

## BIOHEMIJSKA ANALIZA F2 ZRNA GENOTIPOVA KUKURUZA VISOKOG KVALITETA PROTEINA

Marija Kostadinović <sup>1\*</sup>, Dragana Ignjatović Micić <sup>1</sup>, Goran Stanković <sup>1</sup>, Snežana Mladenović Drinić<sup>1</sup>

### Izvod

Proteini kukuruza su siromašni u sadržaju dve esencijalne aminokiseline – lizina i triptofana. Prirodna *opaque2* mutacija udvostručava nivo ovih aminokiselina, ali istovremeno smanjuje prinos, čini endosperm kukuruza mekim i brašnjavim, a seme osjetljivim na trulež klipa i štetočine skladištenog zrna. Kukuruz visokog kvaliteta proteina (Quality Protein Maize – QPM) se može definisati kao kukuruz sa visokom nutritivnom vrednošću proteina endosperma i istovremeno dobrim agronomskim performansama. U Institutu za kukuruz već nekoliko godina postoji program stvaranja genotipova kukuruza visokog kvaliteta proteina, adaptiranih na umereno klimatsko područje. Cilj ovog rada je bio da se ispita kvalitet proteina F2 zrna kukuruza dobijenog ukrštanjem 24 QPM inbred linija sa tri standardne inbred linije i dve *opaque2* linije. Većina od 108 analiziranih genotipova (83,5%) je imala sadržaj triptofana ispod praga od 0,075, od čega je poboljšani nivo triptofana (0,065-0,074) imalo 50% genotipova. Visok sadržaj je imalo 16,5% analiziranih genotipova, od kojih je najviša vrednost bila 0,088. Samo jedan genotip je imao indeks kvaliteta proteina iznad praga od 0,80. Biohemijskom analizom utvrđeni su genotipovi poboljšanog kvaliteta čija će agronomska svojstva biti ispitana kako bi se utvrdilo da li se mogu smatrati potencijalnim QPM hibridima.

**Ključne reči:** kvalitet proteina, kukuruz, triptofan, QPM

---

\* Originalni naučni rad

<sup>1</sup>Marija Kostadinović, Dragana Ignjatović Micić, Goran Stanković, Snežana Mladenović Drinić. Institut za kukuruz Zemun Polje, Slobodana Bajića 1, 11185 Beograd

\*([kmarija@mrizp.rs](mailto:kmarija@mrizp.rs))

## Uvod

Kukuruz ima veoma važnu ulogu u ishrani ljudi i životinja širom sveta. Međutim, proteini kukuruza su siromašni u sadržaju dve esencijalne aminokiseline - lizina i triptofana. Poboljšana hranljiva vrednost prirodnog *opaque2* (*o2*) mutanta kukuruza otkrivena je 1960-ih godina (Mertz et al., 1964). Ova mutacija udvostručava nivo lizina i triptofana, ali istovremeno smanjuje prinos, čini endosperm kukuruza mekim i brašnjavim, a seme osetljivim na trulež klipa i štetočine skladištenog zrna.

Kukuruz visokog kvaliteta proteina (*Quality Protein Maize* – QPM) je kukuruz sa visokom nutritivnom vrednošću proteina endosperma i istovremeno dobrim agronomskim performansama. Mada je QPM stvoren prvenstveno za korišćenje u regionima u kojima je, zbog siromaštva, kukuruz glavna hrana, postoje mnoge prednosti za njegovu proizvodnju i korišćenje i u ostalim regionima sveta. Nekoliko studija (Bressani, 1991; Akuamo-Boateng, 2002; Krivanek et al., 2007; Sofi et al., 2009; Mbuya et al. 2011) je pokazalo pozitivne efekte prilikom ishrane ljudi i životinja ovim kukuruzom. Pored kvalitetnijih proteina, QPM ima i povećan sadžaj niacina (vitamin B3) i poboljšano iskorišćavanje kalcijuma i karotena (Graham et al., 1980; De Bosque et al., 1988). Značaj QPM kukuruza potvrđuje i činjenica da se 1977. godine ovaj kukuruz gajio samo na teritoriji četiri države, a u 2003. godini u 23 države na površini od 3,5 miliona hektara (Sofi et al., 2009).

