

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Polona NOVAK

**SPREMLJANJE POJAVLJANJA PROTEINOV ZA
SINTEZO ŠKROBA V LISTIH NAVADNE AJDE**

(Fagopyrum esculentum Moench)

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Polona NOVAK

**SPREMLJANJE POJAVLJANJA PROTEINOV ZA SINTEZO ŠKROBA
V LISTIH NAVADNE AJDE (*Fagopyrum esculentum* Moench)**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**MONITORING THE OCCURRENCE OF PROTEINS FOR THE
SYNTHESIS OF STARCH IN LEAVES OF COMMON BUCKWHEAT
(*Fagopyrum esculentum* Moench)**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2010



Po Koroškem po Kranjskem že ajda cveti, že ajda cveti.....

(Slovenska ljudska)

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 je potekalo sprotno shranjevanje listov. Del raziskovalnega dela je bil opravljen na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer je potekala priprava vzorcev in elektroforeza. Setev je bila izvedena na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete Oddelka za agronomijo.

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

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: akad. 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 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.

Polona NOVAK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Vs
DK	UDK 633.12:26:577.2:543.545(043.2)
KG	ajda/proteini/beljakovine/škrob/listi/SDS-PAGE/elektroforeza
KK	AGRIS F 30
AV	NOVAK, Polona
SA	KREFT, Ivan (mentor)/GERM, Mateja (somentorica)
KZ	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2010
IN	SPREMLJANJE POJAVLJANJA PROTEINOV ZA SINTEZO ŠKROBA V LISTIH NAVADNE AJDE (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.)
TD	Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij)
OP	X, 29 str., 6 pregl., 11 sl., 29 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Leta 2008, meseca maja smo v primerno pripravljeno zemljišče posejali zrna ajde. Tekom vegetacije smo spremljali rast in razvoj, hkrati pa pobirali različne vzorce listov ob določenem času. Opazili smo razlike v obarvanosti stebel in listov. Skozi ves čas poskusa smo vodili dnevnik, ter izdelovali herbarij listov in cvetov ajde. S pomočjo SDS-PAGE elektroforeze smo dokazali razlike v intenzivnosti elektroforetskih črt beljakovin potrebnih, za izgradnjo škroba. Na osnovi lege elektroforetskih črt sorte 'Siva', smo v tem diplomskem delu dokazali kdaj je bil pojav proteinov najbolj in slabo izrazit.

KEY WORD DOCUMENTATION

ND Vs
DC UDC 634.12:57.2:543.545.(043.2)
CX buckwheat/starch/proteins/SDS-PAGE electrophoresis
CC AGRIS F 30
AU NOVAK, Polona
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 MONITORING THE OCCURRENCE OF PROTEINS FOR THE
SYNTHESIS OF STARCH IN LEAVES OF COMMON BUCKWHEAT
(*Fagopyrum esculentum* Moench.)
DT Graduation thesis (Higher professional studies)
NO X, 29 p., 6 tab., 11 fig., 29 ref.
L A sl
AL sl/en
AB In May 2008, we sowed buckwheat in appropriate prepared soil. During the
vegetation period we monitored the growth and development, and collected
samples of leaves in a certain time of the day. Throughout the running time of the
experiment we fed daily and manufacture of herbarium leaves and flowers of
buckwheat. We have noticed some differences between the stem colors and
leaf structures. Later, with the SDS-PAGE electrophoresis we presented the
different intensity of electrophoresis lines from proteins needed for starch
synthesis. Based on the electrophoretic position of lines of cv. 'Siva' was in
this thesis demonstrated when the phenomenon was most expressed proteins.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
Slovarček	XI
1 UVOD	1
1.1 POVOD ZA RAZISKAVO	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
1.3 CILJ	1
2 PREGLED LITERATURE	2
2.1 AJDA	2
2.1.1 Pridelovanje ajde	4
2.1.2 Prehranski pomen ajde	4
2.1.2.1 Vlakinine	6
2.1.2.2 Maščobe	6
2.1.2.3 Vitamini in minerali	7
2.1.2.4 Fenolne spojine	7
2.1.2.5 Proteini	7

2.1.2.6	Škrob	8
3	MATERIAL IN METODE DELA	11
3.1	DNEVNIK RASTI IN RAZVOJA AJDE	11
3.2	MATERIAL	17
3.3	DELO NA POLJU	18
3.4	DELO V LABORATORIJU	19
3.4.1	Priprava elektroforeznih vzorcev	19
3.4.2	SDS-PAGE elektroforeza na poliakrilamidnem gelu	19
3.5	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	21
4	REZULTATI	22
4.1	PROTEINI ZA SINTEZO ŠKROBA	22
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	25
6	POVZETEK	27
7	VIRI	28
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Sistematika navadne ajde (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench) (Sistematika ..., 2010)	3
Pregl. 2: Sestava ajde (Sestava ..., 2010)	5
Pregl. 3: Sestavine ekstrakcijskega pufra (Ličen, 2004)	19
Pregl. 4: Priprava 10% T separacijskega gela (Laemmli, 1970)	20
Pregl. 5: Priprava koncentracijskega gela (Laemmli, 1970)	20
Pregl. 6: Ocenjena molekulska masa elektroforetske črte s pomočjo molekulskega standarda širokega spektra Fermentas, PageRuler Unstained Protein Ladder, No.SMO661	22

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Cvetoča ajda (Botanik online, marec 2010)	2
Sl. 2: Kemijski prikaz škroba (Kemijski ..., 2010)	9
Sl. 3: List navadne ajde (19.6.2008)	12
Sl. 4: List in cvet navadne ajde (27.6.2008)	13
Sl. 5: List navadne ajde (16.7. 2008)	14
Sl. 6: Sivkasto-rjava zrna ajde (23.7. 2008)	15
Sl. 7: Srčasti list navadne ajde (30.7. 2008)	15
Sl. 8: List navadne ajde (4.8. 2008)	16
Sl. 9: cv. 'Siva' iz poskusa na Laboratorijskem polju (23.7.2008)	18
Sl. 10: SDS-PAGE elektroferogram proteinov za sintezo škroba v listih ajde (Lastna dokumentacija, 2008)	23

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate-polycrylamide gel electrophoresis.

Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z dodatkom natrijevega
Dodecilsulfata.

SDS: sodium dodecyl sulphate; lavril sulfat

TRIS: hidroksimetil amino-metan

ppm: relativna količina delcev v snovi (delci na milijon)

ppb: delci na milijardo (parts per bilion; enota za masni in volumski delež topljenca v raztopini)

kDa: kilo dalton, enak je teži tisočih atomov vodika, enota za izražanje velikosti proteina

SLOVARČEK

AMILOZA: je polisharid, sodeluje pri izgradnji škroba

AMILAZA: encim, ki polisaharid škrob razgrajuje do enostavnih sladkorjev

OGLJIKOVI HIDRATI: kemijske spojine, ki vsebujejo kisikove in ogljikove atome. To so: glukoza, celuloza, glikogen, škrob,.....

PROTEINI ALI BELJAKOVINE: so kompleksne organske molekule, sestavljene iz najmanj 50 verižno povezanih aminokislin

AMILOPEKTIN: polisaharid, ki ni topen v vodi, sestavlja 80% škrobnega zrnja

RUTIN: bioflavonoid, ki ga najdemo v ajdi, v zeleni papriki, marelicah,...

