

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Maja Matoša Kočar, dipl. ing.

**GENETSKA VARIJABILNOST SVOJSTAVA KVALITETE
GERMPLAZME SOJE (*Glycine max* L. Merr.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2016.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Maja Matoša Kočar, dipl. ing.

**GENETSKA VARIJABILNOST SVOJSTAVA KVALITETE
GERMPLAZME SOJE (*Glycine max* L. Merr.)**

- Doktorska disertacija -

Osijek, 2016.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Maja Matoša Kočar, dipl. ing.

**GENETSKA VARIJABILNOST SVOJSTAVA KVALITETE
GERMPLAZME SOJE (*Glycine max* L. Merr.)**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Sonja Vila

Povjerenstvo za ocjenu:

- 1. prof. dr. sc. Vlado Guberac, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, predsjednik**
- 2. prof. dr. sc. Sonja Vila, redovita profesorica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentorica i član**
- 3. dr. sc. Aleksandra Sudarić, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju na Poljoprivrednom institutu Osijek, član**
- 4. doc. dr. sc. Sonja Petrović, član**
- 5. doc. dr. sc. Andrijana Rebekić, član**

Osijek, 2016.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Maja Matoša Kočar, dipl. ing.

**GENETSKA VARIJABILNOST SVOJSTAVA KVALITETE
GERMPLAZME SOJE (*Glycine max* L. Merr.)**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Sonja Vila

**Javna obrana doktorske disertacije održana je 14. studenog 2016. godine pred
Povjerenstvom za obranu:**

- 1. prof. dr. sc. Vlado Guberac, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, predsjednik**
- 2. prof. dr. sc. Sonja Vila, redovita profesorica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentorica i član**
- 3. dr. sc. Aleksandra Sudarić, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju, član**
- 4. doc. dr. sc. Sonja Petrović, član**
- 5. doc. dr. sc. Andrijana Rebekić, član**

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij: Poljoprivredne znanosti

Smjer: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

UDK:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda

Grana: Genetika i oplemenjivanje bilja, životinja i mikroorganizama

Genetska varijabilnost svojstava kvalitete germplazme soje (*Glycine max* L. Merr.)

Maja Matoša Kočar, dipl. ing.

Disertacija je izrađena na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: prof. dr. sc. Sonja Vila

U ovom istraživanju ispitana je genetska varijabilnost svojstava kvalitete germplazme soje i genetska udaljenost genotipova temeljem utvrđivanja mase 1000 zrna, kemijskih analiza zrna i molekularnih analiza. Ciljevi ovog istraživanja bili su na 22 genotipa soje: (1) procijeniti genetsku varijabilnost svojstava kvalitete zrna i genetsku udaljenost germplazme soje na temelju utvrđivanja mase 1000 zrna te kemijskih analiza zrna koje su uključivale određivanje koncentracije bjelančevina i ulja, sastava i koncentracije masnih kiselina i saharida te sastava i sadržaja izoflavona; (2) procijeniti genetsku varijabilnost svojstava kvalitete zrna i genetsku udaljenost genotipova soje uz pomoć SSR biljega izabranih temeljem rezultata studija povezanosti polimorfizma DNA biljega i pojedinih istraživanih svojstava kvalitete zrna; (3) odabrati genotipove s poželjnim svojstvima kvalitete zrna; (4) identificirati najudaljenije sorte s poželjnim svojstvima kvalitete kao potencijalne, nove roditeljske kombinacije za buduće programe križanja.

Tijekom tri vegetacijske sezone (2010. – 2012.), na Poljoprivrednom institutu Osijek postavljen je poljski pokus u dva ponavljanja po slučajnom bloknom rasporedu. Svake godine pokusa nakon žetve određena je masa 1000 zrna te su napravljene kemijske analize kojima se utvrdila koncentracija bjelančevina i ulja, sastav i koncentracija masnih kiselina i saharida te sastav i sadržaj izoflavona u zrnu soje. Na kraju trogodišnjeg pokusa napravljene su i molekularne analize. Statistička obrada rezultata ovih analiza uključivala je izračun standardnih mjera varijacije, analizu varijance, utvrđivanje udaljenosti genotipova temeljem standardiziranih srednjih vrijednosti svojstava kvalitete zrna te izradu pripadajućeg UPGMA dendrograma, utvrđivanje genetske udaljenosti po Nei-u (1973.) temeljem molekularnih analiza uz pomoć 10 mikrosatelitnih biljega te izradu pripadajućeg UPGMA dendrograma, analizu molekularne varijance za genotipove porijeklom sa Poljoprivrednog instituta Osijek te usporedbu podataka različitih vrsta analiza Mantelovim testom. Nakon završene analize podataka utvrđeno je da unutar istraživanih seta biljnog materijala postoji genetska raznolikost u svojstvima kvalitete zrna što je i potvrđeno na molekularnoj razini.

Broj stranica: 139

Broj slika: 5 i 4 grafa

Broj tablica: 49

Broj literaturnih navoda: 247 i 9 mrežnih izvora

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: soja, kvaliteta zrna, genetska divergentnost, SSR, UPGMA, oplemenjivanje

Datum obrane: 14. studenog, 2016.

Povjerenstvo za obranu:

1. **prof. dr. sc. Vlado Guberac** – predsjednik
2. **prof. dr. sc. Sonja Vila** – mentorica i član
3. **dr. sc. Aleksandra Sudarić** – član
4. **doc. dr. sc. Sonja Petrović** – član
5. **doc. dr. sc. Andrijana Rebekić** – član

Disertacija je pohranjena u:

Nacionalna i sveučilišna knjižnica u Zagrebu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilište u Rijeci, Sveučilište u Splitu

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

PhD thesis

Faculty of Agriculture in Osijek

Postgraduate university study: Agricultural sciences

Course: Plant Breeding and Seed Production

UDK:

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Agriculture

Branch: Genetics and breeding of plants, animals and microorganisms

Genetic variability of soybean (*Glycine max* L. Merr.) germplasm seed quality

Maja Matoša Kočar, B.Sc.

Thesis performed at Faculty of Agriculture in Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Supervisor: Prof.dr.sc. Sonja Vila

This research investigated the variability of soybean germplasm seed quality by determining 1000 seed weight, chemical analyses of seed and molecular analysis of 22 soybean genotypes. Aims of this research were: (1) assessing genetic variability of seed quality and genotypes' genetic distance on the basis of measuring 1000 seed weight and by determining soybean seed protein and oil concentrations, composition and concentrations of fatty acids and saccharides as well as isoflavone composition and content; (2) assessing genetic diversity and genetic distance of genotypes with the help of SSR markers chosen on the basis of relevant association studies between used markers and investigated seed quality parameters; (3) choosing genotypes with favourable seed quality; (4) among genotypes with favourable seed quality, choosing those genetically most distant for future crossing programmes. Field trials were set up in randomized complete block design with two replications, at the Agricultural Institute Osijek during three growing seasons (2010-2012). Chemical analyses and determining 1000 seed weight were performed each year after harvest while molecular analysis was done at the end of the three year trial. Statistical analyses of the results included: calculating basic measures of variation, analysis of variance, determining genotypes' genetic distance with standardised average values of seed quality parameters and constructing corresponding UPGMA dendrogram, determining genetic distance according to Nei (1973) on the basis of molecular analysis with 10 microsatellite markers as well as constructing corresponding UPGMA dendrogram, analysis of molecular variance for Agricultural Institute Osijek's genotypes and comparing the results of different types of analyses with Mantel's test. Analysed data showed existence of genetic diversity in seed quality among tested plant materials, which was confirmed on the molecular level also.

Number of pages: 139

Number of figures: 5 and 4 graphs

Number of tables: 49

Number of references: 247 and 9 internet resources

Original in: croatian

Key words: soybean, seed quality, genetic diversity, SSR, UPGMA, breeding

Date of the thesis defense: November 14, 2016

Reviewers:

1. **PhD Vlado Guberac, professor** – president
2. **PhD Sonja Vila, professor** – mentor and member
3. **PhD Aleksandra Sudarić** –member
4. **PhD Sonja Petrović** – member
5. **PhD Andrijana Rebekić** – member

Thesis deposited in:

National and University Library, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, University of Zagreb;
University of Rijeka; University of Split

KAZALO

1. UVOD	1
1.1. Pregled literature	3
1.1.1. Značaj genetske varijabilnosti u oplemenjivanju soje.....	3
1.1.2. Parametri kvalitete zrna.....	9
1.1.2.1. Apsolutna masa	9
1.1.2.2. Bjelančevine i ulje.....	10
1.1.2.3. Masne kiseline.....	11
1.1.2.4. Saharidi.....	12
1.1.2.5. Izoflavoni.....	14
1.1.3. Molekularni biljezi u oplemenjivanju soje.....	15
1.2. Cilj istraživanja	19
1.2.1. Hipoteza.....	19
1.2.2. Ciljevi istraživanja.....	19
2. MATERIJAL I METODE	20
2.1. Biljni materijal	20
2.2. Poljski pokusi	21
2.2.1. Pedološki uvjeti.....	22
2.2.2. Primjenjena agrotehnika.....	23
2.2.3. Klimatski uvjeti.....	24
2.3. Apsolutna masa zrna	26
2.4. Kemijske analize	27
2.4.1. Koncentracija bjelančevina i ulja.....	27
2.4.2. Koncentracija masnih kiselina.....	27
2.4.3. Koncentracija saharida.....	28
2.4.4. Sadržaj izoflavona.....	28
2.5. Molekularne analize	29
4.5.1. Uzgoj klijanaca i izdvajanje genomske DNA.....	29
4.5.2. Određivanje koncentracije i provjera kvalitete DNA.....	30
4.5.3. Mikrosatelitni biljezi (SSR).....	31
4.5.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	33
4.5.5. Elektroforeza PCR-produkata.....	34

2.6. Statistička analiza podataka	35
2.6.1 Kvantitativni podatci.....	35
2.6.2. Molekularni podatci.....	38
2.6.3. Usporedba kvantitativnih i molekularnih podataka.....	40
3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	41
3.1. Rezultati analiza parametara kvalitete	41
3.1.1. Apsolutna masa zrna.....	41
3.1.2. Bjelančevine i ulje.....	41
3.1.3. Masne kiseline.....	43
3.1.4. Saharidi.....	46
3.1.5. Izoflavoni.....	50
3.1.6. Genetska udaljenost temeljena na kvantitativnim podacima.....	53
3.1.7. Analiza glavnih sastavnica (PCA).....	54
3.2. Rezultati molekularnih analiza	60
3.2.1. Pokazatelji genetske raznolikosti.....	60
3.2.2. Genetska udaljenost temeljena na molekularnim podacima.....	61
3.2.3. Analiza molekularne varijance (AMOVA).....	63
3.3. Usporedba rezultata provedenih analiza	64
4. RASPRAVA	65
4.1. Raznolikost germplazme u svojstvima kvalitete	65
4.1.1. Genetska udaljenost temeljena na kvantitativnim podacima.....	76
4.2. Genetska raznolikost utvrđena SSR biljezima	80
4.2.2. Genetska udaljenost utvrđena SSR biljezima.....	82
4.2.3. Analiza molekularne varijance (AMOVA).....	83
4.3. Usporedba podudarnosti analiza	84
5. ZAKLJUČCI	85
6. LITERATURA	89
7. SAŽETAK	113
8. SUMMARY	115
9. PRILOZI	117

1. UVOD

Soja (*Glycine max* L. Merr. - u daljnjem tekstu *Glycine max*) je danas jedna od vodećih uljnih i bjelančevinastih kultura u svijetu (FAOSTAT, 2016.), prepoznata kao visoko kvalitetan izvor ljudske i stočne hrane, značajan izvor zdravstveno korisnih tvari, te važna sirovina za prerađivačku industriju (Vratarić i Sudarić, 2008.). Značaj soje proizlazi najviše iz kvalitete odnosno kemijskog sastava njenog zrna, a neprekidnim se znanstvenim i tehnološkim razvojem potvrđuje njegova vrijednost i povećava raznovrsnost uporabe.

U periodu od 20 godina (1995.-2014.), ukupna proizvodnja soje u svijetu se povećavala prosječnom godišnjom stopom rasta od 4,28 % pa je u odnosu na nešto više od 127 milijuna tona koliko je proizvedeno 1995. godine, 2014. godine proizvedeno ukupno preko 308 milijuna tona (FAOSTAT, 2016.). Površine pod sojom su se u ovom periodu također povećavale, ali prosječnom godišnjom stopom rasta od 3,30 %, dok je prosječan godišnji porast prinosa zrna bio tek 0,95 % (FAOSTAT, 2016.). U ukupnoj proizvodnji u spomenutih 20 godina Amerika je imala najveći udio (85 %), slijedi Azija s 12,7 %, Europa sa svega 1,6 %, te Afrika s 0,6 % (FAOSTAT, 2016.). Najveći proizvođač zrna soje od 1995.-2014. bile su SAD (45,5 milijuna tona) dok je najveći prosječni prinos zrna tijekom istog perioda imala Italija (3,5 t/ha). Ovi trendovi ukazuju da, iako je soja kultura uske genetske osnove (Gizlice i sur., 1994.), kontinuiran napredak u povećanju prinosa i poboljšanju značajnih agronomskih svojstava ipak postoji (Wilcox, 2001.; Malcom i sur., 2002.), odnosno da i uska genetska osnova posjeduje značajnu genetsku varijabilnost (Brown-Guedira i sur., 2000.).

Zbog velikog potencijala soje kao kulture, a prateći zahtjeve tržišta, uz povećanje prinosa zrna kao primarnog cilja svih oplemenjivačkih programa, na globalnoj razini intenzivan je i oplemenjivački rad na poboljšanju genetske osnove za kvalitetu zrna (Fehr i Curtiss, 2004.). Neka od najznačajnijih svojstava kvalitete zrna soje su koncentracija bjelančevina i ulja, sastav i koncentracija masnih kiselina u ulju, sastav i koncentracija saharida, posebice oligosaharida te sastav i količina izoflavona. Osim ovih svojstava kvalitete, pri oplemenjivanju se često u obzir uzima i krupnoća zrna soje izražena kao apsolutna masa, odnosno masa 1000 zrna. Apsolutna masa je kvantitativno svojstvo i jedna od komponenata prinosa zrna što ju čini važnom pri stvaranju novih genotipova. Neovisno

o cilju, preduvjet uspješnog oplemenjivanja je uvijek genetska varijabilnost svojstava od interesa. Uz pristupačne izvore genetske varijabilnosti, genetski napredak se ostvaruje kroz kontinuirani, višegodišnji oplemenjivački rad primjenom klasičnih metoda u kombinaciji sa suvremenim kemijskim, biokemijskim i molekularnim analizama (Sudarić i Vratarić, 2008.).

Za unaprjeđenje agronomskih svojstava neophodno je prije svega stvoriti veliku populaciju rekombinantnih elitnih linija, značajne fenotipske varijabilnosti. Sukladno pozitivnoj korelaciji između fenotipske varijabilnosti i genetske raznolikosti (Moose i Mumm, 2008.), stvaranje ovakve populacije je omogućeno genetskom varijabilnošću roditelja, zbog čega je neophodno poduzeti sve mjere očuvanja raznolikosti s ciljem poboljšanja željenih svojstava (Grainger i Rajcan, 2014.).

Uspjeh oplemenjivanja uvelike ovisi o izboru roditeljskih parova koji se obavlja temeljem porijekla linija te temeljem raspoloživih izvora genetske varijabilnosti za ciljane svojstva. Prema Burton-u (1997.) te Miladinović i suradnicima (2008.), najveću šansu za stvaranje superiornog potomstva imaju elitne roditeljske linije koje su međusobno genetski udaljene. Uz statističku obradu rezultata kemijskih analiza parametara kvalitete zrna, evaluaciju biljnog materijala za proces hibridizacije značajno pomaže primjena molekularnih biljega, čija se učinkovitost i pouzdanost zasnivaju na mogućnosti direktnog i brzog određivanja divergentnosti genotipova, isključujući utjecaj okoline. Za proučavanje genetske udaljenosti na soji najčešće se koriste mikrosatelitni biljezi odnosno SSR biljezi (SSR - engl. *Single Sequence Repeats* - ponavljajuće jednostavne sekvence) (Park i sur. 2009.). Kako iznos genetske dobiti u kvaliteti zrna soje značajno ovisi o genetskoj različitosti odabranih roditeljskih komponenti, procjena genetske divergentnosti raspoložive germplazme za ciljane svojstva presudan je aspekt oplemenjivanja soje za maksimiziranje genetskog napretka i stvaranje superiornog potomstva (Sudarić i sur., 2011.).

Osim napretka u kvaliteti zrna, kontinuirano oplemenjivanje i selekcija soje pružaju i odgovor na pitanje problema smanjenja agronomske vrijednosti do kojeg dolazi zbog prirodnog izrođavanja sorti tijekom vremena. Konstantan razvoj i stvaranje domaćih sorti za uzgoj u području gdje su nastale osiguravaju maksimalnu proizvodnost soje, koja kao kultura osjetljiva na fotoperiodizam ima uzak areal rasprostranjenosti.

1.1. Pregled literature

Kultivirana soja (*Glycine max*), prema Melchioru (1964.) cit. Vratarić i Sudarić (2008.) pripada porodici *Leguminosae*, podporodici *Papilionaceae*, *Fabaceae*, plemenu *Phaseoleae*, rodu *Glycine* L., podrodu *Soja* (Moench). Izrazito je samooplodna, s postotkom stranooplodnje u iznosu od 0,5 do 1 %. Soja je diploidni tetraploid ($2n = 40$), a genom ove vrste je veličine približno 1,1 Gb (Schmutz i sur., 2010.). Do duplikacije genoma je došlo prije oko 59, a zatim ponovo i prije 13 milijuna godina (Schmutz i sur., 2010.).

Domovina i primarni gen centar soje je sjeveroistočna Kina, a prvi pisani podatci o ovoj biljnoj vrsti nalaze se u knjizi cara Sheng Nung-a iz 2838. godine pr. Kr. koja opisuje medicinska svojstva biljaka Kine (Morse i sur., 1949.). Mjesto domestikacije soje i danas je predmet rasprave pa tako neki autori smatraju da je to sjeveroistočna Kina (Li, 1994.), neki da je u pitanju dolina rijeke Huang He u sjevernoj Kini (Zhao i Gai, 2004.; Li i sur., 2008.), dok pojedini autori drže da se radi o južnoj Kini (Zhuang i sur., 1994.; Gai i sur., 2000.). Također, nije potpuno jasno da li je soja domesticirana odjednom ili u više navrata (Xu i Gai, 2003.). Iako većina istraživanja potvrđuje da se domestikacija dogodila odjednom (Zhou i sur., 1998.; Gai i sur., 2000.), Xu i Gai (2003.) su, na temelju skromnog uzorka DNA (eng. *Deoxyribonucleic Acid* – deoksiribonukleinska kiselina) kloroplasta soje analiziranog uz pomoć SSR biljega, zaključili da je kultivirana soja nastala neovisnom domestikacijom u četiri različite regije iz različitih genskih zaliha (eng. *gene pool*).

1.1.1. Značaj genetske varijabilnosti u oplemenjivanju soje

Genetska varijabilnost je, prema Ofrano-u (2011.), mjera tendencije individualnih genotipova u populaciji da se međusobno razlikuju tj. predstavlja variranje pojedinačnih genotipova unutar populacije. Osim kao razlika između genotipova populacije, genetska varijabilnost se može promatrati i unutar nukleotida, gena, kromosoma ili cijelog genoma nekog organizma, a zasniva se na složenim odnosima koji nastaju kroz varijancu između alela na genloku, između nekoliko lokusa, kroz varijancu između jedinki unutar jedne populacije i između populacija (Smale, 1997.). Genetska varijabilnost kao takva osnova je svih programa za oplemenjivanje biljnih vrsta čiji je univerzalni cilj poboljšanje biljaka prema potrebama čovjeka tj. sukladno oplemenjivačkim ciljevima, a temeljem genetskih

zakonitosti. Oplemenjivački procesi se, sukladno tome, temelje na stvaranju novih alelnih kombinacija identifikacijom i odabirom divergentnih roditeljskih genotipova dobrih kombinacijskih sposobnosti, koji odgovaraju kriterijima oplemenjivača ovisno o viziji željenog fenotipa. Oplemenjivači u svom nastojanju da stvore nove poboljšane kultivare polaze od postojećih, prirodnih izvora genetske varijabilnosti ili stvaraju genetsku varijabilnost nasljednih osnova putem hibridizacije, induciranjem mutacija ili pomoću biotehnoloških metoda (Martinčić i Kozumplik, 1996.). Genetsku karakterizaciju i ocjenu divergentnosti selekcijskog materijala moguće je napraviti na temelju podrijetla (Vello i sur., 1988.; Gizlice i sur., 1996.), mjerenjem i analizom varijabilnosti kvalitativnih i kvantitativnih morfoloških svojstava (Sudarić i sur. 2002.; Malik i sur., 2006.; Iqbal i sur., 2010.; Aditya i sur., 2011.; Mudibu i sur., 2011.), na temelju biokemijskih svojstava (Bushehri i sur., 2000.; Nikolić i sur., 2004., 2005.; Mladenović Drinić i sur. 2006.; Malik i sur., 2009.; Salimi, 2013.), te uporabom molekularnih biljega (Li i sur., 2001.; Mulato i sur., 2010.; Ristova i sur., 2010.; Tantasawat i sur., 2011.).

Proces koji negativno utječe na unaprjeđenje kultiviranih biljaka je sužavanje genetske osnove, odnosno gubitak genetske različitosti kao posljedice čovjekovog djelovanja i utjecaja okoliša. Ovaj proces kojeg je Harlan (1972.) nazvao genetska erozija, nastao uslijed zamjene autohtonih populacija široke genetske osnove s modernim, novim, ujednačenim kultivarima i hibridima utvrđen je i kod *Glycine max* u odnosu na *Glycine soja* Sieb. et Zucc. (u daljnjem tekstu *Glycine soja*), a predstavlja veliku opasnost za proizvodnju hrane pa samim time i opstanak ljudi. Hyten i suradnici (2006.) su istražujući utjecaj uskih grla evolucije soje na genetsku divergentnost, proučavanjem dijela DNA sekvence sa 102 gena, potvrdili da je divergentnost koja postoji kod kulturne soje upola manja od divergentnosti kod divljih sorti, da se čak 81 % rijetkih alela (s frekvencijom $\leq 0,10$) izgubilo tijekom domestikacije te da za oko 60 % gena postoje dokazi o značajnim promjenama u frekvenciji. Također, Wen i suradnici (2009.) su u istraživanju 196 divljih vrsta soje (*Glycine soja*) i 200 lokalnih kultiviranih sorti (*Glycine max*) utvrdili da kultivirana soja sadrži 65 % alela naslijeđenih od divljih vrsta i 35,5 % novonastalih alela. Varijaciju genoma soje tijekom domestikacije, poboljšavanja i lokalnog oplemenjivanja istraživali su i Zhou i suradnici (2015.) resekvencioniranjem 302 primke soje od koje su 62 divlja genotipa, 130 genotipova iz lokalnih populacija i 110 poboljšanih kultivara iz Kine, Koreje, Japana, Rusije, SAD-a i Kanade. Pri tome su identificirali 13 novih lokusa agronomskih svojstava uključujući

koncentraciju ulja, visinu biljke i dužinu vegetacije te zaključili da su neka svojstva i određeni lokusi povezani sa zemljopisnim područjem što pokazuje da su populacije soje geografski strukturirane. Potvrdili su i da se genetska divergentnost smanjivala od *Glycine soja* genotipova, preko *Glycine max* genotipova iz lokalnih populacija do poboljšanih *Glycine max* kultivara tj. da se tijekom domestikacije divlje soje u lokalne populacije izgubilo prosječno pola genetske divergentnosti, kao što su ranije naveli Hyten i suradnici (2006.). Razlika u divergentnosti između lokalnih populacija i poboljšanih sorti bila je vrlo mala.

Utvrđeno sužavanje genetske osnove, ako se ne zaustavi, može rezultirati velikim katastrofama i propadanjem usjeva uslijed neotpornosti na nepovoljne abiotske ili biotske činitelje okoline. Najpoznatiji primjer za to je bolest plamenjača krumpira (*Phytophthora infestans*) koja je uzrokovala uništenje genetički uniformnih usjeva krumpira u Europi i Sjevernoj Americi kada je u Irskoj, gdje se ljudska prehrana temeljila na ovoj kulturi, od gladi umrlo 1,5 milijun ljudi (Milošević i sur., 2010.). Ipak, kako posjeduje znatno veću divergentnost te znatno veći udio rijetkih alela od kultivirane soje, germplazma *Glycine soja* predstavlja moguće rješenje problema jer može poslužiti kao izvor specifičnih alela koji nisu prisutni u germplazmi *Glycine max*. Neki od njih su i aleli koji uvjetuju otpornost na cist nematodu (*Heterodera glycines* Ichinohe), aleli za sitno zrno, visoku koncentraciju bjelančevina, nižu koncentraciju ulja i oleinske kiseline, višu koncentraciju linolenske kiseline, tolerantnost na sol, ali i za visok prinos zrna (Rebetzke i sur., 1997.; Wang i sur., 2001.; Kabelka i sur., 2005.; Lee i sur., 2009.; Nichols i sur. 2006.).

Za proces oplemenjivanja i napredak kultivara od ključne je važnosti poznavanje genetskog materijala kako divljih, tako i kultiviranih genotipova (Hufford i sur., 2012.). Da je procjena genetske divergentnosti roditelja ključan aspekt oplemenjivanja koji omogućava maksimalno genetsko poboljšanje potvrdili su mnogi autori među kojima su i Sudarić i suradnici (2008.). Istraživajući genetsku dobit za prinos i kvalitetu zrna osječkih genotipova soje, autori su procijenili genetsku povezanost roditeljskih komponenti uporabom 14 SSR markera, dok je agronomska vrijednost rezultirajućeg potomstva određena u poljskim pokusima. Analizom rezultata utvrđeno je da su kombinacije križanja s roditeljima koji su bili genetski udaljeni rezultirale linijama s većim vrijednostima za prinos i kvalitetu zrna u odnosu na kombinacije križanja s roditeljima koji su bili međusobno genetski slični, odnosno

potvrđena je povezanost genetske udaljenosti roditelja i agronomske vrijednosti stvorenih linija. U većini istraživanja germplazme kultivirane soje utvrđena je uska genetska osnova genotipova što ukazuje na potrebu prikupljanja germplazme kao genetskog resursa za stvaranje visokoprinosnih i kvalitetnih kultivara, te na potrebu introdukcije genetski udaljenih sorata i introgresije poželjnih alela. Zhang i suradnici (2013.) su u svom istraživanju na 48 sorti soje (43 iz Kine, 3 iz Japana i 2 iz SAD-a) koje se uzgajaju za ljudsku ishranu, zaključili da je varijabilnost genoma unutar kineske populacije niska, ali da je genetska divergentnost između kineskih, japanskih i genotipova iz SAD-a visoka na temelju čega pretpostavljaju da je riječ o različitoj genetskoj osnovi, odnosno da introdukcija japanskih i američkih genotipova te njihova uporaba u programima križanja može povećati genetsku divergentnost postojeće kineske germplazme soje. Genetsku i fenotipsku raznovrsnost sorti soje iz područja Panonske ravnice istraživali su Perić i suradnici (2014.) na 18 genotipova iz tri oplemenjivačke kuće (Institut za kukuruz Zemun polje, Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad i Poljoprivredni institut Osijek) kombiniranjem agromorfoloških i molekularnih analiza. Prema očekivanju, genetska sličnost materijala je bila vrlo velika, posebice unutar pojedinih oplemenjivačkih programa. Hahn i Würschum (2014.) su istraživali 69 genotipova iz Srednje Europe te 24 genotipa porijeklom iz Azije i Amerike, a utvrdili su da genetska baza istraživanih genotipova iz Srednje Europe i nije tako uska kao što se očekivalo zbog nesistematske fenotipske selekcije te da su isti najrodniji švicarskim i kanadskim genotipovima, odnosno da su nešto više udaljeni od kineskih i genotipova iz SAD-a koji su bili uključeni u pokus. Za razliku od prethodno navedenih istraživanja, Mudibu i suradnici (2011.) su na temelju 14 morfoloških i agronomskih svojstava utvrdili veliku divergentnost 40 primki soje iz gen kolekcije Demokratske Republike Kongo između kojih su utvrđene statistički značajne razlike za sva kvantitativna svojstva koja su analizirana.

Za unaprjeđenje kultivara iznimno je značajan i udio rijetkih alela, koje ne nalazimo u elitnim kultivarima pa predstavljaju potencijalan izvor korisnih svojstava. Visoku frekvenciju rijetkih alela utvrdili su Mulato i suradnici (2010.) prilikom istraživanja genetske divergentnosti 79 genotipova soje porijeklom iz različitih dijelova svijeta. Kao što se i očekivalo, genetska divergentnost istraživanih genotipova bila je visoka, a razina asocijacije između genetske divergentnosti i zemljopisnog porijekla primki umjerena. Od ukupno 259 alela, 59 ih je bilo prisutno samo u pojedinačnim genotipovima i predstavljalo prosječno 2,5

% ukupne genske zalihe. Alela s frekvencijom manjom od 5 % je bilo 118, a predstavljali su 8,7 % ukupne genske zalihe.

Najnovije i najopsežnije istraživanje germplazme soje napravili su Song i suradnici (2015.) na cjelokupnoj kolekciji Ministarstva Poljoprivrede SAD-a (engl. *The USDA Soybean Germplasm Collection*). U istraživanje je bilo uključeno 18 480 primki kultivirane soje i 1168 primki divlje soje na kojima je napravljena genotipizacija uz pomoć SoySNP50K čipa, tj. mikročipa koji sadrži više od 50 000 SNP-ova (eng. *Single Nucleotide Polymorphism* - polimorfizam jednog nukleotida). Utvrdili su velik udio suvišnih, odnosno visoko sličnih primki (23 % *Glycine max* primki i 30 % *Glycine soja* primki je bilo bar 99,9 % identično s nekom drugom primkom u kolekciji) što nije iznenađujuće zbog pretpostavke da su mnogi genotipovi u kolekciju uključeni više puta zbog nepotpunih ili nepostojećih podataka o rodoslovlju. Također, u zemljama porijekla soje kao što je Kina, sortama su imena davali farmeri prema boji, veličini i obliku zrna, boji mahune ili mjesecu dozrijevanja pa nije isključeno da isti genotipovi iz različitih uzgojnih područja imaju različita imena. Analiza povezujućih grupa (engl. *cluster analysis*) 806 primki divlje soje iz Kine, Koreje, Japana i Rusije te 5 396 primki iz lokalnih populacija Kine, Koreje i Japana pokazalo je podjelu u grupe sukladno zemljopisnom porijeklu.

Kako bi se ovaj negativan proces sužavanja genetske osnove zaustavio te osigurao napredak kultivara u budućnosti, neophodno je uložiti napore u očuvanje genetskih izvora soje, prvo na lokalnoj razini, a zatim i u svijetu te osigurati dostupnost bioraznolikosti oplemenjivačima, istraživačima i uzgajivačima. Biljni genetski izvori su svaki biljni genetski materijal koji ima stvarnu ili potencijalnu vrijednost za hranu i poljoprivredu (Pravilnik o očuvanju i održivoj uporabi biljnih genetskih izvora, NN 89/09.), a čuvaju se u bankama gena tj. gen kolekcijama (Vratarić i Sudarić, 2008.).

Vlada Republike Hrvatske je 1996. godine potvrdila Konvenciju o biološkoj raznolikosti (Međunarodni ugovori, NN 6/1996) čime dobiva suvereno pravo na biljne genetske izvore na svom području, kao i dužnost očuvanja i održive uporabe istih. Početak očuvanja biljnih genetskih izvora na nacionalnoj razini u Republici Hrvatskoj započeo je 2004. godine pristupanjem programu SEEDNet (SEEDNet - engl. *South East European Development Network on Plant Genetic Resources*) koji je obuhvaćao 12 zemalja

jugoistočne Europe. Do zastoja u provedbi aktivnosti očuvanja biljnih genetskih izvora došlo je 2010. godine, prestankom financiranja iz državnog proračuna, odnosno prestankom programa SEEDNet. U lipnju 2013. godine Ministarstvo poljoprivrede osniva Povjerenstvo za biljne genetske izvore, a Vlada u listopadu donosi Odluku o donošenju Nacionalnog programa očuvanja i održive uporabe biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu u Republici Hrvatskoj (Nacionalni program). Sredstva za provedbu ovog programa osigurana su iz Državnog proračuna i raspodijeljena između 10 institucija koje u njemu sudjeluju (Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Bc Institut d.d., Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Institut za poljoprivredu i turizam Poreč, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, H.Z.P.C. d.o.o., Podravka d.d., Poljoprivredni institut Osijek, Poljoprivredni fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Visoko gospodarsko učilište u Križevcima). Ciljevi Nacionalnog programa su doprinošenje nacionalnom razvoju, sigurnosti prehrane, održivoj poljoprivredi i očuvanje bioraznolikosti kroz održavanje i uporabu biljnih genetskih izvora. Provedba ovog programa zahtijeva identificiranje, prikupljanje, opisivanje i čuvanje važnih biljnih genetskih izvora u kolekcijama Nacionalne banke gena, te dostupnost tih izvora za korištenje i ravnopravno sudjelovanje Republike Hrvatske u međunarodnim aktivnostima vezanim za očuvanje biljnih genetskih izvora (Ministarstvo poljoprivrede). Aktivnosti vezane za očuvanje biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu u Republici Hrvatskoj regulirane su Zakonom o sjemenu, sadnom materijalu i priznavanju sorti poljoprivrednog bilja (NN 140/05, 35/08 i 55/11), te Pravilnikom o očuvanju i održivoj uporabi biljnih genetskih izvora (NN 89/09 i 04/14). Zaštita biološke raznolikosti definirana je, u širem smislu, Zakonom o zaštiti prirode (NN 80/13), te dokumentom „Strategija i akcijski plan zaštite biološke i krajobrazne raznolikosti Republike Hrvatske“ (NN 143/08). O očuvanju biljnih genetskih izvora soje u Republici Hrvatskoj brigu vodi Radna skupina Nacionalnog programa Industrijsko bilje, koja nije imala značajnih aktivnosti pa je u Nacionalnu banku gena uključeno samo 28 primki soje sa Sortne liste Republike Hrvatske (CPGRD, 2016.) od kojih su neke korištene i u ovom istraživanju.

1.1.2. Parametri kvalitete zrna

Osim kao kvalitetna hrana za životinje, soja sve više dobiva na važnosti u ishrani ljudi zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti, a prema nekim istraživanjima smatra se da smanjuje kolesterol, sudjeluje u prevenciji dijabetesa, prekomjerne težine, bolesti crijeva, bolesti

bubrega pa i raka (Lee i sur., 2010.; Li i sur., 2011.) Također, soja ima velik potencijal za uporabu u različitim granama industrije što ovisi o kemijskom sastavu zrna zbog čega je, uz prinos kao primarni cilj svih oplemenjivačkih programa soje u svijetu, intenzivan i oplemenjivački rad na poboljšanju genetske osnove za kvalitetu zrna (Fehr i Curtiss, 2004.). Osim apsolutne mase zrna kao komponente prinosa, svojstva kvalitete zrna na koja se sve više stavlja naglasak pri oplemenjivanju i uzgoju su koncentracija bjelančevina i ulja, sastav i koncentracija masnih kiselina te sastav i količina oligosaharida i izoflavona. Temelj postizanja ciljeva u oplemenjivanju i stvaranju superiornih genotipova čine genetska raznolikost materijala koji se koristi, heritabilnost i genetski napredak za svojstava od interesa, te njihovi međuodnosi.

1.1.2.1. Apsolutna masa

Krupnoća zrna soje izražena kao apsolutna masa, odnosno masa 1000 zrna, kvantitativno je svojstvo, a vrijednosti variraju od 20 g kod divlje soje do preko 500 g kod nekih kultiviranih vrsta. Komercijalne sorte imaju obično sjeme srednje veličine s apsolutnom masom u rasponu od 150 g do 200 g (Vratarić i Sudarić, 2008.). Kako genetske komponente varijance u realizaciji apsolutne mase zrna imaju veći udio od ostalih komponenti fenotipske varijance, ovo svojstvo je visoke nasljednosti pa neki autori selekciju na veću krupnoću zrna smatraju uspješnom i u ranim generacijama (Jain i Ramgiry, 2000.; Sudarić i sur., 2002.; Malik i sur., 2006.; Malik i sur., 2011.). Ipak, u drugim istraživanjima, visoke procjene heritabilnosti pratila je niska genetska dobit, što ukazuje na sudjelovanje neaditivnog učinka gena u ispoljavanju svojstva te sukladno tome i na poteškoće u poboljšanju selekcijom temeljenom na fenotipu (Aditya i sur., 2011.; Hina-Kausar, 2005.). U ostalim istraživanjima, procjene učinkovitosti selekcije na masu 1000 zrna bile su niske i zbog utvrđenih niskih vrijednosti heritabilnosti u širem smislu, niskog genetskog napretka te niskog fenotipskog i genotipskog koeficijenta stabilnosti (Sudarić i sur., 1997.; Ghodrati, 2013.). Potencijal za poboljšanje ipak postoji i ostvaruje se putem križanja genetski divergentnih roditelja, što ovisi o postojećoj varijabilnosti germplazme za svojstvo, koja je u slučaju apsolutne mase potvrđena u mnogim istraživanjima (Antalikova i sur., 2008.; Iqbal i sur., 2010.; Malik i sur., 2011.; Aditya i sur., 2011.; Ghodrati, 2013.).

1.1.2.2. Bjelančevine i ulje

Zbog povoljnog sastava zrna, soja je jedan od najvažnijih izvora biljnih bjelančevina i ulja u svijetu (Popović i sur., 2012.b). Koncentracije bjelančevina i ulja su dijelom određene aditivnim djelovanjem gena, a procjene heritabilnosti variraju od srednjih do visokih (Malik i sur., 2006.; Jaureguy i sur., 2011.; Rodrigues i sur., 2014.). Količina bjelančevina u zrnu soje je kvantitativno svojstvo koje se nasljeđuje poligeno, a ovisno o genotipu i uvjetima uzgoja varira od 30 % do 50 % na bazi apsolutno suhe tvari (AST) (Vratarić i Sudarić, 2008.). Bjelančevine zrna soje najbližnje su bjelančevinama životinjskog porijekla, što im daje visoku biološku vrijednost uz manju cijenu pa je i oplemenjivanje ovog svojstva iznimno značajno. Količina ulja je također kvantitativno svojstvo pod utjecajem velikog broja gena većinom malog učinka. Koncentracija ulja u zrnu soje varira od 12 % do 24 % na bazi AST (Vratarić i Sudarić, 2008.), a povećanjem koncentracije i kvalitete ulja povećava se i isplativost uzgoja soje kao sirovine za uljare.

Genetska raznolikost je u slučaju koncentracije bjelančevina i ulja u zrnu soje utvrđena u brojnim istraživanjima (Sudarić i sur., 2001.; Malik i sur., 2006.; Malik i sur., 2007.; Iqbal i sur., 2010.; Popović i sur., 2012.b). Malik i suradnici (2006.) su osim statistički značajnih razlika unutar germplazme za bjelančevine i ulje potvrdili i visoku heritabilnost. Visoke vrijednosti heritabilnosti u širem smislu za oba svojstva potvrdili su kasnije Bueno i suradnici (2013.) te Rodrigues i suradnici (2014.). Procjene heritabilnosti u širem smislu su značajne jer predviđaju mogućnost uspjeha selekcije pa što su veće, veća je i šansa za uspjehom (Gravois i Bernhardt, 2000.). U istraživanju Bueno i suradnika (2013.) vrijednost omjera koeficijenta genotipske varijacije i koeficijenta okolinske varijacije za koncentraciju bjelančevina bila je iznad 1, što je idealno za uspjeh selekcije, ali je za koncentraciju ulja bila ispod 1 što ukazuje na nizak potencijal selekcije za poboljšanje svojstva kod testiranih genotipova. Da se oba svojstva mogu uspješno unaprijediti oplemenjivanjem potvrdili su i Miladinović i suradnici (2008.) te Vidić i suradnici (2010.). Ipak, pri oplemenjivanju na ova svojstva kvalitete zrna soje treba uzeti u obzir ne samo genotipsku varijancu i heritabilnost već i međusoban odnos svojstava zbog potvrđene izrazito negativne korelacije između koncentracije bjelančevina i ulja u zrnu (Malik i sur., 2007.; Akond i sur., 2012.; Popović i sur., 2012.b; Bueno i sur., 2013.; Song i sur., 2013.; Rodrigues i sur., 2014.) što značajno otežava postupak oplemenjivanja.

1.1.2.3. Masne kiseline

Sastav masnih kiselina u zrnu konvencionalnih sorti soje čini u prosjeku 12 % palmitinske kiseline (16:0), 4 % stearinske (18:0), 27 % oleinske (18:1), 50 % linolne (18:2) i 7 % linolenske (18:3) kiseline (Fehr i Curtiss, 2004.). O sastavu masnih kiselina koje utječu na okus, nutritivnu vrijednost te stabilnost ulja ovisi i krajnja uporaba sojinog ulja (Panthee i sur., 2006.). Kako stvaranje velikog broja različitih uljnih fenotipova nije isplativo, oplemenjivanjem se pokušavaju stvoriti genotipovi s koncentracijom zasićenih masnih kiselina (palmitinske i stearinske) smanjenom na < 7 %, koncentracijom linolenske kiseline smanjenom na < 3 %, a koncentracijom oleinske kiseline povećanom na > 55 %, jer ulje ovakvog sastava ima najviše mogućnosti uporabe kako u prehrambenoj, tako i u ostalim industrijama (Wilson, 2004.). Potreba za smanjenjem količine zasićenih masnih kiselina, koje prema nekim istraživanjima povećavaju količinu kolesterola u krvi te sudjeluju u razvoju srčanih oboljenja, proizlazi prvenstveno iz zahtjeva potrošača i proizvođača za zdravijom hranom (Grundy, 1997.; Wilson, 2004.; Lee i sur., 2007.). Za razliku od ulja za ishranu, kod sojinog ulja namijenjenog za industrijsku uporabu, poželjan je što veći sastav zasićenih masnih kiselina jer one povećavaju stabilnost (Spencer i sur., 2003.). Nezasićene masne kiseline mogu biti mononezasićene (oleinska kiselina) ili polinezasićene (linolna i linolenska). Oleinska kiselina (n-9, Omega-9), koja se smatra neutralnom i nema utjecaja na razinu kolesterola u krvi, prekursor je nekim esencijalnim masnim kiselinama, neophodnim u ljudskoj ishrani (CSE, 2009.). Povećana koncentracija oleinske kiseline povećava stabilnost ulja i omogućava uporabu pri visokim temperaturama, a smatra se da bi omogućila i uporabu sojinog ulja kao sirovine u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji te u proizvodnji lubrikanata i bio-dizela (Wilson, 2004.). Linolna (n-6, Omega-6) i linolenska (n-3, Omega-3) kiselina esencijalne su masne kiseline koje ljudsko tijelo ne može samo proizvesti, a zajedno s ostalim esencijalnim kiselinama potpomažu zdravlje krvožilnog, reproduktivnog, imunog i živčanog sustava, te su neophodne za stvaranje i regeneraciju staničnih membrana (CSE, 2009.; Maltas i sur., 2011.). Ipak, ove masne kiseline podložne su oksidaciji pa smanjuju trajnost ulja i njegovu stabilnost na visokim temperaturama te mu daju loš okus (Lee i sur., 2007.). Oksidativna stabilnost sojinog ulja može se poboljšati hidrogenacijom u proizvodnji pri čemu nastaju nepoželjne trans masne kiseline ili povećanjem koncentracije oleinske kiseline oplemenjivanjem (Wardlaw i Snook, 1990.; Chang i Huang, 1998.; Wilson,

2004.; Rani i sur., 2007.; Lee i sur., 2007.; Pham i sur., 2010.). Song i suradnici (2013.) su za ocjenu stabilnosti ulja utvrđivali upravo omjer oleinske i linolne kiseline na 185 genotipova soje porijeklom iz sedam različitih zemalja, pri čemu nisu utvrdili značajne razlike između primki iz različitih područja. Koncentracija oleinske kiseline je bila u negativnoj korelaciji s koncentracijom linolne kiseline, što je poželjno u oplemenjivanju, dok negativan odnos koncentracije ulja s koncentracijom oleinske i linolne kiseline otežava istovremeno povećanje količine i stabilnosti ulja (Song i sur., 2013.).

