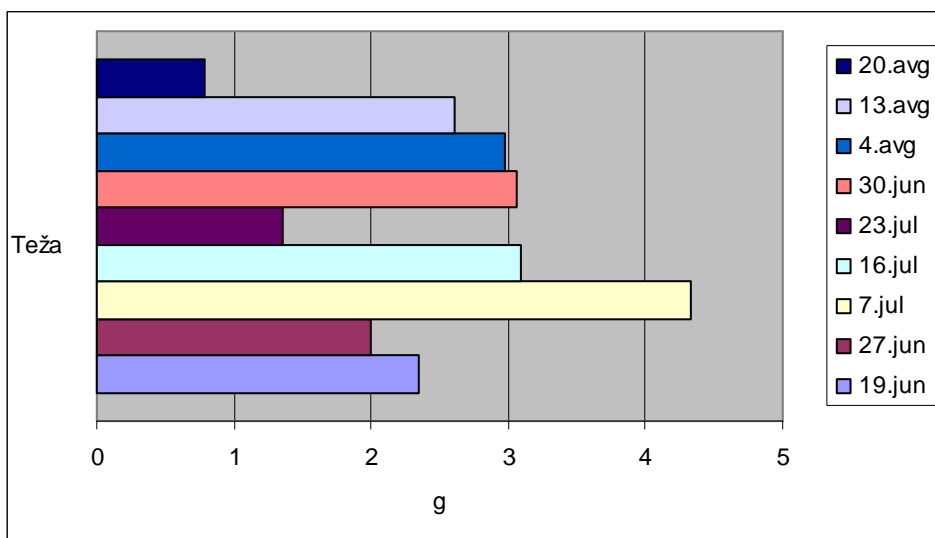
Slika 3: SDS-PAGE elektroferogram beljakovin endosperma v listih tatarske ajde

4.2 REZULTATI MERJENJA LISTOV

Ko smo vsak teden pobirali po tri liste z ene rastline v treh ponovitvah na različnih koncih, smo jih stehali ter jih izmerili v širino in dolžino. Nabirali smo zgornje mlade liste. Po rezultatih je razvidno, da je širina listov za malenkost večja od dolžine. Na sliki 4 in 5 opazimo, da so listi 19. in 27. junija občutno manjši in lažji od listov 7. julija, ki so v povprečju največji in najtežji če gledamo skozi celo rastno dobo. Najmanjši so pri koncu rastne dobe, takrat jih je tudi občutno manj. Zanimivo je, da so majhni okoli 5,5 cm in težki le 1,352 g tudi 23. julija, ta datum sovпада s polnim cvetenjem ajde, kar je mogoče razlog, da so novi listi veliko manjši od ostalih.



Sl. 4: Povprečna dolžina in širina listov glede na rastno dobo.

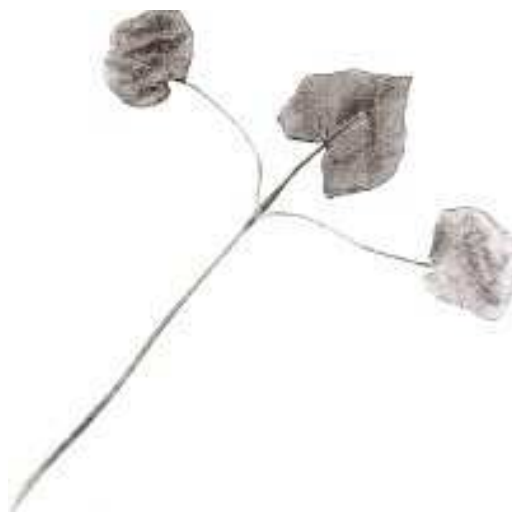


Sl.5: Povprečna teža listov glede na rastno dobo.

4.3 OPISI LISTOV

03.06.2008

Ker ajda hitro kali, predvsem pa hitro raste plevel, je bilo potrebno prvo pletje plevela, med katerim je prevladoval predvsem slak. Ker so bile rastline še majhne (13 cm) sem za herbarij odtrgala celo rastlino. Vidita se dva klična lista, pri nekaterih rastlinah so že formirani tudi prvi pravi listi, ki so temnejši in bolj intenzivne barve.



Slika 6: Herbarij 03.06.2008



Slika 7: Ajda 03.06.2008

10.06.2008

Ajda je zrasla (22 cm), imela je že dva do tri lepo razvite liste. Po listih se tatarska loči od navadne že po obliki, pa tudi po rdečkastih žilah, ki jih ima navadna ajda. Listi so srčasto puščičasti. Odrhala sem celo rastlino za izdelavo herbarija.



