

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

Marko Ključarić

**Selekcija na niski sadržaj tripsin inhibitora u zrnu soje primjenom
molekularnih markera**

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ivana Pejića uz neposredno voditeljstvo mag. ing. agr. Zoe Andrijanić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Značaj soje u Europi i Hrvatskoj.....	2
1.2. Osnovne karakteristike soje kao poljoprivredne kulture.....	3
1.2.1. Tripsin inhibitori.....	5
1.2.2. Utvrđivanje razine TI u zrnu pomoću HPLC.....	7
1.3. Selekcija potpomognuta markerima (MAS).....	8
1.3.1. Razvijeni markeri na KTI.....	9
2. HIPOTEZE I CILJEVI RADA.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Biljni materijal.....	12
3.2. Ekstrakcija DNA.....	13
3.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	14
3.4. Elektroforeza na gelu.....	15
3.5. Kapilarna elektroforeza.....	17
3.6. HPLC analiza.....	18
3.7. Analiza podataka.....	18
4. REZULTATI.....	19
4.1. Broj i učestalost alela na mikrosatelitskom lokusu Satt228.....	19
4.2. Povezanost marker lokusa za pretpostavljeno niski sadržaj KTI i vrijednosti utvrđenih pomoću HPLC.....	21
4.3. Analiza linija F ₅ i F ₈ generacije na sadržaj KTI u zrnu.....	24
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČAK.....	28
7. ZAHVALE.....	29
8. POPIS LITERATURE.....	30

9. SAŽETAK	35
10. SUMMARY	36
PRILOZI.....	37
Prilog 1. Popis svih analiziranih genotipova iz kolekcije Crop-BioDiv	37
Prilog 2. Rezultati F ₂ populacije ASD	39
Prilog 3. Rezultati F ₂ populacije BM	41

1. UVOD

Soja [*Glycine max* (L.) Merr.] je biljna vrsta koja pripada porodici mahunarki (*Fabaceae*). Porijeklom je iz istočne Azije gdje se uzgaja već tisućama godina. Soja u svijetu, Europi i Hrvatskoj predstavlja jednu od glavnih uljnih i proteinskih kultura, a osnova za proizvodnju u Hrvatskoj su domaće sorte koje su najprikladnije za lokalne uvjete (Andrijanić i sur., 2022). Na globalnoj razini, soja čini čak 71% izvora ukupnih proteina (FAOSTAT, 2022). Zbog visokog sadržaja proteina i ulja u sjemenu, soja se koristi za ishranu stoke te za ljudsku prehranu. Znatno je više zastupljena u proizvodnji hrane za stoku gdje se koristi u obliku sojine sačme i brašna za sastavljanje krmnih smjesa.

Potrebe za sve većom proizvodnjom hrane u svijetu između ostalog zahtijevaju i povećanje prinosa po jedinici površine. Kako bi se ovo postiglo, kontinuirano se primjenjuju brojne agrotehničke mjere i druge metode za povećanje prinosa. U te metode se ubraja stvaranje novih sorata kroz oplemenjivačke programe, što je slučaj i u proizvodnji soje. Oplemenjivanjem se mogu dobiti nove sorte koje daju više prinose i zrno boljeg kvalitativnog sastava. Jedan od problema kod korištenja soje u ishrani stoke je što sirova soja u svojem sastavu sadrži nekoliko antinutritivnih spojeva zbog čega ju životinje ne mogu probaviti, pa ju je prethodno potrebno termički obraditi. Ovo uzrokuje velike troškove i značajna je poteškoća za proizvođače (Beuković. 2014., Maranna i sur., 2016).

Dosadašnja praksa u proizvodnji i preradi soje uglavnom ne uključuje kemijsku analizu uroda pomoću koje bi se provjerio stvarni sadržaj nepoželjnih spojeva u zrnu. Ona je najčešće preskupa pa se postupci termičke obrade provode rutinski, pretpostavljajući gornje granice antinutritivnih spojeva, a time i s velikim utroškom energije.

Učinkovito rješenje za ovaj problem bi bilo primjena sorata soje koje imaju značajno smanjen udio antinutritivnih spojeva u zrnu. Nekoliko je spojeva u zrnu soje koje možemo smatrati nepoželjnim: stahioza, rafinoza, sukroza, tripsin inhibitori, lektini, ureaza i fitinska kiselina (Grant. 1989., Liener, 1994., Vagadia i sur., 2017). Među njima, značajno mjesto zauzimaju tripsin inhibitori (TI). Unutar germplazme soje za svojstvo niskog sadržaja TI postoji genetska varijabilnost pa je metodama

oplemenjivanja bilja moguće stvoriti nove sorte sa značajno nižim sadržajem ovih antinutritivnih proteina. Stoga moderni oplemenjivački programi vode računa o ovom svojstvu i nastoje stvoriti nove sorte koje se odlikuju ne samo visokim prinosom zrna i visokim sadržajem proteina, već i niskim sadržajem TI. Štoviše, od nedavno su na hrvatskom tržištu prisutne i sorte sa sniženim sadržajem TI (Bc institut, 2017). Dakle, oplemenjivačkim postupkom se mogu dobiti sorte koje bi po sastavu sjemena bile kvalitetnije i ne bi se morale termički obrađivati, ili bi se morao obrađivati samo manji dio ukupnog uroda.

Jedan od alata u oplemenjivanju bilja je i molekularno oplemenjivanje, u kojem se najčešće koristi selekcija pomoću molekularnih biljega. Posebnost ove metode je brz postupak selekcije, povećana točnost selekcije i direktna analiza genoma kojom se izbjegava učinak okolišnih uvjeta. Najviše se primjenjuje u odabiru poželjnih donora, utvrđivanju učestalosti pojedinih alela, unošenju gena iz srodnih vrsti te u povratnim križanjima (Hasan i sur., 2021). Zbog navedenih specifičnosti je upravo ovaj pristup poželjan u selekciji na niski sadržaj TI, a postoje i istraživanja u kojima je potvrđeno da se primjenom ove metode mogu stvoriti linije soje sa niskim sadržajem TI (Bulatova i sur., 2019).

Na Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku Agronomskog fakulteta u Zagrebu provodi se najstariji hrvatski program oplemenjivanja soje koji ima fokus na razvoj novih sorata kraće vegetacije, tolerantnih na sušu i niskog sadržaja TI u zrnu. Za potrebe selekcije biljaka s niskim sadržajem TI u oplemenjivačkim populacijama potrebno je provesti genotipizaciju kolekcije sorata s ciljem identifikacije poželjnih donora te razviti pouzdan i racionalan protokol za selekciju pomoću molekularnih biljega.

1.1. Značaj soje u Europi i Hrvatskoj

Soja je danas u poljoprivrednoj proizvodnji visoko zastupljena kultura. Na svjetskoj razini je prema podacima FAOSTAT-a u 10 najviše uzgajanih, a razlog tome je kvaliteta i sastav sojinog zrna što ju čini vrlo vrijednim izvorom hranjivih tvari. U Europi se soja proizvodi na 5,5 milijuna ha površine i ukupan prinos u 2021. godini je bio 11,5 milijuna tona (FAOSTAT, 2022). Na teritoriju RH je u 2021. godini soja bila uzgajana

na ukupno 86.260 ha površine, a ukupno je proizvedeno 227.870 tona (FAOSTAT, 2022). Ovo ju čini četvrtom ratarskom kulturom u Hrvatskoj (nakon kukuruza, pšenice i šećerne repe). S obzirom da je u RH proizvodnja genetski modificiranog (GM) materijala zakonom zabranjena (NN 126/19.), sva proizvedena soja potječe od genetski nemodificiranih izvora, što ju čini poželjnom za ekološki uzgoj te izvoz na tržišta koja su zabranila korištenje genetski modificirane soje (Andrijanić i sur., 2022). Zrno soje se na prostoru Hrvatske prvenstveno koristi kao sirovina u industriji stočne hrane za sastavljanje krmnih smjesa. Proizvodnja soje u Hrvatskoj bilježi pozitivne trendove, a postoje i značajni potencijali za daljnje povećanje proizvodnje zbog dostupnosti domaćeg sortimenta visokih agronomskih vrijednosti i kvalitetnog sastava zrna (Andrijanić i sur., 2022).

1.2. Osnovne karakteristike soje kao poljoprivredne kulture

Soja [*Glycine max* (L.) Merr.] je jednogodišnja jara (proljetna) biljna vrsta i pripada porodici *Fabaceae*. Sije se u proljeće, a žanje u jesen. Kako se u konvencionalnoj poljoprivedi uzgaja već dugi niz godina, stvoren je veliki broj sorti koje se razlikuju po duljini vegetacije tj. vremenu dozrijevanja, ali i boji hiluma, krupnoći zrna, okusu, kemijskim svojstvima te naravno i u prinosu. Prema Vratarić i Sudarić (2008.), sorte soje su prema duljini vegetacije podijeljene u 13 različitih grupa zriobe. Za proizvodnju u Hrvatskoj su najpogodnije sorte iz grupe zriobe 0 (Kurasch i sur., 2017). Kod nas su u uzgoju najviše zastupljene sorte iz grupa zriobe 0 i 1, ali se koriste i ranije i kasnije.

Morfološka svojstva soje variraju između različitih sorti i dijelom su pod utjecajem genotipa, a dijelom i uvjeta okoline u kojoj se sorta uzgaja. Sorte u komercijalnoj proizvodnji imaju stabljiku koja prosječno dosegne između 75 i 125 cm visine. Korijenov sustav je vretenast i pretežno se razvija u prvih 15 cm dubine tla, a lateralno se može širiti i do 150 cm (Lersten i Carlson, 2004). Na korijenovom sustavu se razvijaju simbiozne bakterije vrste *Bradyrhizobium japonicum*. One biljci omogućuju bolje usvajanje dušika iz tla, a iz biljke koriste ugljikohidrate kao izvor energije. Listovi soje se razlikuju na četiri različita tipa. Troperasti listovi variraju u obliku od lancetastih do ovalnih (Lersten i Carlson, 2004. prema Dzikowski, 1936). Prosječno po biljci ima 15 – 20 listova, koji nakon zriobe poprime žutu boju i kod većine sorata otpadnu

(Vratarić i Sudarić, 2008). Svi nadzemni dijelovi biljke prekriveni su dlačicama koje mogu biti sivkasto-bijele, žute ili smeđe.

Cvjetovi su dvospolni, samooplodni, veličine 3 – 8 mm. Kod indeterminantnog tipa rasta, cvjetovi su skupljeni po 3 do 6 u grozdaste cvatove koji se formiraju u pazušcima listova. Kod determinantnog tipa rasta, cvatovi sadrže 3 do 15 cvjetova, a stabljika završava terminalnim cvatom na kojemu je približno 35 cvjetova. Prvi cvjetovi se pojavljuju na petom ili šestom nodiju (Carlson i Lersten, 2004). Period cvatnje ovisi o datumu sjetve i grupi dozrijevanja pojedine sorte, a može trajati i do 5 tjedana (Hardman, 1970). Soja stvara jako velik broj cvjetova, od kojih samo manji dio ostvari uspješnu oplodnju i razvije plodove. Istraživanja su pokazala da čak do 80% cvjetova bude odbačeno (Wiebold i sur., 1981). Sorte koje formiraju više cvjetova po cvatu imaju veću šansu odbacivanja cvjetova od onih koje formiraju manji broj.

Plodovi su mahune koje su dugačke 3 – 7 cm i široke oko 1 cm, a mogu biti ravne ili blago srpasto povijene (Carlson i Lersten, 2004). Mahune mogu sadržavati do 5 zrna, ali kod većine sorti uobičajeno sadrže dva ili tri zrna. Broj mahuna varira od dvije do preko 20 na pojedinom cvatu, a ukupno ih na biljci može biti i do 400, ovisno o sorti i agroekološkim uvjetima (Carlson i Lersten, 2004).

Soja je cijenjena zbog kvalitetnog sastava zrna u kojem sadrži proteine, ulja, ugljikohidrate, vitamine, minerale i nezasićene masne kiseline. Proteini i ulja zajedno u prosjeku zastupaju otprilike 60% ukupne mase suhog zrna (Liu, 1997). Najviše su zastupljeni proteini, čiji sadržaj u zrnu soje varira od 30% do 46% (u prosjeku 40%), dok sadržaj ulja iznosi između 12% i 24% ili prosječno 20% (Breene i sur., 1988). Ovo soju čini najbogatijim izvorom neophodnih aminokiselina u odnosu na druge mahunarke i žitarice, koje su često glavna sirovina za ishranu monogastričnih životinja (Nahashon i Kilonzo-Nthenge, 2011). Sorte koje se najčešće koriste u komercijalnoj proizvodnji prosječno u zrnu sadrže oko 40 % proteina, 20 – 22 % ulja, 34 % ugljikohidrata, 5 % minerala (kalij, fosfor, sumpor, kalcij, željezo, magnezij, natrij) te sadrže vitamine A, vitamine B skupine, vitamine D, E i K (Vratarić i Sudarić, 2008).