REZISTENTEN ŠKROB: neprebavljiv škrob

ELEKTROFOREZA: je tehnika, s katero lahko opazujemo gibanje nabitih molekul v električnem polju. Pri elektroforezi gre za porazdelitev komponent na osnovi pozitivnih in negativnih delcev v električnem polju. SDS-PAGE elektroforeza - z njeno pomočjo določimo molekulsko maso proteinov.

1 UVOD

1.1 POVOD ZA RAZISKAVO

Ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) ni žito niti enokaličnica. Je najbližja sorodnica dresni, uvrščamo jo v družino dresnovk (*Polygonaceae*). Ajda je po obliki podobna plevelom. Ajdovo zrno vsebuje veliko ogljikovih hidratov, vlaknin, proteinov, različnih esencialnih elementov, vitaminov in antioksidantov. Vsebuje veliko proteinov, ki imajo pomembno vlogo in vpliv na funkcijsko vrednost ajde. Zori kratek čas, pri njeni pridelavi pa ne potrebujemo sredstev za varstvo rastlin, saj je nezahtevna rastlina glede tipa tal in vsebnosti gnojil v tleh. Ajda je znana medonosna rastlina.

Mnogi raziskovalci so raziskovali ajdo in jo še raziskujejo, nekateri so prišli do izjemnih rezultatov. Tudi moje diplomsko delo se navezuje na ajdo. Želeli smo ugotoviti pojav specifičnih proteinov v listih ajde in posledično z njimi sintezo škroba v njih.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Škrob spada med glavne endogene faktorje, ki so odgovorni za prehranske značilnosti ajdovih izdelkov (Ikeda in sod., 1997).

Delovna hipoteza naloge je:

1. Predpostavili smo, da bomo s pomočjo elektroforeze določili pojav proteinov za sintezo škroba v listih navadne ajde

1.3 CILJ

Z nalogo smo želeli ugotoviti pojav, potrebnih proteinov za sintezo škroba v listih navadne ajde, kateri se kopičijo v listih. S pomočjo SDS-PAGE elektroforeze smo dokazali intenzivnost pojavljanja proteinov.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 AJDA

V Sloveniji je bila ajda prvič omenjena leta 1426 (Kuhar, 1976). Nekoč so tam, kjer druge rastline niso rastle ali pa slabo, sejali ajdo. Na jugozahodu Kitajske že vsaj tisočletje uživajo v ajdi. V pestrih pokrajinah Junana in Sečuana na Kitajskem se še vedno razveselijo samoniklih rastlin navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) in njene sorodnice tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). Največja uvoznica ajde v svetu je Japonska, največja izvoznica pa Kitajska, ki dobavlja ajdo na Japonsko in v Evropo (Kreft I, 1995). V 17. stoletju je bila ajda pri nas ena vodilnih poljščin.

Poznamo: navadno ajdo (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarsko ajdo (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). Ajda je zelo skromna rastlina. Največkrat jo gojimo zaradi njenega trioglatega semena, ki je botanično plod in še natančneje orešek, s trdo lusko. Med predelavo je potrebno lusko odstraniti, ker ni primerna za uživanje. Ajda je tudi medonosna rastlina. Pridelujemo jo tudi v farmakološke namene, predvsem za pridobivanje rutina iz zeli (Kreft I, 1995). Ajda ne spada v družino trav, kot druga žita.

Cvetoča ajda jasno kaže, da ni sorodnica s travami (Slika 1).



Slika 1: Cvetoča ajda (Botanik online, 2010)

Ajda je dvokaličnica iz družine dresnovk (*Polygonaceae*), je sorodnica rabarbare, k žitom jo štejemo zaradi uporabnosti njenih semen. Ajde ne uvrščamo med trave (Preglednica 1). Po strukturi in sestavi ploda je podobna žitom. Ajda raste na revnih tleh, ne potrebuje sredstev za varstvo rastlin, niti gnojenja, zato je primerna za ekološko kmetovanje.

Preglednica 1: Sistematika navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) (Sistematika ..., 2010)

Superkraljestvo	EUCARYOTA	Ekvarionti
Kraljestvo	PLANTAE	Rastline
Organizacijski tip	TRACHEOPHYTA	Cevnice, brstnice
Deblo	SPERMATOPHYTA	Semenovke
Poddeblo	MAGNOLIOPHYTINA	Kritosemenke
Razred	ROSOPSIDA	Prave dvokaličnice
Podrazred	CARYOPHYLLIDAE	Kariofilide
Družina	POLYGONACEAE	Dresnovke
Rod	<i>FAGOPYRUM</i>	Ajda
Vrsta	<i>esculentum</i>	Navadna ajda

Ajda zaradi hitrega vznika in rasti preprečuje rast plevelom (Kreft, Petr, 1995, Kalinova in Moudry, 2003). Ima epigejični razvoj in kali pri temperaturi 10 stopinj Celzija (Ličen, 2004). Rastlina zraste do 60 centimetrov visoko in ima pecljate, srčaste liste. Steblo je rdeče, cvetovi so beli do rožnato obarvani in zbrani na koncu stebela v pakobulih in latih. Ajda vsebuje veliko vlaknin in ima najbolj harmonično sestavo beljakovin. Je dober vir flavonoidov - rutina. Proteini v ajdi so visoko kakovostni, vsaj vsebujejo vseh osem esencialnih aminokislin, vključno lizin. Ajda zavzema tudi pomembno mesto v brez glutenski dieti bolnikov s celiakijo.

2.1.1 Pridelovanje ajde

Področje razširjenosti ajde v svetu je zelo ozko. Proti jugu je omejeno z visokimi temperaturami, proti severu pa z nizkimi temperaturami. Seme kali pri 5 stopinjah Celzija, rastline pa vznikajo na temperaturi 7-8 stopinj Celzija. Pri nižjih temperaturah rastline propadejo, ker je ajda zelo občutljiva na mraz in je to eden glavnih razlogov za nižje pridelke pri poznejši setvi. Optimalna temperatura za rast ajde je od 13-26 stopinj Celzija. Ajda ima velike potrebe po talni in zračni vlagi. Posebej velike potrebe po vlagi ima v času cvetenja, oplodnje in polnjenja zrn. Pomanjkanje vlage v tem obdobju zmanjša število oplojenih cvetov, veliko število cvetov se posuši in odpade, ostala zrna pa se slabše polnijo. Ajda je skromna rastlina, za svojo rast in razvoj ne potrebuje posebej pripravljenega zemljišča. Raste tudi v najbolj revnih tleh ali pa tam, kjer druge rastline ne uspevajo več ali pa slabo.

Ajdo poznajo vsepovsod po Sloveniji, v osrednji Sloveniji ji pravijo ajda, v Goriških brdih jo poznajo pod imenom jajda, v Beli krajini kot hejda, na Dravskem polju in v Prlekiji je poznana kot ajdina in hajdina, v Prekmurju pa je idina (Cortese, 2007).

2.1.2 Prehranski pomen ajde

Ajda je vsestransko uporabna kulturna rastlina. Naši strokovnjaki so požlahtnili več novih sort kot so 'Darja', 'Darina', 'Siva I', 'Siva II', 'Rana' in druge. Škrob spada med glavne endogene faktrje, ki so odgovorni za prehranske značilnosti ajde (Kreft I., 1995). Zrno ajde je bogato s škrobom, proteini, minerali, antioksidanti in aromatičnimi snovmi (Preglednica 2). V ajdi je zmerna količina rudnin, kot sta magnezij in mangan. Vsebuje tudi vitamine B skupine, od drugih škrobnih semen pa ajda najbolj izstopa po vrednosti flavonoidov. Največ vsebuje rutina. Izjemno je pomembna njegova velika vsebnost (3-10% v suhi snovi), ki je pomemben predvsem iz farmakološkega vidika.

