



Oplemenjivanje pšenice na nizak sadržaj fitinske kiseline: stanje i perspektive

Gordana Branković · Desimir Knežević · Dejan Dodig · Vesna Dragičević

primljeno / received: 04.10.2010. prerađeno / revised: 15.11.2010. prihvaćeno / accepted: 29.11.2010.
© 2011 IFVC

Izvod: Potreba za oplemenjivanjem pšenice na nizak sadržaj fitinske kiseline proistekla je iz njene uloge antinutritivnog faktora koji vezujući mineralne elemente (Ca, Zn, Fe, Mn, Cu, kao i P) dovodi do njihovog nedovoljnog iskorišćavanja. Neiskorišćeni fosfor u kompleksu sa fitinskom kiselinom se preko lanca ishrane nepreživara (živina, svinje, ribe) izlučuje u spoljašnju sredinu i uzrokuje zagađivanje vodenih ekosistema. Razvijene su brojne indirektno (spektrofotometrijske) i direktne (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) metode za brzo i pouzdano utvrđivanje sadržaja fitinske kiseline u zrnu pšenice. Brojna istraživanja u svetu su pokazala da se sadržaj fitinske kiseline kreće od jedan do nekoliko procenata suve mase semena i 50% do 85% ukupnog fosfora u semenu. Utvrđena je značajna genetička varijabilnost sadržaja fitinske kiseline i fitatnog fosfora u zrnu sorata i linija pšenice u različitim uslovima spoljašnje sredine. Oplemenjivanjem je dobijen i mutant pšenice (*Triticum aestivum* L.) Js-12-LPA, za osobinu niskog sadržaja fitinske kiseline (*Low phytic acid*).

Ključne reči: fitinska kiselina, mutanti, oplemenjivanje, pšenica

Uvod

Rastući interes za istraživanja fitinske kiseline žitarica i leguminoza rezultat je njene uloge antinutritivnog faktora. Fitinska kiselina kao polivalentni anjon stvara helate sa mineralnim elementima i proteinima, onemogućavajući njihovo potpuno iskorišćavanje. Ishrana bogata fitinskom kiselinom značajno smanjuje apsorpciju važnih mikronutrijenata (kalcijum, cink, gvožđe, mangan i bakar) koje ljudi i nepreživari (živina, svinje, ribe) u vidu mešovitih soli izlučuju, dovodeći do njihovog ozbiljnog deficita, naročito kod siromašnih i zemalja u razvoju (Reicwald & Hatzack 2008, Khan et al. 2007, Guttieri et al. 2004, Lönnerdal 2002, García-Esteva et al. 1999, Tabekhia & Donnelly 1982, Nahapetian & Bassiri 1976, Lolas et al. 1976).

U SAD i Evropskoj Uniji ozbiljni naponi se ulažu da se smanji zagađivanje vodenih ekosistema fosforom koji se neiskorišćen u kompleksu sa

fitinskom kiselinom izlučuje životinjskim ekskrementima. Usled neiskorišćenosti unešenog fosfora iz žitarica neophodno je dodavati suplemente neorganskog fosfora ili granule enzima fitaze u stočnu hranu, radi postizanja optimalne produkcije mesa. Granule enzima fitaze se industrijski proizvode korišćenjem gljivičnih gena za fitazu, što značajno uvećava troškove proizvodnje, dok samo 50% fosfora vezanog u solima fitinske kiseline postaje dostupan (Reichwald & Hatzack 2008, Centeno et al. 2003, Raboy 2001a, Wodzinski & Ullah 1996, Greiner et al. 1998, Cromwell et al. 1993).

Pšenica doprinosi sa jednom petinom ukupnom svetskom unosu kalorija ishranom (FAO, 2009). Gaji se na više od 200 milion hektara obradivih površina od 67° N u Skandinaviji i Rusiji do 45° u Argentini uključujući i visinske delove u tropima i subtropima (Dodig 2010, Knežević et al. 2008a, Feldman 1995). Prosečan prinos u svetu je 2,8 t ha⁻¹ ali je visoko varijabilan po državama i regionima, i u Evropskoj Uniji je u periodu 2005-2007. iznosio 5 t ha⁻¹ dok je u Srbiji za isti period iznosio 3,4 t ha⁻¹ (Dodig 2010). Danas

G. Branković (✉)
Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Nemanjina 6, 11000, Beograd
e-mail: bgordana@agrif.bg.ac.rs
D. Knežević
Poljoprivredni fakultet u Lešku, Jelene Anžijske b.b., 38228, Zubin Potok
D. Dodig · V. Dragičević
Institut za kukuruz "Zemun Polje", Slobodana Bajića 1, 11080 Zemun

Rad je rezultat projekta TR20097 „Izučavanje genotipova strnih žita i oplemenjivanje na poboljšanje rodnosti, kvaliteta i adaptivne sposobnosti“ Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije / This article is a result of the project TR20097 funded by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia

je 95% pšenice koja se gaji u svetu heksaploidna hlebna pšenica, dok preostalih 5% čini tetraploidna durum pšenica (Dodig 2010).

Visok sadržaj fitinske kiseline kod pšenice dovodi najčešće do deficita mineralnih elemenata (Fe, Zn, Ca) i najviše se odražava na rast dece i zdravlje trudnica u zemljama sa niskom kupovnom moći stanovništva. Posledice po zdravlje ljudi koje nastupaju usled nedovoljnog iskorišćavanja ovih mineralnih elemenata su: anemije, kardiovaskularne bolesti, tkivna hipoksija, poremećaj pažnje i memorije, oslabljene motorne sposobnosti (Walter et al. 1997, Prasad 1996).