Zbog visoko nutritivnog sadržaja kemijskih spojeva u zrnu, soja je vrlo pogodna kao izvor hranjivih tvari. Utvrđeno je da su proteini soje dobar izvor svih aminokiselina osim metionina te da je njihova nutritivna vrijednost visoka skoro kao i kod proteina koji su prisutni u mlijeku i jajima (Zarkadas i sur., 1993). Istraživanja također pokazuju da konzumiranje soje pomaže u očuvanju zdravlja i prevenciji kroničnih bolesti (Zakir i Freitas, 2015). Kao primjer važnosti soje za proizvodnju krmiva može se navesti podatak da se u SAD-u 27% proizvedene sojine sačme koristi za hranidbu svinja jer sadrži jako puno lizina, a to je najviše limitirajuća aminokiselina za njihove hranidbene potrebe (Dozier i Hess, 2011).

Nedostatak proizvedenih krmiva bogatih biljnim proteinima u EU predstavlja problem u vidu sigurnosti hrane. Iz tog razloga, jedan od dugoročnih ciljeva Zajedničke poljoprivredne politike je poticanje proizvodnje proteina i uzgoj mahunarki (Andrijanić i sur., 2022). Međutim, proizvođačima je prinos još uvijek najvažnija stavka i cjelokupnu tehnologiju proizvodnje usmjeravaju u povećanje prinosa, a ne vode računa o kvaliteti zrna soje. Razina kvalitete uroda je pitanje vremena i vrlo vjerojatno će postati važan čimbenik u proizvodnji soje, pogotovo za krmiva. Na kvalitetu uroda se može utjecati na razne načine, uključujući i odabirom najpogodnije sorte.

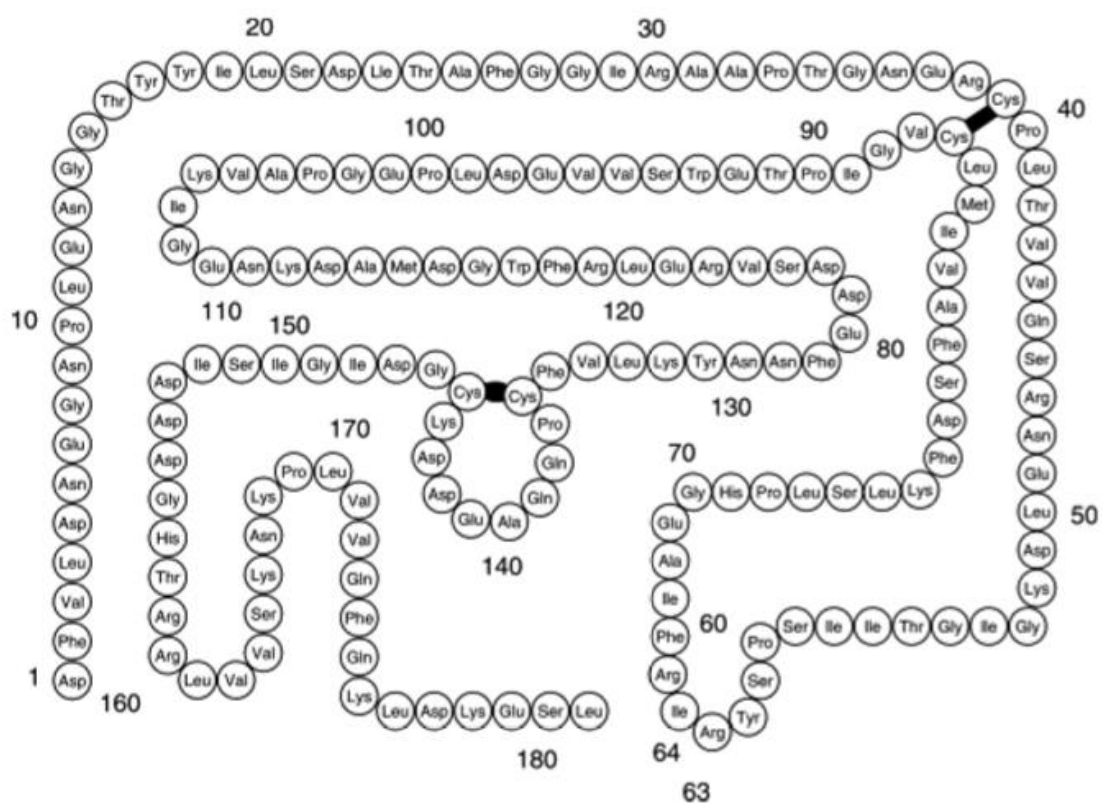
1.2.1. Tripsin inhibitori

Unatoč kvalitetnom sastavu i visokom sadržaju nutritivno vrijednih spojeva u sojinom zrnu, ono također sadrži i neke antinutritivne spojeve koji imaju nepovoljno djelovanje na zdravlje životinja i ljudi. Među tim spojevima najviše su zastupljeni inhibitori proteinaze poznati kao tripsin inhibitori (TI), koji svojim djelovanjem onemogućavaju normalnu aktivnost probavnih enzima tripsina i kimotripsina (Vagadia i sur., 2017). Dva glavna oblika tripsin inhibitora u sjemenu soje su Kunitz tripsin inhibitor (KTI) i Bowman-Birk tripsin inhibitor (BBTI) (Tan-Wilson i sur., 1987).

KTI (slika 1.1.) je u sjemenu soje znatno više zastupljen od BBTI i može činiti do 80% ukupnih inhibitora tripsina (Kumar i sur., 2013). Ovaj spoj je okarakteriziran kao alergen (Bursens i sur., 2011. prema Quirce i sur., 2002), pa zbog toga proizvodi koji sadrže soju moraju biti posebno označeni i deklarirani jer podliježu regulaciji Europske Komisije (European Commission, 2011). Istraživanjima je utvrđeno da kod životinja

koje su hranjene ekstraktima soje bogatim KTI dolazi do hipertrofije gušterače i hiperplazije. Tim životinjama je kao posljedica bio inhibiran rast, što je zabilježeno kod miševa, štakora i pilića (Liener i Kakade, 1980). Pilići koji su hranjeni sirovim ekstraktom soje dobivenim iz sorte sa niskom razinom KTI nisu imali inhibiran rast u odnosu na piliće hranjene termički obrađenim zrnom soje koja je imala standardnu razinu KTI (Han i sur., 1991).

S obzirom na negativne učinke KTI i velike troškove njegove inaktivacije u procesu toplinske obrade, postoji veliki interes za oplemenjivačke programe kojima bi se mogle stvoriti sorte sa niskom razinom ovog spoja (Clarke i Wiseman, 2000). Ovi autori ipak navode da je inaktivacija inhibitornog učinka poželjnija od potpunog uklanjanja ovog proteina, s obzirom da je on vrijedan izvor amino kiselina bogatih sumporom.



Slika 1.1. Struktura Kunitz tripsin inhibitora
(preuzeto iz: Koide i Ikenaka, 1973).

U dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno 10 gena koji kodiraju KTI u soji, ali samo četiri njih se transkribiraju u mRNA (*Ti1*, *Ti2*, *Ti3* i *Ti4*). Također je ustanovljeno i da samo gen *Ti3* (GenBank ID: S45092.1) predstavlja glavni KTI, jer je njegova razina ekspresije u zrnu soje znatno veća u usporedbi s ostalim genima (Jofuku i Goldberg, 1989). Druga dva gena (*Ti1* i *Ti2*) se uglavnom transkribiraju tijekom različitih faza razvoja lišća, stabljike i korijena, te njihov udio u sjemenu nije značajan. Analizom genoma soje otkriveno je da recesivni null-alel (*ti*) rezultira odsutnošću KTI. Uzrok ove pojave su tri nukleotida razlike unutar *Ti3* kodirajućeg područja (Jofuku i sur., 1989). Introgresijom null-alela moguće je smanjiti sadržaj KTI u zrnu soje za 69 – 84 % (Kumar i sur., 2015).

Postoje rezultati istraživanja u kojima je zabilježena visoka povezanost između razine KTI i BBTI (Pesic i sur., 2007). Međutim, u drugim istraživanjima je utvrđeno da promjena u razini jednog spoja nije utjecala na razinu drugog spoja (Mittal i sur., 2021). Iz ovoga proizlazi da je povratnim križanjima moguće dobiti sortu koja bi imala nizak sadržaj oba spoja.

1.2.2. Utvrđivanje razine TI u zrnu pomoću HPLC

Postoji više metoda za detekciju TI u zrnu soje. U praksi se najviše koristi standardna kolorimetrijska enzimatska metoda koja ne zahtijeva skupu i specijaliziranu opremu. Pomoću ove metode se mjeri aktivnost TI na temelju razlike između ukupne količine tripsina i rezidualne aktivnosti tripsina u zrnu (Rosso, 2018). Međutim, nedostaci ove metode su visoka cijena korištenih kemikalija, slaba ponovljivost i nemogućnost iskazivanja rezultata po jedinici mase (Stauffer, 1990., Rosso, 2018). U novije vrijeme razina TI u zrnu mjeri se i metodom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC, *high performance liquid chromatography*). Ovu metodu odlikuje niska granica razine detekcije, mala količina uzorka, visoka točnost dobivenih rezultata te mogućnost istovremenog i odvojenog prikazivanja vrijednosti za KTI i BBTI (Rosso, 2018). HPLC je ujedno i brža metoda, jednostavnija je i jeftinija u odnosu na klasične metode (enzimatske i metode mokre kemije), što ju čini prihvatljivom za korištenje u analizi većeg broja uzoraka (Rosso, 2018).

1.3. Selekcija potpomognuta markerima (MAS)

U poljoprivredi se oduvijek nastojalo poboljšati usjeve odabirom sjemena najboljih biljaka, odnosno selekcijom i križanjem biljaka sa poželjnim svojstvima. Prije se taj postupak provodio na temelju vizualnog odabira, ali danas je zbog razvoja tehnologije postalo moguće koristiti preciznije metode. Selekcija potpomognuta markerima (eng: *Marker Assisted Selection*, skraćeno MAS) je metoda koja se u oplemenjivanju bilja koristi kako bi se ubrzao postupak selekcije i povećala točnost selekcije. Ovakav način selekcije svoje korijene vuče iz doba kada su u tradicionalnom oplemenjivanju korišteni morfološki markeri odnosno biljezi (npr. boja cvijeta ili boja zrna) kako bi se odabrale poželjne biljke.

Napretkom tehnologije i novim otkrićima iz polja kemije, genetike i drugih znanosti, postalo je moguće koristiti nove metode u postupku oplemenjivanja i odabiru biljaka. Metoda selekcije potpomognute markerima se počela koristiti sredinom 20. stoljeća (Grover i Sharma, 2014). Nakon otkrića tehnike PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sredinom 1980-ih godina (Mullis i sur., 1986.) uporaba te metode je postala učinkovitija i počela se široko primjenjivati (Tiwari i sur., 2014). Od tada se MAS sve više razvijala i s vremenom su otkriveni različiti tipovi molekularnih markera, a napretci u tehnologiji sekvenciranja su omogućili široku primjenu ove metode u oplemenjivanju bilja (Nadeem i sur., 2018).

Da bi se moglo razumjeti kako selekcija pomoću molekularnih markera funkcionira, najprije je potrebno objasniti što su molekularni markeri i kako su oni povezani sa svojstvima za koja se biljke odabiru. Molekularni markeri po svojoj strukturi mogu biti molekule raznih spojeva, a najčešće su proteini, sekundarni metaboliti, enzimi i nukleinske kiseline (DNA i RNA). Danas su najviše u upotrebi DNA markeri. To su kratki odsječci unutar DNA molekule koji se nalaze blizu određenog gena na kromosomu. Što se marker nalazi bliže genu, to je njegova pouzdanost veća jer je time i veća šansa da se marker ne odvoji od gena tijekom rekombinacije i *crossing-overa* (Collard i sur., 2005).

U selekciji pomoću molekularnih markera se biljke koje posjeduju svojstvo od interesa odabiru na temelju markera koji je povezan sa tim svojstvom. Kod MAS pomoću DNA markera, selekcija se provodi na temelju markera vezanog za gen koji kontrolira svojstvo. Kada je moguće, poželjno je koristiti dva markera koji su usko vezani za gen jer se na taj način osigurava visoka točnost selekcije, pogotovo ako su markeri unutar DNA molekule smješteni tako da je svaki na različitom kraju gena.