Ajdovi cvetovi nam dajejo odličen med. Ajdina moka je vsestransko uporabna in manj kalorična kot druge moke iz žit. Iz nje pripravljamo ajdine palačinke, ajdin kruh, ajdine testenine (krapi, žlikrofi, sloviti japonski rezanci), ajdova kaša, ajdovi žganci, ajdina polenta in druge. Na Kitajskem so že dolgo znane ajdine testenine. Kitajci iz tatarske ajde pridobivajo kis. V zeli ajde najdemo antioksidante in fagopirine (Preglednica 2).

Preglednica 2: Sestava ajde (Wikipedia, 2010)

DEL RASTLINE	SESTAVA	OPIS
SEME	ŠKROB	71-78% v kaši 70-91% v različnih tipih moke Škrob je sestavljen iz 25% amiloze in 75% amilopektina
	BELJAKOVINE	18% z biološko vrednostjo nad 90%, velika je vsebnost esencialnih aminokislin- lizin, teroin, triptofan
	MINERALI	Vsebuje veliko železa (60-100 ppm), cinka (20-30 ppm) in selena (20-50 ppb)
	ANTIOKSIDANTI	100-200 ppm rutina in 0,1-2% tanina
	AROMATIČNE SNOVI	Saliciliadehid je najbolj značilna sestavina ajdinega vonja
ZEL	ANTIOKSIDANTI	1-10% rutina in 1-10% tanina
	FAGOPIRIN	0,4-0,6 mg/g fagopirina

Ajdova semena pred zaužitjem namakamo v vodi. Užitni so tudi mladi poganjki ajde, najsi bo tisti z njive, ali vzgojeni v posodi. Ker vsebujejo živahno združbo bioaktivnih snovi, so primerna poživilna hrana za zimski čas. Lahko prebavljiva ajda po biološki vrednosti beljakovin presega vse vrste žit, vsebuje pa tudi od 2-3 krat več aminokislin.

Seme ajde vsebuje veliko rutina, posebne zaščitne snovi, ki krepijo ožilje, uravnavajo krvni tlak in podobno. Seme in zelene rastline ajde so uporabne za živalsko krmo, zeleno gnojenje in kot dragocena paša za čebele v avgustu in septembru.

Ajda surova ni užitna, zato jo je potrebno pred zaužitjem predelati, pripraviti in skuhati (Vadnal in Kreft, 2002). Za ajdov čaj pobiramo cvetoče rastline brez korenin. Farmakološka oznaka za zel ajde je *Fagopyri herba*. Prehranska vrednost ajde v primerjavi s pravimi žiti je zelo velika, vendar pa variira predvsem v odvisnosti od dodelave pridelka. Ajdova luska je zelo trda, seme pa krhko. Izkušnje mnogih so pokazale, da se najenostavneje olušči predkuhana ajda, seveda je pri tem pomembno to, da se semena napnejo in zato luska počí. Med prekuhavanjem se spremenita tudi barva in aroma semena, ki postane temnejše in dobi značilno ajdovo aromo, ker pa je bilo to že toplotno obdelano, moramo vedeti, da tako seme ni več kaljivo. Neoluščena ajdova semena dobro kalijo, zaradi lupine jih ne moremo uživati kot kalčke, zato pa lahko iz nakaljene neoluščene ajde pridelamo zelenčke (Cortese, 2007). Kaljiva so le oluščena ajdova zrna, če so hladno oluščena. Tukaj je posebnost čas namakanja oluščenih semen, dovolj je že 15-20 minut. Nakaljena semena so primerna za prehrano, ko je kalček dolg od 1-2 centimetra.

2.1.2.1 Vlakinine

V semenu ajde na vsebnost vlaknin vplivajo genetski in okoljski dejavniki. Vsebnost vlaknin je 5-11%, od tega 20-30% topnih vlaknin (Zheng in sod., 1998). Z vlakninami izredno bogati so tudi ajdovi otrobi (13-16%).

2.1.2.2 Maščobe

Zrna slovenske sorte 'Siva' vsebujejo 3,0% maščob v suhi snovi, oluščena pa 3,2% (Javornik in sod., 1981). V zrnju ajde naj bi bilo okoli 3% maščob, v otrobih okoli 7%, v moki pa okoli 2% maščob (Bonafaccia in sod., 2003).

2.1.2.3 Vitamini in minerali

Ajdino seme je dober vir esencialnih mineralov in vitaminov. Veliko teh se nahaja pod lusko semena. Ajda vsebuje veliko cinka, magnezija in bakra v primerjavi z žiti (Steadman in sod., 2001). V ajdi je veliko vitamina B1 (tiamin), B2 (riboflavin) in B6 (piridoksin) (Bonafaccia in sod., 2003).

2.1.2.4 Fenolne spojine

Glavne skupine fenolov so: flavonoidi, fenolne kisline in kondenzirani tanini. V semenu ajde so tanini povezani z monosaharidi, fruktozo in glukozo v tanin - karbohidratni kompleks (Luthar in Tišler, 1992). V ajdi se nahaja tudi odličen antioksidant - rutin. Flavonoidi imajo pomembno vlogo pri zaščiti rastlin pred ultravijoličnimi žarki, zato jih rastline sintetizirajo. Od sorte, rastnih razmer in faze razvoja rastline, je odvisna vsebnost in sestava flavonoidov v rastlini. Ker je ajda tujeprašna in heterozigotna rastlina, se vsebnosti rutina lahko razlikujejo med sortami in razlike se pojavijo tudi znotraj iste sorte (Kreft S. in sod., 1999).

2.1.2.5 Proteini

Proteini v ajdi so visoko kakovostni, vsaj vsebujejo vseh osem esencialnih aminokislin. Proteini ajde so v prehranskem pomenu pomembni, zaradi njihove odlične sestave (Kreft I., 1995) in posledično tudi zaradi njihove velike biološke vrednosti, ki je veliko večja od biološke vrednosti žitnih proteinov (Škrabanja in sod., 2000). Ajda vsebuje toliko proteinov kot pšenica, okrog 12% (Eggum in sod., 1981). Ajdine beljakovine naj bi imele veliko hranilno vrednost. Kayashita in sodelavci (1999), so ugotovili, da so v primerjavi s sojinimi beljakovinami, ekstrati ajdovih beljakovin občutno zmanjšali koncentracijo holesterola v jetrih pri podganah. Količina založnih proteinov je približno med 6,5% in 33% celotnih proteinov semena (Radović in sod., 1996).