Pored negativnih antinutritivnih svojstava, fitinska kiselina ima i pozitivnih dejstava jer vezuje gvožđe i smanjuje formiranje hidroksilnih radikala u debelom crevu, pokazujući antioksidativno i antikancerogeno dejstvo (García-Estepa et al. 1999, Harland & Morris 1995, Graf et al. 1987). Pokazano je da fitinska kiselina povećava vigor klijanaca i usporava razvoj aflatoksina u zrnu pšenice (Ortiz-Monasterio et al. 2007, Tang et al. 2008).

Preporuke SZO i FAO jesu da se tržište u budućnosti snabdeva sortama pšenice sa niskim sadržajem fitinske kiseline (*low phytic*), ali i sortama sa visokim sadržajem fitinske kiseline (*high phytic*). Korišćenje oba tipa sorta pšenice će zavistiti od toga da li će služiti za stočnu hranu, za povećanje iskorišćavanja mikronutrijenata ili sprečavanje oksidativnog stresa i kancera.

Fitinska kiselina kod pšenice - uloga i fizička pozicija u semenu

Fitinska kiselina (*myo*-inositol (1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphate (InsP₆) predstavlja jedinjenje široko rasprostranjeno u semenu biljaka i najpoznatija je kao rezervna forma fosfora (P) u semenu. Obuhvata jedan do nekoliko procenata suve mase semena i 50% do 85% ukupnog fosfora u semenu pšenice (Raboy 2001a, Guttieri et al. 2004, Hídvégi & Lásztity 2002, Khan et al. 2007, Yenagi & Basarkar 2007, Dintzis et al. 1992, Nahpetian & Basiri 1976). Količina fosfora sintetisana u formi InsP₆ predstavlja više od 50% unešenog fosfora u agroekosisteme mineralnim đubrenjem na godišnjem nivou. Najveći deo fitinske kiseline je uskladišten u formi soli sa kalijumom, magnezijumom, kalcijumom, gvožđem i cinkom (fitini) u mikroakuolama i proteinskim telima-globoidima (Raboy 2001b, Svečnjak et al. 2007, Williams 1970).

Dokazane su višestruke uloge fitinske kiseline u obavljanju važnih ćelijskih funkcija: glavni je

izvor inozitola u metaboličkim putevima inozitol fosfata (Safrany et al. 1999); kao ligand sekundarnih „messenger” molekula (Sasakawa et al. 1995); učesće u popravci dvolančanih DNK prekida (Hanakahi et al. 2000); transportu RNK iz jedra (York et al. 1999); učesće u ATP metabolizmu (Safrany et al. 1999) i fiziološkom odgovoru stominih ćelija na ABA (Lemtiri-Chlieh et al. 2000).

U toku klijanja semena fitine razlaže enzim endogena fitaza, oslobađajući neorganski fosfor, *myo*-inositol i mineralne elemente koji se koriste za rast i razvoj klijanca. InsP₆ se akumulira i u drugim biljnim tkivima i organima kao što su polen, krtole, koren, zbog čega je organski fosfor u zemljištu i najprisutniji u obliku derivata fitinske kiseline. Fitinska kiselina i njeni pirofosfatni derivati imaju ulogu u obnovi ATP molekula neophodnih za održavanje bazalnog metabolizma u najranijim stadijumima klijanja pre formiranja mitohondrijalne membrane (Raboy 2001a, Williams 1970).

Utvrđeno je na osnovu istraživanja na *Triticum vulgare* cv. Insignia da se fitinska kiselina nalazi u klici, skutelumu, aleuronskom omotaču i spoljašnjim frakcijama perikarpa, dok se ne nalazi u frakcijama endosperma (Guttieri et al. 2004, Hídvégi & Lásztity 2002, Febles et al. 2001, Williams 1970). Fitinska kiselina se akumulira u aleuronu pšeničnog zrna koje je prošlo normalan tok razvoja posle 28 dana od početka klijanja, i posle 23 dana od početka klijanja kod zrna izloženog stresnim uslovima. Sinteza fitina je deo reakcije na stres u spoljašnjoj sredini i deo opšteg mehanizma za usporavanje metabolizma pre nastupanja dormantnosti, jer stvaranje helata sa metalnim katjonima kontroliše nivo fosfotransferaza od kojih zavisi ćelijski energetski metabolizam.

In vitro istraživanja su pokazala da fitinska kiselina i proteini formiraju komplekse od kojih su mnogi nerastvorljivi i biološki nedostupni u normalnim fiziološkim uslovima (Knežević et al. 2006, Febles et al. 2001). Proteolitički enzimi su manje efikasni u razlaganju proteinskih kompleksa sa fitinskom kiselinom nego slobodnih proteina (Cheryan 1980, Fox & Tao 1989).

Metode za utvrđivanje sadržaja fitinske kiseline

Najšire korišćene metode za utvrđivanje sadržaja fitinske kiseline kod žitarica su modifikacije procedura koje su razvili Heubner & Stadler (1914) i predstavljaju indirektno metode koje uključuju precipitaciju kompleksa sa gvožđem (Fe³⁺) na niskim pH vrednostima i spektrofotofoto-

metrijsku kvantifikaciju fosfora, Fe^{+3} , inozitola u precipitatu ili analizu preostalog gvožđa u supernatantu (Sandberg 1995, Vaintraub & Lapteva 1988, Oberleas 1983, García-Villanova et al. 1982, Latta & Eskin 1980, Oberleas 1971). Direktno analitičke metode koje su nezavisne u odnosu na formiranje Fe^{3+} kompleksa uključuju primenu HPLC metoda (*High-performance liquid chromatography*) (Larson et al. 2000, Raboy et al. 2000, Dorsch et al. 2003, Graf & Dintzis 1982a), HPLC koja uključuje jonoizmenjivačku proceduru (Dorsch et al. 2002, Graf & Dintzis 1982b, Tangendjaja et al. 1980, Harland & Oberleas 1977), “*capillary isotachophoresis*” tehnike (Blatny et al. 1995, Kikunaga et al. 1985), modifikovane hromatografije jonskih parova (Lehrfeld 1989).