Kako bi se oplemenjivanjem mogao modificirati sastav masnih kiselina u zrnu soje sukladno cilju oplemenjivanja, neophodno je istražiti genetsku varijabilnost ovih svojstva u dostupnoj germplazmi. Veliku varijabilnost za navedena svojstva utvrdili su Carraño-Panizzi (2005. - citirano u Priolli i sur., 2014.), Rani i suradnici (2007.), te Priolli i suradnici (2014.). Priolli i suradnici (2014.) nisu uočili značajan utjecaj godine na koncentraciju ulja i pojedinačnih masnih kiselina iz čega su zaključili da je varijabilnost ovih svojstava najvećim dijelom pod utjecajem genotipa dok je u istraživanjima Hou i suradnika (2006.) i Fan i suradnika (2015.) utvrđen i statistički značajan utjecaj okoline, ali je genetski učinak ipak imao veću ulogu.

1.1.2.4. Saharidi

Zrno soje sadrži oko 33 % ugljikohidrata, od čega je oko 16,6 % topivih šećera (Hymowitz i Collins, 1974.), uz varijabilnost ovisno o genotipu (Lowell i Kuo, 1989.). Od pet osnovnih šećera u zrnu soje predominantni su saharoza i stahioza, dok su glukoza, fruktoza i rafinoza manje zastupljeni (Hou i sur., 2009.). Od ukupnih topivih šećera, udio saharoze varira u rasponu od 41,3 do 67,5 %, odnosno od 1,5 do 10,2 % ukupne suhe tvari zrna (Hymowitz i Collins, 1974.). Galaktooligosaharidi (rafinoza, stahioza i verbaskoza) čine oko 5 % suhe tvari zrna soje, udio rafinoze u topivim šećerima varira od 5,2 do 15,8 %, a stahioze od 12,1 do 35,2 % (Yazdi-Samadi i sur., 1977.; Maughan i sur., 2000.; Karr-Lilienthal i sur., 2005.).

Šećeri utječu na kvalitetu, probavljivost i hranidbenu vrijednost zrna soje. Dok su glukoza, fruktoza i saharoza poželjni u zrnu namijenjenom ljudskoj ishrani jer su lako probavljivi i daju proizvodima od soje karakterističan slatkast okus, oligosaharidi,

prvenstveno galaktooligosaharidi (stahioza i rafinoza) ograničavaju hranidbenu vrijednost soje jer se smatraju neprobavljivim i uzrokuju iritaciju gastrointestinalnog trakta uslijed čega dolazi do bolova, nelagode i nadutosti (Suarez i sur., 1999.; Jones i sur., 1999.; Gulewitz i sur., 2014.). S druge strane, smatra se da ovi šećeri imaju i određene pozitivne učinke na ljudsko zdravlje jer njihovom fermentacijom u crijevima nastaju masne kiseline kratkih lanaca koje imaju prebiotska svojstva pa u posljednje vrijeme postoji povećan interes za primjenu oligosaharida kao nutraceutika (Tsangalis i Shah, 2004.; Roberfroid, 2007.; Zheng i sur., 2012.). Osim u ljudskoj ishrani, galaktooligosaharidi stvaraju slične probleme i kod domaćih životinja koje se hrane sojom (Hartwig i sur., 1997.; van Kempen i sur., 2002.; Félix i sur., 2013.; Qiu i sur., 2015.) pa je uputno oplemenjivanjem prilagoditi sastav šećera u zrnju soje kako bi se povećala mogućnost uporabe ove mahunarke za prehranu.

Kako bi se količina pojedinih šećera oplemenjivanjem prilagodila krajnjem cilju uporabe, neophodno je istražiti varijabilnost dostupne germplazme soje. Statistički značajne razlike između genotipova te varijabilnost koja opravdava selekciju na koncentraciju šećera utvrđeni su u brojnim istraživanjima (Hymowitz i Collins, 1974.; Geater i sur., 2000.a; Hollung i sur., 2005.; Hou i sur., 2009.; Mozzoni i sur., 2013.). Kao izvore varijabilnosti neki autori navode genotip (Geater i sur., 2000.a) dok je u drugim istraživanjima utjecaj okoline bio veći od utjecaja genotipa (Taira, 1990.). Chen (2004.) smatra da postoji značajan potencijal za korekciju sadržaja šećera, jer se oplemenjivanje na povećanu koncentraciju najčešće pokazalo kao učinkovito. Također, na temelju rezultata kojima nije utvrđeno postojanje interakcije genotipa s okolinom, Geater i suradnici (2000.b) zaključuju da je razlika između genotipova za svojstvo koncentracija ukupnih šećera bila konstantna u svim okolinama što olakšava selekciju na ovo svojstvo. Ovome pridonose i visoke procjene heritabilnosti za koncentraciju ukupnih šećera uz zabilježene majčinske i aditivne učinke (Openshaw i Hadley, 1978.; Maughan i sur., 2000.).

1.1.2.5. Izoflavoni

Izoflavoni su glavne komponente flavonoidne grupe i najuobičajenija forma fitoestrogena (Kim i sur., 2012.) koji u organizmu ljudi djeluju kao antiestrogeni (Hedlund i sur., 2003.), antioksidansi (Jeng i sur., 2010.; Maltas i sur., 2011.) i inhibitori tirozin protein kinaze (Akiyama i sur., 1987.). Također, imaju antimutageni učinak pa smanjuju rizik od

pojave nekih oblika raka (Wang i sur., 2009.; Jiang i sur., 2010.; Li i sur., 2011.) te smanjuju rizik pojave kardiovaskularnih bolesti i osteoporoze (Regal i sur., 2000.; Albertazzi i Purdie, 2002.; Lee i sur., 2008.; Lee i sur., 2010.) iz čega proizlazi njihova zdravstvena važnost. Sukladno navedenom, stvaranjem genotipova s povećanim sadržajem izoflavona povećala bi se mogućnost uporabe soje kao značajnog izvora zdravstveno korisnih tvari (Murphy i sur., 2009.), ali nije zanemariva niti uloga izoflavona unutar samih biljaka koja se očituje u borbi protiv raznih oblika stresa i patogena (Mabrouk i sur., 2007.; Meng i sur., 2011.) te u poticanju infekcije korijena i nodulacije od strane kvržičnih bakterija *Bradyrhizobium* (Subramanian i sur., 2007.). Soja, koja se smatra najbogatijim izvorom ovih spojeva u ljudskoj ishrani (Zhang i sur., 2007.), sadrži 12 vrsta izoflavona podijeljenih u četiri podgrupe: aglikoni, glikozidi, malonil glikozidi i acetil glikozidi (Wang i Murphy, 1994.a; Lee i sur., 2004.). Najznačajniji izoflavoni u zrnu soje su aglikoni genistein i daidzein (te njihovi β -glikozidi genistin i daidzin) dok gliciteina zrno sadrži puno manje (Messina, 1999.). Učinkovitost izoflavona zavisi o koncentraciji i sastavu u zrnu soje, a prema istraživanjima Kupier i suradnika (1998.), genistein ima čak 10 puta veću biološku aktivnost u usporedbi s daidzeinom i gliciteinom.

Količina i sastav izoflavona u zrnu soje variraju ovisno o genotipu, uvjetima uzgoja i interakciji genotipa s okolinom (Gutierrez-Gonzalez i sur., 2011.; Kim i sur., 2012.; Akond i sur., 2013.; Adie i sur., 2015.). Gutierrez-Gonzalez i suradnici (2011.) navode da je količina izoflavona svojstvo koje se nasljeđuje kvantitativno i kontrolira ga mnoštvo gena malog učinka. Sukladno tome, činitelji okoline koji utječu na sadržaj izoflavona toliko su brojni da čak i neznatne promjene na mikro-okolinskoj razini mogu uzrokovati značajne razlike u koncentracijama. Isti autori zaključuju da je napredak u sadržaju izoflavona moguć unatoč snažnim okolišnim utjecajima jer je heritabilnost u širem smislu imala visoke vrijednosti (> 90%), a utjecaj okoline je bio relativno ujednačen u svim genotipovima. Hoeck i suradnici (2000.) zaključuju da je utjecaj genotipske komponente u ekspresiji sadržaja ukupnih i sadržaja pojedinačnih izoflavona bio dovoljno velik za učinkovito poboljšanje genotipova, iako se prema istraživanju Akond i suradnika (2014.b) sadržaj izoflavona u soji smatra svojstvom umjerene heritabilnosti. Mogućnost poboljšanja sadržaja izoflavona oplemenjivanjem potvrdili su i Chiari i suradnici (2004.), Cvejić i suradnici (2011.) te Adie i suradnici (2015.).

1.1.3. Molekularni biljezi u oplemenjivanju soje

Tehnološki napreci u molekularnoj genetici koji su omogućili analizu biljnog genoma na molekularnoj razini zaslužni su za pojavu, razvoj i širenje uporabe molekularnih biljega, odnosno biljega na razini molekula DNA. Molekularni biljezi su područja DNA s točno definiranim slijedom i rasporedom nukleotida, strogo karakterističnim za različite organizme. Nasljeđuju se na isti način kao ispitivano svojstvo i koriste kao selekcijsko mjerilo (Vratarić i Sudarić, 2008.; Sudarić i sur., 2010.). Značaj molekularnih ili DNA biljega je u mogućnosti izravnog određivanja genotipa, isključujući utjecaj okoline. Osim toga, u odnosu na morfološke i biokemijske, prednosti molekularnih biljega su u mogućnosti analize iz vrlo male količine tkiva u bilo kojem stadiju razvoja bez nužnog uništavanja biljke, mogućnosti boljeg praćenja genetske varijabilnosti te njihov neograničen broj (Sudarić i sur., 2010.). U velikim oplemenjivačkim programima soje u svijetu, molekularni biljezi se koriste rutinski za genetsku karakterizaciju germplazme i brzu detekciju divergentnosti materijala, pri izboru roditeljskih komponenti i za procjenu heterotičnog učinka na temelju genetske udaljenosti u programima križanja, za identifikaciju poželjnih genotipova u ranim generacijama i praćenje introgresije te za otkrivanje gena, odnosno za DNA tipizaciju (engl. - *DNA fingerprinting*), mapiranje gena, povratna križanja i selekciju potpomognutu biljezima (MAS - engl. *Marker Assisted Selection*) (Mladenović Drinić i sur., 2008.; Sudarić i sur., 2008., 2010., 2011.). Uporabna vrijednost molekularnih biljega ovisi o njihovoj pouzdanosti (ponovljivosti rezultata analize), univerzalnosti (neovisnost o specifičnom biljnom materijalu), razini uočenog polimorfizma, kodominantnosti, raspodjeli biljega po genomu te poziciji na genskoj mapi. Procjena genetske divergentnosti cijelog genoma soje započela je 1980-ih godina uz pomoć RFLP tehnologije (RFLP - engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* - polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka) (Apuya i sur., 1988.). Kasnije analize za utvrđivanje genetske divergentnosti kod kultivirane soje i njenih divljih srodnika uključuju RAPD (RAPD - engl. *Randomly Amplified Polymorphic DNA* – nasumično amplificirana polimorfna DNA), AFLP (AFLP - engl. *Amplified Fragment Length Polymorphism* – polimorfizam dužine amplificiranih ulomaka) i SSR biljege (Cregan, 2008.).

Iako su danas svi navedeni biljezi u uporabi, a odabir ovisi o planiranoj primjeni, troškovima razvoja, opreme i analiza te mogućnosti automatizacije postupka odnosno

njegovoj jednostavnosti (Sudarić i sur., 2011.), za proučavanje genetske udaljenosti različitih biljnih vrsta najčešći su izbor SSR biljezi tj. mikrosateliti (Park i sur., 2009.). Mikrosateliti čine područja DNA (dužine obično 2-5 baznih parova) koja se sastoje od uzastopnih ponavljanja kratkih sljedova nukleotida (Sudarić i sur., 2011.). Polimorfizam je kod ovih biljega detektiran preko broja ponovljenih kratkih sekvenci nakon umnažanja u lančanoj reakciji polimeraze (PCR - engl. *Polymerase Chain Reaction*) uz pomoć početnica koje ograničavaju lokus satelitske DNA (Sudarić i sur., 2011.). Kod soje su najčešći motivi: AT, ATT, TA, TAT, CT i CTT (Mohan i sur., 1997.). Uporaba SSR biljega na soji započela je kada su dvije grupe znanstvenika (Akkaya i sur., 1992.; Morgante i Olivieri, 1993.), istovremeno početkom 1990-ih za njih utvrdili visoku razinu polimorfizma, kodominantnost i specifičnost za lokus. Prvi veliki set od preko 600 SSR biljega razvili su i u integriranu mapu genoma soje uvrstili Cregan i suradnici (1999.), a nešto kasnije su slijedile mape koje su izradili Wu i suradnici (2001.), Yamanaka i suradnici (2001.) te Song i suradnici (2004.). SSR biljezi se na soji koriste za DNA tipizaciju, mapiranje gena, istraživanja divergentnosti germplazme, populacijsku genetiku i selekciju potpomognutu biljezima (Panthee i sur.; 2006.; Wang i sur., 2006.; Shultz i sur., 2007.; Vuong i sur., 2007.; Tavaud-Pirra i sur., 2009.; Sudarić i sur., 2009.).

Selekcija potpomognuta biljezima konceptijski je utemeljena na povezanosti gena biljega i gena odgovornih za agronomski važna svojstva, odnosno predstavlja indirektnu selekciju na neko svojstvo pri čemu se kao selekcijsko mjerilo koristi molekularni biljeg koji se nasljeđuje na isti način kao i svojstvo od interesa. Selekcija biljaka se provodi preko „molekularnog fenotipa“, koji se obično utvrđuje metodama laboratorijske analize genomske DNA. U okvirima svjetske znanosti MAS je jedna od najznačajnijih pomoćnih metoda oplemenjivačkih programa, a početak razvoja ovog koncepta započeo je sredinom 1980-ih godina na kukuruzu (Edwards i sur., 1987.) i rajčici (Weller i sur., 1988.). U slučaju soje, u širokoj praksi, selekcija potpomognuta biljezima se prvo počela upotrebljavati pri oplemenjivanju na otpornost prema cist nematodi, a zatim i u oplemenjivanju na otpornost prema ostalim bolestima i štetnicima kao što su iznenadno ugibanje biljaka (Njiti i sur., 2002.), smeđa trulež stabljike – *Phialophora gregata* (Bachman i sur., 2001.), trulež korijena i stabljike – *Phytophthora megasperma* (Demirbas i sur., 2001.), bijela trulež korijena i stabljike – *Sclerotinia sclerotiorum* (Arahana i sur., 2001.), nematode *Meloidogyne spp.* (Tamulonis i sur., 1997.) te *Helicoverpa zea* (Boddie) (Rector i sur., 2000.). Uporaba biljega

u selekcijskom procesu povećava mogućnost identifikacije superiornih genotipova te omogućava oplemenjivanje na poboljšanje agronomski važnih svojstava uključujući i svojstava koja su u negativnoj korelaciji (Dekkers i Hospital, 2002.; Todorovska i sur., 2010.). Kombiniranje pouzdane procjene fenotipa i MAS-a iznimno je važno za transfer poželjnih alela pri jednostavnom povratnom križanju s elitnom germplazmom. Uporaba MAS-a za introgresiju može smanjiti broj ciklusa oplemenjivanja te time povećati učinkovitost same selekcije. Također, molekularni biljezi nam omogućavaju identificiranje i mapiranje lokusa kvantitativnih svojstava (QTL - engl. *Quantitative Trait Loci*), tj. lokusa odgovornih za genetsku varijabilnost svojstava koja se nasljeđuju kvantitativno. Ispoljavanje kvantitativnih svojstava značajno ovisi o uvjetima sredine te su za njihovo oplemenjivanje neophodni višegodišnji i višelokacijski poljski pokusi s ponavljanjima, što je iznimno skupo i vremenski zahtjevno pa se uporabom genetskih biljega za utvrđivanje prisutnosti ili odsutnosti određenih QTL-ova oplemenjivački postupak ubrzava uz značajno smanjenje troškova (Sudarić i sur., 2011.). Tako su u brojnim populacijama mapirani i lokusi za apsolutnu masu (Hayten i sur., 2004.; Moongkanna i sur., 2011.), koncentraciju bjelančevina i ulja (Chapman i sur., 2003.; Fasoula i sur., 2004.; Jun i sur., 2008.; Eskandri i sur., 2013.), masnih kiselina (Murphy, 2006.; Akond i sur., 2014.a; Priolli i sur., 2014.; Fan i sur., 2015.), šećera (Maughan i sur., 2000.; Yang i sur., 2014.; Akond i sur., 2015.) i izoflavona (Zeng i sur., 2009.; Liang i sur., 2010.; Akond i sur., 2014.b; Wang i sur., 2014.).

Mikrosateliti, koji su odabrani i za ovo istraživanje, su kodominantni, raspoređeni po cijelom genomu, specifični za određeni lokus, imaju visoku razinu polimorfizma, pouzdanosti i ponovljivosti rezultata, a za rad su potrebne male količine izolirane DNA (Ristova i sur., 2010.). Osim navedenog, ovi biljezi imaju i viši informacijski sadržaj po lokusu od ostalih biljeg-sustava (RFLP, AFLP, RAPD), a procjene genetske sličnosti temeljene na RFLP, AFLP i SSR biljezima su visoko korelirane što ukazuje na sukladnost između navedenih sustava biljega (Powell i sur., 1996.; Karp i sur., 1997.). Nedostaci primjene SSR sustava su potrebno poznavanje sekvence DNA koja omeđuje mikrosatelitni lokus radi konstrukcije početnica, a same početnice su specifične ovisno o vrsti i ako ne postoje potrebno ih je razviti što je vrlo skupo (Sudarić i sur., 2011.).

1.2. Cilj istraživanja

1.2.1. Hipoteza

Pretpostavka je da će rezultati analize svojstava kvalitete zrna soje pokazati varijabilnost ispitivane germplazme soje te da će se moći izdvojiti genetski udaljeni genotipovi poželjnih svojstava kvalitete za izradu specifičnih programa križanja s ciljem stvaranja superiornih genotipova za ciljane svojstva kvalitete.

1.2.2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. procjena genetske varijabilnosti svojstava kvalitete zrna i genetske udaljenosti germplazme soje na temelju izračuna mase 1000 zrna te kemijskih analiza zrna,
2. procjena genetske varijabilnosti svojstava kvalitete zrna i genetske udaljenosti germplazme soje uz pomoć SSR biljega,
3. odabir genotipova s poželjnim svojstvima kvalitete zrna,
4. identifikacija najudaljenijih genotipova s poželjnim svojstvima kvalitete kao potencijalnih roditeljskih kombinacija za buduće programe križanja u smjeru razvoja visokoprinosnih sorti soje.

2. MATERIJAL I METODE RADA

2.1. Biljni materijal

Istraživanja su provedena na 22 genotipa soje (*Glycine max* L. Merr.) koji su odabrani s ciljem pokrivanja svih grupa zriobe (GZ) koje se uzgajaju u našim uvjetima, a različiti su prema godini priznavanja, rodoslovlju, morfološkim te kvalitativnim svojstvima što osigurava veću divergentnost germplazme.

Devetnaest genotipova je u vlasništvu Poljoprivrednog instituta Osijek (PIO), od toga je 18 priznatih sorti te jedna linija. U istraživanje je uvrštena i jedna sorta Hrvatskog stočarsko selekcijskog centra iz Zagreba (HSSC), jedna sorta Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo iz Novog Sada, Srbija (NI NS), u Hrvatsku introducirana te upisana na Sortnu listu 2008. godine, te jedna introdukcija nastala na Sveučilištu u Guelph-u (SG), Guelph, Ontario, Kanada (tablica 1). Podatci o rodoslovlju su prikupljeni temeljem matičnih knjiga PIO i usmenih priopćenja (tablica 1).

Tablica 1. Grupa zriobe, godina priznavanja, podrijetlo i rodoslovlje genotipova soje korištenih u istraživanju.

Br.	Genotip	Grupa zriobe	Godina priznavanja	Podrijetlo	Rodoslovlje
1.	LIKA	I	1989.	PIO	(L-39/80 x Corsoy) x L-48/02
2.	NADA	0	1994.	PIO	L-AA-16/84 x Drava
3.	PODRAVKA 95	0-I	1995.	PIO	(Corsoy x L-360R) x (0619 x CM-048)
4.	IKA	0-I	1998.	PIO	(Tisa x L-15/04) x OS-C-600
5.	ANICA	0	1998.	PIO	(OS-266 x Hodson) x L-116
6.	JULIJANA	0	2003.	PIO	Tisa x L-20-24
7.	ZORA	0-I	2003.	PIO	(Sava x L-15/04) x OS-C-600
8.	VITA	0	2005.	PIO	Kuna x Drina
9.	KORANA	00	2006.	PIO	L-57/95 x L-98 RC
10.	LUCIJA	00-0	2006.	PIO	(Bara x LR-66) x LR-66
11.	TOMA	0	2008.	PIO	RL-314/95 x Ika
12.	TENA	0-I	2008.	PIO	(L-39 x L-38)/94 x Ika
13.	SANDA	0	2009.	PIO	Ika x Kuna
14.	MARA	0-I	2009.	PIO	Ika x Kaja
15.	SEKA	0-I	2010.	PIO	Kuna x L-288/95
16.	SARA	0-I	2010.	PIO	Podravka 95 x L-90-92/94
17.	EMA	00-0	2010.	PIO	OS-30 x L-30/90
18.	SONJA	0	2011.	PIO	Ika x L-93/99
19.	OS-60-06	0-I	-	PIO	(RL-23/95 x L-42) x Ika
20.	GORDANA	II	1987.	HSSC	-
21.	ALISA	I	2005.	NI NS	-
22.	SG-1	0	2008.	SG	-

2.2. Poljski pokusi

Trogodišnji poljski pokus (2010. - 2012.) je postavljen na površinama Poljoprivrednog instituta Osijek po blok metodi sa slučajnim rasporedom varijanti u dva ponavljanja (slika 1). Pokusne parcele su svake godine sijane sijačicom u četiri reda, a površina svake parcele iznosila je 10 m². Ukupno je svake godine posijano 44 parcele, odnosno 440 m².

Na pokusima su tijekom vegetacije provedene redovne mjere uređenja i zaštite, a nakon žetve od ukupno požete količine zrna, svake se godine uzimao prosječan uzorak za

određivanje koncentracije bjelančevina i ulja (1 kg po parceli). Iz tih uzoraka su se, nakon nedestruktivne analize, prema protokolima radili pojedinačni radni uzorci za masu 1000 zrna, analizu koncentracije masnih kiselina, koncentracije oligosaharida i sadržaja izoflavona.



Slika 1. Poljski pokus postavljen u 2010. godini na pokusnom polju PIO (foto original; M. Matoša Kočar)

2.2.1. Pedološki uvjeti

Prema Hidropedološkoj studiji s idejnim rješenjem navodnjavanja proizvodnih površina Poljoprivrednog instituta Osijek (Romić i sur., 2006.), tip tla na površinama Poljoprivrednog instituta Osijek na kojima je pokus bio postavljen 2010. i 2012. godine je humofluvisol černozemni, srednje duboko oglejeni, nekarbonatan, praškasto, glinasto ilovast. Sadržaj čestica gline u oraničnom sloju iznosi oko 30 %, a praha 48 %. Makroagregati su do dubine 40 cm nestabilni dok su mikroagregati vrlo stabilni, a cijeli površinski horizont je vrlo plastičan i vrlo porozan (49 vol. % pora). Apsolutni kapacitet tla za vodu je osrednji (39 vol %), a kapacitet za zrak umjereno mali (10 vol. %). Po kemijskim karakteristikama, tlo je u površinskom sloju slabo kiselo (pH u 1 MKCl-u je 6,24), a sadržaj

humusa je od 2,12 – 3,05 %, odnosno slabo humusno. Tlo je dobro opskrbljeno dušikom čiji je sadržaj dosta ujednačen i kreće se od 0,12 – 0,14 %. Prosječna opskrbljenost fiziološki aktivnim fosforom je umjerena do dobra (16,39 mg P₂O₅/100 g tla), a količine fiziološki aktivnog kalija su vrlo velike (22,60 – 42,22 mg K₂O/100 g tla). Stupanj zasićenosti adsorpcijskog kompleksa bazama je u površinskom sloju visok i iznosi u prosjeku 87,75%.

Druge godine istraživanja (2011.) pokus je bio postavljen na humofluvisolu, plitko oglejenom, nekarbonatnom, praškasto, glinasto ilovastom koji se nalazi na najnižim formama reljefa gdje su površinske vode sporo procjedne. Razina podzemnih voda kod viška oborina može doći do podoraničnog sloja i spojiti se s površinskim vodama što uzrokuje izraženo oglejavanje u podoranicima. Površinski horizont je po teksturnom sastavu praškasto glinasta ilovača sa sadržajem gline od 31 - 32 %, a sadržajem praha od oko 67 %. Stabilnost makroagregata je do dubine od 35 cm potpuno nestabilna, a mikroagregata vrlo stabilna. Tlo je vrlo plastično te malo porozno do porozno (46 vol. % pora). Apsolutni kapacitet tla za vodu je osrednji (38 vol %), a kapacitet za zrak na granici malog do umjereno malog (8 vol. %). Tlo je u površinskom sloju kiselo (pH u 1 MKCl-u je 5,20), a po sadržaju humusa je slabo humusno, ali vrlo blizu grupe dosta humusnih tala (2,40 – 2,88 %). Sadržaj dušika ovo tlo svrstava u grupu dobro opskrbljenih tala (0,13 %), prosječna vrijednost fiziološki aktivnog fosfora je na granici slabe i umjerene opskrbljenosti (11,40 mg P₂O₅/100 g tla) dok je prosječna opskrbljenost fiziološkim aktivnim kalijem bogata do vrlo bogata (27,10 mg K₂O/100 g tla), ali ove vrijednosti variraju ovisno o mjestu uzorkovanja. Stupanj zasićenosti adsorpcijskog kompleksa bazama je u površinskom sloju visok i iznosi u prosjeku 77,50 %.

2.2.2. Primijenjena agrotehnika

Svake godine istraživanja primijenjena agrotehnika je bila jednaka. Osnovna obrada tla obavljena je u jesen oranjem na dubinu od 30 - 35 cm, u proljeće se obavljalo zatvaranje zimske brazde i ravnanje tla, a neposredno pred sjetvu predstetvena priprema kombiniranim sjetvospremačem. Za gnojidbu se koristilo 300 kg/ha N:P:K 7:20:30 te 100 kg/ha uree. Sjetva je obavljena Hege 95 b sijačicom, prve godine (2010.) 26. travnja, druge godine (2011.) 18. travnja i treće godine (2012.) 13. travnja. Razmak između redova je bio 50 cm, a razmak unutar reda 2-3 cm. Dužina parcela je bila 5 m.

Sjeme je prije sjetve tretirano preparatom koji sadrži kvržične bakterije *Brayrhizobium japonicum*. Nakon sjetve površina je tretirana herbicidom s aktivnom tvari S-metolaklor (0,8 l/ha) i herbicidom s aktivnom tvari metribuzin (0,6 kg/ ha) u kombinaciji. Tijekom vegetacije obavljena je jedna međuredna kultivacija (odmah nakon faze prve troliske), nakon čega je korov plijevljen ručno, odnosno okopavanjem po potrebi. Žetva je obavljena Wintersteiger Classic Plot kombajnom u vrijeme pune zriobe.

2.2.3. Klimatski uvjeti

Prema Köppenovoj klasifikaciji klime (Penzar i Penzar, 2000.; Šegota i Filipčić, 2003.) područje Osijeka ima oznaku Cfb što predstavlja umjereno toplu vlažnu klimu s toplim ljetom. Godišnja amplituda temperature zraka u Osijeku iznosi 22,2°C (prosjek 1961. - 1990.), srednja temperatura najtoplijeg mjeseca u godini je najčešće niža od 22°C, a više od četiri mjeseca u godini imaju srednju mjesečnu temperaturu višu od 10°C, s puno kiše početkom ljeta, dok je u kasnom ljetu malo oborina.

Tablica 2. Srednje mjesečne temperature zraka (°C) na području Osijeka za vegetacijske godine od 2010., 2011. i 2012. te višegodišnji prosjek (1961. - 1990.).

Srednja mjesečna temperatura zraka u °C				
Mjesec/Godina	1961. - 1990.	2010.	2011.	2012.
Travanj	11,3	12,4	13,6	12,7
Svibanj	16,5	16,9	17,1	17,4
Lipanj	19,5	20,9	21,5	23,0
Srpanj	21,1	24,0	22,7	25,3
Kolovoz	20,3	22,2	23,6	24,8
Rujan	16,6	15,8	20,5	19,2
Prosjek	17,6	18,7	19,8	20,4

Klimatski podatci o srednjim mjesečnim temperaturama zraka i oborinama po mjesecima travanj, svibanj, lipanj, srpanj, kolovoz i rujna s mjerne stanice Osijek-Klisa za razdoblje od travnja 2010. do rujna 2012. te višegodišnjim prosjecima istih parametara (1961. - 1990.) dobiveni su od Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ) i prikazani u tablici 2 i tablici 3.

Tablica 3. Ukupne oborine (mm) na području Osijeka za vegetacijske godine 2010., 2011. i 2012. te višegodišnji prosjek (1961. - 1990.).

Ukupna količina oborina u mm				
Mjesec/Godina	1961. - 1990.	2010.	2011.	2012.
Travanj	53,8	62,7	14,1	65,6
Svibanj	58,5	124,2	91,7	102,0
Lipanj	88,0	192,0	36,2	44,4
Srpanj	64,8	68,6	58,6	32,1
Kolovoz	58,5	41,1	1,0	6,4
Rujan	44,8	95,7	18,3	25,5
Ukupno	368,4	584,3	219,9	276

Prva vegetacijska godina pokusa (2010.) imala je srednje mjesečne temperature za sve mjesece osim rujna, iznad višegodišnjeg prosjeka za razdoblje 1961. – 1990. (tablica 2). Prema analizi raspodjele percentila, temperaturne prilike za mjesece travanj i lipanj svrstane su u kategoriju toplo, za mjesec svibanj u kategoriju normalno, mjeseci srpanj i kolovoz su svrstani u kategoriju vrlo toplo, a rujnan u kategoriju hladno. Količine oborina za sve prikazane mjesece osim za kolovoz bile su više od višegodišnjeg prosjeka za razdoblje 1961. - 1990. (tablica 3), a ljeto je svrstano u kategoriju ekstremno kišno. Mjesec travanj je prema analizi raspodjele percentila svrstan u kategoriju kišno, mjeseci svibanj, kolovoz i rujnan u kategoriju vrlo kišno, lipanj je svrstan u kategoriju ekstremno kišno dok je srpanj svrstan u kategoriju normalno (DHMZ).

U drugoj vegetacijskoj godini pokusa (2011.), koja je bila toplija od prethodne, temperature su bile iznad višegodišnjeg prosjeka za razdoblje 1961. – 1990. (tablica 2). Prema analizi raspodjele percentila, temperature za mjesece travanj, lipanj i srpanj svrstane su u kategoriju toplo, svibanj je kao i 2010. godine svrstan u kategoriju normalno, dok su kolovoz i rujnan svrstani u kategoriju ekstremno toplo. Ukupne oborine su u svim mjesecima osim u svibnju bile manje od višegodišnjeg prosjeka za razdoblje 1961. - 1990. (tablica 3). Mjeseci travanj i kolovoz su prema analizi raspodjele percentila za količinu oborina svrstani u kategoriju vrlo sušno, lipanj i rujnan u kategoriju sušno, srpanj je svrstan u kategoriju normalno, a svibanj u kategoriju kišno (DHMZ).

Treća godina (2012.) bila je još toplija od prethodne dvije (tablica 2). Prema analizi raspodjele percentila, temperaturne prilike za mjesec travanj svrstane su u kategoriju toplo, svibanj u kategoriju normalno, razdoblje od lipnja do početka rujna u kategoriju ekstremno

toplo, dok je rujan pripadao kategoriji vrlo toplo. Ukupne oborine su samo u travnju i svibnju bile više od višegodišnjeg prosjeka (1961. - 1990.) (tablica 3). Količine oborina u mjesecima travanj, lipanj, srpanj i rujan su prema analizi raspodjele percentila svrstani u kategoriju normalno, svibanj je prema količini oborina svrstan u kategoriju kišno, a kolovoz u kategoriju ekstremno sušno (DHMZ).

2.3. Apsolutna masa zrna

Apsolutna masa zrna predstavlja masu 1000 zrna ispitivanog uzorka uzetog iz frakcije „čisto sjeme“, izraženu u gramima. Ispitivanje mase 1000 zrna provedeno je u svakoj godini istraživanja nakon žetve, u laboratoriju Poljoprivrednog instituta Osijek prema Pravilniku o metodama uzorkovanja i ispitivanja kvalitete sjemena (NN 99/08). Brojačem zrna se odbrojvalo osam puta po 100 zrna iz radnog uzorka za svaku parcelu, uzorci su se potom vagali nakon čega su izračunate varijanca (σ^2), standardna devijacija (σ) i koeficijent varijacije (CV) prema formulama (Horvat i Ivezić, 2005.):

$$\sigma_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n} - \bar{x}^2$$

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$$

gdje je:

x_i – vrijednost jedinica promatranja

n – ukupni broj podataka članova uzorka ili skupa

Ako varijacijski koeficijent nije prelazio 4,0 % izračunao se rezultat, odnosno srednja vrijednost (\bar{x}) osam mjerenja. Kada je varijacijski koeficijent prelazio navedeni limit, uzorkovanje i cijeli postupak su se ponavljali, tj. vagalo se novih osam ponavljanja, a

standardna devijacija se izračunavala za ukupnih 16 ponavljanja, uz izdvajanje svakog ponavljanja koje je odudaralo od prosjeka za više od dvostruke standardne devijacije. Nakon izračunavanja prosječne mase 100 zrna za svaki genotip po ponavljanju i godini, dobivena vrijednost se množila s 10 kako bi dobili masu 1000 zrna.

2.4. Kemijske analize

Sve kemijske analize obavljene su u laboratoriju Poljoprivrednog instituta Osijek.

2.4.1. Koncentracija bjelančevina i ulja

Koncentracija bjelančevina i ulja u zrnu određivala se iz jednog kilograma prosječnog uzorka zrna po parceli na uređaju Foss Infratec™ 1241 Grain Analyzer (Foss Tecator AB, Švedska) i izražavala u % na bazi apsolutno suhe tvari (AST). Nedestruktivna analiza temelji se na metodi bliske infracrvene transmisije (NIT) propuštanjem cijele šarže zrna kroz navedeni uređaj. Metoda bliske infracrvene transmisije temelji se na činjenici da glavni sastojci zrna apsorbiraju elektromagnetsko zračenje u području bliskog infracrvenog spektra. Mjerenjem količine transmitiranog zračenja i matematičkom obradom spektralnih podataka određuje se udio pojedinih tvari u zrnu, i određeni fizikalno-kemijski i tehnološki parametri zrna (Infratec 1241 Grain Analyzer User Manual, Foss Tecator AB, Švedska, 1992.).

2.4.2. Koncentracije masnih kiselina

U okviru laboratorijskih analiza utvrđivale su se koncentracije različitih masnih kiselina, standardnih za soju: miristinska (14:0), palmitinska (16:0), stearinska (18:0), oleinska (18:1), linolna (18:2), linolenska (18:3), arahidska (20:0), behenijska (22:0), eručna (22:1), ali su se za daljnju statističku obradu uzimali samo rezultati koncentracije palmitinske, stearinske, oleinske, linolne i linolenske masne kiseline izražene u % od ukupne količine masnih kiselina.

Za određivanje koncentracije masnih kiselina u zrnu soje prvo se ekstrahiralo ulje iz uzoraka metodom po Soxhletu (1879.). Samljeveni uzorak se stavljao u tuljak za ekstrakciju, a za otapanje se koristio dietileter koji sadrži butilhidroksitoluen (BHT) kao antioksidans.

Nakon toga su se, prema metodi HR EN ISO 5509:2004, iz ulja dobivenog ekstrakcijom pomoću bortrifluorida (BF_3) pripremali metilesteri masnih kiselina. Sastav masnih kiselina određivao se na sustavu Shimadzu GC-2010 Plus i softveru Lab solution GC Solution (verzija 2.32.00, Shimadzu, Japan). Masne kiseline su se razdvajale prema broju ugljikovih atoma i broju dvostrukih veza te identificirale usporedbom retencijskog vremena sa standardnom smjesom metilestera masnih kiselina (AOCS FAME standard #3, Restek, SAD). Kvantificiranje se obavljalo iz površina pika, metodom normalizacije površine.

2.4.3. Koncentracije saharida

Za određivanje koncentracija različitih saharida koristila se prilagođena HPLC metoda po Giannoccaro i suradnicima (2006.). Prema toj metodi optimalna ekstrakcija topivih šećera postiže se uporabom vode kao otapala na 25°C kroz 15 min. Za identifikaciju i kvantifikaciju koriste se: verbaskoza, stahioza, rafinoza, saharoza, glukoza, galaktoza i fruktoza. Ekstrahirani uzorak se centrifugirao, a nakon centrifugiranja u novu epruvetu se odpipetirao čisti supernatant. Dodavao mu se acetonitril za taloženje topivih bjelančevina i ostavljalo se da stoji 2 sata. Smjesa se nakon toga centrifugirala, a supernatant se odvajao u okruglu tikvicu i uparavao na rotavaporu do suhog, te razrjeđivao s vodom i prenosio u odmjernu tikvicu. Neposredno prije analize uzorak se profiltrirao kroz najlon filter. Hidrolizirani uzorci su se analizirali na PE HPLC uređaju. Iz površina pika izračunavala se količina identificiranog šećera metodom eksternog standarda. Za daljnju statističku obradu koristile su se vrijednosti koncentracije izražene u % na bazi apsolutno suhe tvari (AST) za stahiozu, rafinozu, saharozu, glukoza, fruktozu te ukupne saharide i ukupne oligosaharide.

2.4.4. Sadržaj izoflavona

Za određivanje sadržaja izoflavona prilagođena je HPLC metoda po Vyn i suradnicima (2002.). Prema toj metodi, 12 izoflavona se kiselinskom hidrolizom prevodilo do svog aglikonskog oblika (daidzein, glicitein i genistein) čiji je zbroj dao sadržaj ukupnih izoflavona. Za identifikaciju i kvantifikaciju izoflavona koristila su se tri standarda aglikona (daidzein, glicitein i genistein) te β -naftol (interni standard). Standardi su se pripremali otapanjem u etanolu i dopunjavanjem etanolom. Uzorci samljevene soje su vagani i stavljeni u plastične epruvete s čepom, dodavao im se EtOH, otopina β -naftola i koncentrirana HCl.

Ovako pripremljeni uzorci su se hidrolizirali u vodenoj kupelji, a zatim hladili i centrifugirali. Bistri alikvoti su se profiltrirali kroz PTFE filter u vialice. Hidrolizirani uzorci su se zatim analizirali na PE HPLC uređaju, a količina identificiranog aglikona se izračunavala metodom internog standarda iz površine pika i izražavala se u mg/100 g suhe tvari.

2.5. Molekularne analize

Molekularne analize provedene su u Laboratoriju za biljnu genetiku i biotehnologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku pomoću mikrosatelitnih biljega.

2.5.1. Uzgoj klijanaca i izdvajanje genomske DNA

Za izdvajanje genomske DNA korištena je modificirana cetiltrimetilamonij bromid (CTAB) metoda koju su opisali Doyle i Doyle (1990.). Modifikacije protokola za izdvajanje genomske DNA su se odnosile na povećanje količine dodanog izolacijskog pufera te povećanja dužine kuhanja u kupelji. Količina SEVAGA (kloroform izoamil alkohola), smanjena je prije odvajanja supernatanta. Postupak ispiranja DNA je napravljen po Nabisulfit metodi, a isparavanje etanola iz uzorka obavljeno je u laminaru umjesto u sušioniku.

Za izdvajanje genomske DNA u plateniku se naklijavalo osam zrna soje po genotipu. S biljaka koje su bile stare 2 tjedna uzimala se jedna mlada i zdrava troliska, nakon čega su se listovi odvajali od peteljki i zajedno sušili smrzavanjem tekućim dušikom te mljeli u fini prah drobljenjem tučkom u tarioniku. Uzorcima biljnog materijala za svaki genotip dodavalo se 1000 μ l 2 %-tne CTAB puferske otopine (1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M Na₂EDTA pH 8,0; 5 M NaCl; 10 % SDS) prethodno ugrijane u vodenoj kupelji na 68 °C. Sadržaj se prebacivao u Eppendorf mikro epruvete koje su stavljane na Vortex kako bi se uzorci homogenizirali, potom su epruvete 45 minuta stajale u vodenoj kupelji temperature 65 °C uz povremeno okretanje rukom. Mikro epruvete su nakon inkubacije stavljane u posudu s ledom i svakom uzorku je dodano 670 μ l SEVAG-a (kloroform/izoamil alkohol 24:1), nakon čega su mućkane na stalku tijekom 30 minuta. Nakon mućkanja slijedilo je centrifugiranje na maksimalnoj brzini (14 000 o/min) tijekom 7-8 minuta. Mikro epruvete su pažljivo vađene iz centrifuge kako se disk koji je nastao ne bi raspao. Supernatant se izvlačio pipetom u novo

obilježene mikro epruvete od 2 ml. Na ovaj način izdvojeno je oko 750 μ l tekuće faze po uzorku. U uzorke se dodavalo po 16 μ l RNAze te su ostavljani na sobnoj temperaturi uz trešnju na tresilici i povremeno ručno tijekom 30 minuta. Nakon 30 minuta u uzorke je dodavano 525 μ l 0,7 V hladnog izopropanola nakon čega su se mikro epruvete lagano okretale dok DNA nije postala vidljiva. Uzorci su se u izopropanolu ostavljali stajati sat vremena uz povremeno okretanje tubica nakon čega su se centrifugirali jednu minutu na 14 000 o/min. Supernatant koji je nastao uklanjao se izlijevanjem pazeći da se pri tome ne izlije formirana peleta. U mikro epruvete je dodavano po 500 μ l 0,2 mM natrij acetata u 76 %-tnom etanolu te su iste 30 minuta lagano protresane prstima kako bi se DNA očistila od nečistoća. Nakon 30 minuta uzorci su se stavljali 2 minute na centrifugu pri 14 000 o/min, a tako izdvojeni supernatant se pažljivo izljevao. Postupak pranja taloga se ponavljao s 500 μ l amonij acetata u 76 %-tnom etanolu po uzorku. Mikro epruvete su se potom lagano 10 minuta protresale prstima, te centrifugirale tijekom jedne minute na 14 000 o/min nakon čega se supernatant izljevao, a preostali etanol se pažljivo uklanjao mikropipetom. Mikro epruvete su ostavljane otvorene tijekom 60 minuta u laminaru kako bi se osušile nakon čega im je dodavano 100 μ l TE pufera u 76 %-tnom etanolu. Nakon dodavanja TE pufera, DNA peleta se otopila tresući mikro epruvete prstom te su uzorci centrifugirani tijekom 30 s. Uzorci izolirane genomske DNA su pohranjeni na -20 °C.

