

ARLINDO INÊS TEIXEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ENZIMÁTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE SACAROSE E CORRELAÇÕES ENTRE O
CONTEÚDO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E PROTEÍNA EM SOJA**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

Viçosa
Minas Gerais - Brasil
Abril - 2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

Teixeira, Arlindo Inês, 1978-

T266d

Desenvolvimento de método enzimático para determi-

2008

nação de sacarose e correlações entre conteúdo de

açúcares solúveis e proteína em soja / Arlindo Inês

Teixeira.

– Viçosa, MG, 2008.

xi, 79f.: il. ; 29cm.

Orientador: Maurílio Alves Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Sacarose. 2. Química analítica quantitativa.

3. Açúcares (Química orgânica). 4. Soja - Teor de

sacarose. 5. Soja - Teor de açúcares solúveis. 6. Soja -

Teor de proteína. I. Universidade Federal de Viçosa.

II.Título.

CDD 22.ed. 547.78

ARLINDO INÊS TEIXEIRA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE SACAROSE E CORRELAÇÕES ENTRE O CONTEÚDO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E PROTEÍNA EM SOJA

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 03 de Abril de 2008

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Prof. Sebastião Tavares de Rezende
(Conselheiro)

Prof. Taís Cristina Bastos Soares

Prof. Adésio Ferreira

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Orientador)

Aos meus pais, Geraldo e Geralda,
Aos meus filhos Diogo, Bernardo, Saullo e Sophia,
À minha esposa Michele,
A todos aqueles que lutam por um mundo mais justo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade da realização do Curso de Doutorado em Bioquímica Agrícola.

Ao Professor Maurílio Alves Moreira, pela orientação, pelos ensinamentos, pela amizade e pela confiança depositada, que foram decisivos na minha formação profissional.

Aos Professores Everaldo Gonçalves de Barros e Sebastião Tavares de Rezende, pelo aconselhamento, amizade, críticas e ensinamentos que muito contribuíram para a realização desta tese.

À Professora Taís Cristina Bastos Soares e ao Professor Adésio Ferreira pelas críticas e valiosas sugestões, que possibilitaram o aprimoramento desta pesquisa.

Ao Técnico Newton Denis Piovesan, pela amizade, pelo apoio e pelas críticas e sugestões, fundamentais na realização deste trabalho.

Ao grande amigo e estudante de doutorado Pedro Ivo Vieira Good-God, pela ajuda e pelas conversas tão produtivas que tivemos ao longo de todo o desenvolvimento do trabalho

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela convivência e ensinamentos que muito contribuíram na minha formação acadêmica e profissional.

Aos colegas de curso, de laboratório e a todos os funcionários do BIOAGRO e do Departamento de Bioquímica e Biologia molecular, pela agradável convivência, pelo auxílio e pela amizade, que foram fundamentais na realização deste trabalho.

BIOAGRAFIA

Arlindo Inês Teixeira, filho de Geraldo Bertoldo Teixeira e Geralda Pantaleão Teixeira, nasceu no dia 21 de janeiro de 1978, em Guaraciaba, MG.

Em Dezembro de 1995 adquiriu formação em Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Rio Pomba, Rio Pomba, MG.

Em março de 1997 ingressou no curso de Química da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, graduando-se em julho de 2001.

Em agosto de 2001 ingressou no Programa de Mestrado em Bioquímica Agrícola nessa mesma instituição, defendendo tese em 31 de julho de 2003.

Em agosto de 2003 ingressou no Programa de Doutorado em Bioquímica Agrícola nessa mesma instituição, defendendo tese em 03 de julho de 2008.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	9
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. Carboidratos presentes na soja	18
2.2. Proteínas de Reserva da Soja	21
2.3. Correlações entre teores de sacarose, açúcares totais e proteína em soja	24
2.4. Herança, modo de ação gênica e herdabilidade dos teores de proteína e sacarose em soja	26
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE SACAROSE EM GRÃOS DE SOJA	37
RESUMO	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1. Material genético e reagentes	41
2.2. Extração de carboidratos	41
2.3. Quantificação de sacarose pelo método GOD/invertase	42
2.4. Quantificação de sacarose pelo método enzimático de STITT	42
2.5. Quantificação de sacarose por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	43
2.6. Correlações entre as metodologias	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45

4. CONCLUSÕES.....	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO 2: CORRELAÇÕES ENTRE OS CONTEÚDOS DE PROTEÍNA	
TOTAL, SACAROSE, RAFINOSE E ESTAQUIOSE EM SOJA	53
RESUMO	54
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1. Material genético	59
2.2. Análise da concentração de proteína total	60
2.3. Análise da concentração de açúcares solúveis totais	60
2.4. Análise da concentração de sacarose pelo método GOD/invertase	61
2.5. Determinação do peso de 100 sementes	62
2.6. Análises Genético Estatísticas	62
2.6.1. Estimativa da herdabilidade das características avaliadas	62
2.6.2. Estimativa das correlações fenotípicas das características avaliadas ..	63
2.7. Testes de normalidade	63
2.7.1. Teste de assimetria	63
2.7.2. Teste de curtose	64
2.7.3. Teste de Lilliefors	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.1. Concentração de proteína total	67
3.2. Concentração de açúcares solúveis totais	68
3.3. Concentração de sacarose pelo método GOD/invertase	71
3.4. Análise do peso de 100 sementes	72
3.5. Herdabilidades	74
3.6. Correlações fenotípicas	78
3.7. Testes de normalidade	83
4. CONCLUSÕES.....	85
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

RESUMO

TEIXEIRA, Arlindo Inês, D.S. Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2008.

Desenvolvimento de método enzimático para determinação de sacarose e correlações entre o conteúdo de açúcares solúveis e proteína em soja.

Orientador: Maurílio Alves Moreira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Sebastião Tavares de Rezende.

O conteúdo de sacarose no grão de soja é uma das mais importantes características responsáveis pela melhoria da qualidade, principalmente no que tange ao sabor e ao aroma, sendo um fator crítico na elaboração de produtos a base de soja. Os objetivos deste trabalho foram em primeiro lugar desenvolver uma metodologia espectrofotométrica, simples e de baixo custo, para quantificação de sacarose em grãos de soja. Em seguida, selecionar progenitores contendo alto teor de sacarose e analisar os teores de sacarose, rafinose, estaquiase, açúcares solúveis totais e proteínas totais numa população derivada dos progenitores selecionados, estimando-se ao final as correlações entre estas características. Para desenvolver a metodologia combinou-se a ação da enzima glicose-oxidase, largamente usada na quantificação de glicose, com a invertase, uma enzima hidrolítica que cliva a ligação glicosídica da sacarose formando frutose e glicose. Adaptou-se ainda este sistema para placas de ELISA, possibilitando análises em larga escala a um baixo custo, com grande potencial de aplicação em análises de rotina no melhoramento da soja. Para validar esta nova metodologia, quantificou-se também o teor de sacarose no grão de 14 genótipos de soja por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por um método enzimático já devidamente validado, calculando ao final o coeficiente de correlação entre as metodologias. Estas correlações foram altamente significativas, principalmente entre a quantificação por CLAE e a metodologia por nós desenvolvida ($r=0,9766$), demonstrando ser esta eficiente na quantificação de sacarose. Dando seqüência ao trabalho, uma população composta de 119 progênies $F_{2:3}$ derivadas do cruzamento entre a linhagem CD2013PTWA4-1-1, derivada de uma variedade que possui alto

teor de sacarose, com a isolinha CD2013PTA106B-4, derivada de uma linhagem que possui alto teor de proteína, constituíram o material genético utilizado neste trabalho. Este material, juntamente com os progenitores, foi analisado para as características: concentração de sacarose, analisada por CLAE e pelo método GOD/invertase, concentração de rafinose, estaquiase, açúcares solúveis totais, proteína total e peso de 100 sementes. Foram realizados testes de normalidade para cada característica bem como se determinou as herdabilidades de cada uma e as correlações fenotípicas entre elas. As herdabilidades no sentido amplo das características concentração de sacarose, rafinose, açúcares solúveis totais e proteína foram altas, significando que a maior parte da variação observada nessas características é devida a causas genéticas. As concentrações de sacarose determinadas por CLAE e pelo método GOD/invertase apresentaram coeficientes de correlação de Pearson e Spearman relativamente altos, evidenciando a aplicabilidade do método enzimático desenvolvido. A concentração de sacarose determinada por CLAE apresentou altos e positivos coeficientes de correlação com as concentrações de rafinose, estaquiase e açúcares solúveis totais, indicando a impossibilidade de se fazer seleção indireta de indivíduos com baixos teores de rafinose e estaquiase nesta população. A concentração de sacarose determinada por CLAE correlacionou negativamente com a concentração de proteínas totais, indicando a impossibilidade de se fazer seleção direta de indivíduos contendo altos teores de ambas as características. A correlação entre as concentrações de rafinose e estaquiase com a concentração de proteína foi não significativa. A correlação entre a concentração de sacarose determinada por CLAE com o peso de 100 sementes não foi significativa. O mesmo comportamento foi observado para as concentrações de rafinose, estaquiase e açúcares solúveis totais. As correlações entre a concentração de sacarose determinadas pelo método GOD/invertase com as demais características foram menores do que aquelas encontradas entre a concentração de sacarose determinadas por CLAE com as outras características. Uma possível explicação pode estar no fato da correlação entre as duas metodologias não ter sido tão alta (54,8%). Isso sugere a necessidade de análises semelhantes em outras populações para aumentar a abrangência desses resultados. Apenas a concentração de estaquiase, pelo teste de Lilliefors, e a concentração de proteína, pelo teste de curtose, foram não significativos, evidenciando uma distribuição aproximadamente normal. As demais características não apresentaram esta distribuição.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Arlindo Inês, D.S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2008.

Development of enzymatic method to quantify sucrose and correlations between the total soluble sugar and protein in soybean. Adviser: Maurilio Alves Moreira. Committee members: Everaldo Gonçalves de Barros and Sebastião Tavares de Rezende.

The sucrose content in the soybean grain is one of the most important characteristics that accounts for quality improvement, especially concerning flavor and aroma, and it is a critical factor in elaborating soy-based products. The objectives of this study were first to develop a simple and cheap spectrophotometric methodology to quantify sucrose in soybean grains. Next, parents were selected with high sucrose contents and analyze the sucrose, raphinose and stachyose contents, total soluble sugars and total proteins in a population derived from the selected parents, and the correlation among these characteristics was estimated at the end. To develop the methodology, the action of the glucose-oxidase enzyme, which is widely used in glucose quantification, was combined with invertase, a hydrolytic enzyme that cleaves the sucrose glycosidic link forming fructose and glucose. This system was adapted for Elisa plates, that permitted low cost, large scale analyses, with great potential for application in routine analyses in soybean breeding. To validate this new methodology, the sucrose content was also quantified in the grain of 14 soybean genotypes by high performance liquid chromatography (HPLC) and by an enzymatic method already validated, and the correlation coefficient between the methodologies was calculated at the end. These correlations were highly significant, especially between the HPLC quantification and the methodology we developed ($r=0.9766$), showing that this was efficient in quantifying sucrose. To continue the

study, the genetic material used consisted of a population of 19 $F_{2:3}$ progenies derived from the cross between the CD2013PTWA4-1-1 line, derived from a variety with high sucrose contents, with the CD2013PTA106B-4 isoline that is derived from a high protein content line. This material, together with the parents, was analyzed for the following characteristics: sucrose concentration, analyzed by HPLC and by the GOD/invertase method, the concentration of raphinose, staquiose, total soluble sugars, total protein and weight of 100 seeds. Normality tests were carried out for each characteristic and the heritability was determined for each one and their phenotypic correlations. The broad sense heritabilities of the characteristics sucrose and raphinose contents, total soluble sugars and protein content were high, meaning that most of the variation observed in these characteristics was due to genetic causes. The sucrose concentrations determined by HPLC and the GOD/invertase methods had relatively high Pearson and Spearman correlation coefficients, showing the applicability of the enzymatic method developed. The sucrose concentration determined by HPLC had high and positive correlation coefficients with the raphinose, staquiose and total soluble sugar concentrations, indicating that indirect selection of individuals with low raphinose and staquiose contents in this population would be impossible. The sucrose concentration determined by HPLC correlated negatively with the total protein concentration, indicating that direct selection could not be made of individuals with high contents of both characteristics. The correlation between the raphinose and staquiose concentrations and the protein concentration was not significant. Correlation between the sucrose concentration determined by HPLC with the weight of 100 seeds was not significant. The same performance was observed for the concentrations of raphinose, staquiose and total soluble sugars. The correlation between the sucrose concentration determined by the GOD/invertase method with the other characteristics were smaller than those determined between the sucrose concentration determined by HPLC with the other characteristics. A possible explanation may be the fact that the correlation between the two methodologies was not very high (54.8%). This suggested the need for similar analyses in other populations to increase the range of these results. Only the estaquiose concentration, by the Lilliefors test, and the protein concentration, by the curtose test, was not significant, showing an approximately normal distribution. The other characteristics did not present this distribution.

1. Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das principais fontes de proteína e óleo vegetal do mundo. Ela tem sido cultivada comercialmente e utilizada na alimentação humana e animal por milênios. O grande interesse mundial pelo cultivo da soja deve-se à excelente combinação que ela apresenta em termos de produtividade (geralmente superior a 2.000 kg/ha) e conteúdos de óleo e proteína, em média, 20 e 40% do peso das sementes, respectivamente (VELLO *et al.*, 1988).

No Brasil, a soja constitui atualmente um dos produtos agrícolas de maior importância econômica, ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país, sendo cultivada em todo território nacional. Na safra 2005/2006 foram produzidos aproximadamente 55 milhões de toneladas de grãos desta cultura, mantendo o país como o segundo maior produtor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos, que naquela safra alcançou uma produção aproximada de 70 milhões de toneladas. Vale ressaltar que, ao contrário dos norte americanos, o Brasil pode expandir grandemente sua produção e que a produtividade alcançada em nossas lavouras já é superior à alcançada nas lavouras dos Estados Unidos (CONAB, 2008).

Todo este sucesso da produção brasileira de soja foi alcançado graças ao importante e constante trabalho de melhoramento da cultura realizado por inúmeros pesquisadores brasileiros das mais diferentes áreas do conhecimento, os quais desenvolveram e continuam desenvolvendo variedades de alta produtividade adaptadas a todas as regiões brasileiras. Assim, técnicas que venham auxiliar na caracterização desses cultivares e direcionar a obtenção de novos, são de fundamental importância para a manutenção deste potencial produtivo nacional.

A soja no Brasil é predominantemente utilizada para o processamento do grão em óleo e farelo. O processamento basicamente consiste no esmagamento do grão para se extrair o óleo, amplamente utilizado pela população brasileira, e o resíduo restante resulta no farelo de soja, um importante suplemento protéico na ração animal, sendo o Brasil, juntamente com os Estados Unidos, os principais fornecedores desta matéria-prima em nível mundial (BORÉM, 1999).

A semente de soja apresenta a seguinte composição média em base seca, segundo os resultados de KAWAMURA (1967): 40,2% de proteína, 21,0% de lipídios, 4,9% de cinzas e 33,9% de carboidratos.

Em virtude de sua composição química, a soja apresenta um alto valor nutricional. Este potencial energético-protéico da soja tem sido explorado pelas indústrias alimentícias, o que tem estimulado o cultivo em larga escala.

Apesar das qualidades nutricionais apresentadas pela soja, o consumo da soja *in natura* é pequeno nos países ocidentais, principalmente no Brasil. Esta baixa aceitação é explicada em razão dos hábitos alimentares dos brasileiros. A soja apresenta um sabor típico, denominado “beany-flavor”, que para muitos é desagradável. Esse sabor está diretamente ligado à presença de substâncias, como aldeídos, que são produzidos durante o processamento do grão. Essas substâncias são derivadas da oxidação do óleo, um processo que é iniciado pela ação de enzimas que estão normalmente presentes no grão, denominadas lipoxigenases (CICEK, 2001).

Outro fator que tem contribuído para a baixa aceitação da soja no consumo humano é a presença nestes de quantidades consideráveis de oligossacarídeos, principalmente a rafinose e a estaquiose. Estes oligossacarídeos não são digeridos no trato digestivo de animais monogástricos, incluindo o homem, sendo responsáveis pela flatulência associada ao consumo de produtos à base de soja. Desta forma, estes oligossacarídeos assumem papel restritivo quanto ao consumo destes grãos como fonte protéica (CICEK, 2001). Devido a este fato, muitos grupos que atuam no melhoramento da soja têm se dedicado a produzir variedades com baixos teores destes açúcares.

Um fato animador é que a procura por produtos a base de soja têm crescido muito nos últimos anos nos países ocidentais, abrindo mercado para produtos a base de soja tradicionalmente usados na alimentação dos povos orientais. Dentre estes podemos citar o extrato hidrosolúvel (leite de soja), e produtos como tofu, miso, natto e soysauce. Esta maior procura se deve principalmente à divulgação de resultados de pesquisas que revelaram os benefícios para a saúde humana e o grande valor nutricional dos grãos desta cultura. Com isto, este mercado, que há alguns anos atrás era ínfimo, vem experimentando um grande crescimento. Apesar da dificuldade em se determinar com precisão a porcentagem de soja destinada ao consumo humano, devido ao fato de um grande número de pequenas empresas

atuarem nesse ramo, acredita-se que por volta de 3% da produção brasileira de soja já esta sendo destinada a esse fim. A poucos anos atrás esta porcentagem não chegava a 1% (EMBRAPA, 2008).

Contudo, as variedades comerciais brasileiras mais comumente cultivadas não atendem a alguns requisitos necessários para a elaboração destes produtos a base de soja, requisitos estes referentes à aparência, ao sabor e ao valor nutricional. Os principais são o tamanho, a uniformidade, a textura, a capacidade de absorção de água e os conteúdos de proteína, óleo, carboidratos, cálcio, fibras e cinzas (CHEN e BUSS, 2004). Por exemplo, para a produção do tofu e do miso são preferidas variedades que apresentam sementes grandes (>20 mg/semente) com alto teor de proteína e sacarose e baixo teor de óleo. Já na produção do natto são preferidas variedades com sementes pequenas (<8 mg/semente) contendo alto teor de sacarose e baixo teor de cálcio (GRIFFTIS e WIEDERMANN, 1990). CARTER, (1987), citado por MAUGHAN et. al. (2000) ressalta que em face da dimensão e a importância destas características, indústrias de alimentos nos Estados Unidos oferecem prêmios a produtores que queiram plantar variedades que satisfaçam estas características, as quais são menos produtivas do que cultivares comerciais.