Većina metoda za fotometrijsko utvrđivanje fitata je zasnovana na indirektnim merenjima. Vrš se ekstrakcija sa kiselinama HCl, H_2SO_4 ili HCl_3 koju sledi precipitacija sa Fe^{3+} . Kisela ekstrakcija je poželjna jer sirovi materijal, kao što je pšenica, može da sadrži visoki nivo endogene fitaze koja razgrađuje fitin (Oberleas & Harland 1986, Reicwald & Hatzack 2008). Neistaloženi Fe^{3+} joni se utvrđuju spektrofotometrijski i razlika u koncentraciji jona istaloženog i neistaloženog gvožđa se koristi za izračunavanje koncentracije fitinske kiseline. Jedan od najpoznatijih fotometrijskih metoda za određivanje koncentracije fitinske kiseline je protokol koji su razvili Haug & Lantzs (1983) koji koristi 2,2'-bipyridine kao kompleksirajući agens za kvantifikaciju Fe^{3+} , ali koji je do sada korišćen samo na kukuruзу. Modifikaciju metoda Haug & Lantzs za utvrđivanje sadržaja fitinske kiseline kod pšenice, soje i kukuruza su dali Reichwald & Hatzack (2008) prilagođavajući ekstrakciono vreme na 45 minuta i temperaturu na 100°C i smanjujući količinu toksične tioglikolne kiseline sa 1% v/v na 0.13% v/v.

Autori Febles et al. (2002) su primenili kompleksometrijsko određivanje sadržaja fitinske kiseline zasnovano na titraciji Fe^{3+} sumpor-salicilnom kiselinom po metodi Garcia-Villanova et al. (1982).

Metoda HPIC (*High performance ion chromatography*) se koristi kao specifična za određivanje inozitol fosfata (Pontoppodian et al. 2007, Camire & Clydesdale 1982) i kao referentna metoda za poređenje rezultata sa indirektnim metodama, kao što je modifikacija Haug & Lantzs (1983) (Reicwald & Hatzack 2008). Precizno određivanje sadržaja fitinske kiseline, na koju ne utiče proteinski sadržaj, omogućeno je ultrafiltracijom na membrani (30kDa) i ispiranjem proteinskih anjona sa kolone pre inozitol fosfata i fitinske kiseline.

Genetička varijabilnost sadržaja fitinske kiseline linija i sorata pšenice

Autori Yenagi & Basarkar (2008) su utvrdili da su sorte hlebne pšenice u severnoj Karnataki (Indija) imale prosečan sadržaj fitinske kiseline od $2,39 \text{ g } 100\text{g}^{-1} \pm 0,02 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, sorte durum pšenice $1,93 \text{ g } 100\text{g}^{-1} \pm 0,002 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ i sorte *dicoccum* pšenice $1,90 \text{ g } 100\text{g}^{-1} \pm 0,04 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$. Autori Hídvégi & Lásztity (2002) su dobili da sadržaj fitinske kiseline za sorte durum pšenice iznosi $0,72 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ i od $0,85 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ do $0,93 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ za sorte hlebne pšenice. Proučavajući odnos fitinske kiseline i mineralnih elemenata kod 12 sorata hlebne pšenice autori Nahapetian & Bassiri (1976) su utvrdili da je sadržaj fitatnog fosfora od $109 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ do $318 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$. Tabekhia & Donnelly (1982) su za šest sorata durum pšenice utvrdili da je sadržaj fitinske kiseline izražen kao procenat suve mase u opsegu 0,95% do 1,43%, kao i da sorte pšenice belog zrna imaju niži fitinski sadržaj od sorata pšenice crvenog zrna, sa čim su u saglasnosti rezultati Nahapetian & Bassiri (1976).

Lolas et al. (1976) su za 38 sorata i linija hlebne i durum pšenice utvrdili da se sadržaj fitinske kiseline, izražen kao procenat suve mase zrna, kreće od 0,62% do 1,35%. Khan et al. (2007) su analizom 66 mutanata/ sorata hlebne pšenice dobili da je sadržaj fitinske kiseline u zrnu od 0,98% do 2,17% izražen kao procenat suve mase zrna. Svečnjak et al. (2007) su utvrdili da prosečan sadržaj fitatnog fosfora za sorte hlebne pšenice Marija, Žitarka i Renan iznosi $3,84 \text{ g kg}^{-1}$ što čini 82% ukupnog sadržaja fosfora u zrnu pšenice. Sa navedenim rezultatima su u saglasnosti nalazi Syltie & Dahnke (1983) i Zebarth et al. (1992), dok su Liu et al. (2006) dobili više vrednosti, u opsegu $5,16\text{--}9,87 \text{ g kg}^{-1}$. Tang et al. (2008) su utvrdili da je sadržaj fitatnog fosfora za 43 sorte pšenice gajenih u Jinanu (Kina) iznosio 1.059 mg kg^{-1} . Bassiri & Nahapetian (1977) su utvrdili da sadržaj fitata u ukupnom fosforu zrna pšenice varira od 38% do 77% za sorte gajene u sušnim uslovima i od 73% do 94% za sorte gajene u uslovima navodnjavanja.