2.5.2. Određivanje koncentracije i provjera kvalitete DNA

Koncentracija i kvaliteta izolirane genomske DNA provjeravane su spektrofotometrijski i gel-kvantifikacijom. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA napravljeno je mjerenjem apsorbance pri valnim duljinama $\lambda=260$ i $\lambda=280$ nm na spektrofotometru (Eppendorf BioSpectrometer®basic) u dva ponavljanja. Prilikom mjerenja kao kontrola korišten je TE pufer. Rezultati mjerenja izraženi su kao koncentracija DNA u ng/ μ l, a čistoća izolirane DNA procijenjena je pomoću omjera A260/A280 (A260 pokazuje koncentraciju nukleinskih kiselina u uzorku, a A280 pokazuje koncentraciju proteina) koji mora biti između 1,8 – 2,0 ako je DNA dovoljno čista za analizu biljega. Nakon provedenih mjerenja, pripremljeni su radni uzorci za PCR na način da je za svaki uzorak izračunata količina DNA i TE pufera za PCR razrjeđenje 1:5 prema formulama:

$$\text{DNA } (\mu\text{l}) = 20/[\text{DNA}] * 50$$

$$\text{TE 8.0 } (\mu\text{l}) = 50 - \text{DNA } (\mu\text{l})$$

Genomska DNA analizirana je i vizualizacijom na 1%-tnom agaroznom gelu horizontalnom elektroforezom u 1 x TBE puferu (10,8 g Tris-a, 5,5 borne kiseline, 4 ml 0,5M Na₂EDTA-e pH 8.0) u trajanju od 30 minuta pri 60 V. Po 1 μ l genomske DNA svakog uzorka, pomiješan je sa 6 μ l ultračiste vode i 3 μ l Takara 6X Loading Buffer za nanošenje uzorka. Osim uzorka, na gel je kao standard nanescena λ DNA unaprijed poznate koncentracije. Trake na gelu su vizualizirane Olerup SPP[®] GelRedTM Drop bojom i očitane na aparatu Syngene G:Box F3. Koncentracija DNA uzorka određena je vizualnom usporedbom s koncentracijama standarda, a kvaliteta, odnosno stupanj razgradnje pri ekstrakciji procijenjen je usporedbom traka uzorka s λ DNA, pri čemu razmazi ispod traka ukazuju na mehaničku ili kemijsku degradaciju i lošu kvalitetu.

2.5.3. Mikrosatelitni biljezi (SSR)

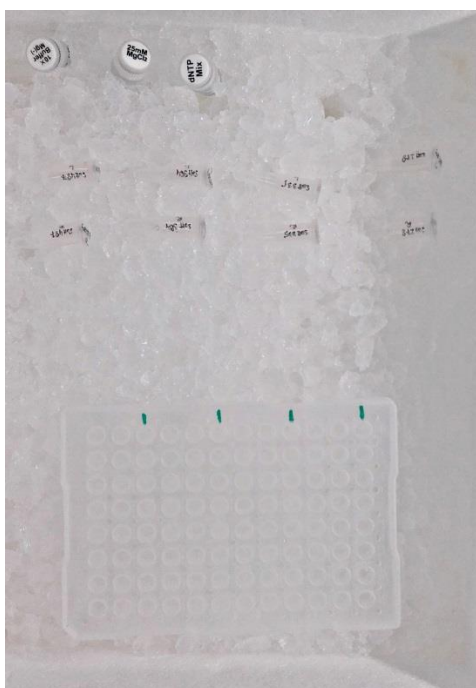
Lokusi mikrosatelitnih biljega odabrani su pregledom literature koja je sadržavala signifikantne rezultate studija povezanosti polimorfizma DNA biljega i pojedinih svojstava kvalitete zrna za soju (tablica 4), a svi koji su se koristili su prethodno mapirani i integrirani u genetske povezujuće mape za soju koje su razvili Cregan i suradnici (1999.), te Song i suradnici (2004.). Početnice korištene u analizi nalaze se u tablici 4, a naručene su iz tvrtke Metabion International AG, Njemačka.

Tablica 4. Parovi mikrosatelitnih početnica korištenih za molekularnu analizu genotipova soje (<http://www.soybase.org/>), svojstva s kojima je biljeg povezan i literaturni izvori.

Oznaka početnice	Slijed nukleotida prednje (<i>upper</i>) početnice (5' → 3')	Slijed nukleotida stražnje (<i>lower</i>) početnice (5' → 3')	Svojstva s kojima je povezan biljeg	Literaturni izvor
Sat_040	GTTCTAGTTCTTCTTTTCACTTG	TTGTCATCAAATATCATCCATTT	glicitein	Wang i sur., 2014.
Sat_103	ACTGGGAATCCATTTCTTGTTA	AAAGAACTTTCAATCAAATGTTGTG	daidzein	Wang i sur., 2014.
Sat_312	GCGCCTCCCATTACTTCGGATTAGTTA	GCGAACGCAACAAATAATCAAACATC	daidzein, genistein	Cregan i sur., 1999.
Satt186	GGGAAGTTATAAGCAGAT	GGGAATCCATTCCTGATGAGT	ulje, genistein	Priolli i sur., 2014. Wang i sur., 2014.
Satt251	CCTCCACCCCTTCCCACCCAAAA	GGTGATATCGCGCTAAAATTA	bjelančevine	Chapman i sur., 2003.
Satt273	GCGCTGATTACATTATCGCTTA	GCCTTTCGTTCTCAAAGTGAAGT	ulje, bjelančevine	Cregan i sur., 1999.
Satt277	GGTGGTGGCGGGTACTATTACT	CCACGCTTCAGTTGATTCTTACA	linolna kiselina	Priolli i sur., 2014.
Satt278	GCGCTGGTGCATTGAGAAATCTAA	GCGGATTCCGTTATCGCCAGTAAT	ulje, oligosaharidi	Kim i sur., 2005.
Satt294	GCGGGTCAAATGCAAATTATTTTT	GCGCTCAGTGTGAAAGTTGTTTCTAT	masne kiseline	Priolli i sur., 2014.
Satt313	GCGGTAAGTCATGGCTTTTTAATCTT	GCGCGAGGTATGGAACCTAACTCACA	ulje, oligosaharidi, saharoza	Kim i sur., 2005.
Satt335	CAAGCTCAAGCCTCACACAT	TGACCAGAGTCCAAAGTTCATC	ulje, bjelančevine	Cregan i sur., 1999.
Satt364	GCGGCATAAGTTTTATCCCATC	ATCGGGTCATGACTTTTGAAGA	ulje	Cregan i sur., 1999.
Satt423	TTCGCTTGGGTTCAGTACTT	GTTGGGGAATTAATAAATG	ukupni izoflavoni	Wang i sur., 2014.
Satt487	ATCACGGACCAGTTCATTTGA	TGAACCGCGTATTCTTTAATCT	masne kiseline	Priolli i sur., 2014.
Satt499	GCGGCAGAGATAATTGTATTTTTG	GCGCTGCCACTAGGGAACGAAAGATGA	izoflavoni	Cregan i sur., 1999.
Satt571	GGGTAGGGGTGGAATATAAG	GCGGGATCCGCGGATGGTCAAAG	bjelančevine	Sebolt i sur., 2000.

2.5.4. Lančana reakcija polimerazom

PCR se provodio s izoliranom DNA uz pomoć mikrosatelitnih biljega, tj. SSR biljega prema standardnom protokolu (Morgante i Olivieri, 1993.) uz prethodno optimiziranje reakcije odnosno prilagođavanje uvjetima u laboratoriju. U ukupnom volumenu od 15 μ l po reakciji sadržano je 20 ng genomske DNA (3 μ l pripremljene otopine DNA), te 12 μ l PCR miksa. PCR miks je pravljjen za svaki par početnica posebno, a količine po uzorku su bile: 1,25 μ l 10 x PCR pufera (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3) (Takara BIO Inc., Shiga, Japan), 0,1 μ l DNA polimeraze (GoTaq[®]G2 Flexi DNA Polymerase, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, SAD), 0,375 μ l svake početnice (prednje i stražnje), 1 μ l (2,5mM) dNTP-a (Takara BIO Inc, Shiga, Japan), 1,5 μ l (25mM) MgCl₂ (Takara BIO Inc, Shiga, Japan) te 7,5 μ l ultračiste vode (slika 2).



Slika 2. Priprema uzoraka za PCR
(foto original; M. Matoša Kočar)



Slika 3. Elektroforeza
(foto original; M. Matoša Kočar)

Amplifikacija je provedena na uređaju Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler i za većinu biljega sastojala se od pet ciklusa čije su temperature i trajanje ovisili o korištenim početnicama (tablica 5): 1. početni ciklus - aktivacija polimeraze; 2. ciklus - denaturacija; 3. ciklus - nalijeganje početnica; 4. ciklus - elongacija; 5. ciklus - završna elongacija. Drugi, treći i četvrti ciklus su ponavljani 30 puta. Za biljege Satt335, Satt487,

Satt364 i Satt278 amplifikacija je rađena Touchdown modificiranom PCR metodom čiji su ciklusi bili: 10 min na 5 °C, deset puta po 1 min na 94 °C, 1 min na 50 °C i 1 min na 72 °C, zatim trideset puta 40 s na 94 °C, 40 s na 40 °C i 1 min na 72 °C te završni korak od 5 min na 72 °C.

Tablica 5. Temperature i trajanje ciklusa amplifikacije za pojedine setove početnica.

Oznaka početnice	Amplifikacija									
	1. ciklus		2. ciklus		3. ciklus		4. ciklus		5 ciklus	
	°C	min	°C	min	°C	min	°C	min	°C	min
Satt273	95	2	94	45s*	57	45s*	72	1	72	1
Satt277										
Satt313										
Satt499										
Satt251	95	2	94	45s*	57	45s*	72	1	72	4
Satt571										
Satt186	94	5	94	0,5	47	0,5	72	0,5	72	5
Satt294										
Satt423										
Sat_040	94	2	94	2	58	0,5	72	1	72	8
Sat_103										
Sat_312										

* s - sekundi

2.5.5. Elektroforeza PCR-produkata

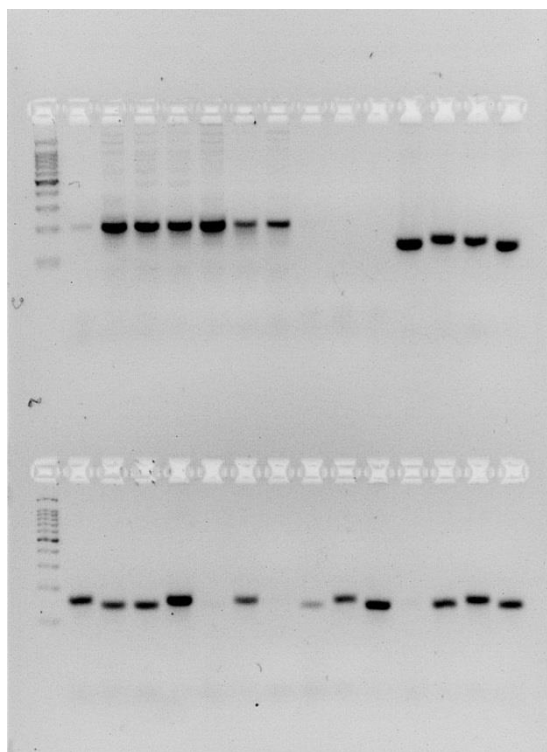
Ulomci dobiveni umnažanjem mikrosatelitnih lokusa razdvajani su na 2,5 %-tnom agaroznom gelu u 1 x TBE puferu pri 80 V, 50 mA i 40 W tijekom 60 min (slika 3). Agarozni gel je pravljjen tako da se u tikvicu od 250 ml dodalo 1,5 g agaroze (SeaKem[®] LE Agarose, Lonza, Rockland, ME, SAD) i 60 ml 1 x TBE pufera, nakon čega se otopina grijala otprilike dvije minute uz povremeno miješanje te kratko hladila pod mlazom vode. Otopini su se prije izlivanja dodavale i dvije kapi boje (Olerup SPP[®] GelRed[™] Drop).

Kao standardi za utvrđivanje duljine mikrosatelitnih početnica korišteni su obilježeni biljezi PROMEGA BenchTop ladder od 100 parova baza (Madison, WI, SAD), a svakom uzorku se nakon PCR-a dodavalo po 2 µl 6x PROMEGA Blue/Orange boje (Madison, WI, SAD) nakon čega su jažice agaroznog gela punjene s po 5 µl uzorka. Poslije elektroforeze, gelovi su slikani uređajem Syngene G:Box F3 (Syngene, Frederick, Maryland, SAD) (slike 4 i 5). Za izradu matrice podataka na temelju mikrosatelitne analize, rađena je kvantifikacija

rezultata elektroforeze uz pomoć programa Kodak 1D Molecular Image Analysis Software (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, SAD).



Slika 4. Aparat Syngene G:Box F3
(foto original; M. Matoša Kočar)



Slika 5. Slika agaroznog gela
(foto original; M. Matoša Kočar)

2.6. Statistička analiza podataka

Statistička obrada podataka istraživanja uključivala je obradu rezultata utvrđivanja mase 1000 zrna, rezultata kemijskih analiza za svojstva kvalitete zrna te rezultata molekularnih analiza.

2.6.1. Kvantitativni podatci

Za statističku analizu kvalitete zrna soje korišteni su podatci mjerenja te kemijskih analiza za sljedeća svojstva: masa 1000 zrna, koncentracija bjelančevina, koncentracija ulja, koncentracija pojedinačnih masnih kiselina standardnih za soju (palmitinska, stearinska, oleinska, linolna, linolenska), koncentracija pojedinačnih šećera (glukoza, fruktoza,

saharoza, stahioza, rafinoza, koncentracija ukupnih saharida, koncentracija ukupnih oligosaharida i sadržaj pojedinačnih izoflavona (daidzein, glicitein, genistein).

Nakon sistematizacije podataka po godinama na razini srednje vrijednosti ponavljanja za svaki genotip, od osnovnih statističkih pokazatelja za svako svojstvo utvrđena je srednja vrijednosti (\bar{x}) genotipova za svaku godinu zasebno te u prosjeku za sve tri godine pokusa (2010. – 2012.), a isto tako i minimalna vrijednost (min), maksimalna vrijednost (max), te varijanca (σ^2), odnosno standardna devijacija (σ) koje su neophodne za izračunavanje koeficijenta varijacije (CV). Spomenuti parametri izračunati su u programu MS Excel 2010 po sljedećim formulama (Horvat i Ivezić, 2005.):

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$\sigma_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n} - \bar{x}^2$$

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2}$$

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

gdje je:

x_i – vrijednost jedinica promatranja

n – ukupni broj podataka članova uzorka ili skupa

Nakon izračunavanja osnovnih mjera varijacije, napravljena je i analiza varijance (ANOVA), a genotipovi i godine međusobno su uspoređeni Fisher-ovim LSD testom na razini značajnosti $P < 0,05$ i $P < 0,01$ u programu SAS 9.3 pri čemu ponavljanje nije uzeto u obzir jer nije bilo statistički značajno niti za jedno svojstvo kroz tri godine.

U svrhu izrade matrice udaljenosti genotipova na temelju euklidske udaljenosti napravljena je standardizacija srednjih vrijednosti pokusa za istraživana svojstva prema Roldan-Ruiz i suradnicima (2001.) pomoću formule:

$$y_i^{STD} = \frac{y_i - \bar{y}_i}{s(y_i)}$$

gdje je:

y_i^{STD} – standardizirano svojstvo y_i

y_i – prosječna vrijednost svojstva za i -ti genotip prije standardizacije ($i = 1, 2, 3, \dots, I$)

\bar{y}_i – prosjek datog svojstva

$s(y_i)$ – standardna devijacija datog svojstva za i -ti genotip

Matrica udaljenosti genotipova napravljena je na temelju vrijednosti euklidske udaljenosti izračunate prema Roldan-Ruiz i suradnicima (2001.) u računalnom programu PAST 3.0 (Hammer i sur., 2001.) pomoću formule:

$$D_{ij} = \frac{[\sum_i^p (x_{im} - x_{jm})]^2}{4M}$$

gdje je:

D_{ij} – euklidska udaljenost između vrijednosti individua x_i i x_j po varijabli x_m

M – ukupni broj svojstava

$4M$ – normalizirajuća konstanta

Izračunate udaljenosti analiziranih genotipova grupirane su neponderiranom metodom za sparivanje skupina na temelju prosječnih vrijednosti (eng. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* - UPGMA).

Za procjenu varijabilnosti sadržane u izvornoj matrici udaljenosti napravljena je analiza glavnih sastavnica (eng. *Principal Component Analysis* - PCA) uz pomoć NTSYS-pc 2.10s (Rolf, 2005.) računalnog programa. Analiza glavnih sastavnica je metoda kojom se uklanjaju međuodnosi komponenata te smanjuje set podataka čime se veći broj međusobno povezanih varijabli pretvara u manji broj umjetno stvorenih i međusobno nezavisnih. Temeljem izračunate matrice korelacija između svojstava, izračunate su svojstvene vrijednosti i vektori. U koordinatnom sustavu zadanom s osima glavnih sastavnica, na temelju istraživanih genotipova i svojstava, napravljen je 2D PCA graf, odnosno biplot.

2.6.2. Molekularni podatci

Kako bi procijenili genetsku raznolikost i informativnost biljega izračunati su ukupan broj alela ($\sum N_a$), prosječan broja alela po lokusu (N_a), genetska raznolikosti (H_E) prema Nei-u (1973.) i informacijski sadržaj polimorfizma (eng. *Polymorphism Information Content* - PIC) za svaki mikrosatelitni lokus uz pomoć računalnog programa PowerMarker 3.25 (Liu i Muse., 2005.)

Genetska raznolikost (H_E) odnosno genetski varijacijski koeficijent prema Nei-u (1973.) predstavlja udio jedinki u populaciji koje bi nakon jedne generacije slobodne oplodnje bile heterozigotne, tj. to je vjerojatnost da su dva nasumično odabrana alela iz populacije međusobno različita. Na nju utječe razina ujednačene učestalosti različitih alela, ali rijetki aleli ne doprinose u značajnoj mjeri njenom rastu. Procijenjena je za svaki biljeg po formuli:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2$$

gdje je:

p_i – učestalost alela i

I – ukupan broj alela.

PIC vrijednost je mjera za broj alela koje biljeg posjeduje, a ovisi o razini učestalosti različitih alela pri čemu aleli vrlo često nemaju utjecaja na rast PIC vrijednosti. Izračunava se za svaki biljeg po formuli (Vaz Patto i sur., 2004.):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2 - 2 \sum_{i=j+1}^I \sum_{j=1}^{I-1} p_i^2 p_j^2$$

gdje je:

p_i, p_j – učestalost alela i i j

I – ukupan broj alela.

Vrijednosti genetskog varijacijskog koeficijenta prema Nei-u (1973.) izračunate temeljem ishodišne matrice umnoženih alela izraženih brojem parova baza koristile su se za

izradu matrice genetske udaljenosti ispitivanih genotipova. Kako bi se grafički prikazala genetska raznovrsnost sorata, napravljen je UPGMA dendrogram (Sneath i Sokal, 1973.) u statističkom programu R 3.3.1. (R Core Team, 2013.). UPGMA dendrogram je ultrametričan i pretpostavlja jednaku učestalost mutacija duž grana. Formiran je tako da su svi završni članci podjednako udaljeni od korijena, a algoritam se sastoji od dva koraka koji se izmjenjuju sve dok se analizirani genotipovi ne objedine u jednu skupinu. U prvom koraku se određuje par genotipova (i i j) sa minimalnom međusobnom udaljenosti, koji se ujedinjuju u istu skupinu (ij), nakon čega se izračunava udaljenost između dobivene skupine (ij) i svih ostalih genotipova prema formuli:

$$d_{(ij)k} = \frac{(d_{ik} + d_{jk})}{2}$$

gdje je:

$d_{(ij)k}$ - udaljenost između skupine ij i genotipa k

d_{ik} - udaljenost između sorte i i sorte k

d_{jk} - udaljenost između sorte j i sorte k

Rezultati kvantifikacije mikrosatelitne analize za 19 genotipova soje nastalih na Poljoprivrednom institutu Osijek podvrgnuti su analizi molekularne varijance (eng. *Analysis of Molecular Variance* – AMOVA) u računalnom programu GenAlEx 6.5 (Peakall i Smouse, 2012.). Analiza molekularne varijance omogućava raspodjelu genotipske varijance između i unutar bilo kojih pretpostavljenih razina struktura te testiranje razina značajnosti svakog izvora raznolikosti (Excoffier i sur., 1992.). AMOVA se, kao i ANOVA temelji na linearnom modelu, ali za razliku od uobičajene analize kojom se izračunavaju sume kvadrata pojedinih izvora raznolikosti, kod analize molekularne varijance koriste se sume kvadratnih odstupanja, tj. odstupanja od centroida u višedimenzionalnom prostoru jer kao ulazne podatke koristimo genetske udaljenosti između genotipova, a ne vrijednosti samih genotipova. Analiza molekularne varijance se koristila radi utvrđivanja ukupne molekularne varijance između i unutar oplemenjivačkog programa PIO s obzirom na razdoblja priznavanja kultivara tj. između genotipova Poljoprivrednog Instituta Osijek nastalih kao rezultat oplemenjivačkog programa soje prije 2007. i nakon 2007. godine. Granična godina (2007.) odabrana je jer se u sklopu oplemenjivačkog programa koji je rezultirao sortama soje Poljoprivrednog instituta Osijek priznatim nakon nje, uz primarne ciljeve oplemenjivanja

(prinos, stabilnost, otpornost na bolesti i polijeganje, sadržaj bjelančevina i ulja) počelo raditi i na poboljšanju nekih specifičnih svojstava kvalitete koja ranije nisu bila u fokusu. U prvu grupu genotipova pripadaju sorte Lika, Nada, Podravka 95, Ika, Anica, Julijana, Zora, Vita, Korana i Lucija, a u drugu grupu sorte Toma, Tena, Sanda, Mara, Seka, Sara, Ema, Sonja i OS-60-06. Također, analizom molekularne varijance izračunate su vrijednosti ϕ_{ST} ekvivalentne udjelu ukupne varijance raspodjeljene između ispitivanih razdoblja.

2.6.3. Usporedba kvantitativnih i molekularnih podataka

Usporedba kvantitativnih podataka predstavljenih matricom udaljenosti genotipova napravljenoj na temelju vrijednosti euklidske udaljenosti izračunate prema Roldan-Ruiz i suradnicima (2001.) i molekularnih podataka predstavljenih matricom genetske udaljenosti koja se temeljila na izračunu genetske raznolikosti prema Nei-u (1973.) te pripadajućih im dendrograma, s ciljem utvrđivanja ispravnosti i podobnosti napravljena je pomoću Mantelovog testa (1967.) prema formuli:

$$Z = \sum_{i>j}^n X_{ij}Y_{ij}$$

gdje su:

X_{ij}, Y_{ij} – elementi ispod dijagonale matrica X i Y .

Značajnost Z određena je usporedbom uočene Z -vrijednosti s očekivanom Z -vrijednosti nakon 10000 permutacija. Pri tome, ako manje od 5 % randomizacija ima rezultat koji je jednak ili prelazi onaj postignut sa originalnim matricama, smatra se da su iste u značajnoj korelaciji (Mantel, 1967.). Mantelov test za usporedbu matrica kvantitativnih i molekularnih podataka napravljen je u računalnom programu PASSaGE 2 (Rosenberg i Anderson, 2011.).

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

3.1. Rezultati analize parametara kvalitete zrna

3.1.1. Apsolutna masa zrna

Analizom varijance za mjerenja apsolutne mase zrna utvrđene su statistički visoko značajne razlike ($P < 0,01$) između genotipova i godina, dok ponavljanje nije statistički značajno utjecalo na ispitivano svojstvo (tablica 6).

Tablica 6. Analiza varijance za apsolutnu masu zrna (g) genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Apsolutna masa zrna (g)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	4702,705	578,345	< 0,01
Genotip	21	1643,316	202,097	< 0,01
Ponavljanje	1	0,255	0,031	0,860
Pogreška	65	8,131		

Apsolutna masa zrna je u prosjeku za sve tri godine istraživanja (2010. – 2012.) varirala od 139,35 g (Podravka 95) do 215,02 g (Alisa). Prosječna vrijednost svojstva za sve genotipove tijekom tri godine (2010. - 2012.) iznosila je 171,06 g, dok je prosječan koeficijent varijacije iznosio 9,68 %. Ako promatramo godine zasebno, najmanju prosječnu srednju vrijednost genotipovi su imali 2012. godine (159,57 g), a najveću 2010. (179,59 g). Također, srednje vrijednosti genotipova unutar pojedinih godina različito su varirale pa je tako najveći koeficijent varijacije bio 2010. godine (CV = 15,87 %), zatim 2012. (CV = 9,95 %), dok je najmanji bio 2011. godine (CV = 7,64 %) (tablica 30 u Prilogu).

3.1.2. Bjelančevine i ulje

Analizom varijance za koncentraciju bjelančevina i ulja u zrnju soje utvrđene su statistički visoko značajne razlike ($P < 0,01$) između genotipova i godina, dok za ponavljanje nije utvrđen statistički značajan utjecaj na ispitivana svojstva (tablica 7 i tablica 8).

Tablica 7. Analiza varijance za koncentraciju bjelančevina (% AST) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija bjelančevina u zrnu (% AST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	391,193	11761,360	< 0,01
Genotip	21	3,139	94,389	< 0,01
Ponavljanje	1	0,025	0,751	0,389
Pogreška	65	0,033		

Prosječna koncentracija bjelančevina u zrnu se za cjelokupni pokus (2010. – 2012.) kretala u rasponu od 39,06 % (SG-1) do 41,50 % (Alisa), a koeficijent varijacije bio je 1,81 %. Prosječna vrijednost svojstva za sve genotipove tijekom tri godine (2010. - 2012.) iznosila je 40,07 %. Ako promatramo godine zasebno, najmanju prosječnu srednju vrijednost koncentracije bjelančevina genotipovi su imali 2011. godine (37,14 %), a najveću 2012. (43,09 %). U 2010. godini vrijednosti su varirale od 37,98 % (Tena) do 41,70 % (Sanda), 2011. od 34,61 % (Julijana) do 38,89 % (Sara), a 2012. godine od 41,34 % (Seka) do 45,49 % (Alisa). Variranje svojstva po genotipovima je bilo nešto veće za pojedinačne godine nego za prosjek pokusa pa je tako koeficijent varijacije 2010. bio 2,18 %, 2011. 2,88 %, a 2012. 2,10 % (tablica 31 u Prilogu).

Tablica 8. Analiza varijance za koncentraciju ulja (% AST) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija ulja u zrnu (% AST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	160,976	12748,372	< 0,01
Genotip	21	1,616	127,948	< 0,01
Ponavljanje	1	0,104	8,218	0,223
Pogreška	65	0,013		

Prosječna vrijednost koncentracije ulja za cjelokupni pokus (2010. – 2012.) varirala je od 22,09 % (Toma) do 24,09 % (SG-1), dok je koeficijent varijacije bio 2,26 %. Srednja vrijednost za sve tri godine zajedno bila je 23,05 %. Proučavajući godine zasebno, uočavamo da se 2012. godina statistički visoko značajno razlikovala od ostale dvije i rezultirala je najvećom prosječnom koncentracijom ulja u zrnu (25,06 %). Slijedila ju je 2011. godina (22,85 %) dok je 2010. godine koncentracija ulja bila najmanja (21,25 %). Sorta Sanda je u 2010. godini imala najmanju koncentraciju (20,33 %), a sorta SG-1 najveću (22,34 %). U

2011. godini najmanju koncentraciju imala je Toma (21,73 %), a najveću Lucija (24 %), dok su 2012. godine granične vrijednosti imale Korana (23,71 %) i SG-1 (26,36 %). Varijabilnost vrijednosti koncentracije ulja za genotipove je po godinama imala slične vrijednosti kao i u prosjeku pokusa. Koeficijent varijacije je 2010. godine bio 2,35 %, 2011. 2,44 %, a 2012. 2,83 % (tablica 32 u Prilogu).

3.1.3. Masne kiseline

Analiza varijance za pojedinačne masne kiseline pokazala je jednak trend značajnosti za izvore varijabilnosti kao i kod prethodnih svojstava. Kod svih se statistički visoko značajnim ($P < 0,01$) pokazao utjecaj godine i genotipa, dok se utjecaj ponavljanja na ispitivano svojstvo nije pokazao statistički značajnim (tablica 9 - tablica 13).

Tablica 9. Analiza varijance za koncentraciju palmitinske kiseline (%) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija palmitinske kiseline u zrnu (%)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	0,885	3548,954	< 0,01
Genotip	21	1,210	4850,195	< 0,01
Ponavljanje	1	0,001	4,714	0,135
Pogreška	65	2,495 x 10 ⁻⁴		

Koncentracija palmitinske kiseline je tijekom trogodišnjeg pokusa u prosjeku varirala od 9,31 % (Korana) do 11,29 % (Julijana) uz koeficijent varijacije koji je iznosio 4,26 %. Prosječna vrijednost za cijeli pokus bila je 10,55 % dok je najmanja prosječna vrijednost utvrđena 2011. (10,39 %), a najveća 2012. godine (10,68 %). U 2010. te 2012. godini, sorta Korana je imala najmanju vrijednost palmitinske kiseline (slijedom: 9,18 %, 9,21 %), a Julijana najveću (slijedom: 11,52 %, 11,41 %), dok je 2011. godine najmanju vrijednost imala Korana (9,54 %), a najveća vrijednost utvrđena je kod sorte Alisa (11,44 %). Također, vrijednosti su tijekom godina varirale više nego u prosjeku pa su koeficijenti varijacije u 2010. i 2011. godini bili slijedom 4,86 %, a 2012. 4,69 %. (tablica 33 u Prilogu).

Tablica 10. Analiza varijance za koncentraciju stearinske kiseline (%) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija stearinske kiseline u zrnu (%)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	24,961	625,259	< 0,01
Genotip	21	1,980	49,597	< 0,01
Ponavljanje	1	0,107	2,686	0,106
Pogreška	65	0,040		

Koeficijent varijacije za stearinsku kiselinu u prosjeku, za sve tri godine pokusa iznosio je 11,61 %, a raspon vrijednosti se kretao od 3,73 % (Lucija) do 6,03 % (OS-60-06). Srednja vrijednost pokusa bila je 4,95 %. Ako promatramo godine zasebno, najveća srednja vrijednost utvrđena je 2012. (5,71 %) kada je najnižu koncentraciju imala sorta Lucija (4,19 %), a najveću OS-60-06 (7,22 %). Godine 2010., koja je imala najmanju srednju vrijednost za stearinsku kiselinu (4,20 %), vrijednosti su varirale od 3,41 % (Lucija) do 4,69 % (OS-60-06), dok je 2011. godine, koja je po prosječnoj vrijednosti (4,93 %) bila između 2010. i 2012. godine, Lucija imala najnižu koncentraciju (3,58 %), a Podravka 95 najvišu (6,34 %). Varijabilnost procijenjena pomoću koeficijenta varijacije u 2010. godini (CV = 8,75 %) bila je manja od varijabilnosti za prosjek pokusa (CV = 11,61 %). U ostale dvije godine, vrijednosti su više varirale, pa je tako koeficijent varijacije 2011. godine bio 14,18 %, a 2012. 14,83 % (tablica 34 u Prilogu).

Tablica 11. Analiza varijance za koncentraciju oleinske kiseline (%) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija oleinske kiseline u zrnu (%)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	283,103	18276,526	< 0,01
Genotip	21	10,700	690,800	< 0,01
Ponavljanje	1	0,045	2,928	0,092
Pogreška	132	0,015		

Oleinska kiselina je u trogodišnjem pokusu varirala od 21,38 % (Toma) do 27,38 % (Korana) uz koeficijent varijacije koji je iznosio 5,50 %. Ukupna srednja vrijednost svih sorata bila 24,27 %. Kao i u slučaju prethodno spomenutih masnih kiselina, i oleinska je najveće vrijednosti imala 2012. godine. Srednja vrijednost je tada bila 26,72 %, a raspon od 22,89 % (Anica) do 31,71 % (Korana). Slijedila je 2011. godina sa srednjom vrijednosti

24,43 %, minimalnom vrijednosti od 20,55 % (Toma) i maksimumom od 28,91 % (SG-1), dok je srednja vrijednost 2010. bila manja u odnosu na ostale dvije godine i iznosila je 21,65 % uz raspon od 18,76 % (Toma) do 25,71 % (Korana). Varijabilnost vrijednosti je i ovdje, kao i kod palmitinske kiseline, bila veća po godinama nego za prosjek pokusa. Koeficijent varijacije je 2010. godine bio 8,05 %, 2011. 8,19 %, a 2012. godine 7,05 % (tablica 35 u Prilogu).

Tablica 12. Analiza varijance za koncentraciju linolne kiseline (%) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija linolne kiseline u zrnu (%)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	271,464	1739,898	< 0,01
Genotip	21	12,163	172,540	< 0,01
Ponavljanje	1	0,153	0,949	0,145
Pogreška	65	0,070		

U slučaju linolne kiseline, srednja vrijednost pokusa bila je 52,11 % uz raspon od 50,13 % (Alisa) do 55,44 % (Toma), a koeficijent varijacije je iznosio 2,73 %. Za razliku od prethodno spomenutih masnih kiselina, prosječna vrijednost za linolnu bila je najmanja u 2012. godini (49,83 %), a slijedile su 2011. (51,75 %) pa 2010. godina (54,76 %). Najmanje vrijednosti u 2010. (51,42 %) i 2012. godini (46,37 %) imala je Alisa, a u 2011. godini (47,37 %) sorta SG-1. Najveće vrijednosti je 2010. (58,05 %) i 2011. godine (55,86 %) imala sorta Toma, a 2012. (53,94 %) sorta Anica. Variranje vrijednosti po godinama bilo je nešto veće nego za cijeli pokus, pa je tako koeficijent varijacije vrijednosti genotipova 2010. iznosio 2,84 %, 2011. 4,79 %, a 2012. 3,67 % (tablica 36 u Prilogu).

Koncentracija linolenske kiseline je u prosjeku pokusa varirala od 5,77 % (Lucija) do 7,59 % (Anica) uz koeficijent varijacije od 6,79 % te srednju vrijednost 6,84 %. Srednje vrijednosti su po godinama slijedile trend kao i u slučaju linolne kiseline pa je tako 2012. godina, sa srednjom vrijednosti 5,74 %, bila najnepovoljnija za linolensku kiselinu. Slijedila je 2011. godina sa 7,08 %, a najveća srednja vrijednost (7,71 %) utvrđena je 2010. godine. Godine 2010. raspon vrijednosti koncentracije linolenske kiseline kretao se od 6,58 % (Lucija) do 8,73 % (Tena), 2011. od 6,29 % (OS-60-06) do 7,99 % (Anica), a 2012. od 4,41 % (Lucija) do 6,98 % (Anica). Razinu variranja srednjih vrijednosti možemo procijeniti i

pomoću koeficijenta varijacije koji je najveći bio 2012. godine (CV = 11,45 %), zatim 2010. godine (CV = 7,32 %), te 2011. godine (CV = 6,98 %) (tablica 37 u Prilogu).

Tablica 13. Analiza varijance za koncentraciju linolenske kiseline (%) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija linolenske kiseline u zrnu (% AST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	44,381	149890,772	< 0,01
Genotip	21	1,293	4367,572	< 0,01
Ponavljanje	1	1,673 x 10 ⁻⁵	0,057	0,813
Pogreška	65	2,961 x 10 ⁻⁴		

3.1.4. Saharidi

U slučaju svih istraživanih saharida, utvrđene su statistički visoko značajne razlike (P < 0,01) za godinu i genotip (tablica 16 – tablica 20). Isti je slučaj bio sa ukupnom koncentracijom oligosaharida (tablica 15), dok za ukupne saharide nije utvrđen statistički značajan utjecaj godine (tablica 14).

Tablica 14. Analiza varijance za koncentraciju ukupnih saharida (% AST) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija ukupnih saharida u zrnu (% AST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	0,095	2,980	0,058
Genotip	21	2,216	69,734	< 0,01
Ponavljanje	1	0,102	3,223	0,077
Pogreška	65	0,032		

Srednja vrijednost ukupnih saharida za trogodišnji pokus (2010. – 2011.) iznosila je 6,62 %, a raspon variranja se kretao od 5,69 % (Ika) do 7,68 % (SG-1) uz koeficijent varijacije od 9,18 %. Iako se srednje vrijednosti po godinama nisu statistički međusobno razlikovale, najveća je uočena 2012. godine (6,65 %) kada je i koeficijent varijacije bio najviši (CV = 21,83 %). Najniže vrijednosti ukupnih saharida navedene godine imala je sorta Ika (3,09 %), a najviše Tena (9,03 %). U 2011. godini, srednja vrijednost svih genotipova bila je niža u odnosu na ostale godine pokusa (6,56 %). Niži je bio i koeficijent varijacije (CV = 13,58 %), odnosno srednje vrijednosti su bile ujednačenije. Te godine, najmanju

koncentraciju ukupnih saharida imala je Korana (5,25 %), a najveću Seka i OS-60-06 (7,86 %). Srednja vrijednost svih genotipova 2010. godine iznosila je 6,63 % dok je koeficijent varijacije te godine bio manji u odnosu na ostale dvije godine pokusa (CV = 8,13 %). Minimalnu srednju vrijednost imala je Mara (5,54 %), a maksimalnu Ema (7,48 %) (tablica 38 u Prilogu).

Tablica 15. Analiza varijance za koncentraciju ukupnih oligosaharida (% AST) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija ukupnih oligosaharida u zrnu (% AST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	2,403	357,287	< 0,01
Genotip	21	0,374	55,543	< 0,01
Ponavljanje	1	0,008	1,254	0,267
Pogreška	65	0,007		

Ako zasebno gledamo samo ukupne oligosaharide, srednja vrijednost za cijeli pokus bila je 2,79 %, koeficijent varijacije 8,94 %, a raspon se kretao između 2,40 % (Ika) i 3,40 % (SG-1). Srednja vrijednost 2010. bila je 2,92 %, a 2011. 2,93 %. Ipak 2011. godine koeficijent varijacije je bio 11,52 %, a 2010. 8,64 %. Minimalnu srednju vrijednost 2010. godine imala je Lucija (2,47 %), a 2011. Mara (2,38 %), dok je najveću koncentraciju 2010. imala Anica (3,41 %), a 2011. SG-1 (3,62 %). Godina 2012. bila je statistički visoko značajno ($P < 0,01$) različita od prve dvije godine pokusa. Iako je srednja vrijednost (2,52 %) bila niža u odnosu na 2010. i 2011., ali i u odnosu na prosjek pokusa, koeficijent varijacije je bio najviši i iznosio je čak 22,83 % uz variranje koncentracije u rasponu od 1,10 % (Ika) do 3,54 % (SG-1) (tablica 39 u Prilogu).

Tablica 16. Analiza varijance za koncentraciju glukoze (% AST) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija glukoze u zrnu (% AST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	0,125	680,596	< 0,01
Genotip	21	0,006	30,279	< 0,01
Ponavljanje	1	$9,155 \times 10^{-6}$	0,050	0,824
Pogreška	65	$1,834 \times 10^{-4}$		

Vrijednosti koncentracije glukoze za ukupan pokus varirale su od 0,16 % (Anica) do 0,29 % (Seka) s koeficijentom varijacije od 13,42 %. Prosječna koncentracija u pokusu bila je 0,23 %. Gledajući godine zasebno, vrijednosti su varirale više nego u prosjeku za čitav pokus pa je tako koeficijent varijacije 2010. godine bio 23,24 %, 2011. 17,01 %, a 2012. 23,69 %. Raspon vrijednosti 2010. godine bio je od 0,12 % (Lucija) do 0,30 % (Seka), 2011. od 0,13 % (Anica i Gordana) do 0,26 % (Vita) i 2012. od 0,13 % (Ika) do 0,40 % (Tena) (tablica 40 u Prilogu).

Tablica 17. Analiza varijance za koncentraciju fruktoze (% AST) u zrnju genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija fruktoze u zrnju (% AST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	0,623	4329,368	< 0,01
Genotip	21	0,010	72,103	< 0,01
Ponavljjanje	1	0,001	5,557	0,214
Pogreška	65	1,439 x 10 ⁻⁴		

Od svih saharida, uključujući i ukupne te ukupne oligosaharide, fruktoza se pokazala najvarijabilnijom. Koeficijent varijacije je za prosjek pokusa iznosio 23,42 %, dok su po godinama bili i veći: 2010. koeficijent varijacije bio je čak 42,94 %, 2011. 28,06 %, a 2012. 27,32 %. Koncentracije su u ukupnom pokusu varirale od 0,11 % (Anica) do 0,28 % (Seka), dok su 2010., 2011. i 2012. rasponi slijedom bili od 0,01 % (SG-1) do 0,08 % (Tena); od 0,17 % (Lika i Anica) do 0,39 % (Seka i OS-60-06) i od 0,13 % (Anica) do 0,40 % (Seka) (tablica 41 u Prilogu).

Tablica 18. Analiza varijance za koncentraciju saharoze (% AST) u zrnju genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija saharoze u zrnju (% AST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	7,392	1452,676	< 0,01
Genotip	21	0,586	115,253	< 0,01
Ponavljjanje	1	0,002	0,330	0,568
Pogreška	65	0,005		

Srednja vrijednost koncentracije saharoze za pokus iznosila je 2,99 % uz raspon od 2,32 % (Anica) do 3,46 % (SG-1) i koeficijent varijacije 10,47 %. Promatrajući utjecaj

godine, najpovoljnijom za akumulaciju saharoze pokazala se 2010., kada je srednja vrijednost bila 3,34 %. Slijedila je 2011. godina s 3,08 %, a najnepovoljnija je bila 2012. kada je srednja vrijednost iznosila 2,54 %. Kako se po godinama smanjivala srednja vrijednost, tako je rastao koeficijent varijacije koji je 2010. bio 11,19 %, 2011. 15,22 %, a 2012. čak 21,90 %. Vrijednosti su 2010. godine varirale od 2,59 % (Mara) do 3,86 % (Vita), 2011. od 2,35 % (Anica) do 3,79 % (Vita), a 2012. od 1,15 % (Ika) do 3,70 % (SG-1) (tablica 42 u Prilogu).

Tablica 19. Analiza varijance za koncentraciju rafinoze (% AST) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija rafinoze u zrnu (% AST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	1,432	1246,918	< 0,01
Genotip	21	0,125	108,566	< 0,01
Ponavljanje	1	0,001	1,192	0,279
Pogreška	65	0,001		

Srednje vrijednosti pokusa za koncentraciju rafinoze nisu imale isti trend kao srednje vrijednosti za koncentraciju saharoze pa je tako najviša vrijednost zabilježena 2011. (0,98 %), druga po veličini 2012. (0,93 %), a najniža 2010. godine (0,65 %). Ukupan prosjek trogodišnjeg pokusa iznosio je 0,85 % uz raspon vrijednosti od 0,66 % (Lika i Vita) do 1,10 % (Seka) i koeficijent varijacije od 16,93 %. Ako promatramo godine zasebno, koeficijent varijacije je 2010. godine (CV = 16,29 %) bio nešto manji od prosječnog koeficijenta varijacije za pokus uz raspon srednjih vrijednosti svojstva od 0,35 % (Lucija) do 0,84 % (Anica). U naredne dvije godine koeficijenti varijacije su bili veći od prosječnog koeficijenta varijacije za pokus. Godine 2011. CV je iznosio 23,65 % uz raspon srednjih vrijednosti koncentracije od 0,61 % (Korana) do 1,39 % (Seka), a 2012. čak 33,36 % uz raspon od 0,47 % (Ika i Vita) do 1,52 % (Toma) (tablica 43 u Prilogu).

Koncentracija stahioze se u prosjeku pokusa kretala od 1,64 % (Ika) do 2,41 % (SG-1) uz koeficijent varijacije koji je iznosio 8,85 %. Ukupna, trogodišnja srednja vrijednost za sve genotipove iznosila je 1,93 %. Najveća prosječna koncentracija utvrđena je 2010. godine (2,27 %), najmanja 2012. godine (1,58 %), dok je 2011. godina sa srednjom vrijednosti 1,93 % bila između. Kao i kod ukupnih saharida, koeficijent varijacije bio je najveći 2012. godine (CV = 25,13 %), slijedila je 2011. (CV = 8,42 %), a vrijednosti su najmanje varirale 2010.

godine (CV = 7,44 %). Najniže koncentracije su 2010., 2011. i 2012. imale slijedom Lika (1,99 %), Sonja (1,63 %) i Ika (0,63 %), a najviše slijedom Anica (2,56 %), SG-1 (2,28 %) i ponovo SG-1 (2,58 %) (tablica 44 u Prilogu).