Com a demanda crescente pelos produtos a base de soja, vários grupos que atuam na área de melhoramento da soja têm-se dedicado à melhoria da qualidade da semente para atender à demanda da indústria de alimentos. Estes melhoristas atentam-se especificamente nestes caracteres de herança quantitativa relacionados à qualidade do grão aliados a alta produtividade (CICEK, 1997).

O conteúdo de sacarose no grão é uma das importantes características responsáveis pela melhoria da qualidade deste, sendo um fator crítico na elaboração de produtos a base de soja. Porém, esta característica recebeu pouca atenção no processo histórico do melhoramento da soja, o qual se preocupou primeiramente com o aumento do teor do óleo, usado no consumo humano, e posteriormente com o aumento do teor e da qualidade da proteína, majoritariamente usada no preparo de rações animais. Segundo CICEK (1997), outro fator que têm limitado o melhoramento para o teor de sacarose é a dificuldade e custos envolvidos na quantificação deste dissacarídeo. Porém, segundo este mesmo autor, uma forma barata, fácil e eficiente para o *screening* de plantas com alto teor de sacarose seria o uso de marcadores moleculares, ferramenta esta que se mostrou muito eficiente no

melhoramento para outras características quantitativas, como o teor de óleo e de proteína.

A seleção de características agrônômicas monitorada por marcadores moleculares baseia-se no princípio de que se um gene, ou um bloco de genes, encontra-se ligado a um marcador genético de fácil identificação, então, esse marcador pode ser usado para selecionar a característica de interesse. Segundo HAYWARD *et al.* (1994), o método mais eficaz para este tipo de associação envolve a produção de mapas genéticos detalhados nos quais são localizadas regiões contendo locos para características quantitativas (QTLs).

Outros dois caracteres quantitativos importantes na qualidade de produtos à base de soja é o teor de açúcares totais e o teor de açúcares solúveis totais, que inclui principalmente sacarose, estaquiose e rafinose. GEATER *et al.* (2000) relataram que a dureza do natto, um produto fermentado consumido principalmente no Japão, está negativamente correlacionada com o teor de açúcares totais das variedades usadas na indústria do natto. Por outro lado, MULLIN e XU (2000) ressaltam que variedades contendo alto teor de açúcares solúveis totais e baixa atividade de lipoxigenase não apresentam o indesejável “beany flavor”. Para KUO *et al.* (1997), a determinação da composição e do metabolismo dos oligossacarídeos durante o desenvolvimento da semente fornecerá informações essenciais para a melhoria da qualidade do grão da soja.

Em relação à qualidade, a principal limitação da proteína da soja é o baixo teor de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) que ela apresenta. Cerca de 90% das proteínas da semente da soja são do tipo globulinas, que representam em média 36% do peso seco da semente (HUGHES e MURPHY, 1983). Essas globulinas apresentam duas frações principais, uma com coeficiente de sedimentação 11S, composta pela proteína glicinina, e outra com coeficiente de sedimentação 7S, composta principalmente pela β -conglícinina, sendo a fração 11S a que contém maior conteúdo de aminoácidos sulfurados (FUKUSHIMA, 1968). Em decorrência dessa característica, KROBER e CARTTER (1966) sugeriram que a elevação da relação 11S/7S poderia resultar em aumento no teor de aminoácidos sulfurados da proteína da soja.

O programa de melhoramento genético da soja desenvolvido no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, que tem como um dos objetivos produzir variedades de soja mais

apropriadas para o consumo humano, deu um importante passo ao conseguir eliminar as lipoxigenases do grão de soja por meio de cruzamentos entre variedades comerciais e mutantes silvestres, que não continham essas enzimas. Desta forma, os grãos da soja melhorada não apresentam o chamado “beany flavor”, podendo ser utilizados diretamente na alimentação humana.

Um novo passo que o referido programa pretende atingir, baseado nas exigências do mercado da soja para consumo humano, é a produção de variedades que combinem as características alto teor de sacarose (~10%), baixos teores de rafinose e estaquiose, alto teor de proteína, alta relação 11S/7S e alta produtividade.

Especificamente, este trabalho teve como objetivos: (i) desenvolver um método analítico para a quantificação de sacarose na semente de soja que além de confiável, possua baixo custo por análise e permita a realização de um grande número de amostras em um intervalo pequeno de tempo, podendo assim ser aplicado em análises de rotina no programa de melhoramento; (ii) Selecionar progenitores contendo alto teor de sacarose para uso no programa de retrocruzamentos; (iii) Analisar os teores de sacarose, rafinose, estaquiose, açúcares solúveis totais e proteínas totais numa população derivada dos progenitores selecionados; (iv) Estimar as correlações entre estas características.

2. Revisão de Literatura

2.1. Carboidratos presentes na soja

Segundo os resultados de KAWAMURA (1966), a semente de soja apresenta em média 33,9% de carboidratos. Este mesmo autor ressalta que a fração de carboidratos da soja contém muito pouco amido, sendo constituída basicamente por celulose (4,0%), hemicelulose (15,0%), rafinose (1,1%), estaquiose (3,8%) e sacarose (5,1%). Os outros açúcares juntos somam 5,1%.

CHEN e BUSS (2004) detectaram em bancos de germoplasma de soja que o conteúdo de açúcares solúveis totais, que inclui os teores dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose além dos teores de sacarose e de monossacarídeos, varia de 4,1% a 15,1% em base seca. A sacarose é o componente principal desta classe, correspondendo aproximadamente a 60% do total de açúcares solúveis. A variação detectada para o teor de sacarose em bancos de germoplasma é de 1,5% a 10,2%. Estes mesmos autores relataram que recentemente foi identificada uma linhagem contendo 13,6% de sacarose, mostrando que existe variabilidade natural suficiente para permitir o melhoramento da soja para altos teores deste açúcar.

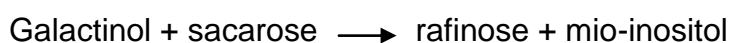
Os oligossacarídeos rafinose e estaquiose estão presentes em teores que variam 0,1% a 2,1% e 1,4% a 6,7%, respectivamente (CHEN e BUSS, 2004). Estes oligossacarídeos não são digeridos no trato digestivo de vários animais monogástricos, incluindo o homem, sendo responsáveis pela flatulência associada ao consumo de produtos à base de soja. Desta forma, estes oligossacarídeos assumem papel restritivo quanto ao consumo destes grãos como fonte protéica. Devido a este fato, muitos grupos que atuam no melhoramento da soja têm se dedicado a produzir variedades com baixos teores destes dois açúcares.

Acreditava-se que o papel fisiológico primário da estaquiose e da rafinose era servir como carboidratos de reserva, transportando energia para os pontos de crescimento dos vegetais (CHARTTERTON *et al.*, 1990). Entretanto, tanto a sacarose como a estaquiose e a rafinose estão sempre presentes em sementes dessecadas dormentes. Na ausência de estaquiose e rafinose, a tolerância das sementes à dessecação é perdida, mesmo que a sacarose esteja presente. Isto levou KOSTER e LEOPOLD (1988) a postular que a sacarose seja o principal

agente da tolerância das sementes à dessecação, enquanto que a estaquiose e a rafinose previnem a cristalização da sacarose.

Em plantas superiores, a rafinose encontra-se em folhas, caules e órgãos de reserva, sendo que nestes últimos a rafinose se acumula durante o desenvolvimento da planta. DEY (1985) relata que com a perda de água que ocorre em sementes durante a maturação há um concomitante aumento na concentração de rafinose. Já durante o processo de germinação esta é degradada à galactose e sacarose. A enzima envolvida na biossíntese da rafinose é a galactinol: sacarose 6- α -D-galactosiltransferase, também denominada rafinose sintase. Em órgãos de reserva a rafinose pode ser usada como um precursor para síntese de outros oligossacarídeos, homólogos maiores ou ser hidrolisada por **α -galactosidades** e **invertases**. Estas duas enzimas participam também da hidrólise da estaquiose, que por sua vez é sintetizada a partir da rafinose pela enzima galactosil: rafinose 6- α -D-galactosiltransferase (estaquiose sintase).

O esquema abaixo apresenta a via metabólica da síntese da rafinose e da estaquiose (DEY, 1985):



A reação inicial é catalisada pela galactinol sintase (UDP-galactose: mio-inositol galactosil transferase, GS), a qual requer Mn^{2+} para sua atividade, produzindo galactinol a partir de UDP-galactose e mio-inositol. Em folhas e sementes, a atividade de GS correlaciona-se positivamente com os níveis de oligossacarídeos de reserva (LIU *et al.*, 1995)

Quanto aos monossacarídeos presentes na fração de açúcares solúveis, DELENE e LADENBURG (1972) relataram que a galactose é o principal monossacarídeo presente na semente de soja. Porém, HYMOWITZ e COLLINS (1974), usando soluções puras de galactose, glicose e frutose como padrões, identificaram por cromatografia gasosa que o mais abundante monossacarídeo na

semente era a frutose. Estes autores encontraram apenas traços de glicose e galactose na semente de soja.

Na natureza é encontrado apenas um pequeno número de dissacarídeos de ocorrência livre. Entre estes, destaca-se a sacarose, que é um dos mais abundantes produtos naturais conhecidos. Ela, além de desempenhar um papel central no ciclo de vida das plantas, possui grande valor comercial, devido principalmente a sua importância na nutrição humana e como substrato para indústria química e de alimentos. Como afirmamos anteriormente, o conteúdo de sacarose na semente de soja é de fundamental importância no preparo de diversos produtos a base de soja.

A sacarose é a fonte primária de átomos de carbono que são translocados dos tecidos foliares para o crescimento do embrião (THORME, 1980). A captação de sacarose é drasticamente diminuída com a maturação fisiológica da semente (VERNOOY *et al.*, 1986). Segundo HAGEMAN e RINNE (1976) a semente de soja também tem a capacidade de converter glicose em sacarose. O catabolismo inicial da sacarose no embrião provém carbono para síntese de compostos da semente e para respiração. Este é catalisado pela sacarose sintase ou pela invertase alcalina, sendo que a contribuição de cada enzima varia com o respectivo tipo de tecido, com a função e com a idade (SUNG *et al.*, 1989). LOWELL e KUO (1989) encontraram associação entre altos níveis destas enzimas com o maior acúmulo de matéria seca na semente. MACDONALD e REES (1983) relataram que a sacarose sintase e a invertase alcalina estão envolvidas no catabolismo da sacarose, provendo hexoses para formação de amido em cultura de células de soja em suspensão.

A **Invertase** (EC. 3.20.1.26, β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase), que hidrolisa sacarose em glicose e frutose, ocorre em muitas plantas e microrganismos (HYRAYAMA *et al.*, 1989). ACKERSON (1985) relatou que foi encontrada alta atividade de invertase em flores e frutos em desenvolvimento, o que sugere que a hidrólise de sacarose a suas hexoses constituintes provém substratos necessários ao crescimento. Este autor cita trabalhos demonstrando que a atividade de invertase declina com a maturação do fruto. Ele também concluiu que os dados obtidos em seu trabalho indicavam que a conversão de sacarose em glicose pela invertase e sua possível regulação por ácido abicissico (ABA) desempenham importante papel no crescimento das estruturas reprodutivas jovens de soja.

A **sacarose sintase** (SS; UDP-glicose: D-frutose 2-glicosil transferase, E.C.2.4.1.13) catalisa a conversão reversível entre sacarose e UDP para frutose e

UDP-glicose. LOUREIRO (1999) destaca que esta enzima desempenha um importante papel na mobilização da sacarose em diversos mecanismos relacionados ao metabolismo, à estrutura e a funções de estoque em células de plantas.

As **α -galactosidades** (EC 3.2.1.22, α -D-galactosil galactoidrolase) intra e extra-celular ocorrem em microrganismos, vegetais (especialmente em leguminosas) e animais. Estas enzimas catalisam a hidrólise de ligações α -1,6 em oligossacarídeos simples como melibiose, rafinose, estaquiose e verbascose e em polímeros galatocglicomananas. A hidrólise das ligações α -1,6 libera carboidratos simples como galactose e sacarose, que são prontamente metabolizados para obtenção de energia. A provável função das α -galactosidases de cotilédones é degradar os oligossacarídeos de rafinose (ROs) durante a germinação e o início do desenvolvimento da plântula (HERMAN e SHANNON, 1985). Segundo LAHUTA (2000), sementes maduras contêm algumas formas de α -galactosidades que diferem na sua massa molecular e atividade, indicando que o número de formas da enzima pode estar relacionado ao estágio fisiológico da semente.

Segundo de REZENDE (1998), a degradação enzimática completa dos oligossacarídeos de rafinose a monossacarídeos requer a ação conjunta de duas hidrolases: (i) a α -galactosidade que degrada os ROs a galactose e sacarose e (ii) a invertase, que hidrolisa as ligações entre frutose e glicose nas moléculas de sacarose, rafinose e estaquiose, originando os produtos melibiose (Gal-Glc) e frutose.

2.2. Proteínas de Reserva da Soja

Proteínas de reserva são definidas como sendo aquelas que possuem como única função conhecida servirem como reserva de aminoácidos, as quais, durante a germinação da semente, são degradadas por enzimas proteolíticas para fornecerem os aminoácidos necessários ao desenvolvimento do embrião. Segundo HILL e BREIDENBACH (1974) as proteínas de soja constituem cerca de 35 a 45% da matéria seca da semente, sendo que as proteínas de reserva glicinina (fração 11S) e β -conglucina (presente na fração 7S) representam em torno de 70% da proteína da semente da soja, as quais são depositadas de forma agregadas em organelas especializadas derivadas de vacúolos chamadas de corpos protéicos.

A glicinina apresenta massa molecular de aproximadamente 350 kDa, sendo constituída por polipeptídios de caráter ácido e de caráter básico que diferem da β -conglucina em seus conteúdos de metionina (MOREIRA *et al.*, 1979; COATES *et al.*, 1985). Esta proteína é obtida após duas clivagens dos polipeptídios precursores. A primeira clivagem remove o peptídeo sinal que direciona o precursor para o lúmen do retículo endoplasmático e a segunda clivagem ocorre após a tradução, provavelmente já nos corpos protéicos, originando os polipeptídios ácidos e básicos (DICKINSON *et al.*, 1989).

Foram isolados desta proteína seis polipeptídios ácidos (A1a, A1b, A2, A3, A4 e A5) e cinco básicos (B1a, B1b, B2, B3 e B4) que se encontram associados de modo específico, por meio de ligações bissulfídicas, entre um ácido e um básico, formando as subunidades A1aB2, A1bB1b, A2B1a, A3B4 e A5B3 (MOREIRA *et al.*, 1979; MOREIRA *et al.*, 1981). O polipeptídio A4 está associado ao B3 por meio de ligações não covalentes, formando a subunidade A5A4B3 (STASWICK *et al.*, 1981). Atualmente, essas subunidades são denominadas G1 (A1aB2), G2 (A1bB1b), G3 (A2B1b), G4 (A5A4B3) e G5 (A3B4) e seus genes *Gy1*, *Gy2*, *Gy3*, *Gy4* e *Gy5*. Os polipeptídios A1a, A1b, A2, B1 e B2 possuem de três a seis vezes mais metionina que A3, A4, A5, B3 e B4 (MOREIRA *et al.*, 1979). Em glicinina têm sido observadas variações na composição polipeptídica, como mutantes naturais com ausência do complexo G4 (FONTES *et al.*, 1984).

NIELSEN e seus colaboradores (1989) caracterizaram a estrutura, a organização e a expressão dos genes que codificam a glicinina. Estes autores dividiram as cinco subunidades da glicinina em dois grupos baseados na homologia da seqüência de aminoácidos. G1, G2 e G3 são as subunidades do Grupo 1 e G4 e G5 são as subunidades do Grupo 2. A homologia das seqüências entre subunidades de um mesmo grupo está em torno de 90%, mas está em torno de somente 50%, quando membros de grupos diferentes são comparados.

Estes autores identificaram que o Grupo 1 é codificado por três genes presentes em dois domínios cromossômicos distintos. Um domínio contém dois genes de glicinina ligados (*Gy1* e *Gy2*) e o outro contém o gene *Gy3*. Os dois domínios têm alto grau de homologia e contêm outros genes que são expressos tardiamente nos embriões ou em folhas de plantas maduras. Dois destes outros genes foram identificados e designados como glicinina-relacionados, e podem codificar outras famílias de subunidades de glicinina que se acumulam em menor quantidade nas

sementes. DIERS *et al.* (1994) mapearam os genes *Gy4* e *Gy5* da glicinina em uma população obtida do cruzamento interespecífico de *Glycine max* x *G. soja* e encontraram que estes genes estão localizados nos grupos de ligação “O” e “F” respectivamente, grupos estes caracterizados pelo mapa de ligação construído por SONG *et al.* (2004).

Usando a eletroforese bidimensional para analisar as proteínas isoladas de corpos protéicos, LEI e REECK (1987) constataram que vários polipeptídios da semente de soja estão presentes nos corpos protéicos, incluindo a β -conglucina, glicinina, lectina e o inibidor de tripsina Kunitz, além de outros polipeptídios não identificados. Neste mesmo trabalho, estes pesquisadores, usando a coloração com dansilhidrazina e a cromatografia de afinidade com concanavalina A, mostraram que além da β -conglucina e a lectina, uma pequena porção da glicinina e outras proteínas não identificadas são glicosiladas.

A β -conglucina é uma glicoproteína com massa molecular estimada em 150-170 kDa e possui três subunidades principais α' , α e β , sendo codificadas pelos genes *Cgy1*, *Cgy2* e *Cgy3*, respectivamente (THANH e SHIBASAKI, 1977). As subunidades α e α' possuem dois e três resíduos de metionina, respectivamente, e a subunidade β não possui esse aminoácido (COATES *et al.*, 1985). Existe polimorfismo genético na composição polipeptídica de β -conglucina, sendo que tem sido identificando genótipos com ausência de α' (KITAMURA *et al.* 1984). Subunidades menores dessa globulina, designadas β' , γ e δ , também têm sido descritas (COATES *et al.*, 1985).