Potencijalni način za dobivanje linija soje sa smanjenim udjelom TI je selekcija pomoću DNA markera. Prednost ovakve selekcije je što traje znatno kraće u odnosu na klasičnu selekciju jer je analiza DNA markera moguća već na prvim pravim listovima, što znači da nije potrebno čekati da biljka formira sjemenke na kojima bi se onda provodila kemijska analiza. Također, selekciju na poželjni genotip (homozigot za niski sadržaj TI) moguće je provesti već u F₂ generaciji. Još jedna prednost je da se ovakvim načinom selekcije eliminira utjecaj okolinskih čimbenika koji bi ponekad mogli rezultirati smanjenim udjelom TI u sjemenu usljed negenetskih čimbenika (Vollman i sur., 2003). Izborom biljaka koje su homozigotne za niski sadržaj KTI u nastavku selekcije uvijek zadržavaju niski sadržaj KTI. Korištenjem ovakvog načina selekcije su već dobivene linije soje sa smanjenim udjelom KTI (Kumar i sur., 2015).

1.3.1. Razvijeni markeri na KTI

Kim i sur. (2006.) razvili su dvije bi-parentalne populacije za mapiranje s ciljem identifikacije DNA markera koji je povezan s *Ti* lokusom. Za mapiranje je u obje populacije korišteno 1000 RAPD početnica, 342 AFLP početnice i 35 SSR početnica. Prisustvo proteina KTI je bilo dominantni oblik nad nedostatkom KTI. Utvrđeno je da je 11 od svih korištenih DNA markera u ovom istraživanju (4 RAPD, 4 AFLP i 3 SSR) povezano s *Ti* lokusom, a tri SSR markera (Satt409, Satt228 i Satt429) su povezana s lokusom unutar 10 centimorgana (cM) udaljenosti. Od njih je SSR marker Satt228 bio čvrsto povezan unutar 0 – 3,7 cM udaljenosti od *Ti* lokusa i predložen je za korištenje u selekciji. Ova pretpostavka je potvrđena i u naknadnim istraživanjima (Bulatova i sur., 2019).

Sekvence mutiranog alela za nisku razinu KTI su originalno identificirane u genotipu soje PI157740 (Jofuku i sur., 1989). Prema njima je razvijen alelno specifičan marker vezan na mutiranu sekvencu gena (Moraes i sur., 2006). Početnice su dizajnirane na temelju sekvenci koje obuhvaćaju mutacije u recesivnom alelu za KTI. Ovaj alel-specifični marker je u naknadnim istraživanjima uspješno korišten za identifikaciju biljaka koje posjeduju recesivni alel za sadržaj KTI (Kumar i sur., 2013). Prednost specifičnog markera *Titi* je da izravno obilježava željeni gen, pa zbog toga nije potrebna validacija prije korištenja (Kumar i sur., 2013). Međutim, nedostatak je što je ovo dominantni tip markera i ne omogućuje razlikovanje dominantnog homozigota od heterozigota, što otežava primjenu u segregirajućim populacijama (Bulatova i sur., 2019).

2. HIPOTEZE I CILJEVI RADA

Hipoteze:

1. U kolekciji sorata soje Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (CroP-BioDiv) i Zavoda za oplemenjivanje bilja postoji više genotipova koji nose alelne gene odgovorne za sniženi sadržaj TI.
2. Selekcija pomoću molekularnih markera na niski sadržaj KTI u zrnu soje dovoljno je pouzdana, a u procesu selekcije učinkovitija u odnosu na selekciju pomoću metode HPLC.

Da bi se ovo provjerilo, postavljeni su sljedeći ciljevi istraživanja:

1. Analizirati 272 genotipova soje iz kolekcije sorata na sadržaj KTI pomoću dva markera (mikrosatelitni marker Satt228 i KTI alelni specifičan marker) te utvrditi frekvenciju i porijeklo genotipova sa niskim sadržajem KTI.
2. Provesti analizu genotipa pomoću navedenih markera unutar skupine segregirajućih oplemenjivačkih linija soje kod kojih se očekuje razdvajanje niskog i visokog sadržaja KTI te utvrđene genotipove usporediti sa vrijednostima izmjerenim HPLC metodom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Za potrebe ovog istraživanja korišteno je više različitih sorti soje prikupljenih iz gen-kolekcije Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (Crop-BioDiv) te linija razvijenih u sklopu oplemenjivačkog programa Zavoda za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za analizu genotipa marker lokusa Satt228 unutar gen-kolekcije uzeti su uzorci tkiva za ekstrakciju DNA od 272 različite sorte soje, a čiji popis je naveden u Prilogu 1 ovog rada. Za potrebe analize genotipa oplemenjivačkih linija korištene su oplemenjivačke linije različitih generacija (vidi tablicu 3.1.). Uzorci tkiva za molekularnu analizu dobiveni su ili uzimanjem tkiva lista s pojedinačnih biljaka (u poljskim uvjetima) u slučaju F₂ populacija, ili naklijavanjem sjemena u slučaju primki iz Crop-BioDiv kolekcije i oplemenjivačkih linija viših generacija koje su približno homozigotne.

Linije iz segregirajućih populacija razvijene su križanjem roditelja donora gena za niski sadržaj (talijanske sorte Aires, Ascasubi i Bahia) i drugih sorata koje imaju normalni sadržaj tripsin inhibitora. Oznake linija (kratice u nazivu) proizlaze iz početnih slova roditelja, konkretno ZA (Zlata x Aires), RB (Ružica x Bahia), MB (Medina x Bahia), ASD (Ascasubi x DH5170), BM (Buga x ES Mentor). U tablici 3.1. su navedene skupine analiziranog materijala i lokusi na kojima su one analizirane.

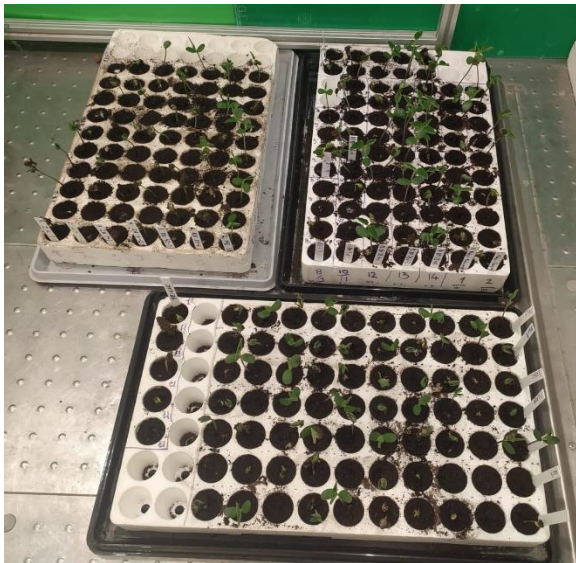
Tablica 3.1. Korišteni materijal i analizirani marker lokusi povezani sa sadržajem KTI u zrnju soje

Skupine analiziranog materijala (sorte i linije)	n	Marker
Gen-kolekcija Crop-BioDiv – sadrži aktualne i povijesne sorte soje iz raznih dijelova svijeta*	272	Satt228
ASD linije F ₂ generacije razvijene iz križanja Ascasubi x DH5170	62	Satt228, KTI
BM linije F ₂ generacije razvijene iz križanja Bahia x Mentor	54	Satt228, KTI
Oplemenjivačke linije F ₅ generacije	10	Satt228, KTI
Oplemenjivačke linije F ₈ generacije	7	Satt228, KTI

* Popis svih analiziranih genotipova naveden je u Prilogu 1.

3.2. Ekstrakcija DNA

Sjeme prethodno navedenih uzoraka je posijano u nesterilni univerzalni supstrat u stiropornim kontejnerima i dobro natopljeno vodom (slika 3.1.). Kontejneri su stavljeni u komoru rasta na temperaturu od 23°C, a tijekom rasta su klijanci redovito zalijevani vodom. Nakon što su se klijanci dovoljno razvili, sa njih su uzeti listovi i spremljeni su u zasebne i obilježene papirnate vrećice (slika 3.2.).



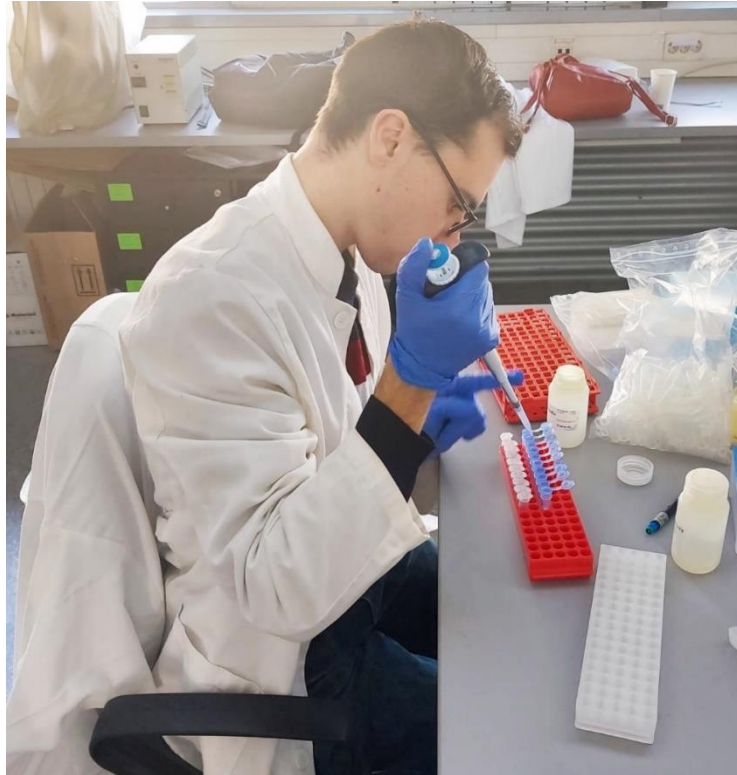
Slika 3.1. Naklijani uzorci u komori rasta



Slika 3.2. Uzimanje listova za analizu

Tijekom uzimanja uzoraka pojedinačni uzorci su čuvani na -20 °C, a ubrzo nakon toga su podvrgnuti liofilizaciji na temperaturi od od -60 °C i 2 bara podtlaka u trajanju od 48 sati. Nakon što je liofilizacija dovršena, 25 mg osušenog lista svakog uzorka premješteno je u eppendorf tubice u koje su zatim stavljene četiri čelične kuglice i uzorci su pomoću oscilatornog mlina Mixer mill MM400 (Verder scientific, Golling, Austria GmbH) usitnjeni u prah.

Izolacija DNA iz uzoraka (Slika 3.3) napravljena je pomoću peqGold DNA Plant Mini Kit-a prema protokolu PeqLab za izolaciju biljne DNA (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Germany). Kvaliteta i kvantiteta dobivene DNA zatim su provjerene spektrofotometrijski te je razrijeđena na radnu koncentraciju od 10 ng/μL.



Slika 3.3. Prikaz postupka izolacije DNA iz biljnog tkiva pomoću kit-a
(foto: Zoe Andrijanić)

3.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

DNA uzoraka se amplificirala (umnažala) na dva marker lokusa korištena u ovom radu (a) mikrosatelitski marker Satt228 i (b) alel-specifični KTI marker, a prema dolje navedenom protokolu. Reakcija je provedena u uređaju Veriti thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) u ukupnom volumenu od 10 μ L. U reakcijsku smjesu dodane su sljedeće komponente: 10 ng predložka DNA svakog uzorka, po 0,3 μ M *forward* i *reverse* početnica, 200 μ M svakog dNTP-a, 2 mM MgCl₂, 0,75 U Taq polimeraze (Sigma-Aldrich, Germany), 0,5X CES PCR pojačivača i 1X PCR pufera. U amplifikaciji dva korištena markera korištene su specifične početnice, kao i različite temperature nalijeganja istih te trajanja elongacije novostvorenih fragmenata (vidi tablicu 3.2.).