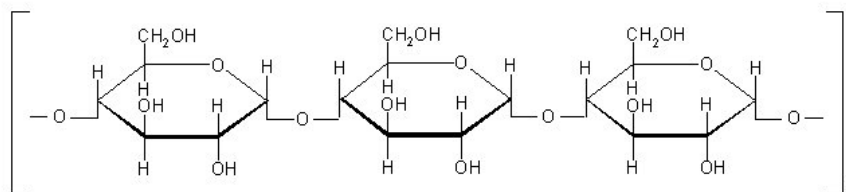
Beljakovine ajde imajo med žiti najmanjšo prebavljivost - 79,9% (Eggum, 1980). Proteini ajde lahko preprečijo nastanek žolčnih kamnov, ovirajo razvoj raka na dojkah. Vsi ti pozitivni učinki proteinov so posledica njihove manjše prebavljivosti (Ikeda in sod., 1986). Prebavljivost proteinov pa je določena s snovmi, ki ovirajo prebavo. Pri ajdi biološki izkoristek beljakovin pri presnovi presega 90%, medtem ko je pri ostalih žitih 50%. Najbolj zastopani med beljakovinami so kakovostni globulini. Zaradi velike vsebnosti esencialnih aminokislin (8,6-9,3% od skupne količine aminokislin) ter predvsem visoke koncentracije lizina v semenu, so beljakovine ajde v primerjavi s pravimi žiti bolj uravnotežene in z večjo prehransko vrednostjo. V povprečju vsebuje seme ajde med 11% in 15% zelo kakovostnih ter rahlo prebavljivih beljakovin.

2.1.2.6 Škrob

Škrob je glavni polisaharid v zelenih rastlinah. Njegova kemična formula je $C_6H_{10}O_5$, sestava pa je prikazana na sliki 2. Kemično ga sestavljata dve strukturni komponenti: amiloza in amilopektin. V semenu ajde je od ogljikovih hidratov največ škroba, njegova vrednost pa se giblje med 67%-75% v suhi snovi, od tega je 23% amiloze (Škrabanja in Kreft I., 1998a). Škrobna zrna so majhna in merijo od 3 do 8 μm (Kreft I., 1995). Škrob ima 25% amiloze in 75% amilopektina. V odvisnosti od načina toplotne obdelave lahko vsebuje od 7%-37% rezistentnega škroba. Mesto odlaganja škroba je popolnoma ločeno od mesta odlaganja saharoze, nahaja pa se v plastidih, tako v kloroplastih v listih in v amiloplastih. Škrob je α - glukan, kar pomeni da sta dva tipa molekul škroba prisotna v rastlinah. Amiloza je molekula, ki se v vodnih raztopinah nagiba k oboritvi v kristalno obliko. Vsebuje nekaj tisoč enot α -glukozila. Število molekul amiloze je heterogeno in lahko zelo variira. Drug tip ali komponenta škroba je amilopektin, ki tvori gelu podobno raztopino. Za ajdov škrob je bilo ugotovljeno da ima karakteristično A strukturo (Zheng in sod., 1998). Škrob se akumulira v granulah, ki se pri različnih rastlinskih vrstah razlikuje po obliki in velikosti.

Lastnosti škrobovih granul pa določata prisotnost amiloze in amilopektina. Tvorba škroba v kloroplastih pa se pojavi v času fotosinteze. Škrabanja in Kreft (1998a), sta določila prisotnost rezistentnega škroba. Rezistentni škrob pride neprebavljiv v debelo črevo, kjer se pod vplivom encimov mikroorganizmov razgradi na kratke maščobne kisline, ki so velikega pomena za zdravje ljudi (Škrabanja in sod., 2001). Ajda je primerno živilo za ljudi s sladkorno boleznijo, zaradi zgoraj naštetih lastnosti škroba (Škrabanja in sod., 1998). Razgrajevanje škroba v fotosinteznih in ne fotosinteznih skladiščnih tkivih se razlikuje po dinamiki tokov in njegove regulacije, čeprav oba v kvalitativnem smislu vključujeta podobne encimske reakcije. V amiloplastih zrelih skladiščnih tkiv, kot na primer v semenih in gomoljih, je znatno število encimov, ki razgrajujejo škrob. V fotosinteznem tkivu pa je razgrajevanje škroba proces, ki v določeni meri poteka ves čas v sorazmerju z biosintezo škroba.

S procesom fotosinteze rastlina iz vode, ki jo črpa iz zemlje in ogljikovega dioksida, ki ga dobiva iz zraka, v listnih celicah proizvaja škrob. Ponoči se proizvodnja škroba ustavi, ker je za njegovo tvorbo v rastlinah nujno potrebna sončna energija. Del škroba se s pomočjo encimov razgradi v glukozo, ki jo celica potrebuje za lastno presnovo, pridobivanje energije in sintezo drugih snovi, ostanek pa se shranjuje. Do jutra listne celice oddajo večino škroba in so pripravljene na ponovno sintezo.



Slika 2: Kemijski prikaz škroba (Kemijski ...,2010)

3 MATERIAL IN METODE DELA

Poskus je bil sestavljen iz dveh delov. V prvem delu poskusa smo spremljali rast in razvoj ajde sorte 'Siva' ter njeno bujnost. Ajdo smo posejali na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani Oddelka za agronomijo. Poskus je potekal tri mesece. V tem času smo odstranjevali liste mladih rastlin in vodili dnevnik razvoja ter rasti. Mlade liste smo tehtali, ter merili njihovo dolžino in širino. Dnevnik rasti in razvoja, dolžine ter širine listkov, so prikazane v naslednjem pod poglavju.

Odstranjevanje listov je potekalo med enajsto in dvanajsto uro v dopoldanskem času, saj je po ugotovitvah znanstvenikov sončna energija takrat najmočnejša in s tem pojav škroba bolj izrazit. Liste smo tehtali, merili dolžino in širino, ter pripravili za zamrzovanje. Shranjevanje listov v zamrzovalniku je potekalo na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo in fiziologijo rastlin Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Drugi del poskusa SDS-PAGE elektroforeza je potekal na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

3.1 DNEVNIK RASTI IN RAZVOJA AJDE

22.5.2008 smo na pripravljeno zemljišče posejali ajdo. Po zemljišču je bila položena črna folija, katera je varovala posevek pred pleveli, ki bi ovirali rast ajde. Sejali smo po deset do petnajst semen. Po končani setvi smo zemljišče zalili z vodo. Teden dni kasneje, 3.6.2008, so bile že opazne mlade rastlinice ajde. Velike so bile okoli sedem centimetrov. Vzklila so skoraj vsa semena, ki smo jih posejali. Zaradi vročine so bile mlade rastlinice nekoliko polegale, vendar so si po zalivanju z vodo opomogle. Čez nekaj dni – 11.6.2008 se je ajda lepo začela razraščati. Opazili smo rdečkasto obarvanost stebel, srčasto - puščičaste liste ter poraščenost posevka z nekaterimi pleveli kot sta slak in gabez. Še večje razlike pri ajdi pa smo opazili slab teden kasneje, 19.6.2008. Rastline so bile visoke že skoraj 30 centimetrov, tudi sedaj so bila stebila obarvano rdeče in izraženi srčasto-puščičasti listi. Opazili smo prve nastavke cvetov.



Slika 3: List navadne ajde (19.6.2008)

Slika 3 nam prikazuje list navadne ajde. 19.6.2008 smo pričeli s prvim pobiranjem listov ajde. Pobiranje listov, meritve ter tehtanje smo izvedli devetkrat, od 19.6 pa do 20.8.2008. Od vsake rastline smo odstranili po tri liste, ki so bili najbolj izpostavljeni soncu. Začeli smo s prvimi meritvami in tehtanjem listov, ki so potekale v laboratoriju. Za povprečno težo listov, smo tehtali vse tri liste skupaj. Pri merjenju dolžine nismo upoštevali pecljevine lista.

