

DETERMINACIJA KTI U GENOTIPOVIMA SOJE

Dragan Kovačević¹, Snežana Mladenović Drinić^{1*},
Vesan Perić¹, Mirjana Srebrić¹

Izvod

Kunitz tripsin inhibitor je glavni antinutritivni faktor u zrnu soje koji smanjuje njenu nutritivnu vrednost. Programi oplemenjivanja koji imaju za cilj stvaranje sorti soje bez ovog proteina su od velikog značaja jer omogućavaju direktnu upotrebu tih sorti za ishranu domaćih životinja. Primenom specifičnih molekularnih markera moguće je identifikovati genotipove koji nemaju Kunitz tripsin inhibitor. Devedest šest genotipova soje iz kolekcije Instituta za kukuruz su analizirani sa dva markera Satt228 i Satt409. Od analiziranih genotipova 89 genotipova su sa oba markera imali karakteristične allele za genotipove sa KTi, tri genotipa Kunitz, Laura i Lana su pokazali prisustvo karakterističnih traka, sa Satt228 alela2 a sa Satt409 trake veličine oko 170kDa, za genotipove sa *titi* recesivnim alelom. Četiri genotipa koji su sa markerom Satt228 pokazali prisustvo oba alela su sa Satt 409 imali samo karakterističan alel za *TiTi* genotip. Dobijeni rezultati su potvrdili da se oba markera mogu koristiti za identifikaciju i selekcionisanje genotipova bez Kunitz tripsin inhibitora.

Cljučne reči: molekularni markeri, Kunitz tripsin inhibitor, soja,

Uvod

Sirovo zrno soja ne može da se koristi za ishranu monogastičnih životinja zbog prisustva antinutritivnih faktora koji smanjuju njenu nutritivnu vrednost. Glavne antinutritivne materije su inhibitori proteinaza, Kunitz tripsin inhibitor, Bowman-Birk tripsin inhibitor i lecitin (Kunitz 1945; Birk 1961, Armour i sar., 1998). Antinutritivni faktori obično se inaktiviraju tokom termičke obrade, ali ih ovaj tretman ne eliminiše u potpunosti, tako

da se njihova rezidualna aktivnost može naći u nekim produktima i dodatno mogu uticati na smanjenje iskoristivosti proteina i gubitka nekih esencijalnih aminokiselina. Alternativa korišćenju termičke obrade za inaktivaciju antinutritivnih faktora je genetička eliminacija.

Kunitz tripsin inhibitor (KTI) je monomer proteina veličine 21.5 kDa koji sadrži 181 ostataka amino kiselina. Disulfidna veza između Cys 39-Cys 86 i Cys 138-Cys 145, je bitna za njegovu tripsin inhibitorsku

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

¹Kovačević D., Mladenović Drinić S., Perić V., Srebrić M., Institut za kukuruz Zemun Polje, S. Bajića 1, 1185 Beograd,
* e-mail: msnezana@mrizp.rs

aktivnost (Roychaudhuri i sar., 2003). Multipni aleli *Tia*, *Tib*, *Tic*, *Tid* koji se nalaze na *Ti* lokusu kontorlišu pet elektroforetskih formi Kunitz tripsin inhibitora. Peta forma ne pokazuje traku karakterističnu za Kunitz tripsin inhibitor i nasleđuje se kao recesivni alel *ti*. Ispitivanja sekvenci aminokiselina i nukleotida polimorfni varijanti KTI su pokazala da postoji razlika u sekvenci od devet aminokiselinskih ostataka između *Tia* i *Tib* i da svaki *Tic*, *Tid* i *Tie* se razlikuju u jednoj aminokiselini od *Tia* tipa (Wang i sar., 2004). *Ti* lokus se nalazi na grupi 9 na klasičnim mapama vezanosti soje (Kiang, 1987) koje su integrisane u molekularnu mapu vezanosti A2 (hromozom 8) USDA/Iowa State University molekularne mape soje (Cregan i sar., 1999).