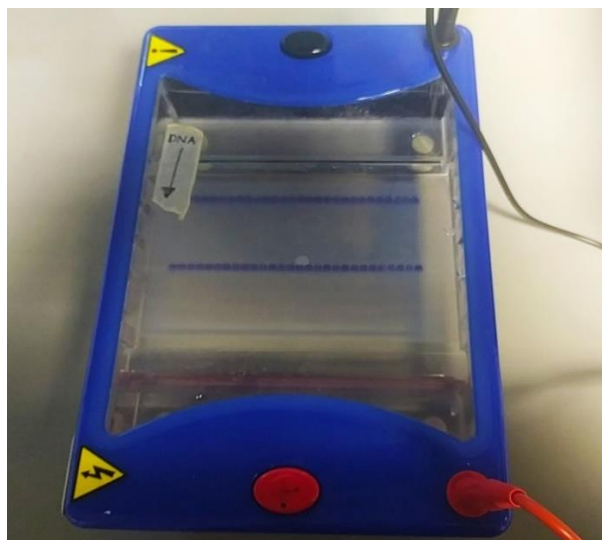
Tablica 3.2. Sekvence početnica i uvjeti lančane reakcije polimerazom (PCR) za dva korištena markera (Satt228 i alel-specifični KTI marker)

	Satt228 (Izvor: Kumar i sur., 2015)	Alel-specifični KTI marker (Izvor: Moraes i sur., 2006)
Sekvence početnica (smjer 5' -> 3')	F VIC-TCATAACGTAAGAGATGGTAAACT	F 6-FAM-CTTTTGTGCCTTCACCACCT
	R CATTATAAGAAAACGTGCTAAAGAG	R GAATTCATCATCAGAAACTCTA
Predciklus	2 minute na 94°C	2 minute na 94°C
30 ponavljajućih ciklusa	Denaturacija 1 min na 94°C	Denaturacija 1 min na 94°C
	Nalijeganje primera, 45 s na 49°C	Nalijeganje primera, 45 s na 54°C
	Elongacija, 45 s na 72°C	Elongacija, 1 min 30 s na 72°C
Post-ciklus	10 minuta na 72°C	10 minuta na 72°C
Terminacija	4°C	4°C

Uspješnost PCR reakcije za Satt228 je najprije provjerena na agaroznom gelu u horizontalnoj elektroforezi, a zatim je razdvajanje i procjena duljine fragmenata provedeno u kapilarnoj elektroforezi. PCR produkti za dominantni alel-specifični marker (nul-alel *ti3*) razdvajani su i očitavani isključivo elektroforezom na agaroznom gelu.

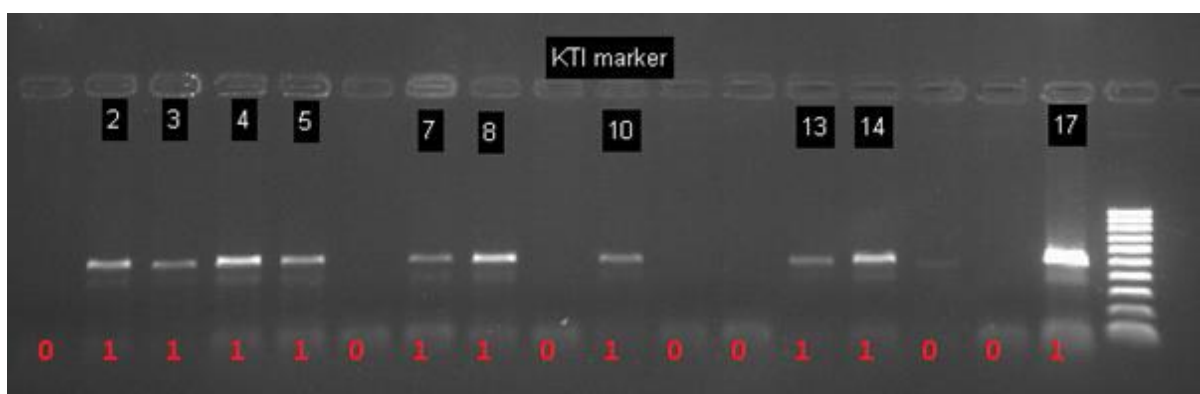
3.4. Elektroforeza na gelu

Za pripremu gela je korištena agarozna tvrtke *Sigma* u količini 1,5 grama i 100ml pufera 0,5 x TBE. Otopina je zagrijana u mikrovalnoj pećnici sve dok se agarozna nije potpuno otopila. Kada se otopina pripremila, ulivena je u kalup na kojeg su stavljene češljevi za formiranje jažica te je zatim ostavljena da se ohladi i stvrdne u gel. Nakon što je gel postao dovoljno čvrst, kalup je ubačen u kadicu za elektroforezu, iz njega su izvađeni češljevi i u kadicu je doliven pufer 0,5 x TBE tako da prekrije gel. Proizvodi PCR reakcije su zatim pomiješani sa bojom za elektroforezu (*loading dye*) i pipetirani u jažice. Osim uzoraka, u posljednju jažicu je dodana i ljestvica s fragmentima poznate veličine kao pomoć u verifikaciji i očitavanju dobivenih fragmenata (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen 100 bp DNA Ladder).



Slika 3.4. Prikaz pipetiranih uzoraka u jažicama

Kadica s uzorcima je spojena na uređaj za horizontalnu elektroforezu multiSUB Choice, Wide Midi Horizontal Electrophoresis System (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, UK) koji je priključen na električni napon od 90 V. Elektroforeza je trajala 30 minuta. Po završetku elektroforeze, gel je očitavan pod UV svjetlom pomoću uređaja Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Očitavanja su snimljena u softveru Image Lab (Slika 3.5.).

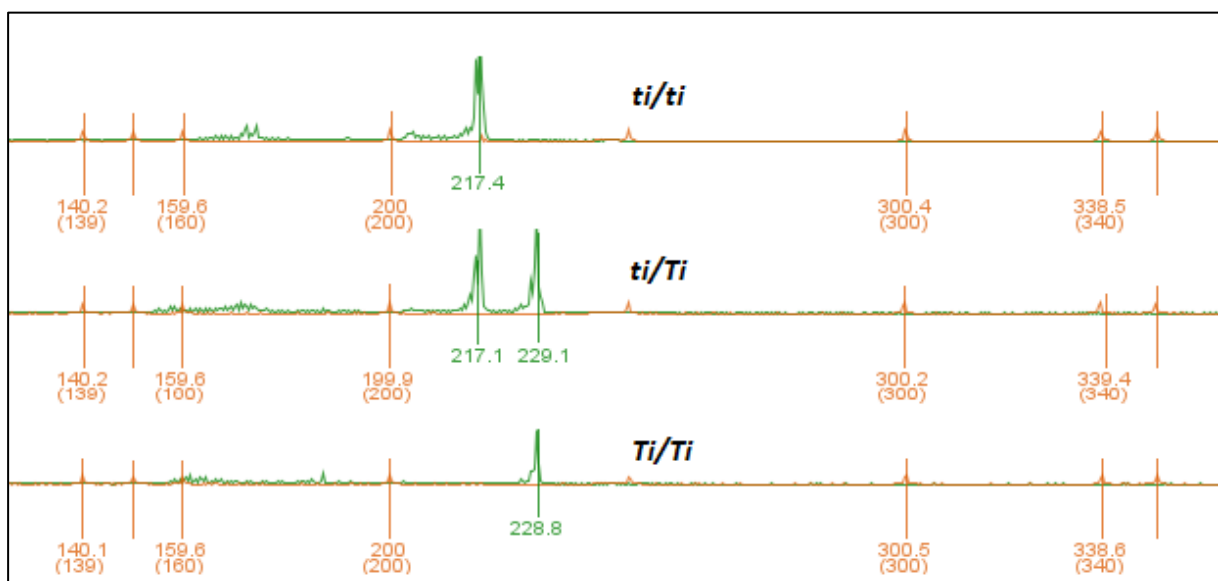


Slika 3.5. Alel-specifični marker KTI pripada skupini dominantnih markera i očitava se po principu: fragment pisutan (očitanje 1) ili fragment odsutan (očitanje 0)
(foto: Zoe Andrijanić)

Prisustvo banda/crtice (fragmenta) označava prisustvo *ti* recesivnog alela na lokusu *KTI₃* bilo u homozigotnom (*ti/ti*) ili heterozigotnom (*Ti/ti*) stanju, a odsustvo crtice pretpostavlja dominantnog homozigota (*Ti/Ti*). Niski sadržaj KTI povezan je isključivo sa recesivnim homozigotom (*ti/ti*), međutim zbog dominantne prirode ovog markera nije moguće razlikovati recesivnog homozigota od heterozigota na lokusu *KTI₃*, a koji je povezan sa razinom sadržaja tripsin inhibitora.

3.5. Kapilarna elektroforeza

Analiza duljine amplificiranih fragmenata sa lokusa Satt228 napravljena je metodom kapilarne elektroforeze pomoću ABI 3130 genetičkog analizatora (Applied Biosystems) i standarda veličine GeneScan-500 LIZ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Za analizu su korišteni PCR produkti razrijeđeni u 10 µL sterilne vode te pomješani sa 8 µL Hi-Di Formamie-a (Applied Biosystems) i 0,25 µL internih standarda. Duljine analiziranih fragmenata određene su pomoću računalnog programa Geneious (Geneious Prime, Auckland, Novi Zeland) i isporučene u obliku Excel tablice.



Slika 3.5. Prikaz mogućih alelnih kombinacija na mikrosatelitskom lokusu Satt228 detektiran pomoću kapilarne elektroforeze. Ovaj tip markera je kodominantan i omogućuje detekciju homozigotnih biljaka za željeni alel „217“.

3.6. HPLC analiza

Analiza sadržaja KTI u uzorcima sjemena analiziranog materijala provedena je uslužno od strane stručnog osoblja u laboratoriju Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta prema optimiziranom protokolu (Rosso, 2018.) na HPLC uređaju (Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™).

3.7. Analiza podataka

Za svaku jedinku pojedine F₂ segregirajuće populacije ustanovljen je genotip na dva analizirana marker lokusa, te je potom za svaki lokus provedena provjera očekivanog omjera razdvajanja pomoću hi-kvadrat (χ^2) testa. Očekivani omjer razdvajanja za dominantni specifični marker KTI je 3:1, dok je za kodominantni Satt228 marker očekivani omjer 1:2:1.

Jednostruka ANOVA za provjeru povezanosti genotipskih klasa i količine KTI (mg/g) provedena je primjenom GLM procedure u software-u SAS (SAS Institute, Cary, NC), a na način kako je detaljnije objašnjeno u Kozumplik i sur. (1996). Za provjeru značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrijednosti genotipskih klasa korišten je Tukey test (Tukey, 1977).

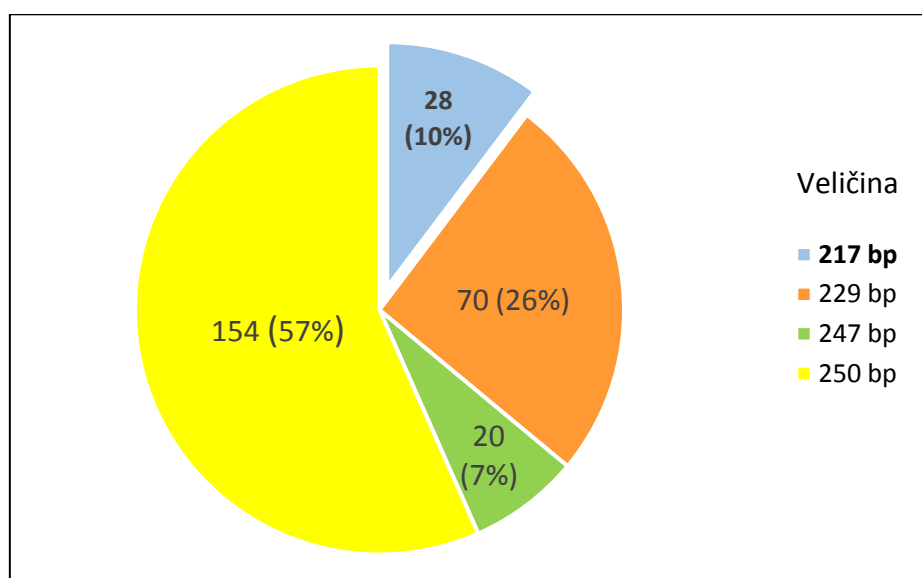
4. REZULTATI

Nakon provedene izolacije DNA naprijed navedenih uzoraka i provedene genotipizacije na dva marker lokusa, prikupljeni su molekularni podaci potrebni za dobivanje odgovora na postavljene ciljeve istraživanja.

4.1. Broj i učestalost alela na mikrosatelitskom lokusu Satt228

Kako je naprijed navedeno, jedan od ciljeva ovog rada bio je utvrditi, unutar Crop-BioDiv kolekcije sa 272 genotipa soje, postojanje i broj različitih alela na mikrosatelitskom lokusu Satt228. Posebno je važno bilo ustanoviti koliko kultivara nosi poželjni recesivni alel *ti* temeljem očekivane visoke vezanosti sa alelom 217 navedenog mikrosatelitskog lokusa.

