

Dinamika nakupljanja fitata i otpuštanja vode tokom nalivanja semena kukuruza. I. Dinamika nakupljanja fitinskog fosfora

- Originalan naučni rad -

Vesna DRAGIČEVIĆ, Danijela RISTIĆ i Snežana MLADENOVIĆ-DRINIĆ
Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd-Zemun

Izvod: Fitinska kiselina je najrasprostranjenije jedinjenje koje sadrži fosfor, i to 60-80% ukupnog fosfora u semenu. Ona se smatra antinutritivnom supstancom, jer monogastrični organizmi ne mogu da je svare. Smanjenje sadržaja fitinskog na ime lako pristupačnog, tj. neorganskog fosfora u semenu kukuruza moguće je izvršiti selekcijom genotipova iz postojećih populacija. Kod nisko-fitinskih genotipova kukuruza metabolizam fosfornih jedinjenja je drugačiji prilikom nalivanja semena. Cilj ogleada je bio da se ispita dinamika nakupljanja neorganskog i fitinskog fosfora, kao i rastvorljivih proteina tokom nalivanja semena kod četiri populacije i šest ZP hibrida kukuruza, uključujući i jednu potencijalno nisko-fitinsku populaciju. Tokom prvih 30 dana nalivanja semena kukuruza sinteza skladišnih supstanci, kao što je fitat, bila je najintenzivnija, što je posebno bilo izraženo kod hibrida kukuruza. Kod populacija sa relativno niskim učešćem fitinskog fosfora sinteza fitata je trajala tokom čitavog perioda nalivanja. Srazmerno povećanju sadržaja fitinskog, došlo je do smanjenja sadržaja neorganskog fosfora i rastvorljivih proteina, ali je ono bilo najintenzivnije između 15. i 30. dana od oplodnje. Značajno je istaći da je kod hibrida bio prisutan ujednačen sadržaj sve tri ispitivane komponente, dok neujednačenost na nivou populacija, pogotovo u sadržaju fitinskog fosfora može poslužiti kao izvor pogodnih svojstava za selekcionare.

Ključne reči: Fitinski fosfor, kukuruz, neorganski fosfor, rastvorljivi proteini, seme.

Uvod

Fitinska kiselina (mio-inozitol heksafosfat) je najrasprostranjenije jedinjenje koje sadrži fosfor, i to 60-80% ukupnog fosfora u semenu. Ona najčešće gradi kompleksna jedinjenja sa mineralima (fitati) i kao takva se nalazi u embrionu i aleuronu žitarica, *Lott i sar.*, 2000. Fitat ne mogu da vare monogastrični organizmi, tako da prisutan fosfor i minerali ostaju neiskorišćeni i u kranjoj liniji vode

zagađenjima podzemnih voda fosforom, **Bilyeu i sar.**, 2008. Sa navedene tačke gledišta nameće se potreba za povećanjem sadržaja lako-pristupačnih formi fosfora, kao što je neorganski, u odnosu na fitinski u semenu žitarica, čime bi se rešili paralelno nutritivni i problem životne sredine, **Lorenz i sar.**, 2008. Druga, važna osobina fitata je njegova antioksidativna aktivnost, čime učestvuje u zaštiti živih organizama od stresnih faktora i daje mu poseban značaj pri očuvanju životne sposobnosti semena, **Grafi sar.**, 1987, **Doria i sar.**, 2009.

Smanjenje sadržaja fitinskog na ime lako pristupačnog, tj. neorganskog fosfora u semenu kukuruza moguće je izvršiti selekcijom genotipova iz postojećih populacija, **Lorenz i sar.**, 2008, **Mladenović Drinić i sar.**, 2009. Da bi se odabrali adekvatni genotipovi, potrebno je steći uvid u dinamiku nakupljanja i konverzije neorganskog fosfora u fitat, s obzirom da kod nisko-fitinskih genotipova kukuruza metabolizam fosfornih jedinjenja prilikom sazrevanja ima nešto drugačiji tok, **Raboy i sar.**, 2000. Naime, ukupni sadržaj neorganskog i fitinskog fosfora je prilikom nalivanja semena niskofitinskih linija kukuruza ostao konstantan, kao i kod normalnih genotipova, dok smanjivanje neorganskog fosfora nije bilo tako brzo u odnosu na normalne genotipove. Slična situacija je bila konstatovana i kod ječma, **Bowen i sar.**, 2006, gde se kod nisko-fitinskih genotipova nivo neorganskog fosfora smanjivao sa sazrevanjem semena, sve do 24. dana, kada je došlo do rasta njegovog nivoa, dok je sadržaj fitinskog fosfora rastao, ali u manjem stepenu.