Slika 8: Herbarij 10.06.2008



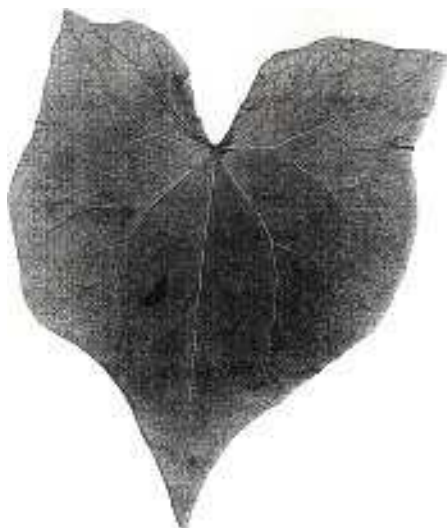
Slika 9: Ajda 10.06.2008

19.06.2008

Ajda je lepo raščena, listi so svetlo zelene barve. Pobrala sem po tri liste z ene rastline v treh ponovitvah na različnih koncih gredice, jih nato po tri stehtala in vsakega posebej zmerila v dolžino in širino. Jih zložila v vrečke in jih dala v zamrzovalnik. Odrkala sem tudi list za izdelavo herbarija. To sem potem ponavljala vsak teden.

Preglednica 4: Podatki merjenja listov.

Datum	Prva ponovitev	Druga ponovitev	Tretja ponovitev
19.06.2008	3,567 g	2,336 g	1,135 g
	š: 9,3 cm d: 8,1 cm	š: 6,5 cm d: 6 cm	š: 5,7 cm d: 5 cm



Slika 10: Herbarij 19.06.2008



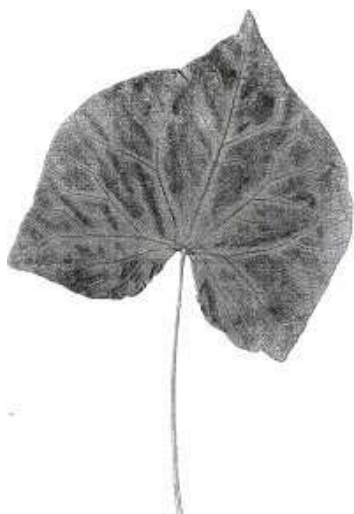
Slika 11: Ajda 19.06.2008

27.06.2008

Rastlina je že lepo razvejana, opazila sem prve nastavke cvetov.

Preglednica 5: Podatki merjenja listov.

Datum	Prva ponovitev	Druga ponovitev	Tretja ponovitev
27.06.2008	1,883 g	2,016 g	2,089 g
	š: 7 cm d: 6,6 cm	š: 6,7 cm d: 6,4 cm	š: 6,7 cm d: 6,6 cm



Slika 12: Herbarij 27.06.2008



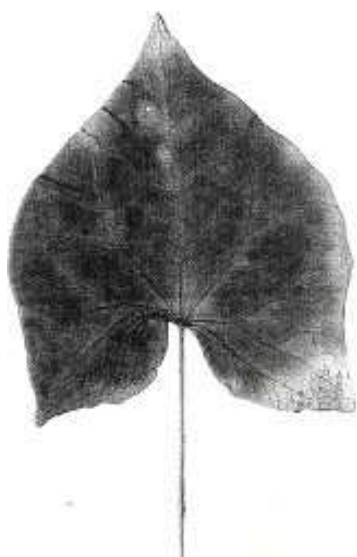
Slika 13: Ajda 27.06.2008

07.07.2008

Prvi cvetovi se počasi odpirajo, v enem tednu so rastline zelo zrasle, tudi sama velikost listov se je povečala.

Preglednica 6: Podatki merjenja listov.

Datum	Prva ponovitev	Druga ponovitev	Tretja ponovitev
7.07.2008	4,144 g	6,544 g	2,306 g
	š: 9,8 cm d: 9,3 cm	š: 11,1 cm d: 10,3 cm	š: 7,7 cm d: 7,5 cm



Slika 14: Herbarij 7.07.2008



Slika 15: Ajda 7.07.2008

16.07.2008

Cvetovi so na polovici odprti, vidijo se zgornji sedeči listi ajde. Stebla opazno spreminjajo barvo.

Preglednica 7: Podatki merjenja listov.

