IDENTIFIKACIJA POTOMSTAVA BEZ KUNITZ TRIPSIN INHIBITORA KOD UKRŠTANJA SOJE U PUNOM SRODSTVU

Mirjana Srebrić^{1*}, Dragan Kovačević¹, Vesna Perić¹

Izvod

Kunitz tripsin inhibitor (KTI) je deo antihranljivog kompleksa prisutnog u zrnu soje. Zrno soje bez KTI može da se koristi u ishrani nepreživara bez prethodne termičke obrade. U cilju dobijanja linija soje sa smanjenim sadržajem anti-hranljivih materija u zrnu, na prvom mestu bez KTI, izvršeno je ukrštanje adaptiranog genotipa standardnog kvaliteta zrna (sorta Kador) sa genotipom bez KTI slabije adaptiranim na naše uslove gajenja (sorta Kunitz). Dobijena je segregirajuća generacija iz koje su za novi ciklus ukrštanja odabrane tri najprinosnije F_3 linije, heterozigotne za prisustvo KTI. Realizovane su dve kombinacije ukrštanja u punom srodstvu (*full-sib* - FS) sa različitim brojem uspešno ukrštenih biljaka. Utvrđivanje prisustva KTI u potomstvima razvijenim iz odabranih linija poreklom iz ukrštanja Kunitz x Kador i njihovih kombinacija FS ukrštanja, izvršeno je pomoću proteinskih markera na nativnom poliakrilamidnom gelu. Na osnovu elektroforegrama je uočeno da trake koje odgovaraju poziciji KTI nisu istog intenziteta. Analiza je rađena iz grupnog uzorka, tako da je moguće da se u uzorku nalaze zrna sa i bez KTI. Na elektroforegramu je identifikovano deset potomstava linija majki i pet potomstava FS ukrštanja bez trake koja odgovara poziciji KTI. Ukupno četiri potomstva sa prinosom zrna po biljci na nivou i boljim od prinosnijeg roditelja mogu se smatrati perspektivnim za dalji postupak odabiranja.

Ključne reči: soja, ukrštanje u punom srodstvu, Kunitz tripsin inhibitor, proteinski markeri

Uvod

Soja predstavlja jednu od najvažnijih gajenih biljnih vrsta zbog sadržaja pre svega kvalitetnih proteina i ulja. Iako se najveće količine proizvedenog zrna soje u svetu koriste za ishranu domaćih životinja (sačme, pogače, griz), zrno soje se sve više koristi i za ljudsku ishranu (brašno, teksturirani belančevinasti koncentri sa 38-95% proteina). U prehrambenoj, hemijskoj i farmaceutskoj industriji, zrno soje je značajna sirovina (Vratarić i Sudarić, 2008).

Osim korisnih sastojaka, zrno soje sadrži i kompleks antihranljivih supstanci (Mikić et al., 2009) od kojih su najviše proučavane: tripsin inhibitori, hemaglutinin, saponin, goitrogeni

faktori, alergeni, flatulenske supstance, lipoksidaza, ureaza. Smatra se da su glavni antinutritivni faktori tripsin inhibitori i lektin (Beker-Ritt et al., 2004; Gu et al., 2010). Tripsin inhibitori (Kunitz i Bowman-Birk tripsin inhibitor) spadaju u proteine i učestvuju sa oko 6% od ukupnih proteina u zreloom zrnu soje. Kunitz tripsin inhibitor (KTI) se smatra supstancom sa najjačim inhibirajućim delovanjem u zreloom zrnu soje (Watanabe et al., 2018).

U sistemu za varenje monogastričnih životinja i čoveka tripsin inhibitori blokiraju proteolitičke fermente i na taj način ometaju normalnu razgradnju molekula korisnih proteina (Kim et al., 2010). Blokiranje funkcije proteolitičkih fermenta pouzrokuje hiperfunkciju a