Kao što je ranije opisano, mikrosatelitski lokus Satt228 tijesno je povezan sa lokusom *KTI₃*, koji značajno kontrolira sadržaj KTI u zrnu soje. Genotipizacijom 272 primke iz kolekcije ustanovljena su 4 različita alela na ovom lokusu čija učestalost je prikazana u grafu 4.1. Najčešći alel u ispitivanoj kolekciji (57 %) bio je fragment duljine 250 bp. Značajan udio imao je i alel 229 bp (26 %). Poželjni alel, 217 bp, koji je tijesno povezan sa alelom *ti* na lokusu *KTI₃* u kolekciji je prisutan kod 28 genotipova (oko 10 % kolekcije).



Graf 4.1. Broj i distribucija primki iz Crop-BioDiv kolekcije soje prema veličini fragmenta (marker alela) lokusa Satt228. Alel duljine 217 bp kada je u homozigotnom stanju odgovoran je za niski sadržaj KTI.

Ovi genotipovi mogu poslužiti kao poželjni donori u razvoju oplemenjivačkih populacija i selekciji za nizak sadržaj KTI, a podaci o njihovom porijeklu prikazani su u tablici 4.1. Većina navedenih genotipova predstavljaju moderne sorte izvrsnih agronomskih svojstava, a samo manji dio su povijesne sorte. Najveći broj sorata (16) sa poželjnim *ti* alelom pripadaju grupama zriobe MG0, MG0+ i MGI, a koje su ujedno i najzastupljenije u proizvodnji u Hrvatskoj. Rane sorte iz grupa zriobe MG000 i MG00 su zastupljene sa 5 sorti, a kasne sorte iz grupa zriobe MGI+ i MG2 sa 4 sorte, dok je za 3 sorte grupa zriobe nepoznata.

Tablica 4.1. Sorte soje iz Crop-BioDiv kolekcije sa alelom 217 bp na lokusu Satt228.

Naziv sorte	Porijeklo	Grupa zriobe	Izvor/oplemenjivačka kuća
Aires	Italija	MG0+	ERSA Friuli Venezia Giulia
Almas	Italija	MGI	ERSA Friuli Venezia Giulia
Amma	Italija	MGI	ERSA Friuli Venezia Giulia
Ananda	Italija	MGI	ERSA Friuli Venezia Giulia
Ascasubi	Italija	MGI	ERSA Friuli Venezia Giulia
Avatar	Italija	MGI	ERSA Friuli Venezia Giulia
Avril	Argentina	MGI+	Asociados Don Mario S.A.
Bahia	Italija	MG0	ERSA Friuli Venezia Giulia
Buenos	Italija	MGI	ERSA Friuli Venezia Giulia
Chmelarovska brensk	Azija	NA	BOKU Noah Arche
Es Tribori	Francuska	MG0	Euralis Semences S.A.S.
Gatersleben 57	Njemačka	NA	BOKU Noah Arche
Guru	Italija	MGI+	ERSA Friuli Venezia Giulia
Herb 620	Njemačka	MG000	BOKU Noah Arche
Hilario	Italija	MG0	ERSA Friuli Venezia Giulia
Jozefina	Austrija	MG00	Saatzucht Donau Ges.m.b.H. & CoKG
Kruna	Hrvatska	MG0	Poljoprivredni institut Osijek (HR)
Laura	Srbija	MGI	Maize Research Institute "Zemun Polje"
Mandala	Italija	MG00	ERSA Friuli Venezia Giulia
Mantra	Italija	MG0+	ERSA Friuli Venezia Giulia
Milana	Srbija	MG0+	Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad
Namaste	Italija	MGI	ERSA Friuli Venezia Giulia
Pedro	Italija	MG0	ERSA Friuli Venezia Giulia
Pepita	Italija	MG0+	ERSA Friuli Venezia Giulia
Saljut 216	Rusija	MG000	BOKU Noah Arche
SCF 5110	Azija	NA	NA
Suzumaru	Japan	MGI	BOKU Noah Arche
Xonia	Italija	MG00	ERSA Friuli Venezia Giulia

4.2. Povezanost marker lokusa za pretpostavljeno niski sadržaj KTI i vrijednosti utvrđenih pomoću HPLC

Temeljem više literaturnih izvora potvrđeno je da su marker lokusi Satt228 i alel-specifični KTI marker tijesno povezani sa niskim sadržajem Kunitz tripsin inhibitora u zrnu soje. Jedan od ciljeva oplemenjivanja programa Zavoda za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku Agronomskog fakulteta je niski sadržaj KTI. Prethodno su provedena križanja pretpostavljenih donora alela *ti* i genotipova primatelja te su razvijene populacije različitih generacija razdvajanja.

Obzirom na očekivano monogeno nasljeđivanje sadržaja tripsin inhibitora u zrnu soje (Orf i Hymowitz, 1979.), omjer razdvajanja genotipova s pouzdanim markerima za ovo svojstvo trebao bi unutar F₂ populacija biti vrlo blizak teoretskim omjerima. Kod kodominantnog mikrosatelitskog markera Satt228 očekivani omjer razdvajanja genotipova je 1:2:1, dok je za alel-specifični KTI marker koji predstavlja dominantni tip markera očekivani omjer 3:1. Iz tablice 4.2. vidljivo je da su očekivani i stvarni omjeri razdvajanja vrlo slični, odnosno statistički beznačajno različiti. Ovo potvrđuje polimorfnost i mendelovski način nasljeđivanja navedenih markera, a što je preduvjet za primjenu u selekciji pomoću molekularnih markera (MAS).

Tablica 4.2. Očekivani i opaženi omjeri razdvajanja genotipskih klasa i vrijednosti hi-kvadrat testa u dvjema F₂ populacijama za oba korištena markera

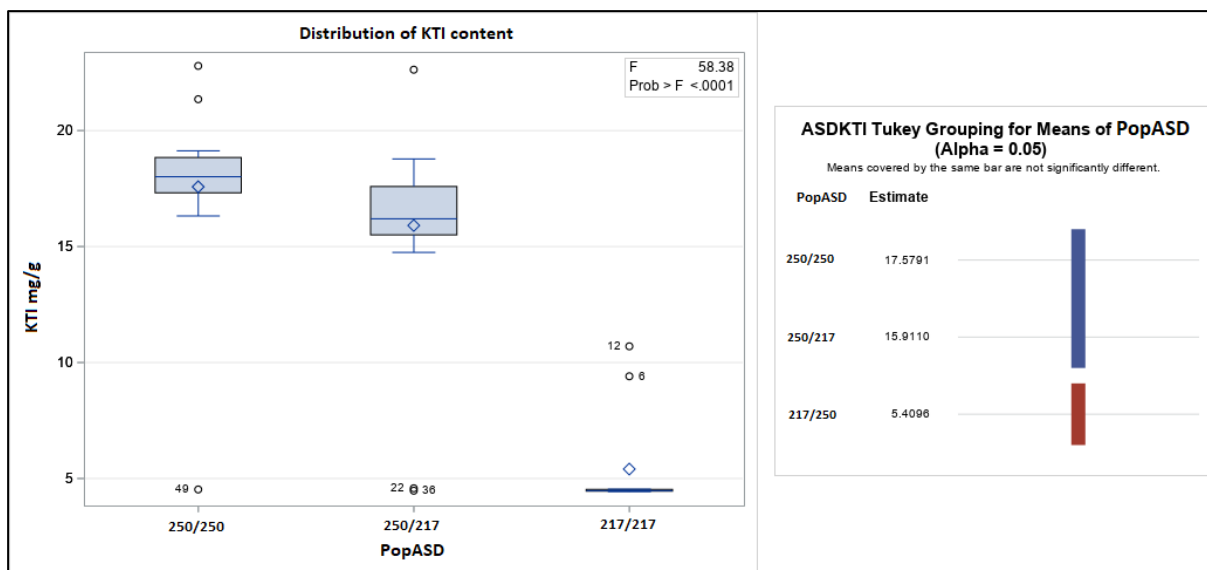
		ASD		BM	
		Očekivani omjer	Opaženi omjer	Očekivani omjer	Opaženi omjer
Satt228	(1)	15,5	12	13,5	14
	(2)	31	31	27	28
	(1)	15,5	19	13,5	12
Vjerojatnost odstupanja		= 0,4537		= 0,8948	
Alel-specifični KTI marker	(3)	46,5	40	40,5	42
	(1)	15,5	22	13,5	12
Vjerojatnost odstupanja		= 0,0566		= 0,6374	

Količina KTI izmjerena u roditeljskim sortama F₂ populacije ASD iznosila je 4,52 mg/g za Ascasubi koji je donor nul-alela, te 15,84 mg/g za sortu DH5170. Količina KTI u roditeljima F₂ populacije BM iznosila je 4,50 mg/g za Bahiu (donor nul-alela) te 17,36 mg/g za sortu ES Mentor. Podaci u tablici 4.3. prikazuju ekstremne i prosječne količine KTI u zrnu F₂ populacija, izmjereno HPLC metodom. Iz podataka se može vidjeti da je kod biljaka sa genetskim profilom 217/217 zabilježen oko tri puta niža prosječna količina KTI u odnosu na biljke s drugim genotipom na ovom marker lokusu. Prosječna razina KTI prema genotipskim grupama s obzirom na lokus Satt228 kretala se od 5,41 mg/g za homozigote alela 217 do 17,58 mg/g za homozigote alela 250 u populaciji ASD.

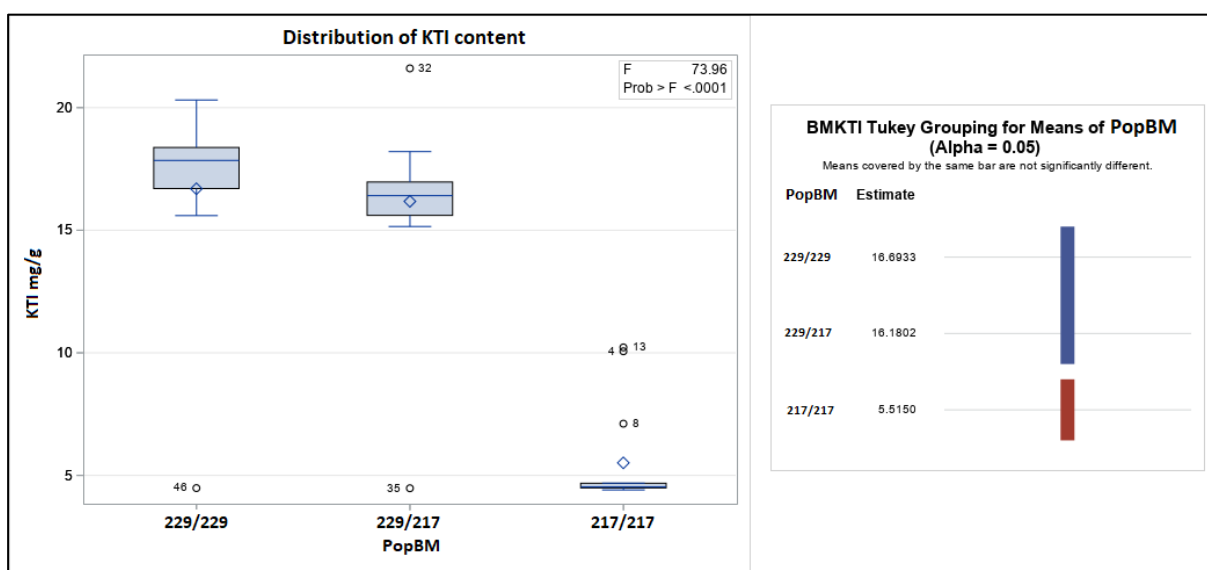
Tablica 4.3. Prosječne količine Kunitz tripsin inhibitora u zrnu soje pojedinih genotipskih klasa marker lokusa Satt228 utvrđene u dvjema F₂ populacijama (ASD i BM)

KTI mg/g	F ₂ _ASD (n=62)			F ₂ _BM (n=54)		
	250/250 (n=19)	250/217 (n=31)	217/217 (n=12)	229/229 (n=12)	229/217 (n=28)	217/217 (n=14)
min.	4,53	4,48	4,44	4,49	4,48	4,41
max.	22,79	22,63	10,7	20,31	21,6	10,22
avg	17,58	15,91	5,41	16,69	16,18	5,52

Iz grafova 4.2. i 4.3. također se vide prosječne vrijednosti genotipskih klasa, ali i varijaciona širina. Kod obje populacije analiza varijance rezultirala je sa visokosignifikantnim F testom ($P < 0.0001$) i isto tako visoko značajnom razlikom između jedinki sa homozigotnim genotipom za alel 217 i onih koje imaju heterozigotnu konstituciju ili su homozigoti za drugi alel. Tukey test pokazao je da zbog dominantno-recesivnog modela nasljeđivanja za ovo svojstvo, jedinke koje su heterozigoti i homozigoti za alel roditelja primatelja međusobno imaju slične vrijednosti količine tripsin inhibitora i stoga su statistički gledano istovjetnog sadržaja. Bez obzira na različit genotip dva roditelja donora i dva roditelja primatelja, detektirani alel 217 u homozigotnom stanju doveo je do vrlo sličnih niskih vrijednosti KTI u obje populacije. Rezultati genotipizacije i fenotipizacije svakog pojedinačnog uzorka iz obje populacije prikazani su u Prilogu 2. i Prilogu 3.