Batten (1986) je u ogledima sa 17 genotipova pšenice, koje su imale različite nivoe ploidnosti, utvrdio da je ukupni fosfor u zrnu 0,14% do 0,71% suve mase zrna, i da je bio najviši kod diploidnih genotipova, a najmanji kod heksaploidnih genotipova (Djukić et al. 2008). Utvrdili su i da je gotovo potpuno korelisan ($r = 0.99$) sa sadržajem fitatnog fosfora, dok su Nahapetian & Bassiri (1976) dobili koeficijent korelacije $r = 0.93$ i Lolos et al. (1976) su utvrdili da je $r = 0.97$. Stoga je selekcija za niži sadržaj ukupnog fosfora

predložena kao način da se ostvare niže fitatne koncentracije u zrnu. Međuzavisnost sadržaja fitinske kiseline sa agronomskim svojstvima bi bilo poželjno ispitati da bi se utvrdila mogućnost primene indirektno selekcije na sadržaj fitinske kiseline (Dodig et al. 2008b).

Svečnjak et al. (2007) su utvrdili statistički značajan uticaj genotipa ($P < 0.05$) na sadržaj fosfora u zrnu kao i statistički značajnu ($P < 0.05$) korelaciju ($r = -0.47$) između ukupnog fosfora i mase hiljadu zrna. Khan et al. (2007) su zaključili da je sadržaj fitinske kiseline u zrnu hlebne pšenice statistički značajno korelisan sa širinom semena ($P < 0.001$), debljinom semena ($P < 0.01$) i zapreminom semena ($P < 0.05$). Analizom varijanse su utvrdili da su genotip, sredina i interakcije genotip x sredina visoko statistički značajno uticali na sadržaj fitinske kiseline u zrnu, sa najvećim uticajem lokaliteta. Predloženo je da je pravilnu proceduru sortimenta za sadržaj fitinske kiseline potrebno obavljati u višelokacijskom ogledu (Dodig et al. 2007, Dodig et al. 2008a).

Najveći deo fitata u pšeničnom zrnu se nalazi u aleuronskom omotaču i tokom mlevenja većina aleuronskih ćelija ostaje sa česticama perikarpa, pa je to razlog što je najveći deo fitata koncentrisan u frakcijama mekinja (Tang et al. 2008) i do 5 puta više nego u brašnu (Zečević et al. 2007). Celo pšenično zrno sadrži 0,3% do 0,4% fitata dok mekinje sadrže do 5% (O'Dell et al. 1972). García-Estapa et al. (1999) su utvrdili da je sadržaj fitinske kiseline u brašnu dobijenim od hlebne pšenice od 2,94 mg g⁻¹ do 4,04 mg g⁻¹, dok je za durum pšenicu iznosio 9,41 mg g⁻¹. U mekinjama je bio 30,34 mg g⁻¹ do 36,42 mg g⁻¹ za hlebu pšenicu i 24,96 mg g⁻¹ za durum, dok je griz hlebne pšenice sadržao od 20,18 mg g⁻¹ do 26,73 mg g⁻¹ i 9,87 mg g⁻¹ kod duruma. Autori Febles et al. (2001) su utvrdili da je koncentracija fitinske kiseline u rafiniranom pšeničnom brašnu iznosila 2-4 mg g⁻¹, dok je za brašno dobijeno od celog zrna bila 6-10 mg g⁻¹. Camire & Clydesdale (1982) su utvrdili da sadržaj fitinske kiseline kod mekinja dobijenih od durum pšenice crvenog zrna iznosi 68,8 ± 1,85 mg g⁻¹, dok je kod mekinja dobijenih od hlebnih pšenica belog zrna iznosila 50,27 ± 1,45 mg g⁻¹.

Autori Dintzis et al. (1992) su utvrdili da je na sadržaj fitinske kiseline u frakcijama mekinja 15 sorata meke pšenice prevashodno uticala sredina i da je sadržaj fitinske kiseline u mekinjama korelisan sa parametrima mlinskog kvaliteta: procentom ekstrakcije brašna (EXI), endospermnim separacionim indeksom (ESI) i sa drobljivošću.

Na sadržaj fitinske kiseline mlinskih frakcija pšenice najviše utiče tip frakcije, ali je u ANOVA

utvrđen i statistički značajan ($P < 0.01$) uticaj lokaliteta, genotipa, interakcije genotip x lokalitet i lokalitet x mlinska frakcija (Tabekhia & Donnelly, 1982). Tang et al. (2008) su utvrdili statistički značajan ($P < 0.001$) uticaj mlinske frakcije i statistički značajan ($P < 0.01$) uticaj genotipa u ANOVA za sadržaj fitatnog fosfora.

Oplemenjivanje pšenice na nizak sadržaj fitinske kiseline

S obzirom da je fitinska kiselina rezervna forma fosfora u zrnu, ukupni fosfor i fitinska kiselina su u visokoj, pozitivnoj korelaciji. Spoljašnja sredina i genotip su faktori koji redukuju ukupni sadržaj fosfora, dovodeći čak do snižavanja sadržaja fitinske kiseline (Dragičević et al. 2010, Knežević 2007a, Raboy 2001a). Proučavajući dve populacije ozime pšenice (*Triticum aestivum* L.) autori Raboy et al. (1991) su utvrdili da je sadržaj fitinske kiseline statistički značajno korelisan sa ukupnim sadržajem fosfora ($r = 0.93$ i $r = 0.96$ u populacijama 1 i 2) kao i sa sadržajem proteina ($r = 0.65$ i $r = 0.87$). Navedeno ukazuje da će selekcija na nizak sadržaj fitinske kiseline dovesti do neželjenog smanjenja ukupnog fosfora i proteina u zrnu. Preveliko sniženje sadržaja fitinske kiseline ne bi bilo dobro jer je njena uloga kao helatora mineralnih elemenata važna za metaboličku ravnotežu u semenu pre klijanja (Mladenović-Drinić et al. 2009, Perić et al. 2009).

