

GENETIČKA SRODNOST GENOTIPOVA SOJE NA OSNOVU PROTEINA SEMENA

NIKOLIĆ ANA, SREBRIĆ MIRJANA, DRINIĆ MLADENOVIĆ SNEŽANA¹

IZVOD: *Proteini semena 20 odabranih genotipova soje analizirana su u cilju genetičke karakterizacije i determinacije genetičke divergentosti. Genetička srodnost između ispitivanih genotipova utvrđena je primenom koeficijenta sličnosti po Dice-u i Roger-u i Tanimoto-u. Na osnovu analize proteinskog kompleksa najmanja genetička sličnost dobijena je između genotipova Nena i Progres, a najveća između genotipova P9272 i Kunitz primenom oba koeficijenta sličnosti.*

Da bi se utvrdilo na koji način se ispitivani genotipovi grupišu na osnovu dobijenih koeficijenata sličnosti korišćene su dve tehnike-klaster i PC analiza. Oba koeficijenta sličnosti dala su klastere slične strukture i ispitivani genotipovi su se grupisali u dva veća klastera (I i II). Klaster I sadrži genotipove selekcionisane u Institutu za kukuruz "Zemun Polje", Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu i jedan genotip poreklom iz Francuske koji je jedan od roditelja domaće sorte, pa je to možda razlog zbog koga se ovi genotipovi grupišu zajedno. Klaster II sadrži genotipove poreklom iz Severne Amerike, Francuske, Italije i Kanade.

Za genotipove koje smo ispitivali u radu nemamo kompletne podatke o poreklu tako da nije moguće utvrditi da li klasifikacija na osnovu markera odgovara i klasifikaciji na osnovu porekla.

Ključne reči: *genetička srodnost, soja, klaster, proteinski markeri*

UVOD: U oplemenjivanju biljaka, informacije o genetičkoj varijabilnosti selekcionog materijala pomažu pri izboru roditeljskih komponenti, planiranju ukrštanja, razvoju linija, svrstavanju genotipova u odgovarajuće grupe, selekciji genotipova sa specifičnim svojstvima, zaštiti sorata, izboru mapirajućih populacija, itd. Genetička srodnost soje utvrđivana je na osnovu morfoloških, agronomskih svojstava, na osnovu podataka o poreklu kao i na osnovu podataka dobijenih primenom molekularnih markera (Nelson et al., 1987, 1988; Juvik et al., 1989; Perry and McIntosh, 1991; Sneller, 1994; Bernard et al., 1998, Nikolić et al., 2004).

Biohemijske markere predstavljaju strukturni proteini, rezervni proteini semena i izozimi. Na osnovu proteinskih kompleksa kao specifičnih produkata gena koji se ekspimiraju u različitim tkivima ili u

različitim fazama razvika može se utvrditi genetička specifičnost ispitivanog materijala pa se oni mogu koristiti kao markeri (Wang et al., 1994). Najveći deo ukupnih proteina semena soje čine globulini (90%). Predstavljaju složen proteinski kompleks sastavljen od dva rezervna proteina β -konglicinina i glicinina, i više-manje zastupljenih proteina kao što su γ -konglicinin, bazni 7S globulin i biološki aktivni proteini: tripsin inhibitori, lipoksigenaze i lektini.

Brojna ispitivanja proteinskog kompleksa semena izvršena su kod različitih biljnih vrsta (Aliaga-Morel et al., 1987; Darmerval et al., 1987; Wang et al., 1994; Mladenović et al., 1997; Montalvan et al., 1998). Korišćenjem ove metode uspešno su uspostavljene filogenetske veze između najvažnijih useva kao što su pirinač, pšenica, soja, pamuk, ječam itd. (Ladizinsky and Hymowitz, 1979).

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

¹Mr ANA NIKOLIĆ, istraživač saradnik; mr MIRJANA SREBRIĆ, istraživač saradnik; dr SNEŽANA MLADENOVIĆ DRINIĆ, naučni savetnik; Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd

Na osnovu istorijskih, biogeografskih i agronomskih podataka kao i na osnovu proteina semena, Hymowitz i Kaizuma, (1981) pretpostavili su da je soja prenesena iz Kine u Japan i Južnu Koreju. Na osnovu polipeptidnog sastava rastvorljivih proteina semena soje Pešić et al., (2003) su utvrdili značajne genetičke razlike u strukturi proteina a Nikolić et al., (2004) su na osnovu polimorfizma proteina semena soje grupisali deset genotipova soje u odgovarajuće grupe u saglasnosti sa poreklom.