Elektroforeza metoda za identifikaciju nultog alela je destruktivna, kao biološki material se koristi zrno tako da ne može da se koristi za detekciju u ranim fazama selekcionog procesa u cilju stvaranja sorti soje bez Kunitz tripsin inhibitora. Molekularni markeri, blisko povezani sa genima od interesa, su pogodni za detekciju genotipova koji imaju/nemaju željeno svojstvo (Tanksley i sar., 1989). Kim i sar. (2006) su identifikovali DNK markere blisko povezane sa *Ti* lokusom koji kontroliše prisustvo i odsustvo Kunitz tripsin inhibitora. Utvrdili su da se markeri nalaze na različitoj udaljenosti od *Ti* lokusa u dve ispitane mapirajuće populacije. Marker Satt 228 se nalazio na udaljenosti od 0.00 odnosno 3.7cM od *Ti* lokusa u populacijama Jinpukong2 x C242 i Klark x C242, a marker Satt 409 na udaljenosti od 4.5cM u populaciji Jinpukong2 x C242, dok u drugoj populaciji nije utvrđena povezanost. U mapirajućoj populaciji, dobijenoj iz ukrštanja LS61 i PI542044 (donor nultog alela), Satt 409 je bio na udaljenosti od 4.7cM od *Ti* lokusa (Rani i sar., 2011). Ovo variranje genetičke udaljenosti markera od *Ti*

lokusa se pripisuje strukturnim rearanžmanima u genomu različitih mapirajućih populacija.

Cilj ovog rada je da se ispita da li se markeri Satt228 i Satt409 mogu da koriste za identifikaciju genotipova koji su nosioci recesivnog alela u cilju selekcije sorti soje bez Kunitz tripsin inhibitora.

Materijal i metod

Devedeset šest genotipova soje različitog porekla iz kolekcije Instituta za kukuruz, od kojih 93 imaju KTI, a tri genotipa Kunitz, Laura i Lana su bez KTI, je izabrano za ova ispitivanja. Pet zrna od svakog genotipa je usitnjeno pomoću tučka i avana u tečnom azotu. DNK je izolovana prema proceduri Kamiya i Kiguchi (2003): 20-30 mg biljnog materijala je inkubirano 20 min na 55°C u 0.2 ml digestionog pufera (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.5% Igepal CA-630, 0.5% Tween-20) koji sadrži 16 µg proteinaze K. DNK prečišćena sa fenolom i koncentrovana sa etil alkoholom, a zatim je rastvorena u TE puferu (pH 8.0) i kvantifikovana spektrofotometrijski.

Sekvence markera su (Kim i sar. 2006):

Satt228

F-TCATAACGTAAGAGATGGTAAACT

R-CATTATAAGAAAACGTGCTAAAGAG

Satt 409

F-CCTTAGACCATGAATGTCTCGAAGAA

R-CTTAAGGACACGTGGAAGATGACTAC.