HARADA *et al.* (1989) concluíram que a família de genes que codificam a β -conglucina contém no mínimo 15 membros que estão distribuídos entre seis regiões distintas do genoma. Três destas regiões contêm genes múltiplos (região A, cinco genes; região B, dois; região C, três; regiões D, E e F, um cada). Estes 15 membros estão divididos em dois grupos principais com base no tipo de RNA mensageiro (mRNA) transcrito. Um grupo é transcrito em mRNAs de 2,5 Kb, que codificam as subunidades α e α' , enquanto o outro grupo é transcrito em mRNAs de 1,7 Kb, que codifica as subunidades β . A homologia entre os grupos é alta e a diferença entre eles deve-se à presença ou ausência de um segmento específico de DNA de 0,56 Kb, presente no éxon 1 dos membros do primeiro grupo. Estes mesmos autores concluíram que a expressão dos genes que codificam a β -conglucina é regulada em

nível de transcrição e pós-transcricionalmente, sendo que a regulação pós-transcricional é diferente entre os dois grupos principais.

YAKLICH (2001) estudou linhagens de soja com alto teor de proteína, visando identificar se ocorre acúmulo de algumas subunidades específicas nestas linhagens, usando para isso a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) acompanhada da densitometria. Este autor observou que algumas das linhagens estudadas apresentaram um acúmulo significativo das subunidades α , α' e β da β -conglucina enquanto outras apresentaram um acúmulo da subunidade A3 da glicina e todas as linhagens apresentaram acúmulo das subunidades A1, A2 e A4. Os polipeptídeos básicos da glicina também se acumularam na maioria das linhagens. Baseado nestas observações, o autor concluiu que linhagens com alto teor de proteína contêm maiores concentrações de β -conglucina e glicina do que linhagens normais e que as linhagens diferem em relação a quais subunidades destas proteínas se acumulam em maior quantidade.

A mesma metodologia foi usada também por FEHR *et al.* (2003) visando estudar a influência do genótipo e do ambiente sobre a composição de subunidades das proteínas de reserva da soja. Estes autores, trabalhando com 14 cultivares, alguns de uso amplo e outros de uso específico, como cultivares livre de lipoxigenases e cultivares com alto teor de proteína, que foram cultivados em 8 localidades diferentes por 3 anos consecutivos, concluíram que a concentração de 7S, 11S e a razão 11S/7S são influenciados pelo ambiente. Por outro lado, ressaltaram que não são esperadas alterações significativas nestes parâmetros de um ano para o outro a nível industrial, em virtude dos grãos colhidos em localidades próximas serem misturados nas indústrias de processamento de alimentos.

2.3. Correlações entre teores de sacarose, açúcares totais e proteína em soja

A informação de como estão correlacionados os teores dos diversos constituintes da semente da soja é essencial em um programa de melhoramento que visa melhorar a qualidade da semente da soja. CRUZ *et al.* (2003) ressaltam que o conhecimento da correlação entre caracteres é de grande importância no melhoramento de plantas, especialmente se alguma das características avaliadas apresentarem baixa herdabilidade e, ou, tiver problemas de medição e identificação.

KROBER e CARTTER (1962) avaliaram quatro cultivares que diferiam nos conteúdos de proteína e óleo na semente e encontraram que aqueles cultivares que continham altos teores de proteína apresentavam baixos teores de açúcares totais. HYMOWITZ *et al.*, (1972) analisaram os teores de óleo, proteína, açúcares totais, sacarose, rafinose e estaquiose em 60 linhagens de um germoplasma de soja, as quais cobriam praticamente toda a faixa de conteúdo de óleo e proteína existente na cultura. Uma análise de correlação simples mostrou que o teor de açúcares totais estava positivamente correlacionado com o teor de óleo e que ambos apresentam correlação negativa com o teor de proteína. Os teores de sacarose e rafinose apresentaram correlação positiva com o teor de óleo enquanto o teor de estaquiose mostrou-se positivamente correlacionado com o teor de proteína.

HARTWIG *et al.* (1997) analisaram os teores de óleo, proteína, sacarose, rafinose e estaquiose em 20 cultivares comerciais de soja contendo alto teor de óleo e em 20 linhagens contendo alto teor de proteína. Os coeficientes de correlação entre os teores de rafinose + estaquiose com o teor de proteína ($r = -0,16$) e óleo ($r = -0,03$) foram não significativos. Em contraste, os autores encontraram uma relação significativa e inversa entre os teores de sacarose e proteína ($r = -0,78^{**}$) e positiva entre os teores de sacarose e óleo ($r = 0,67^{**}$).

Os teores de açúcares totais, proteína, óleo e fibras além do peso da semente foram determinados por GEATER e FEHR (2000) em 23 cultivares de soja, incluindo, nesta relação, cultivares convencionais e específicos para produção de alguns alimentos a base de soja. Esses autores encontram diferenças significativas entre os cultivares para todos caracteres analisados e uma alta correlação negativa ($r = -0,81$) entre os teores de açúcares totais e soma dos teores de óleo e proteína.

Analisando os caracteres produtividade e os teores de proteína, óleo, rafinose, estaquiose, sacarose e enxofre em 43 linhagens derivadas de uma população melhorada, WILCOX e SHIBLES (2001) mostraram que o aumento no teor de proteína ocorreu à custa do teor de óleo, carboidratos totais e sacarose com coeficientes de correlação de $-0,98$, $-0,71$ e $-0,66$, respectivamente. Estes autores concluíram que a diminuição no teor de carboidratos com o aumento do teor de proteína deve contribuir para um aumento do valor nutricional do farelo obtido das linhagens melhoradas.

2.4. Herança, modo de ação gênica e herdabilidade dos teores de proteína e sacarose em soja

No melhoramento da soja, como destaca PIOVESAN (2000), muitos estudos da genética de caracteres agronômicos têm sido realizados com interesse na obtenção de subsídios para o estabelecimento de estratégias eficientes de seleção. Mas o mesmo autor ressalta que existem poucas informações a respeito do tipo de herança e do modo de ação gênica na determinação do teor de proteína da semente. Para o teor de sacarose se conhece menos ainda.

Dos trabalhos disponíveis, vários autores, entre eles SINGH e HADLEY (1972), WILCOX e SIMPSON (1977), ISHIGE (1984) e PULCINELLI (1992) concluíram que o teor de proteína nas sementes é determinado, em grande parte, pelo genótipo da planta mãe, sofrendo também influência do ambiente. Efeitos do citoplasma e dos genótipos do embrião e do grão de pólen não foram evidenciados por estes autores. Já OPENSHAW e HADLEY (1978), estudando a herança do teor de carboidratos na semente concluíram que este caráter é pouco influenciado pelo genótipo da própria semente, ficando evidenciada a herança materna. Este trabalho também não identificou efeito citoplasmático.

Para que se tenha um entendimento das propriedades genéticas de uma população, além de conhecer a variância genotípica e ambiental, é necessário conhecer também os componentes da variância genotípica do caráter em estudo. A variância genotípica pode ser decomposta entre variância aditiva, variância devida à dominância e a variância epistática.

A composição da variância genética foi demonstrada por COCKERHAM (1954) e depois expandida por HORNER e WEBER (1956) e COCKERHAM (1963), que apresentaram um amplo conjunto de maneiras para estimar os componentes da variação genética. Para o teor de proteína em soja, diversos trabalhos têm relatado a existência de efeitos gênicos epistáticos e de dominância, contudo os efeitos gênicos aditivos foram sempre superiores (BRIM e COCKERHAM, 1961; HANSON *et al.*, 1967; McKENDRY *et al.*, 1985; LEE e WANG, 1986). OPENSHAW e HADLEY (1978) concluíram que o teor de carboidratos totais é controlado exclusivamente por efeitos gênicos aditivos. Porém estes autores ressaltam que o modelo genético para a herança do teor de açúcar carece de dados comprobatórios, pois não se sabe se

alguns genes dominantes controlam o alto ou o baixo teor de açúcar na semente de soja.

A herdabilidade (h^2) fornece a proporção da variância genética presente na variância fenotípica total. Desta forma, mede a confiabilidade do valor fenotípico como indicador do valor reprodutivo. Devido a isso, a herdabilidade participa quase sempre de todas as fórmulas relacionadas com a predição de ganho dos métodos de melhoramento e também de inúmeras decisões práticas que os melhoristas tomam (RAMALHO *et al.*, 1993).

Para FALCONER (1987) a herdabilidade de um caráter métrico é uma das mais importantes propriedades de uma população, porque expressa a proporção da variância total que é atribuída ao efeito médio dos genes, o que determina o grau de semelhança entre progenitores. A seleção é efetuada, fundamentalmente, nessa semelhança.

Entretanto, RAMALHO *et al.* (1993) ressaltam que a herdabilidade não é apenas uma propriedade do caráter, mas também da população e das condições ambientais a que foram submetidos os indivíduos da população. Nesta mesma linha de raciocínio, DUDLEY e MOLL (1969) relatam que a estimativa de herdabilidade refere-se a uma característica e a uma população e é específica para as condições experimentais nas quais os genótipos foram estudados, sendo difícil extrapolar estimativas de herdabilidade de uma população para outra, ou para diferentes condições experimentais.

STRICKBERGER (1985) destacou que a importância das estimativas de herdabilidade reside em sua relação com a seleção, uma vez que quanto maior for a herdabilidade, maior será o sucesso de seleção para dada característica, o que resulta numa relação positiva entre alta herdabilidade e eficiência de seleção. Para os progenitores transmitirem certas características aos seus descendentes que sejam de algum modo predizíveis, é necessário que a variância ambiental seja baixa e a variância genética seja alta.

Na literatura são descritas várias metodologias para obtenção de estimativas do coeficiente de herdabilidade. A utilização da variabilidade entre as plantas na geração F_2 em relação à variabilidade entre as plantas dos progenitores foi utilizada por MAHMUD e KRAMER (1951) para a obtenção do coeficiente de herdabilidade. WARNER (1952) propôs uma metodologia para estimar a herdabilidade com base nos progenitores, gerações F_1 e F_2 e dos dois retrocruzamentos. HANSON *et al.*

(1962) determinaram estimativas do coeficiente de herdabilidade com base nos componentes de variância. FREY e HORNER (1957) propuseram estimar a herdabilidade em unidades-padrão, as quais são obtidas calculando-se a regressão sobre os dados codificados em termos de desvio-padrão. SMITH e KINMAN (1965) utilizaram fatores de correção do coeficiente de regressão pai-filho para estimar a herdabilidade utilizando progenitores endogâmicos para algumas gerações de autofecundação.

JOHNSON e BERNARD (1963), estudando a herdabilidade para várias características em soja, dentre elas o teor de proteína, mostraram que em gerações precoces (F_2) esta apresenta baixos valores, quando comparadas com gerações mais avançadas (F_4). Esta observação aponta para dificuldades de identificar e selecionar genótipos superiores em gerações precoces (no caso F_2), resultando em pouco progresso esperado por seleção.

KWON e TORRIE (1964) procurando estimar a herdabilidade para caracteres de interesse em soja, estudaram duas populações derivadas da seleção de 64 plantas F_2 para cada cruzamento. Avaliaram essas populações na geração F_3 em um ano e um local, e as gerações F_4 e F_5 em dois anos e dois locais. Os parâmetros genéticos extraídos da análise de variância proporcionaram estimativas de herdabilidade livre dos efeitos da interação genótipo \times ambiente. Os autores verificaram que a interação genótipo \times ano foi maior que a interação genótipo \times local, para muitas características, principalmente produção de sementes. A herdabilidade para produção de sementes foi mais baixa devido a maior interação genótipo \times ano, ficando na ordem de 3 e 10%, respectivamente, para cada cruzamento. Para os caracteres teor de óleo e proteína, a herdabilidade só foi estimada para um dos cruzamentos, apresentando valores de 51 e 57%, respectivamente.

OPENSHAW e HADLEY (1981), usando o modelo de regressão pai e filho, estimaram a herdabilidade do teor de açúcares totais em soja em dois cruzamentos, sendo que em um foram analisadas as gerações F_2 , F_3 e F_4 e em outro as gerações F_2 e F_3 . Eles encontraram estimativas de herdabilidade de 38% e 14% quando a seleção foi baseada em plantas F_2 individuais e 69% quando a seleção foi baseada na progênie F_3 .

Objetivando estudar os componentes genéticos envolvidos no controle do teor de proteína e em outros 8 caracteres agronômicos, PIOVESAN (2000) encontrou,

com base nos componentes de variância, estimativas de herdabilidade para teor de proteína nas 6 populações F_2 estudadas variando de 22 a 81%. TEIXEIRA (2003), estudando um população nas gerações F_2 e F_3 , encontrou estimativas de herdabilidade de 56,2% para o teor de proteínas totais, 62,1% para o teor de 7S e 43,4% para o teor de 11S, mostrando a possibilidade de melhoramento para a qualidade protéica da soja

3. Referências Bibliográficas

- BORÉM, A. Escape Gênico. **Biotecnologia**, ano II, n.10, p.101-107, 1999.
- BRIM, C.A., COCKERHAM, C.C. Inheritance of quantitative characters in soybeans. **Crop Science**, v.1, p.187-190, 1961.
- CERVIGINI, G.D.L. **Análise genômica da resistência às raças 3 e 9 do nematóide de cisto e avaliação da variabilidade genética de caracteres agronômicos em soja**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 82p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- CHARTTERTON, N.J., HARISOM, P.A., THORNLEY, W.R., BENNETT, J.H. Sucrosyloligosaccharides and cool temperature growth in 14 forb species. **Plant Physiological Biochemistry**. v.28, p.167-172, 1990.
- CHEN, P., BUSS, G.R. Breeding soybeans for the soyfood market: specific traits and strategies for selection. In: **IV International Soybean Processing and Utilization Conference**. Foz do Iguassu, PR, Brazil. *Proceedings*, 2004 . p.830-838.
- CICEK, M. **Genetic analysis of quantitative trait loci associated with seed sucrose content using molecular markers in an interspecific *Glycine* cross**. Blacksburg, VA: FVPIST, 1997. 46p. Dissertation (Master of Science in Crop and Soil Environmental Sciences) – Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State university, 1997.
- COATES, J.B., MEDEIROS, J.S., THANH, V.H., NIELSEN, N.C. Characterization of the subunits of β -conglucinin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.243, n.1, p.184-194, 1985.
- COCKERHAM, C.C. An extension of the concept of partitioning hereditary variance for analysis of covariances among relatives when epistasis is present. **Genetics**, v.39, p.859-892, 1954.
- COCKERHAM, C.C. Estimation of genetic variance. In: HANSON, W.D., ROBINSON, H.F. **Statistical genetics and plant breeding**. Madison: National Academy of Sciences, 1963. p.53-94.
- CONAB. **Anuário estatístico**. Disponível em <http://www.conab.gov.br>. Acessado em Março, 2008

- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Ed. UFV, Viçosa-MG, 390p., 1997.
- DELENE, J., LADENBURG, K. Quantitative determination of the oligosaccharides in defatted soybean meal by gas-liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v.37, p.372-374, 1972.
- DICKINSON, C.D.; HUSSEIN, E.H.A.; NIELSEN, N.C. Role of Posttranslational Cleavage in Glycinin Assembly, **The Plant Cell**, v.1, n.4, p.459-469, 1989.
- DIERS, B.W., BEILINSON, V., NIELSEN, N.C., SHOEMAKER, R.C. Genetic mapping of the Gy4 e Gy5 glycinin genes in soybean and the analysis of a variant of Gy4. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, n.2, p.297-304, 1994.
- DIERS, B.W., KEIM, P., FEHR, W.R., SHOEMAKER, R.C. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, n.5, p.608-612, 1992.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- DUDLEY, J.W., MOLL, R.H. Interpretation and use of estimates of heritability and genetics variances in plant breeding. **Crop Science**, v.9, p.257-262, 1969.
- EMBRAPA. **Uso da soja para o consumo humano**. Disponível em <http://www.embrapa.gov.br>. Acessado em Fevereiro, 2008.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: Imprensa Universitária, 279p., 1987
- FEHR, W.R., HOECK, J.A., JOHNSON, S.L., MURPHY, J.D.N., PADILLA, G.I., WELKE, G.A. Genotype and Environment Influence on Protein Components of Soybean. **Crop Science**, v.43, p.511-514, 2003.
- FONTES, E.P.B., MOREIRA, M.A, DAVIES, C.S. , NIELSEN, N.C. Urea-elicited changes in relative electrophoretic mobility of certain glycinin and β -conglycinin subunits. **Plant Physiology**, v.76, n.3, p.840-842, 1984.
- FREY, K.J., HORNER, T. Heritability in standard units. **Agronomy Journal**, v.49, n1, p.59-62, 1957.
- FUKUSHIMA, D. Internal structure of 7S and 11S globulin molecular in soybean proteins. **Cereal Chemistry**, v.45, p.203-224, 1968.
- GEATER, C.W., FEHR, W.R. Association of total sugar content with other seed traits of diverse soybean cultivars. **Crop Science**, v.40, p.1552-1555, 2000.

- GEATER, C.W., FEHR, W.R., WILSON, L.A. Soybean seed traits influence natto quality. **Crop Science**, v.40, p.1529-1534, 2000.
- GRIFFITS, G., WIEDERMANN, L. **Marketing food-quality soybeans in Japan**. American Soybean Association, P.O. Box 27300, St. Louis, Mo. 63141. 1990.
- GUIMARÃES, C.T., MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Ed. UFV, Viçosa-MG, p. 715-740, 1999.
- HAGEMAN, M.E., RINNE, R.W. Glucose, pyruvate, and acetate metabolism by developing soybean seeds. **Plant Cell Physiology**, v.17, p.501-507, 1976.
- HANSON, D.W., WEBER, C.R. Analysis of genetic variability from generations of plant-progeny lines in soybeans. **Crop Science**, v.2, n.1, p.63-67, 1962.
- HANSON, W.D., PROBST, A.H., CALDWELL, B.E. Evaluation of a population of soybean genotypes with implications for improving self-pollinated crops. **Crop Science**, v.7, p.99-103, 1967.
- HARADA, J.J., BARKER, S.J., GOLDEBERG, R.B. Soybean β -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes. **The Plant Cell**, v.1, n.4, p.415-425, 1989.
- HARTWIG, E.E., KUO, T.M., KENTY, M.M. Seed protein and its relationship to soluble sugars in soybean. **Crop Science**, v.37, p.770-773, 1997.
- HILL, J.E., BREIDENBACH, R.W. Protein of soybean seeds. **Plant Physiology**, v.53, n.5, p.742-746, 1974.
- HORNER, T.W., WEBER, C. Theoretical and experimental study of self fertilized populations. **Biometrics**, v.12, p.404-416, 1956.
- HUGHES, S.A.; MURPHY, P.A. Varietal influence on the quality of glycinin in soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.31, p.376-379, 1983.
- HYMOWITZ, T., COLLINS, F.I., PANZNER, J., WALKER, W.M. Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. **Agronomy Journal**, v.64, p.613-616, 1972.
- HYMOWITZ, T., COLLINS, F.I. Variability of sugar content in seed of *Glycine max* (L.) Merrill and *G. soja* Sieb. And Zucc. **Agronomy Journal**, v.66, p.239-240, 1974.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo: 1985. v.1, 533p.