Tablica 20. Analiza varijance za koncentraciju stahioze (% AST) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Koncentracija stahioze u zrnu (% AST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	5,280	7627,966	< 0,01
Genotip	21	0,175	252,692	< 0,01
Ponavljjanje	1	2,061 x 10 ⁻⁴	0,298	0,587
Pogreška	65	6,922 x 10 ⁻⁴		

3.1.5. Izoflavoni

Jednako kao i kod ostalih svojstava kvalitete, i u slučaju izoflavona statistički visoko značajnim (P < 0,01) kao izvori varijabilnosti pokazali su se genotip i godina, dok ponavljanje nije statistički značajno utjecalo na navedena svojstva (tablica 21 – tablica 24).

Tablica 21. Analiza varijance za sadržaj ukupnih izoflavona (mg/100 g ST) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Sadržaj ukupnih izoflavona u zrnu (mg/100 g ST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	48998,308	4277,757	< 0,01
Genotip	21	9335,565	815,034	< 0,01
Ponavljjanje	1	34,763	3,035	0,086
Pogreška	65	11,454		

Sadržaj ukupnih izoflavona u pokusu (2010. - 2012.) varirao je u prosjeku od 124,06 mg/100 g ST (SG-1) do 286,20 mg/100 g ST (Korana) uz koeficijent varijacije od 23,97 %. Srednja vrijednost pokusa iznosila je 164,58 mg/100 g ST. Jačina utjecaja uvjeta okoline očitovala se u statistički značajnim razlikama vrijednosti između godina pa je tako za sortu Korana, koja je u pokusu imala najveći sadržaj ukupnih izoflavona, 2012. godina rezultirala najmanjim sadržajem (73,92 mg/100 g ST), dok je najveći sadržaj iste godine imala sorta Gordana (192,61 mg/100 g ST). Godina 2012. se općenito pokazala kao najnepođodnija za akumulaciju izoflavona i imala je najnižu srednju vrijednost (127,78 mg/100 g ST). Iste je

godine koeficijent varijacije (CV = 27,08 %) bio manji u odnosu na prethodne dvije, ali veći od prosjeka pokusa. Najpovoljnijom za nakupljanje izoflavona pokazala se 2010. godina kada je srednja vrijednost bila 192,89 mg/100 g ST, a koeficijent varijacije 29,21 %. Te godine raspon sadržaja kretao se od 116,30 mg/100 g ST (Anica) do 372,48 mg/100 g ST (Lucija). Godine 2011. srednja vrijednost iznosila je 173,06 mg/100 g ST, a koeficijent varijacije čak 49,91 %. Sorta Korana te godine imala je rekordno visok sadržaj ukupnih izoflavona (498,01 mg/100 g ST) dok je najmanji sadržaj zabilježen kod Ike (91,97 mg/100 g ST) (tablica 45 u Prilogu).

Tablica 22. Analiza varijance za sadržaj daidzeina (mg/100 g ST) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Sadržaj daidzeina u zrnu (mg/100 g ST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	7102,815	4421,475	< 0,01
Genotip	21	615,860	383,371	< 0,01
Ponavljanje	1	3,103	1,932	0,169
Pogreška	65	1,606		

U slučaju daidzeina, u prosjeku najveći sadržaj imala je Lika (69,88 mg/100 g ST), a najmanji OS-60-06 (36,01 mg/100 g ST). Trogodišnji (2010. - 2012.) prosjek vrijednosti iznosio je 49,27 mg/100 g ST, a koeficijent varijacije 20,56 %. Kao i kod sadržaja ukupnih izoflavona, za akumulaciju daidzeina najpovoljnijom se pokazala upravo 2010. godina kada je srednja vrijednost bila 58,70 mg/100 g ST, dok se raspon kretao od 42,14 mg/100 g ST (Anica) do 97,99 mg/100 g ST (Lucija). Koeficijent varijacije te je godine bio 25,65 % što je predstavljalo nižu razinu varijabilnosti u odnosu na ostale dvije godine. Srednja vrijednost 2011. godine bila je 54,29 mg/100 g ST, a raspon se kretao od 24,14 mg/100 g ST (SG-1) do 105,36 mg/100 g ST (Korana). Iste godine koeficijent varijacije je iznosio 40,18 %. Godina 2012. se po srednjoj vrijednosti (34,82 mg/100 g ST) pokazala kao najlošija za akumulaciju daidzeina, pri čemu je koeficijent varijacije (51,27 %) te godine bio najviši utvrđen tijekom tri godine (2010. – 2012.) koliko je trajao pokus. Minimalan sadržaj iste godine zabilježen je kod Korane (11,58 mg/100 g ST), a maksimalan kod sorte Gordana (76,29 mg/100 g ST) (tablica 46 u Prilogu).

Sorta SG-1, koja je imala najmanji sadržaj ukupnih izoflavona, imala je najveći prosječni sadržaj gliciteina u pokusu (31,42 mg/100 g ST) dok je u prosjeku najmanji imala

Tena (13,41 mg/100 g ST). Srednja vrijednost pokusa za sadržaj izoflavona iznosila je 20,90 mg/100 g ST, a koeficijent varijacije 21,67 %. Godine 2011. zabilježena je najveća srednja vrijednost (21,56 mg/100 g ST) i visok koeficijent varijacije (41,74 %), a vrijednosti su te godine bile u rasponu od 8,76 mg/100 g ST (Gordana) do 46,29 mg/100 g ST (SG-1). Isti maksimum (46,29 mg/100 g ST) bio je i 2012. godine, ali je zabilježen kod sorte Podravka 95. Najmanji sadržaj gliciteina u 2012. godini imala je sorta Alisa (11,54 mg/100 g ST), dok je srednja vrijednost statistički bila na razini one utvrđene 2011. godine i iznosila je 21,44 mg/100 g ST. Iste godine izračunat je i najveći koeficijent varijacije (CV = 46,08 %). Najnepovoljnija za akumulaciju gliciteina bila je 2010. godina, kada je srednja vrijednost iznosila 19,69 mg/100 g ST, koeficijent varijacije 28,15 %, a raspon vrijednosti od 10,14 mg/100 g ST (Tena) do 30,87 mg/100 g ST (Lucija) (tablica 47 u Prilogu).

Tablica 23. Analiza varijance za sadržaj gliciteina (mg/100 g ST) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Sadržaj gliciteina u zrnu (mg/100 g ST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	48,605	28,098	< 0,01
Genotip	21	123,042	71,128	< 0,01
Ponavljanje	1	17,622	10,187	0,185
Pogreška	65	1,730		

Tablica 24. Analiza varijance za sadržaj genisteina (mg/100 g ST) u zrnu genotipova soje (2010. - 2012.).

Izvor varijabilnosti	Sadržaj genisteina u zrnu (mg/100 g ST)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F	P
Godina	2	20583,927	2752,534	< 0,01
Genotip	21	6426,040	859,306	< 0,01
Ponavljanje	1	0,004	0,001	0,982
Pogreška	65	8,416		

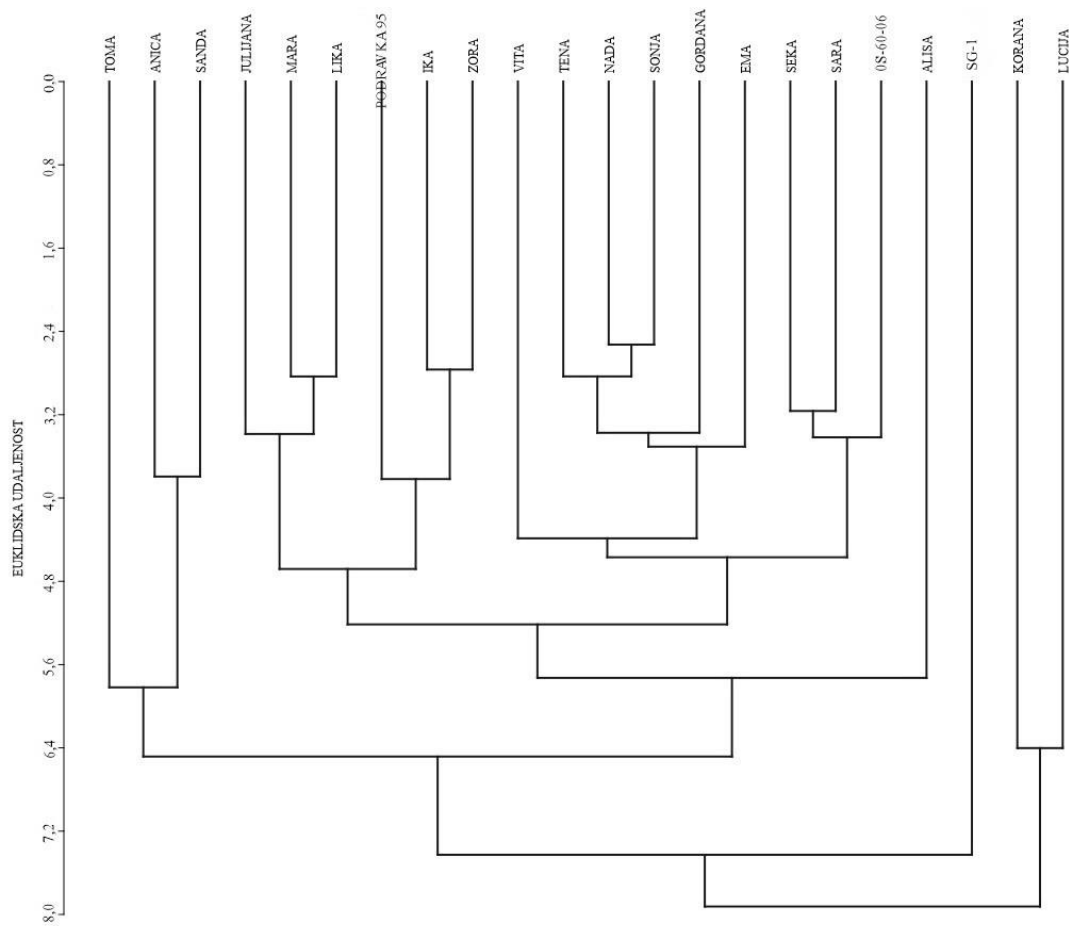
Prosjeck pokusa za sadržaj genisteina bio je 94,41 %, a koeficijent varijacije 34,66 %. Sadržaj je u prosjeku varirao od 53,86 mg/100 g ST (SG-1) do 195,34 mg/100 g ST (Korana). Najmanja srednja vrijednost zabilježena je 2012. (71,52 mg/100 g ST), slijedila je 2011. (97,21 mg/100 g ST), a najveća je bila 2010. godine (114,50 mg/100 g ST). Ako promatramo koeficijente varijacije, najmanji je bio 2012. (CV = 28,21 %), slijedila je 2010. (CV = 36,77 %) dok je najveći bio 2011. godine (CV = 68,54 %). Minimalne i maksimalne vrijednosti su

2010., 2011. i 2012. slijedom imale: Anica (55,35 mg/100 g ST) i Lucija (243,62 mg/100 g ST); Gordana (46,14 mg/100 g ST) i Korana (352,43 mg/100 g ST); SG-1 (36,93 mg/100 g ST) i Seka (103,03 mg/100 g ST) (tablica 48 u Prilogu).

3.1.6. Genetska udaljenost temeljena na kvantitativnim podacima

Genetska udaljenost istraživanih genotipova temeljena na kvantitativnim podacima iskazana je preko koeficijenta euklidske udaljenosti i prikazana UPGMA dendrogramom (graf 1). Kako bi napravili procjenu raznolikosti germplazme, prosječne vrijednosti 19 svojstava kvalitete standardizirane su i objedinjene. Koeficijenti udaljenosti između 22 genotipa kretali su se od 2,5 do 8, s prosječnom vrijednošću koja je iznosila 5,94 (graf 1). Na dendrogramu uočavamo 2 osnovne grupe. Prvu grupu (I) čine sorte Korana i Lucija, a drugu (II) čini ostatak sortimenta. Ako dendrogram promatramo sa 75 % ukupne udaljenosti, u grupi II uočavamo izdvajanje sorte SG-1 dok je ostatak sortimenta podijeljen u 2 podgrupe (IIA i IIB). Prvu čine (IIA) Toma, Anica i Sanda, a drugu (IIB) preostalih 15 sorti i 1 linija. Podgrupu IIB možemo dalje podijeliti pri čemu se izdvaja sorta Alisa, a zajedno su grupirane sorte Julijana, Mara i Lika, Podravka 95, Ika i Zora; te sorte Vita, Tena, Nada, Sonja, Gordana i Ema, Seka, Sara i linija OS-60-06. Međusobno najbliže sorte prema analiziranim svojstvima kvalitete su Nada i Sonja te Ika i Zora dok su najudaljenije u odnosu na ostatak sortimenta Korana i Lucija, te SG-1 (graf 1).

Koeficijent korelacije između originalne matrice genetske udaljenosti temeljene na kvantitativnim podacima i matrice kofonetičkih vrijednosti bio je visok i statistički značajan ($r = 0,805$; $P < 0,001$; $N = 22$) što ukazuje na to da je UPGMA dendrogram prikladan za prikaz genetske raznolikosti sadržane u izvornim podacima.



Graf 1. UPGMA dendrogram genetske udaljenosti 22 genotipa soje dobiven temeljem podataka o kvaliteti zrna soje preko koeficijenta euklidske udaljenosti.

3.1.7. Analiza glavnih sastavnica (PCA)

Vrijednosti svojstava podvrgnute su analizi glavnih sastavnica kako bi se temeljitije procijenili međuodnosi. Svojevrsne vrijednosti pokazuju postotni udio ukupne varijabilnosti sadržane u izvornoj matrici, a iste se objašnjavaju svakom pojedinom PC osi. Od glavnih osi sastavnica, primarnim su se pokazale prve tri (PC 1, 2 i 3) jer imaju svojstvene vrijednosti veće od 1 i objašnjavaju ukupno 64,02 % varijabilnosti između 22 genotipa (tablica 25). Prva PC (PC1) os objašnjava 27,88 % ukupne varijabilnosti i najviše je vezana za svojstva koncentracija ukupnih saharida (XV) i koncentracija rafinoze (XII) (tablica 25). Druga PC os (PC2) objašnjava 19,56 % ukupne varijabilnosti i najviše je vezana za svojstva koncentracija oleinske kiseline (VI), koncentracija linolenske kiseline (VIII) i sadržaj genisteina (XVIII) (tablica 25). Treća PCA os (PC3) objašnjava 16,58 % ukupne

varijabilnosti i najviše je vezana za svojstva koncentracija stearinske kiseline (V) i koncentracija stahioze (XIII) (tablica 25).

Tablica 25. Glavne sastavnice 19 svojstava kvalitete za 22 genotipa soje (2010. – 2012.).

		PC1	PC2	PC3
Svojstvena vrijednost		5,296	3,717	3,151
Postotni udio		27,88	19,56	16,58
Ukupni postotni udio		27,88	47,44	64,02
Svojstva	Oznaka	Svojstveni vektori		
Apsolutna masa zrna	I	-0,20735	0,12049	0,10116
Koncentracija bjelančevina	II	-0,10913	-0,07764	-0,03953
Koncentracija ulja	III	-0,00729	0,12476	-0,13484
Koncentracija palmitinske kiseline	IV	-0,04016	0,04329	-0,33050
Koncentracija stearinske kiseline	V	0,22423	-0,05924	-0,43371
Koncentracija oleinske kiseline	VI	0,00723	0,39938	-0,11462
Koncentracija linolne kiseline	VII	-0,12097	-0,22312	0,34058
Koncentracija linolenske kiseline	VIII	0,01994	-0,39676	0,053809
Koncentracija glukoze	IX	0,32214	0,25917	0,039916
Koncentracija fruktoze	X	0,33391	0,23102	-0,05944
Koncentracija saharoze	XI	0,33821	0,18011	0,09230
Koncentracija rafinoze	XII	0,38468	0,01608	0,10292
Koncentracija stahioze	XIII	0,10207	-0,16137	0,43115
Koncentracija oligosaharida	ukupnih XIV	0,29818	-0,09990	0,35530
Koncentracija ukupnih saharida	XV	0,38779	0,08402	0,21022
Sadržaj daidzeina	XVI	-0,16493	0,32636	0,19482
Sadržaj gliciteina	XVII	-0,16009	-0,09034	0,17827
Sadržaj genisteina	XVIII	-0,19636	0,38640	0,19533
Sadržaj ukupnih izoflavona	XIX	-0,24359	0,36264	0,22850

Položaj vektora svojstava i sorti u biplotu ukazuje na međusobne odnose istih u smislu korelacija, odnosno sličnosti te varijabilnosti. Pogledom na Graf 2 uočavamo da se većina sorti grupirala u središnjem dijelu, dok su sorte Korana, Lucija, Seka, OS-60-06, SG-1, Sanda i Anica na perifernim dijelovima. U pozitivnom odnosu sa obje PC osi (I kvadrant) nalaze se koncentracija oleinske kiseline (VI), koncentracija glukoze (IX), koncentracija fruktoze (X), koncentracija saharoze (XI), koncentracija rafinoze (XII) i koncentracija ukupnih saharida (XV) te sorte Zora, Ema, Sara, Seka i OS-60-06. U negativnom dijelu PC1 osi i pozitivnom dijelu PC2 osi (II kvadrant) nalaze se svojstva apsolutna masa zrna (I), koncentracija ulja (III), koncentracija palmitinske kiseline (IV), sadržaj daidzeina (XVI), sadržaj genisteina (XVIII) i sadržaj ukupnih izoflavona (XIX) te sorte Vita, Ika, Alisa, Lika, Lucija i Korana. U negativnom dijelu PC1 i PC2 osi (III kvadrant) nalaze se svojstva koncentracija bjelančevina (II), koncentracija linolne kiseline (VII) i koncentracija gliciteina

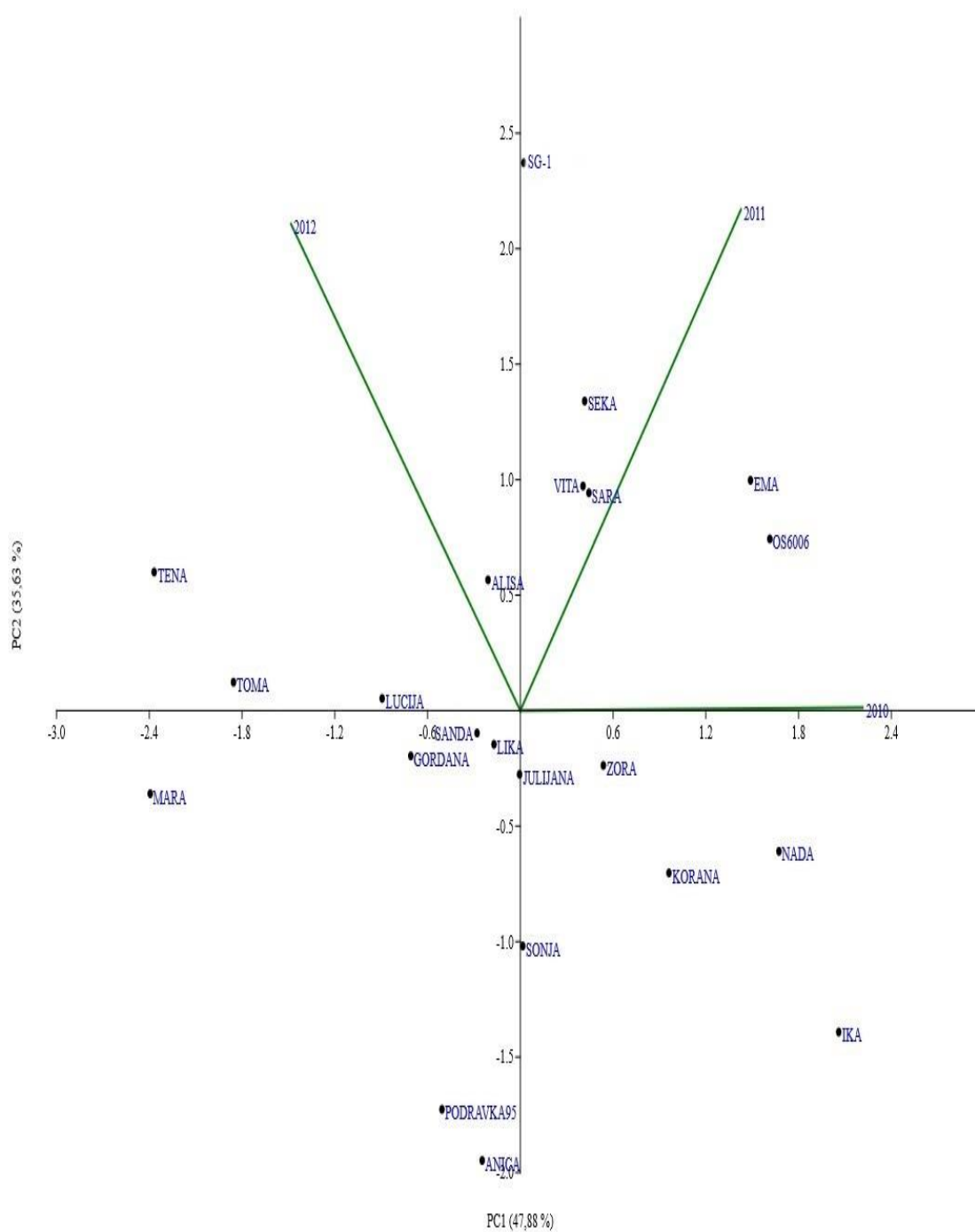
(XVII) te sorte Mara, Julijana, Podravka 95, Gordana, Sanda i Anica. U pozitivnom dijelu PC1 osi i negativnom dijelu PC2 osi (IV kvadrant) nalaze se koncentracija stearinske kiseline (V), koncentracija linolenske kiseline (VIII), koncentracija stahioze (XIII), koncentracija ukupnih oligosaharida (XIV) te sorte Sonja, Nada, Toma, Tena i SG-1. Zanimljivo je da se sorta Sara nalazi između vektora za svojstva koncentracija glukoze (IX) i koncentracija fruktoze (X), sorta Ema između vektora za svojstva koncentracija rafinoze (XII) i koncentracija ukupnih saharida (XV), Nada se nalazi na vektoru za koncentraciju ukupnih oligosaharida (XIV) i vrlo blizu vektora za koncentraciju stearinske kiseline (V), Sonja na vektoru za koncentraciju stahioze (XIII), a Vita na vektorima za sadržaj daidzeina (XVI) i genisteina (XVIII) koji se poklapaju. Ako promatramo svojstva najveća pozitivna povezanost utvrđena je između koncentracije glukoze (IX), koncentracije fruktoze (X) i koncentracije saharoze (XI), zatim koncentracije rafinoze (XII) i ukupnih saharida (XV), koncentracije stearinske kiseline (V) i koncentracije ukupnih oligosaharida (XIV), sadržaja ukupnih izoflavona (XIX), genisteina (XVIII) i daidzeina (XVI) te sadržaja gliciteina (XVII) i koncentracije bjelančevina (II) (graf 2). Međusobno najbliže sorte su Julijana i Podravka 95, Sonja i Nada te Seka i OS-60-06 (graf 2), koje se i u dendrogramu nalaze grupirane zajedno (graf 1).

Uz analizu glavnih sastavnica svojstava, napravljena je i analiza glavnih sastavnica godina, koje su se statistički visoko značajno razlikovale u analizi varijance za sva svojstva (poglavlja 3.1.1 – 3.1.5). Od tri glavne osi sastavnice (PCA 1, 2 i 3), dvije (PC1 i PC2) imaju svojstvene vrijednosti veće od 1 i objašnjavaju ukupno 83,51 % varijabilnosti između 22 genotipa (tablica 26). Prva PC os objašnjava 47,88 % ukupne varijabilnosti i najviše je vezana uz 2010. godinu. Druga PC os objašnjava 35,63 % ukupne varijabilnosti i najviše je vezana uz 2011. godinu (tablica 26).

Tablica 26. Glavne sastavnice 19 svojstava kvalitete za 22 genotipa soje (2010. – 2012.).

	PC1	PC2	PC3
Svojstvena vrijednost	1,436	1,069	0,495
Postotni udio	47,88	35,63	16,49
Ukupni postotni udio	47,88	83,51	100,00
Godine	Svojstveni vektori		
2010.	0,733	0,004	0,681
2011.	0,472	0,717	-0,512
2012.	-0,491	0,697	0,524

Iz biplota (graf 3) uočavamo da se sve tri godine nalaze u pozitivnom dijelu PC2 osi, 2010. i 2011. su u pozitivnom dijelu PC1 osi, dok je 2012. u negativnom dijelu PC1 osi. U blizini vektora za 2011. godinu se nalaze sorte Sara, Vita i Seka dok su uz njih i sorte SG-1, Ema, OS-60-06, Julijana, Sonja, Zora, Korana, Nada i Ika u pozitivnom odnosu sa 2010. i 2011. godinom. Za ostatak sortimenta ove godine nisu bile pogodne. Uz godinu 2012. se nalazi samo sorta Alisa, ali su u pozitivnom odnosu i sorte Tena, Toma, Lucija, Vita, Sara, Seka, SG-1, Ema i OS-60-06. Ako promatramo položaj sorti u odnosu na njihovu reakciju prema utjecaju godine, uočavamo grupiranje sorti Seka, Vita i Sara, te sorti Lucija, Sanda, Gordana, Lika, Julijana i Zora.



Graf 3. BiPlot konstruiran temeljem rezultata analize glavnih sastavnica (PCA) za tri godine pokusa sa 22 genotipa soje (2010. – 2012.).

3.2. Rezultati molekularnih analiza

3.2.1. Pokazatelji genetske raznolikosti

Od testiranih 16 mikrosatelitnih biljega, deset ili 62,5 % dalo je jasno vidljive i polimorfne produkte te su oni korišteni za molekularnu analizu genetske raznolikosti 22 genotipa soje, pri čemu je umnožen ukupno 141 različiti alel. Od potencijalnih 220 umnoženih DNA fragmenata, uspješno je amplificiralo 209 tj. 95 %. Mikrosatelitni profili za sve analizirane genotipove nalaze se u tablici 49 u Prilogu.

Od pokazatelja genetske raznolikosti unutar testirane germplazme izračunati su broj alela po lokusu (N_a), genetska raznolikost (H_E), i informacijski sadržaj polimorfizma (PIC). Broj alela po lokusu (N_a) varirao je od 11 (Satt186) do 17 (Satt571), a u prosjeku je iznosio 14,1. Najmanja genetska raznolikost ($H_E = 0,880$) te najmanji informacijski sadržaj polimorfizma (PIC = 0,869) utvrđeni su biljekom Sat_040, a najveća genetska raznolikost ($H_E = 0,927$) i informacijski sadržaj polimorfizma (PIC = 0,922) biljekom Satt571. Prosječna H_E vrijednost iznosila je 0,905, a prosječna PIC vrijednost 0,897. Detaljan prikaz navedenih pokazatelja po biljezima prikazan je u tablici 27.

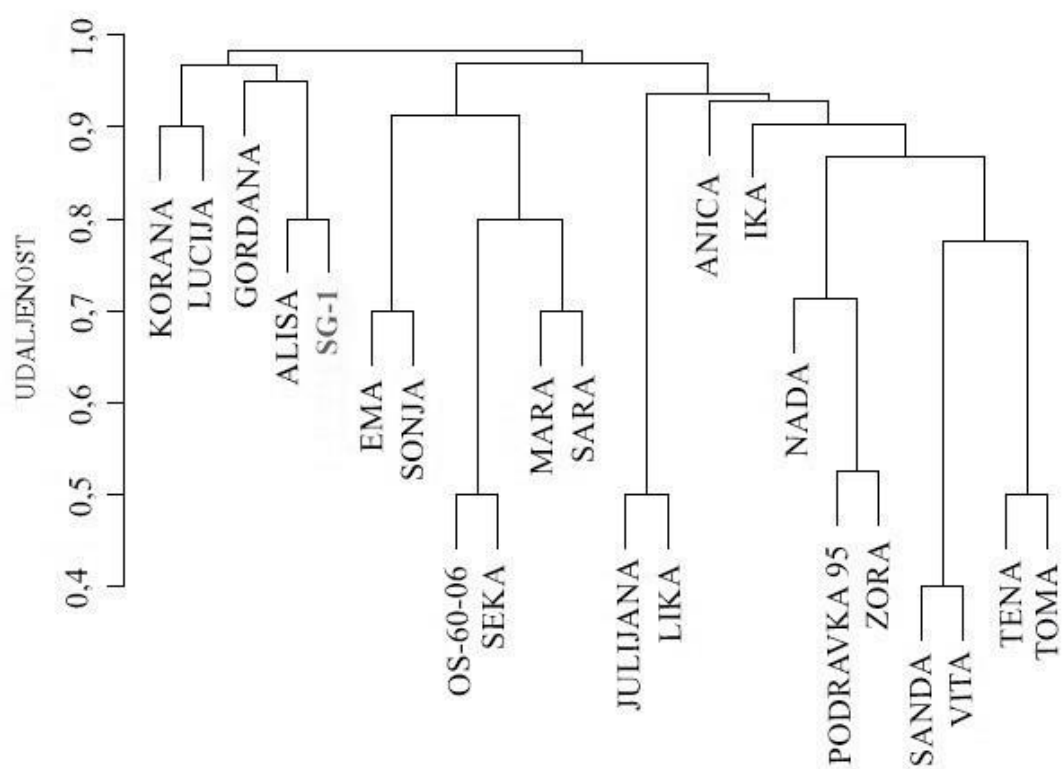
Tablica 27. Broj neuspješno amplificiranih fragmenata (N.A.), broj alela po lokusu (N_a), genetska raznolikost (H_E), i informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) temeljem 10 mikrosatelitnih biljega.

Br	Biljeg	N.A.	N_a	H_E	PIC
1	Satt251	1	14	0,906	0,899
2	Satt571	1	17	0,927	0,922
3	Satt273	0	16	0,917	0,912
4	Satt277	1	13	0,901	0,893
5	Satt313	0	14	0,901	0,893
6	Satt499	1	16	0,913	0,907
7	Satt278	2	15	0,913	0,907
8	Satt364	2	12	0,894	0,885
9	Satt186	3	11	0,894	0,884
10	Sat_040	0	13	0,880	0,869
<i>Minimum</i>		0	11	0,880	0,869
<i>Maksimum</i>		3	17	0,927	0,922
<i>Srednja vrijednost</i>		1,1	14,1	0,905	0,897
<i>Suma</i>		11	141	9,050	8,970

3.2.2. Genetska udaljenost temeljena na molekularnim podacima

Matrica genetskih udaljenosti napravljena je temeljem rezultata molekularnih analiza pomoću 10 mikrosatelitnih biljega izraženih u parovima baza pri čemu je izračunat genetski varijacijski koeficijent prema Nei-u (1973.) za sve kombinacije parova 22 genotipa soje. Prosječna genetska udaljenost (GD – eng. *Genetic Distance*) iznosila je 0,938, a najmanja 0,4 - utvrđena između sorti Vita i Sanda. Visoka prosječna vrijednost koeficijenta genetske udaljenosti prema Nei-u (1973.) posljedica je visokog udjela (45,46 %) kombinacija genotipova između kojih je utvrđena maksimalna udaljenost, tj. kod kojih je genetski varijacijski koeficijent iznosio 1.

Na osnovi matrice genetske udaljenosti, a pomoću UPGMA metode konstruiran je dendrogram (graf 4) koji jasno pokazuje podjelu genotipova u dvije osnovne grupe. Prva grupa (I) se dijeli u dvije podgrupe od kojih jednu (IA) čine sorte Korana i Lucija, a drugu podgrupu (IB) čine sorte Alisa i SG-1 te Gordana koja se od njih izdvaja na većoj genetskoj udaljenosti. Drugu grupu čini ostatak sortimenta podijeljen u dvije podgrupe (IIA i IIB). Podgrupu IIA čine sorte Ema, Sonja, OS-60-06, Seka, Mara i Sara, a podgrupu IIB čine sorte Julijana, Lika, Anica, Ika, Nada, Podravka 95, Zora, Sanda, Vita, Tena i Toma (graf 4).



Graf 4. UPGMA dendrogram genetske udaljenosti 22 genotipa soje dobiven temeljem genetskog varijacijskog koeficijenta prema Nei-u (1973.).

3.2.3. Analiza molekularne varijance (AMOVA)

Uvid u raspodjelu ukupne varijance za 19 genotipova Poljoprivrednog instituta Osijek istraživanih pomoću mikrosatelita omogućila je analiza molekularne varijance (AMOVA). Pretpostavljenu strukturnu razinu činilo je razdoblje priznavanja kultivara pri čemu su genotipovi podijeljeni u dvije grupe: (1) sorte priznate prije 2007. godine; (2) sorte priznate nakon 2007. godine i novostvorena linija OS-60-06. Godina 2007. je odabrana kao granična jer se u sklopu oplemenjivačkog programa koji je rezultirao sortama soje Poljoprivrednog instituta Osijek priznatim nakon ove godine, uz primarne ciljeve oplemenjivanja (prinos, stabilnost, otpornost na bolesti i polijeganje, sadržaj bjelančevina i ulja) počelo raditi i na poboljšanju nekih specifičnih svojstava kvalitete koja ranije nisu bila u fokusu. U prvu grupu genotipova pripadaju sorte Lika, Nada, Podravka 95, Ika, Anica, Julijana, Zora, Vita, Korana i Lucija, a u drugu grupu sorte Toma, Tena, Sanda, Mara, Seka, Sara, Ema, Sonja i OS-60-06.

Tablica 28. Rezultati analize molekularne varijance za PIO genotipove soje podjeljene u dva razdoblja priznavanja (do 2007. godine i nakon 2007. godine).

Izvori varijabilnosti	Stupnjevi slobode	Sastavnice varijance	Udio varijabilnosti	φ_{ST}	$P_{(\varphi)}$
Između razdoblja	1	0,345	3%	0,071	0,001
Unutar razdoblja	17	4,494	97%		
Ukupno	18	4,839	100 %		

Rezultati analize molekularne varijance ukazuju na umjeren i statistički visoko značajan utjecaj razdoblja priznavanja na molekularnu varijancu ($\varphi_{ST} = 0,071$; $P_{(\varphi)} < 0,001$) pri čemu je varijabilnost unutar razdoblja (97 % udjela ukupne varijabilnosti) bila znatno veća od varijabilnosti između razdoblja (3 % udjela ukupne varijabilnosti) (tablica 28). Varijabilnost između razdoblja govori o razlikama između strategije oplemenjivanja čiji rezultat su sorte priznate prije 2007., te strategije čiji su rezultat sorte priznate nakon 2007., a varijabilnost unutar razdoblja govori o razlikama između genotipova uključenih u istraživanje.

3.3. Usporedba rezultata provedenih analiza

Mantelovim testom ispitan je stupanj povezanosti različitih pristupa u analizi genetske raznolikosti istraživanih genotipova. Usporedba je napravljena između matrice dobivene temeljem podataka svojstava kvalitete (svojstva kvalitete u tablici 29) i matrice genetske udaljenosti dobivene temeljem molekularnih podataka (genetska udaljenost u tablici 29) pri čemu nije utvrđeno postojanje korelacije ($r = 0,02$). Iz tablice 29 također uočavamo da rezultati Mantelovog testa nisu bili statistički značajni na osnovi 1000 permutacija ($P = 0,809$).

Tablica 29. Rezultati Mantelovog testa dobiveni usporedbom svojstvenih matrica genetske udaljenosti temeljenih na različitim tipovima podataka te matrice genetske sličnosti.

	Svojstva kvalitete	Genetska udaljenost	Vrijednost Mantelovog testa (r)
Svojstva kvalitete	-	0,020	
Genetska udaljenost	0,809	-	
Značajnost rezultata Mantelovog testa (P)			

4. RASPRAVA

Iako je soja kultura uske genetske osnove (Gizlice i sur., 1994.), kontinuiran napredak u povećanju prinosa i poboljšanju značajnih agronomskih svojstava ipak postoji (Wilcox, 2001.; Malcolm i sur., 2002.), što je i osnova uspješnog oplemenjivanja. Tavaud-Pirra i suradnici (2009.) navode da o genetskoj raznolikosti europske germplazme soje postoji vrlo malo podataka, ali se temeljem povijesti uzgoja može pretpostaviti da primke u europskim kolekcijama germplazme posjeduju značajnu raznolikost, što uz njihovu prilagođenost uvjetima umjerene klime može biti iznimno korisno za oplemenjivačke programe. Također, Mulato i suradnici (2010.) smatraju da je potencijal za oplemenjivanje soje vrlo velik, jer je do sada za stvaranje elitnih kultivara korišten samo mali dio primki iz kolekcija germplazme. Uz to Tara Satyavathi i suradnici (2006.) navode da potpuni opis kultivara i njihove genetske divergentnosti pomaže introgresiju genetski različite germplazme u postojeće gen kolekcije koje su temelj oplemenjivačkih programa. Dakle, za unaprjeđenje sortimenta, neophodno je prije svega istražiti postojeću germplazmu, ocjeniti fenotipsku i genotipsku varijabilnost za svojstva od interesa te poduzeti sve mjere očuvanja raznolikosti. Temeljem rezultata istraživanja klasičnim metodama u kombinaciji sa suvremenim kemijskim, biokemijskim i molekularnim analizama moguće je, kroz križanja i kontinuirani, višegodišnji oplemenjivački rad stvoriti populaciju koja će osigurati odabir superiornih linija u smislu uroda, stabilnosti, otpornosti, ali i kvalitete zrna soje.

4.1. Raznolikost germplazme u svojstvima kvalitete

Zbog utvrđene visoke nutritivne vrijednosti zrna soje i potencijala za njegovu uporabu kao sirovine u različitim granama industrije, oplemenjivački programi u svijetu u fokusu istraživanja uz prinos imaju i kvalitetu zrna. O kemijskom sastavu zrna različitih kultivara ovisiti će i njegova krajnja namjena pa se kroz oplemenjivanje, utvrđivanjem i čuvanjem genetske varijabilnosti za ciljane svojstva kvalitete te uporabom varijabilnosti u svrhu stvaranja novih kultivara, nastoje zadovoljiti zahtjevi industrije, tržišta i potrošača. Neka od svojstava kvalitete zrna soje koja utječu na raznolikost njegove uporabe su koncentracija bjelančevina i ulja, sastav i koncentracija masnih kiselina u ulju, sastav i koncentracija šećera, posebice oligosaharida te sastav i količina izoflavona.

Statistička analiza podataka u provedenom istraživanju pokazala je da su na variranje vrijednosti visoko značajno ($P < 0,01$) za sva svojstva kvalitete zrna utjecali genotip i godina, osim u slučaju koncentracije ukupnih saharida gdje razlike između godina nisu bile statistički značajne. Značajnost istih izvora varijacije za svojstvo apsolutna masa zrna potvrdili su Antalikova i suradnici (2008.), Iqbal i suradnici (2010.), i Ghodrati (2013.), za koncentraciju bjelančevina i ulja Sudarić i suradnici (2006.), Popović i suradnici (2012.b), Bueno i suradnici (2013.), Ghodrati (2013.), Josipović i suradnici (2013.) te Rodrigues i suradnici (2014.), za masne kiseline Primomo i suradnici (2002.), Hou i suradnici (2006.) te Fan i suradnici (2009.), a za izoflavone Murphy i suradnici (2009.), Gutierrez-Gonzalez i suradnici (2011.) i Adie i suradnici (2015.). U ranijim istraživanjima saharida u zrnju soje, izvori varijabilnosti su bili nešto drugačiji. Geater i suradnici (2000.b), koji su utvrđivali sadržaj saharoze, rafinoze i stahioze kod 16 kultivara soje malog zrna koji se koriste za proizvodnju natto-a, utvrdili su da je genotip bio statistički značajan kao izvor varijacije samo za rafinozu. U istraživanju Taira (1990.), koncentracije rafinoze i stahioze većinom su bile pod utjecajem genotipa, dok je na koncentraciju ukupnih saharida te koncentraciju saharoze okolina utjecala više nego genotip. Da na sadržaj saharoze u zrnju soje utječu genotip i godina potvrdili su i Maughan i suradnici (2000.).