Dobijen je mutant pšenice (*Triticum aestivum* L.) niskog sadržaja fitinske kiseline i označen je kao Js-12-LPA (Guttieri et al. 2004). Js-12-LPA homozigoti imaju zrna u kojima je fosfor fitinske kiseline predstavljen sa 48,2% ukupnog fosfora zrna u poređenju sa nemutantnim (wild type WT) genotipom Js-12-WT, kod koga je sadržaj fitatnog fosfora u odnosu na ukupni 74,7%. Neorganski fosfor je povećan sa 9,1% u Js-12-WT na 50,1% u Js-12-LPA. Svojstvo niskog sadržaja fitinske kiseline je promenilo raspodelu ukupnog fosfora u zrnu, povećavajući njegov sadržaj u centralnom endospermu i smanjujući sadržaj u mekinjama. Sadržaj fitinske kiseline u mekinjama je povećan za 43%. Praćenje nasleđivanja analiziranjem F₂ i F_{4.6} familija (Knežević et al. 2008b) je utvrdilo da su u nastanak mutantnog fenotipa za nizak sadržaj fitinske kiseline uključena dva gena.

Guttieri et al. (2006a) su izveli ogledne 2003. i 2004. na dva lokaliteta koji su uključili WT i LPA genotipove jare pšenice: tvrdih i crvene boje zrna, tvrdih i bele boje zrna i mekih bele boje zrna. LPA genotipovi jarih sorata pšenice sa crvenom bojom zrna su imali zakasneli razvoj i redukovani prinos zrna za 8% do 25% u prinosnijoj sredini,

delom zbog redukovane veličine zrna od 3 mg po zrnju. Kod LPA genotipova jare pšenice tvrdih i bele boje zrna, nisu bile zabeležene razlike u razvoju zrna i prinosu u odnosu na WT genotipove, ali su u prinostnijoj sredini LPA genotipovi imali manja zrna za 2,0-2,4 mg po zrnju. LPA genotipovi meke pšenice bele boje zrna, su se razvili ranije i prinos im je bio redukovan za 20% do 24% u prinostnijoj sredini, dok su im zrna bila teža i šira u odnosu na WT genotipove. Odsustvo ujednačenih efekata *lpa* mutacija kroz tri genetički različita materijala vodi zaključku da se štetni efekti genotipova sa svojstvom niskog sadržaja fitinske kiseline mogu popraviti oplemenjivanjem (Knežević 2007b).

LPA genotipovi tvrde pšenice nisu imali štetne efekte na koncentraciju proteina u brašnu, sposobnost razvoja gasova i zapreminu hleba (Guttieri et al. 2006b). Utvrđeno je povećanje od 0,93 g kg⁻¹ pepela u brašnu kod LPA genotipova u odnosu na WT genotipove, ali to nije uticalo na boju reznaca ($L^* = 86,8-87,5$) koja je bila slična boji reznaca tvrdih WT genotipova bele boje zrna ($L^* = 86,1-87,9$). Kod LPA genotipova jarih sorata pšenice crvene i bele boje zrna, je došlo do preraspodele mineralnih elemenata iz mekinja u endosperm, dovodeći do nepoželjne karakteristike kvaliteta brašna-povećanog sadržaja pepela u brašnu (Knežević et al. 2010). LPA genotipovi meke jare pšenice su imali viši sadržaj Na₂CO₃ i saharoze u brašnu (za 31 g kg⁻¹ i 43 g kg⁻¹) u odnosu na WT genotipove, što je ukazalo da je kod LPA genotipova došlo do većeg oštećenja skroba i pentozana pri mlevenju u odnosu na WT genotipove. Farinografski tolerancioni indeks i apsorpciona moć su za tvrde sorte hlebne pšenice crvene boje zrna, bili nepromenjeni kod LPA genotipova u odnosu na WT. Promena reoloških karakteristika nije imala štetne posledice na kvalitet brašna.

Guttieri et al. (2007) su povratnim ukrštanjem uneli mutantni *lpa1-1* fenotip u sortu jare tvrde pšenice crvene boje zrna-Grandin. WT i LPA familije srodnika su gajene tokom dve godine i praćene su osobine kvaliteta. Sadržaj neorganskog fosfora (P) u LPA zrnima bio je 3,4 puta veći u odnosu na sadržaj u WT zrnima. Koncentracija fitinske kiseline u LPA zrnima bila je snižena za 65% u odnosu na koncentraciju u WT zrnima. Stoga je i sadržaj P_i u brašnu od LPA genotipova bio 3-4 puta veći, dok je ukupni fosfor bio uvećan za 20% u odnosu na brašno dobijeno od WT genotipova. Koncentracija Mg je u brašnu dobijenom od LPA genotipova bila za 20% veća, dok su koncentracije mineralnih elemenata u mekinjama bile identične i kod LPA i WT genotipova. Povećan sadržaj P i Mg je doveo do porasta udela pepela u brašnu sa 3,86 g kg⁻¹ kod WT genotipova na 4,38 g kg⁻¹ kod LPA genotipova. Koncentracije proteina kod obe familije srodnika su bile slične, ali su farinografsko vreme razvoja i maksimalna konzistencija bili veći kod brašna dobijenom od LPA genotipova.