Teža treh listov na dan 19.6.2008 je znašala 1,4181 grama. Velikosti vzorčnih listov pa so:

1. LIST: širina: 5,2 centimetra; dolžina: 5,8 centimetra
2. LIST: širina: 4,5 centimetra; dolžina: 5,4 centimetra
3. LIST: širina: 6,1 centimetra; dolžina: 5,7 centimetra

27.6.2008 je bila ajda v polnem cvetenju. Imela je lepo izražene belo rožnate cvetove, okoli katerih je bilo polno čebel. Spodnji del stebela je bil zelo močno rdeče obarvan, proti vrhu pa se je rdeča barva izgubljala in se je rdeča barva prelila v zeleno. Skozi folijo katero smo predhodno položili po zemljišču med posevkom ajde, so klili pleveli katere smo odstranili in ajdin posevek dobro opleli ter rahlo okopali zemljišče. Slika 4 prikazuje list in cvet mlade rastline.



Slika 4: List in cvet navadne ajde (27.6.2008)

Teža treh listov na dan 27.6.2008 je znašala 3,8765 grama. Velikosti vzorčnih listov pa so:

1. LIST: širina: 7,9 centimetra; dolžina: 9,4 centimetra
2. LIST: širina: 8,5 centimetra; dolžina: 8,1 centimetra
3. LIST: širina: 8,2 centimetra; dolžina: 10,3 centimetra

7.7.2008 je ajda pridobila na višini. Na ta dan smo izmerili njeno višino, ki je znašala 1 meter. Steblo rastline je bilo vse do vrha obarvano rdeče.

Teža treh listov na dan 7.7.2008 je znašala 1.7236 grama. Velikosti vzorčnih listov pa so:

1. LIST: širina: 5 centimetrov; dolžina: 6 centimetrov
2. LIST: širina: 6,1 centimetra; dolžina: 6,6 centimetra
3. LIST: širina: 6,6 centimetra; dolžina: 5,9 centimetra

Dne 16.7.2008 je ajda dosegla višino 1,20 metra in je še vedno cvetela.



Slika 5: List navadne ajde (16.7.2008)

Teža treh listov na dan 16.7.2008 je znašala 1,0664 grama. Velikosti vzorčnih listov pa so:

1. LIST: širina: 6,1 centimetra; dolžina: 7,5 centimetra
2. LIST: širina: 4,1 centimetra; dolžina: 4,9 centimetra
3. LIST: širina: 4,6 centimetra; dolžina: 4,2 centimetra

23.7.2008 je ajda še vedno cvetela, vendar ne več tako izrazito kot pred tednom dni. Rastlina že odcvita in na nekaterih rastlinah so že opazna sivkasto-rjava zrna.

Teža treh listov na ta dan je znašala 1,1906 grama. Velikosti vzorčnih listov pa so:

1. LIST: širina: 5,5 centimetra; dolžina: 5,6 centimetra
2. LIST: širina: 5,1 centimetra; dolžina: 5,4 centimetra
3. LIST: širina: 4,1 centimetra; dolžina: 4,8 centimetra



Slika 6: Sivkasto-rajava zrna ajde (23.7.2008)



Slika 7: Srčast list navadne ajde (30.7.2008)

30.7.2008 smo opazili rahlo upadlost rastlin, nekatere rastline so še vedno malo cvetele. Po predhodno položeni foliji smo opazili že odpadla semena ajde.

Teža treh listov na ta dan je znašala 1,2940 grama. Velikosti vzorčnih listov pa so:

1. LIST: širina: 5,7 centimetra; dolžina: 6,6 centimetra
2. LIST: širina: 5 centimetrov; dolžina: 5,4 centimetra
3. LIST: širina: 4,7 centimetra; dolžina: 4,9 centimetra

4.8.2008, 13.8.2008 in 20.8.2008 smo še vedno pobirali liste, ajda pa je odcvetela, okrog nje je bilo vse polno semen. 13.8.2008 in 20.8.2008 smo opazili poleganje ajde in venenje. Ob koncu poskusa smo zemljišče očistili, pobrali ajdo, semena ajde ter odstranili folijo.



Slika 8: List navadne ajde (4.8.2008)

Teža treh listov na dan 4.8.2008 je znašala 0,8213 grama. Velikosti vzorčnih listov pa so:

1. LIST: širina: 4,9 centimetra; dolžina: 5,7 centimetra
2. LIST: širina: 4,8 centimetra; dolžina: 4,2 centimetra
3. LIST: širina: 4,1 centimetra; dolžina: 4,5 centimetra

Teža treh listov na dan 13.8.2008 je znašala 0,6950 grama. Velikosti vzorčnih listov pa so:

1. LIST: širina: 3,9 centimetra; dolžina: 4,2 centimetra
2. LIST: širina: 3 centimetre; dolžina: 3,5 centimetra
3. LIST: širina: 3,8 centimetra; dolžina: 4,1 centimetra

20.8.2008 smo zadnjikrat pobrali liste ter opravili meritve in tehtanje. Teža treh listov navedenega dne je znašala 0,7187 grama, velikosti vzorčnih listov pa so:

1. LIST: širina: 3,4 centimetra; dolžina: 3,7 centimetra
2. LIST: širina: 3,6 centimetra; dolžina: 4,2 centimetra
3. LIST: širina: 4,5 centimetra; dolžina: 5,1 centimetra

Vse te dni, ko smo odstranjevali listke in opazovali ajdo ter opravljali meritve, smo spremljali tudi vremenske razmere. Dnevi kot so: 19.6., 27.6., 7.7., 26.7., 30.7. in 4.8.2008 je bilo vreme zelo sončno in vroče. Ostali dnevi, in sicer 23.7., 13.8. ter 20.8.2008 je bilo vreme slabo. Tudi to spremljanje je pripomoglo k naši raziskavi, kar je razvidno iz elektrferograma (slika 10).

3.2 MATERIAL

Biološki material, oziroma semena ajde sorte 'Siva' smo dobili na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, Oddelek za agronomijo. Navadna ajda, sorta 'Siva' je požlahtnjena sorta na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Stebila sorta 'Siva' so se v poskusu obarvala močno rdeče, cvetovi pa so bili izrazito belo - rožnate barve (Slika 9). Semena so bila dokaj majhna in tri robate oblike, srebrno - sive do kostanjeve barve. Semena so zorela enakomerno. Sorta 'Siva' je odporna proti poleganju, slabše pa je odporna proti visoki temperaturi in suši (Kreft I, 1995).



Slika 9: Sorta 'Siva' iz poskusa na Laboratorijskem polju (23.7.2008)

3.3 DELO NA POLJU

Z delom na polju smo pričeli 22.5.2008, ko smo na Laboratorijsko polje Biotehniške fakultete iz domače populacije navadne ajde sorte 'Siva' v pripravljeno zemljišče posejali semena ajde. Zemljišče je obsegalo dva razora dolžine petih metrov in širine enega metra. Ajdo sejemo, ko ni več nevarnosti slane. Za uspešno kalitev je primerna temperatura tal okrog 10 stopinj Celzija. Sejali smo po 10-15 semen skupaj. Ajda za rast ne potrebuje rodovitnih tal, zato dodatno in posebno gnojenje ni bilo potrebno. Deset dni kasneje so se že pojavile prve vzkлите rastline ajde. Rastline so bile vsak teden večje in močnejše, opazili pa smo tudi močno obarvanost stebel in listov. 27.6.2008 je bila ajda v polnem cvetenju. Ajdo smo spremljali tekom njenega razvoja in rasti. Ko so bili listi dovolj razviti smo začeli z odstranjevanjem le-teh. Odločili smo se, da bomo tedensko odstranjevali po tri listke, a le tiste, ki so najbolj izpostavljeni soncu, saj je v njih največja količina škroba.

