

# Varijabilnost obojenja sjemena ljuske soje s obzirom na peroksidaznu aktivnost

---

**Kosić, Nikolina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:*

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:434334>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-02**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical  
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of  
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Nikolina Kosić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

**Varijabilnost obojenja sjemene ljuske soje s obzirom na  
peroksidaznu aktivnost**

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Nikolina Kosić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

**Varijabilnost obojenja sjemene ljuske soje s obzirom na  
peroksidaznu aktivnost**

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
2. prof.dr.sc. Sonja Vila, član
3. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić, član

Osijek, 2020.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek  
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Bilinogojstvo  
Nikolina Kosić

Završni rad

### **Varijabilnost obojenja sjemene ljuske soje s obzirom na peroksidaznu aktivnost**

**Sažetak:** Jedna od vodećih uljnih i bjelančevinastih kultura je soja (*Glycine max* (L.) Merr.). Uzgaja se u cijelome svijetu, a upotrebljava se u ishrani ljudi, životinja. Cilj rada je proračun varijabilnosti obojenja sjemena ljuske određenom aktivnošću peroksidaze koja se nalazi u sjemenom omotaču. Postupak pokusa je najprije priprema biljnog materijala, a zatim potapanje sjemenih ljuski u otopini gvajakola. Uz dodavanje vodikovog peroksida otopina pokazuje pozitivnu (tamno crveno) ili negativnu (bezbojnu) reakciju. U ovom pokusu je testirano 8 sorata i 2 linije. Dobiveni rezultati pokazuju odstupanje kod 2 linije, a stabilnost kod 6 sorata. Nasljeđivanje aktivnosti peroksidaze je određeno ep lokusom, gdje je kod dominantnih genotipova (Ep<sub>-</sub>) izražena aktivnost peroksidaze dok je kod recesivnih genotipova (epep) izostaje aktivnost peroksidaze.

**Ključne riječi:** soja, aktivnost peroksidaze, varijabilnost

23 stranica, 2 tablice, 2 grafikona, 14 slika, 23 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek  
Undergraduate university study Agriculture, course Plant production  
Nikolina Kosić

BSc Thesis

### **Variability of soybean seed coat color with difference in peroxidase activity**

**Summary:** One of the leading oil and protein crops is soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). It is grown all over the world and used in the nutrition of humans and animals. The aim of this paper is to calculate the variability of shell seed coloring with the specific activity of peroxidase found in the seed sheath. The procedure of the experiment consists of the preparation of plant material, and then the sinking of the seed shells in the solution of guaiacol. With the addition of hydrogen peroxide, the solution exhibits a positive (dark red) or negative (colorless) reaction. In this experiment, 8 varieties and 2 lines were tested. The results show a deviation in 2 lines, and stability in 6 varieties. Succession of peroxidase activity is determined by an ep locus, where peroxidase activity is expressed in dominant genotypes (Ep<sub>-</sub>) while in recessive genotypes peroxidase activity is absent (epep).

**Keywords:** soybean, peroxidase activity, variability

23 pages, 2 tables, 2 figures, 14 photos, 23 references

BSc Thesis is archived: in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. MATERIJAL I METODE.....	3
2.1. Biljni materijal .....	3
2.2. Metode rada .....	8
2.2.1. Aktivnost peroksidaze.....	8
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	12
4. ZAKLJUČAK.....	21
5. POPIS LITERATURE .....	22

## 1. UVOD

Soja (*Glycine max* (L.) Merrill) pripada porodici Leguminosae, rodu *Glycine* L. te podrodu *Soja* (Moench). Kulturna soja potječe iz Kine, starosti 4000-5000 godina. S vremenom se stvorio širok broj varijeteta s različitim morfološkim i fiziološkim svojstvima. Koristeći te izvore genetske varijabilnosti oplemenjivači razvijaju razne sorte za različite načine i ciljeve uzgoja (Vratarić i Sudarić, 2008.). Na području Hrvatske soja se prvi put pojavljuje između 1876. i 1878. godine, gdje su povoljni klimatski i zemljišni uvjeti za uzgoj, a usporedo se razvila tehnologija i tehnika uzgoja te znanje poljoprivrednika s ciljem profitabilne proizvodnje. Značajno se povećao obim znanstveno-stručnih ispitivanja s ciljem stvaranja vlastitog oplemenjivačkog programa iz kojeg su stvorene domaće, rodnije i stabilnije sorte (Vratarić i Sudarić, 2000.). Prema FAOSTAT-u proizvodnja soje 2018. godine u svijetu je 124 921 956 ha s prosječnim prinosom od 2791,4 kg/ha, a u Hrvatskoj zasijana je površina 77 087 ha uz prinos od 3 180,7 kg/ha ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

Postupak prijave novih linija Komisiji za priznavanje sorti je proces koji se temelji ispitivanju gospodarske vrijednosti genetskog materijala (Value for Cultivation and Use – VCU) te ispitivanju različitosti, ujednačenosti i stabilnosti (Distinctness, Uniformity and Stability test – DUS). Ispitivanje peroksidazne aktivnosti je jedan od DUS testova koji se provode na soji.

Biljne peroksidaze ima u izobilju te su detaljno proučene. Metabolizam organskih spojeva i zaštita od stresnih uvjeta su neke biljne funkcije koje zahtijevaju prisutnost peroksidaze (bazične i kisele). Istraživanje specifičnih izoenzima peroksidaze temelji se na njihovoj lokalizaciji i molekularnoj biologiji. U biljaka nalaze se većinom u sjemenoj ovojnici tj. u staničnoj stijenci ili mogu biti lokalizirani i u vakuoli kao u duhana (Perrey i sur. 1989.). Uloga i funkcija kiselih peroksidaza u biljkama su vezane za procese lignifikacije i umrežavanja ekstenzivnih monomera i feruloziranih polisaharida (Perrey i sur. 1989.). Peroksidaza sjemenki soje je izvanredne stabilnosti i katalitičkih svojstava, a njena aktivnost ovisi o sorti. Pripada obitelji peroksidaza biljaka III. razreda koje mogu oksidirati široku paletu organskih i anorganskih supstrata pomoću vodikovog peroksida. (Henriksen i sur. 2001.). Aktivnost peroksidaze u zrnu soje je lokalizirana u sjemenom omotaču. Molekularna masa peroksidaze je 37 kDa, a ima svojstva karakteristična za glikoprotein. Enzim se počinje nakupljati otprilike 21 dan nakon sinteze te nastavlja tijekom cijelog sazrijevanja sjemenne ljuske. U suhim sjemenim omotačima ga ima u topljivim