Zaključak

Istraživanja genetičke varijabilnosti sadržaja fitinske kiseline pšenice i rad na stvaranju sorata pšenice niskog sadržaja fitinske kiseline postaju sve aktuelnija. Oplemenjivačke napore je potrebno usmeriti na optimalno snižavanje sadržaja fitinske kiseline u zrnju da bi se nutritivna svojstva zrna poboljšala i smanjila zagađenost vodenih ekosistema viškom fosfora. Sniženje sadržaja fitinske kiseline zrna ne bi trebalo da bude preveliko jer fitinska kiselina pokazuje i pozitivna svojstva kao antioksidans i antikancerogeni agens. Način za ostvarivanje tog cilja je primena mutacija i metoda povratnog ukrštanja, kao i rekurentne selekcije za popravku agronomskih osobina koje se introgresijom mutiranih gena delom pogoršavaju.

Literatura

- Bassiri A, Nahapetian A (1977): Differences in concentrations and interrelationships of phytate, phosphorus, magnesium, calcium, zinc, and iron in wheat varieties grown under dry land and irrigated conditions. *J. Agric. Food Chem.* 25: 1118-1122
- Batten G D (1986): Phosphorus fractions in the grain of diploid, tetraploid and hexaploid wheat grown with contrasting phosphorus supplies. *Cereal Chem.* 63: 384-387
- Blatny P, Kvasnicka F, Kandler E (1995): Determination of phytic acid in cereal grains, legumes and feeds by capillary isotachopheresis. *J. Agric. Food Chem.* 43: 129-133
- Camire A L, Clydesdale F M (1982): Analysis of Phytic Acid in Foods by HPLC. *J. Food Sci.* 47: 575-578
- Centeno C, Viveros A, Brenes A, Lozano A, De La Cuadra C (2003): Effect of several germination conditions on total P, phytate P, phytase, acid phosphatase activities and inositol phosphate esters in spring and winter wheat. *J. Agric. Sci.* 141: 313-321
- Cheryan M (1980): Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 13: 296-335
- Cromwell G L, Stahly T S, Coffey R D, Monegue H J, Randolph J H (1993): Efficacy of low-activity, microbial phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. *J. Anim. Sci.* 71: 1831-1840
- Dintzis F R, Lehrfeld J, Nelsen T C, Finney P L (1992): Phytate content of soft wheat brans as related to kernel size, cultivar, location and milling and flour quality parameters. *Cereal Chem.* 69: 577-581
- Đukić N, Knežević D, Zečević V (2008): Genetic determination of technological quality in *Triticum durum*. *Periodicum Biologorum* 110: 285-289
- Dodig D, Zorić M, Knežević D, Dimitrijević B, Šurlan-Momirović G (2007): Assessing wheat performance using environmental information. *Genetika* 39: 413-425
- Dodig D, Zoric M, Knezevic D, King SR, Surlan-Momirovic G (2008a): Genotype x environment interaction for wheat yield in different drought stress conditions and agronomic traits suitable for selection. *Aust. J. Agric. Res.* 59: 536-545
- Dodig D, Zorić M, Mitić N, Nikolić R, Šurlan-Momirović G (2008b): Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95: 107-114
- Dodig D (2010): Wheat breeding for drought resistance. *Društvo genetičara Srbije*. Beograd
- Dorsch J A, Cook A, Young K A, Anderson J M, Bauman A T, Volkmann C J, Murthy P P N, Raboy V (2003): Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley low phytic acid genotypes. *Phytochemistry* 62: 691-706
- Dragičević V, Simić M, Stefanović L, Sredojević S, Dumanović Z (2010): The alteration of phytic phosphorus content in maize inbred lines, caused by post-emergence herbicides. *Proceedings of 3rd International Scientific/Professional Conference "Agriculture in Nature and Environment Protection"*, 31st May – 2nd June, 2010, Vukovar, Croatia, 59-64
- Febles C I, Arias A, Hardisson A, Rodríguez-Alvarez C, Sierra A (2002): Phytic acid level in wheat flours. *J. Cereal Sci.* 36: 19-23
- Feldman M (1995): Wheats. In: Smartt J., Simmonds N.W. (eds.) *Evolution of Crop Plants*. Longman Scientific and Technical, Harlow, UK, 185-192