Datum	Prva ponovitev	Druga ponovitev	Tretja ponovitev
16.07.2008	3,722 g	2,698 g	2,860 g
	š: 9,4 cm d: 8,2 cm	š: 7,6 cm d: 7,4 cm	š: 7,8 cm d: 7,6 cm



Slika 16: Herbarij 16.07.2008



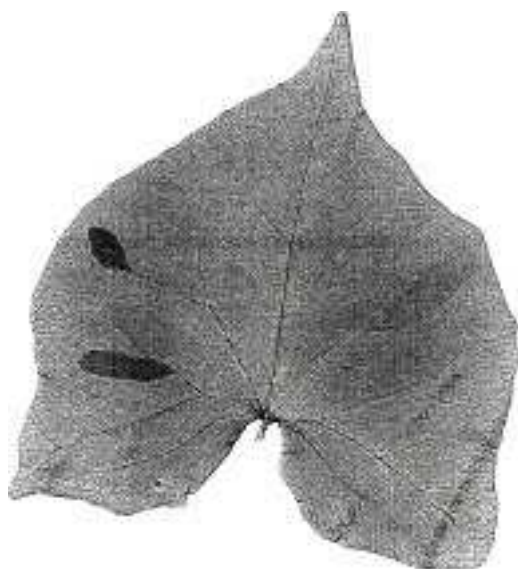
Slika 17: Ajda 16.07.2008

23.07.2008

Ajda je v polnem cvetenju, opazni so že prvi oplojeni cvetovi z zrnjem. Stebla so lepo rdečkasto obarvana. Ker je bilo vmes neurje je nekoliko polegla.

Preglednica 8: Podatki merjenja listov.

Datum	Prva ponovitev	Druga ponovitev	Tretja ponovitev
23.07.2008	1,750 g	1,423 g	0,885 g
	š: 6,2 cm d: 5,8 cm	š: 6 cm d: 5,5 cm	š: 4,1 cm d: 4,6 cm



Slika 18: Herbarij 23.07.2008



Slika 19: Ajda 23.07.2008

30.07.2008

Cvetenje je pri koncu, pojavlja se vedno več zrnja. Listi ponekod že rumenijo.

Preglednica 9: Podatki merjenja listov.

Datum	Prva ponovitev	Druga ponovitev	Tretja ponovitev
30.07.2008	2,773 g	2,953 g	3,453 g
	š: 8 cm d: 7,1 cm	š: 8,4 cm d: 8,4 cm	š: 8,7 cm d: 7,9 cm



Slika 20: Herbarij 30.07.2008



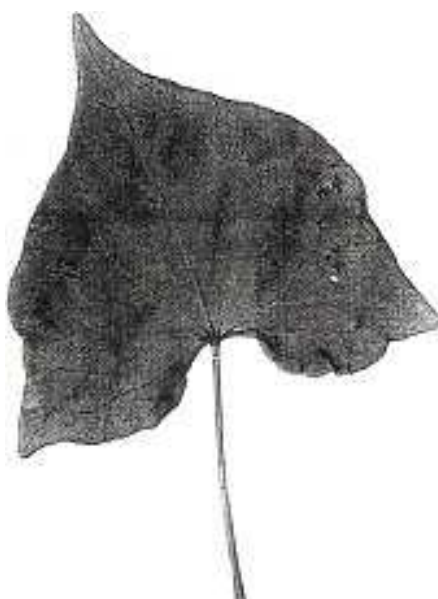
Slika 21: Ajda 30.07.2008

04.08.2008

Opazno zmanjšanje listov, zgornji del rastline ima večinoma rumene liste, cvetov ni več zamenjala so jih zelena zrna.

Preglednica 10: Podatki merjenja listov.

Datum	Prva ponovitev	Druga ponovitev	Tretja ponovitev
4.08.2008	2,997 g	3,232 g	2,704 g
	š: 8,1 cm d: 8,1 cm	š: 7,9 cm d: 8 cm	š: 7,8 cm d: 6,9 cm



Slika 22: Herbarij 4.08.2008



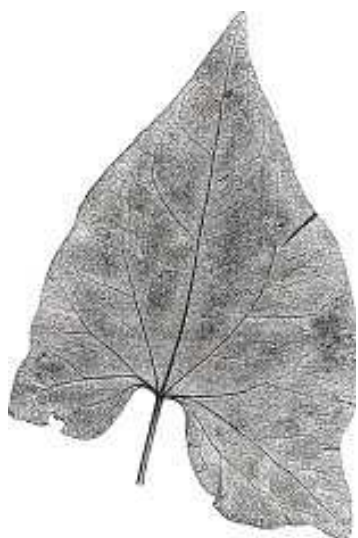
Slika 23: Ajda 4.08.2008

13.08.2008

Nekatera zrna so že potemnela, večina pa je še zelenih. Nekateri listi so se obarvali rdeče.

Preglednica 11: Podatki merjenja listov.