Variranje vrijednosti utvrđeno analizom varijance, uočljivo je i kroz raspone prosječnih mjerenja za pojedina svojstva. U ovom istraživanju, kultivari su se izrazito razlikovali po apsolutnoj masi zrna, koja je u trogodišnjem prosjeku varirala od 139,35 g (Podravka 95) do 215,02 g (Alisa) dok je srednja vrijednost trogodišnjeg pokusa bila 171,06 g. Kako masa 1000 zrna soje može varirati od 40 do čak 500 grama, od divljih do povrtnih sorti (Vratarić i Sudarić, 2008.), u različitim istraživanjima zabilježene su različite minimalne i maksimalne, odnosno srednje vrijednosti. Tako su, na primjer, Sudarić i Vratarić (2002.) za 22 genotipa utvrdili variranje apsolutne mase zrna od 126,0 do 173,7 g, Malik i suradnici (2006.) za 17 genotipova od 139 do 210 g, Antalikova i suradnici (2008.) za 50 genotipova od 127 do 230 g, Ghodrati (2013.) za 12 genotipova od 131,60 do 223,30 g, a Malik i suradnici (2011.) za 92 genotipa čak od 42 do 195 g. U slučaju istraživanja Popović i suradnika (2012.a) gdje se genotip nije pokazao kao statistički značajan izvor varijabilnosti dok je godina utjecala na razini značajnosti od 5 %, i raspon vrijednosti je bio uži (141,26 – 149,27 g). Kao rasponi, i srednje vrijednosti apsolutne mase zrna znatno se razlikuju po istraživanjima ovisno o korištenim genotipovima i vanjskim utjecajima pa je na

primjer u istraživanju Basića i suradnika (2006.) srednja vrijednost bila 194,57 g, u istraživanju Aditya i suradnika (2011.) 99,80 g, kod Malik i suradnika (2011.) 114,60 g, a kod Ghodrati-a (2013.) 162 g. Kao sorte s najvećom masom 1000 zrna, u ovom istraživanju izdvajaju se Alisa, Lucija, Julijana i Korana. Koncentracija bjelančevina u ovom pokusu varirala je u rasponu od 39,06 do 41,05 %, dok je srednja vrijednost bila na razini 40,07 %. Slične vrijednosti su utvrđene u istraživanju Vratarić i suradnika (2005.) gdje je raspon vrijednosti za elitne osječke linije I grupe zriobe iznosio 38,7 – 41,2 %, a srednja vrijednost 39,93 %, te u istraživanju Ramteke i suradnika (2010.) u kojem je raspon bio 37,69 - 42,74 %, a srednja vrijednost 40,23 %. Vrijednosti pokusa za koncentraciju ulja u zrnu soje bile su u rasponu od 22,09 % do 24,09 % sa srednjom vrijednosti koja je iznosila 23,05 % što se podudaralo s rasponom (22,1 – 23,8 %) i prosjekom (22,92 %) utvrđenim kod elitnih osječkih linija soje 00 grupe zriobe u istraživanju Vratarić i suradnika (2005.), te rasponom (21 – 26 %) i prosjekom (23,4 %) utvrđenim u istraživanju Ghodrati-a (2013.). Kako koncentracije bjelančevina i ulja u zrnu soje potvrđeno ovisi o genotipu i okolini (Sudarić i sur., 2006.; Popović i sur., 2012.b; Bueno i sur., 2013.; Ghodrati, 2013.; Josipović i sur., 2013.; Rodrigues i sur., 2014.), rasponi i srednje vrijednosti variraju od istraživanja do istraživanja pa je tako u pokusu Popović i suradnika (2012.a) s četiri genotipa soje utvrđena srednja vrijednost koncentracije bjelančevina od 37,15 % (raspon: 36,65 – 37,66 %), a ulja 21,08 % (raspon: 19,13 – 23,16 %), kod Bueno i suradnika (2013.) 42,44 % za bjelančevine (raspon: 40,20 – 44,49 %) i 22,10 % za ulje (raspon: 20,72 – 22,81 %), a kod Sharma i suradnika (2014.) 41,4 % za bjelančevine (raspon: 39,40 – 44,40 %) i 16,3 % za ulje (raspon: 14 – 18,70 %). Koncentracija bjelančevina u zrnu soje kod cjelokupne kolekcije germplazme USDA varirala je od 34,1 % do čak 56,8 %, a koncentracija ulja od 8,1 % do 27,9 % (Wilson, 2004.). Razlike srednjih vrijednosti i raspona vrijednosti za koncentraciju bjelančevina i koncentraciju ulja ovisi i o namjeni kultivara soje uključenih u različita istraživanja, odnosno o ciljevima oplemenjivačkih programa iz kojih su genotipovi uzeti. U ovom istraživanju najveću koncentraciju bjelančevina su imale sorte Alisa, Sanda, Anica i Sara, a najveću koncentraciju ulja SG-1 i Lika. Sastav masnih kiselina u zrnu konvencionalnih sorti soje prema Fehr i Curtiss-u (2004.) čini u prosjeku 12 % palmitinske kiseline (16:0), 4 % stearinske (18:0), 27 % oleinske (18:1), 50 % linolne (18:2) i 7 % linolenske (18:3) kiseline. Rani i suradnici (2007.) navode nešto drugačije prosječne vrijednosti za ovih pet masnih kiselina u konvencionalnim sortama, slijedom: 11 %, 4 %, 23 %, 53 % i 8 %, a Lee i suradnici (2007.) 12 %, 4 %, 23 %, 53 % i 8-10 %. U ovom istraživanju su koncentracija palmitinske

(10,55 %), stearinske (4,95 %), oleinske (24,27 %), linolne (52,11 %) i linolenske (6,84 %) kiseline bile u okviru standardnih vrijednosti. Slične srednje vrijednosti dobili su Rani i suradnici (2007.) u pokusu sa 78 indijskih genotipova gdje su koncentracije palmitinske, stearinske, oleinske, linolne i linolenske kiseline iznosile slijedom: 11,15 %, 3,45 %, 25,60 %, 52,56 % i 6,91 %. Znatno niže prosječne vrijednosti za svih pet masnih kiselina utvrdio je Farno (2005.) u četiri pokusa koji su uključivali genotipove soje IV – VI grupe zriobe. Kao mogući razlog autor navodi vrlo visoke temperature te nisku količinu oborina ili sušu tijekom razvoja zrna, pri čemu su vrijednosti ipak bile nešto veće u godini u kojoj je ovaj period bio malo vlažniji i s nižim temperaturama. Isti autor navodi tri poželjna fenotipa soje ovisno o tome koristi li se ulje za prženje, pečenje ili kao gorivo (biodizel). Soja koja se uzgaja za proizvodnju jestivog ulja, odnosno ulja za prženje i pečenje, mora imati visoku koncentraciju oleinske kiseline, a niske koncentracije linolne i linolenske kiseline, što je u ovom istraživanju slučaj kod sorte Korana i linije OS-60-06. Soja koja se uzgaja za proizvodnju biodizela mora imati visoku koncentraciju oleinske, a nisku palmitinske kiseline što je također utvrđeno za sortu Korana. Rasponi te prosječne vrijednosti koncentracije glukoze (0,16 - 0,29 %; 0,23 %), fruktoze (0,11 – 0,28 %; 0,18 %), saharoze (2,32 – 3,46 %; 2,99 %), rafinoze (0,66 - 1,10 %; 0,85 %) i stahioze (1,64 - 2,41 %; 1,93 %) utvrđeni u ovom istraživanju, bili su u okviru raspona vrijednosti za navedene šećere iz istraživanja Hou i suradnika (2009.) koje je uključivalo 241 genotip soje porijeklom iz različitih dijelova svijeta. U navedenom istraživanju (Hou i sur., 2009.), za ukupan sadržaj saharida utvrđen je raspon od 72,6 do 166,2 mg/g suhe tvari (7,26 – 16,62 %), za glukozu od 0,3 do 23,9 mg/g (0,03 – 2,39 %), za fruktozu od 0,3 do 25,2 mg/g (0,03 – 2,52 %), za saharozu od 11,1 do 83,1 mg/g (1,11 – 8,31 %), za rafinozu od 2,3 do 13,1 mg/g (0,23 – 1,31 %), a za stahiozu od 11,8 do 69,1 mg/g suhe tvari (1,18 – 6,91 %). Iz navedenog je uočljivo da su srednje vrijednosti utvrđene u našem istraživanju bile u donjem dijelu raspona vrijednosti utvrđenih u istraživanju Hou i suradnika (2009.), dok je prosječna vrijednost koncentracije ukupnih saharida utvrđena u našem istraživanju (6,62 %) bila ispod minimalne vrijednosti ukupnih saharida (72,6 – 166,2 mg/g) u rasponu ukupnih saharida Hou i suradnika (2009.). Uz Hou i suradnike (2009.), široke raspone za sadržaj glukoze, fruktoze, saharoze te oligosaharida utvrdili su Hymowitz i suradnici (1972.), Hymowitz i Collins (1974.) te Hartwig i suradnici (1997.) u ranijim istraživanjima. U istraživanju Geater i Fehr-a (2000.a) koje je provedeno s 23 kultivara soje tijekom jedne godine na osam lokacija, raspon ukupnog sadržaja saharida kretao se od 184 do 219 g/kg suhe tvari (18,4 – 21,9 %). Isti autori u istraživanju sa 16

kultivara soje malog zrna navode raspone za saharozu od 62 do 71 g/kg (6,2 – 7,1 %), za rafinozu od 4,9 do 5,8 g/kg (0,49 – 0,58 %) i za stahiozu od 47 do 49 g/kg (4,7 – 4,9 %). Razlog što su u ovom istraživanju utvrđene nešto niže vrijednosti za koncentraciju ukupnih i pojedinačnih saharida nego u ostalim navedenim istraživanjima može biti porijeklo korištenih genotipova. Tako u istraživanju Hou i suradnika (2009.) većina genotipova dolazi iz područja gdje se soja uzgaja kao hrana za ljude pa je samim time i jedan od ciljeva oplemenjivačkih programa povećati, odnosno poboljšati sastav šećera. U slučaju naših genotipova, koji se uzgajaju većinom za ishranu stoke, naglasak u oplemenjivanju je više na povećanju koncentracije bjelančevina koje su u negativnom odnosu s ukupnom količinom saharida (Krober i Carter, 1962.). Ukupan sadržaj saharida te udio pojedinih šećera iznimno su važni ako se oplemenjivanjem žele stvoriti genotipovi čije će se zrno koristiti za ishranu ljudi, ali i životinja. Pri tome je neophodno smanjiti količinu galaktooligosaharida koji su neprobavljivi i uzrokuju iritaciju gastrointestinalnog trakta (Suarez i sur., 1999.; Jones i sur., 1999.; Gulewitz i sur., 2014.), a povećati količinu glukoze, fruktoze i saharoze koje su poželjne jer su lako probavljive i daju proizvodima od soje karakterističan slatkast okus. U ovom istraživanju, najmanju količinu oligosaharida imale su sorte Ika (2,40 %), Lika (2,44 %) i Julijana (2,49 %), ali su njihove koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze bile na srednjoj razini. Najviše oligosaharida su imale sorte SG-1 (3,40 %) i Sanda (3,18 %) koje ne bi trebalo uključivati u oplemenjivačke programe čiji je cilj stvaranje genotipova za hranu ili hranidbu. Kao genotip čije zrno bi se moglo, prema sadržaju pojedinačnih šećera, koristiti za proizvodnju hrane izdvaja se sorta Seka koja ima vrlo visoku razinu poželjnih monosaharida i disaharida, a nisku razinu nepoželjnih galaktooligosaharida. Prosječna vrijednost pokusa za sadržaj ukupnih izoflavona, kao zbroja daidzeina, genisteina i gliciteina, iznosila je 164,58 mg/100 g ST uz raspon od 124,06 do 286,20 mg/100 g ST. U odnosu na ove vrijednosti, u istraživanju Murphy i suradnika (2009.), koji su u dvogodišnje, višelokacijske pokuse uključili F_{4:7} populaciju nastalu iz nekoliko križanja, utvrđene su nešto više vrijednosti i raspon od 1600 do 3700 µg/g ST (160 - 370 mg/100 g), a u istraživanju Adie i suradnika (2015.) sa 10 linija na osam lokacija u trajanju od jedne godine znatno niže vrijednosti u rasponu od 149,71 do 398,50 ppm (14,97 - 39,85 mg/100 g ST). Izrazito širok raspon vrijednosti za sumu sadržaja daidzeina, genisteina i gliciteina (124 - 3174 µg/g ST odnosno 12,4 - 317,4 mg/100 g) utvrdili su Gutierrez-Gonzalez i suradnici (2011.) na populaciji rekombinantnih elitnih linija koja se sastojala od 188 F₇ potomstava nastalih križanjem kultivara sa niskom i kultivara sa visokom koncentracijom izoflavona. Da rasponi

vrijednosti izoflavona mogu znatno varirati pokazuje i istraživanje Eldridge i Kwolek-a (1983.) koji su unutar jednog genotipa utvrdili variranje ukupnih izoflavona od 46 do 309 mg/100 g ST, a Wang i Murphy (1994.b) variranje ukupne vrijednosti za 12 izoflavona od 1176 do 3309 $\mu\text{g/g}$ ST (117,6 – 330,9 mg/100 g ST). Suprotno istraživanju Tepavčević i suradnika (2010.) te Cvejić i suradnika (2011.) u kojima je prosječan sadržaj daidzeina bio najveći, a prosječan sadržaj gliciteina najmanji, odnosno Kim i suradnika (2012.) gdje je prosječan sadržaj daidzeina bio najveći, a prosječan sadržaj genisteina najmanji, u našem istraživanju situacija je bila nešto drugačija: prosječan sadržaj genisteina je bio najveći (94,41 mg/100 g ST), slijedio je prosječan sadržaj daidzeina (49,27 mg/100 g ST), a najmanji je bio prosječan sadržaj gliciteina (20,90 mg/100 g ST). Ista situacija je bila i u pokusu u kontroliranim uvjetima Lozovaya i suradnika (2005.) koji je uključivao dva francuska i tri američka kultivara II grupe zriobe. Cvejić i suradnici (2011.) su na skupu od 20 F_1 potomstava utvrdili više vrijednosti u odnosu na one utvrđene u našem istraživanju za sva tri izoflavona tj. za daidzein prosječnu vrijednost od 1,32 mg/g ST (132 mg/100 g ST), za glicitein 0,25 mg/g ST (25 mg/100 g ST), a za genistein 1,02 mg/g ST (102 mg/100 g ST). Prosječne vrijednosti u istraživanju Tepavčević i suradnika (2010.) sa 20 kultivara soje bile su još više i to 1,54 mg/g ST (154 mg/100g ST) daidzeina, 0,41 mg/g ST (41 mg/100 g ST) gliciteina i 1,31 mg/g ST (131 mg/100 g ST) genisteina dok su niže vrijednosti za genistein (409 $\mu\text{g/g}$ ST tj. 40,9 mg/100 g ST) i daidzein (385 $\mu\text{g/g}$ ST tj. 38,5 mg/100 g ST) utvrdili Gutierrez-Gonzalez i suradnici (2011.) u čijem je istraživanju prosječan sadržaj gliciteina bio skoro četiri puta veći od onog utvrđenog u ovom istraživanju tj. iznosio je 814 $\mu\text{g/g}$ ST (81,4 mg/100 g ST). Također, Gutierrez-Gonzalez i suradnici (2011.) su za daidzein utvrdili variranje od 49 do 2013 $\mu\text{g/g}$ ST (4,9 – 201,3 mg/100 g ST), za genistein od 58 do 1297 $\mu\text{g/g}$ ST (5,8 – 129,7 mg/100 g ST) te za glicitein od 0 do 277 $\mu\text{g/g}$ ST (0-27,7 mg/100 g ST) što, u odnosu na raspon od 36,01 do 69,88 mg/100 g ST za daidzein, od 13,41 do 31,42 mg/100 g ST za glicitein i od 53,86 do 195,34 mg/100 g ST za genistein koji su utvrđeni u ovom istraživanju, predstavlja znatno šire raspone vrijednosti odnosno veliku varijabilnost germplazme. Unutar genotipova istraživanih u sklopu ove disertacije, Korana i Lucija su imale najviše vrijednosti ukupnih izoflavona. Najveći sadržaj daidzeina utvrđen je kod Like, Korane i Vite, najveći sadržaj genisteina kod Korane i Lucije, a najveći sadržaj gliciteina kod SG-1 i Like pa ove sorte treba uzeti u obzir pri planiranju oplemenjivačkog programa s ciljem povećanja sadržaja izoflavona.

Ako promatramo kretanje vrijednosti po godinama, značajnost utjecaja okoline na fenotipsku ekspresiju svojstava jasno je uočljiva, što je potvrđeno i analizom varijance kroz statistički visoko značajne ($P < 0,01$) razlike između godina. Iako su sve tri godine po prosječnim vrijednostima temperatura tijekom vegetacije soje bile iznad višegodišnjeg prosjeka (1961. – 1990.), prva godina (2010.) pokusa se u odnosu na ostale dvije (2011. i 2012.) izdvaja kao godina s nižim temperaturama i većom količinom oborina, koje su premašile i višegodišnji prosjek (1961. – 1990.). Treća godina pokusa (2012.) je tijekom perioda formiranja i nalijevanja zrna od sve tri bila najtoplija i najsuša. Kako su se godine izrazito razlikovale, moguće je bilo istražiti njihov utjecaj na svojstva kvalitete zrna. Negativan učinak visokih temperatura i nedostatka vode u tlu tijekom cvatnje, formiranja mahuna i nalijevanja zrna na akumulaciju suhe tvari u zrnu soje, koje su ranije utvrdili Vratarić i Sudarić (2008.) te Popović i suradnici (2012.a, 2012.b), potvrđen je i u ovom istraživanju jer je najmanja prosječna vrijednost apsolutne mase zrna svih genotipova zabilježena 2012. godine (159,57 g), a najveća 2010. (179,59 g). Koncentracija ulja se u odnosu na uvjete sredine kretala suprotno kretanju apsolutne mase zrna pa je 2012. godine utvrđena najviša razina prosječne koncentracije (25,06 %), a u izrazito vlažnoj 2010. najmanja (21,25 %). Isti slučaj bio je i u istraživanju Josipović i suradnika (2013.) s osječkim sortama soje za razdoblje od 2010. – 2012. Prema Popović i suradnicima (2012.a) te Josipović i suradnicima (2013.), sadržaj ulja je veći u godinama s manje oborina uz više temperature zraka tijekom formiranja mahuna i nalijevanja zrna, dok je suprotno istinito za koncentraciju bjelančevina. Ako uz navedeno uzmemo u obzir i međusobno inverzan odnos koncentracije ulja i bjelančevina pri čemu se smatra da 1 % smanjenja koncentracije ulja u zrnu uzrokuje 2 % porasta koncentracije bjelančevina (Clemente i Cahoon, 2009.), za očekivati bi bilo da prosječne vrijednosti koncentracije bjelančevina po godinama imaju suprotan trend kretanja u odnosu na koncentraciju ulja. Značaj dovoljne količine vode u tlu za ova svojstva kvalitete utvrdio je i Latifi (1989.) u čijem je istraživanju navodnjavanje u početku formiranja mahuna te tijekom nalijevanja zrna rezultiralo povećanjem koncentracije bjelančevina, a smanjenjem koncentracije ulja. Isto su potvrdili i Kirnak i suradnici (2010.) te Ghassemi-Golezani i Farshbaf-Jafari (2012.). Ipak, takvo kretanje koncentracije bjelančevina nije potvrđeno u ovom istraživanju jer je najveći prosjek svih genotipova za koncentraciju bjelančevina zabilježen 2012. godine. Iako maksimalna koncentracija bjelančevina u zrnu soje nije, prema prethodno navedenim istraživanjima, očekivana u godinama koje su izrazito suhe i tople kao što je to bilo slučaj 2012. godine, Gibson i Mullen

(1996.) navode da visoke dnevne temperature u kombinaciji s visokim noćnim temperaturama tijekom R5-R8 faze razvoja (nalijevanje zrna do zriobe) mogu uzrokovati porast sadržaj bjelančevina sukladan porastu prosječnih temperatura. Također, Dornbos i Mullen (1992.) su temeljem rezultata istraživanja došli do zaključka da visoke temperature uz sušne uvjete u nalijevanju zrna soje rezultiraju značajnim porastom koncentracije bjelančevina. Prema nekim autorima, temperature (Wolf i sur., 1982.) i oborine (Dornbos i Mullen, 1992.) tijekom razvoja zrna znatno utječu i na koncentraciju stearinske, oleinske, linolne i linolenske masne kiseline, ali ne na koncentraciju palmitinske kiseline, dok Lee i suradnici (2007.) te Farno (2005.) smatraju da temperatura općenito nema utjecaj na zasićene masne kiseline. Cherry (1985.), te Lee i suradnici (2007.) navode kako visoke temperature tijekom razvoja zrna uzrokuju povećanje koncentracije oleinske kiseline, a smanjenje koncentracija linolne i/ili linolenske kiseline. Isti slučaj je bio i u ovom istraživanju. Koncentracija oleinske kiseline bila je najveća (26,72 %) u 2012. godini, a najmanja u 2010. godini (21,65 %), dok su srednje vrijednosti koncentracije linolne i linolenske kiseline imale obrnuti trend pa su maksimalne koncentracije zabilježene 2010. (slijedom: 54,76 % i 7,71 %), a minimalne 2012. godine (slijedom: 49,83 % i 5,74 %). Primomo i suradnici (2002.) navode da su na uvjete okoline najosjetljivije bile oleinska i linolenska kiselina, a Oliva i suradnici (2006.) da su genotipovi s najvećim sadržajem oleinske kiseline bili najmanje stabilni. U ovom istraživanju prosječna vrijednost koncentracije stearinske kiseline imala je jednak trend kretanja kao i koncentracija oleinske kiseline tj. bila je najveća 2012. godine, a najmanja 2010. godine. Sličan slučaj su zabilježili Primomo i suradnici (2002.) u čijem istraživanju je godina statistički značajno utjecala na koncentraciju palmitinske kiseline pa autori zaključuju da je koncentracija ove zasićene masne kiseline pod utjecajem ostalih činitelja okoline koji nisu posebno istraživani. Minimalne vrijednosti za koncentraciju saharoze i stahioze zabilježene su u 2012. godini (slijedom: 2,54 % i 1,58 %), što je sukladno istraživanju Wolf i suradnika (1982.) koji navode da su se koncentracije ovih saharida snižavale s povećavanjem prosječne temperature okoline. Također, Wolf i suradnici (1982.) navode da na glukozu, fruktozu i rafinozu, temperature nisu imale značajan utjecaj. Ipak, u ovom istraživanju razlike srednjih vrijednosti za godine bile su statistički značajne što može biti posljedica utjecaja nekih drugih okolinskih činitelja osim temperature ili posljedica negativne korelacije glukoze (Hou i sur., 2009.), fruktoze (Hou i sur., 2009.) i rafinoze (Mozzoni i sur., 2013.) sa saharozom na koju uvjeti okoline znatno utječu. Negativan odnos saharoze zabilježen je i u odnosu na koncentraciju ukupnih saharida čija vrijednost je također

bila najmanja u godini kada su za koncentraciju saharoze zabilježene maksimalne vrijednosti. Sadržaj ukupnih izoflavona (kao zbroj sadržaja daidzeina, genisteina i gliciteina) u ovom je istraživanju najveći bio 2010. godine (192,89 mg/100 g ST), koja je od sve tri godine pokusa imala najniže temperature i najveću količinu oborina, dok je najmanji bio izrazito vruće i sušne 2012. godine (127,78 mg/100 g ST). Isti slučaj je bio sa sadržajem daidzeina i genisteina, a veće vrijednosti sadržaja izoflavona kod nižih temperatura i veće količine vlage u tlu tijekom razvoja zrna zabilježili su Lee i suradnici (2003.), Lozovaya i sur., (2005.) te Murphy i suradnici (2009.). Ipak, sadržaj gliciteina je imao suprotan trend, odnosno najveći je bio 2011. godine (21,56 mg/100 g ST), a najmanji 2010. godine (19,69 mg/100 g ST). Razlozi za ovakvo kretanje sadržaja gliciteina nisu pronađeni u istraženju literaturi pa su neophodni dodatni pokusi kako bi se izveli valjani zaključci.

Kako bi usporedili varijabilnost između testiranih genotipova za pojedina svojstva, izračunat je koeficijent varijacije. Prema ovom koeficijentu, genotipovi su se u prosjeku najviše razlikovali u sadržaju genisteina (34,66 %), a najmanje u koncentraciji bjelančevina (1,81 %). Niski koeficijenti varijacije utvrđeni su i za koncentraciju ulja (2,26 %), linolne kiseline (2,73 %), palmitinske kiseline (4,26 %), oleinske kiseline (5,50 %) i linolenske kiseline (6,79 %). Nešto veći u odnosu na navedene bili su koeficijenti varijacije za svojstva: koncentracija stahioze (8,85 %), koncentracija ukupnih oligosaharida (8,94 %), koncentracija ukupnih saharida (9,18 %), apsolutna masa zrna (9,68 %), koncentracija saharoze (10,47 %), koncentracija stearinske kiseline (11,61 %), koncentracija glukoze (13,42 %) i koncentracija rafinoze (16,93 %). Koeficijenti varijacije preko 20 % utvrđeni su za sadržaj daidzeina (20,56 %), sadržaj gliciteina (21,67 %), koncentraciju fruktoze (23,42 %) te sadržaj ukupnih izoflavona (23,97 %). Vrijednost koeficijenta varijacije za apsolutnu masu zrna iz ovog istraživanja podudarala se s vrijednostima utvrđenim za dvije od četiri različite povezujuće grupe (eng. *clusters*) genotipova u istraživanju Antalikova i suradnika (2008.) koji su iznosili 9,98 % i 9,40 %, dok su u ostale dvije povezujuće grupe koeficijenti varijacije bili veći: 13,35 % i 12,95 %. Utjecaj različitih uvjeta okoline na varijabilnost svojstava jasno se mogao uočiti i iz vrijednosti koeficijenata varijacije po godinama. U slučaju apsolutne mase zrna, najmanje variranje među genotipovima uočeno je 2011. godine (CV = 7,64 %), srednje 2012. (CV = 9,95 %), a najveće 2010. godine (CV = 15,87 %). Nešto niže vrijednosti utvrđene su u trogodišnjem istraživanju Sudarić i Vratarić (2002.) na 22 genotipa soje kada je koeficijent varijacije ovisno o godinama bio u rasponu od 5,24 % do

6,07 %. Procjene koeficijenta varijabilnosti su se u drugim istraživanjima kretale od manjih (3,18 %) do znatno većih (39,01 %) (Aditya i sur., 2011.; Malik i sur., 2011.) ovisno o obimu pokusa, uključenom materijalu te uvjetima okoline. Razinu varijacije sličnu kao u ovom istraživanju za koncentraciju bjelančevina i ulja utvrdili su Bueno i suradnici (2013.) na 18 genotipova soje (CV = 1,91 % za bjelančevine, CV = 2,78 % za ulje) dok je koeficijent varijacije u istraživanju Ghodrati-a (2013.) za bjelančevine bio 3,06 %, a za ulje 1,72 %, a kod Rodrigues i suradnika (2010.) za bjelančevine 4,1 %, a za ulje 3,8 %. Koeficijenti varijacije za koncentraciju bjelančevina i ulja su u svim godinama trajanja pokusa bili na sličnoj razini pa su tako u 2010., 2011. i 2012. za koncentraciju bjelančevina iznosili slijedom: 2,18 %, 2,88 % i 2,10 %, a za koncentraciju ulja slijedom: 2,35 %, 2,44 % i 2,83 %, iz čega možemo zaključiti da je fenotipska ekspresija ovih svojstava relativno stabilna odnosno da utjecaj godine, iako statistički visoko značajan, nije izrazito velik. Ako promatramo masne kiseline, iz navedenog možemo vidjeti i da su se testirani genotipovi međusobno najviše razlikovali u koncentraciji stearinske kiseline, a najmanje u koncentraciji linolne kiseline. Isti slučaj je bio u istraživanju Primomo i suradnika (2002.), dok je u istraživanju Priolli i suradnika (2014.) te Fan i suradnika (2015.) najveću varijabilnost imala koncentracija oleinske kiseline, a najmanju koncentracija linolne. Varijacija koncentracije palmitinske kiseline po godinama nije se puno razlikovala od prosjeka pokusa pa je tako 2010. i 2011. koeficijent varijacije bio 4,86 %, a 2012. 4,69 %. Slične vrijednosti su utvrđene i u istraživanju Primomo i suradnika (2002.) gdje je koeficijent varijacije koncentracije palmitinske kiseline za 17 genotipova iznosio 5,8 %, odnosno od 5,0 – 6,4 % za tri godine pokusa u istraživanju Fan i suradnika (2015.) s rekombinantnim elitnim linijama i njihovim roditeljima. Priolli i suradnici (2014.) bilježe nešto veće vrijednosti koeficijenta varijacije za koncentraciju palmitinske kiseline kod 94 genotipa soje, ali sličnu razinu promjene koeficijenta varijacije po godinama pri čemu je CV u prvoj godini bio 17,2 %, a u drugoj godini pokusa 16,2 %. Veće vrijednosti koeficijenta varijacije u navedenom istraživanju su i očekivane jer je u istraživanje uključen veći broj genotipova. Koncentracija stearinske kiseline je u ovom istraživanju 2010. godine u odnosu na prosjek nešto manje varirala (CV = 8,75 %), a 2011. i 2012. godine nešto više (slijedom: CV = 14,18 % i CV = 14,83 %). U istraživanju Priolli i suradnika (2014.) vrijednosti koncentracije za stearinsku kiselinu su se također razlikovale po godinama pa je tako 2010. godine zabilježen koeficijent varijacije od 14,4 %, a 2011. od 16,4 %, dok su koeficijenti varijacije za trogodišnji pokus Fan i suradnika (2015.) bili u rasponu od 10,2 % do čak 18,4 %. Koncentracija oleinske kiseline je u našem

istraživanju po godinama u odnosu na prosjek pokusa varirala više pa su tako 2010., 2011. i 2012. godine zabilježeni koeficijenti varijacije koji su iznosili slijedom: 8,05 %, 8,19 % i 7,05 %. Nešto veći koeficijent varijacije za oleinsku kiselinu (CV = 10,0 %) zabilježen je u istraživanju Primomo i suradnika (2002.), a znatno veći u dvije godine istraživanja Priolli i suradnika (2014.) (CV = 39,2 % i CV = 32,1 %) u koje je bio uključen puno veći broj genotipova različitog porijekla. U našem istraživanju, koncentracija linolne kiseline koja je najmanje varirala u prosjeku, imala je male razlike u koeficijentima varijacije po godinama. Godine 2010. koeficijent varijacije (CV = 2,84 %) je bio na razini prosjeka pokusa (CV = 2,73 %), dok je 2011. (CV = 4,79 %) i 2012. (CV = 3,67 %) bio nešto veći. Slične vrijednosti su izračunate i u pokusu Fan i suradnika (2015.) gdje su koeficijenti varijacije za linolnu kiselinu tijekom tri godine bili u rasponu od 4,0 % do 6,1 % te Primomo i suradnika (2002.) gdje je prosjek pokusa varirao koeficijentom od 3,6 %. U pokusu Priolli i suradnika (2014.) koji je uključivao velik broj genotipova, i koeficijent varijacije za koncentraciju linolne kiseline bio je veći (CV = 13,7 % i CV = 12,3 %). Koeficijenti varijacije za koncentraciju linolenske kiseline u našem istraživanju imale su veće vrijednosti po godinama nego u prosjeku. Najveće variranje je zabilježeno 2012. godine (CV = 11,45 %), a najmanje 2011. (CV = 6,98 %) Slične vrijednosti utvrdili su Fan i suradnici (2015.) (CV = 7,6 % - 10,4 %), dok su znatno veće izračunali Priolli i suradnici (2014.) (CV = 27,0 % i CV = 24,1 %). U istraživanju Akond i suradnika (2015.), u populaciji rekombinantnih elitnih linija vrijednosti koeficijenta varijacije za koncentraciju rafinoze (CV = 11,11 %) i stahioze (CV = 6,73 %) bile su nešto niže od onih utvrđenih u istraživanju u sklopu ove disertacije (za rafinozu CV = 16,93 %; za stahiozu CV = 8,85 %) dok je za koncentraciju saharoze koeficijent varijacije bio nešto veći (CV = 12,37 %). Također, koeficijenti varijacije za koncentracije različitih šećera po godinama, razlikovali su se od CV vrijednosti za njihove prosjeke pokusa, što potvrđuje da je godina imala utjecaj na fenotipsku ekspresiju svojstva. Za ukupne saharide, ukupne oligosaharide, saharozu, rafinozu i stahiozu najmanji koeficijenti varijacije bili su 2010. godine, a najveći 2012. godine iz čega možemo zaključiti da su visoke temperature i nedostatak oborina bili najpogodniji za ispoljavanje raznolikosti spomenutih svojstava. Koncentracija glukoze je najviše varirala također 2012. godine, a najmanje 2011. godine, dok je koncentracija fruktoze imala suprotan trend, odnosno najviše je varirala 2010., a najmanje 2012. godine. Koeficijenti varijacije za sadržaj ukupnih izoflavona, daidzeina, genisteina i gliciteina u ovom istraživanju iznosili su slijedom 23,97 %, 20,56 %, 34,66 % i 21,67 %. Sličan slučaj je bio i u istraživanju Lee i suradnika (2003.), koji su utvrdili da je

između genotipova najviše varirao sadržaj genisteina, zatim gliciteina, a najmanje daidzeina. Vrlo visoke vrijednosti koeficijenta varijacije zabilježili su Gutierrez-Gonzalez i suradnici (2011.) u već spomenutom istraživanju sa populacijom rekombinantnih elitnih linija koja se sastojala od 188 F₇ potomstava nastalih križanjem kultivara s niskom i kultivara s visokom koncentracijom izoflavona. CV vrijednost je za sadržaj daidzeina bila 55,1 %, za sadržaj genisteina 49,4 %, a za sadržaj gliciteina 65,5 % (Gutierrez-Gonzalez i sur., 2011.). U našem su istraživanju slično visoke vrijednosti koeficijenta varijacije utvrđene u pojedinim godinama za sadržaj ukupnih izoflavona (CV = 49,91 % u 2011.), daidzeina (CV = 51,27 % u 2012.), genisteina (CV = 68,54 % u 2011.) i gliciteina (CV = 46,08 % u 2012.), dok su prosjeci pokusa za sva četiri svojstva znatno manje varirali. Visoki koeficijenti varijacije, odnosno velike razlike u istima ovisno o godini ukazuju na značajan utjecaj genotipa te uvjeta okoline na izoflavone što su ranije potvrdili i Hoeck i suradnici (2000.), Lee i suradnici 2003., Tepavčević i suradnici (2010.), Adie i suradnici (2015.) te brojni drugi. Također, Adie i suradnici (2015.) navode da izoflavonoidi u zrnu soje imaju široke raspone varijacije čak i u genetski stabilnim linijama koje se uzgajaju u jednoj određenoj sredini jer na njihovu sintezu i akumulaciju znatno utječu brojni biotski i abiotski činitelji.

4.1.1. Genetska udaljenosti genotipova temeljem svojstava kvalitete

Temeljem utvrđenih vrijednosti različitih fenotipskih svojstava pa tako i svojstava kvalitete, moguće je napraviti procjenu genetske udaljenosti istraživanog materijala pri čemu veći broj svojstava osigurava veću točnost procjene (Cui i sur., 2001.). Ovaj koncept su u praktičnom oplemenjivanju prvi koristili Grafius i suradnici (1976.) tako da su na temelju morfoloških razlika različitih genotipova ječma birali genetski divergentne roditeljske komponente za križanja. Kako bi se pojasnila slika genetske udaljenosti germplazme temeljene na istraživanim svojstvima kvalitete, napravljena je skupna analiza (UPGMA dendrogram) te analiza glavnih sastavnica (PCA) po svojstvima i godinama, koje jasno razdvajaju genotipove ukazujući da varijabilnost unutar istraživanog materijala u svojstvima kvalitete zrna postoji, što je utvrđeno i koeficijentom varijacije za pojedina svojstva. Cui i suradnici (2001.), Zhou i suradnici (2002.) i Antalikova i suradnici (2008.) navode kako je skupna analiza pogodna za identifikaciju divergentnosti genotipova soje temeljem porijekla, morfoloških ili agronomskih svojstava, a poznavanje jačine i smjera povezanosti između svojstava od iznimne je važnosti u oplemenjivačkom procesu i omogućava poboljšanje

većeg broja svojstava istovremeno. Isto je potvrđeno i u ovom istraživanju kroz statistički značajanu ($P < 0,001$) i visoku ($r = 0,805$) vrijednost kofonetičkog korelacijskog koeficijenta.

S obzirom na to da su podaci o rodoslovlju bili samo djelomično dostupni, opsežnija procjena podudarnosti grupiranja genotipova u UPGMA dendrogramu s njihovim pedigreima nije bila moguća. Iz podataka o rodoslovlju koji su dobiveni iz matičnih knjiga PIO poznato je da sorte Sonja, Sanda, Mara, Tena, Toma i OS-60-06 kao jednog od roditelja imaju sortu Ika. Sorta Ika ima zajedničkog roditelja (Tisa) sa sortom Julijana, te zajedničkog roditelja (OS-C-600) sa sortom Zora, što ove dvije sorte povezuje s grupom prethodno navedenih. Sorta Sanda ima zajedničkog roditelja sa sortama Seka i Vita, što i ove dvije sorte pridružuje gornjoj skupini sorti koje proizlaze iz Ike. Ipak, navedene sorte koje dijele istog pretka, ne nalaze se u istim grupama dendrograma. Roditeljske komponente za ostatak genotipova uvedene su šiframa linija pa nije bilo moguće utvrditi njihovu daljnju srodnost. Podaci o rodoslovlju za sorte Gordana, Alisa i SG-1 nisu bili poznati, ali iz dendrograma u istraživanju Sudarić i suradnika (2008.), koji su koristili 14 mikrosatelitnih biljega za utvrđivanje genetske udaljenosti između sorti Poljoprivrednog Instituta Osijek i kanadskih sorti, može se uočiti da je sorta SG-1 smještena unutar grupe koju, između ostalih, čine sorta Ika te sorta Podravka 95, a sorta Podravka 95 je jedan od roditelja sorte Sara, te ima jednog roditelja zajedničkog sa sortom Lika (Corsoy). Također, Perić i suradnici (2014.), u čijem je istraživanju utvrđeno raspoređivanje genotipova u povezujuće grupe bez obzira na međusobnu srodnost tj. vrlo slabo podudaranje grupa dendrograma s rodoslovljem genotipova, navode da je evidentno kako su kultivari soje koji se uzgajaju u Hrvatskoj i Srbiji uske genetske osnove, odnosno imaju slično porijeklo, što je posljedica razmjene materijala između oplemenjivačkih kuća u regiji te selekcije unutar materijala prilagođenog na slične uvjete. Iz svega navedenog možemo zaključiti da je zbog ukupne genetske sličnosti materijala očekivano da su genotipovi preciznije grupirani temeljem svojstava kvalitete koja ranije nisu istraživana, odnosno da su raspoređeni u različitim grupama dendrograma, bez obzira na to imaju li prema dostupnim podacima rodoslovlja zajedničkog roditelja ili ne. Uz to treba uzeti u obzir i da razlike između grupiranja temeljem fenotipske ekspresije analiziranih svojstava kvalitete i rodoslovlja mogu biti posljedica statistički visoko značajnog utjecaja uvjeta okoline tj. utjecaja godine koji je u ovom našem istraživanju potvrđen analizom varijance za sva svojstva osim za ukupne saharide. Isto su zaključili i Liu

i suradnici (2011.) usporedbom genetske divergentnosti procijenjene temeljem agronomskih svojstava i genetske divergentnosti procijenjene mikrosatelitima.

U odnosu na genotipove nastale u Poljoprivrednom Institutu Osijek, strane sorte SG-1 i Alisa izdvajaju se i stoje svaka samostalno što ukazuje da se razlikuju u istraživanim svojstvima kvalitete od većine sorti. Najstarija sorta u istraživanom biljnom materijalu, Gordana, koja je porijeklom iz Hrvatskog Stočarsko Seleksijskog Centra također se izdvojila i stoji sama, ali se na većoj genetskoj udaljenosti ipak svrstava unutar grupe PIO genotipova, što znači da posjeduje veću sličnost svojstava kvalitete s genotipovima nastalim kao rezultat oplemenjivačkog programa PIO u odnosu na Alisu i SG-1. Navedeno može biti i rezultat sličnih ciljeva oplemenjivanja i sličnih uvjeta proizvodnje matičnih oplemenjivačkih kuća koje se nalaze u istoj državi.

Ako dendrogram promatramo iz ugla pripadnosti genotipova različitim grupama zriobe, pravilnosti nisu uočljive. Ipak sorte Korana i Lucija, koje su klasificirane kao vrlo rane (00, 00-0 grupa zriobe), grupirane su zajedno i izdvajaju se od ostalih genotipova. Uz iznimku Gordane koja je jedina sorta II grupe zriobe, ostatak sortimenta pripada 0-I grupi zriobe, odnosno 0 ili I grupi zriobe pa se i očekivalo da će sortiment biti preciznije grupiran temeljem svojstava kvalitete, odnosno raspoređen u različite grupe dendrograma neovisno o dužini trajanja vegetacije. Također, iz dendrograma je moguće uočiti da su genotipovi grupirani bez obzira na vrijeme nastanka. Izuzetak čini grupa u kojoj se nalaze sorte Korana i Lucija, obje priznate 2006. godine, te podgrupa u kojoj su isključivo novi kultivari Seka i Sara (priznati 2010. godine) i novonastala linija OS-60-06. Grupiranje genotipova neovisno o vremenu priznavanja ukazuje da procjenom genetske udaljenosti temeljem istraživanih svojstava ne možemo utvrditi genetski napredak nove germplazme u odnosu na staru u kvaliteti zrna. Ovo je i očekivano jer, uz izuzetak koncentracije bjelančevina i ulja, ispitivana svojstva kvalitete nisu bila dio oplemenjivačkog programa PIO genotipova koji čine većinu istraživanog biljnog materijala odnosno rad na unaprjeđenju spomenutih svojstava kvalitete zrna dio je nove strategije oplemenjivačkog programa koji je tek u začetku.

Iako prema istraživanju Čupića (2006.) veće variranje svojstava često može rezultirati u maskiranju stvarne vrijednosti pojedinih svojstava i nepouzdanosti vrijednosti temeljem kojih se procjenjuje raznolikost neke skupine genotipova, izračunati parametri genetske

udaljenosti te grupiranje genotipova omogućavaju izdvajanje genotipova koji bi mogli predstavljati poželjne roditeljske parove za križanja.

Analiza glavnih sastavnica (PCA) za 19 svojstava i 22 genotipa soje pokazala je da se većina sorti nalazi u središnjem dijelu biplota, raspoređena u sva četiri kvadranta. Pri tome jednu grupu čine sorte Ika, Mara, Julijana, Podravka 95, Gordana, Sonja, Nada, Zora i Vita koje u dendrogramu temeljenom na svojstvima kvalitete čine veći dio II B grupe (poglavlje 3.1.6.). Sorte Korana i Lucija koje čine zasebnu grupu u gore spomenutom dendrogramu izdvajaju se i u biplotu i nalazimo ih na periferiji te su najudaljenije od središta u odnosu na ostale sorte. Sorta Seka i linija OS-60-06 koje se nalaze u istoj grupi dendrograma i ovdje su vrlo blizu jedna drugoj. Iz navedenog se može zaključiti da se PCA rezultati poklapaju sa rezultatima grupiranja u dendrogramu konstruiranom temeljem svojstava kvalitete. Podudaranje različitih multivarijantnih analiza ranije su utvrdili Liu i suradnici (2011.), dok su se u slučaju Perić i suradnika (2014.) sorte u dendrogramu grupirale temeljem tipa rasta, a u biplotu prema grupi zriobe.

Ako promatramo raspored različitih svojstava u biplotu, uočavamo grupiranje koje odgovara ranije utvrđenim međuodnosima svojstava. Pomoću kosinusa kuteva između vektora bilo kojih svojstava možemo procijeniti koeficijent korelacije (Yan i Kang, 2003.), pri čemu oštri kutevi između vektora svojstava pokazuju pozitivnu korelaciju, tupi kutevi negativnu korelaciju, a pravi kutevi ukazuju na nedostatak korelacije (Murphy i sur., 2009.). Tako je iz biplota očito da su koncentracija ulja i bjelančevina u negativnoj korelaciji, sadržaj daidzeina, genisteina i ukupnih izoflavona u pozitivnoj, glukoza, fruktoza i saharoza u pozitivnoj, koncentracija rafinoze i ukupnih saharida u pozitivnoj i slično. Osim grupiranja i međuodnosa svojstava, analizom glavnih sastavnica možemo utvrditi i svojstva koja imaju najveći učinak odnosno svojstva koja treba uzeti u obzir pri selekciji materijala u oplemenjivačkim programima. To su svojstva koja opterećuju PC1 os, a u ovom istraživanju su to bile koncentracija saharoze i koncentracija ukupnih saharida.

Biplot analize glavnih sastavnica godina pokazuje da su sorte Lucija, Sanda, Gordana, Lika, Julijana, Zora i Alisa najstabilnije u različitim uvjetima sredine, dok su sorte SG-1, Tena, Mara, Ika, Anica, Podravka 95 najnestabilnije. Ostatak sorti se nalazi između. Također uočavamo da se 2011. godina nalazi u pozitivnom dijelu obje PC osi (I kvadrant), godina

2012. u pozitivnom dijelu PC2 osi, ali u negativnom dijelu PC1 osi (II kvadrant), dok je vektor 2010. godine tik uz PC1 os i nalazi se također u I kvadrantu biplota. Iz navedenog možemo zaključiti da su u odnosu na 2012. godinu, godine 2010. i 2011. bile nešto povoljnije za istraživane genotipove.

4.2. Genetska raznolikost utvrđena SSR biljezima

Uz kemijske analize parametara kvalitete zrna, za evaluaciju biljnog materijala u oplemenjivačkim programima značajna je i primjena molekularnih biljega, čija se učinkovitost i pouzdanost zasnivaju na mogućnosti direktnog i brzog određivanja divergentnosti genotipova, isključujući utjecaj okoline. Tako su Sudarić i suradnici (2008.) u istraživanju uporabe molekularnih biljega za odabir roditeljskih komponenti soje utvrdili da se genetska divergentnost roditelja, procijenjena pomoću 14 mikrosatelitnih biljega, očitovala u agronomskoj performansi potomstva, odnosno da su križanja divergentnijih roditelja dala potomstva sa većim urodom zrna i boljom kvalitetom zrna te zaključuju da uporaba biljega doprinosi učinkovitosti oplemenjivačkog programa. Orf i suradnici (2004.) te Sneller i suradnici (2005.) navode i da će križanja divergentnijih elitnih roditelja rezultirati u populaciji koja sadrži veću genetsku varijaciju za važna agronomska svojstva u usporedbi sa križanjima roditelja koji su srodniji. Za proučavanje genetske udaljenosti na soji najčešće se koriste mikrosatelitni biljezi odnosno SSR biljezi (Park i sur., 2009.) koji su korišteni i u ovom istraživanju. Lokusi mikrosatelitnih biljega odabrani su pregledom literature koja je sadržavala signifikantne rezultate studija povezanosti polimorfizma DNA biljega i pojedinih svojstava kvalitete zrna za soju (Cregan i sur., 1999.; Sebolt i sur., 2000.; Chapman i sur., 2003.; Kim i sur., 2005.; Priolli i sur., 2014. Wang i sur., 2014.), a svi koji su se koristili su prethodno mapirani i integrirani u genetske povezujuće mape za soju koje su razvili Cregan i suradnici (1999.), te Song i suradnici (2004.).