proteinima najmanje 5%. Ovaj izoenzim ima važnu ulogu u otvrdnjavanju sjemene ljuske soje. (Gillikin i Graham, 1991.). Peroksidaza iz soje (SBP) se može također pronaći u korijenu i listu soje. Smatra se da soja ima 15 – 20 izoenzimskih formi peroksidaze, a u ljusci zrna soje se nalazi samo jedna izoenzimaska forma. Ovaj enzim pokazuje izrazitu termostabilnost i mogućnost polimerizacije različitih aromatskih spojeva u organskom i vodenom okruženju. Zbog toga se upotrebljava u razvoju zelenih tehnologija u primjeni za pročišćavanje zagađene otpadne vode. (Prokopijević, 2017.).

Enzim unutar sjemene ljuske predstavlja dominantni peroksidazni izoenzim koji se akumulira tijekom sazrijevanja tkiva. Aktivnost peroksidaze ostaje nakon berbe najmanje tri godine u sjemenu, što ukazuje na stabilnost ovoga spoja. Istraživanje aktivnosti peroksidaze prema gvajakolu kvantitativno je određena brzinom pretvorbe gvajakola u tetragvajakol. (Gillikin i Graham, 1991.). Kroz istraživanje o aktivnosti peroksidaze Mark Gijzen (1997.) objašnjava utjecaj Ep lokusa na količinu peroksidaze. Biljke koje sadrže dominantne Ep alele nakupljaju velike količine peroksidaze u stanicama, dok recesivni epep genotipovi ne nakupljaju peroksidazu. Peroksidaza se nalazi u stanicama u obliku pješčanog sata, te su one za razliku od dominantnih kod recesivnih genotipova smanjene. Genetska analiza iz sjemene ljuske pokazuje slijed aminokiselina. Analizom lančane reakcije polimerazom otkriveni su polimorfizmi koji su razlikovali genotipove Ep\_ i epep. Ep lokus kodira protein peroksidaze u sjemenskom omotaču. Kod recesivnog gena ep nedostaje sekvenca koja obuhvaća prijevod u start kodon. Rezultati koji ukazuju na manjak nakupljanja peroksidaze u sjemenskim omotačima homozigotne recesivne biljke nastaju zbog mutacije strukturnog gena koji smanjuje obilje transkripata.

Cilj rada je najprije opisati postupak utvrđivanja aktivnosti peroksidaze, a zatim ocjenjivanje obojenosti sjemene ljuske. Na temelju toga je utvrđena varijabilnost između sorata soje.

## **2. MATERIJAL I METODE**

### **2.1. Biljni materijal**

Soja je vodeća uljna (18-24%) i bjelančevinasta (35-50%) kultura, a zrno soje se koristi za ishranu ljudi i stoke te kao sirovina u raznim industrijama. Glavne hranidbene vrijednosti pokraj ulja i bjelančevina su ugljikohidrati (34%), minerali (5%) i vitamini. (Vratarić i Sudarić, 2007.). Sjeme ili zrno soje različitog je oblika, veličine i boje, što ovisi o načinu uzgoja i sorti. Boja sjemene ljuske može biti žuta, zelena, smeđa, crna ili kombinacija navedenih boja. Masa tisuću zrna soje varira između 20 i 500 grama. Prema obliku razlikujemo okruglo do spljošteno zrno. Sastavljeno je od embrija (dva kotiledona, epikotil, hipokotil i korjenčić) koji je obavijen sjemenom opnom. Kotiledoni čine najveći dio ukupne mase i volumena zrna, a prekriveni su epidermom. Sjemeni ljuska završava hilumom (sjemenskim pupkom) na kojem se nalazi mali žlijeb (halaza) i mikropila. Kroz te otvore će izbiti klicin korjenčić, a za vrijeme mirovanja služe za disanje sjemena (Vratarić i Sudarić, 2000.).

U protokolu Međunarodne unije za zaštitu novih sorti biljaka (UPOV) postoje smjernice za provođenje DUS testa među kojima je i ispitivanje aktivnosti peroksidaze sjemena soje. Sjeme osam sorata soje dobiveno je preko Hrvatske agencija za poljoprivredu i hranu - Centra za sjemenarstvo i rasadničarstvo u Osijeku. Materijal je isporučen u obliku sjemena koje je prethodno zadovoljilo minimalne zahtjeve za klijanje, analitičku čistoću i sadržaj vlage. Sjeme je bilo vidno zdravo bez utjecaja bolesti ili štetnika. U istraživanju je korišteno ukupno 10 genotipova od kojih je bilo osam sorata (od kojih su dvije standardne sorte korištene kao pozitivna i negativna kontrola) te dvije linije. Prema protokolu je odvojeno 80 zrna od svake sorte, od kojih je uzet nasumičan uzorak od 20 zrna (slika 5.), dok je za standardne sorte izdvojeno po 10 zrna u jednom eksperimentu. Zbog lakšeg rasporeda, očitavanja i obrade rezultata, svakoj sorti je pridružen redni broj kako je navedeno u tablici 1.



Tablica 1. Sorte soje koje su korištene u ispitivanju

Redni broj	Ime sorte	Podrijetlo
1.	DH 5170	Mađarska
2.	ES Pallador	Francuska
3.	Bahia	Italija
4.	Satyna	Francuska
5.	Linija SK3070	Italija
6.	Linija KA5050	Francuska
7.	Krajina	nedostupno
8.	Ascasubi	Italija
9.	Standardna sorta (pozitivna kontrola) Bragg	-
10.	Standardna sorta (negativna kontrola) Hood	-

Sorta DH 5170 pripada vegetacijskoj grupi zriobe grupe I. koje je najpogodnija za naše uvjete rasta i razvoja. Dužina vegetacije sorata I. grupe u našim uvjetima iznosi od 130 do 135 dana) i svrstava se u srednje rane sorte (Vratarić i sur., 2008.). Prosječna visina biljke je oko 78 cm, dok je visina mahuna na oko 14 cm (slika 1). Sorta se odlikuje vrlo dobrom tolerantnosti na viruse i bijelu trulež (*Sclerotinia sclerotiorum*). Boja cvijeta je ljubičasta, hilum je prozirno žute boje. Sjeme je okruglo s masom 1000 zrna oko 156 g u prosjeku sadrži oko 22% ulja i 40% proteina te je pogodno za ljudsku prehranu. Za sjetvu se preporuča sklop od 60 klijavih zrna/m<sup>2</sup>, a genetski potencijal prinosa je oko 4 500 kg/ha (<https://rwa.hr/sjeme/soja/>).