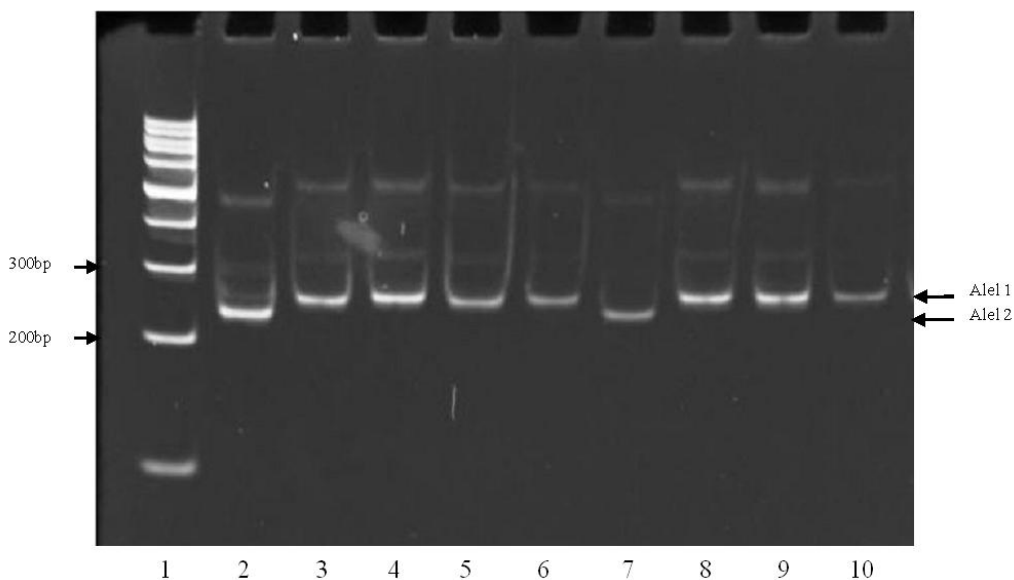
PCR reakcija je izvedena u MJ Research Thermocycler model PTC100 u 25 µl reakcione smeše koja sadrži: 30 ng genomske DNK, 1.0 jedinicu *Taq* DNK polimeraze (Thermo Scientific), 1X PCR pufera, 2.5 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs i 0.5µM svakog para prajmera. Inicijalno, DNK je denaturisana na 95°C tokom 2 min, zatim 25 ciklusa koji obuhvata denaturaciju na 95°C tokom 30sec, vezivanje prajmera na 56°C tokom 1 min, izduživanje prajmera (elongacija) na 72°C

tokom 1 min, na kraju elongacija na 72°C tokom 10 min. Produkti amplifikacije su razdvojeni elektroforezom na 2.5% agaroznom gelu i obojeni EtBr. Kao markeri su korišćeni GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) i O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

Rezultati i diskusija

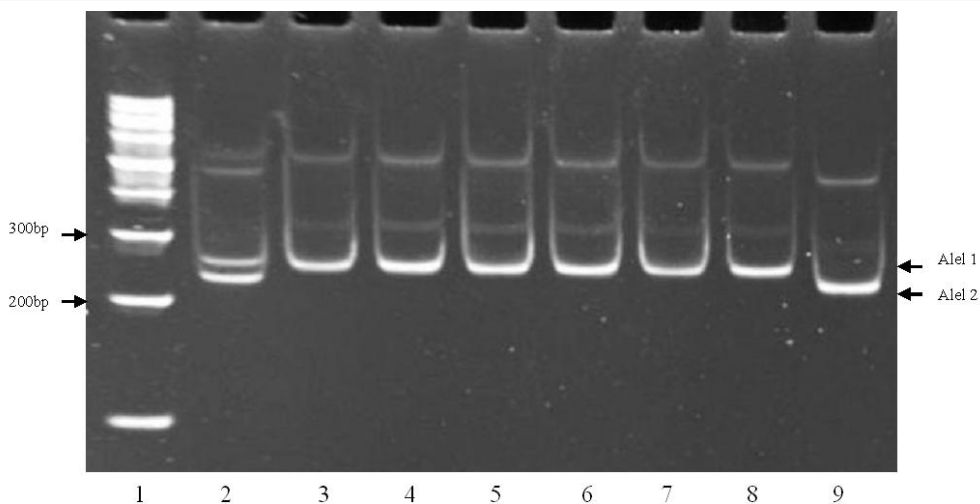
Kod soje utvrđeno je da se specifični SSR markeri, Satt228 i Satt409 nalaze na različitim genetičkim distancama od *Ti* lokusa u različitim mapirajućim populacijama (Kim i sar., 2006; Rani i sar. 2011). DNK marker, Satt 228, blisko vezan za *Ti* lokus, dizajniran da amplifikuje deo recesivnog alela *ti*, je korišćen za analizu 96 genotipova soje iz kolekcije Instituta za kukuruz. Amplifikacioni produkti