kasnije i hipertrofiju pankreasa monogastričnih organizama. Vidljive posledice su zaostajanje u rastu i razvoju, što je izraženije kod mladih organizama. Zrno soje bez KTI može da se koristi u ishrani odraslih nepreživara dok bi za ishranu mladih životinja trebalo da bude eliminisan i lektin (Palacios, 2004). Da bi zrno soje moglo da se koristi u ishrani domaćih životinja i ljudi, tripsin inhibitori se inaktiviraju najčešće procesima koji uključuju termičku obradu, zahtevaju veliki utrošak energije a dolazi i do denaturacije i pogoršanja svarljivosti korisnih proteina (Aviles-Gaxiola et al., 2018). Sve do osamdesetih godina smatralo se da je Bowman-Birk inhibitor (BBI) termostabilniji (Obara i Watanabe, 1971). Van den Hout et al. (1998) su došli do zaključka da se oba tripsin inhibitora istovremeno inaktiviraju u toku prve faze termičke obrade i da se pri tome BBI potpuno inaktivira. U drugoj fazi se inaktivira ostatak aktivnosti KTI. Ovo ide u prilog ekonomičnijoj preradi zrna soje bez KTI, koja bi mogla da se obavlja jednofazno, uz manji utrošak vremena i energije i bolje očuvanje svarljivosti korisnih proteina. Kasnije su objavljeni rezultati koji pokazuju da je termostabilnost oba tripsin inhibitora približna (Csapo and Albert, 2018). Sastav amino- kiselina u protenskom kompleksu u zreom zrnu soje bez KTI, osim smanjenog sadržaja lizina ne pokazuje veliku razliku u odnosu na zrno standardnih genotipova (Monteiro et al., 2004).

Smatra se da KTI učestvuje u regulisanju transporta rezervnih proteina i inhibiciji endogenih proteaza u semenu, a njegova najvažnija uloga je zaštita od insekata. U cilju postizanja rezistentnosti na insekte koji se hrane listom gen za KTI je unet u genom drugih gajenih biljnih vrsta (Mc Manus i sar., 2005). Nije utvrđena posebna osetljivost zrna soje bez KTI na insekte. KTI nije u vezni sa agronomski značajnim osobinama kod soje i ne utiče na prinos zrna (Žilić et al., 1998). Ukupan sadržaj proteina u zrnu sorti bez KTI u odnosu na sorte standardnog kvaliteta zrna je približan (Srebrić et al., 2010).

Kao i drugi proteini KTI predstavlja specifični produkt gena. Poznato je da je njegovo prisustvo u zreom zrnu soje determinisano sa

tri kodominantna alela u jednom lokusu, označena kao Ti^a , Ti^b , i Ti^c , koji su dominantni u odnosu na četvrti gen označen kao ti , čija homozigotna konstitucija determiniše odsustvo KTI (Orf and Hymowitz, 1979). Za identifikaciju prisustva ili odsustva KTI primenjena je metoda gel elektroforeze. Ovo je stara, ali pouzdana metoda, za koju je Anre Tisellius dobio Nobelovu nagradu 1948. godine. Ona podrazumeva kretanje naelektrisanih čestica kroz rastvor slabog elektrolita u homogenom električnom polju. U zavisnosti od naelektrisanja, veličine, oblika i molekulske težine molekuli proteina se kreću različitom brzinom i zauzimaju različitu poziciju na gelu, pri čemu se ne menja njihova struktura, što je veoma pogodno za razdvajanje i identifikaciju proteina (Trenkovski et al., 2006).

Metoda ukrštanja u punom srodstvu (*full-sib*), korišćena u ovom radu za formiranje materijala, spada u brojne metode rekurentne selekcije, čija je zajednička karakteristika odabiranje i rekombinovanje manjeg broja superiornih potomstava za svaki naredni ciklus selekcije (Stojković i sar., 2008). Rekurentna selekcija se koristi u cilju poboljšanja kvantitativnih osobina a započinje stvaranjem početne populacije koju je moguće formirati učešćem različitog broja roditelja. U sledećim ciklusima se obavljaju ukrštanja odabranih superiornih linija. Zbog toga što se kod soje teško postiže dovoljan broj ukrštanja potrebnih za pojedine cikluse rekurentne selekcije, nove sorte soje se pretežno stvaraju iz potomstava ukrštanja dva roditelja. Rekurentna selekcija je kod soje korišćena u cilju povećanja varijabilnosti početne populacije (Allipadrini and Vello, 2004) i za poboljšanje različitih osobina od kojih je najznačajnija prinos zrna (Orf, 2008; Burton and Miranda, 2013).