Materijal i metode

Za ispitivanje genetičke varijabilnosti odabrano je 20 genotipova soje iz kolekcije Instituta za kukuruz "Zemun Polje" za koje se pokazalo da poseduju dobre agronomске osobine, visok prinost, otpornost na poleganje i sušu, a rasipanje semena je malo. Genotipovi Bosa, ZPS 015, Nena, L91 4042, L94 128, SG1 selekcionisani su u Institutu za kukuruz; Bačka, Afrodit, Balkan, Vojvođanka selekcionisani su u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad; Kador, Semu 20, Progres poreklom su iz Francuske; Shine iz Italije; Maple presto i PRW 80 iz Kanade; Elf, A 3963, P9272, Kunitz iz SAD.

Proteini semena izolovani su po metodi Wang-a i sar. (1994) koja je modifikovana, a zatim su proteinske frakcije razdvojene elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (Fling i Gregerson, 1986).

Koeficijent genetičke sličnosti između parova genotipova je izračunat po Dice-u, (1945) i Roger-u i Tanimoto-u (1960) koristeći program SIMQUAL. Klaster analiza, PCA i testovi značajnosti vršeni su u NTSYS-pc softveru (Rohlf, 2000).

Rezultati i diskusija

Analiza proteina semena dvadeset genotipova različitog porekla potvrdila je nizak nivo polimorfizma soje. Svi ispitivani genotipovi imaju specifičnu proteinsku sliku koja se odlikuje jedinstvenim rasporedom proteinskih frakcija osim genotipova P 9272 i Kunitz koji imaju uniformnu proteinsku sliku (slika 1). Ukupan broj proteinskih frakcija na gelu bio je 26, od kojih je 15 bilo polimorfno (57.7%). Svi ispitivani genotipovi imali su većinu proteinskih frakcija. Na gelu su pored kvalitativnih razlika uočene i razlike u

kvantitetu - intenzitetu pojedinih taka, ali one nisu razmatrane u daljoj analizi.

Sl. 1. Elektroforegram proteinskih markera semena ispitivanih genotipova soje



Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Pešić i sar., (2003), koji su na osnovu analize proteina semena tri genotipa soje: ZPS 015, Nena i L91-4042 utvrdili da sorte soje ispoljavaju značajne genotipske razlike u strukturi proteinskog kompleksa i da heterogenost proteinskog sastava utiče na tehnološko funkcionalna svojstva sojinih proteina. Sathe et al. (1987) ispitivali su polimorfizam proteina 31 genotipa soje poliakrilamidnom elektroforezom. Ovaj sistem je omogućio diferencijaciju genetički veoma sličnih parova genotipova (Century i Century 84 kao i Wells II i Miami).

