

---

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN – POLONIA

VOL. LXII (1)

SECTIO E

2007

---

Katedra Chemii Akademii Rolniczej w Lublinie, ul. Akademicka 15, 20-934 Lublin, Poland,  
tel. 081-445-65-86, e-mail:ewa.makarska@wp.pl

\*\*Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Akademii Rolniczej w Lublinie

EWA MAKARSKA\*, DANIELA GRUSZECKA,  
AGNIESZKA GRĄDZIELEWSKA\*\*

**Zawartość alkilorezorcynoli i aktywność inhibitorów tripsyny  
w rodach translokacyjnych żyta i komponentach rodzicielskich  
*Secale cereale* L. i *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy**

The content of alkylresorcinols and trypsin inhibitors activity in translocational  
rye strains and parental components *Secale cereale* L. and *Dasypyrum villosum* (L.)  
P. Candargy

**Streszczenie.** Materiał badań stanowiły 4 rody translokacyjne żyta odmiany Amilo, które otrzymano w wyniku zapylenia odmiany Amilo pyłkiem dzikiego gatunku *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy oraz komponenty rodzicielskie. Analizowano w ziarnie aktywność inhibitorów tripsyny i zawartość alkilorezorcynoli, zaliczanych do związków antyżywniowych. Ziarniaki *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy charakteryzowały się istotnie mniejszą aktywnością inhibitorów tripsyny (0,618 TUI/g) niż żyto (2,38 TUI/g). Aktywność antytrypsynowa w ekstraktach z ziarniaków wszystkich analizowanych rodów była istotnie większa (nawet kilkakrotnie) w porównaniu z komponentami rodzicielskimi. Z kolei największą zawartość alkilorezorcynoli spośród wszystkich badanych form stwierdzono, w *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy. W ziarniakach trzech badanych rodów translokacyjnych poziom tych związków był pośredni pomiędzy komponentami rodzicielskimi, a w jednym był niższy niż u obu form rodzicielskich.

**Słowa kluczowe:** *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy, *Secale cereale* L., krzyżowanie oddalone, rody translokacyjne, alkilorezorcynole, inhibitory tripsyny

WSTĘP

Hodowcy zbóż poszukują nowych źródeł zmienności wśród traw, które mogą być donorami korzystnych cech z punktu widzenia rolniczego. W tym celu m.in. wykonuje się krzyżowanie oddalone, połączone z krzyżowaniem wypierającym niekorzystne geny z odmiany uprawnej i selekcją, które prowadzą do uzyskania odpowiedniego poziomu cech użytkowych w mieszańcach. Możliwe jest otrzymanie form lepszych od komponentów rodzicielskich pod względem odporności na niektóre choroby, suszę, wymarza-

nie, a także o lepszej jakości ziarna [Gruszecka i in. 2001, Gruszecka i Pietrusiak 2003, Gruszecka i in. 2004].

Niezbędne jest więc poznanie charakterystyki biochemicznej oraz aktywności biologicznej ziarna translokacyjnych form żyta, determinujących ich dalsze wykorzystanie gospodarcze. Na dostępność i metabolizm składników pokarmowych w organizmach zwierząt mają wpływ m.in. inhibitory trypsyny i alkilorezorcynole, które są fizjologicznie aktywnymi metabolitami wtórnymi występującymi także w ziarnie żyta. Obie grupy związków, ze względu na możliwe skutki ich negatywnego oddziaływania zaliczamy do związków antyżywniowych, stąd ich aktywność i poziom są istotne ze względu na przydatność gospodarczą ziarna żyta.