Cilj ogleada je bio da se ispita dinamika nakupljanja neorganskog i fitinskog fosfora, kao i rastvorljivih proteina tokom nalivanja semena kod četiri populacije i šest ZP hibrida kukuruza, uključujući i jednu potencijalno nisko-fitinsku populaciju.

Materijal i metode

Postavljen je ogled sa četiri populacije iz banke gena Instituta za kukuruz "Zemun Polje" (col 138, col 186, col 216 i col 280), kao i šest dvolinijskih hibrida (ZP 341, ZP 434, ZP 555, ZP 666, ZP 728 i ZP 836). Biljke su gajene po slučajnom blok sistemu (rbc dizajn) u tri ponavljanja na oglednom polju Instituta za kukuruz, tokom leta 2009. godine. Uzorci semena za praćenje nakupljanja fitata su uzimani na svakih 15 dana od momenta oplodnje: nakon 15 dana - F1, 30 dana - F2, 45 dana - F3, 60 dana - F4 i u tehnološkoj zrelosti - F5. Uzorci semena su osušeni na 60°C do konstantne težine, nakon čega je analiziran sadržaj fitinskog (P_{phy}) i neorganskog fosfora (P_i), kao i rastvorljivih proteina. Navedeni parametri su određeni nakon ekstrakcije bidestilovanom vodom. Fitinski fosfor je određen modifikovanom metodom **Latta i Eskina**, 1980, kolorimetrijski, na bazi smanjenja intenziteta ružičaste boje Wadeovog reagensa. Neorganski fosfor je određen takođe kolorimetrijski po metodi **Pollmana**, 1991, dok su rastvorni proteini bili analizirani po metodi **Lowrya i sar.**, 1951.

Rezultati su obrađeni ANOVA analizom varijanse (LSD 5%), a korelacije sadržaja fitinskog i neorganskog fosfora i rastvorljivih proteina dobijene su obradom podataka u programu Minitab 14.

Rezultati i diskusija

Ispitivanjem dinamike sadržaja fitinskog fosfora u semenu kukuruza utvrđeno je da je tokom F1, kao što je očekivano, bio prisutan njegov najniži nivo (prosečno 0,59 mg g⁻¹, Tabela 1). Takođe je potrebno istaći da je seme ispitivanih populacija prosečno imalo veći sadržaj fitinskog fosfora u odnosu na hibride (prosečno za 4%), bez obzira što je populacija 216, determinisana kao niskofitinska i imala prosečno za 31% manje fitinskog fosfora u semenu. Tokom sazrevanja semena sadržaj fitinskog fosfora se povećavao, tako da je u F4 bio značajno veći (prosečno sedam puta u odnosu na F1). Međutim, nije kod svih genotipova došlo do skoka u sadržaju fitinskog fosfora u F4. Naime, kod populacija 186 i 280 ovaj skok je bio zabeležen već od F3 (tri i dva puta više u odnosu na F2), dok je kod populacija 138 i 216 navedeni rast sadržaja fitinskog fosfora uglavnom bio konstantan. Navedeni rezultati su u saglasnosti sa podacima *Raboya i sar.*, 2000, *Bowena i sar.*, 2006, koji su takođe utvrdili da je kod genotipova sa niskim učešćem fitata u semenu, dinamika njegovog nakupljanja, kao i smanjenja P_i drugačija u odnosu na genotipove sa standardno većim sadržajem fitata, tj. manje je intenzivno nakupljanje fitata, uz zadržavanje skoro konstantnog nivoa P_i. Sa druge strane, kod većine hibrida je od F3 došlo do znatnog povećanja sadržaja fitinskog fosfora i to u proseku tri puta u odnosu na F2.