Slika 1. Sorta DH5017

(izvor: <https://www.agroklub.com/> 25.8.2020.)

ES pallador je srednje kasna sorta soje. Prema vegetacijskoj grupi zriobe pripada grupi I, te je jedna od najprinosnijih sorata na ovim područjima. Razvija stabljiku obraslu dlačicama srednje visine, uz odličan potencijal grananja (slika 2). Prva mahuna se razvija na visini od oko 18 cm sa zrnom koje sadrži 41% proteina i 21 – 22% ulja. Listovi rastu u obliku koplja, a cvijet je ljubičaste boje. Karakteristična je po tolerantnosti na sušu i polijeganje, a od bolesti na plamenjaču (*Peronospora manshurica*) i bijelu trulež te na bakterioze. Preporučeni rok sjetve je do 20. travnja uz sklop od 50 – 56 klijavih zrna/m<sup>2</sup>, dok je u uvjetima navodnjavanja zadovoljavajući sklop od 39 – 44 klijavih zrna/m<sup>2</sup>. (<https://axereal.hr/ponuda-inputa/sjemena/soja/>)



Slika 2. Sorta ES Pallador

(izvor: <https://www.agroklub.com> 24.8.2020.)

Srednje rana sorta Bahia pripada grupi dozrijevanja 0-I. Stabljika je srednje visoka i obrasla smeđim dlačicama, u vrijeme žetve je suha i bez listova (slika 3). Svojstveno joj je da je dobro otporna na bolesti i polijeganje. U optimalnom sklopu se dobijaju visoki prinosi uz visok sadržaj ulja (21 – 24%) i bjelančevina (29 – 40%), uz nisku žetvenu vlagu koja je pogodna za daljnje skladištenje. Uz optimalan rok sjetve do 15. travnja i sloop od oko 450.000 – 550.000 biljaka/ha ostvaruje se i dobar potencijal rodosti iznad 5,3 t/ha. (<https://bc-institut.hr/soja/bahia/>)



Slika 3. Sorta Bahia

(izvor: <https://bc-institut.hr/soja/bahia/> 24.8.2020.)

Sorta Satyna je porijeklom iz Francuske i pripada 00 grupi zriobe. Ima nisku stabljiku, cvjetovi su ljubičaste boje dok su mahune izrazito smeđe boje. Sjeme je srednje veličine okruglastog oblika žute boje i sive boje hiluma ([www.hapih.hr](http://www.hapih.hr)).

Krajina je starija sorta pripada u 0 grupu dozrijevanja. Srednje niske stabljike i ljubičastoga cvijeta, dok je boja mahuna svijetlo smeđe boje. Sjeme je žute boje srednje veličine okruglastog oblika i žute boje hiluma ([www.hapih.hr](http://www.hapih.hr)).

Ascasubi je sorta soje koja pripada srednjoj grupi dozrijevanja. Stabljika je obrasla smeđim dlačicama i srednje visine (slika 4). Također je otporna na bolesti i polijeganje, a u vrijeme žetve potpuno odbaci lisnu masu. Zrno ove sorte sadrži 20 – 25% ulja i 39 – 40% proteina, a masa 1000 zrna je od 195 do 206 g. Sjetva se preporučuje od 15. travnja. U dobrom sklopu od 450.000 do 550.000 biljaka/ha daje kvalitetan prinos iznad 5,4 t/ha. (<https://bc-institut.hr/soja/ascasubi/>)



Slika 4. Sorta Ascasubi

(izvor: <https://bc-institut.hr/soja/ascasubi/> 2.8.2020.)

## **2.2. Metode rada**

### **2.2.1. Aktivnost peroksidaze**

Prema protokolu upotrijebljeno je po 20 sjemenki svake sorte (slika 5). S obzirom na to da se test obavlja na sjemennoj ljusci zrna soje, najprije je pažljivo uklonjena ljuska kako ne bi ostao niti jedan komadić kotiledona (slika 7). Kako bi se taj postupak olakšao, sjemenke je bilo potrebno natopiti u vodi u trajanju od 2 sata (slika 6). Svaka ljuska je stavljena u zasebnu tubicu (slika 8). Za vrijeme dok su se natapala zrna soje u vodi, pripremljene su otopine koje su potrebne u daljnjem pokusu. Protokolom je određeno kako se dodaju 3 ml 0,5% otopine gvajakola. Zbog opsega pokusa pripremljeno je ukupno 540 ml 0,5% gvajakola (2,7 ml čiste otopine gvajakola i 537,3 ml destilirane vode). Te je bilo potrebno pripremiti 0,1% otopinu vodikovog peroksida. S obzirom na to da je za svaku tubicu upotrijebljeno po jedna kap 0,1% vodikovog peroksida, pripremljeno je 50 ml za potrebe pokusa. Ostatak otopina je uskladišten



u hladnjaku te mora biti upotrijebljen u roku od mjesec dana. Prije samog pokusa određen je prag odlučivanja koliko je jednakih tubica pozitivne ili negativne reakcije potrebno kako bi se sorta odredila pozitivnom ili negativnom na aktivnost peroksidaze. U ovom slučaju ako tri ili više uzoraka odstupa, uzorak nije čist. Tako se rezultati efikasno očitavaju. Prema protokolu dopušteno je odstupanje od 10%, preko tog postotka se sorta određuje nečistom.