za deo analiziranih genotipova su prikazani na slikama 1 i 2. *TiTi* genotipovi imaju alel 1, dok *titi* genotipovi imaju alel 2, što je u saglasnosti sa rezultatima Kim i sar., 2006, Drinic i sar., 2011, Kovačević i sar., 2012. Od 96 genotipova 89 ima alel 1. Tri sorte Kunitz, kao i dve sorte Laura i Lana selekcionisane u Institutu za kukuruz, bez KTI imaju alel 2. Četiri genotipa sa KTI imaju alel 1 ali i traku na poziciji alela 2. Ovi genotipovi su provereni elektroforezom na PAGE i svi imaju 21,5 kD proteinsku traku (Slika 3). Prethodna istraživanja različitih genotipova soje su pokazala da *TiTi* genotipovi imaju 21.5 kDa protein koji odgovara Kunitz tripsin inhibitoru, dok *titi* genotipovi nemaju ovaj protein (Drinic i sar., 2011).



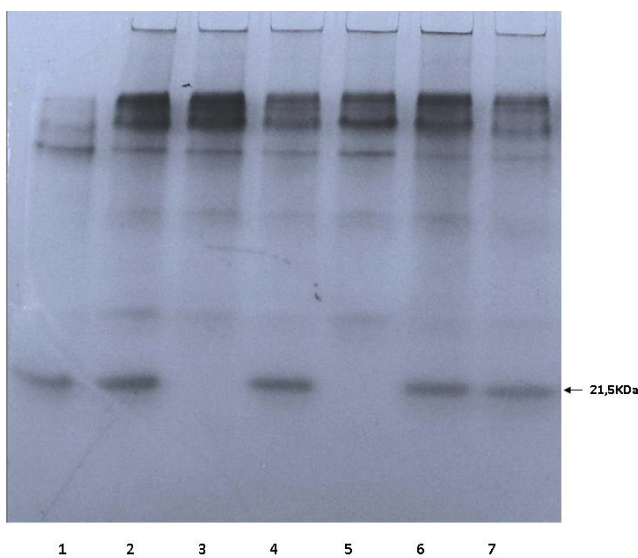
Slika 1. Amplifikacija sa Satt 228 markerom. 1- Marker GeneRuler 100bp, 2- Kunitz (*titi*), 3,4,5,6 - *TiTi* genotipovi, 7 - Laura (*titi*), 8,9,10 - *TiTi* genotipovi

Figure 1. Amplification with Satt228 marker. 1- Marker GeneRuler 100bp, 2 - Kunitz (*titi*), 3,4,5,6 - *TiTi* genotypes, 7 - Laura (*titi*), 8,9,10 - *TiTi* genotypes



Slika 2. Amplifikacija sa Satt 228 markerom. 1- Marker GeneRuler 100bp, 2 – TiTi genotip sa alelom 1 i alelom 2, 3,4,5,6,7,8- TiTi genotip sa alelom 1, 9 - Lana titi

Figure 2. Amplification with Satt228 marker. 1- Marker GeneRuler 100bp, 2- TiTi genotype with both alleles 1 and 2, 3,4,5,6,7,8 – TiTi genotype with allele 1, 9- Lana with allele 2