- Fox M R S, Tao S H (1989): Antinutritive effects of phytate and other phosphorylated derivatives. *Nutrition Toxicology* 3: 59-62
- García-Villanova R, García-Villanova R J, Ruiz de Lope C (1982): Determination of phytic acid by complexometric titration of excess iron (III). *Analyst* 107: 1503-1506
- García-Esteva R M, Guera-Hernández E, García-Villanova B (1999): Phytic acid content in milled cereal products and breads. *Food Res. Int.* 32: 217-221
- Graf E, Dintzis F R (1982a): High-performance liquid chromatographic method for the determination of phytate. *Anal. Biochem.* 119: 413
- Graf E, Dintzis F R (1982b): Determination of Phytic Acid in Foods by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 30: 1094-1097
- Graf E (1987): Phytic acid: a natural antioxidant. *J. Biol. Chem.* 262: 11647-11650
- Greiner R, Konietzny U, Jany K D (1998): Purification and properties of a phytase from rye. *J. Food Biochem.* 22: 143-161
- Guttieri M, Bowen D, Dorsch J A, Raboy V, Souza E (2004): Identification and characterization of a low phytic acid wheat. *Crop Sci.* 44: 418-424
- Guttieri M J, Peterson K M, Souza E J (2006a): Agronomic performance of low phytic acid wheat. *Crop Sci.* 46: 2623-2629
- Guttieri M J, Peterson K M, Souza E J (2006b): Milling and baking quality of low phytic acid wheat. *Crop Sci.* 46: 2403-2408
- Guttieri M J, Peterson K M, Souza E J (2007): Nutritional and baking quality of low phytic acid wheat. In: Buck HT et al. (eds.), *Wheat production in stressed environments*, Springer, 487-493
- Hanakahi L A, Bartlett-Jones M, Chappell C, Pappin D, West SC (2000): Binding of inositol phosphate to DNK-PK and stimulation of double-strand break repair. *Cell* 102: 721-729
- Harland B F, Oberleas D (1977): A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure-application to texture vegetable protein. *Cereal Chem.* 54: 827
- Harland B F, Morris E R (1995): Phytate: a good or a bad food component? *Nutrition Res.* 15: 733-754
- Haug W, Lantzsch H J (1983): Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agric.* 34: 1423-1426
- Heubner W, Stadler H (1914): On a titration method of determining phytate. *Biochem. Z.* 64: 422-437
- Hídvégi M, Lásztity R (2002): Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins. *Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.* 46: 59-64
- Khan A J, Ali A, Azam F I, Zeb A (2007): Identification and isolation of low phytic acid wheat (*Triticum aestivum* L.) inbred lines / mutants. *Pak. J. Bot.* 39: 2051-2058
- Kikunaga S, Takashi M, Huzisige H (1985): Accurate and simple measurement of phytic acid contents in cereal grains. *Plant Cell Physiol.* 26: 1323-1330
- Knežević D, Mićanović D, Zečević V, Madić M, Paunović A, Djukić N, Šurlan-Momirović G, Dodig D, Urošević D (2006): Oplemenjivanje u funkciji obezbeđenja semena biološki vredne hrane. U: D. Knežević (ured.), *Unapredjenje poljoprivredne proizvodnje na Kosovu i Metohiji*. Poljoprivredni fakultet u Prištini, Lešak, 71-87
- Knežević D (2007a): Oplemenjivanje pšenice osnova održivog razvoja. U: K. Konstatinov i V. Andjelković (ured.) *Nauka - osnova održivog razvoja*. Društvo genetičara Srbije, Beograd, 241-265
- Knežević D (2007b): Osnovne metode u oplemenjivanju i semenarstvu biljaka. *Foto-oko*, Novi Sad
- Knežević D, Đukić N, Zečević V, Madić M, Paunović A, Dodig D, Knežević J, Branković G (2008a): Varijabilnost osobina semena pšenice (*Triticum aestivum* L.). *Zbornik abstrakata sa Petog naučno-stručnog simpozijuma iz selekcije i semenarstva Društva selekcionara i semenara Republike Srbije*, Vrnjačka Banja, 25-28. maj, 57
- Knezevic D, Djulic N, Paunovic A, Madić M (2008b): Variability of harvest index and yield components in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Res. Commun.* 36: 1151-1154