Tabela 1. Dinamika sadržaja fitinskog fosfora (mg g⁻¹) tokom nalivanja semena kod četiri ZP populacije (Col 138 -Col 280) i šest ZP hibrida kukuruza (ZP 341 -ZP 836)
Dynamics of the Content of Phytic Phosphorus (mg g⁻¹) during Seed Filling in Four ZP Populations (Col 138 -Col 280) and Six ZP Maize Hybrids (ZP 341 -ZP 836)

Faza Stage	Col 138	Col 186	Col 216	Col 280	ZP 341	ZP 434	ZP 555	ZP 666	ZP 728	ZP 836	Prosek Average
F1	0,75	1,03	0,11	0,66	0,40	0,09	0,54	0,50	0,80	0,97	0,59
F2	2,35	1,55	1,13	1,86	3,61	1,31	1,37	1,41	1,72	1,22	1,75
F3	3,87	4,30	2,82	4,19	3,98	3,62	3,45	3,67	3,90	3,59	3,74
F4	3,87	4,99	3,35	4,52	4,12	3,87	4,32	3,70	4,06	3,88	4,07
F5	4,58	5,00	3,56	4,65	4,51	4,23	4,57	4,26	4,09	4,35	4,38
Prosek Average	3,08	3,37	2,20	3,18	3,32	2,63	2,85	2,71	2,92	2,80	
LSD 5%	Genotip - Genotype				0,44		Faza - Stage		1,38		

Za razliku od fitinskog, najveći sadržaj neorganskog fosfora bio je zabeležen tokom F1 (prosečno 4,78 μg g⁻¹, Tabela 2), da bi već prema fazama F2 i F3 došlo do njegovog značajnijeg pada (prosečno tri puta u odnosu na F1, odnosno četiri puta od F2 do F3). Među samim genotipovima takođe nije bilo znatnijeg variranja po fazama, tj. nakon F1 je došlo do višestrukog smanjenja sadržaja neorganskog fosfora. Sa druge strane, kod populacije 216 je pored značajno nižeg udela fitinskog, bio zabeležen i značajno veći udeo neorganskog fosfora (prosečno za 10%), što ukazuje na obrnutu proporcionalnost prisutnu pri biosintezi fitata. S obzirom da neorganski fosfor tokom nalivanja semena služi za biosintezu fitata, tj. fitat predstavlja skladišni

Tabela 2. Dinamika sadržaja neorganskog fosfora ($\mu\text{g g}^{-1}$) tokom nalivanja semena kod četiri ZP populacije (Col 138 -Col 280) i 6 ZP hibrida kukuruza (ZP 341 -ZP 836)
Dynamics of the Content of Inorganic Phosphorus ($\mu\text{g g}^{-1}$) during Seed Filling in Four ZP Populations (Col 138 -Col 280) and Six ZP Maize Hybrids (ZP 341 -ZP 836)