Tavaud-Pirra i suradnici (2009.) koristili su 18 mikrosatelita za utvrđivanje genetske divergentnosti 350 *Glycine max* genotipova, 2 *Glycine soja* genotipa, te 17 poluidivljih genotipova soje. Unutar *Glycine max* grupe ukupno se amplificiralo 222 alela pri čemu je prosječan broj alela po lokusu iznosio 12,3, a prosječna H_E vrijednost 0,734 (Tavaud-Pirra i sur., 2009.). Mulato i suradnici (2010.) su istraživali genetsku divergentnost 79 primki iz različitih dijelova svijeta. Uz pomoć 30 SSR parova početnica uspjeli su amplificirati 259

alela uz prosječno 8,63 alela po lokusu. Srednja PIC vrijednost je bila visoka (0,626), a prosječna H_E vrijednost je varirala od niskih (0,182) do visokih vrijednosti (0,935). Priolli i suradnici (2010.) su unutar 168 elitnih brazilskih kultivara uz pomoć 18 mikrosatelita uspjeli amplificirati tek 91 alel čiji je broj po lokusu iznosio u prosjeku 5,06. Liu i suradnici (2011.) istraživali su genetsku divergentnost 91 genotipa soje iz Shaanxi provincije u Kini uz pomoć agronomskih svojstava te uporabom 35 mikrosatelitna biljega. Utvrdili su ukupno 250 alela pri čemu se broj alela po lokusu kretao od 4 do 12 uz prosječnu vrijednost koja je iznosila 7,14 alela po lokusu. Informacijski sadržaj polimorfizma kretao se 0,11 do 0,60 uz prosjek od 0,26. Song i suradnici (2013.) su procjenom genetske divergentnosti 185 genotipova soje iz različitih područja svijeta uz pomoć 72 mikrosatelita utvrdili ukupno 784 alela s rasponom od 3 do 31 alel po lokusu (prosječno 10,9). Prosječna PIC vrijednost je u istom istraživanju iznosila 0,607, a prosječna H_E vrijednost 0,648 (0,164 – 0,922). Perić i suradnici (2014.) su istraživanjem 18 genotipova porijeklom iz Hrvatske i Srbije uz pomoć 21 RAPD biljega uspjeli amplificirati 107 alela od čega je 46 bilo polimorfno. Prosječan broj alela po lokusu bio je 5,1, a PIC vrijednost 0,3887. Visoke prosječne N_a (14,1) i PIC (0,897) vrijednosti utvrđene u istraživanju u sklopu ove disertacije, unatoč relativno malom broju upotrebljenih biljega te malom setu genotipova u odnosu na ostala spomenuta istraživanja, ukazuju na dobar odabir mikrosatelita temeljem povezanosti njihovog polimorfizma i pojedinih svojstava kvalitete zrna za soju. Također, visoka H_E vrijednost (0,905) unatoč poznatoj uskoj genetskoj osnovi istraživnog materijala ukazuje da genetska raznolikost u specifičnim svojstvima kvalitete, čiju fenotipsku ekspresiju odabrani biljezi kodiraju, ipak postoji, ali do sada nije uočena jer nije bila u fokusu istraživanja.

4.2.1. Genetska udaljenost utvrđena SSR biljezima

Prosječna genetska udaljenost (GD) prema Nei-u (1973.) iznosila je 0,938, a najmanja je ($GD = 0,4$) utvrđena između sorti Vita i Sanda. Kao što je navedeno u rezultatima istraživanja (poglavlje 3.2.2.) maksimalan koeficijent genetske udaljenosti prema Nei-u (1973.) ($GD = 1$) utvrđen je između čak 45,46 % parova genotipova što ukazuje na veliku raznolikost materijala u svojstvima kvalitete. Iako su Song i suradnici (2013.) te ranije Leberg (2002.) potvrdili da genetska divergentnost ovisi o veličini uzorka, unutar većih setova biljnog materijala niže GD vrijednosti odnosno veliku sličnost koja potvrđuje usku genetsku bazu materijala i nedostatak divergentnosti utvrdili su Narvel i suradnici (2000.),

Priolli i suradnici (2002.), Tavaud-Pirra i suradnici (2009.), Bonato i suradnici (2006.), Ristova i suradnici (2010.) te Perić i suradnici (2014.). U istraživanju Perić i suradnika (2014.), unatoč niskoj genetskoj udaljenosti ($GD = 0,418$), genotipovi su se u grupe dendrograma rasporedili sukladno pripadnosti različitim oplemenjivačkim programima odnosno sukladno rodoslovlju. Iz toga autori zaključuju da su korišteni RAPD biljezi pogodni za utvrđivanje čak i malih razlika između materijala, a slične rezultate dobili su Priolli i suradnici (2002.) te Ristova i suradnici (2010.), koristeći SSR biljege.

Temeljem izračunatih GD vrijednosti konstruiran je UPGMA dendrogram koji je istraživane genotipove podijelio u 2 grupe (I i II). Unutar I grupe dendrograma, zajedno su grupirane sorte Alisa i SG-1, obje strane sorte, te sorte Lucija i Korana koje su jedine vrlo rane i, prema dostupnim podacima, ne dijele zajedničke roditelje sa ostatkom sortimenta. U istoj grupi zasebno stoji sorta Gordana koja je porijeklom iz HSSC. Sorte čiji je jedan roditelj Ika (Toma, Tena, OS-60-06, Mara i Sonja) zajedno sa sortom Ika raspoređene u II grupi dendrograma, ali u različitim podgrupama. U istoj podgrupi (IIB) sa Ikom nalaze se sorte Tena i Toma dok je ostatak sorti čiji je roditelj Ika grupiran u IIA podgrupi dendrograma. Sorta Vita grupirana je uz sortu Sanda s kojom dijeli zajedničkog roditelja što odgovara podacima rodoslovlja, sorta Julijana i sorta Ika, koje dijele zajedničkog roditelja, nalaze se u istoj podgrupi dendrograma (IIIB), a sorta Sara u istoj grupi, ali u različitoj podgrupi u odnosu na svog roditelja Podravku 95. Nedosljednost u odnosu na ranija istraživanja uočavamo iz toga što sorte SG-1, Ika i Podravka 95 koje su u istraživanju Sudarić i suradnika (2008.) bile grupirane zajedno, ovdje pripadaju različitim grupama. Kao što je navedeno u poglavlju 4.1.2. i utvrđeno iz djelomično dostupnih podataka o rodoslovlju te prethodnih istraživanja genetske udaljenosti, genotipovi korišteni u istraživanju imaju usku genetsku osnovu pa su očekivana određena odstupanja u grupiranju u odnosu na pedigree. Razlog odstupanjima može biti i u malom broju biljega korištenih za analizu udaljenosti odabranih temeljem svoje povezanosti s istraživanim svojstvima kvalitete. Uz to, pri usporedbi grupiranja genotipova temeljem molekularnih analiza u odnosu na podatke o rodoslovlju treba spomenuti da procjene povezanosti koeficijenta srodstva (COP – eng. *Coefficient Of Parentage*) izračunatog temeljem rodoslovlja i molekularnih analiza variraju od niskih (Bonato i sur., 2006., Priolli i sur., 2010.) do umjerenih (Kisha i sur., 1998.) što znači da su odstupanja moguća. Koeficijent srodstva se može koristiti kao mjerilo genetske sličnosti u

slučajevima kada su poznati cjelokupni pedigrei temeljem kojih se isti računa (Cox i sur., 1985.), što ovdje nije slučaj, zbog čega navedeni parametar nije bio uključen u istraživanje.

4.2.2. Analiza molekularne varijance (AMOVA)

Analizu molekularne varijance među prvima su koristili Excoffier i suradnici (1992.). Ovom metodom moguće je raspodijeliti genotipsku varijancu između i unutar bilo kojih pretpostavljenih strukturnih razina, uz testiranje razina značajnosti za svaki izvor varijabilnosti. U ovom istraživanju, pretpostavljenu strukturnu razinu za grupiranje 19 genotipova porijeklom s Poljoprivrednog instituta Osijek činilo je vrijeme priznavanja kultivara pri čemu su sorte i jedna linija podijeljene u dvije grupe: (1) sorte priznate prije 2007. godine i (2) sorte priznate nakon 2007. godine i novostvorena linija OS-60-06. Sorte priznate nakon 2007. godine, te linija OS-60-06 rezultat su oplemenjivačkog programa PIO u sklopu kojeg se uz poboljšanje prinosa, stabilnosti, otpornosti na polijeganje i bolesti te sadržaja bjelančevina i ulja počelo istraživati i raditi na specifičnim svojstvima kvalitete od kojih su neka uključena i u ovo istraživanje. Uz udio pojedinih izvora varijabilnosti u ukupnoj, analizom molekularne varijance utvrđuje se i indeks fiksacije (φ_{ST}) koji služi za kvantifikaciju diferencijacije među podpopulacijama nastalim podjelom početne populacije (Wright, 1978.), pri čemu se vrijednosti kreću u rasponu od 0 (bez diferencijacije) do 1 (potpuna diferencijacija). Wright (1978.) navodi da (φ_{ST}) vrijednosti u rasponu od 0 do 0,05 ukazuju na nisku razinu diferencijacije, raspon od 0,05 do 0,15 na umjerenu razinu, vrijednosti u rasponu od 0,15 do 0,25 na veliku i vrijednosti preko 0,25 na vrlo veliku razinu diferencijacije podpopulacija. Sukladno navedenom, iz rezultata molekularnih analiza napravljenih u sklopu ove disertacije uočavamo umjeren i statistički visoko značajan utjecaj razdoblja priznavanja na molekularnu varijancu ($\varphi_{ST} = 0,071$; $P_{(\varphi)} < 0,001$). Vrlo mali udio varijabilnosti (3 %) koji je rezultat razlika između dva razdoblja ukazuje na to da sorte priznate nakon 2007. godine ne posjeduju veću varijabilnost u svojstvima kvalitete u odnosu na ranije priznate sorte. Ovakav rezultat je i očekivan jer je oplemenjivanje kvalitete zrna zahtjevan i dugotrajan proces pa značajnije poboljšanje svojstava od interesa konvencionalnim metodama oplemenjivanja zahtjeva dugi niz godina. Velik udio varijabilnost (97 %) koji je rezultat razlika unutar razdoblja govori o genetskoj divergentnosti istraživanih genotipova u svojstvima kvalitete, što je poželjno jer omogućava odabir roditeljskih kombinacija koje bi mogle rezultirati superiornim potomstvom. Slične

vrijednosti za izvore varijabilnosti utvrdili su Cho i suradnici (2008.) istražujući 260 genotipova soje porijeklom iz Koreje pomoću 92 SSR biljega pri čemu su utvrdili da su razlike između podpopulacija ukupnoj varijanci doprinosile s 5,03 %, dok su razlike unutar podpopulacija činile 94,97 % ukupne varijance. Iqbal i suradnici (2015.) su istraživali sadržaj skladišnih bjelančevina zrna kod 139 genotipova soje iz različitih dijelova svijeta pri čemu su razlike između skupina podijeljenih prema porijeklu činile 10 % ukupne varijabilnosti, a razlike između različitih genotipova 90 % ukupne varijabilnosti. Velik udio varijabilnosti između različitih genotipova (76,3 %) u ukupnoj varijanci u odnosu na udio varijabilnosti čiji izvor su zemlje porijekla genotipova i regionalne grupe, utvrdili su i Li i Nelson (2001.).

4.3. Usporedba podudarnosti analiza

Kako je genetska divergentnost u ovom istraživanju procijenjena različitim setovima podataka (genetska udaljenost temeljena na kvantitativnim podacima kvalitete zrna i genetska udaljenost temeljena na rezultatima mikrosatelitnih analiza), neophodno je bilo usporediti ih i utvrditi njihovu međusobnu povezanost za što se koristi Mantelov test (1967.). Analizom podudarnosti nije utvrđena statistička značajnost Mantelovog testa, a korelacija različitih setova podataka nije postojala. Ovo potvrđuju i razlike u dendrogramima nastalim na temelju podataka iz različitih matrica u kojima su se sorte većinom različito grupirale. U dendrogramu konstruiranom temeljem rezultata analize kvalitete zrna i mase 1000 zrna genotipovi su razdvojeni u dvije grupe pri čemu su I grupu činile sorte Korana i Lucija, a II sve ostale sorte, dok su kod dendrograma konstruiranog temeljem koeficijenta genetske udaljenosti u I grupu zajedno sa Koranom i Lucijom grupirane i sorte iz drugih oplemenjivačkih kuća (Gordana, Alisa i SG-1). Kombinaciju različitih tipova podataka s ciljem dobijanja što jasnije slike o genetskoj različitosti ili sličnosti materijala koristili su mnogi autori (Giancola i sur., 2002.; Tavaud-Pirra i sur., 2009.; Mulato i sur., 2010.; Priolli i sur., 2010.; Perić i sur., 2014.). Nisku ($r = 0,28$) i signifikantnu ($P < 0,001$) korelaciju utvrdili su Mulato i suradnici (2010.) između podataka o genetskoj divergentnosti materijala dobivenim pomoću molekularne analize sa SSR biljezima i EST-SSR (eng. *Expressed Sequence Tag – Simple Sequence Repeats*) biljezima. Priolli i suradnici (2010.) su istraživanjem genetske udaljenosti 168 genotipova pomoću SSR biljega te procjenom koeficijenta srodstva (COP) utvrdili statistički visoko značajnu ($P < 0,001$), ali nisku

korelaciju ($r = 0,31$) rezultata različitih analiza. Giancola i suradnici (2002.) i Perić i suradnici (2014.) utvrdili su nisku i nesignifikantnu vezu podataka molekularne i morfološke procjene divergentnosti. Nedostatak korelacije, koji je uočen i u istraživanju u sklopu ove disertacije, može se objasniti činjenicom da genotipovi slični po svojstvima kvalitete zrna, ne moraju biti i genetski slični jer u fenotipskoj ekspresiji navedenih svojstava sudjeluje velik broj gena malog učinka pa različita kombinacija gena može dati iste fenotipske rezultate. Uz to treba uzeti u obzir i statistički visoko značajan utjecaj okoline tj. godine utvrđen za sva svojstva kvalitete osim za ukupne saharide, uslijed kojeg genetska divergentnost temeljena na svojstvima kvalitete ne mora reflektirati stvarnu genetsku varijabilnost (Smyth i Smyth, 1992.).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju istraživanja genetske varijabilnosti svojstava kvalitete zrna kod 22 genotipa soje može se zaključiti sljedeće:

1. Utvrđeno je postojanje varijabilnosti germplazme soje u svim analiziranim svojstvima kvalitete zrna i u masi 1000 zrna uz statistički visoko značajan utjecaj godine na sva svojstva osim na ukupne saharide. Analizom genetske udaljenosti genotipova temeljem kvantitativnih svojstava, genotipovi su raspoređeni u različite grupe koje su se djelomično poklapale s dostupnim podacima o rodoslovlju. Kao sorte koje su prema navedenim svojstvima bile genetski najudaljenije izdvajaju se Korana i Lucija u odnosu na ostatak istraživanog sortimenta.

2. Procjenom genetske udaljenosti genotipova temeljem molekularnih analiza, genotipovi su raspoređeni u različite grupe koje su se također djelomično poklapale s dostupnim podacima o rodoslovlju. Najmanja genetska razlika procijenjena koeficijentom genetske udaljenosti utvrđena je između sorti Vita i Sanda, dok je maksimalna genetska udaljenost utvrđena kod 45,46 % parova genotipova što ukazuje na veliku genetsku raznolikost istraživanog materijala. Rezultati analize molekularne varijance za 19 genotipova Poljoprivrednog instituta Osijek, pri čemu su genotipovi razdvojeni u dvije grupe temeljem vremena njihovog priznavanja, ukazuju na umjeren i statistički visoko značaju utjecaj razdoblja priznavanja na genetsku raznolikost u kvaliteti zrna uz čak 97 % ukupne varijabilnosti koja je rezultat razlika genotipova unutar razdoblja priznavanja. Preostali udio ukupne varijance (3 %) rezultat je razlika između razdoblja priznavanja u oplemenjivačkom programu soje Poljoprivrednog instituta Osijek.

3. Rangiranjem genotipova ovisno o razini pojedinog svojstva kvalitete, kao genotipovi sa superiornom masom 1000 zrna izdvojili su se Alisa, Lucija, Julijana i Korana, sa superiornom koncentracijom bjelančevina sorte Alisa, Sanda, Anica i Sara, a sa superiornom koncentracijom ulja sorte SG-1 i Lika. Za proizvodnju jestivog ulja poželjan sastav masnih kiselina imale su sorta Korana i linija OS-60-06, a za proizvodnju biodizela sorta Korana. Poželjan sastav šećera u zrnu za ishranu ljudi i životinja imala je sorta Seka, a po sadržaju izoflavona najpoželjnije sorte su bile Korana, Lucija, Lika, Vita i SG-1. Među

spomenutima, kao sorte sa superiornom ukupnom kvalitetom zrna izdvajaju se Korana, Lucija, Alisa i SG-1.

4. Sukladno rezultatima utvrđivanja kvalitete zrna i mase 1000 zrna te procjeni genetske udaljenosti iz kvantitativnih i molekularnih podataka, među sortama s visokom kvalitetom zrna koje su u odnosu na ostatak istraživanih genotipova, ali i u međusobnom odnosu genetski najudaljenije izdvajaju se sorte Korana, Lucija, Alisa i SG-1. Uporaba ovih sorti kao roditeljskih komponenti u budućim programima križanja, povećala bi šanse stvaranja populacije koja bi, u odnosu na postojeći sortiment, sadržavala genotipove superiorne u kvaliteti zrna.

Iako rezultati Mantelovog testa kojim su uspoređene kvantitativna i molekularna procjena genetske raznolikosti nisu bili statistički značajni, a korelacija različitih setova podataka nije utvrđena može se zaključiti da kombiniranje ovakvih analiza pruža dovoljno informacija čija uporaba povećava mogućnost uspješnog odabira roditeljskih komponenti. Nedostatak korelacije između kvantitativnih i molekularnih procjena genetske raznolikosti bio je i očekivan uslijed velikog utjecaja uvjeta okoline na svojstva kvalitete te činjenice da se radi o svojstvima koji su pod kontrolom velikog broja gena malog učinka pa genotipovi koji su na molekularnoj razini različiti mogu imati istu fenotipsku ekspresiju. Iako su obje metode korištene za utvrđivanje genetske raznolikosti bile uspješne u razdvajanju genotipova, specifična ograničenja u smislu cijene ulaganja, potrebnog vremena, točnosti i učinkovitosti trebalo bi imati na umu pri planiranju preliminarnih istraživanja u oplemenjivačkim programima.

6. LITERATURA

1. Adie, M.M., Krisnawatia, A., Harnowoa, D. (2015.): Agronomic characteristic and nutrient content from several soybean promising lines with high isoflavones. *Procedia Food Science* 3, 348 – 354.
2. Aditya, J.P., Bhartiya, P., Bhartiya, A. (2011.): Genetic variability, heritability and character association for yield and component characters in soybean (*G. max* (L.) Merrill). *Journal of Central European Agriculture* 12 (1), 27-34.
3. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y. (1987.): Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 262(12), 5592-5595.
4. Akkaya, M.G., Bhawat, A., Cregan, P.B. (1992.): Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132 (4), 1131-1139.
5. Akond, A.G.M., Ragin, B., Bazzelle, R., Kantartzi, S.K., Meksem, K., Kassem, M.A. (2012.): Quantitative trait loci associated with moisture, protein, and oil content in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Journal of Agricultural Science* 4, 16 -25.
6. Akond, A.G.M., Liu, S., Boney, M., Kantartzi, S.K., Meksem, K., Bellaloui, N., Lightfoot, D.A., Kassem, M.A. (2014.a): Identification of Quantitative Trait Loci (QTL) underlying protein, oil, and five major fatty acids' contents in soybean. *American Journal of Plant Sciences* 5, 158-167.
7. Akond, A.G.M., Liu, S., Kantartzi, S.K., Meksem, K., Bellaloui, N., Lightfoot, D.A., Yuan, J., Wang, D., Kassem, M.A. (2014.b): Quantitative Trait Loci for seed isoflavone contents in 'MD96-5722' by 'Spencer' recombinant inbred lines of soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 1464-1468.
8. Akond, A.G.M., Liu, S., Boney, M., Kantartzi, S.K., Meksem, K., Bellaloui, N., Lightfoot, D.A., Kassem, M.A. (2015.): Quantitative Trait Loci underlying seed sugars content in “MD96-5722” by “Spencer” recombinant inbred line population of soybean. *Food and Nutrition Sciences* 6, 964-973.
9. Akond, M., Richard, B., Ragin, B., Herrera, H., Kaodi, U., Akbay C., Kantartzi, S.K., Njiti, V., Barakat, A., Meksem, K., Lightfoot, D. A., Kassem, M.A. (2013.): Additional quantitative trait loci and candidate genes for seed isoflavone content in soybean. *Journal of Agricultural Science* 5 (11), 20-33.

10. Albertazzi, P., Purdie, D.W. (2002.): The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. *Maturitas* 42, 173–185.
11. Antalikova, G., Žakova, M., Benedikova, D. (2008.): Characterization of soybean traits variability by cluster analysis. *Agriculture* 54, 45-53.
12. Apuya, N.R., Frazier, B.L., Keim, P., Roth, E.J., Lark, K.G. (1988.): Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean *Glycine max* (L.) Merrill. *Theoretical and Applied Genetics* 75, 889-901.
13. Arahana, V.S., Graef, G.L., Specht, J.E., Steadman, J.R., Eskridge, K.M. (2001.): Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Crop Science* 41, 180-188.
14. Bachman, M.S., Tamulonis, J.P., Nickell, C.D., Bent, A.F. (2001.): Molecular markers linked to brown stem rot resistance genes, Rbs1 and Rbs2, in soybean. *Crop Science* 41 527-535.
15. Basić, S., Carović, K., Kolak, I., Gunjača, J., Šatović, Z. (2006.): Kretanje prinosa i sastavnica prinosa kultivara soje u različitim sklopovima. *Sjemenarstvo* 23 (3), 223-235.
16. Bonato, A.V.L., Calvo, E.S., Geraldi, I.O., Arias, C.A.A. (2006.): Genetic similarity among soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars released in Brazil using AFLP markers. *Genetic and Molecular Biology* 29, 692-704.
17. Brown-Guedira, G., Thompson, J., Nelson, R. and Warburton, M. (2000.): Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers. *Crop Science* 40, 815–823.
18. Bueno, R.D., Borges, L.L., Arruda, K.M.A, Bhering, L.L., Barros, E.G. de, Moreira, M.A. (2013.): Genetic parameters and genotype x environment interaction for productivity, oil and protein content in soybean. *African Journal of Agricultural Research* 8 (38), 4853-4859.
19. Burton J.W. (1997.): Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Field Crops Research* 53: 171-186.
20. Bushehri, S.A.A., Abd-Mishani, C., Yazdi-Samadi, B., Sayed-Tabatabaei, B.E. (2000.): Variety specific electrophoretic profiles of soybean cultivars. *Iranian Journal of Agricultural Science* 31 (1), 55-56.

21. Chang, N.W., Huang, P.C. (1998.): Effects of the ratio of polyunsaturated and monounsaturated fatty acid on rat plasma and liver lipid concentration. *Lipids* 33, 481-487.
22. Chapman, A., Pantalone, V.R., Ustun, A., Allen, F.L., Landau-Ellis, D., Trigiano, R.N., Gresshoff, P.M. (2003.): Quantitative trait loci for agronomic and seed quality traits in an F2 and F4:6 soybean population. *Euphytica* 129, 387-393.
23. Chen, P. (2004.): Developing high-quality identity-preserved soybean for the specialty soyfood market. U: Production and marketing of identity-preserved soybean. American Soybean Association, St. Louis, MO, 23–31.
24. Cherry, J.H. (1985.): Differences in the fatty acid composition of soybean seed produced in northern and southern areas of the U.S.A. *Phytochemistry* 24, 237-241.
25. Chiari, L., Piovesan, N.D., Naoe, L.K., José, I.C., Viana, J.M.S., Moreira, M.A., (2004.): Genetic parameters relating isoflavone and protein content in soybean seeds. *Euphytica* 138, 55–60.
26. Cho, G.-T.; Lee, J., Moon, J.-K., Yoon, M.-S., Baek, H.-J., Kang, J.-H., Kim, T.-S., Paek, N.-C. (2008.): Genetic diversity and population structure of Korean soybean landrace (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Crop Science and Biotechnology* 11 (2), 83-90.
27. Clemente, T.E., Cahoon, E.B. (2009.): Soybean oil: Genetic approaches for modification of functionality and total content. *Plant Physiology* 151, 1030-1040.
28. Cox, T.S., Kiang, Y.T., Gorman, M.B., Rodgers, D.M. (1985.): Relationship between coefficient of parentage and genetic similarity indices in the soybean. *Crop Science* 25, 529-532.
29. Cregan, P.B., Jarvik, T., Bush, A.L., Shoemaker, R.C., Lark, K.G., Kahler, A.L., Kaya, N., Van Toai, T.T., Lohnes, D.G., Chung, J., Specht, J.E. (1999.): An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Science* 39, 1464-1490.
30. Cregan, P.B. (2008.): Soybean Molecular Genetic Diversity. U: G. Stacey, (ur.): *Genetics and Genomics of Soybean*, Springerlink, 17-34.
31. Cui, Z., Carter, T.E.Jr., Burton, J.W., Wells, R. (2001.): Phenotypic diversity of modern Chinese and North American soybean cultivars. *Crop Science* 41, 1954-1967.

32. Cvejić, J., Tepavčević, V., Bursać, M., Miladinović, J., Malenčić, Đ. (2011.): Isoflavone composition in F1 soybean progenies. *Food Research International* 44, 2698–2702.
33. Čupić, T. (2006.): Proučavanje genetske divergentnosti graška (*Pisum sativum* L.) na osnovi podrijetla, morfoloških i molekularnih markera. Disertacija, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
34. Dekkers, J.C.M., Hospital, F. (2002.): The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics* 3, 22-32.
35. Demirbas, A., Rector, B.G., Lohnes, D.G., Fioritto, R.J., Graef, G.L., Cregan, P.B., Shoemaker, R.C., Specht, J.E. (2001.): Simple sequence repeat markers linked to the soybean Rps genes for phytophthora resistance. *Crop Science* 41, 1220-1227.
36. Dornbos, D.L. Jr., Mullen, R.E. (1992.): Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69 (3), 228-231.
37. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990.): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
38. Edwards, M.D., Stuber, C.W., Wendel, J.F. (1987.): Molecular-marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize, 1. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics* 116, 113-125.
39. Eldridge A.C., Kwolek, W.F. (1983.): Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1674-1677.
40. Eskandri, M.; Cober, E.R., Rajcan, I. (2013.): Genetic control of soybean seed oil: II. QTL and genes that increase oil concentration without decreasing protein or with increased seed yield. *Theoretical and Applied Genetics* 126 (6), 1677–1687.
41. Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. (1992.): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
42. Fan, S., Li, B., Yu, F., Han, F., Yan, S., Wang, L., Sun, J. (2015.): Analysis of additive and epistatic quantitative trait loci underlying fatty acid concentrations in soybean seeds across multiple environments. *Euphytica* 206 (3), 689-700.
43. Farno, L.A. (2005.): Oil and fatty acid profiles of soybeans (maturity groups IV, V, and VI). PhD Thesis. Graduate College of the Oklahoma State University.

-
44. Fasoula, V.A., Harris, D.K., Boerma, H.R. (2004.): Validation and designation of Quantitative Trait Loci for seed protein, seed oil and seed weight from two soybean populations. *Crop Science* 44, 1218-1224.
 45. Fehr, W.R., Curtiss, C.F. (2004.). Breeding for fatty acid composition of soybean oil. U: Moscardi F i sur.. (ur.): Proceeding of the 7th World Soybean Research Conference (WSRC), Brasil, 815-821.
 46. Félix, A.P., Rivera, N.L.M., Sabchuk, T.T., Lima, D.C., Oliveira, S.G., Maiorka A. (2013.): The effect of soy oligosaccharide extraction on diet digestibility, faecal characteristics, and intestinal gas production in dogs. *Animal Feed Science and Technology* 184 (1–4), 86–93.
 47. Gai, J., Xu, D., Gao, Z., Shimamoto, Y., Abe, J., Fukushi, H., Kitajima, S. (2000.): Studies on the evolutionary relationship among eco-types of *G. max* and *G. soja* in China. *Acta Agronomica Sinica* 26, 513-520.
 48. Geater, C.W., Fehr, W.R. (2000.a): Association of total sugar content with other seed traits of diverse soybean cultivars. *Crop Science* 40 (6), 1552-1555.
 49. Geater, C.W., Fehr, W.R., Wilson, L.A. (2000.b): Association of soybean seed traits with physical properties of natto. *Crop Science*, 40 (6), 1529-1534.
 50. Ghassemi-Golezani, K., Farshbaf-Jafari, S. (2012.): Influence of water deficit on oil and protein accumulation in soybean grains. *International journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 2 (3), 46-52.
 51. Ghodrati, G. (2013.): Study of genetic variation and broad sense heritability for some qualitative and quantitative traits in soybean (*Glycine max* L.) genotype. *Current Opinion in Agriculture*, 2 (1), 31-35.
 52. Giancola, S., Marcucci Poltri, S., Lacaze, P., Hopp, H.E. (2002.): Feasibility of integration of molecular markers and morphological descriptors in a real case study of a plant variety protection system for soybean. *Euphytica* 127, 95–113
 53. Giannoccaro, E., Wang, Y. J., Chen, P. (2006.): Effects od solvent, temperature, time, solvent-to-sample ratio, sample size and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean. *Journal of Food Science*, 71, 59-64.
 54. Gibson, L.R., Mullen, R.E. (1996.): Soybean seed composition under high day and night growth temperatures. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73 (6), 733-737.

55. Gizlice, Z., Carter, J. and Burton, J. (1994.): Genetic base for North American public soybean cultivars released between 1947 and 1988. *Crop Science* 34, 1143-1151.
56. Gizlice, Z., Carter Jr, T.E., Gerig, T.M., Burton J.W. (1996.): Genetic diversity patterns in North American public soybean cultivars based on coefficient of parentage. *Crop Science* 33, 753-765.
57. Grafius, J.E., Thomas, R.L., Bernard, J. (1976.): Effect of parental component complementation on yield and components of yield in Barley. *Crop Science* 16, 673-677.
58. Grainger, C.M., Rajcan, I. (2014.): Characterization of the genetic changes in a multi-generational pedigree of an elite Canadian soybean cultivar. *Theoretical and Applied Genetics* 127(1), 211-229.
59. Gravois, K.A., Bernhardt, J.L. (2000.): Heritability x environment interactions for discoloured rice kernels. *Crop Science*, 40(2), 314-318.
60. Grundy, S.M. (1997.): What is the desirable ratio of saturated, polyunsaturated, and monounsaturated fatty acids in the diet? *American Journal of Clinical Nutrition* 66 (4), 988-990.
61. Gulewicz, P., Martinez-Villaluenga, C., Kasproicz-Potocka, M., Frias, J. (2014.): Non-nutritive compounds in *Fabaceae* family seeds and the improvement of their nutritional quality by traditional processing – a review. *Polish Journal of Food and Nutritional Sciences* 64 (2), 75–89.
62. Gutierrez-Gonzalez, J.J., Vuong, T.D., Zhong, R., Yu, O., Lee, J.-D., Shannon, G., Eilersieck, M., Nguyen, H.T., Sleper, D.A. (2011.): Major locus and other novel additive and epistatic loci involved in modulation of isoflavone concentration in soybean seeds. *Theoretical and Applied Genetics* 123, 1375–1385.
63. Hahn, V., Würschum T. (2014.): Molecular genetic characterization of Central European soybean breeding germplasm. *Plant Breeding* 133, 748-755.
64. Harlan, J.R. (1972.): Genetics of disaster. *Journal of Environmental Quality* 1, 212-215.
65. Hartwig, E.E., Kuo, T.M., Kenty, M.M. (1997.): Seed protein and its relationship to soluble sugars in soybean. *Crop Science* 37 (3), 770–773.

66. Hedlund, T.E., Johannes, W.U., Miller, G.J. (2003.): Soy isoflavonoid equol modulates the growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. *Prostate* 54, 68-78.
67. Hina-Kausar, J. (2005.): Genetic investigations in segregating populations of soybean (*Glycine max* L. Merrill). M.Sc. (Agri.) Thesis, University of Agricultural Sciences, Dharwad.
68. Hoeck, J.R., Fehr, W.R., Murphy, P.A., Welcke, G.A. (2000.): Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. *Crop Science* 40, 48-51.
69. Hollung, K., Øverland, M., Hrustić, M., Sekulić, P., Miladinović, J., Martens, H., Narum, B., Sahlstrøm, S., Sørensen, M., Storebakken, T., Skrede, A. (2005.): Evaluation of nonstarch polysaccharides and oligosaccharide content of different soybean varieties (*Glycine max*) by near-infrared spectroscopy and proteomics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 9112-9121.
70. Horvat, D., Ivezić, M. (2005.): *Biometrika u poljoprivredi*. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
71. Hou, G., Ablett, G.G., Pauls, K.P., Rajcan, I. (2006.): Environmental effects on fatty acid levels in soybean seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83(9), 759-763.
72. Hou, A., Chen, P., Alloatti, J., Li, D., Mozzoni, L., Zhang, B., Shi, A. (2009.): Genetic variability of seed sugar content in worldwide soybean germplasm collections. *Crop Science* 49, 903-912.
73. HR EN ISO 5509:2004: Životinjske i biljne masti i ulja - Priprava metilnih estera masnih kiselina (ISO 5509:2000; EN ISO 5509:2000).
74. Hufford, M.B., Xu, X., van Heerwaarden, J., Pyhäjärvi, T., Chia, J.-M., Cartwright, R.A., Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Guill, K.E., Kaepler, S.M., Lai, J., Morrell, P.L., Shannon, L.M., Song, C., Springer, N.M., Swanson-Wagner, R.A., Tiffin, P., Wang, J., Zhang, G., Doebley, J., McMullen, M.D., Ware, D., Buckler, E.S., Yang, S., Ross-Ibarra, J. (2012.): Comparative population genomics of maize domestication and improvement. *Nature Genetics* 44, 808-811.
75. Hymowitz, T., Collins, F.I., Panczner, J., Walker, W.M. (1972.): Relationship between the content of oil, protein and sugar in soybean seed. *Agronomy Journal* 64, 613-616.

-
76. Hymowitz, T., Collins, F.I. (1974.): Variability of sugar content of seed of *Glycine max* (L.) Merr. and *G. Soja* Serb. and Zucco. *Agronomy Journal* 66, 239-240.
 77. Hyten, D.L., Pantalone, V.R., Smas, C.E., Saxton, A.M., Landau-Ellis, D., Stefaniak, T.R. and Schmidt, M.E. (2004.): Seed quality QTL in prominent soybean population. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 552-561.
 78. Hyten, D.L., Song, Q., Zhu, Y., Choi, I.Y., Nelson, R.L., Costa, Y.M., Specht, J.E., Shoemaker, R.C., Cregan, P.B. (2006.): Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103, 16666-16671.
 79. Infratec 1241 Grain Analyzer User Manual, Foss Tecator AB, Švedska (1992.).
 80. Iqbal, Z., Arshad, M., Ashraf, M., Naeem, R., Malik, M.F., Waheed, A. (2010.): Genetic divergence and correlation studies of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. *Pakistani Journal of Botany* 42 (2), 971-976.
 81. Iqbal, Z., Naeem, R., Ashraf, M., Arshad, M., Afzal, A., Shah, A.H., Khan, M.S., Farooq, M. (2015.): Genetic diversity of soybean accessions using seed storage proteins. *Pakistanian Journal of Botany* 47 (1), 203-209.
 82. Jain, P.K., Ramgiry, S.R. (2000.): Genetic variability of metric traits in Indian germplasm of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Advances in Plant Science* 13, 127-131.
 83. Jauregui, L.M., Chen, P., Scaboo, A.M. (2011.): Heritability and correlations among food grade traits in soybean. *Plant Breeding* 130, 647-652.
 84. Jeng, T.L.; Shih, Y.J.; Wu, M.T.; Sung, J.M. (2010.): Comparisons of flavonoids and anti-oxidative activities in seed coat, embryonic axis and cotyledon of black soybeans. *Food Chemistry* 123, 1112–1116.
 85. Jiang, Q., Payton- Stewart, F., Elliott, S., Driver, J., Rhodes, L.V., Zhang, Q., Wang, G. (2010.): Effects of 7-o substitutions on estrogenic and anti-estrogenic activities of daidzein analogues in mcf- breast cancer cells. *Journal of Medical Chemistry* 53, 6153-6163.
 86. Jones, D.A., DuPont, M.S., Ambrose, M.J., Frias, J., Hedley, C.L. (1999.): The discovery of compositional variation for the raffinose family of oligosaccharides in pea seeds. *Seed Science Research* 9, 305-310.
 87. Josipović, M., Sudarić, A., Sudar, R., Plavšić, H., Marković, M., Jug, D., Stojić, B. (2013.): Influence of irrigation and variety on the soybean grain yield and quality
-

- in the no nitrogen fertilization soil condition. *Soil and Crop Management: Adaptation and Mitigation of Climate Change*. Vukadinović, V., Đurđević, B. (ur.). Osijek: Grafika d.o.o., 237-245.
88. Jun, T.-H., Van, K., Kim, M.Y., Lee, S.-H., Walker, D.R. (2008.): Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica* 162, 179-191.
89. Kabelka, E.A., Carlson, S.R., Diers, B.W. (2005.): Localization of two loci that confer resistance to soybean cyst nematode from *Glycine soja* PI 468916. *Crop Science* 45, 2473-2481.
90. Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayada, W.G., Hodgkin, T. (1997.): Molecular tools in plant genetic resources conservation: A guide to the technologies. IPGRI technical bulletin no 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
91. Karr-Lilienthal, L.K., Kadzere, C.T., Grieshop, C.M., Fahey, G.C., Jr. (2005.): Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. *Livestock Productional Science* 97 (1), 1-12.
92. Kim, E.-H., Ro, H.-M., Kim, S.-L., Kim, H.-S., Chung, I.-M. (2012.): Analysis of isoflavone, phenolic, soyasapogenol, and tocopherol compounds in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) germplasms of different seed weights and origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 6045-6055.
93. Kim, H.K., Kang, S.T., Cho, J.H., Choung, M.G., Suh, D.Y. (2005.). Quantitative trait loci associated with oligosaccharides and sucrose contents in soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Plant Biology* 48 (1), 106-112.
94. Kirnak, H., Dogan, E., Turkoglu, H. (2010.): Effect of drip irrigation intensity on soybean seed yield and quality in the semi-arid Harran plain, Turkey. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8 (4), 1208-1217.
95. Kisha, T.J., Diers B.W., Hoyt J.M., Sneller, C.H. (1998.): Genetic diversity among soybean plant introductions and North American germplasm. *Crop Science* 38, 1669-1680.
96. Krober, O.A., Carter, J.L. (1962.): Quantitative interrelationships of protein and non-protein constituents of soybeans. *Crop Science* 2, 171-172.

97. Kupier, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Saag, P.T. (1998.): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252–4263.
98. Latifi, N. (1989.): Yield and morphological response of soybean to time of irrigation and sowing rate. *Dissertation Abstracts International* 40,5088-5098.
99. Leberg, P.L. (2002.): Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology* 11, 2445-2449.
100. Lee, J.H., Renita, M., Fioritto, R.J., Martin, S.K., Schwartz, S.J., Vodovotz, Y. (2004.): Isoflavone characterization and antioxidant activity of Ohio soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2647–2651.
101. Lee, J.D., Bilyeu, K.D., Shannon, J.G. (2007.): Genetics and breeding for modified fatty acid profile in soybean seed oil. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 10 (4), 201-210.
102. Lee, Y.L., Yang, J.H., Mau, J.L. (2008.): Antioxidant properties of water extracts from monascus fermented soybeans. *Food Chemistry* 106, 1128-1137.
103. Lee, J.D., Shannon, J.G., Vuong, T.D., Nguyen H.T. (2009.): Inheritance of salt tolerance in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) accession PI 483463. *Journal of Heredity* 100, 798-801.
104. Lee, S.J., Yan, W., Ahn, J.K., Chung, I.M. (2003.): Effect of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones, *Field Crops Research* 81, 181-192.
105. Lee, S.J., Seguin, P., Kim, J.J., Moon, H.I., Ro, H.M., Kim, E.H., Seo, S.H., Kang, E.Y., Ahn, J.K., Chung, I.M. (2010.): Isoflavones in Korean soybeans differing in seed coat and cotyledon color. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 160–165.
106. Li, F.S. (1994.): A study on origin and evolution of soybean. *Soybean Science (China)* 13, 61-66.
107. Li, Z., Nelson, R.L. (2001.): Genetic diversity among soybean accessions from three countries measured by RAPDs. *Crop Science* 41, 1337-1347.
108. Li, Y., Guan, R., Liu, Z., Ma, Y., Wang, L., Li, L., Lin, F., Luan, W., Chen, P., Qiu, L. (2008.): Genetic structure and diversity of cultivated soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) landraces in China. *Theoretical and Applied Genetics* 117, 857-871.

109. Li, Y., Kong, D., Bao, B., Ahmad, A., Sarkar, F.H. (2011.): Induction of cancer cell death by isoflavone: the role of multiple signaling pathways. *Nutrition* 3, 877–896.
110. Liang, H., Yu, Y.-L., Wang, S.-F., Lian, Y., Wang, T.-F., Wei, Y.-L., Gong, P.-T., Liu X.-Y., Fang X.-J., Zhang M.-C. (2010.): QTL Mapping of isoflavone, oil and protein contents in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Agricultural Sciences in China* 9 (8), 1108-1116.
111. Liu, K., Muse, S.M. (2005.): PowerMarker: Integrated analysis environment for genetics data. *Bioinformatics* 21 (9), 2128-2129.
112. Liu, M., Zhang, M., Jiang, W., Sun, G., Zhao, H., Hu, S. (2011.): Genetic diversity of Shaanxi soybean landraces based on agronomic traits and SSR markers. *African Journal of Biotechnology* 10 (24), 4823-4837.
113. Lowell, C.A., Kuo, T.M. (1989.): Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. *Crop Science* 29, 459-465.
114. Lozovaya, V.V., Lygin, A.V., Ulanov, A.V., Nelson, R.L., Dayde, J., Widholm, J.M. (2005.): Effect of temperature and soil moisture status during seed development on soybean seed isoflavone concentration and composition. *Crop Science* 45, 1934-1940.
115. Mabrouk, Y., Zourgui, L., Delavault, P., Simier, P., Belhadj, O. (2007.): Some compatible *Rhizobium leguminosrum* strains in peas decrease infections when parasitized by *Orobanche crenata*. *Weed Research* 47, 44-53.
116. Malcolm, M., Harvey, V. and Elroy, C. (2002.): Agronomic changes from 58 years of genetic improvement of short-season soybean cultivars in Canada. *Agronomy Journal* 92, 780–784.
117. Malik, M.F.A., Ashraf, M., Qureshi, A.S., Ghafoor, A. (2006.): Utilization of diverse germplasm for soybean yield improvement. *Asian Journal of Plant Sciences* 5 (4), 663-667.
118. Malik, M.F.A., Ashraf, M., Qureshi, A.S., Ghafoor, A. (2007.): Assessment of genetic variability, correlation and path analyses for yield and its components in soybean. *Pakistani Journal of Botany* 39 (2), 405-413.
119. Malik, M.F.A., Qureshi, A., Ashraf, M., Khan, M., Javed, A. (2009.): Evaluation of genetic diversity in soybean (*Glycine max*) lines using seed protein electrophoresis. *Australian Journal of Crop Science* 3 (2), 107-112.