Materijal i metode

Materijal korišćen u ovom radu je formiran ukrštanjem dve sorte, kao inicijalnih roditelja, u cilju stvaranja visokoprinosnih linija bez KTI u zreom zrnu. U ovoj kombinaciji ukrštanja majka je bila američka sorta Kunitz, donor željene osobine, prva takva registrovana

sorta soje (Bernard et al., 1991). Sorta pripada III grupi zrenja, što ne odgovara uslovima gajenja u Srbiji, posebno u regionima sa nižom godišnjom sumom aktivnih temperatura. Otac je bila sorta Kador, standardnog kvaliteta zrna, selekcionisana u francuskoj semenskoj kompaniji Semundo, II grupe zrenja, koja se u prethodnim testiranjima u našim uslovima pokazala kao visokoprinosna. Oba roditelja pripadaju sortama indeterminantnog tipa rasta stabla, koje su pogodnije za naše uslove gajenja. Iz F_2 populacije odabrano je 48 individualnih biljaka, zadovoljavajuće dužine vegetacije, sa dovoljnom količinom semena za dalji postupak, bez obzira na prisustvo KTI. Ukupna količina semena svake pojedinačne F_2 biljke je podeljena na dva dela. Prvi deo je upotrebljen za postavljanje ogleada za testiranje prinosa zrna u koje su bile uključene i roditeljske sorte, a drugi deo je ostavljen kao rezerva. Postavljen je jednogodišnji ogled po RCB dizajnu na dve lokacije (Zemun Polje i Indija), u dva ponavljanja sa elementarnom parcelom $1,5\text{m}^2$ (dva reda 3m dužine). Za određivanje prinosa zrna po biljci uzeti su uzorci od po 30 kompetentnih biljaka po ponavljanju. Odabrane su tri linije sa najboljim rangom prinosa zrna po biljci, označene kao L6 (rang 2), L30 (rang 3) i L38 (rang 1), za roditelje u drugom ciklusu ukrštanja.

Obavljene su dve kombinacije ukrštanja: L38 x L6 i L6 x L30. Ukrštanja su obavljena na F_3 biljkama poreklom iz rezerve semena. Kao markeri za identifikaciju uspešno obavljenog ukrštanja korišćene su dve osobine: boja cveta i boja malja. L30 i L38 su imale ljubičaste i bele cvetove i sive i žute malje, a L6 bele cvetove i žute malje. Polen za komponentu oca je uziman sa slučajno odabranih biljaka iz odgovarajuće linije, uzimajući u obzir da osobine koje su korišćene kao marker budu u fenotipski dominantnoj formi (ljubičasti cvet i/ili žute malje) kod L6 i 30. Ukrštanja su obavljena na biljkama iz linije majke sa obe osobine u recesivnoj formi (beli cvetovi i/ili sive malje) kod linija L38 i L6. Majčinske biljke je bilo lako identifikovati posle sazrevanja. Na njima su obavljena ukrštanja, a mahune sa potencijalno hibridnim semenom su bile obeležene. Posle uzimanja obeleženih mahuna koje su se formirale posle obavljenih

ukrštanja, sačuvano je samooplođeno seme sa majčinskih biljaka. Odgajene su biljke poreklom iz sestrinskih ukrštanja (FS) i eliminisane sve individue kod kojih nije došlo do ekspresije dominantne osobine komponente oca. Biljke kod kojih su uspešno obavljena sestrinska ukrštanja (FSF_1) odgajene su do sazrevanja. U kombinaciji L38 x L6 bilo je 10 FSF_1 biljaka, a u kombinaciji L6 x L30, 15 FSF_1 biljaka. U narednoj sezoni je umnoženo njihovo seme kao i samooplođeno seme sa majčinskih biljaka. Na taj način je obezbeđena dovoljna količina semena za poljski eksperiment i postignut isti stepen homozigotnosti (87,5 %) kod $F_{3:4}$ potomstava majki i $FSF_{1:2}$ potomstava sestrinskih ukrštanja, s obzirom na to da se pri ukrštanju sestrinskih linija u sledećoj generaciji ne menja stepen homozigotnosti. Prosečna vrednost prinosa zrna potomstava se takođe značajno ne menja ali se izdvajaju nova perspektivna potomstva sa prinosom zrna na nivou ili boljim u odnosu na adaptiranog roditelja (Srebrić i sar., 2016).