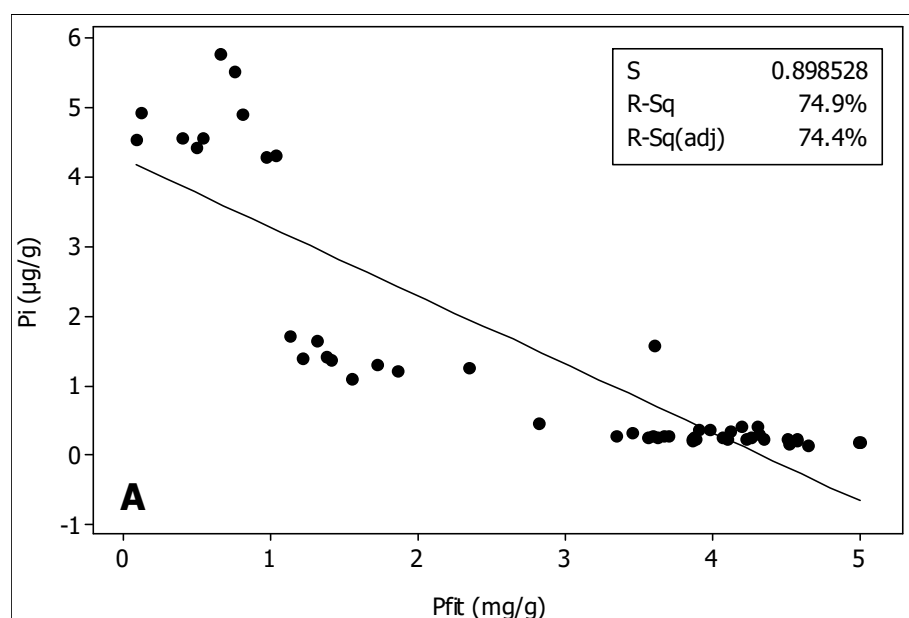
Faze Stage	Col 138	Col 186	Col 216	Col 280	ZP 341	ZP 434	ZP 555	ZP 666	ZP 728	ZP 836	Prosek Average
F1	5,51	4,30	4,92	5,77	4,57	4,54	4,56	4,42	4,89	4,28	4,78
F2	1,26	1,09	1,72	1,21	1,59	1,64	1,43	1,37	1,31	1,40	1,40
F3	0,23	0,43	0,46	0,42	0,38	0,26	0,32	0,28	0,38	0,29	0,35
F4	0,22	0,19	0,29	0,17	0,35	0,25	0,31	0,28	0,25	0,24	0,26
F5	0,21	0,19	0,25	0,14	0,24	0,24	0,24	0,25	0,25	0,23	0,22
Prosek Average	1,49	1,24	1,53	1,54	1,42	1,39	1,37	1,32	1,42	1,29	
LSD 5%	Genotip - Genotype				0,17	Faza - Stage			6,21		