S prvim odstranjevanjem in shranjevanjem listov smo pričeli 19.6.2008. Liste smo pobirali v dopoldanskem času, okoli enajste oziroma dvanajste ure, zaradi najmočnejše sončne energije in velikega kopičenja škroba v listih, ki je potreben za polnjenje semen. Po tri liste skupaj smo tehtali, vsakemu posebej zmerili dolžino in širino, jih nato shranili v PVC vrečke

ter zamrznili v zamrzovalniku pri – 20 stopinjah Celzija. Zadnje odstranjevanje listov smo izvedli 20.8.2008.

3.4 DELO V LABORATORIJU

V laboratoriju so potekale meritve in tehtanje listov. Tehtali smo povprečno težo treh listov, medtem ko, so meritve potekale za vsak list posebej. Po tri liste skupaj smo shranjevali v PVC vrečke ter jih zamrzovali v zamrzovalniku.

3.4.1 Priprava elektroforeznih vzorcev

Za ugotavljanje pojavljanja proteinov v listih navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench.), je bilo potrebno pripraviti ekstrakcije listov, ki smo jih želeli analizirati.

Pri pripravi vzorcev smo uporabljali ekstrakcijski pufer, katerega sestavine so navadne v preglednici 3.

Preglednica 3: Sestavine ekstrakcijskega pufera (Ličen, 2004)

Sestavine	100 ml	Končna koncentracija
Glicerol	20 ml	20%
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	28 ml	140 mM
Bromofenolmodro	0,01 g	0,01%
2 - merkaptotanol	3 ml	3%
SDS	4 g	4%

3.4.2 SDS-PAGE elektroforeza na poliakrilamidnem gelu

Poliakrilamidna gelska elektroforeza se najpogosteje uporablja za ločevanje proteinov. Za ločevanje proteinov pri SDS-PAGE elektroforezi se kot nosilec uporablja poliakrilamidni gel različnih koncentracij. Poliakrilamidni gel je homogena podpora, ki zmanjšuje difuzijo, elektro-osmozo in še nekatere druge motnje. Skozi gel potujejo manjše molekule lažje in hitreje kot velike, saj deluje kot molekulska sito. SDS - imenujemo ga tudi lavril sulfat:

$H_3C-(CH_2)_{10}-CH_2-OSO_3$, se veže na protein in ga denaturira in prekrije njegov nativni naboj, pri čemer peptidne verige postanejo močno negativno nabite (Creighton, 1993). Elektroforetska mobilnost je definirana kot razmerje med potjo proteina in potjo barvila na gelu. Ločeni proteini se po obarvanju z različnimi barvili pojavijo v obliki črt (Marshall in Inglis, 1986). Elektroforeza je potekala vertikalno na gelu, dimenzije 12 x 14 x 0,1 centimeter. Eno uro je potekala pri električnem toku 40 mA, nato pa še približno tri ure pri 60 mA. Pri elektroforezi teče električni tok v anodni smeri. V elektroforetsko posodo smo nalili posodni pufer 0,025 M TRIS, 0,192 M glicin in 0,1% SDS. Ker je elektroforezo naredila dr. Marija Gregori, je postopek izvedbe elektroforeze opisan po njeni metodi.

Za elektroforezo sta bila pripravljena dva gela, ki sta bila vlita, med prej dobro očiščeni stekli. Naslednji dan, ko se je gel strdil, se je med stekla vstavil glavnik debeline 1 milimeter, ki je služil za oblikovanje prostora v koncentracijskem gelu, kamor so se kasneje nanašali vzorci. Med vstavljanjem glavnika je bila potrebna dodatna pozornost, da pod zarezami glavnika, pri vlivanju koncentracijskega gela niso nastali zračni mehurčki, saj bi le-ti lahko motili potek elektroforeze. Sestavine za pripravo separacijskega in koncentracijskega gela so navedene v preglednicah 4 in 5.

Preglednica 4: Priprava 10% T separacijskega gela (Laemmli, 1970)

Sestavine gela	Količina	Končna koncentracija
Raztopina akrilamida	6,7 ml	10%
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 µl	-

+ Vsakič sveže pripravljen

Preglednica 5: Priprava koncentracijskega gela (Laemmli, 1970)

Sestavina 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 µm	-

+ Vsakič sveže pripravljen

Glavnik smo po določenem času, ko se je gel strdil previdno odstranili in prazni prostorčki so se zalili z nekaj posodnega pufra. V vsak prostorček, smo vlili 15 μ l vzorca.

3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Statistična obdelava podatkov pojavljanja elektroforeznih črt je bila opravljena s programom Excel (Microsoft Co., USA).