Graf 4.2. Prikaz distribucije sadržaja KTI u zrnu soje s obzirom na genetski profil na lokusu Satt228, te rezultati F i Tukey testa F₂ populacije ASD



Graf 4.3. Prikaz distribucije sadržaja KTI u zrnu soje s obzirom na genetski profil na lokusu Satt228, te rezultati ANOVA i Tukey testa F₂ populacije BM

Unatoč visokosignifikantnoj vrijednosti F i Tukey testa koje ukazuju na tijesnu povezanost markera i lokusa *KTI*₃, u nekoliko slučajeva u obje populacije došlo je do značajnog odstupanja fenotipa (količina KTI) od prosjeka genotipske klase, a što je vidljivo u grafovima 4.2. i 4.3. te tablicama Priloga 2 i 3.

4.3. Analiza linija F₅ i F₈ generacije na sadržaj KTI u zrnu

U dosadašnjem zavodskom programu oplemenjivanja soje provođena su križanja i razvijane oplemenjivačke linije bez uvida u sadržaj KTI. Temeljem spoznaja opisanih u prethodnim poglavljima ovog rada, i pretpostavljajući tijesnu povezanost sadržaja KTI i poželjnog marker genotipa, provedena je genotipizacija 17 oplemenjivačkih linija F₅ i F₈ generacije pomoću dva ranije spomenuta molekularna markera. Analizirane linije nalaze se u završnim fazama ispitivanja na agronomska svojstva radi izbora za sortno priznavanje.

Iz rezultata prikazanih u tablici 4.4. vidljivo je da 5 analiziranih linija (uzorci KTI 6, 9, 11, 12 i 16) posjeduje homozigotni genotip markera Satt228 koji je povezan s visokim sadržajem KTI, te da ove linije ujedno i za KTI specifičan marker pokazuju odsutnost fragmenta, a što ovo dodatno potvrđuje. Dvije analizirane linije (uzorci KTI 5 i 7) su za marker Satt228 pokazale heterozigotni genotip, a za KTI specifičan marker je utvrđena prisutnost fragmenta. Ostalih 10 analiziranih linija (uzorci KTI 1, 2, 3, 4, 8, 10, 13, 14, 15 i 17) je homozigotno za alel 217 marker lokusa Satt228, a što je povezano sa niskim sadržajem KTI. Od njih 10, dvije su za KTI specifičan marker pokazale odsutnost fragmenta, a ostalih 8 je pokazalo prisutnost fragmenta.

Tablica 4.3. Rezultati selekcije na nizak sadržaj KTI za oba korištena markera

Uzorak	Naziv linije	Generacija	Alel 1	Alel 2	KTI
KTI 2	ZA 1-2	F8	217	217	1
KTI 3	ZA 1-3	F8	217	217	1
KTI 4	ZA 4-2	F8	217	217	1
KTI 8	ASD 30-1	F5	217	217	1
KTI 10	BM 9-1	F5	217	217	1
KTI 13	BM 29-1-2	F5	217	217	1
KTI 14	BM 29-1-3	F5	217	217	1
KTI 17	BM 67-2	F5	217	217	1
KTI 1	ZA 1-1	F8	217	217	0
KTI 15	BM 41-1	F5	217	217	0
KTI 5	RB 42-1	F8	217	229	1
KTI 7	MB 58-2	F8	217	229	1
KTI 6	RB 31-6	F8	229	229	0
KTI 11	BM 26-1	F5	229	229	0
KTI 12	BM 29-1-1	F5	229	229	0
KTI 16	BM 61-1	F5	229	229	0
KTI 9	ASD 139-3	F5	250	250	0

5. RASPRAVA

Kunitz tripsin inhibitor (KTI) iz zrna soje u najvećem je dijelu odgovoran za lošiju nutritivnu kvalitetu termički neobrađene ili termički nepotpuno obrađene sojine sačme i brašna. Jedan od načina za smanjenje negativnog nutritivnog utjecaja u prehrani životinja je i razvoj novih kultivara soje sa značajno sniženim sadržajem KTI. Među više genskih lokusa koji kontroliraju sadržaj tripsin inhibitora u biljci soje, genski lokus *KTI₃* u najvećoj mjeri određuje ukupni sadržaj KTI u zrnu soje (Moraes i sur., 2006).

U ovom istraživanju analizirane su 272 primke iz kolekcije genotipova soje Znanstvenog centra izvrsnosti (CropBio-Div) sastavljene od modernih i povijesnih kultivara soje. Svi genotipovi analizirani su na mikrosatelitskom lokusu Satt228 za koji je u više studija potvrđeno da je tijesno povezan s lokusom *KTI₃* (Bulatova i sur., 2019 Kim i sur., 2006). U ovom istraživanju, a i u istraživanju drugih autora (Kim i sur., 2006., Bulatova i sur., 2019.) utvrđeno je da je mikrosatelitski alel „217“ (fragment duljine 217 bp) tijesno povezan sa recesivnim alelom *ti* lokusa *KTI₃*. Analizom naše kolekcije genotipova soje otkriveno je da 28 genotipova sadrži ovaj alel u homozigotnom stanju. Temeljem naših rezultata i ranije navedenih drugih studija, vrlo je vjerojatno da svi ovi genotipovi mogu poslužiti kao potencijalni donori za svojstvo niskog sadržaja KTI u zrnu soje. Izbor donora može ovisiti i o drugim svojstvima, prije svega ciljanoj dobi dozrijevanja, genetskoj divergentnosti roditelja i sl. Raspoloživost donora za ovo svojstvo iz godine u godinu je sve veća jer brojni oplemenjivački programi donose na tržište nove sorte s niskim sadržajem KTI (Kumar i sur., 2013., Pawale i sur., 2019., Bulatova i sur., 2019).

U ovom radu je također izvršena provjera nasljeđivanja i povezanosti dva molekularna markera za svojstvo niskog sadržaja KTI. Rezultati našeg istraživanja potvrdili su učinkovitost selekcije potpomognute markerima (MAS) za smanjenje sadržaja Kunitz inhibitora tripsina u zrnu soje. Bulatova i sur. (2019.) u svom istraživanju koriste iste donor genotipove, dobivaju vrlo slične rezultate i izvode iste zaključke.

Za identifikaciju genotipova s niskim sadržajem KTI koristili smo dvije vrste molekularnih markera: mikrosatelitni marker Satt228 i dominantni KTI marker specifičan za nul-alel koji bi trebao biti vrlo pouzdan. Za provjeru učinkovitosti selekcije

pomoću markera korištene su dvije F_2 populacije biljaka nastale iz križanja sa poznatim donorima *ti* alela lokusa *KTI₃*. U obje populacije koje su imale različite primatelje i različite donor genotipove utvrđena je visoka povezanost ciljanog markera i razine sadržaja KTI. Utvrđeni su očekivani segregacijski omjeri u F_2 generaciji kod obje populacije, a što je potvrđeno hi-kvadrat (χ^2) testom. Isto tako, primjenom F i Tukey testa potvrđena je visokosignifikantna povezanost niskog sadržaja KTI i recesivnih homozigota (217/217) mikrosatelitskog lokusa Satt228 sa lokusom odgovornim za nizak sadržaj KTI. Naši rezultati potvrđuju da sintezu Kunitz tripsin inhibitora u velikoj mjeri kontrolira jedan recesivni gen u homozigotnom stanju, a što je u skladu s rezultatima Kim i sur., 2008., Kumar i sur., 2015., Maranna i sur., 2016.

Ipak, u nekoliko slučajeva, vrijednosti količine KTI proteina izmjerene sa HPLC nisu korespondirale s očekivanim genotipom, kako kod Satt228, tako i kod alel-specifičnog KTI markera. U slučaju markera Satt228 razlog može biti razdvajanje markera od gena odgovornog za razinu sadržaja KTI u zrnu tijekom tvorbe gameta usljed crossing overa. Neočekivane vrijednosti mogu biti i posljedica nepravilnog uzorkovanja ili greški tijekom utvrđivanja količine KTI, ali i pogreški u postupku genetske analize. Međutim, udio pozitivne kosegregacije ciljanog marker alela i niskog sadržaja KTI je više nego zadovoljavajuće preciznosti za potrebe selekcije u ranim generacijama.

Vezano uz poglavlje 4.3. u kojemu su analizirane linije visoke homozigotnosti utvrđeno je 10 linija sa željenim homozigotnim stanjem na lokusu Satt228, međutim kod dvije linije (ZA 1-1 i BM 41-1) je na lokusu KTI utvrđen genotip „0“, a što bi trebao biti homozigot povezan sa visokim sadržajem KTI. Alel-specifični marker za KTI trebao bi u ovom smislu biti pouzdaniji jer je smješten unutar samog gena. Međutim, u oba slučaja uslijed lošije kvalitete DNA ili drugih pogreški u PCR reakciji teoretski je moguće izostajanje amplifikacije jednog fragmenta (s jednog kromosoma), a što bi moglo dovesti do pogrešnog očitavanja. U planu je ponoviti analize za sporna očitavanja i odstupanja.

Iako bi teoretski alel-specifični marker KTI trebao biti pouzdaniji, on je zbog svoje dominantne prirode nasljeđivanja značajno manje koristan u oplemenjivanju bilja od tijesno vezanih kodominantnih markera. Obzirom na visoku podudarnost u detekciji željene genotipske klase, mikrosatelitski marker Satt228 pokazuje se učinkovitijim i mi

ga preporučujemo za selekciju biljaka i linija soje sa niskim sadržajem KTI. Njegova glavna prednost ogleda se u mogućnosti izbora biljaka homozigotnih za željeni alel *ti* već u F2 ili F3 generaciji čime se ekspresija genotipa ovog svojstva fiksira u nastavku selekcije.

Kako bi se ispitala učinkovitost molekularnih markera, u ovom istraživanju su korišteni rezultati o sadržaju KTI u zrnju soje utvrđeni metodom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC), pribavljeni iz certificiranog laboratorija. Iako je HPLC pouzdana metoda za kvantificiranje sadržaja KTI te se kao takva može i samostalno primijeniti u selekciji genotipova na nizak sadržaj KTI-a, ona je radno i materijalno zahtjevnija. Molekularni markeri su također prilično sofisticiran alat, ali oni imaju nekoliko prednosti u odnosu na HPLC analizu. U prvom redu, oni mogu identificirati biljke sa željenim svojstvom u ranoj fazi, prije nego proizvedu sjeme, a što štedi vrijeme i resurse u usporedbi s HPLC analizom koju je moguće provesti tek nakon žetve. Također, molekularni markeri se mogu koristiti za praćenje nasljeđivanja ciljanog gena/svojstva kroz generacije, osiguravajući da se željeno svojstvo još u ranim generacijama selekcije fiksira u stabilnom (homozigotnom) stanju. Ne manje važan je i izostanak utjecaja okoline u slučaju selekcije pomoću markera. Molekularni markeri su stoga doista učinkovit i racionalan alat za razvoj novih sorti soje s niskim sadržajem KTI.

6. ZAKLJUČAK

Nove sorte soje sa sniženim sadržajem tripsin inhibitora u zrnu vrlo su poželjne u poljoprivrednoj praksi te na tržištu postaju sve učestalije. U kolekciji genotipova soje Znanstvenog centra izvrsnosti (Crop-BioDiv) utvrđeno je 28 kultivara različite dobi dozrijevanja koji mogu poslužiti kao roditelji donori za razvoj oplemenjivačkih populacija i selekciju na ovo svojstvo. Genetskom analizom F_2 populacija te F_5 i F_8 linija nastalih iz više različitih križanja su primjenom korištenih molekularnih markera uspješno identificirane jedinke sa niskim sadržajem TI. Primjenom protokola za izolaciju DNA i genotipizaciju opisanih u ovom radu moguće je već u F_2 generaciji brzo i učinkovito otkriti i izdvojiti biljke homozigotne za svojstvo niskog sadržaja Kunitz tripsin inhibitora. Ovo oplemenjivaču jako pomaže i ostavlja dosta prostora za selekciju na druga agronomski važna svojstva.