Celem prezentowanej pracy była analiza aktywności inhibitorów trypsyny i zawartości alkilorezorcynoli w ziarnie 4 rodów translokacyjnych żyta odmiany Amilo, które otrzymano w wyniku zapylenia odmiany Amilo pyłkiem dzikiego gatunku *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy oraz u komponentów rodzicielskich.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiły 4 rody translokacyjne żyta odmiany Amilo, które otrzymano w wyniku zapylenia odmiany Amilo pyłkiem dzikiego gatunku *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy oraz komponenty rodzicielskie. Ród 1 – CZR 1010 charakteryzował się wyższym plonowaniem w porównaniu z odmianą Amilo, ród 2 – CZR 1012 odznaczał się omszonym dokłosem i wysoką zawartością białka w ziarnie, ród 3 – CZR 1013 charakterystyczną „żółtą wstawką” pod kłosem, a ród 4 – CZR 916 karłowatością i wysoką zawartością białka w ziarnie. Wymienione rody wyselekcjonowano na podstawie korzystnych wartości pod względem elementów plonowania oraz analizy molekularnej [Gruszecka i Miąc 2002, Gruszecka i Pietrusiak 2003, Miąc 2004].

Zawartość alkilorezorcynoli badano w ekstraktach acetonowych po utworzeniu barwnego kompleksu z dwuazowaną p-nitroaniliną ( $\lambda = 435$  nm). Do sporządzenia krzywej standardowej stosowano orcyzol (5-metylo-1,3-dihydroksobenzen) firmy Sigma.

Aktywność antytrypsynową oznaczono metodą Kakade i in. [1974] wg modyfikacji Polanowskiego [1976], stosując jako substrat kazeinę w buforze fosforanowym (pH 7,6). Do sporządzenia krzywej standardowej stosowano trypsynę firmy Sigma. Aktywność antytrypsynową określono w ekstraktach, które uzyskano przez wymieszanie 2 g mąki i 20 cm<sup>3</sup> buforu octanowego (pH 4,5–4,7), przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 1 godzinę, a następnie odwirowanie. Do oznaczenia aktywności pobierano 0,2 cm<sup>3</sup> przygotowanego ekstraktu.

Wyniki opracowano statystycznie, a weryfikacje różnic między średnimi dla rodów i form rodzicielskich uzyskano metodą analizy wariancji i wielokrotnych przedziałów ufności *T*–Tukeya.

#### WYNIKI I DYSKUSJA

Lipidy rezorcynolowe zlokalizowane są w okrywie owocowo-nasiennej ziarna zbóż. W ziarnie żyta występują w większych ilościach w porównaniu z pszenicą i pszenżytem i są to głównie homologi o C<sub>17</sub> i C<sub>19</sub> [Kaczmarek i Tłuścik 1984, Makarska 1994].

Dla ziarna żyta odmiany Amilo poziom tych związków wynosił średnio  $654 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (tab. 1). Spośród badanych form, dziki gatunek *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy charakteryzował się najwyższą zawartością alkilorezorcynoli, która wynosiła średnio  $812 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Ma to zapewne związek z rozmieszczeniem tych związków w ziarniaku i proporcji kutykule zewnętrznej do całej jego masy. W ziarnie rodów translokacyjnych poziom tych związków był istotnie niższy od *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy, jednego z komponentów rodzicielskich. W translokacyjnym rodzie 3 niższy poziom alkilorezorcynoli wystąpił także w stosunku do c.v. Amilo, drugiego komponenta rodzicielskiego.

Z badań nad genetyczną zmiennością alkilorezorcynoli w liniach wsobnych żyta wynika, że oszacowany czynnik genetyczny zmienności jest stosunkowo wysoki (dla linii  $h^2 = 0,81$ ) [Kaczmarek i Tłuścik 1984]. Niski poziom tych związków zaliczanych do substancji antyżywniowych w ziarnie przeznaczonym na paszę jest zjawiskiem korzystnym, gdyż lipidy rezorcynolowe, działając hamująco na syntezę triglicerydów, mogą przyczynić się do słabszych przyrostów masy ciała zwierząt [Deszcz i Kozubek 1996]. Funkcje ochronne alkilorezorcynoli u zbóż w stosunku do patogenów (grzyby, owady) oraz właściwości antyoksydacyjne (hamują reakcje indukowane wolnymi rodnikami) wskazują na istotną rolę tych związków w procesach metabolicznych także człowieka [Kamel-Eldin i in. 2000, Struski i Kozubek 1992, Skrzypek i in. 2007].