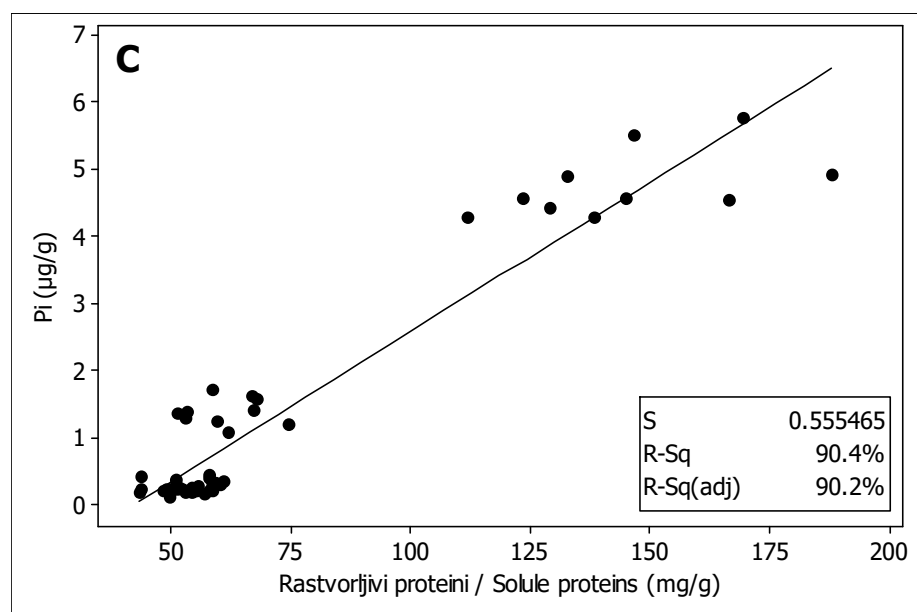
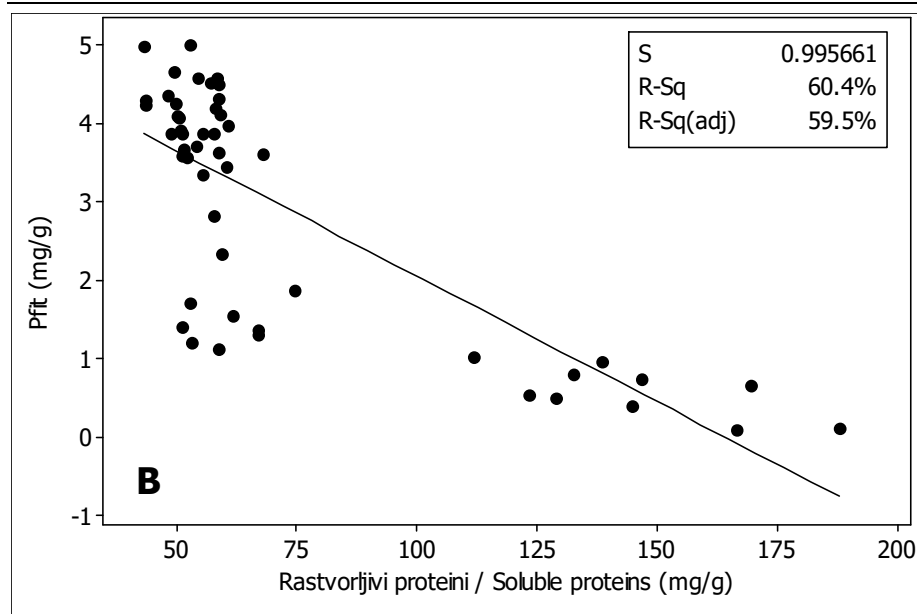
oblik fosfora u semenu, prisutna je značajna negativna korelacija između sadržaja fitinskog i neorganskog (Grafikon 1A). Navedene rezultate potvrđuju i istraživanja Jackson i sar., 2009, Mladenović Drinić i sar., 2009, bez obzira na to što je u pitanju tehnološki zrelo seme kukuruza. Paralelno sa navedenom činjenicom, kod populacije 186, koja je prosečno imala najveći sadržaj fitinskog, ujedno je bio prisutan i najniži sadržaj neorganskog fosfora ($1,24 \mu\text{g g}^{-1}$), uz napomenu da je kod ove populacije startno (F1) bio prisutan najniži nivo neorganskog fosfora. Za razliku od populacija, između ispitivanih hibrida su prosečna variranja sadržaja neorganskog fosfora bila minimalna: 13% tokom F1, kao i 9% tokom F5. Značajno je istaći da se visok udeo fitinskog i neorganskog fosfora (Tabela 1 i 2) od F1 do F2 znatno smanjio, da bi potom došlo do njihovog laganog rasta ka F5 (tehnološka zrelost), što je u suprotnosti sa tvrdnjom da ukupni sadržaj ove dve forme fosfora ostaje skoro konstantan tokom nalivanja semena kukuruza, Raboy i sar., 2000. Po svemu sudeći deo P_i koji se našao u semenu 15 dana od oplodnje se troši i na druge metaboličke procese, a ne samo za sintezu fitata.

Tabela 3. Dinamika sadržaja rastvorljivih proteina (mg g^{-1}) tokom nalivanja semena kod četiri ZP populacije (Col 138 -Col 280) i 6 ZP hibrida kukuruza (ZP 341 -ZP 836)
Dynamics of the Content of Soluble Proteins (mg g^{-1}) during Seed Filling in Four ZP Populations (Col 138 -Col 280) and Six ZP Maize Hybrids (ZP 341 -ZP 836)