Datum	Prva ponovitev	Druga ponovitev	Tretja ponovitev
13.08.2008	2,778 g	2,023 g	3,040 g
	š: 7 cm d: 6,6 cm	š: 6,4 cm d: 6,5 cm	š: 7,4 cm d: 7cm



Slika 24: Herbarij 13.08.2008



Slika 25: Ajda 13.08.2008

20.08.2008

Ajda ima že oblikovana zrna in lahko bi jih pobrali. Na steblih je ostalo zelo malo listov tako, da so zelo opazna rdečkasta stebila.

Preglednica 12: Podatki merjenja listov.

Datum	Prva ponovitev	Druga ponovitev	Tretja ponovitev
20.08.2008	0,869 g	0,774 g	0,737 g
	š: 4,8 cm d: 4,7 cm	š: 4,2 cm d: 3,8 cm	š: 3,8 cm d: 4,1 cm



Slika 26: Herbarij 20.08.2008



Slika 27: Ajda 20.08.2008

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Raziskovalci so objavili, da je pri navadni ajdi velik polimorfizem beljakovin kotiledonov (Gardiner in Forde, 1992; Rogel in Javornik, 1996). Trdili so, da obstaja znotraj ene vrste ajde vedno isti vzorec elektroforeznih črt beljakovin. Kar je Ličen (2004) kasneje ugotovila, da se proteini endosperma razporedijo v eno debelo proteinsko črto in na veliko število neizrazitih črt. Pri vseh kultivarjih navadne ajde se elektroforezne črte pojavljajo na enakih mestih in s podobno močjo, kot pri križancih navadne ajde, pri nekaterih pa se elektroforezna črta ne pojavi. Opazna razlika je tudi pri križancih tatarske ajde. V tem diplomskem delu smo hoteli ugotoviti, če se v listih tatarske ajde tekom rastne dobe pokažejo razlike v intenzivnosti elektroforeznih črt, oziroma če se sploh pokažejo. Poskušali smo ugotoviti če je SDS-PAGE elektroforeza beljakovin endosperma učinkovita metoda za ugotavljanje beljakovin endosperma v listih tatarske ajde. Ličen (2004) je v svoji raziskavi proučevala proteine endosperma v semenih ajde, ki so okoli 60 kDa in ti isti proteini se pokažejo v moji raziskavi v listih tatarske ajde. Zato lahko sklepamo, da so ti proteini isti, ki se nato formirajo v semenih. To je razvidno tudi iz rezultatov elektroferograma beljakovin. Ugotovljeno je bilo, da se lahko z pomočjo metode SDS-PAGE beljakovin endosperma razlikuje med navadno in tatarsko ajdo (Ličen 2004).

Na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete smo posadili gredico tatarske in navadne ajde. Čez dva tedna smo nato že naredili prve slike in nabrali celo rastlinico za pripravo herbarija, isto smo ponovili še naslednji teden, nato pa sem vsak teden pobirala po tri liste z vsake rastline v treh ponovitvah na različnih koncih gredice, jih stehtala, zmerila širino in dolžino lista, ter jih spravila v zamrzovalnik. Po končanem poskusu na laboratorijskem polju smo s pomočjo SDS-PAGE elektroforeze ugotovili, da se spreminja intenzivnost elektroforeznih črt, tekom rastne dobe. Zanimivo je, da se rezultati s pomočjo elektroforeze in merjenje listov nekako dopolnjujejo. Opazila sem da, datum 23. julija sovпада s polnim cvetenjem in nastavki semen ajde. Najbolj so elektroforezne črte opazne prvič, ko smo nabrali liste in nato 23.07. in 30.07., ko je bila ajda v polnem cvetenju in ko so se razvila semena. Po tem datumu so elektroforezne črte postopno manj opazne. Med vzorci, ki so bili nabrani 26.06., 7.07. in 16.07. elektroforeznih črt skoraj ni, medtem ko je ajda polno zacvetela je zelo opazna elektroforezna črta in so tudi listi občutno manjši in lažji, kot so bili pred dvema tednoma. Proti koncu rastne dobe so listi občutno manjši in lažji, sklepamo lahko da gre vsa hrana (škrob) v polnjenje semen.

V tem diplomskem delu smo dokazali, da se z metodo SDS-PAGE beljakovin endosperma lahko loči beljakovine endosperma tudi v listih tatarske ajde. Dokazali smo tudi, da se elektroforezne črte v listih spreminjajo glede na rastne stadije ajde (cvetenje, polnjenje semen). Torej lahko sklepamo, da takrat, ko rastlina nima intenzivnih elektroforeznih črt, torej manj beljakovin v listih, se beljakovine porabijo za cvetenje in semena. Kar bi nam lahko prišlo prav pri gojenju ajde, saj bi v tistih stadijih lahko pognojili rastlino in ji s tem omogočili več hranil in mogoče posledično več pridelka. Zanimivo bi bilo izvesti poskus, če se z dodajanjem gnojenja res poveča pridelek.