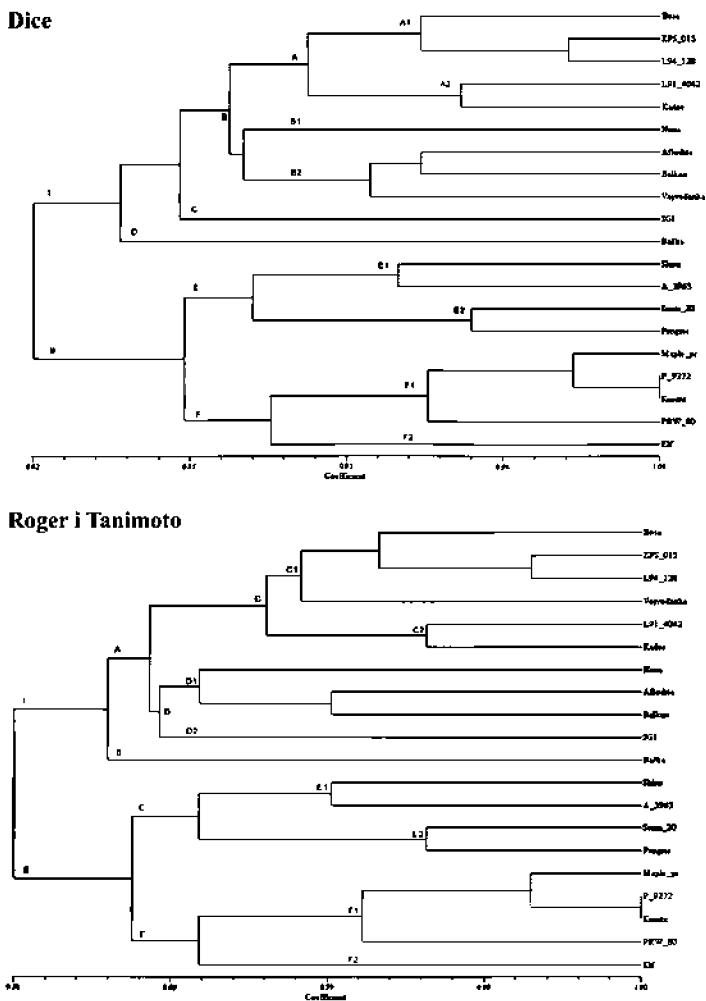
Prisustvo/odsustvo svake od ukupno 26 proteinskih frakcija transformisano je u binarne podatke (1, 0) na osnovu kojih su izračunati koeficijenti sličnosti po *Dice-u* i *Roger-u* i *Tanimoto-u* za sve parove ispitivanih genotipova. Vrednosti koeficijenta sličnosti nisu prikazane u ovom radu. Dobijeni koeficijenti sličnosti bili su u opsegu od 0.72 do 1.0 (Dice) i od 0.41 do 1.0 (Roger i Tanimoto). Za oba koeficijenta najmanja genetička sličnost je izračunata između genotipova Nena i Progres, a najveća između genotipova P9272 i Kunitz. Za izračunavanje genetičke srodnosti korišćena su dva koeficijenta da bi se ispitalo da li će se dobiti različito grupisanje genotipova, i da bi se utvrdilo koji je tip koeficijenta najpogodniji za obradu podataka. Koeficijent po *Roger-u* i *Tanimoto-u* razlikuje se od koeficijenta po *Dice-u* po tome što uzima u obzir i odsustvo frakcija kod oba genotipa. Značajan aspekt na koji treba obratiti pažnju pri izboru koeficijenta je da li koeficijent razmatra odsustvo frakcija kod genotipova koji se porede. U nekim slučajevima odsustvo neke frakcije kod dva ispitivana uzorka biće indikator sličnosti, u drugim slučajevima ne

mora biti tako, odsustvo neke frakcije ne mora obavezno da ukazuje na genetičku sličnost između njih.

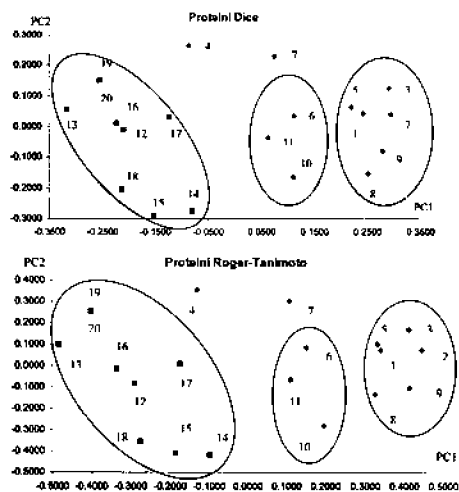
Dendrogrami dobijeni primenom oba koeficijenta imali su sličnu strukturu (grafikon 1). Svaki dendrogram sastoji se iz dva velika, jasno odvojena klastera (I i II). U okviru prvog klastera svrstali su se genotipovi selekcionisani u Institutu za kukuruz "Zemun Polje", Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu kao i genotip Kador, koji je poreklom iz Francuske. Genotip Kador je jedan od roditelja domaće sorte L91 4042, pa je to mogući razlog zašto se ovi genotipovi svrstavaju zajedno. Jedina razlika u grupisanju

genotipova primenom Dice i Roger i Tanimoto koeficijenta sličnosti je ta da je u okviru klastera I prema Dice-u genotip Vojvođanka pridodat subklasteru genotipova Afrodite i Balkan a prema Roger-u i Tanimoto genotip Vojvođanka formira subklaster sa genotipovima Bosa, ZPS 015 i L94 128. Drugi klaster obuhvata dva subklastera. Jedan subklaster sadrži genotipove poreklom iz Evrope (Italija i Francuska), sa izuzetkom genotipa A 3963 poreklom iz SAD. Drugi subklaster sadrži genotipove poreklom iz Severne Amerike (SAD i Kanada). Grupisanje genotipova je u saglasnosti sa njihovim geografskim poreklom.