Mehanizam reakcije uključuje dvoelektronska oksidacija na hemu do intermedijera označenog kao kompleks I, uz redukciju vodikovog peroksida do vode. Naknadna redukcija jednog elektrona vraća enzim u stanje mirovanja preko drugog intermedijarnog stanja (kompleks II) pri čemu dolazi do oksidacije dvije molekule supstrata. Ovaj mehanizam omogućuje oksidaciju nekoliko različitih anorganskih i organskih supstrata u širokom rasponu pH vrijednosti (Prokopijević, 2017.).

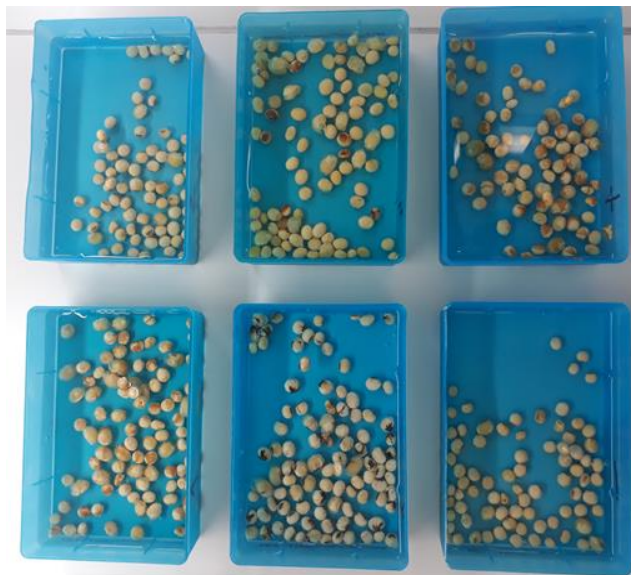


Slika 5. Uzorci zrna soje

(Foto original: N. Kosić)

U pripremljene tubice sa sjemenim ljuskama je pipetom dodano po 3 ml 0,5% otopine gvajakola. Potrebno je potopiti ljuske za bolju reakciju, kako ne bi ostale na vrhu tubice. Nakon 10 min je dodana po jedna kap 0,1% otopine vodikovog peroksida. Otopina mijenja boju u tamno

crvenu/smeđu boju za pozitivnu reakciju ili ostaje bez boje za negativnu reakciju. Bilo je potrebno sačekati 1 min za reakciju vodikovog peroksida.



Slika 6. Natapanje zrna

(Foto original: N. Kosić)



Slika 7. Odvajanje sjemene ljuske

(Foto original: N. Kosić)

Za bolju reakciju mogu se tubice protresti, a zatim očitati rezultate u najkraćem periodu. Vrlo je važno da se promatranje ne provodi duže od 1 min jer duže čekanje može dovesti do pogrešnih rezultata koji ne bi bili reprezentativni.



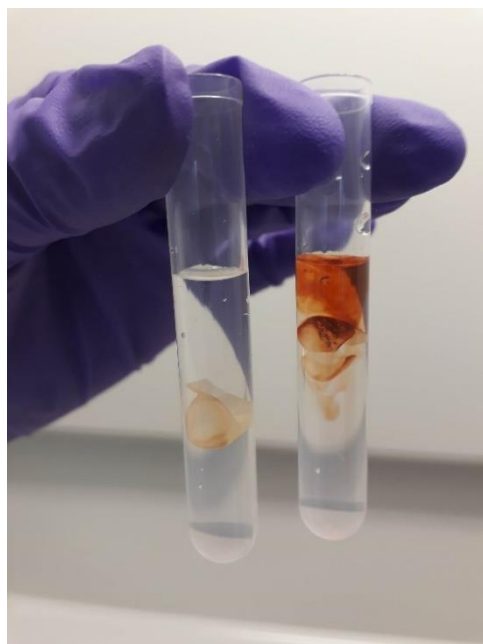
Slika 8. Stavljanje sjemene ljuske u tubice

(Foto original: N. Kosić)



### 3. REZULTATI I RASPRAVA

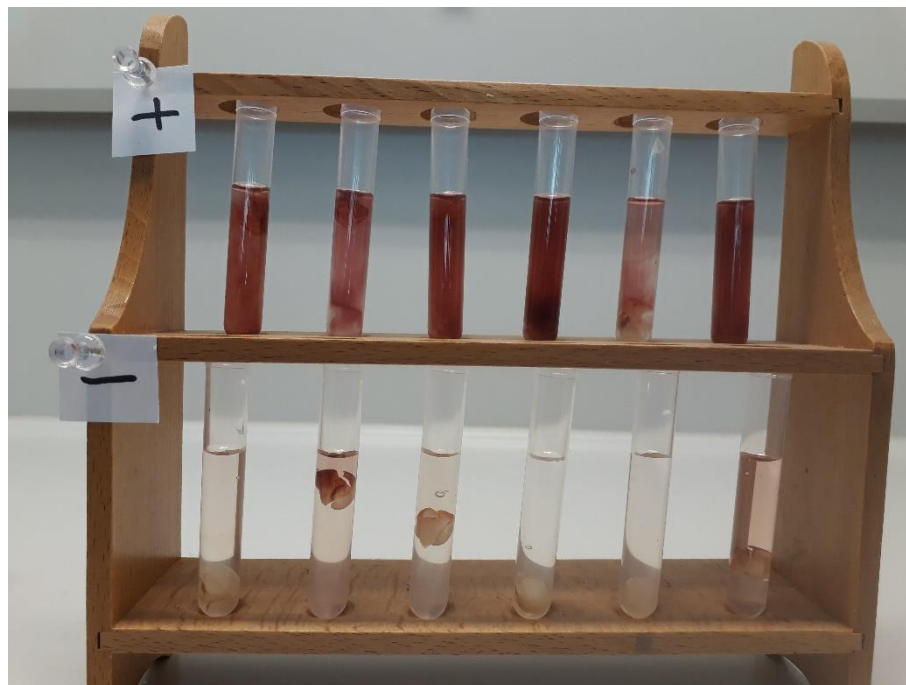
Aktivnost peroksidaze se određuje prema prethodno utvrđenom protokolu UPOV. Pozitivna reakcija je tamno crvene boje, a negativna je bezbojna (slika 9). Ako postoji i najmanje obojenje tekućine taj uzorak je pozitivan na aktivnost peroksidaze. Obojenje sjemene ljuske svih sorata u pokusu je uspoređeno s standardnim sortama koje su korištene kao pozitivna i negativna kontrola (slika 10). Rezultati su prikazani na fotografijama (slika 11 – slika 14) te grafikonu 1.