6 POVZETEK

Pri beljakovinah endosperma navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench), so do sedaj ugotovili veliko homogenost beljakovin. Nas pa je zanimalo če se v listih pojavlja različna koncentracije beljakovin, potrebnih za sintezo škroba. Poskus je potekal na laboratorijskem polju in v laboratoriju, kjer je potekala elektroforeza beljakovin endosperma v listih tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). Uporabili smo semena tatarske ajde domače populacije. S pomočjo SDS-PAGE elektroforeze beljakovin smo ločili beljakovine endosperma v listih ter ugotovili, da se preko rastne dobe spreminja intenzivnost elektroforetskih črt. Med poskusom smo vodili dnevnik rasti listov, jih merili v širino in dolžino ter težo. Tekom poskusa smo ajdo slikali in pobirali liste za herbarij. Glede na stadij ajde smo ugotovili, da se spreminja tudi velikost in teža mladih zgornjih listov, ki smo jih pobirali vsak teden. Saj so ob polnem cvetenju ajde mladi listi manjši ter lažji, elektroforetska črta pa je zelo močna. Pred cvetenjem je elektroforezna črta zelo močna, pri naslednjih treh vzorcih pa komaj opazna, listi pa so večji in težji. Ob polnem cvetenju ajde se ponovno pokažejo močne elektroforetske črte, ki nato pri naslednjih vzorcih zgubljajo na intenzivnosti, listi pa so večji in težji. Proti koncu rastne dobe, ko je formiranih že veliko semen in ajda ne cveti pa elektroforezne črte skoraj ni, kar smo opaziti tudi pri merjenju listov saj so zelo majhni (š: 4,2 cm in d: 4,2 cm) in lažji (0,793 g). V tem diplomskem delu smo torej dokazali, da se intenzivnost elektroforeznih črt spreminja glede na rastne stadije ajde. Zanimivo bi bilo meriti istočasno mlajše ter starejše liste, ter ugotoviti če pride do kakšnega odstopanja.

7 VIRI

- Dolinšek B. 1980. Studies of polymorphism of electrophoretic protein patterns in buckwheat. V: Buckwheat, symp. Ljubljana, Sept. 1-3: 61-68
- Elektroforeza, Veterinarska fakulteta, kemija vaje.
www.veterinarji06.zverinice.com/Kemija/vaje/Elektroforeza.doc (10.02.2010)
- Gardiner S.E., Forde M.B. 1992. Identification of cultivars of grasses and forage legumes by SDS-PAGE of seed proteins. V: Seed analysis, modern methods of plant analysis. Inskens H.F., Jackson J.F. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 43-61
- Kreft I. 1995. Ajda. ČZD, Kmečki glas, Slovenija: 112 str.
- Kreft I., Javornik B., Strel B. 1978. Polymorphism of electrophoretic protein patterns in buckwheat. Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Research Reports, 31: 67-69
- Kuhar B. 1976. K problematiki proučevanja ajde v ljudski prehrani Slovenije. Zdravstveno varstvo, 15, Suppl. 1. : 15-19
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685
- Ličen M. 2004. Polimorfizem beljakovin endosperma pri križancih ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench). Diplomsko naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Slovenija: 36 str.
- Ličen M., Dvoraček V., Čepkova P., Michalova A. 2004. Endosperm protein polymorphism of common and tartary buckwheat. Acta agriculturae Slovenica, 83: 171-179
- Rogel S. 2000. Identifikacija kultivarjev tujeprašnih rastlin z denaturacijsko elektroforezo beljakovin semen in izrednotenje elektroforegramov križancev ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench). Doktorska disertacija, Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 251-256
- Rogl S., Javornik B. 1996. Seed protein variation for identification of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivars. Euphytica, 87: 111-117
- Wikispecies – free species directory
http://species.wikimedia.org/wiki/Fagopyrum_tataricum (10.02.2010)

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju, prof. dr. Ivanu Kreftu za pomoč pri izvedbi diplomske naloge;

ter somentorici doc. dr. Mateji Germ za koristne nasvete in Zlati Luthar za strokovno pomoč;

gospe Mariji Gregori za pomoč in nasvete pri izvajanju elektroforeze;

svojim staršem za brezpogojno pomoč in podporo med študijem;

Maticu za moralno podporo in vlivanje motivacije;