Faze Stage	Col 138	Col 186	Col 216	Col 280	ZP 341	ZP 434	ZP 555	ZP 666	ZP 728	ZP 836	Prosek Average
F1	146,8	111,8	188,0	169,5	147,4	166,5	123,5	129,0	132,8	138,4	145,4
F2	59,5	61,9	58,6	74,6	69,0	66,9	67,1	51,3	53,0	53,3	61,5
F3	57,8	43,5	57,9	58,0	58,5	58,7	60,3	51,5	50,8	51,0	54,8
F4	55,4	43,4	55,6	57,0	56,7	51,3	58,6	54,1	50,5	49,0	53,2
F5	54,4	52,9	52,1	49,6	53,9	43,7	58,3	49,7	50,3	48,4	51,3
Prosek Average	74,7	62,7	82,5	81,7	77,1	77,4	73,6	67,1	67,5	68,0	
LSD 5%	Genotip - Genotype				1,70	Faza - Stage			13,1		

Što se tiče sadržaja rastvorljivih proteina, najveći sadržaj je bio prisutan tokom F1 ($145,4 \text{ mg g}^{-1}$), što je duplo više u odnosu na F2 (Tabela 3). Zatim, sve do F5 sadržaj rastvorljivih proteina se nije značajnije smanjivao. Zanimljivo je istaći da je kod populacije 186, sa prosečno najnižim sadržajem neorganskog fosfora, i sadržaj proteina bio značajno niži u odnosu na ostale genotipove (prosečno za 16%). Paralelno sa navedenim trendom, kod populacije 216, kod koje je zabeležen najveći sadržaj neorganskog fosfora i sadržaj proteina je bio značajno veći (prosečno za 12%). Samim tim bila je prisutna značajna, pozitivna korelacija između rastvorljivih proteina i neorganskog fosfora ($R = 0,904$, Grafikon 1C). Sa druge strane, negativna korelacija između sadržaja fitinskog i neorganskog fosfora ($R = 0,749$, Grafikon 1A) bila je paralelno prisutna i između proteina i fitinskog fosfora, ali je bila izražena u manjem stepenu ($R = 0,604$, Grafikon 1B). Navedeni rezultati su u suprotnosti sa istraživanjima *Lorenza i sar.*, 2008, koji su utvrdili pozitivnu i značajnu korelaciju između saržaja fitata i proteina, što bi moglo biti vezano za tip proteina, s obzirom da su naša istaživanja bila vezana za rastvorljive proteine. Za razliku od populacija između kojih je sadržaj proteina znatno varirao u proseku i po ispitivanim fazama, kod hibrida je njihov sadržaj bio relativno ujednačen i nije prosečno varirao više od 21%.





Grafikon 1. Korelacija između fitinskog fosfora (P_{fit}), neorganskog fosfora (P_i) i rastvorljivih proteina tokom nalivanja semena kukuruza poreklom iz četiri populacije i šest hibrida

The correlation between phytic $P(P_{fit})$, inorganic $P(P_i)$ and soluble proteins during maize seed filling period, originated from four populations and six hybrids

Zaključak

Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da je period od prvih 30 dana naliivanja semena kukuruza vrlo značajan za sintezu skladišnih supstanci, kao što je fitat, što je posebno izraženo kod hibrida kukuruza. Kod populacija sa relativno niskim učešćem fitinskog fosfora sinteza fitata je trajala tokom čitavog perioda naliivanja semena. Srazmerno povećanju sadržaja fitinskog fosfora, došlo je do smanjenja sadržaja neorganskog fosfora i rastvorljivih proteina, ali je ono bilo značajno samo između 15. i 30. dana od oplodnje. Posebno je bilo značajno istaći da je kod hibrida bio prisutan ujednačen sadržaj sve tri ispitivane komponente, dok neujednačenost na nivou populacija, pogotovo u sadržaju fitinskog fosfora, može poslužiti kao izvor pogodnih svojstava za selekcionere.