Slika 9. Primjer negativne i pozitivne reakcije na aktivnost peroksidaze

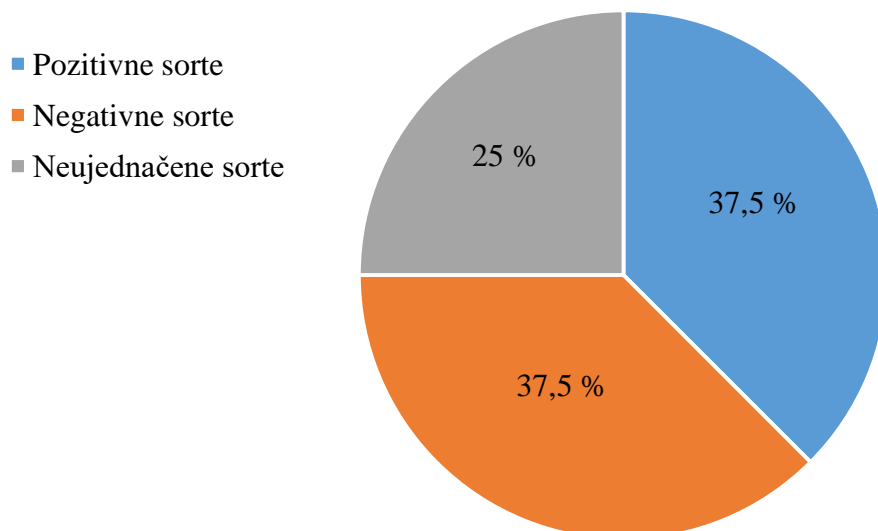
(Foto original: N. Kosić)

UPOV-ove smjernice navode kako u praksi nije uobičajeno izvoditi testove čistoće sjemena kao što je ovaj test s peroksidazom ili fenolni test prepoznatljivosti i jednoličnosti. Međutim pokazalo da se za mnoge vrste i sorte, kad se pokaže da je sorta jednolična, može smatrati i stabilnom, također navode da ako je prikladno, ili u slučajevima sumnje, stabilnost se može dodatno ispitati ispitivanjem nove zalihe sjemena kako bi se osiguralo da pokazuje iste karakteristike kao one koje su prikazane u početnom isporučenom materijalu (UPOV - International union for the protection of new varieties of plants).



Slika 10. Rezultati standardnih sorata (pozitivne i negativne kontrole)

(Foto original: N. Kosić)



Grafikon 1. Udio pozitivnih, negativnih i neujednačenih sorata u pokusu

U 20 testiranih sjemenih ljusaka sorte DH 5170 (uzorak broj 1) test je bio negativan, odnosno sorta je uniformna, 100 % sjemenih ljusaka je pokazalo negativnu reakciju na peroksidazu. Sorta ES Pallador (uzorak broj 2) na 19 sjemenih ljuski je imala pozitivnu reakciju, dok je u jedne sjemene ljuske zabilježena negativna reakcija. Prema pravilniku i pragu odlučivanja ova sorta je ocijenjena pozitivnom na aktivnost peroksidaze uz odstupanje od 5% (slika 11) te se smatra ujednačenom.



Slika 11. Rezultati pokusa na uzorcima 1 i 2

(Foto original: N. Kosić)

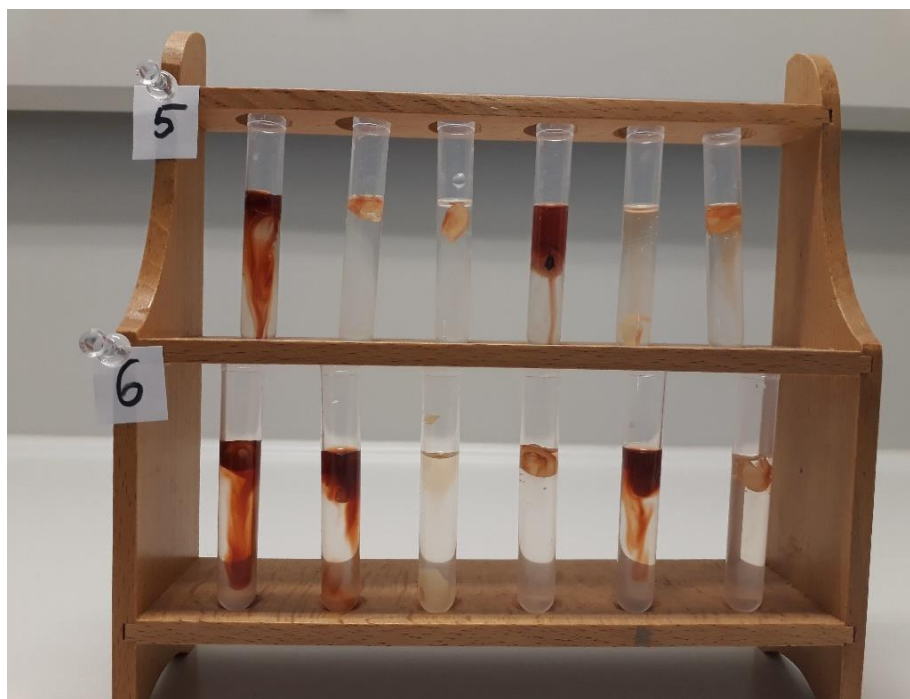
Sorta Bahia, (uzorak broj 3) je pokazala pozitivnu reakciju na svih 20 testiranih sjemenih ljusaka, što ukazuje na potpunu ujednačenost sorte, odnosno prikupljenog sjemena U sorte Satyna (uzorak broj 4) u 18 sjemenih ljusaka je utvrđena negativna, a dvije sjemene ljuske pozitivne reakcija. Sorta je ocijenjena kao negativna na peroksidaznu aktivnost jer je 90 % sjemenki negativno. Postoji postotak neujednačenosti od 10% ne prelazi prethodno zadanu granicu prema protokolu te je sorta okarakterizirana kao ujednačena uz malo odstupanje (slika 12).