Tabela 1. Zawartość alkilorezorcynoli i poziom aktywności antytrypsynowej w ziarniakach rodów translokacyjnych i komponentów rodzicielskich (wartości średnie)

Table 1. Content of alkylresorcinols and anti-trypsin activity in translocation strains and parental components kernels (mean values)

Ród/odmiana/gatunek Strain/cultivar/species	Alkilorezorcynole Alkylresorcinols ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	Aktywność antytrypsynowa Anti-trypsin activity ( $\text{TUI} \cdot \text{g}^{-1}$ )
Ród 1	682**	6,16*
Ród 2	694**	5,61*
Ród 3	581*	6,40**
Ród 4	707**	5,57**
Amilo	654	2,38
<i>Dasypyrum villosum</i> (L.) P. Candargy	812	0,618

TUI – Ilość mg trypsyny bydłowej hamowanej przez inhibitor zawarty w 1 g ziarna

\*różnica statystycznie istotna w porównaniu z odmianą Amilo

\*\*różnica statystycznie istotna w porównaniu z *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy

TUI – Amount of bovine trypsin (mg) inhibited by the inhibitor contained in 1 g of grain

\*statistically significant difference as compared to `c.v. Amilo`

\*\*statistically significant difference as compared to *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy

Stwierdzono istotne zróżnicowanie poziomu aktywności antytrypsynowej w ekstraktach z ziarniaków rodów translokacyjnych żyta i komponentów rodzicielskich (tab. 1). Dla żyta cv. Amilo – formy matecznej – średnia aktywność inhibitorów trypsyny wynosiła 2,38 jednostek antytrypsynowych i mieściła się w granicach wartości podanych we wcześniejszych badaniach dla tej odmiany [Makarska i Gruszecka 1998]. Ziarno *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy charakteryzowało się bardzo niską aktywnością tych

polipeptydów (śr. 0,618 TUI). Aktywność antytrypsynowa w ekstraktach z ziarna wszystkich rodów translokacyjnych była wyraźnie wyższa, nawet kilkakrotnie, w porównaniu z komponentami rodzicielskimi. W największym stopniu trypsynę bydłęcą hamowały inhibitory z ziarna rodu 3 (CZR 1013), najniższą zaś aktywnością wyróżnił się ród 4 (CZR 916). Potwierdzenie występowania zjawiska transgresji w rodach translokacyjnych uzyskano także przy ocenie poziomu pentozanów w ziarnie, co zostało opisane we wcześniejszej pracy [Gruszecka i in. 2004]. Wysoka aktywność inhibitorów trypsyny w ziarnie przeznaczonym na paszę nie jest zjawiskiem korzystnym ze względu na jej wpływ na obniżenie strawności białka [Liener 1989, Sosulski 1988].

#### WNIOSKI

1. Poziom alkilorezorcynoli w badanych formach zależał od gatunku i był najwyższy w ziarnie komponenta rodzicielskiego *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy.
2. W wyniku krzyżowania oddalonego żyta z dzikim gatunkiem *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy można uzyskać cenne formy charakteryzujące się istotnie niższym poziomem alkilorezorcynoli w ziarnie (ród 3 – CZR-1013), w porównaniu z komponentami rodzicielskimi
3. Translokacyjne rody żyta wykazywały istotnie wyższą aktywność antytrypsynową w porównaniu z odpowiednimi komponentami rodzicielskimi, co potwierdza występowanie zjawiska transgresji, ale świadczy o mniejszej wartości żywieniowej ziarna tych rodów z przeznaczeniem na paszę.