- Knežević D, Dodig D, Kandić V, Branković G, Prodanović S, Šurlan-Momirović G. (2010): Tehnološki kvalitet sorti pšenice Instituta za kukuruz "Zemun polje". Zbornik izvoda sa VI naučno-stručnog simpozijuma iz selekcije i semenarstva Društva selekcionara i semenara Republike Srbije, 17-21.05.2010. Vršac, Srbija, 91
- Larson S R, Rutger J N, Young K A, Raboy V (2002): Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid mutation. *Crop Sci.* 40:1397-1405
- Latta M, Eskin M (1980): A simple and rapid colorimetric method for phytine determination. *J. Agric. Food Chem.* 28: 1308-1311
- Lehrfeld J (1989): High-performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable, macroporus polymer column. *Cereal Chem.* 66: 510
- Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie E A C, Brearley C A (2000): Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K⁺-inward rectifying conductance in guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 8687-8692
- Liu Z H, Wang H Y, Wang X E, Zhang G P, Chen P D, Liu D J (2006): Genotypic and spike positional difference in grain phytase activity, phytate, inorganic phosphorus, iron, and zinc contents in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Cereal Sci.* 44: 212-219
- Lolas G M, Palamidis N, Markakis P (1976): The phytic acid-total phosphorus relationship in barley, oats, soybeans, and wheat. *Cereal Chem.* 53: 867-871
- Lönnnerdal B (2002): Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. *International J. Food Sci. Tech.* 37: 749-758
- Mladenović-Drinić S, Ristić D, Sredojević S, Dragičević V, Micić-Ignjatović D, Delić N (2009): Genetic variation of phytate and inorganic phosphorus in maize population. *Genetika* 41: 107-115
- Nahapetian A, Bassiri A (1976): Variations in concentrations and interrelationships of phytate, phosphorus, magnesium, calcium, zinc and iron in wheat varieties during two years. *J. Agric. Food Chem.* 24: 947-950
- Oberleas D (1971): The Determination of Phytate and Inositol Phosphates. *Methods Biochem. Anal.* 20: 87-101
- Oberleas D (1983): Phytate content in cereals and legumes and methods of determination. *Cereal Foods World* 28: 6
- Oberleas D, Harland B F (1986): Analytical methods for phytate. In: Graf E. (ed) Phytic acid: Chemistry and Applications, Pilatus Press: Minneapolis, MN, 77-78
- O'Dell B L, De Boland A R, Koirtyohann S R (1972): Distribution of phytate and nutritionally important elements among morphological components of cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* 20: 718-721
- Ortiz-Monasterio I, Palacios-Rojas N, Meng E, Pixle K, Tretlowan R, Pena R J (2007): Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. *J. Cereal Sci.* 46: 293-307
- Perić V, Dragičević V, Sredojević S, Srebrić M, Terzić D, Mladenović-Drinić S (2009): Genetička varijabilnost sadržaja fosfora u semenu soje. *J. Sci. Agric. Res.* 70: 79-84
- Pontoppidan K, Petterson D, Sandberg A S (2007): The type of thermal feed treatment influences the inositol phosphate composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132: 137-147
- Prasad A S (1996): Zinc deficiency in women, infants and children. *J. Am. Coll. Nutr.* 15: 113-120
- Raboy V, Noaman M M, Taylor G A, Pickett S G (1991): Grain phytic acid and protein are highly correlated in winter wheat. *Crop Sci.* 31: 631-635
- Raboy V (2001a): Progress in breeding low phytate crops. Symposium: Plant Breeding: A new tool for fighting micronutrient malnutrition, April 1st, Orlando, Florida, 503-505
- Raboy V (2001b): Seeds for a better future: "low phytate" grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends Plant Sci.* 6: 458-462
- Raboy V, Young K A, Dorsch J A, Cook A (2001): Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *J. Plant Physiol.* 158: 489-497
- Reichwald K, Hatzack F (2008): Application of a modified Haug and Lantzsch method for the rapid and accurate phytate determination in soybean, wheat and maize meals. *J. Agri. Food Chem.* 56: 2888-2891
- Safrany S T, Caffrey J J, Yang X, Shears S B (1999): Diphosphoinositol polyphosphates: the final frontier for inositide research. *Biol. Chem.* 380: 945-951
- Sandberg A S (1995): Determination of phytic acid. In: Recent progress in the analysis of dietary fibre Luxembourg: European Commission, Cost 92, 93-103
- Sasakawa N, Sharif M, Hanley M R (1995): Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate. *Biochem. Pharmacol.* 50: 137-146
- Svečnjak Z, Bujan M, Dragojević I V, Vitali D, Čebušnik A, Jenel M (2007): Nitrogen and phosphorus content, hectoliter weight and yield variations of wheat grain as affected by cropping intensity. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 72: 251-255
- Syllie P W, Dahnke W C (1983): Mineral and protein content, test weight, and yield variations of hard red spring wheat as influenced by fertilization and cultivar. *Qual. Plant.* 32: 37-49
- Tabekhia M M, Donnelly B J (1982): Phytic acid in durum wheat and its milled products. *Cereal Chem.* 59: 105-107
- Tang J, Zou C, He Z, Shi R, Ortiz-Monasterio I, Qu Y, Zhang Y (2008): Mineral element distributions in milling fractions of Chinese wheats. *J. Cereal Sci.* 48: 821-828
- Tangendjaja B, Buckle K A, Wootton M (1980): Analysis of phytic acid by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 197: 274
- Vaintraub L A, Lapteva N A (1988): Colorimetric determination of phytate in unpurified extracts of seeds and the products of their processing. *Analyt. Biochem.* 175: 227-230
- Walter T, Peirano P, Ronglacliolo M (1997): Effect of iron deficiency anemia on cognitive skills and neuromaturation in infancy and childhood. In: Fisher, P.W.F, L'Abbé M.R., Cockell, K.A., Gibson RS (Eds.), Trace Elements in Man and Animals-9. Proceedings of the Nineth International Symposium on Trace Elements in Man and Animals. National Research Council of Canada, Ottawa, 217-219
- Williams S G (1970): The role of phytic acid in the wheat grain. *Plant Physiol.* 45: 376-381
- Wodzinski R J, Ullah A H J (1996): Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42: 263-302
- Yenagi S N, Basarkar P W (2008): Antioxidant contents of whole grain cereals of North Karnataka. *Karnataka J. Agric. Sci.* 21: 602-603
- York J D, Odom A R, Murphy R, Ives E B, Wente S R (1999): A phospholipase dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* 285: 96-100
- Zebarth B J, Warren C J, Sheard R W (1992): Influence of the rate of nitrogen fertilization on the mineral content of winter wheat in Ontario. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1528-1530
- Zečević V, Knežević D, Mićanović D (2007): Variability of technological quality components in winter wheat. *Genetika* 39: 65-74

Wheat Breeding for Low Phytic Acid Content: State and Perspectives

Gordana Branković¹ · Desimir Knežević² · Dejan Dodig³ · Vesna Dragičević³

¹Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Nemanjina 6, 11080 Zemun

²Faculty of Agriculture, University of Priština, Jelene Anžuške b.b., 38228 Zubin Potok

³Maize Research Institute "Zemun Polje", Slobodana Bajića 1, 11080 Zemun

Summary: Interest in wheat breeding for low phytic acid content arised from its roll as antinutrient factor which chelates mineral elements (Ca, Zn, Fe, Mn, Cu and P), leading to their inadequate use. Excretion of unused P in phytic acid complex through non-ruminant animals such as poultry, swine and fish causes water eutrophication. Numerous indirect methods (e.g. spectrophotometric) and direct methods (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) were developed for fast and accurate phytic acid determination in wheat. It typically represents 50-85% of seed total phosphorus and one to several percents of dry seed weight. Phytic acid content and phytate phosphorus genetic variability have been determined for wheat cultivars and lines under different environmental conditions. Wheat mutant (*Triticum aestivum* L.) for low phytic acid content Js-12-LPA was created through breeding efforts.

Key words: breeding, mutants, phytic acid, wheat