U Institutu za kukuruz već nekoliko godina postoji program stvaranja genotipova kukuruza visokog kvaliteta proteina, adaptiranih na umereno klimatsko područje (Ignjatović-Mićić et al., 2008; Ignjatović-Mićić et al., 2009; Ignjatović-Mićić et al., 2010). Cilj ovog rada bio je da se ispita kvalitet proteina

F2 zrna kukuruza dobijenog ukrštanjem QPM inbred linija sa standardnim i *opaque2* linijama. Identifikacija i potvrda QPM kvaliteta podrazumeva laboratorijske analize ukupnog sadržaja proteina, sadržaja triptofana i indeksa kvaliteta proteina.

## Materijal i metode

### Poljski ogledi

U toku 2011. godine izvedeni su poljski ogledi u Zemun Polju. 24 QPM linija (QPM1 - QPM24) adaptiranih na umereno klimatsko područje ukršteno je sa 3 standardne inbred linije (SL): L92, L375/25-6 i L255/75-5, kao i sa 2 *opaque2* linije (*o2L*): B73o2 i Intl5510. Ogledi su postavljeni po metodi slučajnog blok sistema sa tri ponavljanja. Sva ukrštanja su posejana u dva reda sa po 15 biljaka u gustini od 67000 biljaka po hektaru. Prvi red je korišćen za merenje prinosa ( $t\ ha^{-1}$  sa 14% vlage), a drugi za samooplodnju. Dobijeno seme nakon samooplodnje je korišćeno za biohemijske analize. Standardni hibrid ZP 434 je korišćen kao kontrola.

### Biohemijske analize

#### Priprema uzoraka

Od svakog genotipa odabran je reprezentativni uzorak od po 30 zrna od 10 biljaka. Zrno je sušeno 16-18 sati na 65°C u termostatu, zatim samleveno u ciklonskom mlinu, pa brašno odmašćeno.

*Ukupan sadržaj proteina* je određen po Kjeldahl metodi (McKenzie, 1994; Vivek et al., 2008). Po ovoj metodi sadržaj proteina se određuje indirektno, na osnovu koncentracije azota (N) u uzorku dobijene odgovarajućom titracionom tehnikom. Za kukuruz, sadržaj proteina (%) se izračunava kada se koncentracija N (%) pomnoži sa 6,25 (faktor konverzije za kukuruz).

*Sadržaj triptofana* određen je

po metodi datoj u Nurit et al., 2009. Ova kolorimetrijska metoda se zasniva na Hopkins-Cole reakciji, u kojoj jedan molekul glioksilne kiseline i dva molekula triptofana formiraju obojeno jedinjenje sa maksimumom absorpcije na 560nm. Ukratko, nakon digestije papainom kolorimetrijska reakcija je razvijena pomoću  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  rastvorenog u  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Apsorpcija je očitana na 560nm pomoću spektrofotometra. Procenat triptofana je izračunat pomoću standardne (kalibracione) krive dobijene na osnovu apsorpcija poznatih količina triptofana, opsega od 0 do 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

*Indeks kvaliteta proteina* (QI – quality indeks) je izračunat kao odnos triptofana prema proteinu.

### Rezultati i diskusija

Osnovni cilj istraživanja je stvaranje linija i hibrida visokog kvaliteta proteina čijim bi se gajenjem obezbedila proizvodnja biljnih proteina veće hranljive i biološke vrednosti u ishrani ljudi i domaćih životinja. Glavni problem kod QPM hibrida je istovremeno dobijanje visokog nivoa esencijalnih aminokiselina i visokog prinosa.

Sadržaj lizina i triptofana u zrnu kukuruza su visoko korelisani (Nurit et al., 2009). Odnos 3:1 lizina prema triptofanu je uočen i kod standardnog i kod QPM kukuruza (Bjarnson and Vasal, 1992; Vivek et al., 2008). Prilikom stvaranja QPM germplazme prati se samo sadržaj triptofana jer je metoda brža i jednostavnija.