Postupkom gel elektroforeze, na osnovu prisustva ili odsustva trake na elektroforegramu, identifikovana su potomstva biljaka koje su korišćene kao majke i potomstva njihovih sestinskih ukrštanja sa i bez KTI u zrnu. Za identifikaciju prisustva KTI u zrnu testiranih potomstava majki i njihovih sestrinskih ukrštanja korišćena je rezerva semena sa majčinskih F_3 i sestrinskih ukrštanja FSF_1 biljaka čuvana u hladnoj komori. Mlevenje zrna soje je obavljeno na kataskaptu. Imajući u vidu stepen homozigotnosti, samleveno je po 10 zrna sa svake biljke od kojih je napravljen grupni uzorak. Na isti način je pripremljeno i zrno sorti Kunitz i Kador kao početnih roditelja. Ekstrakcija je obavljena po proceduri Hymowitz and Hadley (1972), odabranoj zbog specifičnog pufera koji je selektivno izdvojio proteine iz uzorka, tako da su na elektroforegramu dobijene jasno izdvojene trake na mestu gde treba da se nalazi KTI (veličina fragmenta od 21,5 Kda). Od svakog uzorka je uzeto po 100 mg brašna i pomešano sa 1,5 ml ekstrakcionog pufera (0,092 M TrisHCl pH 8,1; 13,3% saharoze; 0,023 M CaCl_2 ; 1mM PMSF). Proteini su ekstrahovani na sobnoj temperaturi uz povremeno mućkanje, tokom 20-30 minuta. Smeša

je centrifugirana 5 minuta u Ependorf mikrocentrifugi. Za elektroforezu je uzeto po 10 μ l od gornjeg, bistrog sloja. Proteinska elektroforeza je vršena na nadenaturišućem (nativnom) poliakrilamidnom gelu koji se sastojao od 10% gela za razdvajanje i 5% za fokusiranje uzoraka. Gel za razdvajanje je sadržao 0,375 M TrisHCl pH 8,8 a gel za fokusiranje 0,25 M TrisHCl pH 6,8 pufer. Gornji i donji rezervoari miniproteana (Mini Protean II, Bio-Rad) su punjeni sa 25mM TrisHCl, 192 mM glicin puferom za elektroforezu. Elektroforeza na oko 120 V je trajala dok bromfenol plavi marker nije stigao do kraja gela za razdvajanje. Posle završene elektroforeze, gelovi su držani 1 sat u rastvoru za fiksiranje (30% etanola, 10% sircetne kiseline). Bojenje gelova je trajalo oko 1 sat u rastvoru sa bojom „comassie blue“. Posle završenog bojenja gelovi su ispirani u istom rastvoru kao za fiksiranje do postizanja zadovoljavajuće vidljivosti proteinskih traka. Gelovi su fotografisani, spakovani u hermetički zatvorene polivinilske kesice i stavljeni na čuvanje na +4°C.

Rezultati i diskusija

Identifikacija prisustva KTI, uz pomoć proteinskih markera može da se obavlja u bilo kojoj fazi postupka selekcije. Za gel elektroforezu, kao kvalitativnu metodu, dovoljna je mala količina uzorka, koji može biti i deo kotiledona ako je potrebno da se zrno sačuva za setvu (Schmidt, 2015), smeša brašna od nekoliko zrna sa pojedinačnih biljaka ili grupni uzorak ako se radi o perspektivnim linijama u kasnijim generacijama samooplodnje ili kontroli kod gotovih sorti.

Na osnovu elektroforegrama je uočeno da trake koje odgovaraju poziciji KTI nisu istog intenziteta. Moguće je da trake slabijeg intenziteta pripadaju heterogenim i/ili heterozigotnim potomstvima, s obzirom da potomstva majki pripadaju $F_{3,4}$ generaciji, a potomstva njihovih ukrštanja u punom srodstvu, $FSF_{1,2}$ generaciji. Analiza je rađena iz grupnog uzorka, tako da je moguće da se u uzorku nalaze zrna heterozigotnih biljaka ili zrna sa i bez KTI. Primenom ove metode, ne mogu pouzdano da se razlikuju dominantni homozigoti i hetero-

zigoti na ovom lokusu. Da bi to bilo moguće, primenjuju se specifični molekularni markeri Satt228 i Satt409 (Kovačević i sar., 2015.)