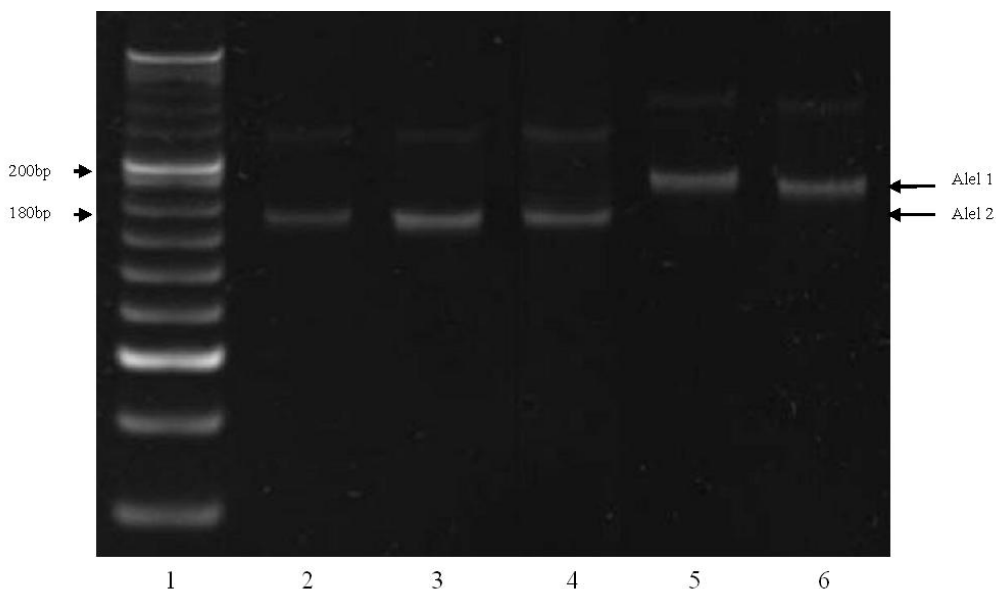


Slika 3. Proteinski profil genotipova TiTi koji su sa Satt 228 markerom bili heterozigoti. 1- Marker, 2 – TiTi genotip, 3- Lana, 4- TiTi genotip, 5-Kunitz, 6- iTi genotip, 7- iTi genotip

Figure 3. Protein profile of TiTi genotypes heterozygote with Satt228. 1- Marker, 2-TiTi genotype, 3-Lana, 4-TiTi genotype, 5-Kunitz, 6-TiTi genotype, 7-TiTi genotype

Amplifikacija sa Satt409 mapirajuće populacije LS61 i PI542044 (donor nultog alela) je pokazala prisustvo dva amplifikaciona produkta jedan veličine oko 190 bp koji odgovara genotipovima sa KTI (*TiTi*) i drugi veličine oko 170bp koji odgovara genotipovima bez Kunitz tripsin inhibitora (*titi*), (Kumar i sar., 2013). Analiza sa markerom Satt409 devedeset šest genotipova soje iz kolekcije

Instituta za kukuruz je pokazala da je 93 genotipova imalo alel 1 (veličine oko 190kD) koji odgovara genotipu *TiTi*, dok su tri sorte Kunitz, Laura i Lana imale alel 2 (veličine oko 170kD) koji odgovara *titi* genotipu bez Kunitz tripsin inhibitora, slika 4. Četiri genotipa koja su sa Satt228 markerom pokazala prisustvo oba alela sa Satt409 su imala samo alel 1 specifičan za genotipove sa Kunitz tripsin inhibitorom.



Slika 4. Amplifikacija sa Satt 409 markerom. 1- Marker O'RangeRuler 20bp, 2- Kunitz, 3-Laura, 4-Lana, 5-*TiTi* genotip, 6-*TiTi* genotip

Figure 4. Amplification with Satt409 marker. 1- Marker O'RangeRuler 20bp, 2-Kunitz, 3-Laura, 4-Lana, 5- *TiTi* genotype, 6-*TiTi* genotype

Zaključak

Svi *titi* genotipovi, koji nisu imali 21.5 kDa proteinsku traku, imali su alel 2 sa Satt228 i alel veličine oko 170 kDa sa Satt 409. Četiri genotipa koji su sa markerom Satt228 pokazali prisustvo oba alela su analizom proteina pokazali odsustvo KTI proteina i sa Satt 409 su dali samo karakterističan alel za *TiTi* genotip.

Dobijeni rezultati su potvrdili da se oba markera, Satt228 i Satt409, mogu koristiti za identifikaciju i selekcionisanje genotipova bez Kunitz tripsin inhibitora ali se na ovom setu genotipova Satt409 pokazao kao bolji marker.