Od dobijenog potomstva iz ukrštanja u polju, za biohemijske analize je odabrano 108 genotipova (72 QPM x SL i 36 QPM x o2L). Visok sadržaj triptofana ( $\geq 0,075$  - nivo specifičan za QPM germplazmu) je imalo 16,5% genotipova, od kojih je najviša vrednost 0,088. Za genotipove koji su imali vrednosti od 0,065-0,074 (50% genotipova) smatra se da imaju povišeni nivo triptofana jer su dovoljno blizu granične vrednosti, a više od vrednosti dobijene kod standardnog hibrida (0,06).

Samo jedan genotip (QPM x B73o2) je imao indeks kvaliteta proteina iznad granične vrednosti za QPM (0,80). Ali 10 genotipova sa visokim ili povišenim sadržajem triptofana je imalo QI preko 0,7, što je više u poređenju sa standardnim hibridom (0,6).

Kada se uporede tipovi ukrštanja (Tabela 1), kod genotipova iz ukrštanja QPM x o2L je nađen viši nivo triptofana i indeks kvaliteta u odnosu na QPM x SL. Kod QPM x SL genotipova vrednosti sadržaja triptofana su bile od 0,046% do 0,088% (prosečno 0,066%). Samo osam genotipova (11,1%) je imalo sadržaj triptofana preko 0,075, dok je 36 genotipova (50%) imalo povišeni nivo triptofana (0,065-0,074). Kod genotipova iz ukrštanja QPM x o2L vrednosti sadržaja triptofana su bile od 0,057% do 0,088% (prosečno 0,071%). Visok sadržaj triptofana je imalo deset genotipova (27,8%), dok je 18 (50%) imalo povišeni nivo triptofana. Prosečna vrednost QI kod QPM x SL je bila 0,61, a kod QPM x o2L 0,71.

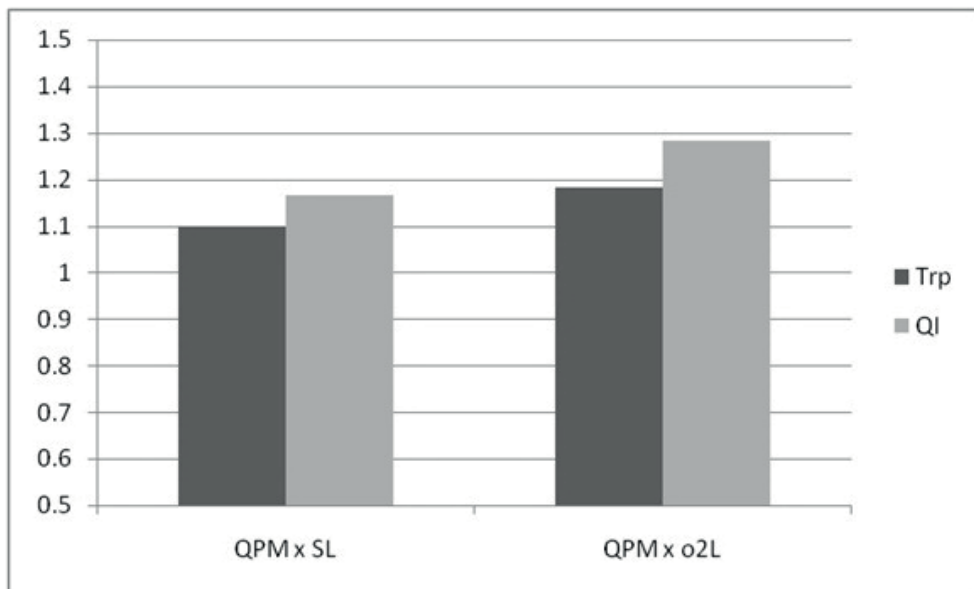
Tabela 1. Sadržaj triptofana (%) kod QPM x SL i QPM x o2L ukrštanja