4 REZULTATI

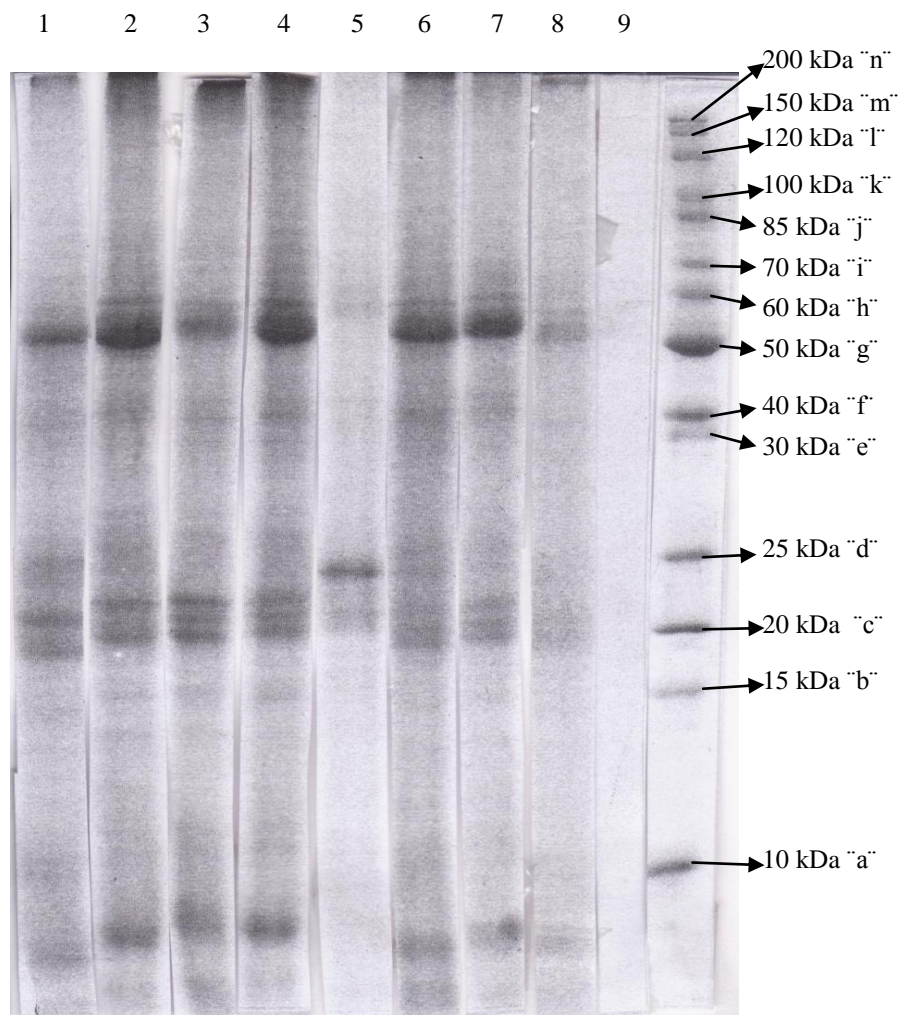
4.1 PROTEINI ZA SINTEZO ŠKROBA

Na elektroforeogramu so vidne dobro in nekoliko slabše obarvane elektroforetske črte različnih intenzivnosti, z oznakami od 1-9 in molekulskih mas od 10 kDa pa do 200 kDa, kar pomeni intenzivnost pojava škroba, ki je potreben za sintezo proteinov (Slika 10). Opaznih je tudi nekaj šibkejše obarvanih elektroforetskih črt, predvsem pri črti "a", "b", "d", "e", "f", "h", "i", "j", "k", "l", "m" in "n". Pri tej raziskavi smo se osredotočili na dobro vidne elektroforetske črte beljakovin, ki se sintetizirajo v listih navadne ajde sorte 'Siva' (*Fagopyrum esculentum* Moench), molekulskih mas od 10 kDa in do 200 kDa. Med vsemi elektroforetskimi črtami sta najbolj intenzivni obarvani črti "c" molekulske mase 20 kDa in "g" molekulske mase 50 kDa (Slika 10). Molekulsko maso elektroforeznih črt smo določili s pomočjo markerja oziroma molekulskega standarda širokega spektra Fermentas, Pageruler Unsaturated Protein Ladder, NO.SMO661 (Preglednica 6).

Preglednica 6: Ocenjena molekulska masa posamezne elektroforetske črte

Elektroforetska črta	Ocenjena molekulska masa (kDa)
"a"	10 kDa
"b"	15 kDa
"c"	20 kDa
"d"	25 kDa
"e"	30 kDa
"f"	40 kDa
"g"	50 kDa
"h"	60 kDa
"i"	70 kDa
"j"	85 kDa
"k"	100 kDa
"l"	120 kDa
"m"	150 kDa
"n"	200 kDa

Slika 10: SDS-PAGE elektroferogram proteinov za sintezo škroba v listih ajde (Lastna dokumentacija, 2008)



SDS-PAGE elektroferogram (Slika 10) proteinov za sintezo škroba v listih ajde, nam prikazuje elektroforetske črte z oznakami od "a" do "n". Vsaka ima ocenjeno molekulsko maso, ki se giblje od 10 kDa pa do 200 kDa. Vzorci analiziranih listov so na elektroferogramu označeni s številkami od 1-9. Vsaka številka pomeni oziroma označuje tudi datum pobiranja listov. Številka 1 nam prikazuje dan pri datumu 19.6.2008. Tukaj opazimo, da se je intenzivnost pojava škroba najbolj izrazila pri elektroforezni črti z oznako "c" pri 20 kDa, nekoliko slabše izražen je pri črti "d" pri 25 kDa in pri črti 50 kDa. Pri vseh ostalih črtah "a", "b", "d", "e", "f", "h", "i", "j", "k", "l", "m" in "n" pri tem datumu ni

opaznega intenzivnega izražanja škroba. S številko 2 smo označili dan 27.6.2008, pri katerem so najbolj izražen črte "c" pri 20 kDa in "g" pri 50 kDa, ter črti "m" pri 150 kDa in "n" pri 200 kDa. S številko 3 smo označili datum 7.7.2008. Na ta dan se je škrob najbolj izrazil pri črti "c" katera ima določeno molekulsko maso 20 kDa, nekoliko slabše je izražen pri molekulski masi 25 kDa črta "d", ravno tako pri črtah "e" in "f" z molekulskimi masami 30 kDa in 40 kDa. Zopet se intenzivnost pojavi pri črti "g" z molekulsko maso 50 kDa. Vse ostale črte pa so slabo izražene. Pod številko 4 je označen datum 26.7.2008. Na ta dan se je škrob najbolj izrazil pri črti "c" z molekulsko maso 20 kDa, črti "f" z molekulsko maso 40 kDa, črti "g" z molekulsko maso 50 kDa, pri ostalih črtah pa nekoliko slabše. Datum 23.7.2008 smo označili s številko 5. Pri tem datumu se je škrob nekoliko izrazil pri elektroforezni črti "d" z molekulsko maso 25 kDa. Pri vseh ostalih črtah se ni dobro izrazil oziroma ni viden. 30.7.2008 smo označili s številko 6. Tukaj smo opazili, da se je škrob najbolj izrazil pri črti "g" z molekulsko maso 50 kDa. Nekoliko manj je izražen pri črti "c" z molekulsko maso 20 kDa. Pri ostalih elektroforeznih črtah pa ni opazen. Dan 4.8.2008 smo označili s številko 7. Na ta dan se je škrob izrazil pri črti "c" z molekulsko maso 20 kDa, najbolj pa se je izrazil pri črti "g", ki ima molekulsko maso 50 kDa. Slabo je opazen tudi pri črti "f" z molekulsko maso 40 kDa. Ostale elektroforezne črte se niso dobro izrazile. Pod številko 8 smo označili datum 13.8.2008. Na ta dan se je škrob zelo slabo izrazil. Nekoliko je viden pri črti "c" z molekulsko maso 20 kDa in pri črti "g" z molekulsko maso 50 kDa. Ostale črte so bile zelo slabo izražene oziroma skoraj neopazne. Pod številko 9 smo označili datum 20.8.2008. Pri tem dnevu se škrob ni izrazil oziroma na elektroferogramu ni viden.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V tem diplomskem delu smo želeli ugotoviti, kdaj se pojavi največ proteinov, ki pripomorejo k sintezi škroba v listih navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench), saj je škrob potreben za polnjenje semen. S pomočjo SDS-PAGE elektroforeze smo poskušali ugotoviti, kdaj je bila intenziteta proteinov največja in to tudi dokazali.

Prvi del poskusa smo izvedli na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani (Oddelek za agronomijo), kjer smo uspešno posejali navadno ajdo (*Fagopyrum esculentum* Moench). Drugi del poskusa je potekal v laboratoriju na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so potekale meritve listov in tehtanje. Tretji del poskusa smo izvajali na isti katedri kot v drugem delu, kjer je potekala izvedba SDS-PAGE elektroforeze. Izvedbo je vodila in izvajala dr. Marija Gregori.



Slika 11: Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) (23.7.2008)

V diplomskem delu navajamo, da smo na podlagi elektroforeze (Slika 10), ugotovili, da so na elektroferogramu obarvane elektroforetske črte različnih intenzivnosti obarvanja, kar nam predstavlja pojav proteinov potrebnih za sintezo škroba, ki se kopiči v listih in pripomore k polnjenju semen. Opazne so tudi šibke črte, 23.7.2008 in 20.8.2008. Pri tej raziskavi smo se osredotočili na dobro vidne elektroforetske črte beljakovin, ki se sintetizirajo v listih, molekulskih mas od 10 kDa pa do 200 kDa.