Graf. 1. Klaster analiza genetičkih sličnosti po Dice-u i Roger-u i Tanimoto-u



Graf. 2. PC analiza genetičkih sličnosti po Dice-u i Roger-u i Tanimoto-u



Genotipovi: 1. Bosa, 2. ZPS 015, 3. Nena, 4. L91 4042, 5. L94 128, 6. SG1, 7. Kador, 8. Bačka, 9. Afrodita, 10. Balkan, 11. Vojvodanka, 12. Shine, 13. Maple presto, 14. Semu 20, 15. Progres, 16. PRW 80, 17. Elf, 18. A 3963, 19. P9272, 20. Kunitz.

PC analiza je pokazala sličan raspored ispitivanih genotipova kao i klaster analiza (grafikon 2). Genotipovi su se grupisali u tri grupe, sa izuzetkom genotipova L91 4042 i Kador koji ne pripadaju nijednoj grupi. Najkompaktnija grupa (III) je ona koja obuhvata genotipove Bosa, ZPS 015, Nena, L94128, Bačka i Afrodita, i razlike između genotipova unutar nje su bile najmanje.

Grupa koja obuhvata najveći broj genotipova je najmanje kompaktna zbog razuđenosti tačaka po PC2 osi, i ona sadrži genotipove koji su se na osnovu klaster analize svrstali u isti klaster, označen kao klaster II.

Prema rezultatima PC analize genotipovi P9272 i Kunitz nisu se mogli razdvojiti, kao što pokazuje i klaster analiza. Najveća stabilnost uočena je za genotip Elf, jer se nalazi najbliže preseku nultih koordinata.

Zaključak

Analiza proteina semena dvadeset genotipova različitog porekla potvrdila je nizak nivo polimorfizma soje. Proteini semena mogu se koristiti za karakterizaciju genotipova soje, s obzirom da su dobijeni specifični proteinski profili karakteristični za genotip. Najmanja genetička sličnost je dobijena između genotipova Nena i Progres. Grupisanje genotipova na osnovu proteina semena je u saglasnosti sa njihovim geografskim poreklom. Za genotipove koje smo ispitivali u radu nemamo kompletne podatke o poreklu tako da nije moguće utvrditi da li klasifikacija na osnovu markera odgovara i klasifikaciji na osnovu porekla.

Polimorfizam proteina semena soje ima ograničenu primenu u proceni njihove genetičke divergentnosti, zbog malog broja dobijenih markera, njihove relativno niske polimorfnosti i ograničenosti na samo mali deo celokupnog genoma. Mogao bi da se koristi za precizniju procenu genetičke divergentnosti ukoliko se prati i polimorfizam u koncentraciji proteinskih frakcija.

LITERATURA

- ALIAGA-MOREL, J.R., F.A. CULIANEZ-MACIA, G. CLEMENTE MARIN and PRIMO-YUFERA, E. (1987): Differentiation of rice cultivars by electrophoresis of embryo protein. *Theor. Appl. Gen.* 74, 187-193.
- BERNARD, R.L., G.A. JUVIK, and E.E. HARTWIG AND C.J. EDWARDS (1988): Origins and pedigrees of public soybean varieties in the United States and Canada. *USDA Tech. Buill.* 1746.
- DAMERVAL, C., Y. HEBERT and D. VIENNE (1987): Is the polymorphism of protein amounts related to phenotypic variability? A comparison of two-dimensional electrophoresis data with morphological traits in maize. *Theor. Appl. Genet.* 74: 194-202.
- DICE, L. R. (1945): Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297 - 302.
- FLING, S. P. and GREGERSON, D. S. (1986): Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155:83-88.
- HYMOWITZ, T., and KAIZUMA, N. (1981): Soybean protein electrophoresis profiles from 15 Asian countries or regions: Hypothesis on paths of dissemination of the soybean from China. *Econ. Bot.* 35:10-23.
- JUVIK, G.A., R.L. BERNARD, J.H. ORE, J.F. CAVINIS AND, D.J. THOMAS (1989): Evaluation of the USDA Soybean Germplasm Col-