Table 1. Tryptophan content (%) in QPM x SL and QPM x o2L crosses

Parametar	Tip ukrštanja	Sadržaj triptofana (%)			Ukupno
		<0,065	0,065-0,074	≥0,075	
Broj genotipova	QPM x SL	28	36	8	72
	QPM x o2L	8	18	10	36
Opseg	QPM x SL	0,046-0,064	0,065-0,073	0,076-0,088	0,046-0,088
	QPM x o2L	0,057-0,064	0,065-0,074	0,075-0,088	0,057-0,088
Prosek	QPM x SL	0,059	0,069	0,080	0,066
	QPM x o2L	0,062	0,069	0,079	0,071

Odnos prosečnih vrednosti obe biohemijske komponente genotipova sa visokim sadržajem triptofana i standardnih hibrida (izražen u %) je prikazan na Grafikonu 1. Vrednosti standardnog hibrida date su kao

100% (1). I triptofan i indeks kvaliteta bili su viši kod QPM x SL za 10% odnosno 17%. Kod QPM x o2L triptofan je bio viši za 18%, a QI za 28%.



Grafikon 1. Prosečne vrednosti sadržaja triptofana i QI genotipova sa visokim triptofanom kod QPM x SL i QPM x o2L ukrštanja predstavljene kao % standardnog hibrida. Vrednosti standarda su date kao 1 (100%).

Figure 1. Average tryptophan contents and QI of the genotypes with high tryptophan in QPM x SL and QPM x o2L crosses given as % of the standard hybrid. Standard hybrid values are given as 1 (100%).

Uzimajući u obzir stabilnost sadržaja triptofana i indeksa kvaliteta, ovaj eksperiment je izveden samo na jednoj lokaciji sa ciljem da se identifikuju genotipovi sa visokim vrednostima ovih komponenti. Ipak, prinos zavisi od interakcije različitih sredinskih faktora (Banziger et al., 2000; Banziger and Diallo, 2004). Zato će poljski ogledi biti izvedeni na više lokacija kako bi se ispitala stabilnost prinosa i otpornost na patogene. Na osnovu rezultata prezentovanih u ovom radu značajno je smanjen broj hibrida za poljske ogledе.

### Zaključak

Stvaranje hibrida visokog kvaliteta proteina ukrštanjem QPM linija i standardnih ili *opaque2* linija predstavlja izazov zbog kompleksnosti različitih genskih sistema uključenih u ekspresiju ovog svojstva. Biohemijskom analizom utvrđeni su genotipovi poboljšanog kvaliteta. Da bi hibridi sa visokim kvalitetom proteina mogli da se koriste za proizvodnju kukuruza, neophodno ih je testirati na agronomska svojstva i otpornost prema bolestima. Ukoliko se pokaže da pored visokog kvaliteta proteina imaju i dobre agronomske performanse i da su otporni na štetočine i patogene, onda bi se moglo zaključiti da se radi o QPM kukuruza.

### Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan kroz projekat TR 31068 "Poboljšanje svojstava kukuruza i soje molekularnim i konvencionalnim metodama" Ministarstva za prosvetu i nauku RS.

### Literatura

Akuamoa-Boateng A (2002): Quality protein maize infant feeding trials in Ghana. Ghana Health Service, Ashanti, Ghana  
Banziger M, Edmeades GO, Beck D and

Bellon M (2000): Breeding for Drought and N Stress Tolerance in Maize. From Theory to Practice. CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico.

Banziger M and Diallo AO (2004): Progress in developing drought and N stress tolerant maize cultivars for eastern and southern Africa. Integrated Approaches to Higher Maize Productivity in the New Millennium. Proceedings of the 7th Eastern and Southern Africa Regional Maize Conference. 5-11 February 2002, CIMMYT/KARI, Nairobi, Kenya. pp. 189-194.

Bjarnason M, Vasal SK (1992): Breeding of Quality Protein Maize (QPM). Plant Breeding Reviews, 9:181-216.