V tem diplomskem delu smo s pomočjo SDS-PAGE elektroforeze, ki jo je vodila dr. Marija Gregori, ugotovili, kdaj je bila intenzivnost škroba najbolj izrazita. Ugotovili smo tudi, da se pri datumih 5 (23.7.2008) in 9 (20.8.2008) intenzivnost ni dovolj izrazila, kar pomeni da je sončna energija pomemben dejavnik, ki sodeluje pri polnjenju semen.

6 POVZETEK

Škrob spada med glavne endogene faktorje, ki so odgovorni za sestavne značilnosti ajdovih izdelkov (Ikeda in sod., 1997). Ajda ne vsebuje glutena, zato je cenjena dietna hrana za ljudi, ki so občutljivi na gluten - celiakija. V zrnju ajde pa je od vseh ogljikovih hidratov največ ravno škroba.

Poskus je bil sestavljen iz dveh delov. V prvem delu poskusa meseca maja 2008, smo posejali semena ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench). Drugi del poskusa smo izvajali v laboratoriju, kjer je potekala SDS-PAGE elektroforeza beljakovin za sintezo škroba v listih ajde. Tekom vegetacije smo spremljali rast in razvoj rastlin, hkrati pa pobirali različne vzorce listov ob določenem času. Skozi ves čas poskusa smo vodili dnevnik. S pomočjo SDS-PAGE elektroforeze po Laemmliju (Laemmli, 1970), smo dokazali pojav potrebnih proteinov za sintezo škroba v listih ajde. Najmočnejša intenziteta beljakovin potrebnih za sintezo škroba je bila pri 50 kDa, pri skoraj vseh analiziranih listih, označenih s številkami od 1 do 9, katere označujejo tudi datum pobiranja listov. Med posameznimi analiziranimi listi smo opazili razlike le v obarvanju elektroforetskih črt in v pojavu proteinov. Pri nekaterih analiziranih listih na elektroferogramu nismo opazili pojava proteinov oziroma so slabo vidni. Sončna energija je po raziskavah znanstvenikov tudi dejavnik, ki pripomore k intenziteti škroba v listih, kar smo dokazali tudi v tem diplomskem delu, saj je pojav proteinov izražen ali pa slabo izražen. Vse to je bilo odvisno od vremenskih razmer in je razvidno na elektroferogramu. Pri tem opažamo, da je sončna energija po raziskavah res pomemben dejavnik pri polnjenju semen, saj je bila intenziteta pojava škroba najmočnejša v lepem vremenu. S temi ugotovitvami smo potrdili naša predvidevanja in pripomogli k prihodnjim raziskavam o ajdi in njeni pridelavi.

7 VIRI

Creighton T.E.1993. Proteins studies, structures and molecular properties. 2rd ed., New York, Freeman W.H. and Company: 512 str.

Cortese D., Semena tretje moči. 2007. Ljubljana, Kmečki glas, 112: 89-93

Bonafaccia G., Marocchini M., Kreft I., 2003. Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. Food Chemistry, 80: 8-17

Botanik online. 2010. Cvetočja ajda.

[http:// www.biolib.de](http://www.biolib.de) (maj 2010)

Eggum B. O., Kreft I., Javornik B., 1981. Chemical composition and protein quality of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). Qualitas Plantarum - Plant Foods for Human Nutrition, 30: 175-179

Eggum B.O. 1980. The protein quality of buckwheat in comparison with other sources of plant and animal origin. V: Buckwheat, symp. Ljubljana, Sept. 1-3: 115-120

Ikeda K., Oku M., Kusano T., Yasumoto K. 1986. Inhibitory potency of plant nutrients towards the in vitro digestibility of buckwheat protein. Journal of Food Science, 51: 1527-1530

Ikeda K., Kishida M., Kreft I., Yasumoto K. 1997. Endogenous factors responsible for the textural characteristic of buckwheat products. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 43:101-111

Javornik B., Eggum B. O. in Kreft I. 1981. Studies on protein fractions and protein quality of buckwheat. Genetika, 13, 2: 115-121

Kreft S., Knapp M., Kreft I. 1999. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 490-496

Kreft I. 1995. Ajda, Ljubljana. Kmečki glas: 112 str.

Kuhar B. 1976. K problematiki proučevanja ajde v ljudski prehrani Slovenije. Zdravstveno varstvo, 15, Suppl. 1: 15-19

Kayashita J., Shimaoka I., Nakajoh M., Kishida N., Kato N. 1999. Consumption of a buckwheat protein extract retards 7,12-dimethylbenz α anthracene-induced mammary carcinogenesis in rat. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 63: 1837-1839

Kalinova J., Moudry J. 2003. Evaluation of frost resistance in varieties of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). Plant, Soil and Environment, 49, 9: 410-413

Kemijski prikaz škroba. 2010.

<http://www2.arnes.si/~sspzkola/ogp.htm> (14.3.2010)

Ličen M. 2004. Polimorfizem beljakovin endosperma pri križancih ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench). Dipl. delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, 36 str.

Luthar Z., Tišlar V. 1992. Tanin-carbohydrate complex in buckwheat seeds. (*Fagopyrum esculentum* Moench). Fagopyrum, 12: 21-26

Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685

Marshall R.C., Inglis A.S. 1986. Practical Protein Chemistry: A Handbook. Darbre A., (ed.), John Wiley and Sons. Ltd.: 13 str.

Petr J. 1995. Buckwheat and proso miller production. V: Metodiky pro Zavedeni Vysledku Vyzkumu do Zemedelske Praxe, 7: 35

Radović S.R., Maksimović V.R., Varkonji-Grašič E.I. 1996. Characterization of buckwheat seed storage proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 972-974

Sestava ajde. Wikipedia 2010.

<http://sl.wikipedia.org/wiki/Ajda> (17.5.2010)

Sistematika navadne ajde 2010.

<http://www.bf.uni-lj.si/biologija> (18.4.2010)

Steadman K. J., Burgoon M.S., Lewis B.A., Edwardson S.E. in Obenford R.L. 2001. Buckwheat seed milling fractions: description, macronutrient composition and dietary fibre. *Journal of Cereal Science*, 33: 271-278

Škrabanja V., Kreft I. 1998a. Ajda - njeno mesto v prehrani. *Sodobno kmetijstvo*. št: 50-54

Škrabanja V., Laerke H.N., Kreft I. 2000. Protein-polyphenol interactions and in vivo digestibility of buckwheat groat proteins. *Pflugers Archiv – European Journal of Physiology*, 440: R129-R131

Škrabanja V., Lijeberg Elmstahl H. G., Kreft I., Bjorck I. M. E. 2001. Nutritional properties of starch in buckwheat products: studies in vitro and vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 490-496

Vadnal K., Kreft I. 2002. Economic botany of buckwheat pap in Slovenia. *Fagopyrum*, 19: 95-100

Zheng G. H., Soluski F. W., Tyler R.T. 1998. Wet - milling, composition and functional properties of starch and protein isolated from buckwheat groats. *Food Research International*, 30,7: 493-502

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju akad. prof. dr. Ivanu Kreftu za pomoč in koristne nasvete pri izvedbi diplomskega dela ter somentorici doc. dr. Mateji Germ in prof. dr. Zlati Luthar.

Posebna zahvala gre dr. Mariji Gregori, ki je poskrbela za izvedbo elektroforeze.

Svojim staršem za brezpogojno pomoč in podporo med študijem, Martinu P., in vsem ostalim, ki so kakorkoli pomagali pri izvedbi diplomskega dela.