- ISHIGE, T. Biometrical analysis and estimation of the number of genes for seed protein content of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v.17, p.230-235, 1984.
- JANSEN, R.C. Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm. **Biometrics**, v.49, n.1, p.227-231, 1993.
- JOHNSON, H.W., BERNARD, R.L. Soybean genetics and breeding. In: NORMAN, A.G. (Ed.). **The soybean genetics, breeding, physiology, nutrition, management**. New York: Academic Press, p.1-73, 1963.
- KAWAMURA, S. Review of PL 480 work on soybean carbohydrates. In: **International Conference of Soybean Protein Foods**. Peoria, Illinois, 1966. *Proceedings*, Washington DC, U.S. Department of Agriculture, 1967 . p.249-54.
- KITAMURA, K., DAVIES,C.S., NIELSEN, N.C. Inheritance of alleles for *Ggy1* and *Gy4* storage protein genes in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.68, n.3, p.253-254, 1984.
- KOSTER, K.L., LEOPOLD, A.C. Sugar and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, v.88, p.829-832, 1988.
- KROBER, O.A.; CARTTER, J.L. Quantitative interrelationships of protein and nonprotein constituents of soybeans. **Crop Science**, v.2, p.171-172, 1962.
- KROBER, O.A.; CARTTER, J.L. Relation of methionine content to protein levels in soybean. **Cereal Chemistry**, v.43, p.320-325, 1966.
- KUO, T.K., LOWELL, C.A., SMITH, P.T. Changes in soluble carbohydrates and enzymic activities in maturing soybean seed tissues. **Plant Science**, v.125, p.1-11, 1997.
- KWON, S.H., TORRIE, J.H. Heritability and interrelationships among traits of two soybean populations. **Crop Science**, v.4, n.2, p.196-198, 1964.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAURENTIN, A., EDWARDS, C.A. A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates, **Analytical Biochemistry**, v.315, p.143-145, 2003.
- LEE, W.B., WANG, J.L. Comparison of inheritance of several agronomic characters between *Glycine max* X *G. soja*, *G. max* X *G. gracilis*, and *G. max* X *G. max*. **Soybean Genetic Newsletter**, v.13, p.59-61, 1986.

- LEI, M.G.; REECK, G.R. Two-Dimensional Eletrophoretic Analysis of the Proteins of Isolated Soybean Protein Bodies and of the Glycosylation of Soybean Proteins, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.35, p.296-300, 1987.
- LOWELL, C.A., KUO, T.M. Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. **Crop Science**, v.29, p.459-465, 1989.
- MAcDONALD, F.D., REES, T. Enzymic properties of amyloplasts from suspension cultures of soybean. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.755, p.81-89, 1983.
- MAHAMUD, I., KRAMER, H.H. Segregation for yield, height, and maturity following a soybean cross. **Agronomy Journal**, v.43, n.3, p.605-609, 1951.
- MAUGHAN, P.J., MAROOF, M.A.S., BUSS, G.R. Identification of quantitative trait loci controlling sucrose content in soybean (*Glycine max*). **Molecular Breeding**, v.6, p.105-111, 2000.
- McKENDRY, A.L., MCVETTY, P.B.E., VOLDENG, H.D. Inheritance of seed protein an seed oil content in early maturing soybean. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.27, p.603-607, 1985.
- MORAES, R.M.A. **Introgressão de alelos para alto teor de proteína em soja assistida por marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 139p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- MORAIS, A.A.C., DA SILVA, A.L. **Soja: Suas Aplicações**, Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 1996, 260p.
- MOREIRA, M.A., HERMADSON, M., LARKINS, B.A. Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. **Journal of Biological Chemistry**, v.254, n.20, p.9921-9926, 1979.
- MOREIRA, M.A., HERMADSON, M., LARKINS, B.A., NIELSEN, N.C. Comparison of the primary structure of the acidic polypeptides of glycinin. **Archives of Biochemistry and Biophyics**. v.210, n.2, p.636-642, 1981.
- MULLIN, W.J., XU,W. A study of the intervarietal differences of cotyledon and seed coat carbohydrates in soybeans. **Food Research International**, v.33, p.883-891, 2000.
- NIELSEN, N.C., DICKINSON, C.D., CHO, T-J, THANH, V.H., SCALLON, B.J., FISCHER, R.L., SIMS, T.L., DREWS, G.N., GOLDEBERG, R.B. Characterization of the glycinin gene family in soybean. **The Plant Cell**, v.1, n.3, p.313-328, 1989.

- OPENSHAW, S.J., HADLEY, H.H. Maternal effects on sugar content in soybean seeds. **Crop Science**, v.18, p.581-584, 1978.
- OPENSHAW, S.J., HADLEY, H.H. Selection to modify sugar content of soybean seeds. **Crop Science**, v.21, p.805-808, 1981.
- PIOVESAN, N.D. **Aplicação de Cruzamentos Dialélicos no Melhoramento Genético da concentração Protéico em Soja**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 91p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- PULCINELLI, C.E. **Herança da concentração de proteína em soja**. Piracicaba: ESALQ, 1992. 67p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1992.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; ZIMMERMANN, M.J.O. **Genética Quantitativa em Plantas Autógamas: Aplicações ao melhoramento do Feijoeiro**, Goiânia: Editora UFG, 1993, 272p.
- SINGH, L., HADLEY, H.H. Maternal and cytoplasmic effects on seed protein content in soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v.12, p.583-585, 1972.
- SMITH, J.D., KINMAN, M.L. The use of parent-offspring regression as an estimator of heritability. **Crop Science**, v.5, n.6, p.595-596, 1965.
- SOARES, T.C.B. **Mapeamento de locos associados ao conteúdo de proteínas de reserva em soja**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 113p. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- SONG, Q. J., MAREK, L. F., SHOEMAKER, R. C., LARK K. G., CONCIBIDO, V. C., DELANNAY, X., SPECHT, J. E., CREGAN, P. B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theory Applied Genetics** , 109:122–128, 2004.
- STASWICK, P.E., HERMODSON, M.A., NIELSEN, N.C. Identification of the acidic and basic subunits complexes of glycinin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.256, n.6, p.8752-8755, 1981.
- STRICKBERGER, M.W. **Genetics**. New York: The McMillan, 842p,1985.
- SUNG, S.S., XU, D., BLACK, C.C. Identification of actively filling sucrose sinks. **Plant Physiology**, v.89, p.1117-1121, 1989.
- TEIXEIRA, A.I. **Herdabilidades e correlações entre concentrações de proteína em soja avaliadas por diferentes metodologias**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 53p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2003

- THANH, V.H., SHIBASAKI, K. Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.490, n.2, p.370-384, 1977.
- THORME, J.H. Kinetics of ¹⁴C-photosynthate uptake by developing soybean fruit. **Plant Physiology**, v.65, p.975-979, 1980.
- VELLO, N.A.; HIRAMOTO, D.M.; AZEVEDO FILHO, A.J.B.V. Coefficient of parentage and breeding of Brazilian soybean germplasm. **Revista Brasileira de Genética**, v.11, p.679-697, 1988.
- VERNOOY, C.D., THORME, J.H., LIN, W., RAINBIRD, R.M. Cessation of assimilate uptake in maturing soybean seeds. **Plant Physiology**, v.82, p.222-225, 1986.
- WARNER, J.N. A method for estimating heritability. **Agronomy Journal**, v.44, n.2, p.427-430, 1952.
- WILCOX, J.R., SIMPSON Jr.,A.M. Performance of reciprocal soybean hybrids. **Crop Science**, v.17, p.351-352, 1977.
- WILCOX, J.R., SHIBLES, R.M. Interrelationships among seeds quality attributes in soybean. **Crop Science**, v.41, p.11-14, 2001.
- YAKLICH, R. beta-Conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.2, 2001, p 729-735.

CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE SACAROSE EM GRÃOS DE SOJA.

RESUMO

O conteúdo de sacarose no grão de soja é uma das mais importantes características responsáveis pela melhoria da qualidade, principalmente no que tange ao sabor e ao aroma, sendo um fator crítico na elaboração de produtos a base de soja. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia espectrofotométrica, simples e de baixo custo, para quantificação de sacarose em grãos de soja. Para isso combinou-se a ação da enzima glicose-oxidase, largamente usada na quantificação de glicose, com a invertase, uma enzima hidrolítica que cliva a ligação glicosídica da sacarose formando frutose e glicose. Adaptou-se ainda este sistema para placas de ELISA, possibilitando análises em larga escala a um baixo custo, com grande potencial de aplicação em análises de rotina no melhoramento da soja. Para validar esta nova metodologia, quantificou-se também o teor de sacarose no grão de 14 genótipos de soja por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por um método enzimático já devidamente validado, calculando ao final o coeficiente de correlação entre as metodologias. Estas correlações foram altamente significativas, principalmente entre a quantificação por CLAE e a metodologia por nós desenvolvida ($r=0,9766$), demonstrando ser esta eficiente na quantificação de sacarose.

1. Introdução

O conteúdo de sacarose no grão de soja é uma das mais importantes características responsáveis pela melhoria da qualidade deste, principalmente no que tange ao sabor e ao aroma, sendo um fator crítico na elaboração de produtos a base de soja (TAIRA, 1990). Porém, esta característica recebeu pouca atenção nos programas de melhoramento da soja, o qual se preocupou primeiramente com o aumento do teor do óleo, usado no consumo humano, e posteriormente com o aumento do teor de proteína, majoritariamente usada no preparo de rações animais (CICEK, 1997).

Outro fator que tem dificultado o melhoramento para o teor de sacarose em soja é a dificuldade e os custos envolvidos na quantificação deste dissacarídeo (MAUGHAN et al., 2000). Na literatura encontram-se poucas metodologias disponíveis para este fim. Uma delas é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usada há vários anos por inúmeros pesquisadores (KUO ET AL., 1997; LOWELL e KUO, 1989) em análises quantitativas e qualitativas de inúmeros compostos. Apesar da alta confiabilidade desta análise, ela apresenta custos proibitivos para ser usada no processo de melhoramento, o qual requer a análise de um número muito grande de amostras.

Um método enzimático que consiste na determinação seqüencial de glicose, frutose e sacarose presentes na fração solúvel de um extrato alcoólico foi proposto por STITT et al. (1989). Esta metodologia apresenta custos mais compatíveis, porém ainda assim é muito trabalhosa, demandando uma parcela significativa de tempo para ser concluída.

Visando desenvolver uma metodologia para quantificação de sacarose, que possa ser usada em grãos de soja, com potencial de uso no melhoramento, ou seja, que possibilite a realização de análises em larga escala a um baixo custo, estamos propondo neste trabalho um método enzimático adaptado para o uso em placas de poliestireno de 96 poços ("placas de ELISA"). Este método é baseado na ação combinada da enzima glicose-oxidase, largamente usada em *kits* comerciais para quantificação de glicose, com a invertase, enzima hidrolítica que cliva a ligação glicosídica da sacarose formando frutose e glicose. Para validar esta nova metodologia, analisamos 14 amostras de sementes de soja pelo método enzimático

desenvolvido, denominado método GOD/invertase e também por CLAE e pelo método enzimático desenvolvido por STITT et al. (1989).

2. Material e métodos

2.1. Material genético e reagentes

As amostras analisadas foram constituídas de sementes de seis variedades e de oito linhagens de soja, obtidas junto ao Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO-UFV. O kit BIOCLIN para quantificação de glicose baseado na ação da enzima glicose-oxidase (GOD) foi adquirido junto a Quibase Química Básica. A enzima invertase, a adenosina trifosfato (ATP) e o imidazol foram adquiridos junto à Sigma. As enzimas glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), fosfoglicoisomerase (PGI) e hexocinase foram adquiridas junto à Roche. O β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) foi adquirido junto à Merck. Todos os outros reagentes utilizados possuíam grau analítico. A água utilizada nas análises por CLAE foi purificada pelo sistema MilliQ, e a acetoneitrila grau analítico foi filtrada antes do uso.

2.2. Extração de carboidratos

Vinte sementes de soja de cada amostra foram moídas e o pó resultante foi seco em estufa durante 5 horas a uma temperatura de 105 °C. Após este período, as amostras foram transferidas para um dessecador. Utilizando microtubos, pesou-se aproximadamente 20 mg de amostra em uma balança analítica. A cada tubo adicionou 1,0 mL de etanol 80%, homogeneizou-se por 1,0 min em vortex e foram deixados em um banho-maria a 70 °C por 90 min. Decorrido este período, os tubos foram centrifugados por 10 min a 16.100Xg. O sobrenadante foi coletado e o volume aferido para 1,0 mL em tubos de ensaio volumétricos, transferindo-se a solução para um microtubo. Este extrato foi utilizado tanto na determinação seqüencial de glicose, frutose e sacarose pelo método de STITT quanto na determinação de sacarose pelo método GOD/invertase, desenvolvido neste trabalho.

2.3. Quantificação de sacarose pelo método GOD/invertase

O método GOD/invertase consistiu no seguinte procedimento: em uma “placa de ELISA” de 96 poços foram adicionados em cada poço 85,0 µL de água destilada, 5,0 µL do extrato alcoólico de cada amostra e 10 µL de invertase. A invertase foi preparada numa concentração de 200000 U/mL, em água destilada. Feito isso, a placa foi selada e deixada em banho-maria a 55 °C por 10 minutos. Decorrido este período de tempo a placa foi retirada do banho, adicionou-se 200 µL do reagente GOD (Bioclin), sendo posteriormente selada e deixada em banho-maria a 37 °C por 15 min. Terminado este tempo, a placa foi retirada do banho e deixada a temperatura ambiente por 5 min para resfriar e a leitura da absorvância foi realizada em 490 nm num espectrofotômetro Titertek Multiskan Plus, equipado para realizar leituras em “placas de ELISA”. Em cada placa foram adicionados ainda soluções padrão de sacarose nas concentrações de 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 e 0,25 % (g/100mL). Isto possibilitou a construção de uma curva de calibração e por meio dela determinou-se a concentração de sacarose em cada amostra. A análise foi realizada em triplicata.

2.4. Quantificação de sacarose pelo método enzimático de STITT

O conteúdo de sacarose nas sementes de soja foi também determinado por meio da adaptação do método enzimático publicado por STITT *et al.* (1989). Em cada poço de uma “placa de ELISA” foram adicionados 130 µL de tampão contendo imidazol 200 mM, MgCl₂ 10 mM, NAD⁺ 4 mM, ATP 2mM e 0,4 U de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH); 20 µL do extrato (amostra) e 110 µL de água destilada. Para medir glicose foram adicionados 5 µL de hexocinase (0,2 U), colocou-se a placa no espectrofotômetro e fez-se a leitura de absorvância em 340 nm, esperando-se a estabilização das leituras. Para medir frutose, foram adicionados 5 µL de fosfoglicoisomerase (0,6 u) e também esperou-se a estabilização das leituras de absorvância em 340 nm. Para medir sacarose, foram adicionados 5 µl de invertase (50 U) e esperou-se a estabilização das leituras. Após ter atingido esta última estabilização, os valores máximos das absorvâncias foram registrados e calculou-se os ΔA (valor final menos o inicial, antes de se adicionar cada enzima). Dividindo-se esse ΔA por 6,2 (coeficiente de extinção do NAD⁺), transformou-se os valores de

absorvância em μmol de NADH (ou em μmol de equivalentes-glicose) por poço. Para sacarose, o ΔA deve ser dividido por 2, para depois dividi-lo pelo coeficiente de extinção. Esta análise foi feita em triplicata. As leituras foram feitas em 340 nm em um espectrofômetro Molecular Devices, que realiza a leitura da absorvância em “placas de ELISA” de 96 poços. Além dos brancos 1 (checagem do tampão) e 2 (checagem do sistema, com glicose, frutose e sacarose), foi feita a checagem da linearidade do resultado com o volume do extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

Para o cálculo do teor de sacarose na massa seca foi utilizada a seguinte equação:

Sacarose ($\text{mg g}^{-1} \text{ms}$) = $\{[(0,5 \times \Delta A / 6,2) \times (\text{vol total do extrato} / \text{alíquota na reação})] / \text{massa seca}\} \times 0,3423$.

2.5. Quantificação de sacarose por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Na análise por CLAE, 20 sementes de cada uma das 14 amostras foram moídas em moinho analítico da marca Quimis, peneiradas e liofilizadas durante 10 horas em um liofilizador da marca Edwards, modelo Pirani 501. Pesou-se, em triplicata, aproximadamente 20 mg de soja em tubos de propileno para microcentrífuga de 2,0 mL de capacidade e com tampa rosqueável. Em seguida procedeu-se a extração de lipídeos, adicionando 1,0 mL de éter de petróleo, aquecendo em banho-maria a 42 °C por 5 min sob agitação constante. Decorrido este período as amostras foram homogeneizadas em Vortex, centrifugadas a 16.100Xg por 10 min e descartado o éter de petróleo. Este procedimento foi repetido cinco vezes. Concluída a extração de lipídeos, procedeu-se a extração dos açúcares solúveis, adicionando 1,0 mL de etanol 80% a cada tubo, os quais foram aquecidos em banho-maria em ebulição por 5 minutos, sob agitação. Após este período a amostra foi resfriada até a temperatura ambiente, sendo então homogeneizada e depois centrifugada a 16.100Xg por 5 min. A solução alcoólica foi coletada em um béquer de 10 mL. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Concluída a extração dos açúcares, os béqueres foram deixados em uma estufa a 48 °C até evaporar todo o solvente. Feito isso, ressuspendeu-se os açúcares em 1 mL de etanol 80%, aferiu-se o volume em tubos de ensaio volumétricos e transferiu-se a solução para um

microtubo. Este por sua vez foi congelado a -20°C . Para a aplicação das amostras, estas foram descongeladas, centrifugadas a 16.100Xg por 10 min e filtradas. Foram aplicadas alíquotas de $25\ \mu\text{L}$ em um cromatógrafo da marca Shimadzu, com detecção por índice de refração. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água na proporção 80:20. A coluna utilizada foi a Supelcosil LC-NH₂ da marca Supelco. Visando principalmente a quantificação de sacarose nas amostras, foram também aplicadas soluções padrões contendo quantidades conhecidas dos açúcares frutose, sacarose, rafinose e estaquiose. Por meio de uma curva de calibração determinou-se a concentração de sacarose de cada amostra.