Zahvalnica

Rezultati prikazani u ovom radu su deo istraživanja u okviru projekta TR31068

Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

- Armour JC, Perera RLC, Buchan W, Grant G (1989): Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. *Journal of Science Food and Agriculture* 78: 225–231.
- Birk Y (1961): Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and chymotrypsin from soybeans. *Biochem Biophys Acta* 54: 378-381.
- Cregan PB, Jarvik T, Bush AL, Shoemaker RC, Lark KG, Kahler AL, Kaya N, VanToai TT, Lohnes DG, Chung J & Specht E (1999): An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39:1464-1490.
- Drinić Mladenović S, Kovačević D, Srebrić M, Perić V, Zilić S (2011): Biochemical and molecular determination of KTI in F2 soybean population. *Proceedings 46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture. Opatija, Croatia, 443-446.*
- Kamiya KM and Kiguchi T (2003): Rapid DNA extraction from soybean seeds. *Breeding Science* 53 (3): 277-279.
- Kiang YT (1987): Mapping three protein loci on a soybean chromosome. *Crop Sci.* 27: 44-46.
- Kim MS, Park MJ, Jeong WH, Nam KC, Chung JI (2006): SSR marker tightly linked to the Ti locus in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Euphytica* 152: 361-366.
- Kovačević D, Srebrić M, Perić V, Mladenović Drinić S (2012): Molecular determination of KTI in F2 soybean population. *International Conference on BioScience: Biotechnology and Biodiversity - Step in the Future. The Fourth Joint UNS - PSU Conference, Novi Sad, Serbia, 18-20 June 2012, 141-144.*
- Kumar V, Rani A, Rawal R (2013): Deployment of gene specific marker in development of kunitz trypsin inhibitor free soybean genotypes. *Indian Journal of Experimental Biology* 51:1125-1129.
- Kunitz M (1945): Crystallization of a soybean trypsin inhibitor from soybean. *Science* 101: 668- 669.
- Rani A, Kumar V, Mourya V, Singh R, Husar SM (2011): Validation of SSR markers linked to null kunitz trypsin inhibitor allele in India soybean. *J Biochem Biotech* 20(2): 258.
- Roychaudhuri R, Sarath G, Zeece M & Markwell J (2003): Reversible denaturation of soybean Kunitz trypsin inhibitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 412. 20–26.
- Song SI, Kim, CH, Baek SJ, Choi YD (1993): Nucleotide sequences of cDNAs encoding the precursors for soybean (*Glycine max*) trypsin inhibitors (Kunitz type). *Plant Physiol.* 101:1401–1402.
- Tanksley SD (1989): RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnology* 7: 257-264.
- Wang KJ, Yamashita T, Watanabe M, Takahata Y (2004): A Tib-derived variant of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (*Glycine soja*). *Genome* 4: 9–14.

DETERMINATION OF KTI IN SOYBEAN GENOTYPES

Dragan Kovačević, Snežana Mladenović Drinić, Veslan Perić, Mirjana Srebrić

Summary

Kunitz trypsin inhibitor is major antinutritive factor in soybean seed that decrease its nutritional value. Breeding programs aimed to select soybean variety without Kunitz trypsin inhibitor are of great importance as that varieties can be used directly for monogastric animal feeding. By specific markers analysis is possible to detect genotypes without KTI. Ninety sixth soybean genotypes from Soybean collection of Maize Research Institute are analyzed by two markers Satt228 and Satt409. 89 genotypes with both markers had characteristic alleles for genotypes with KTI, and three genotypes Kunitz, Laura and Lana have characteristics bands, with Satt228 alel 2 as with Satt409 band about 170kDa, for genotypes with *titi* recesive allele. Four genotypes which had both alleles with marker Satt228 with Satt 409 had only allele characteristic for *TiTi* genotype. Obtained results confirmed that both markers could be used for identification and selection genotypes without Kunitz trypsin inhibitor.

Key words: soybean, Kunitz trypsin inhibitor, molecular marker

Primljen: 27.02.2015.

Prihvaćen: 11.07.2015.