7. ZAHVALE

Ovim putem zahvaljujem se:

Prof. dr. sc. Ivanu Pejiću na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu, mentorstvu, savjetima i strpljenju tijekom izrade rada. Hvala na pruženoj prilici za mogućnost izrade ovog rada i na razumijevanju tijekom procesa pisanja.

Mag. ing. agr. Zoe Andrijanić na prenesenom iskustvu i znanju koje će mi zasigurno u budućnosti biti korisno, nadziranju tijekom rada u laboratoriju te na velikoj pomoći bez koje ne bih mogao izraditi ovaj rad.

Dr. sc. Ivani Tomaz i Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo na provedenoj HPLC analizi i ustupljenim podacima o razini sadržaja KTI u zrnu soje.

8. POPIS LITERATURE

1. Andrijanić, Z., Matoša Kočar, M., Brezinščak, L., Pejić, I. (2022). Trendovi proizvodnje soje u Hrvatskoj. *Glasnik Zaštite Bilja*, 45. (4.), 58-68. DOI: 10.31727/gzb.45.4.6
2. Bc institut (2017). Nove sorte soje Bc instituta. Online katalog. <https://bc-institut.hr/wp-content/uploads/2017/10/Soja-rezultati.pdf> (25.3.2023.)
3. Beuković, D. (2014). Hranljiva vrednost sirovog i termički obrađenog zrna soje u ishrani tovnih pilića u zavisnosti od nivoa tripsin inhibitora. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
4. Breene, W. M., Lin, S., Hardman, L., Orf, J. (1988). Protein and oil content of soybeans from different geographic locations. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(12), 1927–1931 (1988). DOI: 10.1007/bf02546009
5. Bulatova, K., Mazkirat, S., Didorenko, S., Babissekova, D., Kudaibergenov, M., Alchinbayeva, P., Khalbayeva, S., Shavrukov, Y. (2019). Trypsin Inhibitor Assessment with Biochemical and Molecular Markers in a Soybean Germplasm Collection and Hybrid Populations for Seed Quality Improvement. *Agronomy* 9(2), 76-86. DOI: 10.3390/agronomy9020076
6. Burssens, S., Pertry, I., Ngudi, D. D., Kuo, Y-H., Van Montagu, M., Lambein, F. (2011). Soya, human nutrition and health, *Soybean and Nutrition*, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953- 307-536-5, InTech, <http://www.intechopen.com/books/soybean-andnutrition/soya-humannutrition-and-health> (17.1.2023.)
7. Carlson, J.B., Lersten, N.R. (2004). Reproductive Morphology. In *Soybeans: Improvement, Production, and Uses* (eds R.M. Shibles, J.E. Harper, R.F. Wilson and R.C. Shoemaker). DOI: 10.2134/agronmonogr16.3ed.c3
8. Clarke, E., Wiseman, J. (2000). Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans II. Anti-nutritional factors. *Journal of Agricultural Science*, 134 (2), pp. 125-136.
URL: <http://journals.cambridge.org/action/displayJournal?jid=ags> (28.3.2023.)
9. Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142(1-2), 169–196.
DOI: 10.1007/s10681-005-1681-5

10. Dozier, W. A., Hess, J. B. (2011). Soybean meal quality and analytical techniques, Soybean and Nutrition, Hany El-Shemy, IntechOpen, DOI: 10.5772/24161
11. European Commission (2011): Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011. Off. J. Eur. Union, L 304/18 of 22.11.2011. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32011R1169> (26.3.2023.)
12. FAOSTAT (2022). FAOSTAT Database. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (22.3.2023.)
13. Grant, G. (1989). Anti-nutritional effects of soyabean: a review. Prog Food Nutr Sci. 1989;13(3-4):317-48. PMID: 2699045.
14. Grover, A., Sharma, P. C. (2014). Development and use of molecular markers: past and present. Critical Reviews in Biotechnology, (), 1–13. DOI: 10.3109/07388551.2014.959891
15. Han, Y., Parsons, C. M., Hymowitz, T. (1991). Nutritional evaluation of soya beans varying in trypsin inhibitor. Poultry Science 70, 896–906. DOI: 10.3382/ps.0700896
16. Hardman, L. (1970). The effects of some environmental conditions on flower production and pod set in soybean *Glycine max* (L.) Merrill var. Hark. Diss. Abstr. 31 , 5.
17. Hasan, N., Choudhary, S., Naaz, N., Nidhi, S., Rafiul, A.L. (2021). Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. J Genet Eng Biotechnol 19, 128. <https://jgeb.springeropen.com/articles/10.1186/s43141-021-00231-1> (6.2.2023.)
18. Jofuku, K. D., Goldberg, R. B. (1989). Kunitz Trypsin Inhibitor Genes Are Differentially Expressed during the Soybean Life Cycle and in Transformed Tobacco Plants. THE PLANT CELL ONLINE, 1(11), 1079–1093. DOI: 10.1105/tpc.1.11.1079
19. Jofuku, K. D., Schipper, R.D., Goldberg, R. B. (1989). A Frameshift Mutation Prevents Kunitz Trypsin Inhibitor mRNA Accumulation in Soybean Embryos. THE PLANT CELL ONLINE, 1(4), 427–435. DOI: 10.1105/tpc.1.4.427
20. Kim, M. S., Park, M. J., Jeong, W. H., Nam, K. C., Chung, J. I. (2006). SSR markers tightly linked to the Ti locus in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Euphytica 152: 361–366. DOI: 10.1007/s10681-006-9223-3
21. Koide, T., Ikenaka, T. (1973). Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. 3. Amino-Acid Sequence of the Carboxyl-Terminal Region and the Complete Amino-Acid

- Sequence of Soybean Trypsin Inhibitor (Kunitz). *European Journal of Biochemistry*, 32 (3), 417-431. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02624.x
22. Kozumplik, V., Pejic, I., Senior, L., Pavlina, R., Graham, G., Stuber, C. (1996). Use of molecular markers for QTL detection in segregating maize populations derived from exotic germplasm. *Maydica* 41, 211–218.
 23. Kumar, V., Rani, A., Rawal, R. (2013). Deployment of gene specific marker in development of Kunitz trypsin inhibitor free soybean genotypes. *Indian J. Exp. Biol.* 2013, 51, 1125–1129. PMID: 24579379
 24. Kumar, V., Rani, A., Rawal, R., Mourya, V. (2015). Marker assisted accelerated introgression of null allele of kunitz trypsin inhibitor in soybean. *Breeding Science*, 65(5), 447-452. DOI: 10.1270%2Fjsbbs.65.447
 25. Kurasch, A.K., Hahn, V., Leiser, W.L., Vollmann, J., Schori, A., Bétrix, C.A., Mayr, B., Winkler, J., Mechtler, K., Aper, J., Sudaric, A., Pejic, I., Sarcevic, H., Jeanson, P., Balko, C., Signor, M., Miceli, F., Strijk, P., Rietman, H., Muresanu, E., Djordjevic, V., Pospišil, A., Barion, G., Weigold, P., Streng, S., Krön, M., Würschum, T. (2017). Identification of mega-environments in Europe and effect of allelic variation at maturity E loci on adaptation of European soybean. *Plant Cell Environment*;40(5):765-778. DOI: 10.1111/pce.12896. Epub 2017 Feb 18. PMID: 28042879.
 26. Lersten, N.R. and Carlson, J.B. (2004). Vegetative Morphology. In *Soybeans: Improvement, Production, and Uses* (eds R.M. Shibles, J.E. Harper, R.F. Wilson and R.C. Shoemaker). DOI: 10.2134/agronmonogr16.3ed.c2
 27. Liener, I.E., Kakade, M.L. (1980). Protease inhibitors. In: Liener, I.E., Ed., *Toxic Constituents in Plant Feedstuff*, Academic Press, New York, 7-71.
 28. Liener, I.E. (1994). Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1994;34(1):31-67. DOI: 10.1080/10408399409527649. PMID: 8142044.
 29. Liu, K. (1997). Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components. *Soybeans*, 25–113. DOI: 10.1007/978-1-4615-1763-4_2
 30. Maranna, S., Verma, K., Talukdar, A., Lal, S.K., Kumar, A., Mukherjee, K. (2016). Introgression of null allele of Kunitz trypsin inhibitor through marker-assisted backcross breeding in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *BMC Genet.*, 17, 1–9. DOI: 10.1186/s12863-016-0413-2

31. Mittal, P., Kumar, V., Rani, A., Gokhale, S. M. (2021). Bowman-Birk inhibitor in soybean: Genetic variability in relation to total trypsin inhibitor activity and elimination of Kunitz trypsin inhibitor. *Notulae Scientia Biologicae*, 13(1), 10836. DOI: 10.15835/nsb13110836
32. Moraes, R.M.A., Soares, T.C.B., Colombo, L.R., Salla, M.F.S., de Almeida Barros, J.G., Piovesan, N.D., de Barros, E.G., Moreira, M.A. (2006). Assisted selection by specific DNA markers for genetic elimination of the kunitz trypsin inhibitor and lectin in soybean seeds. *Euphytica* 149: 221–226. DOI: 10.1007/s10681-005-9069-0
33. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73. DOI: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.
34. Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y. i sur. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32:2, 261-285. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2017.1400401> (17.1.2023.)
35. Nahashon, S., Kilonzo-Nthenge, A. (2011). Advances in Soybean and Soybean By-Products in Monogastric Nutrition and Health. *Soybean and Nutrition*. InTech. DOI: 10.5772/21135
36. Narodne Novine (2019). Zakon o genetski modificiranim organizmima. (NN 126/2019) URL: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_12_126_2524.html (27.3.2023.)
37. Orf, J.H., Hymowitz, T. (1979). Inheritance of the absence of the Kunitz trypsin inhibitor in seed protein of soybeans. *Crop Sci* 19:107–109
38. Pawale, S., Chimote, V., Deshmukh, M. (2019). Accelerated development of Kunitz trypsin inhibitor free soybean genotype with charcoal rot resistance through marker assisted selection. *J Pharmacogn Phytochem* 2019;8(6):1250-1253.
39. Pesic, M.B., Vucelic-Radovic, B.V., Barac, M.B., Stanojevic, S.P., Nedovic, V.A. (2007). Influence of Different Genotypes on Trypsin Inhibitor Levels and Activity in Soybeans. *Sensors (Basel)*. PMID: PMC3756712.
40. Rosso, M.L., Shang, C., Correa, E., Zhang, B. (2018). An Efficient HPLC Approach to Quantify Kunitz Trypsin Inhibitor in Soybean Seeds. *Crop Science*, 58(4), 1616. DOI: 10.2135/cropsci2018.01.0061

41. Stauffer, C.E. (1990). Measuring trypsin inhibitor activity in soy meal: Suggested improvements in the standard method. *Cereal Chem.* 67:296-302.
https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1990/Documents/67_296.pdf (31.3.2023.)
42. Tan-Wilson, A. L., Chen, J. C., Duggan, M. C., Chapman, C., Obach, R. S., Wilson, K. A. (1987). Soybean Bowman-Birk trypsin isoinhibitors: classification and report of a glycine-rich trypsin inhibitor class. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(6), 974–981. DOI: 10.1021/jf00078a028
43. Tiwari, V., Patel, K., Mandaliya, V., Bishi, S. (2014). Polymerase Chain Reaction: A Robust Technology for Crop Improvement. *Popular Kheti.* 2. 225-229.
https://www.researchgate.net/publication/271079195_Polymerase_Chain_Reaction_A_Robust_Technology_for_Crop_Improvement
44. Tukey, J. W. (1977). *Exploratory Data Analysis*. Reading, Massachusetts: Addison-Wesley.
45. Vagadia, B. H., Vanga, S. K., Raghavan, V. (2017). Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 115–125. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.02.003
46. Vollmann, J., Grausgruber, H., Wagentristl, H., Wohleser, H., Michele, P. (2003). Trypsin inhibitor activity of soybean as affected by genotype and fertilisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(15), 1581–1586.
DOI: 10.1002/jsfa.1582
47. Vratarić M., Sudarić A. (2008). *Soja Glycine max (L.) Merr..* Osijek, Poljoprivredni institut Osijek
48. Wiebold, W.J., Ashley, D.A., Boerma, H.R. (1981). Reproductive abscission levels and patterns for eleven determinate soybean cultivars. *Agronomy Journal*, 73(1), 43-46. DOI: 10.2134/agronj1981.00021962007300010010x
49. Zakir M. N., Freitas I. R. (2015). Benefits to human health in consumption of isoflavones present in soybean products. *Journal of Bioenergy and food science*, 2: 107- 116.
50. Zarkadas, C. G., Yu, Z., Voldeng, H. D., Minero-Amador, A. (1993). Assessment of the protein quality of a new high-protein soybean cultivar by amino acid analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(4), 616–623.
DOI: 10.1021/jf00028a021