2.6. Correlações entre as metodologias

Foram calculados as estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre as 3 metodologias empregadas na quantificação de sacarose, agrupadas duas a duas. Para isso foi utilizada a seguinte expressão:

$$r_{x_1x_2} = \frac{\text{cov}(x_1, x_2)}{\sqrt{\text{var}(x_1) \text{var}(x_2)}}$$

onde,

$r_{(x_1, x_2)}$ = estimador do coeficiente de correlação entre a concentração de sacarose determinada pelos métodos 1 e 2;

$\text{Cov}(X_1, X_2)$ = estimador da covariância entre a concentração de sacarose determinada pelos métodos 1 e 2;

$\text{var}(x_1)$ e $\text{var}(x_2)$ = estimadores das variâncias da concentração de sacarose determinada pelos métodos 1 e 2, respectivamente.

3. Resultados e Discussão

O método GOD/invertase para quantificação de sacarose em sementes de soja foi desenvolvido com o intuito de possibilitar a análise de um grande número de amostras em um curto período de tempo e com baixo custo. A Figura 1 apresenta de forma esquemática o princípio bioquímico do método. Numa primeira etapa, a sacarose contida na amostra de semente de soja é clivada pela enzima invertase (INV) em uma molécula de glicose (Glc) e outra de frutose (Fru). A molécula de glicose é oxidada pela enzima glicose-oxidase (GOD), formando ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido formado é oxidado na presença de fenol pela enzima peroxidase, formando uma quinona com absorção entre 490 e 520 nm.

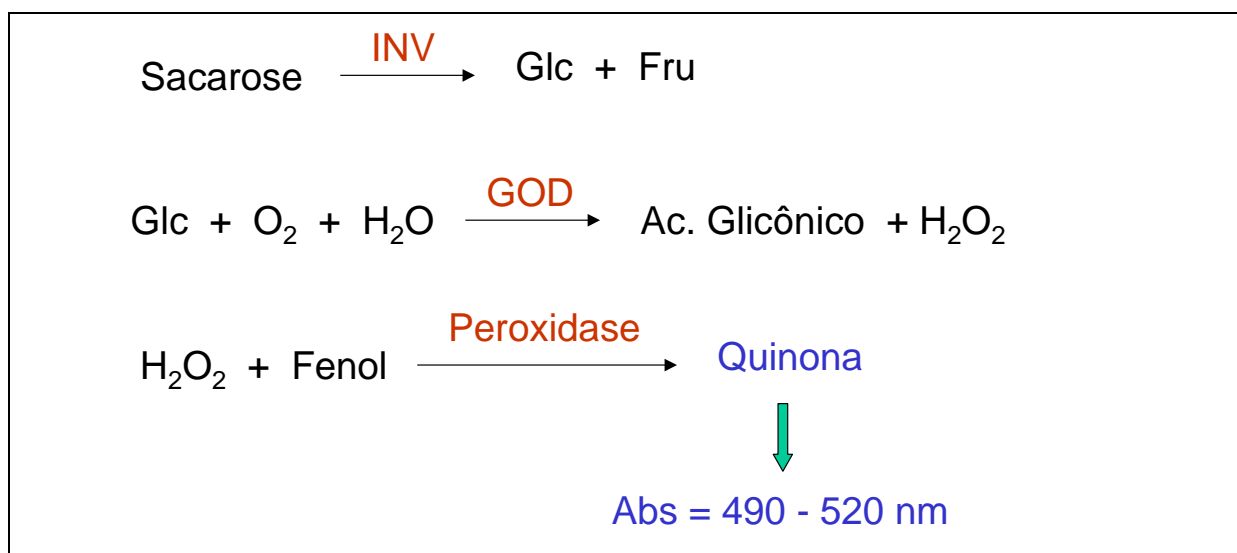


Figura 1: Representação esquemática mostrando as reações químicas que ocorrem e as etapas envolvidas na análise de sacarose pelo método GOD/invertase.

Para se chegar às condições experimentais descritas no item 2.3, foram testadas várias outras condições experimentais, como tempo e temperatura de hidrólise pela invertase, concentração das soluções padrão de sacarose, das amostras e dos demais reagentes enzimáticos utilizados. A Figura 2 representa uma curva de calibração obtida nas condições descritas no item 2.3.

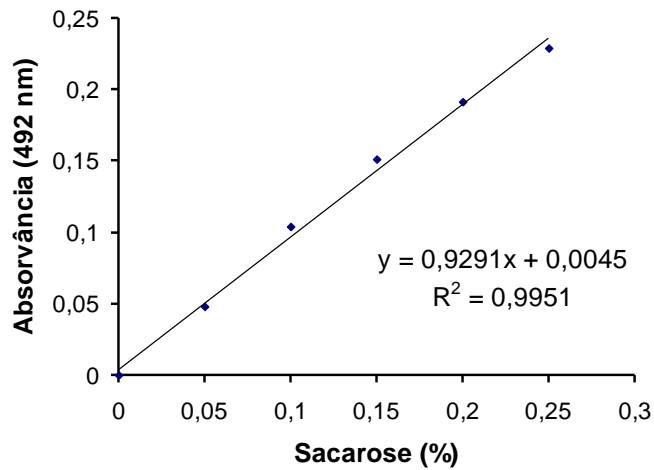


Figura 2: Curva de calibração obtida para o método GOD/invertase

A Figura 3 apresenta o gráfico gerado pelo método de STITT para uma das amostras de soja analisadas e a Figura 4 apresenta esquematicamente as reações e etapas envolvidas no método.

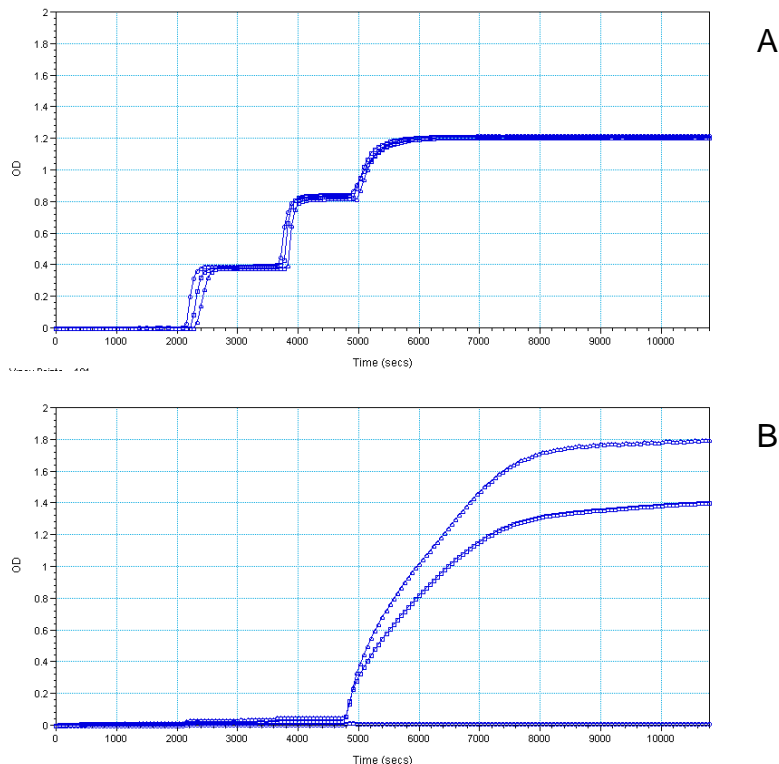


Figura 3: Quantificação de sacarose pelo método de STITT. A) Padrões, Glc=Fru=0,1 mM; Sac=0,05 mM. B) Extrato alcoólico de semente de soja (variedade Wilami).

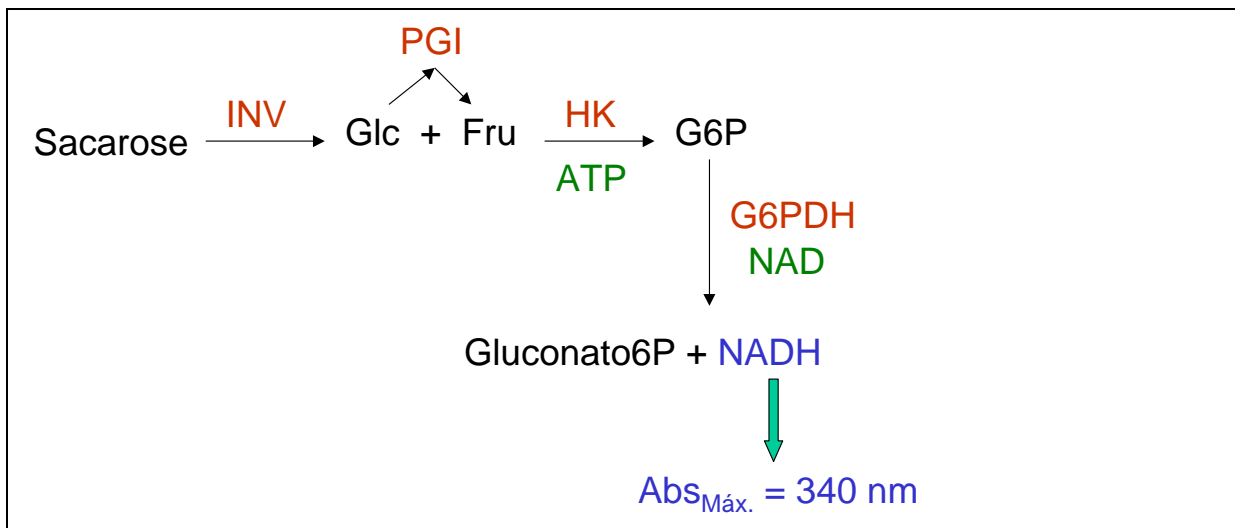


Figura 4: Representação esquemática das reações e etapas envolvidas na quantificação de sacarose pelo método enzimático de STITT.

Pode-se observar pela Figura 4 que o método de STITT consiste primeiramente na clivagem da molécula de sacarose pela invertase formando glicose e frutose. A frutose formada é convertida em glicose pela enzima fosfoglicoisomerase (PGI). Ao final desta etapa cada molécula de sacarose foi convertida em duas moléculas de glicose. A glicose formada é convertida em glicose -6-fosfato (G6P) pela hexocinase (HK) na presença de ATP. A G6P por sua vez é, na presença do NAD, convertida pela glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em gluconato 6P e NADH, o qual absorve radiação em 340 nm. Como as enzimas são adicionadas seqüencialmente, este método permite quantificar, além do teor de sacarose, os teores de glicose e frutose na semente. Contudo podemos observar pelo gráfico da Figura 3B que a semente de soja, como tem sido relatado por diversos pesquisadores, possui muito pouco monossacarídeos, principalmente glicose. Este dado é importante, pois torna confiável a análise de sacarose pelo método GOD/invertase, podendo assumir que praticamente toda a glicose formada durante o ensaio é proveniente da clivagem da sacarose.

A Figura 5 apresenta um cromatograma obtido na análise por CLAE, ressaltando os picos referentes às moléculas de sacarose, rafinose e estaquiose.

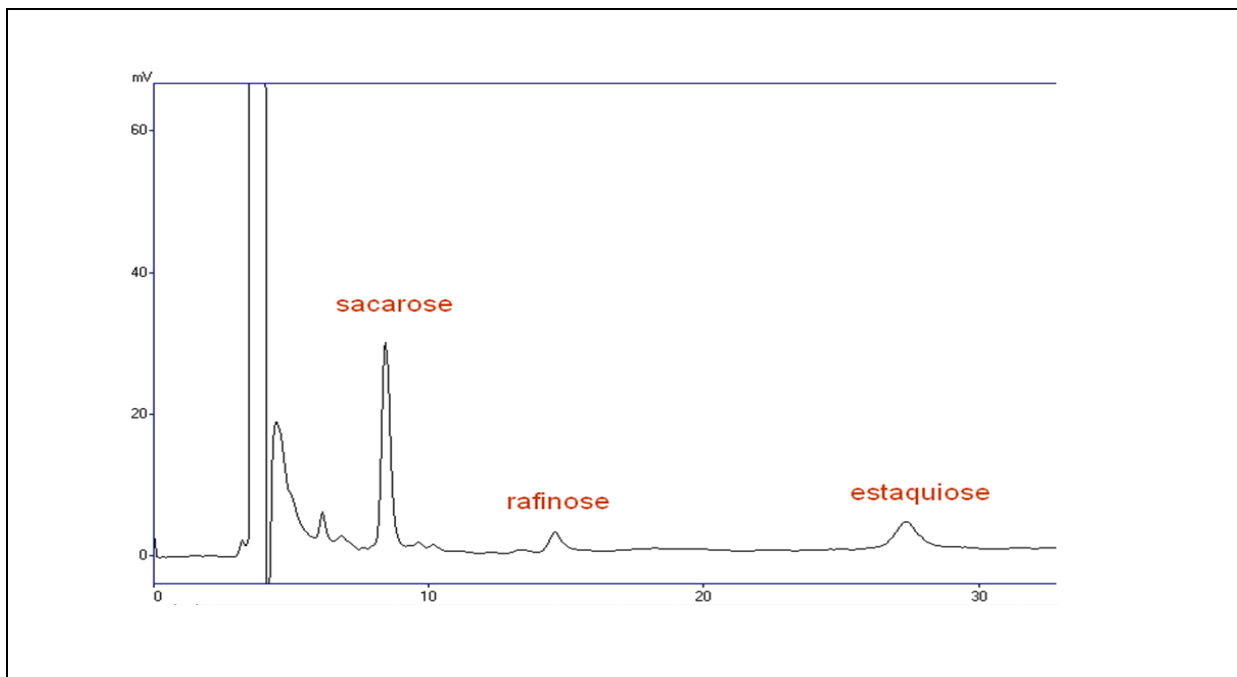


Figura 5: Perfil cromatográfico obtido para extratos alcoólicos de sementes de soja (cultivar Wilami).

As concentrações de sacarose determinadas por estas 3 diferentes metodologias bem como os respectivos coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 1 e 2. A Tabela 3 apresenta os coeficientes de correlação entre as metodologias.

A metodologia desenvolvida para quantificação de sacarose em sementes de soja, denominada GOD/invertase, apresentou altos e significativos coeficientes de correlação, tanto com a análise feita por CLAE ($r=0,9685$, extratos diferentes; $r=0,9854$, mesmo extrato) quanto com a análise feita pelo método enzimático de STITT ($r=0,9461$). O método GOD/invertase apresentou excelente exatidão, indicada pela alta correlação com metodologias já devidamente validadas como é o caso da quantificação por CLAE. O método também apresentou boa precisão, indicada pelos baixos coeficientes de variação, que variaram entre 4,87% a 12,08%. Esta metodologia desenvolvida baseia-se na análise em “placas de ELISA” de 96 poços, requerendo basicamente um espectrofotômetro adaptado para leitura em placas de ELISA e reagentes de baixo custo. Estas características tornam a metodologia apropriada para quantificação de sacarose em sementes em programas de

melhoramento de soja, permitindo a realização de análises em larga escala e a um custo acessível ao programa de melhoramento de soja.

Tabela 1: Concentrações de sacarose (média de três repetições) em % (g/100g) em diferentes amostras de sementes de soja, determinadas pelos métodos CLAE, Glicose-oxidase/Invertase (GOD/INV) e STITT. O coeficiente de variação (CV) para cada metodologia também é mostrado.

Amostra	HPLC		GOD/INV		Stitt	
	Sacarose (%)	CV(%)	Sacarose (%)	CV(%)	Sacarose (%)	CV(%)
CD2053PTA.74.B PL20	2,69 ± 0,40	14,88	2,84 ± 0,34	11,97	7,96 ± 0,62	7,78
CD2053PTA.61.22.4 PL8	4,70 ± 0,41	8,72	4,14 ± 0,28	6,77	9,01 ± 0,43	4,77
CD2053PTA74B.1.1	5,89 ± 0,18	3,06	6,16 ± 0,30	4,87	9,81 ± 0,71	7,24
CD2053PTA152.7.1	5,29 ± 0,22	4,20	5,31 ± 0,41	7,72	10,06 ± 0,82	8,15
CD2053PTA350.35.6.22.1	3,94 ± 0,21	5,32	3,86 ± 0,33	8,56	8,61 ± 0,78	9,06
CD2053PTA295.7.3.3.1	3,91 ± 0,52	13,41	4,61 ± 0,43	9,33	8,92 ± 0,67	7,51
CD2013PTA106A PL4	3,75 ± 0,37	9,74	3,67 ± 0,31	8,45	7,96 ± 0,96	12,06
CD2013PTA171.20.7 PL7	3,33 ± 0,38	11,51	3,86 ± 0,18	4,66	8,13 ± 0,28	3,45
WILAMI	7,90 ± 0,35	4,46	7,12 ± 0,49	6,88	10,55 ± 0,58	5,50
NATTO	5,74 ± 0,12	2,09	5,55 ± 0,67	12,08	9,62 ± 0,9	9,35
LATEGIANT	7,87 ± 0,39	4,93	6,64 ± 0,44	6,62	11,10 ± 1,15	10,36
TADACHA	8,63 ± 0,20	2,28	7,28 ± 0,54	7,42	11,57 ± 0,64	5,53
TOFU	6,98 ± 0,76	10,92	6,04 ± 0,36	5,96	9,80 ± 0,85	8,67
TAMBACURA	7,80 ± 0,54	6,90	7,27 ± 0,57	7,84	10,98 ± 0,63	5,74

Tabela 2: Concentrações de sacarose (média de três repetições) em % (g/100g) em diferentes amostras de sementes de soja, determinadas no mesmo extrato alcoólico pelos métodos CLAE e Glicose-oxidase/Invertase (GOD/INV). O coeficiente de variação (CV) para cada metodologia também é mostrado.

Amostra	CLAE		GOD/INV	
	Sacarose (%)	CV(%)	Sacarose (%)	CV(%)
CD2053PTA.74.B PL20	2,69 ± 0,40	14,88	2,54 ± 0,36	14,29
CD2053PTA.61.22.4 PL8	4,70 ± 0,41	8,72	4,61 ± 0,17	3,71
CD2053PTA74B.1.1	5,89 ± 0,18	3,06	6,54 ± 0,20	3,09
CD2053PTA152.7.1	5,29 ± 0,22	4,20	5,50 ± 0,21	3,85
CD2053PTA350.35.6.22.1	3,94 ± 0,21	5,32	3,86 ± 0,21	5,51
CD2053PTA295.7.3.3.1	3,91 ± 0,52	13,41	3,86 ± 0,71	18,33
CD2013PTA106A PL4	3,75 ± 0,37	9,74	3,26 ± 0,21	6,32
CD2013PTA171.20.7 PL7	3,33 ± 0,38	11,51	2,94 ± 0,02	0,58

Tabela 3: Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre as diferentes metodologias utilizadas na quantificação de sacarose em sementes de soja.