Na slici 1. prikazan je elektroforegram za identifikaciju prisustva KTI kod sorti čijim ukrštanjem je početo formiranje materijala za ovo istraživanje. Prvi uzorak je marker, odnosno KTI, koji je u procesu gel elektroforeze zauzeo svoje mesto i pokazuje gde treba da se nalazi traka za uzorke zrna soje koje ga sadrže (koje ima dominantnu ili heterozigotnu konstituciju alela za prisustvo KTI u zreom zrnu). Drugi uzorak pripada početnom roditelju bez KTI, sorti Kunitz. Treći uzorak je dobijen iz zrna sorte Kador, koja sadrži KTI u zreom zrnu. Jasno se vidi izražena traka na odgovarajućoj poziciji kod sorte Kador, dok kod sorte Kunitz ona nedostaje.

Slika 1. Elektroforegram za marker i inicijalne roditelje – sorte Kunitz i Kador

Picture 1. Electrophoregram for marker and initial parents - varieties Kunitz and Kador

Rezultat gel elektroforeze grupnih uzoraka zrna potomstava biljaka majki L38 i njihovih ukrštanja sa sestrinskom linijom soje L6, prikazan je na slici 2. Potomstva majki označena su brojevima 1-10 a potomstva njihovih

sestrinskih ukrštanja 11-20. Potomstva majki označena sa 5, 7 i 8 i potomstva ukrštanja sa sestrinskom linijom označena sa 14 i 18 koja nemaju traku na mestu gde treba da se nalazi Kunitz tripsin inhibitor na elektroforegramu, su identifikovana kao genotipovi bez Kunitz tripsin inhibitora u zreloom zrnu.

Slika 2. Elektroforegram potomstva majki i ukrštanja u punom srodstvu soje za kombinaciju L38 x L6

Picture 2. Electrophoregram of progenies mother and soybean full-sibs for L38 x L6 combination

Jedno potomstvo majki (7) i dva iz FS ukrštanja L38xL6, (14 i 18) bez Kunitz tripsin inhibitora su po svom prinosu zrna po biljci na

nivou adaptiranog roditelja, što znači da ih možemo smatrati perspektivnim (Grafikon 1).

Na slici 3 je prikazan elektroforegram potomstva majki i sestrinskih ukrštanja za kombinaciju L6 x L30. Potomstva majki označena su brojevima 1-15 a potomstva njihovih sestrinskih ukrštanja 16-30. Identifikovano je 8 potomstava linije L6 (označena sa 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 i 14) i 3 FS potomstva (označena sa 17, 23 i 29) bez Kunitz tripsin inhibitora.

Slika 3. Elektroforegram potomstva majki i sestrinskih ukrštanja soje za kombinaciju L6 x L30

Picture 3. Progenies electrophoregram of mothers and soybean sister crosses for L6 x L30 combination

Grafikon 1. Prinos zrna (g) po biljci potomstava majki i ukrštanja u punom srodstvu soje za kombinaciju L38 x L6

Figure 1. Grain yield (g) per plant of progenies mother and soybean full-sibs for L38 x L6 combination

Grafikon 2. Prinos zrna (g) po biljci majki i sestrinskih ukrštanja soje za kombinaciju L6 x L30

Figure 2. Grain yield (g) per plant of progenies mother and soybean full-sibs for L6 x L30 combination

Kao i kod prethodne kombinacije, i u okviru potomstava L6 i L6 x L30, odabiranje linija za dalji postupak selekcije može se obaviti ne samo po prinosu zrna, kao glavnom kriteriju, već i po prisustvu KTI.

Najviši prinos zrna po biljci, u okviru potomstava ove kombinacije sestrinskog ukrštanja pokazalo je potomstvo označeno kao 23 (Grafikon 2), koje ujedno predstavlja najperspektivnije potomstvo bez KTI u zrnu u okviru testiranog materijala. Ostala potomstva bez KTI i linije majke i njenih ukrštanja sa sestrinskom linijom, pokazala su niži prinos zrna po biljci u odnosu na adaptiranog roditelja, sortu Kador.

Sva potomstva bez KTI, sa prinosom zrna na nivou ili boljim od adaptiranog roditelja biće uključena u program stvaranja sorti bez KTI u zreloom zrnu.