Slika 12. Rezultati pokusa na uzorcima 3 i 4

(Foto original: N. Kosić)

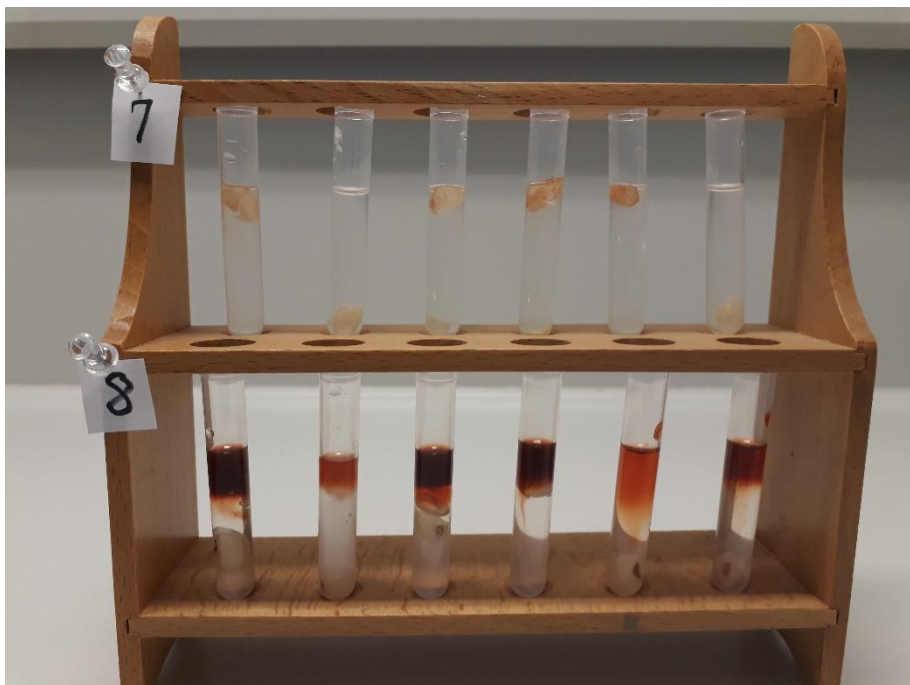
Test aktivnosti peroksidaze na liniji 3070 (uzorak 5) je ukazao je na genetski nečisto sjeme (slika 13). Od dvadeset testiranih, u njih pet je utvrđena pozitivna reakcije (25%), a u 15 sjemenih ljusaka je utvrđena negativne reakcija proksidaze (75%). Linija 3070 je prema UPOV-im smjericama ocijenjena kao nestabilna i neujednačena. Slični rezultati zabilježeni su i u linije 5050 gdje je zabilježeno ukupno devet pozitivnih (45%) i 11 negativnih (55 %) na aktivnost peroksidaze. Ova linija je također ocijenjena nestabilnom i neujednačenom (slika 13).



Slika 13. Rezultati pokusa na uzorcima 5 i 6

(Foto original: N. Kosić)

Sjemene ljuske sorte Krajina (uzorak 7) nisu pokazale obojenost u svih 20 sjemenki, što čini 100 % negativnu reakciju aktivnosti peroksidaze (slika 14). Sorta Krajina je stoga ocijenjena kao genetski čista i ujednačena. U sorte Ascsubi (uzorak broj 8) zabilježeno je 18 pozitivnih (90%) i dvije negativne (10%) reakcije peroksidazom, što znači da se uzorak nalazi u dozvoljenom odstupanju do 10% te je sorta Ascaubi ocijenjena kao ujednačena i stabilna.



Slika 14. Rezultati pokusa na uzorcima 7 i 8

(Foto original: N. Kosić)

Zbog preglednijeg interpretiranja rezultata izračunate su frekvencije i stupanj uniformnosti sorte koje su prikazane u tablici 2 i grafikonu 2.

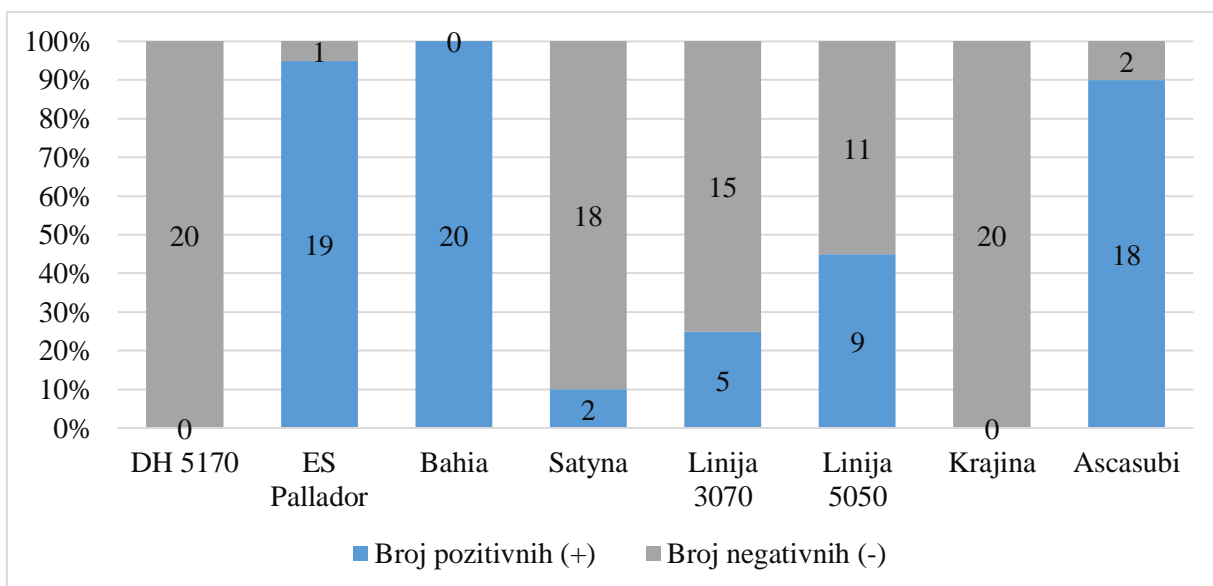
Važnost peroksidaze je dokazana i kroz istraživanja na drugim biljnim vrstama gdje su prisutne različite uloge i forme peroksidaze kao izoenzima. Lagrimini i Rothstein (1987.) objašnjavaju ulogu peroksidaze u duhanu (*Nicotiana tabacum* L.) gdje je prisutna kao anionski izoenzim. Na biljkama sa smanjenom aktivnošću peroksidaze biljke su bile više te su ranije cvjetale, a suprotno tome biljke duhana koje su sadržavale anionsku peroksidazu su bile niže i kasnije cvjetale. Naime u oba slučaja sadržaj lignina u listu, stabljici i korijenu je bio nepromjenjen što bi značilo kako anionska peroksidaza kod duhana nema ulogu u lignifikaciji. Istraživanjem na tkivu krumpira (*Solanum tuberosum* L.) Espelie i sur. (1986.) potiču reakciju anionske peroksidaze kod zacjeljivanja rana u biljaka. Rezultati pokazuju da je ta anionska peroksidaza uključena u taloženje aromatske polimerne domene suberina. Dok kod istraživanja na krastavcu (*Cucumis sativus* L.) Abeles i sur (1988.) pronalaze dva oblika peroksidaze koji imaju kataboličku reakciju u senescentnim tkivima.