- lection: Maturity groups 000 to IV (PI 446.983 to PI 486.355). USDA Tech. Bull. 1760.
- LADIZINSKY, G. and HYMOWITZ, T. (1979): Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 54:145-151.
- MLADENOVIC DRINIC, S., KONSTANTINOV, K., ĆORIĆ T. and IGNJATOVIĆ, D. (1997): Protein marker polymorphism and heterosis in a diallel set of maize. *Genetika*, Vol. 29, No. 2, 89-95.
- MONTALVAN, R., ANDO, A. and ECHEVERRIGARAY, S. (1998): Use of seed protein polymorphism for discrimination of improvement level and geographic origin of upland rice cultivars. *Genet. Mol. Biol.* vol. 21 n. 4.
- NELSON, R.L., PJ. AMDOR, J.H. ORF, J.W. LAMBERT, J.F. CAVINS, R. KLEIMAN, F.A. LAVIOLLETTE, and K.L. ATHOW (1987): Evaluation of the USDA Soybean Germplasm Collection: Maturity groups 000 to IV (PI 273.483 to PI 427.107). USDA Tech. Bull. 1718.
- NIKOLIĆ, A., DRINIĆ MLADENović, S., SREBRIĆ, MIRJANA (2004): Genetic diversity of soybean genotypes revealed by genetics markers. ESNA, XXXIV annual meeting, pp.274-277, 29.8-2.9.2004 Novi Sad.
- NIKOLIĆ, Z., ZLOKOLIC, M., MILOŠEVIĆ, M., BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. i VUJAKOVIĆ, M. (2004): Identifikacija soje na osnovu izozimskih i RAPD markera. *Plant Breed. and Seed Product.* 1-2:91-96.
- PERRY, M.C. and MCINTOSH, M.S. (1991): Geographical patterns of variation in USDA soybean germplasm collection: I. Morphological traits. *Crop Sci.* 31:1350-1355.
- PEŠIĆ, M., VUCELIĆ-RADOVIĆ, BIJANA i BARAĆ, M. (2003): Karakterizacija polipeptidnog sastava različitih genotipova soje. *Arh. za polj. nauke* Vol. 64 157-165.
- ROGERS, J.S. and TANIMOTO, T.T. (1960): A computer program for clasifaying plants. *Science* 132:1115-1118.
- ROHLF F. J. (2000): NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0 Exeter Software, Setaket, N.Y.
- SATHE, S.K., LILLEY, G.G., MASON, A.C. and WEAVER, C.M. (1987): High resolution sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of soybean (*Glycine max* L.) seed proteins. *Cereal Chemistry* 64:380-384.
- SNELLER, C.H. (1994): Pedigree analysis of elite soybean lines. *Crop Sci.* 34:1515-1522.
- WANG, C., BIAN, K., ZHANG, H., ZHOU, Z. and WANG, J. (1994): Polyacrylamide gel electrophoresis of salt soluble proteins for maize variety identification and genetic purity assessment. *Seed Sci. Tech.* 21 (51).

GENETIC SIMILARITY OF SOYBEAN GENOTYPES REVEALED BY SEED PROTEIN

NIKOLIĆ ANA, SREBRIĆ MIRJANA, DRINIĆ MLADENović SNEŽANA

SUMMARY

More accurate and complete descriptions of genotypes could help determinate future breeding strategies and facilitate introgression of new genotypes in current soybean genetic pool.

The objective of this study was to characterize 20 soybean genotypes from the Maize Research Institute "Zemun Polje" collection, which have good agronomic performances, high yield, lodging and drought resistance, and low shuttering by seed proteins as biochemical markers. Seed proteins were isolated and separated by PAA electrophoresis. On the basis of the presence/absence of protein fractions coefficients of similarity were calculated as Dice and Roger and Tanamoto coefficient between pairs of genotypes. The similarity matrix was submitted for hierarchial cluster analysis of unweighted pair group using arithmetic average (UPGMA) method and necessary computation were performed using NTSYS-pc program.

Protein seed analysis confirmed low level of genetic diversity in soybean. The highest genetic similarity was between genotypes P9272 and Kador. According to obtained results, soybean genotypes were assigned in two larger groups and coefficients of similarity showed similar results. Because of the lack of pedigree data for analysed genotypes, correspondence with marker data could not be determined. In plant with a narrow genetic base in their gene pool, such as soybean, protein markers may not be sufficient for characterization and study of genetic diversity.

Key words: soybean, genetic variability, cluster, protein markers