Zaključak

U postupku selekcije sorti bez KTI u zreloom zrnu, neophodna je pouzdana determinacija njegovog prisustva. Pomoću gel elektroforeze, poznate stare metode, uz odgovarajući način pripreme uzoraka, dobijeni su pouzdani rezultati. Dve od tri sestrinske linije, odabrane kao majke u dve kombinacije ukrštanja u punom srodstvu (L6 i L30), bile su heterozigotne za prisustvo KTI u zreloom zrnu. Izdvojena su dva potomstva majki bez KTI sa prinosom zrna ne manjim od adaptiranog roditelja, i tri

potomstva sestrinskih ukrštanja iz obe kombinacije. Posle drugog ciklusa ukrštanja identifikovano je još tri potomstva bez KTI od čega jedno sa najvišim prinosom zrna po biljci. Ako se radi o materijalu sa nekom specifičnom osobinom, kao što je odsustvo KTI u zreloom zrnu, postupak ukrštanja u punom srodstvu ili sličan metod rekurentne selekcije pri stvaranju novih sorti soje ima opravdanu primenu, bez obzira na tehnički veoma zahtevan postupak.

Literatura

- Alliprandini LF and Vello NA (2004): Heritability and correlations among traits in four-way soybean crosses. *Euphytica*, 136: 81-91.
- Aviles-Gaxiola S, Chuck-Hernandez C, Serna Saldivar SO (2018): Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review. *Journal of Food Science*, 83 (1): 17-29.
- Becker-Ritt AB, Mulinari F, Vasconcelos IM, Carlini CR (2004): Antinutritional and/or toxic factors in soybean (*Glycine max.* (L) Merrill) seeds: comparison of different cultivars adapted to the southern region of Brazil. *J. Sci. Food Agric.*, 84: 263-270.
- Bernard RL, Hymowitz T and Cremens CR (1991): Registration of "Kunitz" soybean. *Crop Sci.*, 31: 232-233.
- Burton JW, Miranda L (2013): Soybean improvement: Achievements and challenges. *Rat. Pov.*, 50(2): 44-45