Bilo koja biljna vrsta može imati između 10 i 20 izoenzima peroksidaze. Neki potječu od divergentnih gena koji bi se mogli razlikovati za više od 50% u peptidnom slijedu, dok drugi potječu od istih gena ali se razlikuju samo u ugljikohidratu. Zbog toga su prisutna odstupanja te je teže razviti model za funkciju peroksidaze u rastu i razvoju biljaka (Lagrimini i Rothstein (1987.)). Hiraga i sur (2000.) pokazuju kroz svoje istraživanje kako su identificirane 42 nezavisne oznake slijeda za peroksidazu kod riže (*Oryza sativa* L.). Što ukazuje da više izoenzima peroksidaze funkcionira različito ili kooperativno na istim fiziološkim procesima. To može biti razlog zašto je u jednoj biljnoj vrsti prisutan velik broj izoenzima peroksidaze.

Tablica 2. Postotak pozitivnih i negativnih reakcija sjemenih ljuski sorata

Redni broj sorte	Naziv sorte	Broj pozitivnih (+) sjemenih ljuski i postotak od 20 ispitanih po sorti		Broj negativnih (-) sjemenih ljuski i postotak od 20 ispitanih po sorti	
		Broj	Postotak	Broj	Postotak
1.	DH 5170	0	0 %	20	100 %
2.	ES Pallador	19	95 %	1	5 %
3.	Bahia	20	100 %	0	0 %
4.	Satyna	2	10 %	18	90 %
5.	Linija 3070	5	25 %	15	75 %
6.	Linija 5050	9	45 %	11	55 %
7.	Krajina	0	0 %	20	100 %
8.	Ascasubi	18	90 %	2	10 %

Od 20 slučajno odabranih sjemenki iz uzorka svake sorte prikazana je aktivnost peroksidaze bila ona pozitivna ili negativna. Dobiveni rezultati kod nekih sorata prikazuju 100% pozitivnu (sorta Bahia) ili negativnu (sorte DH 5170 i Krajina) aktivnost svih sjemenki, što je pokazatelj čiste sorte. Do 90% ujednačenih rezultata sjemenih ljuski može se prihvatiti kao jednaka reakcija cijele sorte. Takve rezultate su imale sorta ES Pallador (95% pozitivnih), Satyna (90% negativnih) i Ascasubi (90% pozitivnih). Dok u linije 3070 i linije 5050 rezultati pokazuju neujednačenost uzoraka (grafikon 2).



Grafikon 2. Rezultati testa ujednačenosti sjemena soje na temelju aktivnosti peroksidaze

Važnost peroksidaze kod soje se najprije ogleda u njenim značajkama važnih za pravilan rast i razvoj biljke, a zatim i u pokusima prikazivanja uniformnosti sorte te varijabilnosti među sortama. Također postoji varijabilnost unutar nekih sorti, odnosno odstupanje u svojstvima. Takvi rezultati su dobiveni i u ovom istraživanju gdje se do 10% odstupanja ipak odredilo ujednačenošću cijele sorte. Dok su se kod nekih znatno razlikovale pozitivne i negativne reakcije pa je ta sorta ocijenjena nestabilnom i neujednačenom. Jer ipak sjetvom takve sorte ne bi bila ista otpornost na niske temperature ili zacjeljivanje rana, što je značajno u procesu proizvodnje i krajnjem prinosu.



Navedeni rezultati aktivnosti peroksidaze se prema dostupnoj literaturi mogu povezati i genima koji su kontroliraju navedenu reakciju (Buttery i Buzzel, 1968.; Valario i sur., 2014.). Zrna koja su pozitivna na aktivnost peroksidaze imaju dominantni Ep<sub>-</sub> lokus, a zbog pune dominacije drugi alel može biti i dominantn (EpEp) ili recesivni (Epep). Fenotip sorte u koje je utvrđena negativna reakcija aktivnost peroksidaze, odnosno u koje nema obojenih sjemenih ljusaka, smatra se da su genotipski recesivni homozigoti tj. epep (Buzzel i Buttery, 1969.).

Pokusom na različitim sortama soje Buttery i Buzzell (1968.) koje su podijelili u dvije skupine na temelju visoke ili niske aktivnosti peroksidaze u sjemenoj ljusci. Uočili su promjene među sortama, ali i sličnosti između izoperoksidaza testiranih sorata. Objašnjena je rodoslovna povezanost sorata te postojanje nasljednosti i za visoku i za nisku aktivnost peroksidaze u sjemenskim ljuskama soje. Gijzen i sur, (1993.) pokazuju aktivnost peroksidaze i djelovanje Ep lokusa u ekstraktima bez stanica osim na ljusci sjemena i na korijenu i listu kod tri sorte EpEp i tri epep genotipa. Kod dominantnih sorata ekstrakti iz sjemenih ljuski su bili veći u specifičnoj aktivnosti peroksidaze nego na recesivnim epep sortama. Sjemene ljuske EpEp sorata peroksidaza je prisutna u obilnim količinama, a kod recesivnih epep sorata samo u tragovima. Dok kod korijena i lista nije bilo razlike između dominantnih i recesivnih na aktivnosti peroksidaze. Što pokazuje da i recesivni ep lokus može utjecati u korijenu biljke jednako kao i dominantni Ep lokus na specifičnu aktivnost peroksidaze.