Metodologia	Coeficiente de correlação
CLAE X GOD/INV	0,9685*
CLAE X GOD/INV [#]	0,9854*
CLAE X Stitt	0,9579*
Stitt X GOD/INV	0,9461*

[#] Análise realizada no mesmo extrato alcoólico utilizado para análise por CLAE.

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t .

4. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que:

- A metodologia desenvolvida para quantificação de sacarose em sementes de soja, denominada GOD/invertase, apresentou altos coeficientes de correlação, tanto com a metodologia de CLAE ($r=0,9685$ e $r=0,9854$) quanto com o método enzimático desenvolvido por STITT e colaboradores ($r=0,9461$);
- O método GOD/invertase apresentou excelente exatidão, indicada pela alta correlação com metodologias já devidamente validadas;
- O método GOD/invertase apresentou boa precisão, indicada pelos baixos coeficientes de variação, que variaram entre 4,87% a 12,08%.
- A metodologia desenvolvida baseia-se na análise em placas de ELISA de 96 poços, requerendo basicamente um espectrofotômetro adaptado para leitura em placas de ELISA e reagentes de baixo custo. Estas características a torna apropriada para quantificação de sacarose na semente de soja em programas de melhoramento, permitindo a realização de análises em larga escala a um custo acessível ao programa.

5. Referências

- CICEK, M., 1997. **Genetic analysis of quantitative trait loci associated with seed sucrose content using molecular markers in an interspecific *Glycine* cross.** Blacksburg, VA: FVPIST, 1997. 46p. Dissertation (Master of Science in Crop and Soil Environmental Sciences) – Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University.
- GEATER, C.W.; FEHR, W.R.; WILSON, L.A.; ROBYT, J.F. A more rapid method of total sugar analysis in soybean seed. **Crop Science**, v.41, p.250-252, 2001
- KUO, T.M.; VANMIDDLESWORTH, J.F.; WOLF, W.J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plants. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.32-36, 1988.
- LAURENTIN, A., EDWARDS, C.A. A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.315, p.143-145, 2003.
- LOWELL, C.A., KUO, T.M. Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. **Crop Science**, v.29, p.459-465, 1989.
- MAUGHAN, P.J.; MAROOF, M.A.S.; BUSS, G.R., 2000. Identification of quantitative trait loci controlling sucrose content in soybean (*Glycine max*). **Molecular Breeding** 6:105-111.
- STITT, M.; LILLEY, R.M.; GERHERDT, R.; HELDT, H.W. 1989. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. **Methods Enzymology**.174:518-552.
- TAIRA, H., 1990. Quality of soybeans for processed foods in Japan. **JARQ** 24:224-230.

CAPÍTULO 2

CORRELAÇÕES ENTRE OS CONTEÚDOS DE PROTEÍNA TOTAL, SACAROSE, RAFINOSE E ESTAQUIOSE EM SOJA

RESUMO

O mercado de produtos a base de soja para o consumo humano tem crescido ao longo dos últimos anos, graças à divulgação de resultados de pesquisas que revelaram os benefícios para a saúde humana e o grande valor nutricional dos grãos desta cultura. Para atender a este mercado é necessário o constante desenvolvimento de novas variedades que atendam requisitos necessários à elaboração destes produtos. Entre estes se destacam os teores de sacarose e de açúcares solúveis totais no grão. Este trabalho teve como objetivo selecionar progenitores contendo alto teor de sacarose e analisar os teores de sacarose, rafinose, estaquiose, açúcares solúveis totais e proteínas totais numa população derivada dos progenitores selecionados, estimando-se ao final as correlações entre estas características. Uma população composta de 119 progênies $F_{2:3}$ derivadas do cruzamento entre a linhagem CD2013PTWA4-1-1, derivada de uma variedade que possui alto teor de sacarose, com a isolinha CD2013PTA106B-4, derivada de uma linhagem que possui alto teor de proteína, constituíram o material genético utilizado neste trabalho. Este material, juntamente com os progenitores, foi analisado para as características: concentração de sacarose, analisada por CLAE e pelo método GOD/invertase, concentração de rafinose, estaquiose, açúcares solúveis totais, proteína total e peso de 100 sementes. Foram realizados testes de normalidade para cada característica bem como se determinou as herdabilidades de cada uma e as correlações fenotípicas entre elas. As herdabilidades no sentido amplo das características concentração de sacarose, rafinose, açúcares solúveis totais e proteína foram altas, significando que a maior parte da variação observada nessas características é devida a causas genéticas. As concentrações de sacarose determinadas por CLAE e pelo método GOD/invertase apresentaram coeficientes de correlação de Pearson e Spearman relativamente altos, evidenciando a aplicabilidade do método enzimático desenvolvido. A concentração de sacarose determinada por CLAE apresentou altos e positivos coeficientes de correlação com as concentrações de rafinose, estaquiose e açúcares solúveis totais, indicando a impossibilidade de se fazer seleção indireta de indivíduos com baixos teores de rafinose e estaquiose nesta população. A concentração de sacarose determinada por CLAE correlacionou negativamente com a concentração de proteínas totais,

indicando a impossibilidade de se fazer seleção direta de indivíduos contendo altos teores de ambas as características. A correlação entre as concentrações de rafinose e estaquiose com a concentração de proteína foi não significativa. A correlação entre a concentração de sacarose determinada por CLAE com o peso de 100 sementes não foi significativa. O mesmo comportamento foi observado para as concentrações de rafinose, estaquiose e açúcares solúveis totais. As correlações entre a concentração de sacarose determinadas pelo método GOD/invertase com as demais características foram menores do que aquelas encontradas entre a concentração de sacarose determinadas por CLAE com as outras características. Uma possível explicação pode estar no fato da correlação entre as duas metodologias não ter sido tão alta (54,8%). Isso sugere a necessidade de análises semelhantes em outras populações para aumentar a abrangência desses resultados. Apenas a concentração de estaquiose, pelo teste de Lilliefors, e a concentração de proteína, pelo teste de curtose, foram não significativos, evidenciando uma distribuição aproximadamente normal. As demais características não apresentaram esta distribuição.

1. Introdução

A cultura comercial da soja no Brasil iniciou-se na década de 1970 principalmente com introduções de variedades comerciais americanas ou com variedades derivadas do intercruzamento entre elas. Como os programas de melhoramento existentes na época, tanto nos Estados Unidos quanto os que se desenvolveram aqui no Brasil, priorizavam os quesitos produtividade e teor de óleo, outros quesitos que hoje tem ganhado importância, como o teor de proteína, teor de sacarose e o teor de açúcares solúveis totais se mantiveram baixos nas principais variedades cultivadas no Brasil.

Atualmente, o farelo de soja é um dos principais produtos das indústrias de esmagamento no Brasil, sendo que a maior parte dele destina-se à exportação. O teor de proteína no farelo influencia a determinação de seu valor comercial, assim, torna-se necessário o desenvolvimento de variedades produtivas e com alto teor de proteína (PIOVESAN, 2000).

Nos últimos anos, com a divulgação de resultados de pesquisas que revelaram os benefícios para a saúde humana e o grande valor nutricional dos grãos desta cultura, aumentou muito a procura por produtos a base de soja para o consumo humano.

Contudo, as variedades comerciais brasileiras mais comumente cultivadas não atendem a alguns requisitos necessários na elaboração destes produtos a base de soja, requisitos estes referentes à aparência, ao sabor e ao valor nutricional. Os principais são o tamanho do grão, a uniformidade e os conteúdos de proteína, óleo, carboidratos, cálcio, fibras e cinzas (CHEN e BUSS, 2004). Por exemplo, para a produção do tofu e do miso são preferidas variedades que apresentam sementes grandes (>20 mg/semente) com alto teor de proteína e sacarose e baixo teor de óleo. Já na produção do natto são preferidas variedades com sementes pequenas (<8 mg/semente) contendo alto teor de sacarose e baixo teor de cálcio (GRIFFITHS e WIEDERMANN, 1990). Tão importante é a importância destas características que nos Estados Unidos indústrias de alimentos oferecem prêmios a produtores que queiram plantar variedades que satisfaçam estas características, as quais são menos produtivas do que cultivares comerciais (CARTER, 1987, citado por MAUGHAN *et al.*, 2000).

O conteúdo de sacarose no grão é uma das mais importantes características responsáveis pela melhoria da qualidade deste, sendo um fator crítico na elaboração de produtos a base de soja. Porém, esta característica recebeu pouca atenção no processo histórico do melhoramento da soja, o qual se preocupou primeiramente com o aumento do teor do óleo, usado no consumo humano, e posteriormente com o aumento do teor e da qualidade da proteína, majoritariamente usada no preparo de rações animais.

Outros dois caracteres quantitativos importantes na qualidade de produtos a base de soja é o teor de açúcares totais e o teor de açúcares solúveis totais, que incluem principalmente a soma dos teores de sacarose, estaquiase e rafinose. Embora o aumento do teor de sacarose na semente de soja seja considerado um avanço na melhoria da qualidade desta cultura, os teores de rafinose e estaquiase devem permanecer os mais baixos possíveis, pois ambos são responsáveis pela flatulência causada por produtos a base de soja. Isso porque eles não são digeridos no trato digestivo dos animais monogástricos.

A informação de como estão correlacionados os teores dos diversos constituintes da semente da soja é essencial em um programa de melhoramento que visa melhorar a qualidade dos grãos desta cultura, especialmente se alguma das características avaliadas apresentarem baixa herdabilidade e, ou, tiver problemas de medição e identificação.

Para FALCONER (1987) a herdabilidade de um caráter métrico é uma das mais importantes propriedades de uma população, porque expressa a proporção da variância total que é atribuída ao efeito médio dos genes, o que determina o grau de semelhança entre progenitores. A seleção é efetuada, fundamentalmente, nessa semelhança. Entretanto, RAMALHO *et al.* (1993) ressaltam que a herdabilidade não é apenas uma propriedade do caráter, mas também da população e das condições ambientais a que foram submetidos os indivíduos da população.

FALCONER (1997) ressalta que as estimativas de herdabilidade, os ganhos esperados com a seleção e as correlações das características selecionadas são extremamente importantes para orientar e planejar programas de melhoramento.

Segundo CICEK (1997), uma forma barata, fácil e eficiente para o *screening* de plantas com alto teor de sacarose seria o uso de marcadores moleculares, ferramenta esta que se mostrou muito eficiente no melhoramento para outras características quantitativas, como o teor de óleo e de proteína.

A seleção de características agrônômicas monitorada por marcadores moleculares baseia-se no princípio de que se um gene, ou um bloco de genes, encontra-se ligado a um marcador genético de fácil identificação, então, esse marcador pode ser usado para selecionar a característica de interesse. Segundo HAYWARD *et al.* (1994) o método mais eficaz para este tipo de associação envolve a produção de mapas genéticos detalhados nos quais são localizadas regiões contendo locos para características quantitativas (QTLs).

Este trabalho faz parte do programa de melhoramento de qualidade da soja desenvolvido pelo BIOAGRO/UFV, que visa o desenvolvimento de variedades apropriadas à elaboração de produtos à base de soja destinados ao consumo humano. Este programa pretende produzir variedades que combinem as características alto teor de sacarose (~10%), baixos teores de rafinose e estaquiose, alto teor de proteína, alta relação 11S/7S e alta produtividade. Para isso tivemos como objetivos: (i) selecionar progenitores contendo alto teor de sacarose para uso no programa de retrocruzamentos; (ii) analisar as concentrações de sacarose, rafinose, estaquiose, açúcares solúveis totais, proteínas totais e peso de 100 sementes numa população derivada dos progenitores selecionados; (iii) estimar as herdabilidades dessas características analisadas; (iv) estimar as correlações fenotípicas entre essas características.

2. Material e Métodos

2.1. Material Genético

Foram utilizadas 119 progênies $F_{2:3}$ (CD201H48), derivadas do cruzamento entre a linhagem CD2013PTWA4-1-1 (P1-progenitor materno) com a isolinha CD2013PTA106B-4 (P2-progenitor paterno). Como podemos observar na Figura 1, P1 é uma linhagem derivada do cruzamento entre a variedade Wilami, que possui alto teor de sacarose (7,9 %), com a variedade comercial CD201 (3,5 %). P2 é uma isolinha derivada do cruzamento entre a linhagem BR8014383, que possui alto teor de proteína (48,0 %), com a variedade comercial CD201 (38,0 %). Além das sementes de cada um dos 119 indivíduo da população $F_{2:3}$, que eram sementes derivadas de plantas F_2 , foram analisadas também sementes de 12 plantas do progenitor materno (P1) e 23 plantas do progenitor paterno (P2), visando calcular a variância ambiental e, conseqüentemente, a herdabilidade no sentido amplo.

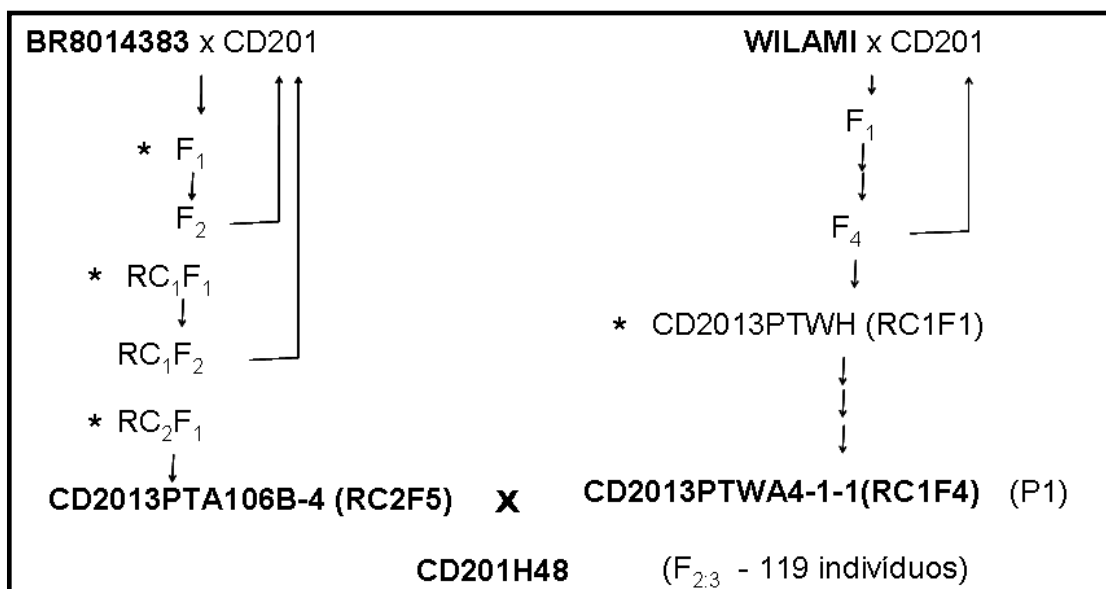


Figura 1: Histórico da população CD201H48, usada nas análises deste trabalho.

2.2. Análise da concentração de proteína total

O teor de proteína total da semente de cada indivíduo da população F_{2:3} foi determinado, tomando-se uma amostra de 30 sementes de cada planta. Cada amostra foi moída e seca em estufa a 105 °C por 5 horas. A determinação foi realizada pelo método Kjeldahl modificado, segundo as normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), que requer um mínimo de trezentos miligramas de soja moída. Na fase de digestão, após a obtenção do material aparentemente digerido com ácido sulfúrico, foi adicionado o peróxido de hidrogênio 30%, sendo a mistura levada ao aquecimento por mais 30 minutos. Na fase de destilação, a amônia liberada foi recolhida em solução de ácido bórico 4%. Obteve-se o teor de nitrogênio pela titulação da amônia com ácido clorídrico 0,05%. A partir do teor de nitrogênio, foi calculada a porcentagem de proteínas totais da amostra, empregando-se o fator de nitrogênio 6,25 no material analisado. Os resultados dos teores de proteína foram expressos em porcentagem, com base na matéria seca obtida pela secagem em estufa a 105°C por 24 horas.

2.3. Análise da concentração de açúcares solúveis totais

Para a determinação do teor de açúcares solúveis totais, que consiste basicamente na soma dos teores de sacarose, rafinose e estaquiose, foi usada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na análise, 20 sementes de cada uma das amostras foram moídas em moinho analítico da marca Quimis e secas em estufa a 105°C por 24 horas. Pesou-se, em duplicata, aproximadamente 20 mg de soja em tubos de propileno para microcentrífuga, de 2,0 mL de capacidade e com tampa rosqueável. Em seguida procedeu-se a extração de lipídeos, adicionando 1,0 mL de éter de petróleo, aquecendo em banho-maria a 42 °C por 5 min sob agitação constante. Decorrido este período as amostras foram homogeneizadas em Vortex, centrifugadas a 16.100 g por 10 min e descartado o éter de petróleo. Este procedimento foi repetido por 5 vezes. Concluída a extração de lipídeos, procedeu-se a extração dos açúcares solúveis, adicionando 1,0 mL de etanol 80% a cada tubo, os quais foram aquecidos em banho-maria em ebulição por 5 minutos, sob agitação. Após este período a amostra foi deixada resfriar até a temperatura ambiente, sendo então homogeneizada e depois centrifugada a 16.100 g por 5 min.

A solução alcoólica foi coletada em um béquer de 10 mL. Este procedimento foi repetido por 3 vezes. Concluída a extração dos açúcares, os béquers foram deixados em uma estufa a 48 °C até evaporar todo o solvente. Feito isso, ressuspendeu-se os açúcares em 1 mL de etanol 80%, aferiu-se o volume em tubos de ensaio volumétricos e transferiu-se a solução para um tubo eppendorf. Este por sua vez foi congelado em freezer a -20 °C. Para a aplicação das amostras, estas foram descongeladas, centrifugadas a 16.100 g por 10 min e filtradas. Foram aplicadas alíquotas de 25 µL em um cromatógrafo da marca Shimadzu, com detecção por índice de refração. A fase móvel utilizada foi acetonitrila:água na proporção 80:20. A coluna utilizada foi a Supelcosil LC-NH₂ da marca Supelco. Visando principalmente a quantificação de sacarose nas amostras, foram também aplicadas soluções padrões contendo quantidades conhecidas dos açúcares frutose, sacarose, rafinose e estaquiose. Por meio de uma curva de calibração determinou-se a concentração de sacarose de cada amostra.