120. Malik, M.F.A., Ashraf, M., Qureshi, A.S., Khan, M.R. (2011.): Investigation and comparison of some morphological traits of the soybean populations using cluster analysis. *Pakistani Journal of Botany* 43 (2), 1249-1255.
121. Maltas, E., Dageri, N., Vural, H.C., Yildiz, S. (2011.): Biochemical and molecular analysis of soybean seed from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (9), 1575-1581.
122. Mantel, N. (1967.): The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.
123. Martinčić, J., Kozumplik, V. (1996.): Oplemenjivanje bilja, Poljoprivredni fakultet Osijek, Agronomski fakultet Zagreb, Zagreb.
124. Maughan, P.J., Saghai Maroof, M.A., Buss, G.R. (2000.): Identification and quantitative trait loci controlling sucrose content in soybean (*Glycine max*). *Molecular Breeding* 6, 105-111.
125. Meng, F. L., Han, Y. P., Teng, W. L., Li, Y. G., Li, W. B. (2011.): QTL underlying the resistance to soybean aphid (*Aphis glycines Matsumura*) through isoflavone-mediated antibiosis in soybean cultivar 'Zhongdou 270. *Theoretical and Applied Genetics* 123, 1459–1465.
126. Messina, M.J. (1999.): Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition* 70 (3), 439-450.
127. Miladinović, J., Hrustić, M., Vidić, M. (2008.): Soja. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Sojaprotein, Bečej.
128. Milošević, M., Dragin, S., Stegić, M. (2010.): Značaj genetičkih resursa i način njihovog očuvanja. *Ratarstvo i povrtarstvo* 47 (1), 11-19.
129. Mladenović Drinić, S., Ignjatović Micić, D., Nikolić, A., Konstantinov, K. (2006.): Genetic characterization of different plant species by protein markers. Book of abstracts of the 3rd symposium on the breeding of organisms and 4th scientific research symposium and breeding and seed production of the Serbian association of plant breeders and seed producers, Zlatibor, Serbia, 143.
130. Mladenović Drinić, S., Nikolić, A., Perić, V. (2008.): Cluster analysis of soybean genotypes based on RAPD markers. *Proceedings of the 43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture*, Opatija, Croatia, 367-370.

131. Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M. (1997.): Genome mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 2, 87-103.
132. Moongkanna, J., Nakasathien, S., Novitzky, W.P., Kwanyuen, P., Sinchaisri, P., Srinives, P. (2011.): SSR markers linking to seed traits and total oil content in soybean. *Thai Journal of Agricultural Science* 44 (4), 233-241.
133. Moose S.P., Mumm R.H. (2008.): Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology* 147, 969-977.
134. Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993.): PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3, 175-182.
135. Morse, W.J, Cartter, J.L., Williams, L.F. (1949.): U.S., Department of Agriculture, Farmers' Bull. No. 1520, 1-38.
136. Mozzoni, L., Shi, A., Chen, P. (2013.): Genetic analysis of high sucrose, low raffinose, and low stachyose content in v99-5089 soybean seeds. *Journal of Crop Improvement* 27 (5), 606-616.
137. Mudibu, J., Nkongolo, K.K.C., Kalonji-Mbuyi, A. (2011.): Morphovariability and agronomic characteristics of soybean accessions from Democratic Republic of Congo (DR-Congo) gene pool. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 3 (11), 660-668.
138. Mulato, B.M., Möller, M., Zucchi, M.I., Quecini, V., Pinheiro, J.B. (2010.): Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45 (3), 276-283.
139. Murphy, D.J. (2006.): Molecular breeding strategies for the modification of lipid composition. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant* 42, 89–99.
140. Murphy, S.E., Lee, E.A., Woodrow, L., Seguin, P., Kumar, J., Rajcan, I., Ablett, G.R. (2009.): Association of seed and agronomic traits with isoflavone levels in soybean. *Canadian Journal of Plant Science* 89 (3), 477-484.
141. Narvel, J.M., Fehr, W.R., Chu, W.-C., Grant, D., Shoemaker, R.C. (2000.): Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. *Crop Science* 40 (5), 1452-1458.
142. Nei, M. (1973.): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Acadademy of Sciences USA* 70, 3321-3323.

143. Njiti, V.N., Meksem, K., Iqbal, J.J., Johnson, J.E., Zobrist, K.F., Kilo, V.Y., Lightfoot, D.A. (2002.): Common loci underlie field resistance to soybean sudden death syndrome in Forrest, Pyramid, Essex and Douglas. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 294-300.
144. Nichols, D.M., Glover, K.D., Carlson, S.R., Specht, J.E., Diers, B.W. (2006.): Fine mapping of a seed protein QTL on soybean linkage group I and its correlated effects on agronomic traits. *Crop Science* 46, 834-839.
145. Nikolić, A., Mladenović Drinić, S., Srebrić, M. (2004.): Genetic diversity of soybean genotypes using molecular markers. ESNA XXXIV annual meeting, Novi Sad, 274-277.
146. Nikolić A., Srebrić, M., Mladenović Drinić, S. (2005.): Genetic similarity of soybean genotypes revealed by seed protein. *Plant breeding and seed production* 11, 1-4.
147. Oliva, M.L., Shannon, J.G., Sleper, D.A., Eilersieck, M.R., Cardinal, A.J., Paris R.L., Lee, J.D (2006.): Stability of fatty acid profile in soybean genotypes with modified seed oil composition. *Crop Science* 46, 2069-2075.
148. Openshaw, S.J., Hadley, H.H. (1978.): Maternal effects on sugar content in soybean seeds. *Crop Science* 18, 581-584.
149. Orf, J.H., Diers, B.W., Boerma, H.R. (2004.): Genetic improvement: conventional and molecular based strategies. 417-450. U: Shibles, R.M., Specht, J.E. (ur.): *Soybeans: Improvement, Production and Uses*. ASA, CSSA, SSSA, USA.
150. Panthee, D.R., Pantalone, V.R., Saxton, A.M. (2006.): Modifier QTL for fatty acid composition in soybean oil. *Euphytica* 152 (1), 67-73.
151. Park, Y.J., Lee, J.K., Kim, N.S. (2009.). Simple sequence repeat polymorphisms (SSRPs) for evaluation of molecular diversity and germplasm classification of minor crops. *Molecules* 14: 4546-4569.
152. Peakall, R., Smouse P.E. (2012.): GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
153. Perić, V., Nikolić, A., Babić, V., Sudarić, A., Srebrić, M., Đorđević, V., Mladenović Drinić, S. (2014.): Genetic relatedness of soybean genotypes. *Genetika* 46 (3), 839-854.
154. Penzar I., Penzar, B. (2000.): *Agrometeorologija*. Školska knjiga, Zagreb.

-
155. Pham, A.T., Lee, J.D., Shannon, J.G., Bilyeu, K.D. (2010.): Mutant alleles of FAD2-1A and FAD2-1B combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait. *BMC Plant Biology* 10, 195.
 156. Popović, V., Vidić, M., Jocković, Đ., Ikanović, J., Jakšić, S., Cvijanović, G. (2012.a): Variability and correlation between yield components of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Genetika*, 44 (1), 33-45.
 157. Popović, V., Vidić, M., Tatić, M., Jakšić, S., Kostić, M. (2012.b): Uticaj sorte i godine na prinos i komponente kvaliteta soje. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 49, 132-139.
 158. Powell, W., Machray, G.C., Provan, J. (1996.): Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1, 215-222.
 159. Primomo, V.S., Falk, D.E., Ablett, G.R., Tanner, J.W., Rajcan, I. (2002.): Genotype x environment interactions, Stability, and agronomic performance of soybean with altered fatty acid profiles. *Crop Science* 42, 37-44.
 160. Priolli, R.H.G., Mendes-Junior, C.T., Arantes, N.E., Contel, E.P.B. (2002.): Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 25 (2), 185-193.
 161. Priolli, R.H.G., Pinheiro, J.B., Zucchi, M.I., Bajay, M.M., Vello, N.A. (2010.): Genetic diversity among Brazilian soybean cultivars based on SSR loci and pedigree data. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53 (3), 519-531.
 162. Priolli, R.H.G., Campos, J.B., Stabellini, N.S., Pinheiro, J.B., Vello, N.A. (2014.): Association mapping of oil content and fatty acid components in soybean. *Euphytica* 206 (1), 263-278.
 163. Qiu, D., Vuong, T., Valliyodan, B., Shi, H., Guo, B., Shannon, J.G., Nguyen, H.T. (2015.): Identification and characterization of a stachyose synthase gene controlling reduced stachyose content in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 128 (11), 2167-2176.
 164. Ramteke, R., Kumar, V., Murlidharan, P., Agarwal, D.K. (2010.): Study on genetic variability and traits interrelationship among released soybean varieties of India (*Glycine max* (L.) Merrill). *Electronic Journal of Plant Breeding* 1 (6), 1483-1487.
 165. Rani, A., Kumar, V., Verma, S.K., Shakya, A.K., Hussain, S.M., Chauhan, G.S. (2007.): Interrelationship between oil content and fatty acid composition in Indian soybean (*Glycine max*) cultivars. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 77 (3): 195-198.

166. Rebetzke, G.J., Pantalone, V.R., Burton, J.W., Carter, T.E., Wilson, R.F. (1997.): Genotypic variation for fatty acid content in selected *Glycine max* x *Glycine soja* populations. *Crop Science* 37, 1636-1640.
167. Rector, B.G., All, J.N., Parrott, W.A., Boerma, H.R. (2000.): Quantitative trait loci for antibiosis resistance to corn earworm in soybean. *Crop Science* 40, 233–238.
168. Regal, J.F., Frazer, D.G., Weeks, C.E., Greenberg, N.A. (2000.): Dietary phytoestrogens have anti-inflammatory activity in a Guinea pig model of asthma. *Experimental Biology and Medicine* 223, 372-378.
169. Ristova, D., Šarčević, H., Šimon, S., Mihajlov, Lj., Pejić, I. (2010.): Genetic diversity in Southeast European soybean germplasm revealed by SSR markers. *Agriculturae Conspectus Scientificus* (75) 1, 21-26.
170. Roberfroid, M. (2007.): Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition* 137, 830–837.
171. Rodrigues, J.I.D, De Miranda, F.D., Ferreira, A., Borges L.L., Ferreira, M.F.D., Good-God, P.I.V., Piovesan, N.D., De Barros, E.G., Cruz, C.D., Moreira, M.A. (2010.): Mapping QTL for protein and oil content in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45 (5), 472-480.
172. Rodrigues, J.I.D, Arruda, K.M.A, Cosme Damião Cruz, C.D., Piovesan, N.D., Barros, E.G. de, Moreira, M.A. (2014.): Biometric analysis of protein and oil contents of soybean genotypes in different environments. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 49 (6), 475-482.
173. Roldan-Ruiz, I., van Eeuwijk, F.A., Gilliland, T.J., Dubreuil, C., Dillmann, C., Lallemand, J.M., De Loose, M., Baril, C.P. (2001.): A comparative study of molecular and morphological methods of describing relations between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 103, 1138-1150.
174. Rolf, F.J. (2005.): NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.10s, Applied Biostatistic, New multivariate analysis system, version 2.10s, Applied Biostatistic, New York.
175. Romić, D., Petošić, D., Stričević, I., Ondrašek, G., Rus, B., Kondres, N., Maurović, N. (2006.): Hidropedološka studija s idejnim rješenjem navodnjavanja proizvodnih površina Poljoprivrednog instituta Osijek. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za poljoprivredne melioracije, Zagreb.

-
176. Rosenberg, M.S., Anderson, C.D. (2011.): PASSaGE: Pattern Analysis, Spatial Statistics nad Geographic Exegesis. Version 2. *Methods in Ecology and Evolution* 2 (3), 229-232.
 177. Salimi, S. (2013.): Relationships of some soybean genotypes based on morphological and biochemical markers. *International Agronomy and Plant Producton* 4 (9), 2237- 2243.
 178. Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R.C., Jackson, S.A. (2010.): Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463, 178-183.
 179. Sebolt, A.M., Shoemaker, R.C., Diers, B.W. (2000.): Analysis of a quantitative trait locus allele from wild soybean that increase seed protein concentration in soybean. *Crop Science* 40, 1438-1444.
 180. Sharma, S., Kaur, M., Goyal, R., Gill, B.S. (2014.): Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. *Journal of Food Science and Technology* 51, 551–557.
 181. Shultz, J.L., Ray, J., Smith, J., Mengitsu, A. (2007.): A soybean mapping population specific to the early soybean production system. *DNA Sequencing* 18 (2), 104-111.
 182. Smale, M. (1997.): The green revolution and wheat genetic diversity: some unfounded assumptions. *World development* 25 (8), 1257-1269.
 183. Smith, O.S., Smith, J.S.C. (1992.): Measurement of genetic diversity among hybrids: A comparison of isozymic, RFLP, pedigree, and heterosis data. *Medica* 37, 53–60.
 184. Sneath, P.H., Sokal, R.R. (1973.): *Numerical taxonomy*. San francisco: Freeman, 573.
 185. Sneller, C.H., Nelson, R.L., Carter Jr., T.E., Cui, Z. (2005.): Genetic diversity in crop improvement: The soybean experiance. 103-144. U: Kand, M.S. (ur.): *Genetic*

- and production innovations in field crop technology: New developments in theory and practice. Food Products Press, New York.
186. Song, J.Y., Piao, X., Choi, Y.-M., Lee, G.-A., Chung, J.-W., Lee, J.-R., Jung, Y., Park, H.-J., Lee, M.C. (2013.): Evaluation of genetic diversity and comparison of biochemical traits of soybean (*Glycine max* L.) germplasm collections. *Plant Breeding and Biotechnology* 1 (4), 374-384.
 187. Song, Q.J., Marek, L.F., Shoemaker, R.C., Lark, K.G., Concibido, V.C., Delannay, X., Specht, J.E., Cregan, P.B. (2004.): A new integrated genetic linkage map of soybean, *Theoretical and Applied Genetics* 109 (1), 122-128.
 188. Song, Q.J., Hyten, D.L., Jia, G., Quigley, C.V., Fickus, E.W., Nelson, R.L., Cregan, P.B. (2015.): Fingerprinting soybean germplasm and its utility in genomic research. *G3 Journal* 5 (10), 1999-2006.
 189. Soxhlet, F. (1879.): Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dingler's Polytechnisches Journal* 232, 461-465.
 190. Spencer, M.M., Pantalone, V.R., Meyer, E.J., Landau-Ellis, D., Hyten, D.L. (2003.): Mapping the Fas locus controlling stearic acid content in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 106(4), 615-619.
 191. Suarez F.L., Springfield J., Furne J.K., Lohrmann T.T., Kerr P.S., Levitt M.D. (1999.): Gas production in human ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. *American Journal of Clinical Nutrition* 69, 135-139.
 192. Subramanian, S., Stacey, G., Yu, O. (2007.): Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in Plant Science* 12, 282-285.
 193. Sudarić, A., Vratarić, M., Volenik, S., Duvnjak, T. (1997.): Parameters for the estimation of genetic gain in soybean breeding program at the Osijek Agricultural Institute. *Eurosoya* 11, 16-22.
 194. Sudarić, A., Vratarić, M., Duvnjak, T., Sudar R. (2001.): Genetski napredak u kvantitativnim svojstvima uroda i kakvoće zrna OS-linija soje I. grupe zriobe. *Poljoprivreda* 7 (2), 207-216.
 195. Sudarić, A., Vratarić, M. (2002.): Variability and interrelationships of grain quantity and quality characteristics in soybean. *Die Bodenkultur* 53 (3), 137-142.
 196. Sudarić, A., Vratarić, M., Duvnjak, T. (2002.): Quantitative genetic analysis of yield components and grain yield for soybean cultivars. *Poljoprivreda* 8, 11-15.

197. Sudarić, A., Šimić, D., Vratarić, M. (2006.): Characterization of genotype by environment interactions in soybean breeding programmes of southeast Europe. *Plant Breeding* 125. 191-194.
198. Sudarić, A., Vratarić, M. (2008.): Značenje, dostignuća i trendovi u oplemenjivanju soje u Poljoprivrednom institutu Osijek. *Sjemenarstvo* 25, 3-4, 207-216.
199. Sudarić, A., Vratarić, M., Rajcan, I., Duvnjak, T., Volenik., M. (2008.): Application of molecular markers in parental selection in soybean. *Acta Agronomica Hungarica* 56 (4), 393-398.
200. Sudarić, A., Vratarić, M., Sudar, R. (2009.): Genetic improvement of soybean by modern breeding strategies in region of the Eastern Croatia. *World Soybean Research Conference VIII, Beijing, China*, 54.
201. Sudarić, A., Vratarić, M., Mladenović Drinić, S., Matoša, M. (2010.): Biotechnology in soybean breeding. *Genetika* 42 (1), 91-102.
202. Sudarić, A., Vratarić, M., Matoša, M. (2011.): Genetski napredak soje potpomognut molekularnim markerima. *Zbornik apstrakata IV Simpozijuma sekcije za oplemenjivanje organizama Društva genetičara Srbije / Berenji, Janoš ; Mladenović Drinić, Snežana ; Konstantinov, Kosana (ur.). - Beograd : Društvo genetičara Srbije*, 50-50.
203. Sudarić, A., Vratarić, M., Mladenović Drinić, S., Zdunić, Z. (2011.): Genetic improvements: Molecular-based strategies. U: Sudarić, A. (ur.): *Soybean – Molecular aspects of breeding*. InTech, Rijeka, Hrvatska. 57-80.
204. Šegota, T., Filipčić, A. (2003.): Köppenova podjela klima i hrvatsko nazivlje. *Geoadria* 8 (1), 17-37.
205. Taira, H. (1990.): Quality of soybeans for processed foods in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly* 24, 224-230.
206. Tamulonis, J.P., Luzzi B.M., Hussey, R.S., Parrot, W.A., Boerma, H.R. (1997.): RFLP mapping of resistance to southern root-knot nematode in soybean. *Crop Science* 37, 1903-1909.
207. Tantasawat P., Trongchuen J., Prajongjai T., Jenweerawat S., Chaowiset W. (2011.): SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand. *Australian Journal of Crop Science* 5 (3), 283-290.

-
208. Tara Satyavathi, C., Bhat, K.V., Bharadwaj, C., Tiwari, S.P., Chaudhury, V.K. (2006.): AFLP analysis of genetic diversity in Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53, 1069-1079.
209. Tavaud-Pirra, M., Sartre, P., Nelson, R., Santoni, S., Texier, N., Roumet, P. (2009.): Genetic diversity in a soybean collection. *Crop Science* 49, 895-902.
210. Tepavčević, V., Atanacković, M., Miladinović, J., Malencić, D., Popović, J., Cvejić, J. (2010.): Isoflavone composition, total polyphenolic content, and antioxidant activity in soybeans of different origin. *Journal of Medicinal Food* 13 (3), 657-664.
211. Todorovska, E., Atanassov, A., Vassiliev, D. (2010.): From genetics to genomics in plants and animals. *Genetika* 42 (1), 177-194.
212. Tsangalis, D., Shah, N.P. (2004.): Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acid in soymilk by probiotic bifidobacteria. *International Journal of Food Science and Technology* 39, 541-554.
213. van Kempen, T.A.T.G., Kim, I.B., Jansman, A.J.M., Verstegen, M.W.A., Hancock, J.D., Lee, D.J., Gabert, V.M., Albin, D.M., Fahey, G.C. Jr., Grieshop, C.M., Mahan, D. (2002.): Regional and processor variation in the ileal digestible amino acid content of soybean meals measured in growing swine. *Journal of Animal Science* 80, 429-439.
214. Vaz Patto, M.C., Satovic, Z., Pego, S., Fevereiro, P. (2004.): Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica* 137, 63-72.
215. Vello N.A., Hiromoto, D.M., Azevedo-Filho A.J.B.V. (1988.): Coefficient of parentage and breeding of Brazilian soybean germplasm. *Brazilian Journal of Genetics* 11, 679-697.
216. Vidić, M., Hrustić, M., Miladinović, J., Đukić, V., Đorđević, V., Popović, V. (2010.): Novine u sortimentu soje. *Ratarstvo i Povrtarstvo* 47, 347-355.
217. Vratarić, M., Sudarić, A., Sudar, R., Duvnjak, T., Jurković, D., Jurković, Z. (2005.): Genetic advance in quantitative traits of soybean lines within different maturity groups. *Poljoprivreda*, 11 (1), 5-10.
218. Vratarić, M., Sudarić, A. (2008.): Soja. *Poljoprivredni institut Osijek, Osijek*: 1-459.
-

-
219. Vuong, T.D., Wu, X., Pathan, S., Valliyodan, B., Nguyen, H.T. (2007.): Genomics approaches to soybean improvement. U: Varshney, R. K., Tuberosa, R. (ur.) Genomics-Assisted Crop Improvement, Volume 2: Genomics Applications in Crops. Springer, The Netherlands, 243-279.
220. Vyn T.J., Yin X., Bruulsema T.W., Jackson C.C., Rajcan I., Brouder S.M. (2002.): Potassium fertilization effects on isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 3501–3506.
221. Wang, B.F., Wang, J.S., Lu, J.F., Kao, T.H., Chen, B.H. (2009.): Antiproliferation effect and mechanism of prostate cancer cell lines as affected by isoflavones from soybean cake. Journal of Agriculture and Food Chemistry 57, 2221-2232.
222. Wang, D., Arelli, P.R., Shoemaker, R.C., Diers, B.W. (2001.): Loci underlying resistance to Race 3 of soybean cyst nematode in *Glycine soja* plant introduction 468916. Theoretical and Applied Genetics 103, 561-566.
223. Wang, H.J., Murphy, P.A. (1994.a): Isoflavone content in commercial soybean foods. Journal of Agriculture and Food Chemistry 42, 1666–1673.
224. Wang, H.J., Murphy P.A. (1994.b): Isoflavone composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42, 1674-1677.
225. Wang, L.X., Guan, R., Zhangxiong, L., Chang, R., Qiu, L. (2006.): Genetic diversity of chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. Crop Science 46, 1032-1038.
226. Wardlaw, G.M ., Snook, J.T. (1990.): Effect of diet high in butter, corn oil, or high-oleic acid sunflower oil on serum lipids and apolipoproteins in men. American Journal of Clinical Nutrition 51, 815-821.
227. Weller, J.I., Soller, M., Brody, T. (1988.): Linkage analysis of quantitative traits in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicum esculentum* x *L. pimpinellifolium*) by means of genetic markers. Genetics 118, 329-339.
228. Wen, Z.X., Ding, Y.L., Zhao, T.J., Gai, J.Y. (2009.): Genetic diversity and peculiarity of annual wild soybean (*G. soja* Sieb. et Zucc.) from various eco-regions in China. Theoretical and Applied Genetics 119 (2), 371-381.
229. Wilcox, J. (2001.): Sixty years of improvement in publicly developed elite soybean lines. Crop Science 49, 1711–1716.
-

-
230. Wilson, R.F. (2004.): Seed composition. U: H.R. Boerma, J.E. Specht (ur.) Soyebans: Improvement, Production and Uses, Ed 3, American Society of Agronomy, Madison, 621-677.
231. Wolf, R.B, Cavins, J.F., Kleiman, R., Black, L.T. (1982.): Effect of temperature on soybean seed constituents: oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids and sugars. *Journal of American Oil Chemistis' Society* 59, 230-232.
232. Wright, S. (1978.): Evolution and genetics of populations Vol 4. Variability within and among natural populations, University of Chicago Press, Chicago. 580.
233. Wu, X.L., He, C.Y., Wang, Y.J., Zhang, Z.Y., Dongfang, Y., Zhang, J.S., Chen, S.Y., Gai, J.Y. (2001.): Construction and analysis of a genetic linkage map of soybean. *Yi Chuan Xue Bao* 28, 1051-1061.
234. Xu, D.H., Gai, J.Y. (2003.): Genetic diversity of wild and cultivated soybeans growing in China revealed by RAPD analysis. *Plant Breeding* 122, 503-506.
235. Yamanaka, N., Ninimiya, S., Hoshi, M., Tsubokura, Y., Yano, M., Nagamura, Y., Sasaki, T., Harada, K. (2001.): An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion. *DNA Research* 8, 61-72.
236. Yan, W., Kang, M.S. (2003.): GGE biplot analysis: A graphical tool for breeders, geneticists and agronomists. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA.
237. Yang, K., Ko, J.-M., Ha, T.J., Lee, Y.H., Baek, I.-Y., Yang, T.-J., Nou, I.-S. (2014.): Development of molecular markers for low raffinose and stachyose in korean soybean cultivars. *Plant Breeding and Biotechnology* 2(2), 151-157.
238. Yazdi-Samadi, B., Rinne, R.W., Seif, R.D. (1977.): Components of developing soybean seeds: oil, protein, sugars, starch, organic acids, and amino acids. *Agronomy Journal* 69 (3), 481-486.
239. Zeng, G., Li, D., Han, Y., Teng., Wang, J., Qiu, L., Li, W. (2009.): Identification of QTL underlying isoflavone contents in soybean seeds among multiple environments. *Theoretical and Applied Genetics* 118, 1455-1463.
240. Zhao, T.J., Gai, J.Y. (2004.): The origin and evolution of cultivated soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Scientia Agricultura Sinica* 37, 954-962.
-

-
241. Zhang, E.J., Ng, K.M., Lou, K.Q. (2007.): Extraction and purification of isoflavones from soybeans and characterization of their estrogenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6940–6950.
242. Zhang, G., Xu, S., Mao, W, Hu, Q., Gong, Y. (2013.): Determination of the genetic diversity of vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) using EST-SSR markers. *Journal of Zhejiang University – Science B (Biomedicine & Biotechnology)* 14 (4), 279-288.
243. Zheng, R., Yang, L., Zhou, X., Zhu, C., Shu, X., Wu, X., Li, H., Wang, L., Bo, J. (2012.): Effect of soybean oligosaccharides in immunity and TLR2--NF- κ B signal pathway response for weaning pigs. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 10, 273–279.
244. Zhou, X., Peng, Y., Wang, G., Chang, R. (1998.): Preliminary studies on the centers of genetic diversity and origination of cultivated soybean in China. *Acta Agronomica Sinica* 31 31, 37-43.
245. Zhou, X. Carter, T.E., Cui, Z., Miyazaki, S., Burton, J.W. (2002.): Genetic diversity patterns in japanese soybean cultivars based on coefficient of parentage. *Crop Science* 42 (4), 1331-1342.
246. Zhou, Z., Jiang, Y., Wang, Z., Gou, Z., Lyu, J., Li, W., Yu, Y., Shu, L., Zhao, Y., Ma, Y., Fang, C., Shen, Y., Liu, T, Li, C., Li, Q., Wu, M., Wang, M., Wu., Y., Dong., Y., Wan, W., Wang, X., Ding, Z., Gao., Y., Xiang, H., Zhu, B., Lee, S.-H., Wang, W., Tian, Z. (2015.): Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean. *Nature Biotechnology* 33 (4), 408-414.
247. Zhuang, B.C., Hui, D.W., Wang, Y.M., Gu, J., Xu, B., Chen, S.Y. (1994.): RAPD analysis of different evolutionary types in different latitude in China. *Chinese Science Bulletin* 39 (23), 2178-2180.

MREŽNI IZVORI

1. Carraõ-Panizzi, M. C. (2005.): Qualidade da produçãõ de soja no Brasil e as perspectivas para graõs com valor agregado. Workshops.
http://www.acsoja.org.ar/images/cms/contenidos/443_b.pdf.

-
- Citirano u: Priolli, R. H. G., Campos, J. B., Stabellini, N. S., Pinheiro, J. B., Vello, N. A. (2014). Association mapping of oil content and fatty acid components in soybean. *Euphytica*. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10681-014-1264-4>
2. Colwell, R. K. (2013.): EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9. User's Guide and application. <http://purl.oclc.org/estimates>.
 3. CSE – Centre for Science and Environment (2009.): Fatty acids profile of edible oils and fats in India. Pollution Monitoring Laboratory, Tughlakabad Institutional Area, New Delhi, India.
http://www.indiaenvironmentportal.org.in/files/fatty_acids_profile.pdf
 4. FAOSTAT database (FAOSTAT, 2016.): <http://faostat3.fao.org/home/E>
 5. Hammer, Ø., Harper, D.A.T, Ryan, P.D. (2001.): PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1):9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.html
 6. Ofrano, F. (2011.): Definition and significance of genetic variability. www.brightub.com/science/genetics
 7. Priolli, R.H.G., Campos, J.B., Stabellini, N.S., Pinheiro, J.B. Vello, N.A. (2014.): association mapping of oil content and fatty acid components in soybean. *Euphytica*, DOI 10.1007/s10681-014-1264-4.
<http://link.springer.com/article/10.1007/s10681-014-1264-4>
 8. R Core Team (2013.): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
 9. Wang, Y., Han, Y., Teng, W., Zhao, X., Li, Y., Wu, L., Li, D., Li, W. (2014.): Expression quantitative trait loci infer the regulation of isoflavone accumulation in soybean (*Glycine max* L. Merr.) seed. *MC Genomics* 15:680
DOI: 10.1186/1471-2164-15-680
<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-680>
-

7. SAŽETAK

U ovom istraživanju ispitana je genetska varijabilnost svojstava kvalitete germplazme soje temeljem utvrđivanja mase 1000 zrna te kemijskih analiza zrna i molekularnih analiza te utvrđena genetska udaljenost genotipova temeljem spomenutih setova podataka. Ciljevi ovog istraživanja bili su na 22 genotipa soje: (1) procijeniti genetsku varijabilnost svojstava kvalitete zrna i genetsku udaljenost germplazme soje na temelju izračuna mase 1000 zrna te kemijskih analiza zrna koje su uključivale određivanje koncentracije bjelančevina i ulja, sastava i koncentracije masnih kiselina i saharida te sastava i sadržaja izoflavona; (2) procijeniti genetsku varijabilnost svojstava kvalitete zrna germplazme soje uz pomoć SSR biljega izabranih temeljem rezultata studija povezanosti polimorfizma DNA biljega i pojedinih istraživanih svojstava kvalitete zrna; (3) odabrati genotipove s poželjnim svojstvima kvalitete zrna; (4) identificirati najudaljenije sorte s poželjnim svojstvima kvalitete kao potencijalne roditeljske kombinacije za buduće programe križanja. Tijekom tri vegetacijske sezone (2010. – 2012.), na Poljoprivrednom institutu Osijek postavljen je poljski pokus u 2 ponavljanja po slučajnom bloknom rasporedu. Svake godine pokusa nakon žetve određena je masa 1000 zrna te su napravljene kemijske analize kojima se utvrdila koncentracija bjelančevina i ulja, sastav i koncentracija masnih kiselina i saharida te sastav i sadržaj izoflavona u zrnu soje. Na kraju trogodišnjeg pokusa napravljene su i molekularne analize. Statistička obrada rezultata ovih analiza uključivala je izračun standardnih mjera varijacije, analizu varijance, utvrđivanje udaljenosti genotipova temeljem standardiziranih srednjih vrijednosti svojstava kvalitete zrna te izradu pripadajućeg UPGMA dendrograma, utvrđivanje genetske udaljenosti po Nei-u (1973.) temeljem molekularnih analiza uz pomoć 10 mikrosatelitnih biljega te izradu pripadajućeg UPGMA dendrograma, analizu molekularne varijance za genotipove porijeklom sa Poljoprivrednog instituta Osijek te usporedbu podataka različitih vrsta analiza Mantelovim testom. Nakon završene analize podataka utvrđeno je da unutar istraživanih seta biljnog materijala postoji genetska raznolikost u svojstvima kvalitete zrna što je i potvrđeno na molekularnoj razini. Utjecaj genotipa je bio statistički značajan za sva istraživana svojstva, a utjecaj godine za sva osim za ukupne saharide. Genetska udaljenost procijenjena iz rezultata analiza kvalitete i mase 1000 zrna varirala je od 2,5 do 8 s prosječnom vrijednošću koja je iznosila 5,94, a UPGMA dendrogram konstruiran temeljem ovih vrijednosti uspješno je razdvojio genotipove u grupe. Korišteni set od 10 biljega imao je visoku razinu informativnosti, a analizom 22 genotipa

amplificiran je ukupno 141 alel. Prosječna genetska udaljenost utvrđena iz rezultata molekularnih analiza iznosila je 0,983. Kao sorte sa visokom kvalitetom zrna koje su međusobno genetski najudaljenije izdvojile su se Korana, Lucija, Alisa i SG-1 u odnosu na ostatak istraživanih genotipova, ali i u međusobnom odnosu što dovodi do zaključka da njihovo uključivanje u programe križanja može povećati šanse stvaranja populacije koja bi sadržavala genotipove superiorne u kvaliteti zrna u odnosu na postojeći sortiment. Analizom molekularne varijance za 19 genotipova Poljoprivrednog instituta Osijek utvrđen je umjeren i statistički visoko značajan utjecaj razdoblja priznavanja na genetsku raznolikost pri čemu je čak 97 % ukupne varijabilnosti bilo rezultat razlika genotipova unutar razdoblja oplemenjivanja. Mantelovim testom usporedbe različitih setova podataka nije utvrđena statistička značajnost dok korelacija nije niti postojala što potvrđuju i razlike u dendrogramima u kojima su se sorte većinom različito grupirale. Slijedom prethodno navedenog može se zaključiti da obje metode korištene za utvrđivanje genetske raznolikosti uspješno razdvajaju istraživane genotipove, ali bi njihova specifična ograničenja u smislu cijene inputa, potrebnog vremena, točnosti i učinkovitosti trebalo imati na umu pri planiranju preliminarnih istraživanja u oplemenjivačkim programima.

Ključne riječi: soja, kvaliteta zrna, genetska divergentnost, SSR, UPGMA, oplemenjivanje

8. SUMMARY

Genetic variability of soybean (*Glycine max* L. Merr.) germplasm seed quality

This research investigated the variability of soybean germplasm seed quality by determining 1000 seed weight, chemical analyses of seed and molecular analysis of 22 soybean genotypes. Aims of this research were: (1) assessing genetic variability of seed quality and genotypes' genetic distance on the basis of measuring 1000 seed weight and by determining soybean seed protein and oil, fatty acid and saccharide composition and concentrations as well as isoflavone composition and contents; (2) assessing genetic diversity and genetic distance of genotypes with the help of SSR markers chosen on the basis of relevant association studies between used markers and investigated seed quality parameters; (3) choosing genotypes with favourable seed quality; (4) among genotypes with favourable seed quality, choosing those genetically most distant for future crossing programmes. Field trials were set up in randomized complete block design with two replications, at the Agricultural Institute Osijek during three growing seasons (2010-2012). Chemical analyses (protein and oil concentrations, composition and concentration of fatty acids and saccharides, composition and content of isoflavones) and determining the 1000 seed weight were performed each year after harvest while molecular analysis was done at the end of the three year trial. Statistical analyses of the results included: calculating basic measures of variation, analysis of variance, determining genotypes' genetic distance with standardised average values of seed quality parameters and constructing corresponding UPGMA dendrogram, determining genetic distance according to Nei (1973) on the basis of molecular analysis with 10 microsatellite markers as well as constructing corresponding UPGMA dendrogram, analysis of molecular variance for Agricultural Institute Osijek's genotypes and comparing the results of different types of analyses with Mantel's test. Analysed data showed existence of genetic diversity in seed quality among tested plant materials, which was confirmed on the molecular level also. The influence of genotype was statistically significant for all investigated quality parameters and the influence of year for all except combined saccharides. Genetic distance assessed from 1000 seed weight and seed quality results varied between 2.5 and 8 with average value of 5.94 and resulting UPGMA dendrogram successfully divided genotypes into different groups. Used set of 10 primer pairs amplified 141 alleles in 22 genotypes suggesting high level of marker informativeness.

Average genetic distance coefficient calculated from the results of molecular analysis was 0.983. According to results of above mentioned analyses, cultivars with favourable seed quality that are genetically distant from other genotypes were Korana, Lucija, Alisa and SG-1 which makes them suitable parents in future crossing programmes aiming to produce genotypes superior in seed quality in comparison to existing ones. Analysis of molecular variance for 19 soybean genotypes created at the Agricultural Institute Osijek determined moderate and statistically significant effect of cultivars' registration time period on genetic diversity with 97 % of total variability being the result of differences between genotypes in time period groups. Mantel's test for comparing showed no statistically significant correlation existed between matrices made by different sets of data while no correlation was observed. This was also confirmed by dendrograms constructed on the basis of different data sets, in which tested genotypes grouped differently. In conclusion, both methods of determining genetic diversity are successful in grouping tested genotypes but their specific restrictions concerning cost of input, time needed, accuracy and effectiveness should be bared in mind while planning preliminary research in breeding programmes.

Key words: soybean, seed quality, genetic diversity, SSR, UPGMA, breeding

9. PRILOG

Prilog 1

Popis kratica, oznaka i simbola

AFLP	- <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> ; polimorfizam dužine amplificiranih ulomaka
AMOVA	- <i>Analysis of Molecular Variance</i> ; analiza molekularne varijance
ANOVA	- <i>Analysis of Variance</i> ; analiza varijance
AST	- <i>Apsolutno Suha Tvar</i>
CTAB	- cetiltrimetilamonij bromid
COP	- <i>Coefficient of Parentage</i> ; koeficijent srodnosti
CPGRD	- <i>Croatian Plant Genetic Resources Database</i> ; Baza podataka biljnih genetskih izvora Republike Hrvatske
CV	- <i>Coefficient of Variation</i> , koeficijent varijacije
DNA	- <i>Deoxyribonucleic Acid</i> – deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	- <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> - etilendiamintetraoctena kiselina
EST-SSR	- <i>Expressed Sequence Tag – Simple Sequence Repeats</i>
FAO	- <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> ; Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija
FAOSTAT	- <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations – the statistics division</i> ; statističko odjeljenje Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija
GD	- <i>Genetic Distance</i> ; genetska udaljenost
H _E	- genetska raznolikost / očekivana heterozigotnost
MAS	- <i>Marker Assisted Selection</i> ; biljezima potpomognuta selekcija
N _a	- broj alela po lokusu
PCA	- <i>Principal Component Analysis</i> ; analiza glavnih sastavnica
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; lančana reakcija polimerazom
PIC	- <i>Polymorphism Information Content</i> ; informacijski sadržaj polimorfizma
PIO	- Poljoprivredni institut Osijek
QTL	- <i>Quantitative Trait Loci</i> ; lokusi kvantitativnih svojstava

RAPD	- <i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i> ; nasumično amplificirana polimorfna DNA
RFLP	- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ; polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka
SAD	- <i>Sjedinjene Američke Države</i>
SEVAG	- kloroform izoamil alkohol
SNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ; polimorfizam jednog nukleotida
SSR	- <i>Simple Sequence Repeats</i> ; jednostavne ponavljajuće sekvence - mikrosateliti
ST	- <i>Suha Tvar</i>
TBE	- Tris-Borna kiselina EDTA
TE	- Tris - EDTA
Tris	- tris(hidroksimetil)aminometan
UPGMA	- <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> ; Neponderirana metoda za sparivanje skupina na temelju prosječnih vrijednosti

Prilog 2

Srednje vrijednosti i mjere varijacije za kvantitativna svojstva. Stranice 119 –138.