Rezultate ovog istraživanja bi svakako trebalo povezati s molekularnim dokazom aktivnosti peroksidaze u sjemenim ljuskama soje koristeći molekularne markere i PCR metodu. Tako Valario i sur. (2014.) povezuju kolorimetrijski test aktivnosti peroksidaze s gvajakolom i identifikaciju Ep alela na molekularnoj razini koristeći PCR metodu. U svojem istraživanje uključili su ukupno 14 komercijalno dostupnih sorata od kojih je šest imalo pozitivnu, četiri negativnu reakciju dok je za četiri sorte potvrđena dvostruka reakcija. Koristili su dva molekularna markera prx 9 i prx 10 te su uz pomoć PCR metode svrstali sorte u dvije različite kategorije. Također navode da je svrsishodno korištenje PCR metode u slučaju da se kolorimetrijskim testom dobiju dvojbene rezultati.

#### 4. ZAKLJUČAK

Koristeći UPOV-e smjernice i DUS test provedeno je istraživanje aktivnosti peroksidaze na osam sorata. Dobiveni rezultati pokazuju varijabilnost među ispitanim sortama te unutar svake sorte. Samo tri sorte su reagirale potpuno pozitivno (Bahia) ili negativno (Dh 5170 i Krajina) na reakciju aktivnosti peroksidaze na svih dvadeset ispitanih sjemenskih ljuski svake sorte. Ostale sorte su pokazale određena odstupanja. Sorta Es pallador je reagirala s 95% pozitivnih sjemenskih ljuski, a Satyna 90% negativnih i Ascasubi 90% pozitivnih čime su ove sorte ocijenjene ujednačenim uz zanemariv postotak odstupanja. Dok je u linije 3070 i linije 5050 rezultat pokazao odstupanje od 25% i 45%. Zbog toga ove sorte prema određenom postotku kojeg moraju zadovoljavati nisu ocijenjene stabilnim i uniformnim. Istraživanje osim što pokazuje varijabilnost aktivnosti peroksidaze također opisuje genetsku različitost i dominantni utjecaj Ep lokusa na ekspresiju peroksidaze. Prema frekvenciji gena ocijenjena je stabilnost, čistoća ispitanih sorata te važnost peroksidaze u fiziološkim procesima biljke.

## 5. POPIS LITERATURE

1. Abeles, F.B., Dunn, L.J., Morgens, P., Callahan, A., Dinterman, R.E., Schmidt, J. (1988.): *Plant Physiology*, 87: 609–615.
2. Buttery, B.R., Buzzell, R.I. (1968.): Peroxidase activity in seeds of soybean varieties. *Crop Science*, 8: 722–725.
3. Buzzell, R.I., Buttery, B.R. (1969.). Inheritance of peroxidase activity in soybean seed coats. *Crop Science*, v.9, p.387-388.
4. Espelie, K.E., Franceschi, V.R., Kolattukudy, P.E. (1986.): *Plant Physiol.*81: 487–492.
5. Gijzen, M. (1997.): A deletion mutation at the ep locus causes low seed coat peroxidase activity in soybean. *The Plant Journal*, 12: 991-998.
6. Gijzen, M., van Huystee, R., Buzzell, R.I. (1993.). Soybean seed coat peroxidase. A comparison of high-activity and low-activity genotypes. *Plant Physiology*, 103: 1061–1066.
7. Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K. G., Gajhede, M. (2001.): Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 10 (1): 108–115.
8. Hiraga, S., Yamamoto, K., Ito, H., Sasaki, K., Matsui, H., Honma, M., Nagamura, Y., Sasaki, T., Ohashi, Y. (2000.). Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes, *FEBS Letters*, 471: 245–250.
9. Gillikin, J. W., Graham, J. S. (1991.). Purification and Developmental Analysis of the Major Anionic Peroxidase from the Seed Coat of *Glycine max*. *Plant Physiology* 96, 214-220.
10. Lagrimini, L.M., Rothstein, S. (1987.): Tissue Specificity of Tobacco Peroxidase Isozymes and Their Induction by Wounding and Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiology*. 84 (2): 438–442
11. Prokopijević, M. (2017.). Imobilizacija peroksidaze iz soje (*Glycine max*) na makroporoznom glicidil-metakrilatu i hemijski modifikovanom pektinu. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd. 101.

12. Perrey, R., Hauser, M., Wink, M. (1989.). Cellular and Subcellular Localization of Peroxidase Isoenzymes in Plants and Cell Suspension Cultures from *Lupinus polyphyllus*, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 44(11-12): 931-936.
13. UPOV (International union for the protection of new varieties of plants) ([https://www.upov.int/meetings/en/doc\\_details.jsp?meeting\\_id=42986&doc\\_id=372958](https://www.upov.int/meetings/en/doc_details.jsp?meeting_id=42986&doc_id=372958)) 25.06.2020.
14. Valario, Bárbara Panoff i sur. (2014.). Use of "EP" (Peroxidase) allele in soybean varietal characterization. *J. Seed Sci.* 36(4), 465-470.
15. Vratarić, M., Sudarić, A. (2000.): *Soja*, Poljoprivredni institut Osijek, Osijek. 220.
16. Vratarić, M., Sudarić, A. (2007.): *Tehnologija proizvodnje soje*. Poljoprivredni institut Osijek, Osijek. 90.
17. Vratarić, M., Sudarić, A. (2008.): *Soja Glycine max (L.) Merr.*. Poljoprivredni institut Osijek, Osijek. 459.
18. <https://rwa.hr/sjeme/soja/> 22.08.2020.
19. <https://axereal.hr/ponuda-inputa/sjemena/soja/> 22.08.2020.
20. <https://bc-institut.hr/soja/bahia/> 22.08.2020.
21. <https://bc-institut.hr/soja/ascasubi/> 22.08.2020.
22. <https://www.hapih.hr/> 1.9.2020.
23. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> 02.09.2020.