Naznaka

Rezultati prikazani u radu su deo istraživanja Projekta TR 31068 finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Literatura

- Bilyeu, K.D., P. Zeng, P. Coello, Z.J. Zhang, H.B. Krishnan, A. Bailey, P.R. Beuselinck and J.C. Polacco** (2008): Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. *Plant Physiol.* **146** (2): 468–477.
- Bowen, D.E., M.J. Guttieri, K. Peterson, K. Peterson, V. Raboy and E.J. Souza** (2006): Phosphorus fractions in developing seeds of four low phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes. *Crop Sci.* **46**: 2468–2473.
- Doria, E., L. Galleschi, L. Calucci, C. Pinzino, R. Pilu, E. Cassani and E. Nielsen** (2009): Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant. *J. Exp. Bot.* **60**: 967-978
- Graf, E.S., K.L. Empson and J.W. Eaton** (1987): Phytic acid. A natural antioxidant. *J. Biol. Chem.* **262**: 11647-11650.
- Jackson, C.A., J.M. Windes, P. Bregitzer, D. Obert, W. Price and B. Brown** (2009): Phosphorus fertility effects on the expression of the low phytic acid barley phenotype. *Crop Sci.* **49**: 1800-1806.
- Latta, M. and M. Eskin** (1980): A simple and rapid colorimetric method for phytine determination, *J. Agric. Food Chem.* **28**: 1308-1311.
- Lorenz, A.J., M.P. Scott and K.R. Lamkey** (2008): Genetic variation and breeding potential of phytate and inorganic phosphorus in a maize population *Crop Sci.* **48**: 79-84.
- Lott, J.N.A., I. Ockenden, V. Raboy and G.D. Batten** (2000): Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: A global estimate. *Seed Sci. Res.* **10**: 11-33.

- Lowry, O.H., N. Rosebrough, A.R. Farr and R.J. Randall** (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mladenović Drinić, S., D. Ristić, S. Sredojević, V. Dragičević, D. Ignjatović Micić and N. Delic** (2009): Genetic variation of phytate and ionorganic phosphorus in maize population. *Genetika* 41 (1): 107-115.
- Pollman, R.M.** (1991): Atomic absorption spectrophotometric determination of calcium and magnesium and colorimetric determination of phosphorus in cheese: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (1): 27-31.
- Raboy, V., P.F. Gerbasi, K.A. Young, S.D. Stoneberg, S.G. Pickett, A.T. Bauman, P.P.N. Murthy, W.F. Sheridan and D.S. Ertl** (2000) Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol.* 124: 355-368.

Primljeno: 20.10.2010.

Odobreno: 19.11.2010.

* *
*

The Dynamics of Phytate Accumulation and Water Releasing during Maize Seed Filling. I. The Dynamics of Accumulation of Phytic Phosphorus

- Original scientific paper -

Vesna DRAGIČEVIĆ, Danijela RISTIĆ and Snežana MLADENOVIĆ-DRINIĆ
Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade-Zemun

S u m m a r y

Phytic acid is a phosphorus compound with the widest prevalence in nature; it encompasses 60-80% of seed phosphorus. Phytic acid is considered as an antinutritive compound and it is indigestible by monogastric animals. The lowering of the phytic content in course of increasing of available, i.e. inorganic phosphorus in maize seed could be achieved through breeding of the present populations. Phosphorus metabolism in low-phytic genotypes differs during seed filling. The aim of this experiment was to determine the accumulation of inorganic and phytic phosphorus, as well as, of soluble proteins in seed of four populations and six ZP hybrids, including one potentially low phytic population. The synthesis of storage substances, such as phytate, was the most intensive during the first 30 days of seed filling, which was particularly expressed in hybrids. In seed of populations with a relatively low phytic P content the phytate accumulation lasted during the whole filling period. In accordance with the increase of the phytic P content, the contents of inorganic P and soluble proteins decreased, and this reduction reached its maximum 15-30 days after pollination. It is important to underline that the content of all three examined components was relatively uniform in hybrid seed, while non-uniformity at the level of populations, especially in the content of phytic P can serve as a source of favourable properties for breeders.

Received: 20/10/2010

Accepted: 19/11/2010

Adresa autora:

Vesna DRAGIČEVIĆ

Institut za kukuruz "Zemun Polje"

Slobodana Bajića 1,

11185 Beograd-Zemun

Srbija

E-mail: vdragicevic@mrizp.rs

J. Sci. Agric. Research/Arh. poljopr. nauke 71, 256 (2010/4), 35-43