- Csapo J, Albert Cs (2018): Methods and procedures for reducing soy trypsin inhibitor activity by means of heat treatment combined with chemical methods. *Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria*, 11: 58-80.
- Gu C, Pan H, Sun Z, Qin G (2010): Effect of soybean variety on anti-nutritional factors content, and growth performance and nutrients metabolism in rat. *Int. J. Mol. Sci.*, 11(3): 1048-1056.
- Hymowitz T, Hadley HH (1972): Inheritance of a trypsin inhibitor variant in seed protein of soybeans. *Crop Sci.*, 12: 197-198.
- Kim DS, Lee KJ, Kim JB, Kim SH, Song JY, Seo YW, Lee BM, Kang SY (2010): Identification of Kunitz trypsin inhibitor mutations using SNAP markers in soybean mutant lines. *Theor. Appl. Genet.*, 121: 751-760.
- Kovačević D, Mladenović Drinić S, Perić V, Srebrić M (2015): Determinacija KTI u genotipovima soje. *Selekcija i semenarstvo*, 21(1): 1-7.
- Mc Manus MT, Laing WA, Watson LM, Marwick N, Voisey CR, White DWR (2005): Expression of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor in leaves of white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Sci.*, 168(5): 1211-1220.
- Mikić A, Perić V, Đorđević V, Srebrić M, Mihailević V (2009): Anti-nutritional factors in some grain legumes. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25 (5-6): 1181-1188.
- Monteiro MRP, Costa NMB, Oliveira MGA, Pires CV, Moreira MA (2004): Protein quality of soy lines lacking Kunitz's trypsin inhibitor and lipoxygenase isosymes. *Rev. Nutr.*, 17(2): 195-205.
- Obara T, Watanabe Y (1971): Heterogeneity of soybean trypsin inhibitors. II Heat inactivation. *Cereal Chem.*, 48: 523-527.
- Orf JH (2008): Breeding, genetics and production of soybeans. In: *Soybeans. Chemistry processing and utilization*. Ed. Johnson LA, White PJ, Galloway R. Academic Press and AOCS Press. ISBN 978-1-893997-64-6. 850 pages: 33-65.
- Orf JH, Hymowitz T (1979): Genetics of the kunitz trypsin inhibitor: An antinutritional factor in soybeans. *Journal of the American Oil and Chemists' Society*, 56(8): 277-726.
- Palacios MF, Easter RA, Soltwedel KT, Parsons CM, Douglas MW, Hymowitz T and Pettigrew JE (2004): Effects of soybean variety and processing on growth performance of young chicks and pigs. *J. Anim. Sci.*, 82:1108-1114.
- Schmidt MA, Hymowitz T, Herman EM (2015): Breeding and characterization of soybean *Triple Null*; a stack of recessive alleles of Kunitz Trypsin Inhibitor, Soybean Agglutinin, and P34 allergen nulls. *Plant Breeding*, 134, 310-315
- Srebrić, M, Ivanović M, Perić V i Mikić A (2016): Varijabilnost prinosa zrna i njegovih komponenti kod ukrštanja soje u punom srodstvu Zb. nauč. rad. XXX Savetovanja agronoma, veterinara, tehnologa i agroekonomista, 22 (1-2): 105-112.
- Srebrić M, Žilić S, Perić V, Jankulovski Lj, Kovačević D, Mladenović Drinić S (2010): Variability of protein, oil and trypsin inhibitor content of ZP soybean genotypes. 45th Croatian & 5th International Symposium on Agriculture. Book of Proceedings, 15-19 February, Opatia, Croatia. 500-503.
- Stojković S, Deletić N, Biberdžić M, Beković D, Aksić M (2008): Varijabilnost i povezanost komponenti prinosa kod S1 i HS potomstva jedne F₃ poulacije kukuruza. *Selekcija i semenarstvo*, 14 (1-4): 63-68.
- Tinius CN, Burton JW, Carter Jr TE. (1991): Recurrent selection for seed size in soybean: Response to selection in replicate populations. *Crop Sci.*, 31: 1137-1141.
- Trenkovski S, Cmiljanić R, Smiljković T, Marinkov G, Stojanović Lj (2006): Osnovi teorije elektroforeze i mogućnosti primene. *Biotechnology and Animal Husbandry*, 22 (5-6): 33-43.
- Van den Hout R., Pouw M, Gruppen H, Van't Riet K (1998): Inactivation kinetics study of the Kunitz soybean trypsin inhibitor and the Bowman-Birk inhibitor. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 281-285.
- Vratarić M, Sudarić A (2008): Soja *Glycine max*. Monografija. Poljoprivredni institut Osijek.
- Watanabe D, Lošak T, Vollmann J. (2018): From proteomics to ionomics: soybean genetic improvement for better food safety. *Genetika*, 50 (1): 333-350.
- Žilić S, Jovanović M, Božović I, Bekrić V (1998): Effects of the Kunitz trypsin inhibitor on agronomic characteristics of soybean. *Genetika*, 30 (3): 245-255.

IDENTIFICATION OF SOYBEAN KUNITZ-FREE PROGENIES IN FULL-SIB CROSSING

Mirjana Srebrić, Dragan Kovačević, Vesna Perić

Summary

Kunitz trypsin inhibitor (KTI) is part of the anti-nutritional complex present in soybeans. Soybean grain without KTI can be used in the diet of non-ruminants without prior heat treatment. In order to obtain soybean lines with reduced content of anti-nutrients in the grain, in the first place without KTI, we crossed the adapted genotype of standard grain quality (variety Kador) with the genotype without KTI, less adapted to our growing conditions (variety Kunitz). A segregating generation was obtained from which the three most productive F_3 lines, heterozygous for the presence of KTI, were selected for the new crossing cycle. Two combinations of full-sib (FS) crosses with different numbers of successfully crossed plants were realized. Determination of the presence of KTI in progeny developed from selected lines originating from Kunitz x Kador crosses and their combinations of FS crosses was performed using protein markers on a native polyacrylamide gel. Based on the electrophoregram, it was noticed that the bands corresponding to the KTI position are not of the same intensity. The analysis was done from a group sample, so it is possible that the sample contains grains with and without KTI. Ten progenies of maternal lines and five progenies of FS crosses without a band corresponding to the KTI position were identified on the electrophoregram. A total of four progenies with grain yield per plant at the level and better than the more productive parent can be considered promising for the further selection process.

Key words: soybean, full-sib, Kunitz trypsin inhibitor, protein markers

Primljen: 13.11.2020.

Prihvaćen: 30.11.2020.