2.4. Análise da concentração de sacarose pelo método GOD/invertase.

O conteúdo de sacarose nas sementes de soja foi determinado através do método GOD/invertase, descrito no capítulo 1 desta tese.

Primeiramente foi feita a extração dos açúcares da semente. 20 sementes de soja de cada amostra foram moídas e depois secas em estufa durante 5 h a uma temperatura de 105 °C. Após este período, as amostras foram transferidas para um dessecador. Utilizando tubos eppendorf, pesou-se aproximadamente 20 mg de amostra em uma balança analítica em triplicata. A cada tubo adicionou 1,0 mL de etanol 80%, homogeneizou-se por 1,0 min em Vortex e foram deixados em um banho-maria a 70 °C por 90 min. Decorrido este período, os tubos foram centrifugados por 10 min a 16.100 g. O sobrenadante foi coletado e aferiu-se o volume para 1,0 mL em tubos de ensaio volumétricos, transferindo-se a solução para um tubo eppendorf.

Em uma “placa de ELISA” de 96 poços foram adicionados em cada poço 85,0 µL de água destilada, 5,0 µL do extrato alcoólico de cada amostra e 10 µL de invertase. A invertase foi preparada numa concentração de 10mg/mL, em água destilada. Feito isso, a placa foi selada e deixada em banho-maria a 55 °C por 10 minutos. Decorrido este período de tempo a placa foi retirada do banho, adicionou-

se 200 µL do reagente GOD (Bioclin), sendo posteriormente selada e deixada em banho-maria a 37 °C por 15 min. Terminado este tempo, a placa foi retirada do banho e deixada a temperatura ambiente por 5 min para resfriar e fizemos a leitura da absorbância em 490 nm num espectrofotômetro Titertek Multiskan Plus, equipado para realizar leituras em “placas de ELISA”. Em cada placa foram adicionados ainda soluções padrão de sacarose nas concentrações de 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 e 0,25 % (g/100mL). Isto possibilitou a construção de uma curva de calibração e por meio dela determinarmos a concentração de sacarose em cada amostra. As análises foram realizadas em triplicata.

2.5. Determinação do peso de 100 sementes

Para determinar o peso de 100 sementes de cada planta da população F_{2:3} contou-se o número de sementes produzidas pela planta e pesou-se este número total de sementes, obtendo-se o peso total das sementes. Por regra de três simples determinou-se o peso de 100 sementes.

2.6. Análises Genético Estatísticas

2.6.1. Estimativa da herdabilidade das características avaliadas

Para estimar a herdabilidade no sentido amplo na populações F₂ para cada característica analisada, que foram as concentrações de proteína total, sacarose, rafinose, estaquiiose e açúcares solúveis totais, utilizou-se a expressão abaixo:

$$h^2_a = \sigma^2_G / \sigma^2_P$$

onde,

h^2_a = estimador da herdabilidade no sentido amplo;

σ^2_G = estimador da variância genotípica na população F₂;

σ^2_P = estimador da variância fenotípica na população F₂.

2.6.2. Estimativa das correlações fenotípicas das características avaliadas

Para estimar os coeficientes de correlação entre as concentrações das características analisadas (concentrações de proteína total, sacarose, rafinose, estaquiose, açúcares solúveis totais e peso de 100 sementes) foram utilizados dois tipos de correlação: a correlação de Pearson e a correlação de Spearman.

As estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson foram obtidas por meio da seguinte expressão:

$$r_{(X1,X2)} = \text{Cov}(X1,X2) / (\sigma^2_{X1} \cdot \sigma^2_{X2})^{1/2}$$

onde,

$r_{(X1,X2)}$ = estimador do coeficiente de correlação entre a concentração das características 1 e 2;

$\text{Cov}(X1,X2)$ = estimador da covariância entre a concentração das características 1 e 2;

σ^2_{X1} e σ^2_{X2} = estimador das variâncias da concentração das características 1 e 2, respectivamente.

Já as estimativas dos coeficientes de correlação de Spearman foram obtidas com o auxílio do aplicativo GENES (CRUZ, 2001), que emprega a seguinte equação:

$$r_{(X1,X2)} = 1 - \{ 6\sum d_i^2 / n(n^2-1) \}$$

onde,

d_i = diferença de posto para cada par de observações;

n = número de observações.

2.7. Testes de normalidade

2.7.1. Teste de assimetria

O coeficiente de assimetria fornece o grau de desvio, ou afastamento da simetria, de uma distribuição. A estimativa do coeficiente de assimetria (s) de uma variável x é dada por:

$$\hat{s} = \frac{n}{(n-1)(n-2)} \sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i - \bar{x}}{s(x)} \right)^3$$

onde:

n= número de observações;

s(x) = desvio padrão da amostra de dados;

x_i = valor máximo da classe i;

\bar{x} = média geral da amostra de dados.

Nesta expressão, se o resultado for zero, a distribuição é simétrica; se o resultado for negativo, a distribuição é assimétrica negativa (inclinada para a esquerda) e se o resultado for positivo, a distribuição é assimétrica positiva (inclinada para a direita).

As hipóteses $H_0: s=0$ e $H_a: s \neq 0$ foram testadas pelo teste t:

$$t = \frac{\hat{s}}{\sqrt{\frac{6n(n-1)}{(n-2)(n+1)(n+3)}}$$

O valor de t calculado foi comparado ao de t tabelado, ao nível α de probabilidade, com infinitos graus de liberdade. Se $|t_{cal}| \geq t_{tab}$, rejeita-se H_0 . (SCHUSTER e CRUZ, 2004).

2.7.2. Teste de curtose

Curtose é o grau de achatamento de uma distribuição, considerado usualmente em relação à distribuição normal. Segundo SCHUSTER e CRUZ (2004), para se estimar o grau de curtose (k) de uma variável X, utilizam-se a seguinte fórmula:

$$\hat{k} = \frac{n(n+1)}{(n-1)(n-2)(n-3)} \sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i - \bar{X}}{s(x)} \right)^4 - \frac{3(n-1)}{(n-2)(n-3)}$$

Se o resultado for zero, a distribuição de freqüências é a própria distribuição normal, sendo chamada de mesocúrtica, se o resultado for negativo, a distribuição é achatada (alta variabilidade) e chamada de planicúrtica e se o resultado for positivo, a distribuição é concentrada em torno da média (alta homogeneidade) e chamada de leptocúrtica.

Para testar a hipótese $H_0: k=0$ vs $H_a: k \neq 0$ tem-se o teste t:

$$t = \frac{\hat{k}}{\sqrt{\frac{24n\hat{k}^2}{(n-3)(n-2)(n+3)(n+5)}}$$

Este valor de t calculado foi comparado ao valor de t tabelado, a nível α de probabilidade, com infinitos graus de liberdade. Se $|t_{cal}| \geq t_{tab}$, rejeita-se H_0 .

2.7.3. Teste de Lilliefors

O teste de Lilliefors apresenta o mesmo princípio que o teste de qui-quadrado (χ^2), ou seja, dada uma amostra de tamanho n, agrupam-se os dados em k classes, podendo-se formar uma distribuição de freqüência com intervalos de classes iguais a 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 do desvio padrão. As freqüências esperadas (FE_i) de cada classe são encontradas de acordo com a distribuição normal reduzida z, multiplicando-se a área de cada classe pelo número total de observações (n) e as freqüências observadas (FO_i) são os números de observação de cada classe (n_i). Para isso, obtêm-se os valores de z com a introdução de uma modificação, ampliando o seu uso para os casos em que a média e a variância não são conhecidas, mas sim estimadas por meio dos dados da amostra, como segue:

$$z_i = \frac{X_i - \bar{X}}{s}, \text{ em que}$$

z_i = valor da variável normal padronizada da classe i;

X_i = valor máximo da classe i;

\bar{X} = média geral da amostra de dados;

s = desvio padrão da amostra de dados.

Na maioria das vezes, o teste de Lilliefors é mais poderoso que o χ^2 .

O teste de Lilliefors pressupõe o cálculo de todos os z_i , os quais devem ser ordenados para as seguintes considerações:

$F(z_i) = FE_{i \leq z_i}$ = valor da tabela de distribuição normal reduzida (área);

$S(z_i) = FO_{i \leq z_i} = n_i/n$, em que:

n_i = número de valores observados $\leq z_i$;

n = número total de observações da amostra.

$D = \text{Máximo } |F(z_i) - S(z_i)|$.

O teste é bilateral, como segue:

H_0 : é razoável estudar os dados através da distribuição normal;

H_a : não é razoável estudar os dados através da distribuição normal.

Rejeita-se a hipótese de nulidade quando $D_{\text{cal}} \geq D_{\text{tab}}$, em um nível α de probabilidade com n observações. Deve-se lembrar, porém, que a não rejeição de H_0 indica apenas que esta é uma razoável aproximação da distribuição desconhecida.

3. Resultados e Discussão

3.1. Concentração de proteína total.

A análise da concentração de proteína total na população $F_{2:3}$ e nos progenitores foi realizada pelo método de Kjeldahl, método este que é considerado padrão para análise da concentração de proteína em alimentos. A Figura 1 apresenta a distribuição das concentrações de proteína na população e nos progenitores. A população $F_{2:3}$ apresentou concentrações variando de 35,19% a 47,49% de proteína, com média igual a 39,93%; os progenitores materno (P1) e paterno (P2) apresentaram médias iguais a 40,65% e 38,45%, respectivamente (Quadro 1).

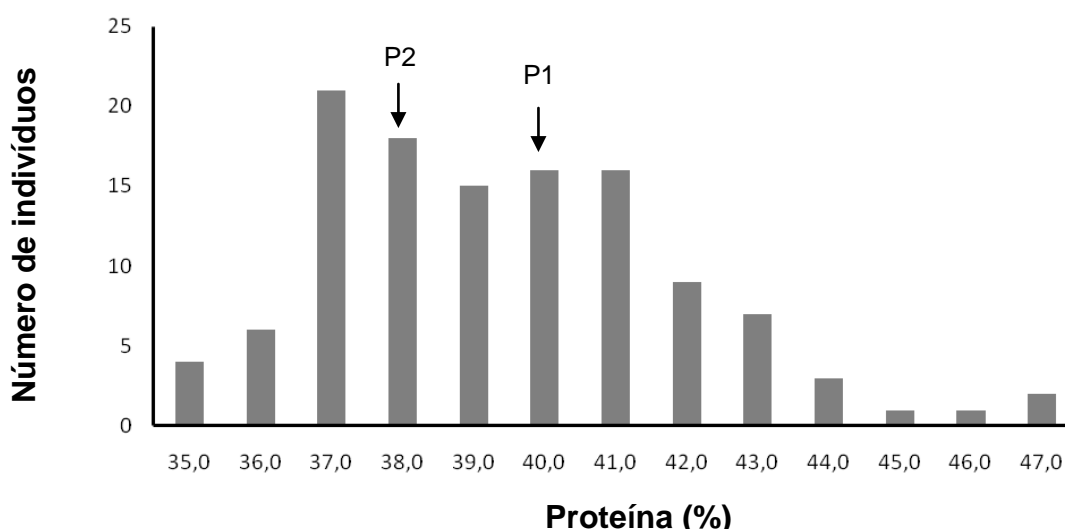


Figura 1: Concentrações de proteína determinadas pelo método de Kjeldahl na população $F_{2:3}$. As médias dos progenitores paterno (P2, 38,45%) e materno (P1, 40,65%) estão indicadas pelas setas.

3.2. Concentração de açúcares solúveis totais.

A concentração de açúcares solúveis totais na semente da soja, como já foi mencionada anteriormente, é um quesito importante no preparo de produtos a base de soja tanto para o consumo humano quanto para o para o consumo de outros animais monogástricos. Isto porque essa fração consiste basicamente na soma dos teores de sacarose, rafinose, estaquiose e monossacarídeos presentes na semente. Como a semente de soja possui quantidades muito pequenas de monossacarídeos, a soma das concentrações de sacarose, rafinose e estaquiose, as quais podem ser obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seria uma boa estimativa do teor de açúcares solúveis totais. Sendo assim, usando o CLAE, determinamos as concentrações de sacarose, rafinose e estaquiose isoladamente e calculamos a concentração de açúcares solúveis totais somando as três concentrações.

As Figuras 2, 3, 4 e 5 apresentam a distribuição dessas concentrações na população, bem como nos progenitores. O Quadro 1 apresenta as médias dessas características na população, os valores mínimo e máximo, e as médias nos progenitores. Podemos observar que a concentração de açúcares solúveis totais avaliada na população $F_{2:3}$ variou de 6,22% a 16,49%, com média igual a 10,13%. Estes valores aproximam-se dos relatados por CHEN e BUSS (2004), os quais encontraram uma variação de 4,1% a 15,1 % em bancos de germoplasma. Esta grande variação encontrada nessa população demonstra o seu potencial de uso num programa de melhoramento. Os progenitores (materno e paterno) apresentaram concentrações iguais a 12,94% e 13,15%, respectivamente.

Quanto às concentrações de sacarose, rafinose e estaquiose determinadas por CLAE apresentaram variação na população $F_{2:3}$ de 2,32% a 6,66%, média igual a 3,93%, para sacarose; 0,97% a 4,68%, média igual a 1,55%, para rafinose; 2,85% a 7,44%, média igual a 4,64%, para estaquiose (Quadro 1). Esses dados demonstram uma grande variabilidade para as três características. CHEN e BUSS (2004) encontraram variações em bancos de germoplasma de soja de 1,5% a 10,2% para sacarose, 0,1% a 2,1% para rafinose e 1,4% a 6,7% para estaquiose.

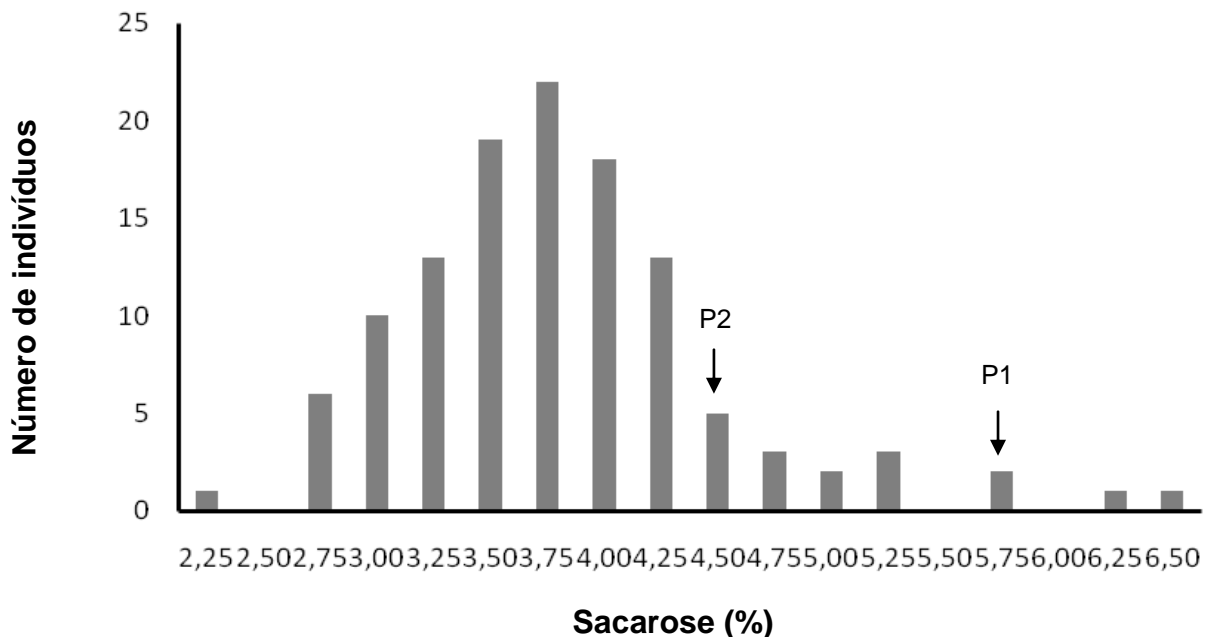


Figura 2: Concentrações de sacarose determinadas por CLAE na população $F_{2:3}$. As médias dos progenitores (paterno P2, 4,68% e materno P1, 5,80%) estão indicadas pelas setas.

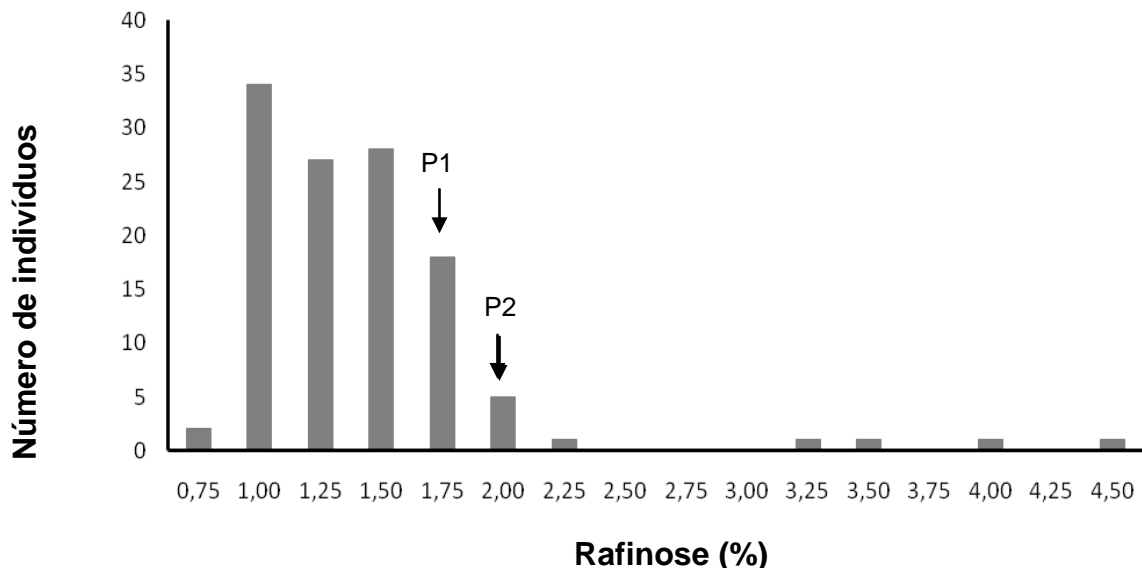


Figura 3: Concentrações de rafinose determinadas por CLAE na população $F_{2:3}$. As médias dos progenitores (paterno P2, 2,21% e materno P1, 1,90%) estão indicadas pelas setas.