Bressani R (1991): Protein quality of high lysine maize for humans. Cereal Foods World 36:806-811.

De Bosque C, Castellanos EJ, Bressani R (1988): In ICAP Report Annual, INCAP, Guatemala.

Graham GG, Placko RP, Maclean WC (1980): Nutritional Value of Normal, Opaque-2 and Sugary-2 Opaque-2 Maize Hybrids for Infants and Children. 2. Plasma Free Amino Acids. Journal of Nutrition, 110:1070-1075.

Ignjatović-Micić D, Stanković G, Marković K, Lazić-Jančić V, Denić M (2008): Quality Protein Maize – QPM. Genetika, Vol. 40, No. 3, 205-214.

Ignjatović-Micić D, Marković K, Ristić D, Mladenović Drinić S, Stanković S, Lazić-Jančić V, Denić M (2009): Variability analysis of normal and *opaque2* maize inbred lines. Genetika, Vol. 41, No. 1, 81 -93.

Ignjatović-Micić D, Stanković G, Marković K, Mladenović Drinić S, Lazić Jančić V, Denić M (2010): Kernel modifications

- 
- andtryptophan content in QPM segregating generations. *Genetika*, Vol 42, No. 2, 267 -278.
- Krivanek A, Groote H, Gunaratna N, Diallo A, Freisen D (2007): Breeding and disseminating quality protein maize for Africa. *Afr. J. Biotech.* 6: 312-324.
- Mbuya K, Nkogolo KK, Kalonji-Mbuyi A (2011): Nutritional analysis of quality protein maize varieties selected for agronomic characteristics in a breeding program. *Journal of Plant Breeding and Genetics.* 5(4): 317-327.
- McKenzie HA (1994): The Kjeldahl determination of nitrogen: retrospect and prospect. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 13(4), 138-44
- Mertz ET, Bates LS, Nelson OE (1964): Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. *Science* 145:279-280.
- Nurit E, Tiessen A, Pixley K, Palacios-Rojas N (2009): Reliable and inexpensive colorimetric method for determining protein-bound tryptophan in maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:7233-7238.
- Sofi PA, Wani SA, Rather AG, Wani SH (2009): Review article: Quality protein maize (QPM): Genetic manipulation for the nutritional fortification of maize. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 1(6): 244-253.
- Vivek BS, Krivanek AF, Palacios-Rojas N, Twumasi-Afryie S, Diallo AO (2008): Breeding Quality Protein Maize (QPM): Protocols for Developing QPM Cultivars. Mexico, D.F.: CIMMYT.

## PROTEIN QUALITY ANALYSIS OF F2 MAIZE KERNELS

Marija Kostadinović, Dragana Ignjatović Micić, Goran Stanković, Snežana Mladenović Drnić

### Summary

Protein quality of standard maize kernels is poor, due to the low levels of two essential aminoacids – lysine and tryptophan. The *opaque2* mutation which increases lysine and tryptophan content also confers an undesirable phenotype leading to low yields, soft and chalky kernels that renders seeds susceptible to storage pest and ear rots. Quality protein maize (QPM) is the maize with increased levels of these amino acids and good agronomic performances. At the Maize Research Institute, a program on creating QPM germplasm developed for conditions of temperate climatic zone is in progress. The aim of this study was to test quality traits of F2 kernels derived from the crosses between 24 QPM inbred lines with three standard inbred lines and two *opaque2* lines. Most of the analyzed 108 genotypes had tryptophan content under the threshold of 0.075 set for QPM (83.5%). However, 50% had elevated tryptophan content in the range from 0.065 to 0.074. High tryptophan content was found in 16.5% of the analyzed genotypes, the highest being 0.088. Only one genotype had quality index over 0.80 (threshold for QPM). Biochemical analysis identified genotypes with good protein quality which will be further tested for agronomic performances in order to potentially be considered as QPM hybrids.

**Key words:** maize, protein quality, tryptophan, QPM

Primljeno: 21. novembar 2012.  
Prihvaćeno: 26. novembar 2012.