Tablica 30. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za apsolutnu masu zrna (g) genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Apsolutna masa zrna (g)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	198,80	174,90	150,30	174,67 ^{cd} e
2	NADA	172,55	170,75	163,15	168,82 ^{fg}
3	PODRAVKA 95	137,50	153,85	126,70	139,35 ^e
4	IKA	179,50	155,85	147,05	160,80 ^{ij}
5	ANICA	146,05	184,15	155,50	161,90 ^{hi}
6	JULIJANA	211,15	190,55	175,80	192,50 ^b
7	ZORA	164,55	156,80	138,40	153,25 ^k
8	VITA	183,30	171,10	150,05	168,15 ^{fg}
9	KORANA	233,40	172,75	160,70	188,95 ^b
10	LUCIJA	213,95	189,20	175,00	192,72 ^b
11	TOMA	153,45	162,80	154,65	156,97 ^k
12	TENA	195,55	175,10	149,85	173,50 ^{de}
13	SANDA	184,25	171,95	172,45	176,22 ^{cd}
14	MARA	173,40	183,35	175,95	177,57 ^{cd}
15	SEKA	155,85	155,40	150,55	153,94 ^k
16	SARA	159,55	163,35	174,30	165,73 ^{gh}
17	EMA	175,25	183,30	177,75	178,77 ^c
18	SONJA	194,40	175,55	159,55	176,50 ^{cd}
19	OS-60-06	156,35	160,75	144,60	153,90 ^k
20	GORDANA	166,10	187,85	157,25	170,40 ^{ef}
21	ALISA	247,15	200,30	197,60	215,02 ^a
22	SG-1	149,05	188,95	153,30	163,77 ^{hi}
<i>Srednja vrijednost</i>		179,59 ^a	174,03 ^b	159,57 ^c	171,06
<i>Minimum</i>		137,50	153,85	126,70	139,35
<i>Maksimum</i>		247,15	200,30	197,60	215,02
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		15,87	7,64	9,95	9,68

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod $P = 0,01$

$LSD_{godina(0,01)} = 1,613$; $LSD_{genotip(0,01)} = 4,36$

Tablica 31. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju bjelančevina (% AST) u zrnju genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija bjelančevina (% AST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	40,94	37,55	42,26	40,25 ^{de}
2	NADA	39,29	36,15	42,82	39,42 ⁱ
3	PODRAVKA 95	39,29	37,95	42,56	39,94 ^{fg}
4	IKA	40,85	37,64	42,96	40,49 ^{cd}
5	ANICA	41,14	38,72	43,39	41,09 ^b
6	JULIJANA	40,26	34,61	42,39	39,08 ^j
7	ZORA	40,45	37,76	43,81	40,67 ^c
8	VITA	40,31	36,59	43,09	39,99 ^{efg}
9	KORANA	40,19	36,47	43,69	40,12 ^{ef}
10	LUCIJA	39,22	35,68	43,43	39,44 ⁱ
11	TOMA	39,67	38,30	43,54	40,51 ^{cd}
12	TENA	37,98	36,68	42,57	39,08 ^j
13	SANDA	41,70	37,69	44,30	41,23 ^{ab}
14	MARA	39,57	36,69	42,95	39,74 ^{gh}
15	SEKA	40,15	38,24	41,34	39,91 ^{fg}
16	SARA	40,28	38,89	43,96	41,05 ^b
17	EMA	39,48	36,07	43,31	39,62 ^{hi}
18	SONJA	40,48	36,84	43,45	40,26 ^{de}
19	OS-60-06	39,40	36,39	42,79	39,53 ^{hi}
20	GORDANA	38,98	36,90	42,51	39,46 ^{hi}
21	ALISA	40,65	38,36	45,49	41,50 ^a
22	SG-1	38,81	36,84	41,53	39,06 ^j
<i>Srednja vrijednost</i>		39,96 ^b	37,14 ^c	43,09 ^a	40,07
<i>Minimum</i>		37,98	34,61	41,34	39,06
<i>Maksimum</i>		41,70	38,89	45,49	41,50
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		2,18	2,88	2,10	1,81

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01

LSD_{godina(0,01)} = 0,103; LSD_{genotip(0,01)} = 0,279

Tablica 32. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju ulja (% AST) u zrnu genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija ulja (% AST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	21,77	23,44	26,35	23,85 ^b
2	NADA	21,22	22,67	25,44	23,11 ^e
3	PODRAVKA 95	20,76	22,12	24,29	22,39 ^h
4	IKA	21,51	22,63	25,06	23,06 ^e
5	ANICA	20,97	21,97	24,57	22,50 ^h
6	JULIJANA	21,31	23,80	25,72	23,61 ^c
7	ZORA	21,47	23,15	24,43	23,01 ^{ef}
8	VITA	21,41	22,54	25,19	23,05 ^e
9	KORANA	21,01	22,97	23,71	22,56 ^h
10	LUCIJA	21,71	24,00	25,38	23,69 ^{bc}
11	TOMA	20,39	21,73	24,14	22,09 ⁱ
12	TENA	21,27	23,09	25,45	23,27 ^d
13	SANDA	20,33	22,31	23,79	22,15 ⁱ
14	MARA	21,70	22,98	25,39	23,36 ^d
15	SEKA	21,03	22,56	25,66	23,08 ^e
16	SARA	21,17	22,75	25,14	23,02 ^{ef}
17	EMA	20,61	22,81	25,13	22,85 ^{fg}
18	SONJA	20,78	22,83	24,55	22,72 ^g
19	OS-60-06	21,60	23,14	25,04	23,26 ^d
20	GORDANA	21,91	22,93	25,43	23,42 ^d
21	ALISA	21,19	22,69	25,09	22,99 ^{ef}
22	SG-1	22,34	23,58	26,36	24,09 ^a
<i>Srednja vrijednost</i>		21,25 ^c	22,85 ^b	25,06 ^a	23,05
<i>Minimum</i>		20,33	21,73	23,71	22,09
<i>Maksimum</i>		22,34	24,00	26,36	24,09
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		2,35	2,44	2,83	2,26

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod $P = 0,01$
 $LSD_{godina(0,01)} = 0,064$; $LSD_{genotip(0,01)} = 0,172$

Tablica 33. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju palmitinske kiseline (%) u zrnju genotipova soje u Osijeku (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija palmitinske kiseline (%)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	10,59	10,88	11,29	10,92 ^d
2	NADA	10,49	9,87	10,02	10,13 ^o
3	PODRAVKA 95	10,91	10,48	10,71	10,70 ^h
4	IKA	10,74	10,44	10,88	10,69 ^h
5	ANICA	10,00	9,64	10,17	9,94 ^q
6	JULIJANA	11,52	10,97	11,41	11,29 ^a
7	ZORA	10,94	10,49	10,77	10,73 ^g
8	VITA	10,51	11,08	10,79	10,79 ^f
9	KORANA	9,18	9,54	9,21	9,31 ^r
10	LUCIJA	10,97	10,98	11,23	11,06 ^c
11	TOMA	10,24	10,33	10,65	10,41 ^m
12	TENA	10,39	10,35	10,96	10,57 ^{ij}
13	SANDA	9,58	9,84	10,58	9,99 ^p
14	MARA	10,69	10,55	10,38	10,53 ^k
15	SEKA	10,85	10,92	10,79	10,85 ^d
16	SARA	10,77	10,10	10,57	10,48 ^l
17	EMA	10,35	10,41	10,02	10,26 ⁿ
18	SONJA	10,54	10,39	10,76	10,56 ^j
19	OS-60-06	10,96	9,72	10,74	10,47 ^l
20	GORDANA	10,54	10,23	10,62	10,46 ^l
21	ALISA	11,25	11,44	11,14	11,27 ^b
22	SG-1	10,51	10,06	11,19	10,59 ⁱ
<i>Srednja vrijednost</i>		10,57 ^b	10,39 ^c	10,68 ^a	10,55
<i>Minimum</i>		9,18	9,54	9,21	9,31
<i>Maksimum</i>		11,52	11,44	11,41	11,29
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		4,86	4,86	4,69	4,26

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01

LSD_{godina(0,01)} = 0,009; LSD_{genotip(0,01)} = 0,024

Tablica 34. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju stearinske kiseline (%) u zrnju genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija stearinske kiseline (%)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	4,09	4,50	4,44	4,34 ^m
2	NADA	4,25	4,83	6,28	5,12 ^{efg}
3	PODRAVKA 95	4,67	6,34	5,87	5,63 ^{bc}
4	IKA	4,46	5,82	6,29	5,52 ^{bcd}
5	ANICA	4,41	4,95	4,74	4,70 ^{ijkl}
6	JULIJANA	4,41	4,99	5,71	5,03 ^{efgh}
7	ZORA	4,63	5,73	7,02	5,79 ^{ab}
8	VITA	3,67	4,36	5,19	4,41 ^{lm}
9	KORANA	3,45	3,70	4,42	3,86 ⁿ
10	LUCIJA	3,41	3,58	4,19	3,73 ⁿ
11	TOMA	3,92	4,51	5,30	4,58 ^{klm}
12	TENA	4,27	5,39	6,36	5,34 ^{cde}
13	SANDA	3,86	4,47	5,15	4,49 ^{klm}
14	MARA	4,15	4,61	6,34	5,03 ^{fgh}
15	SEKA	4,48	4,63	6,13	5,08 ^{efg}
16	SARA	4,37	5,33	6,24	5,31 ^{def}
17	EMA	4,08	4,77	5,88	4,91 ^{ghi}
18	SONJA	4,29	5,32	6,26	5,29 ^{def}
19	OS-60-06	4,69	6,16	7,22	6,03 ^a
20	GORDANA	4,64	4,76	4,87	4,76 ^{hijk}
21	ALISA	4,27	4,46	6,46	5,06 ^{efgh}
22	SG-1	4,01	5,21	5,23	4,82 ^{ghij}
<i>Srednja vrijednost</i>		4,20 ^c	4,93 ^b	5,71 ^a	4,95
<i>Minimum</i>		3,41	3,58	4,19	3,73
<i>Maksimum</i>		4,69	6,34	7,22	6,03
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		8,75	14,18	14,83	11,61

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01
LSD_{godina(0,01)} = 0,113; LSD_{genotip(0,01)} = 0,306

Tablica 35. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju oleinske kiseline (%) u zrnju genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija oleinske kiseline (%)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	23,68	24,32	25,62	24,54 ^f
2	NADA	20,46	23,33	28,91	24,23 ^{gh}
3	PODRAVKA 95	20,27	26,91	25,84	24,34 ^g
4	IKA	22,38	25,82	27,12	25,11 ^d
5	ANICA	20,99	23,38	22,89	22,42 ^m
6	JULIJANA	21,39	24,82	25,98	24,06 ^{hi}
7	ZORA	22,68	25,97	27,71	25,45 ^c
8	VITA	24,54	24,27	26,44	25,08 ^d
9	KORANA	25,71	24,72	31,71	27,38 ^a
10	LUCIJA	21,38	22,88	27,51	23,92 ^{ij}
11	TOMA	18,76	20,55	24,84	21,38 ^o
12	TENA	19,49	24,30	26,82	23,54 ^k
13	SANDA	19,51	21,45	24,82	21,92 ⁿ
14	MARA	20,76	22,65	28,05	23,82 ^j
15	SEKA	20,66	26,22	26,19	24,36 ^{fg}
16	SARA	21,12	26,30	27,07	24,83 ^e
17	EMA	20,58	23,53	28,04	24,05 ^{hi}
18	SONJA	20,82	24,19	26,39	23,80 ^j
19	OS-60-06	22,26	27,37	27,67	25,77 ^b
20	GORDANA	22,75	22,92	23,64	23,10 ^l
21	ALISA	24,12	22,69	28,58	25,13 ^d
22	SG-1	22,02	28,91	25,92	25,62 ^{bc}
<i>Srednja vrijednost</i>		21,65 ^c	24,43 ^b	26,72 ^a	24,27
<i>Minimum</i>		18,76	20,55	22,89	21,38
<i>Maksimum</i>		25,71	28,91	31,71	27,38
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		8,05	8,19	7,05	5,50

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod $P = 0,01$
 $LSD_{godina(0,01)} = 0,070$; $LSD_{genotip(0,01)} = 0,191$

Tablica 36. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju linolne kiseline (%) u zrnu genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija linolne kiseline (%)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	53,12	52,01	51,67	52,27 ^{ef}
2	NADA	56,03	53,52	48,64	52,73 ^d
3	PODRAVKA 95	55,33	48,32	50,35	51,33 ^{gh}
4	IKA	54,54	50,16	49,50	51,39 ^{gh}
5	ANICA	55,16	52,68	53,94	53,93 ^{bc}
6	JULIJANA	53,23	50,85	49,00	51,03 ^{hi}
7	ZORA	53,87	50,16	48,10	50,71 ^{ij}
8	VITA	52,66	51,72	49,95	51,44 ^g
9	KORANA	53,45	53,86	48,69	52,00 ^f
10	LUCIJA	56,53	55,05	51,39	54,32 ^b
11	TOMA	58,05	55,86	52,42	55,44 ^a
12	TENA	56,10	51,16	49,39	52,23 ^{ef}
13	SANDA	57,20	55,32	49,39	53,97 ^{bc}
14	MARA	55,38	53,80	48,29	52,49 ^{de}
15	SEKA	55,16	47,85	50,29	51,09 ^{ghi}
16	SARA	55,12	48,47	49,69	51,09 ^{ghi}
17	EMA	55,71	53,14	48,89	52,58 ^{de}
18	SONJA	54,73	51,79	49,32	51,95 ^f
19	OS-60-06	53,74	49,18	47,59	50,17 ^{kl}
20	GORDANA	53,75	53,55	53,44	53,58 ^c
21	ALISA	51,42	52,60	46,37	50,13 ^l
22	SG-1	54,38	47,37	49,94	50,56 ^{jk}
<i>Srednja vrijednost</i>		54,76 ^a	51,75 ^b	49,83 ^c	52,11
<i>Minimum</i>		51,42	47,37	46,37	50,13
<i>Maksimum</i>		58,05	55,86	53,94	55,44
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		2,84	4,79	3,67	2,73

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01
LSD_{godina(0,01)} = 0,149; LSD_{genotip(0,01)} = 0,405

Tablica 37. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju linolenske kiseline (%) u zrnju genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija linolenske kiseline (%)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	7,36	7,11	6,32	6,94 ^j
2	NADA	7,76	7,41	4,99	6,72 ^l
3	PODRAVKA 95	7,69	6,68	6,18	6,85 ^k
4	IKA	7,043	6,59	5,10	6,24 ^p
5	ANICA	7,83	7,99	6,98	7,59 ^a
6	JULIJANA	8,17	7,36	6,49	7,34 ^c
7	ZORA	6,93	6,47	5,18	6,19 ^q
8	VITA	7,68	7,31	6,32	7,10 ^{efg}
9	KORANA	7,04	6,94	4,68	6,22 ^{pq}
10	LUCIJA	6,58	6,31	4,41	5,77 ^r
11	TOMA	7,98	7,66	5,68	7,11 ^{ef}
12	TENA	8,73	7,42	5,38	7,17 ^d
13	SANDA	8,65	7,67	6,09	7,47 ^b
14	MARA	7,98	7,33	5,84	7,05 ⁱ
15	SEKA	7,91	6,38	5,52	6,60 ^m
16	SARA	7,62	6,56	5,31	6,49 ⁿ
17	EMA	8,27	7,13	5,39	6,93 ^j
18	SONJA	8,47	6,98	5,93	7,12 ^e
19	OS-60-06	7,23	6,29	5,53	6,35 ^o
20	GORDANA	7,13	7,49	6,57	7,07 ^{hi}
21	ALISA	7,72	7,58	5,98	7,09 ^{fg}
22	SG-1	7,77	7,03	6,44	7,08 ^{gh}
<i>Srednja vrijednost</i>		7,71 ^a	7,08 ^b	5,74 ^c	6,84
<i>Minimum</i>		6,58	6,29	4,41	5,77
<i>Maksimum</i>		8,73	7,99	6,98	7,59
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		7,32	6,98	11,45	6,79

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01

LSD_{godina(0,01)} = 0,009; LSD_{genotip(0,01)} = 0,026

Tablica 38. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju ukupnih saharida (% AST) u zrnju genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija ukupnih saharida (% AST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	6,11	6,40	5,06	5,86 ^{jk}
2	NADA	7,37	7,73	5,14	6,75 ^{ef}
3	PODRAVKA 95	6,85	5,81	5,55	6,07 ^{ij}
4	IKA	6,74	7,23	3,09	5,69 ^k
5	ANICA	6,62	5,51	5,05	5,73 ^k
6	JULIJANA	6,17	6,23	5,48	5,96 ^{jk}
7	ZORA	6,39	7,05	5,58	6,34 ^{ghi}
8	VITA	7,05	7,44	6,06	6,85 ^{de}
9	KORANA	7,12	5,25	7,17	6,51 ^{fgh}
10	LUCIJA	5,56	6,02	6,68	6,09 ^{ij}
11	TOMA	6,64	5,78	8,93	7,12 ^{cd}
12	TENA	6,14	6,06	9,03	7,08 ^{cd}
13	SANDA	6,22	6,61	7,44	6,75 ^{ef}
14	MARA	5,54	5,27	7,43	6,08 ^{ij}
15	SEKA	6,67	7,86	8,20	7,58 ^{ab}
16	SARA	7,07	7,22	7,04	7,11 ^{cd}
17	EMA	7,48	7,50	7,32	7,43 ^{ab}
18	SONJA	7,05	5,72	7,04	6,60 ^{efg}
19	OS-60-06	7,33	7,86	6,74	7,31 ^{bc}
20	GORDANA	6,92	6,56	6,71	6,73 ^{ef}
21	ALISA	6,32	5,63	6,82	6,26 ^{hi}
22	SG-1	6,56	7,68	8,8	7,68 ^a
	<i>Srednja vrijednost</i>	6,63 ^a	6,56 ^a	6,65 ^a	6,62
	<i>Minimum</i>	5,54	5,25	3,09	5,69
	<i>Maksimum</i>	7,48	7,86	9,03	7,68
	<i>Koeficijent varijacije (%)</i>	8,13	13,58	21,83	9,18

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod $P = 0,01$
 $LSD_{\text{godina}(0,01)} = 0,101$; $LSD_{\text{genotip}(0,01)} = 0,273$

Tablica 39. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju ukupnih oligosaharida (% AST) u zrnju genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija ukupnih oligosaharida (% AST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	2,64	2,83	1,84	2,44 ^l
2	NADA	3,32	3,13	1,89	2,78 ^{fg}
3	PODRAVKA 95	3,18	2,63	2,01	2,61 ^{ijk}
4	IKA	2,92	3,18	1,10	2,40 ^l
5	ANICA	3,41	2,76	2,23	2,80 ^{efg}
6	JULIJANA	2,53	2,74	2,19	2,49 ^{kl}
7	ZORA	2,78	3,13	2,00	2,64 ^{hij}
8	VITA	2,89	3,04	2,15	2,69 ^{ghij}
9	KORANA	3,02	2,52	2,85	2,79 ^{efg}
10	LUCIJA	2,47	2,81	2,88	2,72 ^{fghi}
11	TOMA	2,98	2,65	3,40	3,0 ^{cd}
12	TENA	2,72	2,76	3,26	2,91 ^{de}
13	SANDA	3,09	3,32	3,14	3,18 ^b
14	MARA	2,70	2,38	2,64	2,57 ^{jk}
15	SEKA	2,73	3,37	2,81	2,97 ^{cd}
16	SARA	2,88	2,99	2,35	2,74 ^{fgh}
17	EMA	3,18	3,27	2,79	3,08 ^{bc}
18	SONJA	2,88	2,53	2,75	2,72 ^{fghi}
19	OS-60-06	3,25	3,37	2,49	3,04 ^{cd}
20	GORDANA	2,96	2,93	2,57	2,82 ^{ef}
21	ALISA	2,69	2,50	2,56	2,58 ^{jk}
22	SG-1	3,04	3,62	3,54	3,40 ^a
	<i>Srednja vrijednost</i>	2,92 ^a	2,93 ^a	2,52 ^b	2,79
	<i>Minimum</i>	2,47	2,38	1,10	2,40
	<i>Maksimum</i>	3,41	3,62	3,54	3,40
	<i>Koeficijent varijacije (%)</i>	8,64	11,52	22,83	8,94

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01
LSD_{godina(0,01)} = 0,046; LSD_{genotip(0,01)} = 0,126

Tablica 40. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju glukoze (% AST) u zrnu genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija glukoze (% AST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	0,20	0,20	0,22	0,21 ^{ghi}
2	NADA	0,25	0,17	0,23	0,22 ^{efg}
3	PODRAVKA 95	0,20	0,16	0,26	0,21 ^{gh}
4	IKA	0,22	0,23	0,13	0,19 ^{hij}
5	ANICA	0,16	0,13	0,19	0,16 ^k
6	JULIJANA	0,20	0,22	0,23	0,22 ^{fg}
7	ZORA	0,21	0,22	0,28	0,24 ^{de}
8	VITA	0,18	0,26	0,27	0,24 ^{de}
9	KORANA	0,26	0,18	0,29	0,24 ^{cd}
10	LUCIJA	0,12	0,18	0,26	0,19 ^{ij}
11	TOMA	0,28	0,18	0,34	0,26 ^b
12	TENA	0,13	0,17	0,40	0,23 ^{def}
13	SANDA	0,19	0,17	0,19	0,18 ^{jk}
14	MARA	0,15	0,16	0,33	0,21 ^{fg}
15	SEKA	0,30	0,19	0,38	0,29 ^a
16	SARA	0,23	0,23	0,34	0,26 ^b
17	EMA	0,27	0,19	0,32	0,26 ^{bc}
18	SONJA	0,23	0,16	0,33	0,24 ^{cd}
19	OS-60-06	0,25	0,19	0,31	0,25 ^{bcd}
20	GORDANA	0,21	0,13	0,30	0,21 ^{gh}
21	ALISA	0,14	0,19	0,33	0,22 ^{efg}
22	SG-1	0,20	0,19	0,37	0,25 ^{bcd}
<i>Srednja vrijednost</i>		0,21 ^b	0,19 ^c	0,29 ^a	0,23
<i>Minimum</i>		0,12	0,13	0,13	0,16
<i>Maksimum</i>		0,30	0,26	0,40	0,29
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		23,24	17,01	23,69	13,42

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01

LSD_{godina(0,01)} = 0,008; LSD_{genotip(0,01)} = 0,021

Tablica 41. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju fruktoze (% AST) u zrnu genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija fruktoze (% AST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	0,02	0,17	0,19	0,13 ^j
2	NADA	0,04	0,29	0,29	0,21 ^{cd}
3	PODRAVKA 95	0,02	0,20	0,18	0,13 ^{ij}
4	IKA	0,05	0,28	0,18	0,17 ^{ef}
5	ANICA	0,02	0,17	0,13	0,11 ^k
6	JULIJANA	0,05	0,21	0,17	0,14 ^{hi}
7	ZORA	0,05	0,29	0,28	0,21 ^{cd}
8	VITA	0,04	0,22	0,21	0,16 ^{efgh}
9	KORANA	0,05	0,19	0,26	0,17 ^{efg}
10	LUCIJA	0,05	0,20	0,24	0,16 ^{efgh}
11	TOMA	0,02	0,20	0,37	0,20 ^d
12	TENA	0,08	0,20	0,39	0,22 ^c
13	SANDA	0,04	0,18	0,24	0,15 ^{gh}
14	MARA	0,02	0,19	0,31	0,17 ^e
15	SEKA	0,05	0,39	0,40	0,28 ^a
16	SARA	0,07	0,31	0,29	0,22 ^c
17	EMA	0,06	0,25	0,30	0,20 ^d
18	SONJA	0,05	0,21	0,25	0,17 ^{efg}
19	OS-60-06	0,05	0,39	0,30	0,25 ^b
20	GORDANA	0,02	0,18	0,23	0,15 ^{hi}
21	ALISA	0,04	0,18	0,24	0,15 ^{fgh}
22	SG-1	0,01	0,24	0,25	0,17 ^{efg}
<i>Srednja vrijednost</i>		0,04 ^c	0,23 ^b	0,26 ^a	0,18
<i>Minimum</i>		0,01	0,17	0,13	0,11
<i>Maksimum</i>		0,08	0,39	0,40	0,28
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		42,94	28,06	27,32	23,42

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01
LSD_{godina(0,01)} = 0,007; LSD_{genotip(0,01)} = 0,018

Tablica 42. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju saharoze (% AST) u zrnu genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija saharoze (% AST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	3,17	3,08	2,1	2,78 ^{gh}
2	NADA	3,67	3,53	1,86	3,02 ^e
3	PODRAVKA 95	3,35	2,71	2,42	2,83 ^{gh}
4	IKA	3,43	3,37	1,15	2,65 ^{ij}
5	ANICA	2,70	2,35	1,90	2,32 ^k
6	JULIJANA	3,31	2,93	2,10	2,78 ^{gh}
7	ZORA	3,22	3,26	2,06	2,84 ^{gh}
8	VITA	3,86	3,79	2,57	3,41 ^a
9	KORANA	3,67	2,63	2,60	2,97 ^{ef}
10	LUCIJA	2,82	2,74	2,30	2,62 ^j
11	TOMA	3,20	2,64	3,26	3,03 ^e
12	TENA	3,14	2,80	3,29	3,07 ^{de}
13	SANDA	2,79	2,83	2,64	2,75 ^{hi}
14	MARA	2,59	2,40	2,89	2,63 ^j
15	SEKA	3,38	3,77	3,08	3,41 ^a
16	SARA	3,74	3,55	2,81	3,36 ^{ab}
17	EMA	3,83	3,67	2,71	3,40 ^a
18	SONJA	3,81	2,69	2,60	3,03 ^e
19	OS-60-06	3,57	3,77	2,50	3,28 ^{bc}
20	GORDANA	3,65	3,19	2,71	3,18 ^{cd}
21	ALISA	3,39	2,66	2,60	2,88 ^{fg}
22	SG-1	3,23	3,45	3,70	3,46 ^a
<i>Srednja vrijednost</i>		3,34 ^a	3,08 ^b	2,54 ^c	2,99
<i>Minimum</i>		2,59	2,35	1,15	2,32
<i>Maksimum</i>		3,86	3,79	3,70	3,46
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		11,19	15,22	21,90	10,47

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01
LSD_{godina(0,01)} = 0,040; LSD_{genotip(0,01)} = 0,109

Tablica 43. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju rafinoze (% AST) u zrnju genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija rafinoze (% AST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	0,64	0,82	0,51	0,66 ^k
2	NADA	0,81	1,16	0,87	0,94 ^d
3	PODRAVKA 95	0,69	0,92	0,53	0,71 ^{hij}
4	IKA	0,62	1,18	0,47	0,75 ^{fgh}
5	ANICA	0,84	0,82	0,54	0,74 ^{ghij}
6	JULIJANA	0,52	0,99	0,59	0,69 ^{ijk}
7	ZORA	0,58	1,11	0,93	0,87 ^e
8	VITA	0,62	0,89	0,47	0,66 ^k
9	KORANA	0,72	0,61	1,06	0,79 ^f
10	LUCIJA	0,35	0,75	0,97	0,69 ^{jk}
11	TOMA	0,70	0,79	1,52	1,01 ^{bc}
12	TENA	0,55	0,98	1,39	0,97 ^{cd}
13	SANDA	0,67	1,13	1,13	0,98 ^{cd}
14	MARA	0,52	0,62	1,07	0,74 ^{ghij}
15	SEKA	0,63	1,39	1,28	1,10 ^a
16	SARA	0,68	1,09	1,04	0,94 ^d
17	EMA	0,65	1,23	1,22	1,03 ^b
18	SONJA	0,66	0,88	1,04	0,86 ^e
19	OS-60-06	0,79	1,39	1,09	1,09 ^a
20	GORDANA	0,67	0,89	0,69	0,75 ^{fghi}
21	ALISA	0,63	0,71	1,01	0,78 ^{fg}
22	SG-1	0,67	1,32	0,92	0,97 ^{cd}
<i>Srednja vrijednost</i>		0,65 ^c	0,98 ^a	0,93 ^b	0,85
<i>Minimum</i>		0,35	0,61	0,47	0,66
<i>Maksimum</i>		0,84	1,39	1,52	1,10
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		16,29	23,65	33,36	16,93

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod $P = 0,01$
 $LSD_{godina(0,01)} = 0,019$; $LSD_{genotip(0,01)} = 0,052$

Tablica 44. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za koncentraciju stahioze (% AST) u zrnu genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Koncentracija stahioze (% AST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	1,99	2,01	1,34	1,78 ^{jk}
2	NADA	2,49	1,94	1,01	1,81 ^{hij}
3	PODRAVKA 95	2,49	1,69	1,48	1,89 ^g
4	IKA	2,31	1,99	0,63	1,64 ^l
5	ANICA	2,56	1,92	1,69	2,06 ^c
6	JULIJANA	2,01	1,73	1,58	1,78 ^{jk}
7	ZORA	2,19	2,02	1,05	1,76 ^k
8	VITA	2,27	2,14	1,69	2,03 ^{cd}
9	KORANA	2,30	1,91	1,76	1,99 ^e
10	LUCIJA	2,12	2,06	1,89	2,03 ^{cde}
11	TOMA	2,28	1,85	1,87	2,00 ^{de}
12	TENA	2,17	1,76	1,87	1,94 ^f
13	SANDA	2,42	2,18	1,99	2,19 ^b
14	MARA	2,19	1,75	1,55	1,83 ^{hi}
15	SEKA	2,09	1,96	1,49	1,85 ^{gh}
16	SARA	2,19	1,88	1,28	1,78 ^{jk}
17	EMA	2,54	2,03	1,53	2,03 ^{cd}
18	SONJA	2,21	1,63	1,69	1,85 ^h
19	OS-60-06	2,46	1,96	1,38	1,93 ^f
20	GORDANA	2,29	2,03	1,88	2,07 ^c
21	ALISA	2,06	1,79	1,54	1,79 ^{ij}
22	SG-1	2,37	2,28	2,58	2,41 ^a
<i>Srednja vrijednost</i>		2,27 ^a	1,93 ^b	1,58 ^c	1,93
<i>Minimum</i>		1,99	1,63	0,63	1,64
<i>Maksimum</i>		2,56	2,28	2,58	2,41
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		7,44	8,42	25,13	8,85

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod $P = 0,01$
 $LSD_{godina(0,01)} = 0,015$; $LSD_{genotip(0,01)} = 0,040$

Tablica 45. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za sadržaj ukupnih izoflavona (mg/100 g ST) u zrnu genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Sadržaj ukupnih izoflavona (mg/100 g ST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	152,87	232,49	164,89	183,41 ^{cd}
2	NADA	163,53	133,23	143,63	146,80 ^{gh}
3	PODRAVKA 95	199,74	117,27	188,96	168,66 ^e
4	IKA	230,47	91,97	124,05	148,83 ^g
5	ANICA	116,30	148,39	144,05	136,25 ^j
6	JULIJANA	150,24	130,71	144,76	141,90 ^{hi}
7	ZORA	191,21	119,33	128,11	146,22 ^{gh}
8	VITA	171,76	212,30	156,91	180,32 ^d
9	KORANA	286,65	498,01	73,92	286,20 ^a
10	LUCIJA	372,48	254,80	153,18	260,16 ^b
11	TOMA	166,61	189,96	90,12	148,89 ^g
12	TENA	155,09	113,19	142,46	136,91 ^{ij}
13	SANDA	160,59	156,79	92,37	136,59 ^j
14	MARA	196,95	214,10	103,10	171,39 ^e
15	SEKA	237,49	125,42	149,25	170,72 ^e
16	SARA	187,98	151,82	139,83	159,88 ^f
17	EMA	204,32	180,40	100,30	161,68 ^f
18	SONJA	187,80	129,13	120,43	145,79 ^{gh}
19	OS-60-06	177,66	134,53	77,63	129,94 ^k
20	GORDANA	142,78	109,45	192,61	148,28 ^g
21	ALISA	247,66	239,25	76,60	187,83 ^c
22	SG-1	143,29	124,82	104,06	124,06 ^l
<i>Srednja vrijednost</i>		192,89 ^a	173,06 ^b	127,78 ^c	164,58
<i>Minimum</i>		116,30	91,97	73,92	124,06
<i>Maksimum</i>		372,48	498,01	192,61	286,20
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		29,21	49,91	27,08	23,97

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01

LSD_{godina(0,01)} = 1,915; LSD_{genotip(0,01)} = 5,185

Tablica 46. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za sadržaj daidzeina (mg/100 g ST) u zrnu genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Sadržaj daidzeina u zrnu (mg/100 g ST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	51,97	90,89	66,78	69,88 ^a
2	NADA	53,94	39,81	33,08	42,28 ^h
3	PODRAVKA 95	57,93	42,57	39,89	46,79 ^{fg}
4	IKA	69,35	28,09	30,63	42,69 ^h
5	ANICA	42,14	41,96	50,88	44,99 ^g
6	JULIJANA	53,95	39,85	47,72	47,17 ^f
7	ZORA	54,66	36,61	35,50	42,26 ^h
8	VITA	55,57	85,56	59,03	66,72 ^b
9	KORANA	87,29	105,36	11,58	68,08 ^{ab}
10	LUCIJA	97,99	42,32	39,86	60,06 ^c
11	TOMA	63,51	91,33	12,93	55,93 ^d
12	TENA	46,69	43,08	29,31	39,69 ^{ij}
13	SANDA	42,60	47,65	19,88	36,71 ^k
14	MARA	60,27	71,04	23,53	51,62 ^e
15	SEKA	80,22	43,63	31,64	51,83 ^e
16	SARA	49,00	48,26	25,23	40,83 ^{hi}
17	EMA	51,04	63,36	20,67	45,02 ^g
18	SONJA	53,32	47,88	37,26	46,15 ^{fg}
19	OS-60-06	53,24	43,02	11,76	36,01 ^k
20	GORDANA	45,14	54,55	76,29	58,66 ^c
21	ALISA	78,07	63,46	13,93	51,82 ^e
22	SG-1	43,48	24,14	48,69	38,77 ^j
<i>Srednja vrijednost</i>		58,70 ^a	54,29 ^b	34,82 ^c	49,27
<i>Minimum</i>		42,14	24,14	11,58	36,01
<i>Maksimum</i>		97,99	105,36	76,29	69,88
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		25,65	40,18	51,27	20,56

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod $P = 0,01$
 $LSD_{godina(0,01)} = 0,717$; $LSD_{genotip(0,01)} = 1,942$

Tablica 47. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za sadržaj gliciteina (mg/100 g ST) u zrnu genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Sadržaj gliciteina u zrnu (mg/100 g ST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	17,85	26,74	39,28	27,95 ^b
2	NADA	21,52	20,02	19,23	20,26 ^{gh}
3	PODRAVKA 95	15,91	10,39	46,29	24,20 ^{cd}
4	IKA	19,85	13,97	16,68	16,83 ^{ij}
5	ANICA	18,81	20,12	32,52	23,82 ^{cde}
6	JULIJANA	25,41	31,97	19,12	25,50 ^c
7	ZORA	20,77	17,19	12,88	16,95 ^{ij}
8	VITA	15,22	14,52	32,55	20,77 ^{fg}
9	KORANA	11,27	40,22	16,84	22,77 ^{def}
10	LUCIJA	30,87	26,66	19,70	25,74 ^c
11	TOMA	13,39	15,17	18,07	15,54 ^j
12	TENA	10,14	18,55	11,55	13,41 ^k
13	SANDA	23,81	25,84	15,54	21,73 ^{fg}
14	MARA	20,77	23,04	24,32	22,71 ^{def}
15	SEKA	19,39	14,52	14,58	16,16 ^j
16	SARA	17,26	20,32	14,95	17,51 ^{ij}
17	EMA	26,68	22,01	19,60	22,77 ^{def}
18	SONJA	25,18	16,80	13,78	18,58 ^{ghi}
19	OS-60-06	17,16	17,94	15,71	16,93 ^{ij}
20	GORDANA	18,47	8,76	38,61	21,95 ^{efg}
21	ALISA	13,82	23,34	11,54	16,23 ^j
22	SG-1	29,55	46,29	18,43	31,42 ^a
<i>Srednja vrijednost</i>		19,69 ^b	21,56 ^a	21,44 ^a	20,90
<i>Minimum</i>		10,14	8,76	11,54	13,41
<i>Maksimum</i>		30,87	46,29	46,29	31,42
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		28,15	41,74	46,08	21,67

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01

LSD_{godina(0,01)} = 0,744; LSD_{genotip(0,01)} = 2,015

Tablica 48. Srednje vrijednosti i mjere varijacije za sadržaj genisteina (mg/100 g ST) u zrnu genotipova soje (2010.-2012.).

Oznaka	Genotip	Sadržaj genisteina u zrnu (mg/100 g ST)			Srednja vrijednost
		2010.	2011.	2012.	
1	LIKA	83,05	114,86	58,83	85,58 ^{ij}
2	NADA	88,06	73,40	91,32	84,26 ^{ik}
3	PODRAVKA 95	125,90	64,31	102,79	97,67 ^{ef}
4	IKA	141,27	49,91	76,73	89,30 ^{hi}
5	ANICA	55,35	86,32	60,65	67,44 ^m
6	JULIJANA	70,89	58,88	77,92	69,23 ^m
7	ZORA	115,78	65,53	79,72	87,01 ^{ij}
8	VITA	100,97	112,21	65,33	92,84 ^{gh}
9	KORANA	188,09	352,43	45,50	195,34 ^a
10	LUCIJA	243,62	185,82	93,62	174,35 ^b
11	TOMA	89,71	83,46	59,11	77,43 ^l
12	TENA	98,25	51,56	101,60	83,80 ^{ik}
13	SANDA	94,19	83,31	56,96	78,15 ^l
14	MARA	115,91	120,02	55,25	97,06 ^f
15	SEKA	137,89	67,27	103,03	102,73 ^d
16	SARA	121,73	83,24	99,65	101,54 ^{de}
17	EMA	126,61	95,03	60,03	93,89 ^{fg}
18	SONJA	109,31	64,46	69,40	81,06 ^{kl}
19	OS-60-06	107,27	73,57	50,16	77,00 ^l
20	GORDANA	79,17	46,14	77,70	67,67 ^m
21	ALISA	155,76	152,44	51,13	119,78 ^c
22	SG-1	70,27	54,39	36,93	53,86 ⁿ
<i>Srednja vrijednost</i>		114,50 ^a	97,21 ^b	71,52 ^c	94,41
<i>Minimum</i>		55,35	46,14	36,93	53,86
<i>Maksimum</i>		243,62	352,43	103,03	195,34
<i>Koeficijent varijacije (%)</i>		36,77	68,54	28,21	34,66

Vrijednosti iza kojih slijede različita slova statistički su značajno različite kod P = 0,01

LSD_{godina(0,01)} = 1,547; LSD_{genotip(0,01)} = 4,189

Prilog 3

Mikrosatelitni profili 22 genotipa soje izraženi u parovima baza. Stranica 139.

Tablica 49. Mikrosatelitni profili 22 genotipa soje izraženi u parovima baza.

r.br.	Genotip	Satt251	Satt571	Satt273	Satt277	Satt313	Satt499	Satt278	Satt364	Satt186	Sat040
1	Lika	204	278	255	266	306	288	537	324	494	457
2	Nada	200	253	275	185	299	298	163	338	500	454
3	Podravka 95	200	244	271	243	302	296	149	338	500	457
4	Ika	198	222	266	185	302	282	544	423	496	452
5	Anica	211	144	267	186	310	293	549	331	489	471
6	Julijana	204	123	260	266	327	289	556	324	494	457
7	Zora	200	123	267	266	310	296	554	338	500	457
8	Vita	307	146	269	268	302	296	563	425	403	457
9	Korana	321	153	282	499	314	310	561	141	-	459
10	Lucija	317	149	287	494	312	305	533	148	-	455
11	Toma	317	131	267	274	204	315	561	338	409	452
12	Tena	317	131	276	274	206	321	563	338	403	452
13	Sanda	307	156	276	268	216	296	563	425	403	452
14	Mara	300	131	284	276	212	308	563	574	412	473
15	Seka	306	229	263	276	206	262	459	574	412	477
16	Sara	308	139	267	276	208	283	445	423	412	473
17	Ema	311	156	260	272	208	277	447	427	409	484
18	Sonja	311	136	268	272	214	262	447	423	424	480
19	OS-60-06	311	229	263	276	206	262	445	417	424	482
20	Gordana	322	260	257	339	206	294	439	-	433	491
21	Alisa	325	234	272	279	208	289	-	420	396	498
22	SG-1	-	-	278	-	222	-	-	-	-	498

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 21. prosinca 1981. godine u Osijeku. Osnovnu školu te dvojezičnu mađarsko-englesku gimnaziju završila sam u Pečuhu, Mađarska. Diplomski studij na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku upisala sam 2001. godine. Diplomski rad pod mentorstvom prof.dr.sc. Jasenke Ćosić, s temom „Patogenost *Fusarium* vrsta za klijance kukuruza“ obranila sam 2008. godine te stekla zvanje diplomiranog inženjera poljoprivrede ratarskog smjera. Radno iskustvo sam počela stjecati 01. 04. 2009. na Odjelu za genetiku i oplemenjivanje industrijskog bilja Poljoprivrednog instituta Osijek u svojstvu znanstvene novakinje u suradničkom zvanju na radnom mjestu asistentice. Isto je planirano i odobreno programom rada znanstvenog projekta broj 073-0730489-0344 pod nazivom „Kontinuirano genetsko unapređenje soje suvremenim metodama oplemenjivanja“, čiji je nositelj dr.sc. Aleksandra Sudarić. Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij „Poljoprivredne znanosti“, smjer „Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo“ upisala sam 2009./2010. na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. Tijekom svog dosadašnjeg rada u svojstvu znanstvene novakinje sudjelovala sam na radionici pod naslovom „Capacity building of regulatory agencies for handling and monitoring genetically modified crops, products and processed food“ (Osijek, 2009.), organizirane od strane Zavoda za sjemenarstvo i rasadničarstvo, Međunarodne organizacije za ispitivanje kvalitete sjemena (ISTA), Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo i Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (FAO), te na radionici „Advancements in Plant Breeding, Trial Design and Analysis“ (Novi Sad, Srbija, 2016.) u organizaciji UC Davis Akademije za oplemenjivanje bilja (UC Davis Plant Breeding Academy) i Instituta za ratarstvo i povrtarstvo iz Novog Sada, Srbija. Također, aktivno sam učestvovala na 5 međunarodnih znanstvenih skupova, te bila član organizacijskog odbora međunarodnog skupa EUCARPIA XXII (Opatija, 2011.). Sudjelovala sam u popularizaciji znanosti kroz organizaciju radionica te u terenskim vježbama sa studentima. Aktivno sam uključena u europsku mrežu provedbe programa Danube Soybean i član sam Hrvatskog genetičkog društva.

Kao koautor ili autor objavila sam slijedeće radove i sažetke:

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. Ćosić, J., Sudarić, A., Vrandečić, K., Matoša Kočar, M., Duvnjak, T. (2016.): First report of soybean Fusarium wilt caused by *Fusarium graminearum* in Croatia. Plant disease 100 (3), 648.

2. Ćosić, J., Sudarić, A., Vrandečić, K., Matoša Kočar, M., Duvnjak, T. (2016.): First report of soybean Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* in Croatia. Plant disease, DOI: 10.1094/PDIS-05-16-0665-PDN

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

1. Kovačević, J., Mazur, M., Lalić, A., Josipović, M., Josipović, A., Matoša Kočar, M., Marković, M., Antunović, J., Cesar, V. (2015.): Photosynthetic performance index in early stage of growth, water use efficiency, and grain yield of winter barley cultivars. Chilean Journal of Agricultural Research 75 (3), 275-283.

2. Sudarić, A., Vratarić, M., Mladenović-Drinić, S., Matoša, M. (2010.): Biotechnology in soybean breeding. Genetika 42 (1), 91-102.

3. Sudarić A., Vratarić, M., Volenik, M., Matoša, M., Duvnjak, V. (2009.): Heterozis i heterobeltiozis za komponente uroda zrna soje. Poljoprivreda 15 (2), 26-31.

Ostali radovi u drugim časopisima:

1. Ćosić, J., Sudarić, A., Vrandečić, K., Matoša Kočar, M., Ilić, J., Duvnjak, T. (2016.): Fuzarijsko venuće soje u Slavoniji. Glasilo biljne zaštite 16, 60-61.

2. Markulj, A., Liović, I., Mijić, A., Sudarić, A., Josipović, A., Matoša Kočar, M. (2014.): Zašto proizvoditi suncokret? Agronomski glasnik 76 (3), 163-176.

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom:

1. Josipović, A., Sudarić, A., Lončarić, Z., Kovačević, J., Matoša Kočar, M., Markulj, A., Jurković, V. (2014.): Photosynthetic efficiency of soybean on cadmium contaminated soil. 7th international scientific/professional conference "Agriculture in nature and environment protection" Vukovar, Proceedings and abstracts, 201-205.
2. Markulj, A., Viljevac Vuletić, M., Kovačević, J., Josipović, A., Liović, I., Mijić, A., Sudarić, A., Matoša Kočar, M. (2014.): Water deficiency effects on photosynthetic performance in leaves of sunflower plants at developmental stage of butonisation. 7th international scientific/professional conference "Agriculture in nature and environment protection" Vukovar. Proceedings and abstracts, 191-195.
3. Matoša Kočar, M., Sudarić, A., Josipović, A., Markulj, A., Mazur, M. (2014.): Effect of beneficial microorganism technology and genotype interaction on soybean seed quality. 7th international scientific/professional conference "Agriculture in nature and environment protection" Vukovar. Proceedings and abstracts, 196-200.
4. Matoša, M., Sudarić, A., Vratarić, M., Volenik, M., Redžepović, S. (2010.): Simbiozna fiksacija dušika - alternativa održivog uzgoja soje. 3rd International scientific/professional conference "Agriculture in nature and environmental protection" Vukovar. Proceedings and abstracts, 145-150.
5. Ćosić, J., Jajić, I., Jurković, D., Vrandečić, K., Velić, N., Matoša, M. (2007.): Ability of *Fusarium graminearum* isolates to produce deoxynivalenol. Proceedings of 4th International Congress Flour-Bread 2007, 266-269.
6. Sudarić, A., Vratarić, M., Matoša, M., Duvnjak, T., Volenik, M. (2012.): Genetski napredak u kakvoći zrna OS-linija soje. Zbornik radova 47. hrvatskog i 7. međunarodnog simpozija agronoma, 340-343.
7. Sudarić, A., Vratarić, M., Matoša, M., Duvnjak, T., Redžepović, S., Sikora, S. (2010.): Učinkak biološke fiksacije dušika na urod i kakvoću zrna različitih genotipova soje. Zbornik radova 45. hrvatskog i 5. međunarodnog simpozija agronoma, 514-518.

Sažeci u zbornicima skupova:

1. Sudarić, A., Duvnjak, T., Matoša Kočar, M., Josipović, A., Jurić, M. (2016.): Stričkov šarenjak i crveni pauk - dominantni štetnici na soji u Slavoniji u 2015. godini. Glasilo biljne zaštite, 48-48.

2. Josipović, A., Sudarić, A., Lončarić, Z., Matoša Kočar, M., Markulj, A., Kovačević, J. (2014.): Cadmium contamination effect on parameters of photosynthetic efficiency in soybean. V Congress of the Serbian Genetic Society. Vasiljević, B., Mladenović Drinić, S., (ur.), Akademska izdanja, Beograd, 293-293.

3. Markulj, A., Viljevac Vuletić, M., Josipović, A., Kovačević, J., Mijić, A., Liović, I., Sudarić, A., Matoša Kočar, M. (2014.): Effect of different soil water content on photosynthetic efficiency and leaf temperature in sunflower. V Congress of the Serbian Genetic Society. Vasiljević, B., Mladenović Drinić, S., (ur.), Akademska izdanja, Beograd, 297-297.

4. Matoša Kočar, M., Sudarić, A., Josipović, A., Markulj, A., Jurković, V. (2014.): Fatty acid composition of oil in eight early maturing soybean genotypes. V Congress of the Serbian Genetic Society. Vasiljević, B., Mladenović Drinić, S., (ur.), Akademska izdanja, Beograd, 299-299.

5. Sudarić, A., Duvnjak, T., Matoša Kočar, M., Mijić, A., Andrić, L. (2014.): Dostignuća u oplemenjivanju soje u Poljoprivrednom institutu Osijek. Zbornik sažetaka, Matotan, Z., Haramija, J. (ur.), Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb, 62-63

6. Sudar, R., Sudarić, A., Jurković, V., Josipović, A., Matoša Kočar, M. (2014.): Ukupni polifenoli i ukupni flavonoidi u OS linijama soje. Zbornik sažetaka 49. hrvatskog i 9. međunarodnog simpozija agronoma, Marić, S., Lončarić, Z. (ur.), Poljoprivredni fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, 86-87.

7. Sudarić, A., Vratarić, M., Matoša, M. (2011.): Genetski napredak soje potpomognut molekularnim markerima. Zbornik apstrakata IV Simpozijuma sekcije za oplemenjivanje

organizama Društva genetičara Srbije, Berenji, J., Mladenović Drinić, S., Konstantinov, K. (ur.), Društvo genetičara Srbije, Beograd, 50-50.

8. Majić, I., Marija, I., Raspudić, E., Vratarić, M., Sudarić, A., Brmež, M., Sarajlić, A., Matoša, M. (2010.): Pojava stjenica na soji u Osijeku. Glasilo biljne zaštite, Sažeci 54. seminar biljne zaštite, Cvjetković, B. (ur.), Hrvatsko društvo biljne zaštite, Zagreb, 51.