9. SAŽETAK

Marko Ključarić

Selekcija na niski sadržaj tripsin inhibitora u zrnu soje primjenom molekularnih markera

Soja je važna proteinska kultura koja služi kao odličan izvor nutritivnih tvari, najviše kao krmivo u ishrani stoke. Međutim, zbog prisutnosti antinutritivnih spojeva u sojinom zrnu, potrebna je termička obrada prije njegovog korištenja za stočni obrok. Najvažniji antinutritivni spoj u zrnu soje je Kunitz tripsin inhibitor (KTI), koji onemogućava normalnu aktivnost probavnih enzima. Oplemenjivačkim postupkom je kod soje moguće stvoriti sorte koje u zrnu sadrže višestruko manju količinu KTI. Kao alternativa kemijskim metodama utvrđivanja sadržaja KTI u zrnu soje potencijalno je na raspolaganju i selekcija pomoću molekularnih markera. Kod soje su uspješno razvijeni mikrosatelitni i alel-specifični markeri povezani sa sadržajem KTI u zrnu. U ovome istraživanju su navedeni markeri korišteni u analizi 272 genotipa iz gen-kolekcije Znanstvenog centra izvrsnosti s ciljem detekcije poželjnih alelnih gena te je ispitivana učinkovitost selekcije pojedinačnih biljaka iz populacija u različitim generacijama selekcijskog postupka (F_2 , F_5 i F_8). Analizom kolekcije utvrđeno je 28 genotipova koji su homozigotni za nul-alel i mogu se koristiti kao donori za svojstvo niskog sadržaja TI. Analizom populacija cijepajućih generacija dokazana je uspješnost predviđanja jedinki s niskim sadržajem TI te su uspješno identificirane jedinke s poželjnim alelom. Selekcija pomoću markera može se preporučiti kao učinkovita i racionalna metoda u oplemenjivanju na svojstvo niskog sadržaja tripsin inhibitora u zrnu soje.

Ključne riječi: soja, kunitz tripsin inhibitor, MAS, molekularni markeri

10. SUMMARY

Marko Ključarić

Selection for low trypsin inhibitor content in soybean seed with the use of molecular markers

Soybean is an important protein crop which is used as an excellent source of nutritional compounds, mostly as feed for livestock. However, due to the presence of antinutritional compounds in soybean seed, thermal processing is required before it can be used as livestock meal. The most important antinutritional compound in soybean seed is the Kunitz trypsin inhibitor (KTI), which restricts the normal activity of digestive enzymes. Through the process of breeding process in soybean, it is possible to develop cultivars which contain multiple times smaller content of KTI in seed. As a potential alternative to the chemical methods for determining KTI levels in soybean seed, marker assisted selection is also available. For soybean, there are successfully developed microsattelite and allele-specific markers connected with the levels of KTI in seed. In this research, both of these marker types were used in the analysis of 272 genotypes from the Crop-BioDiv gene-collection, with the goal of detecting the desirable genes, and testing the efficiency of selection for individual plants from populations in different generations of the breeding process (F_2 , F_5 and F_8). By analyzing the collection, it was determined that 28 genotypes are homozygotes for the null-allele, and they can be used as donors for the low TI content trait. By analyzing the populations from separating generations, individuals with the desirable allele for low TI content were successfully identified. Marker assisted selection can therefore be recommended as an efficient and rational breeding method for the trait of low trypsin inhibitor content in soybean seed.

Keywords: soybean, kunitz trypsin inhibitor, MAS, molecular markers

PRILOZI

Prilog 1. Popis svih analiziranih genotipova iz kolekcije Crop-BioDiv

Abelina	Drina	Kurca	PR92M35
Adonai	Dubravka	Labrador	Primapro
Afrodita	Duchessa	Lambton	Proteix
Aires	Duga	Lana	Protyna
Alexa	Dukat	Lasta	Ratarka S-0990
Alisa	Ecuador	Laura	Regale
Aliz	Eiko	Lena	Reiner
Allemand	Em_Neve	Light Green	Riede 525
Almas	Ema	Lika	Rita
Altapro	Erin Bcv	Lissabon	Roudnicka Ciern
Amandine	Es Advisor	London	RTG Sinfonia
Amma	Es Comandor	Lucija	Rubin
Amphor	Es Mentor	Luna	Ruzica
Amurskaja 262	Es Pallador	Mačvanka	Saljut 216
Amurskaja 265-63	Es Tribori	Magy	Sanda
Amurskaja 41	ES_Senator	Major	Sandokan
Ana ZG	ESG_121	Maksimirka	Sanja
Ananda	Essor	Malaga	Sara
Angela PZO	Eugen	Mandala	Satyna
Anica	Faur	Mantra	Sava
Annette	Felix	Maximus	SCF 5110
Ascasubi	Flambeau	Medena (k1202)	Secan
Astafor	Flavia	Medina	Seka
Atacama	Fortuna	Merit	Senka
Aura AF	Gabriela	Merkur	Sephia
Avatar	Gala PZO	Merlin	SG_Eider
Avril (519)	Galeb	Milana	Sigalia
Bahia	Galina	Mima	Silvia
Balkan	Gallec	Minpro	Simonida
Blancas	Gamba	Mitsuko	Sinara
Bobita	Gatersleben 31	Morava	Sito
Bojana	Gatersleben 57	Nada	Slavonka
Bolly-44	Ginerva	Nađa	Sonja
Bosa	Ginerva	Namaste	Sponsor
Buenos	Gioconda	Naya	Sremica
Buga	Giunone	Nena	Sultana
Capnor	Glorija	Neoplanta	Sunce
Cardiff A	Goldsoy	Nera	Suzumaru
Carla_TD	Gordana	Nizija	Szkliska

Castetis	Gorštak	NS Ana	Ta-chin-hu-houan-tsa
Celina_PZO	Guru	OAC Wallace	Tamara
CH21-414	Hardome	Oana_F	Tara
CH22-172	Hawkeye	Onix	Tea
CH22-174	Hei-He nr.3	Optimus	Tena
Champion	Heimcraft II	OS_Zora	Terrapro
Chmelarovska brensk	Herb 606	OS-2017-1	Tihana
Color	Herb 616	OS-2017-2	Tina
Columna	Herb 620	OS-2017-5	Tisa
Comet	Hilario	OS-2017-6	Toma
Corbett	Hiroko	OS-2017-7	Tourmaline
Cordoba	Hodoninska Zlota	OS-2017-8	Triumf
Corona tip 1	Hrvatica	Oxford	Una
Corona tip 2	Idefix	Pacific	Uskolisna
Crina_F	Ika	Paco	Valjevka
Daccor	Ilidineka	Pannonia 8	Varainana
Daciana	Indijana	Panonka	Venera
Daisy_PZO	Iregi Szrkebar T	Pedro	Vera
Danica	Isidor	Pela	Viola
Dekabig	Jozefina	Pepita	Vita
DH_5170	Julijana	Perla	Voloda
DH4173	Kata	Picor	XL-4
Diamant	KG Eden	Platska Zlta Obrovska	Xonia
Diana	Kleverhof 527	Pluribus	Zagorka
Dippes Frh.	Korana	Podravka 95	Zagrepčanka
DM_503	Kouban 0.375	Pr Coce de Milly	Zlata
DM_513	Krajina	PR91M10	Zlotka
Dora	Kruna	PR92B63	Zora NS
Dornburger stamm	Kuna	PR92M22	Zvezda

Prilog 2. Rezulati F₂ populacije ASD

Ascasubi x DH5170	Satt228		KTI	KTI mg/g
Ascasubi ♀	217	217	1	4,52
DH5170 ♂	250	250	0	15,84
AD16	217	217	1	4,48
AD21	217	217	1	4,45
AD25	217	217	1	4,45
AD27	217	217	1	4,50
AD30	217	217	1	4,44
AD41	217	217	1	9,41
AD48	217	217	1	4,47
AD49	217	217	1	4,47
AD50	217	217	1	4,53
AD51	217	217	1	4,47
AD65	217	217	1	4,54
AD67	217	217	1	10,70
AD01	217	250	1	17,93
AD06	217	250	1	18,78
AD07	217	250	1	16,25
AD10	217	250	1	15,27
AD14	217	250	1	17,59
AD15	217	250	1	16,31
AD17	217	250	1	15,60
AD18	217	250	1	14,75
AD19	217	250	1	15,34
AD23	217	250	1	4,58
AD24	217	250	1	15,64
AD28	217	250	1	14,95
AD29	217	250	1	15,21
AD31	217	250	1	16,20
AD35	217	250	1	15,76
AD36	217	250	1	16,00
AD37	217	250	0	15,68
AD38	217	250	1	16,12
AD40	217	250	1	17,11
AD42	217	250	1	17,15
AD52	217	250	1	17,07
AD53	217	250	1	15,51
AD54	217	250	0	17,75
AD55	217	250	1	4,48
AD58	217	250	1	17,83
AD61	217	250	1	17,03

Ascasubi x DH5170	Satt228		KTI	KTI mg/g
AD62	217	250	0	22,63
AD63	217	250	1	17,64
AD64	217	250	1	16,74
AD69	217	250	1	16,16
AD72	217	250	0	18,19
AD02	250	250	0	18,84
AD03	250	250	0	17,49
AD05	250	250	0	17,32
AD13	250	250	0	18,19
AD20	250	250	0	21,36
AD33	250	250	0	4,53
AD34	250	250	0	16,35
AD43	250	250	0	18,04
AD44	250	250	0	17,75
AD45	250	250	0	16,32
AD46	250	250	0	19,13
AD47	250	250	0	17,62
AD56	250	250	0	18,47
AD57	250	250	0	18,01
AD59	250	250	0	18,60
AD60	250	250	0	22,79
AD66	250	250	0	17,76
AD68	250	250	0	19,05
AD70	250	250	1	16,40

Prilog 3. Rezultati F₂ populacije BM

Bahia x ES Mentor	Satt228		KTI	KTI mg/g
Bahia ♀	217	217	1	4,50
ES Mentor ♂	229	229	0	17,36
BM1 05	217	217	1	4,68
BM1 08	217	217	1	4,61
BM1 09	217	217	1	4,50
BM1 12	217	217	1	10,07
BM1 22	217	217	1	4,54
BM1 24	217	217	1	4,53
BM1 25	217	217	1	4,51
BM1 32	217	217	1	7,11
BM1 34	217	217	1	4,41
BM1 35	217	217	1	4,46
BM1 41	217	217	1	4,50
BM1 44	217	217	1	4,60
BM1 62	217	217	1	10,22
BM1 67	217	217	1	4,48
BM1 03	217	229	1	16,28
BM1 07	217	229	1	16,53
BM1 11	217	229	1	15,79
BM1 13	217	229	1	17,33
BM1 15	217	229	1	15,58
BM1 16	217	229	1	15,15
BM1 17	217	229	1	15,57
BM1 19	217	229	1	16,24
BM1 21	217	229	1	16,73
BM1 26	217	229	1	17,20
BM1 28	217	229	1	16,64
BM1 29	217	229	1	17,27
BM1 30	217	229	1	16,49
BM1 40	217	229	1	17,50
BM1 42	217	229	0	18,21
BM1 45	217	229	1	16,63
BM1 48	217	229	1	16,41
BM1 50	217	229	0	21,60
BM1 53	217	229	1	15,31
BM1 54	217	229	1	17,99
BM1 56	217	229	1	4,48
BM1 57	217	229	1	16,19
BM1 60	217	229	1	16,68
BM1 64	217	229	1	16,41

Bahia x ES Mentor	Satt228		KTI	KTI mg/g
BM1 65	217	229	1	15,37
BM1 69	217	229	1	15,58
BM1 70	217	229	1	15,64
BM1 71	217	229	1	16,25
BM1 02	229	229	0	15,60
BM1 06	229	229	0	18,83
BM1 18	229	229	0	18,02
BM1 20	229	229	1	4,49
BM1 23	229	229	0	17,13
BM1 36	229	229	0	17,01
BM1 39	229	229	0	18,11
BM1 49	229	229	0	18,53
BM1 51	229	229	1	16,40
BM1 63	229	229	0	18,22
BM1 66	229	229	0	20,31
BM1 68	229	229	0	17,68