#### PIŚMIENNICTWO

- Deszcz L., Kozubek A., 1996. Lipidy rezorcynolowe jako czynniki modulacyjne enzymatycznego utleniania lipidów. XXXII Zjazd PT Bioch., 214.
- Gruszecka D., Miąc A., 2002. Wykorzystanie metody RAPD w określeniu mieszańcowego charakteru rodów *Secale cereale* (L.) × *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy. Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol., 488, 161–168.
- Gruszecka D., Pietrusiak A., 2003. Characterization of translocation of rye strains with *Dasypyrum villosum* (Crimea, USSR). Plant Breed Seed Sci., 48, 2/2, 113–121.
- Gruszecka D., Makarska E., Miąc A., 2004. Translokacja genów z *Dasypyrum villosum* L. jako metoda poszerzenia zmienności żyta w odniesieniu do składu chemicznego. [w:] Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych. P. Krajewski, Z. Zwierzykowski, P. Kachlicki (red.), Rozprawy i monografie, IGR PAN, Poznań, 179–184.
- Gruszecka D., Makarska E., Praczyk M., Miąc A., 2001. Wpływ komponentów rodzicielskich na zawartość składników mineralnych translokacyjnej formy żyta z wykorzystaniem *Dasypyrum villosum*. Biul. Magnezol., 6, 3, 260–267.
- Kaczmarek J., Tuściak F., 1984. Variability of alkylresorcinol content in rye (*Secale cereale* L.). A comparative analysis with several species of the genus *Triticum*. Genetica Polon., 25(4), 349–358.
- Kakade M. L., Rackis J. J., McGhee J. E., Puski D., 1974. Determination of trypsin inhibitor activity on soya products: a collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem. 51, 376–382.

- Kamal-Eldin A., Pour A., Eliasson Ch., Aman P., 2000. Alkylresorcinols as antioxidants: hydrogen donation and peroxy radical-scavenging effects. *J. Sci. Food Agric.* 81, 353–356.
- Liener I. E., 1989. Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press, New York.
- Makarska E., 1994. Effect of selected herbicides on the level of alk(en)ylresorcinols in the grains of winter Triticale. *Proc. of the Int. Euro Food Tox IV,* "Bioactive substances in food of plant origin", Olsztyn, 188–191.
- Makarska E., Gruszecka D., 1998. Antitrypsin activity and level of alkylresorcinols in hybrid kernels of X *Triticosecale* Wittmack with *Agroticum* and in parental form. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 7/48, 3, 431–434.
- Miąć A., 2004. Badania genetyczno-hodowlane translokacyjnych rodów żyta (*Secale cereale* L. c.v. Amilo × *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy). Praca doktorska. Instytut Genetyki i Hodowli Roślin, AR Lublin.
- Polanowski A., 1976. Preparacja oraz charakterystyka fizykochemiczna i biochemiczna inhibitorów trypsyny z ziarniaków żyta (*Secale cereale* L.) *Acta Univ. Wratislaviensis*, 371, 1–66.
- Skrzypek A., Makarska E., Kociuba W., Studziński M., 2007. Aktywność przeciwutleniająca i zawartość lipidów rezorcynolowych w ziarnie mieszańcowych rodów pszenżyta ozimego. *Żywność*, 2, 51 (w druku).
- Sosulski F., 1988. Trypsin inhibitors and nutritive value in cereals. *Plant-Food for Human*, 38, 1, 23–24.
- Struski Z., Kozubek A., 1992. Cereal grain alk(en)ylresorcinols protect lipids against ferrous ion-induced peroxidation. *Z. Naturforsch.*, 10, 47–50.

**Summary.** The aim of study was analysis of the trypsin inhibitors activity and alkylresorcinols contents in the grain of 4 translocation 'Amilo' rye hybrids with wild *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy species as well as parental compounds. Kernels of *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy were characterized by significantly lower activity of those polypeptides (0.618 TUI/g) than rye (2.38 TUI/g). Anti-trypsin activity in extracts from kernels of all analyzed strains was significantly higher (even several times) as compared to parental components. Among all tested forms, the highest alkylresorcinols contents were found in *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy. In translocation strain kernels, level of these compounds was usually medium between the among parental components, except for the strain No 3, for which it was lower than for both parental forms.

**Key words:** *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy, *Secale cereale* L. vide crossing, translocation strains, alkylresorcinols, trypsin inhibitors