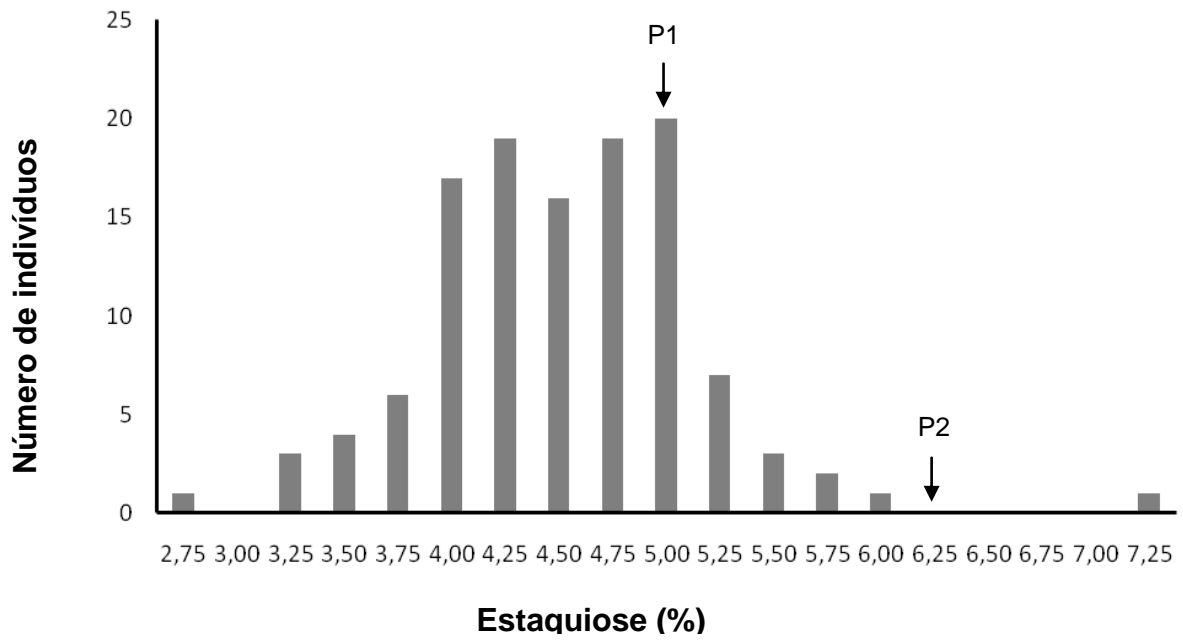


Figura 4: Concentrações de estaquiose determinadas por CLAE na população F_{2:3}. As médias dos progenitores (paterno P2, 6,26% e materno P1, 5,24%) estão indicadas pelas setas.

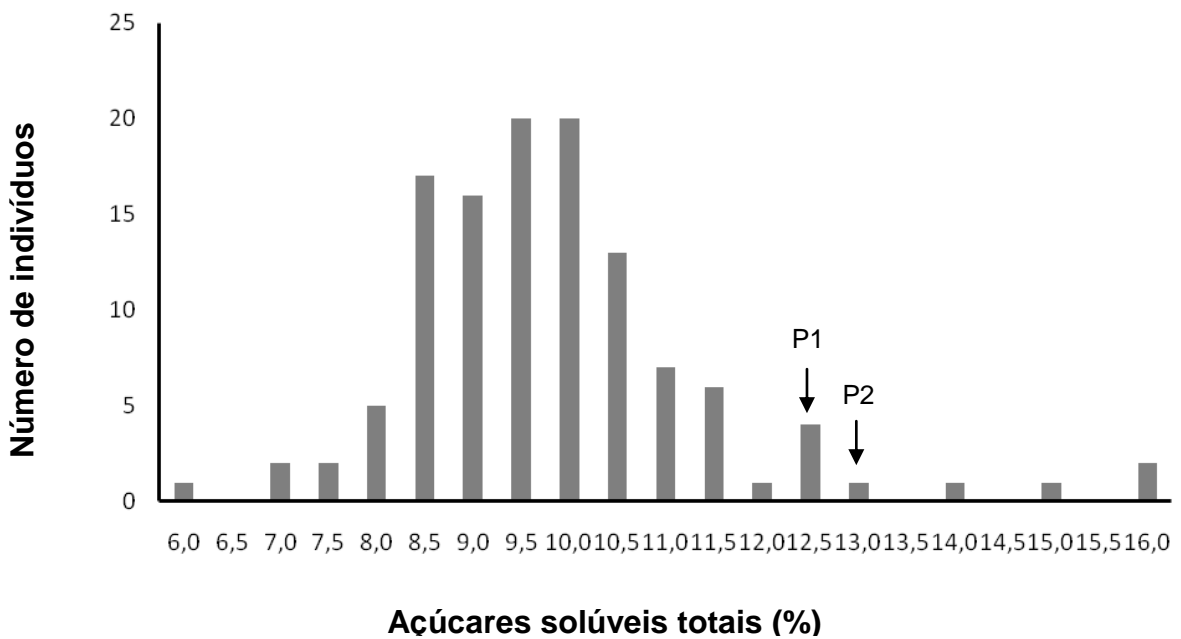


Figura 5: Concentrações de açúcares solúveis totais (sacarose + rafinose + estaquiose) determinadas por CLAE na população F₂. As médias dos progenitores (paterno P2, 13,15% e materno P1, 12,94%) estão indicadas pelas setas.

3.3. Concentração de sacarose pelo método GOD/invertase.

No Capítulo 1 dessa tese relatamos o desenvolvimento e a validação de um método analítico para quantificação de sacarose em sementes de soja, o qual combina a ação das enzimas glicose-oxidase (GOD) e invertase. Esse método foi denominado método GOD/invertase e foi desenvolvido justamente para ser utilizado na análise da concentração de sacarose em programas de melhoramento de soja, visto que ele aliá as qualidades de possuir um baixo custo por análise, permite a análise de um grande número de amostras num período curto de tempo e apresenta alta correlação com métodos confiáveis de análise, como o CLAE.

Sendo assim, utilizamos essa metodologia para determinar a concentração de sacarose na população $F_{2:3}$ e nos respectivos progenitores. A Figura 6 apresenta a distribuição das concentrações de sacarose na população. A população $F_{2:3}$ apresentou concentrações variando de 2,56% a 7,43%, com média igual a 4,41%; os progenitores materno (P1) e paterno (P2) apresentaram médias iguais a 5,77% e 3,78%, respectivamente (Quadro 1).

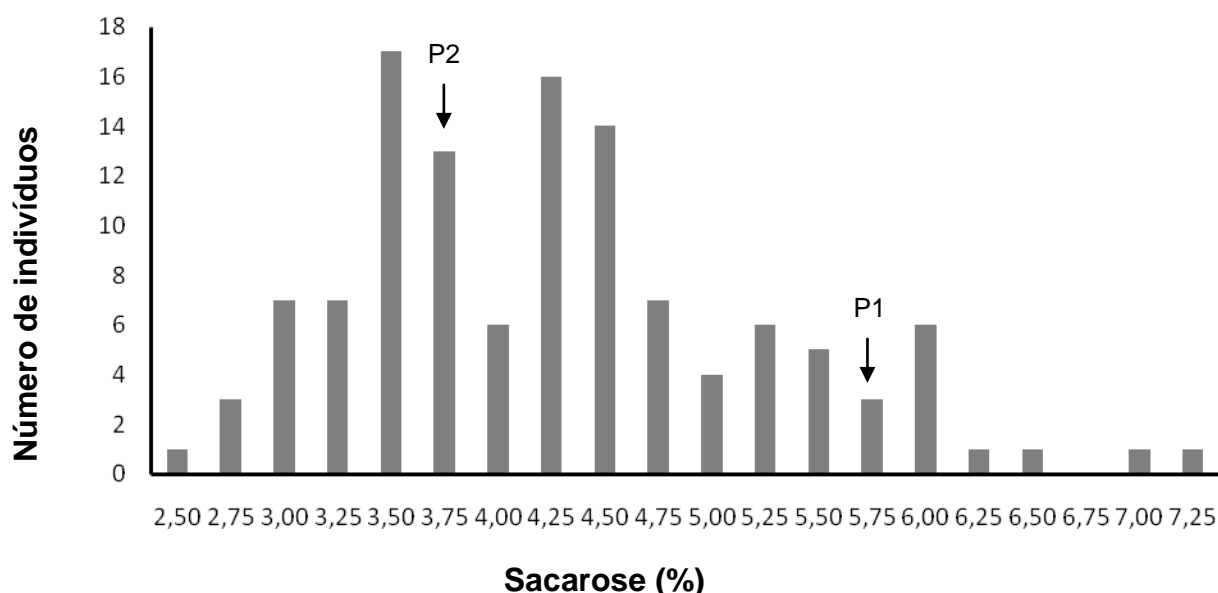


Figura 6: Concentrações de sacarose determinadas pelo método GOD/invertase na população $F_{2:3}$. As médias dos progenitores (paterno P2, 3,78% e materno P1, 5,77%) estão indicadas pelas setas.

Comparando os dados obtidos para as concentrações de sacarose avaliadas por CLAE e pelo método GOD/invertase, podemos observar certas semelhanças. Utilizando CLAE, foi encontrada uma variação de 2,32% a 6,66%, com média igual a 3,93%. Pelo GOD/invertase a variação foi de 2,56% a 7,43% com média igual a 4,41%. Nos progenitores também foi observado esta semelhança, visto que por CLAE, P1=5,8% e P2=4,68%; por GOD/invertase, P1=5,77% e P2=3,78%. Estes dados evidenciam uma boa correlação entre as duas metodologias.

3.4. Análise do peso de 100 sementes

O peso de 100 sementes, por ser uma característica que indica o tamanho da semente de soja, é importante para algumas variedades de soja destinadas a usos específicos, como para produção de alguns produtos a base de soja usados no consumo humano, por exemplo, o tofu e o miso.

A Figura 7 apresenta a distribuição dessa característica na população. O Quadro 1 nos mostra que o peso de 100 sementes variou na população F_{2:3} de 10,40 g a 34,88 g, com média igual a 15,18 g. Estes valores indicam boa variabilidade e potencial de uso da população no melhoramento para essa característica.

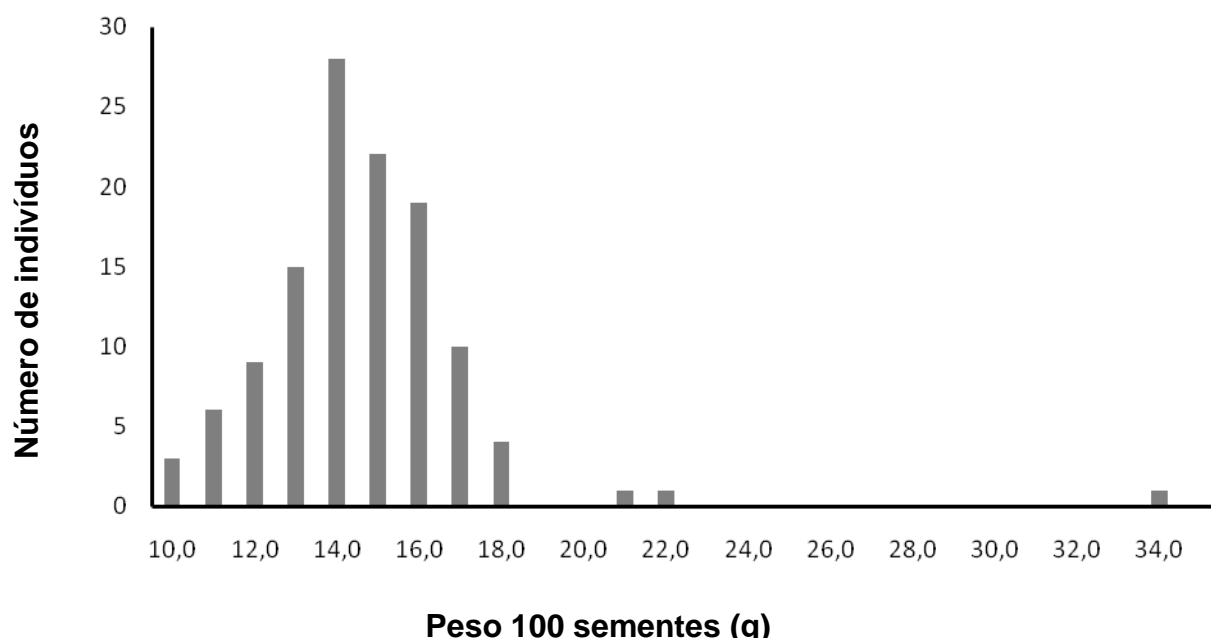


Figura 7: Peso de 100 sementes (em g) determinado por pesagem e contagem do número de sementes para cada indivíduo da população F_{2:3}.

Quadro 1: Média das características avaliadas na população F_{2:3} e nos progenitores materno (CD2013PTWA4-1-1) e paterno (CD2013PTA106B-4). Sacarose-CLAE = concentração de sacarose determinada por CLAE; Sacarose-GOD = concentração de sacarose determinada pelo método GOD/invertase; Peso de 100 sementes (P100sementes) está em gramas. As demais características estão em porcentagem (% = g/100 g). AST = açúcares solúveis totais.

Característica	População F _{2:3}				CD2013PTWA4-1-1		CD2013PTA106B-4	
	n	média ± SD	min.	max.	n	média ± SD	n	média ± SD
Sacarose-CLAE	119	3,93 ± 0,71	2,32	6,66	12	5,80 ± 0,17	23	4,68 ± 0,35
Sacarose-GOD	119	4,41 ± 0,96	2,56	7,43	6	5,77 ± 0,78	24	3,78 ± 0,37
Rafinose	119	1,55 ± 0,55	0,97	4,68	12	1,90 ± 0,17	23	2,21 ± 0,34
Estaquiose	119	4,64 ± 0,63	2,85	7,44	12	5,24 ± 0,26	23	6,26 ± 0,60
AST	119	10,13 ± 1,60	6,22	16,49	12	12,94 ± 0,20	23	13,15 ± 1,05
Proteína	119	39,93 ± 2,53	35,19	47,49	12	40,65 ± 1,21	23	38,45 ± 1,19
P100sementes	119	15,18 ± 2,69	10,40	34,88	-	-	-	-

- Valores não determinados.

3.5. Herdabilidades

Concluída a quantificação das concentrações de sacarose pelos métodos CLAE e GOD/invertase, e das concentrações de proteína total, rafinose, estaquiose e açúcares solúveis totais, estimou-se a herdabilidade no sentido amplo (h^2_a) para cada uma dessas características. Estas estimativas foram obtidas dividindo-se a variância genotípica pela fenotípica, conforme metodologia utilizada por MAHMUD e KRAMER (1951).

No presente trabalho, a variância fenotípica (σ^2_F) foi estimada tomando-se o valor estimado da variância das concentrações de cada característica na população F_2 . A variância ambiental (σ^2_E) foi estimada com base na variação das concentrações das características nos progenitores pela equação:

$$\sigma^2_E = [(n_{P1} \cdot \sigma^2_{P1}) + (n_{P2} \cdot \sigma^2_{P2})] / (n_{P1} + n_{P2})$$

onde σ^2_{P1} e σ^2_{P2} são os estimadores das variâncias das concentrações de cada característica nos progenitores 1 e 2, respectivamente; n_{P1} e n_{P2} são os números de indivíduos analisados dos progenitores 1 e 2, respectivamente. Como podemos considerar que a variância fenotípica total corresponde à soma da variância ambiental com a variância genética, a estimativa da variância genética (σ^2_G) foi determinada subtraindo-se da variância fenotípica a variância ambiental. As concentrações de cada característica nos progenitores foram usadas na estimativa da variância ambiental pelo fato das plantas de cada progenitor ser consideradas geneticamente idênticas, o que permite inferir que a variação ocorrida nas concentrações das características avaliadas entre as plantas de cada progenitor é devida unicamente a causas ambientais. Como os progenitores foram cultivados no mesmo ambiente da população F_2 analisada, a variância ambiental na população $F_{2:3}$ pode ser considerada como sendo igual à variância ambiental estimada para os progenitores.

O Quadro 2 apresenta os valores estimados das variâncias fenotípica, genotípica e ambiental e os valores estimados da herdabilidade no sentido amplo

para a concentração de cada característica avaliada na populações $F_{2:3}$ e nos progenitores.

Pelos resultados apresentados no Quadro 2 observa-se que as estimativas de herdabilidade no sentido amplo para a concentração de sacarose diferiram de acordo com a metodologia de análise empregada. Quando a concentração de sacarose foi determinada pelo método cromatográfico (CLAE), a herdabilidade dessa característica foi igual a 80,8%. Já quando a quantificação de sacarose foi feita pelo método GOD/invertase a herdabilidade foi igual a 68,1%. MAUGHAN e colaboradores (2000) quantificaram o teor de sacarose em 149 indivíduos de uma população $F_{2:3}$ usando um método enzimático e encontraram uma herdabilidade de 82,5 % para esta característica. Este resultado está muito próximo daquele obtido quando usamos o CLAE na quantificação de sacarose (80,8%).

Segundo FALCONER (1987), caracteres com herdabilidade superiores a 50% indicam que a contribuição de causas genéticas será mais pronunciada do que a atribuída a fatores do ambiente na expressão fenotípica do caráter. Logo, as estimativas de herdabilidade encontradas sugerem que na população estudada existe potencial para se realizar a seleção para o teor de sacarose. Sugerem também que o método GOD/invertsase pode ser muito útil em programas de melhoramento que visem aumentar o teor de sacarose na semente da soja, embora tenha apresentado uma estimativa de herdabilidade um pouco menor do que o CLAE.

Podemos observar também pelo Quadro 2 que as estimativas de herdabilidade foram altas para as concentrações de rafinose (71,1%) e açúcares solúveis totais (70,8%). Porém, para a concentração de estaquiose, a estimativa foi baixa, com valor de 32,3%. Estes resultados sugerem o potencial da população estudada para se realizar a seleção para o teor de rafinose e açúcares solúveis totais, o que não acontece para o teor de estaquiose. Não encontramos na literatura trabalhos sobre a estimativa de herdabilidade dessas características (rafinose, estaquiose e açúcares solúveis totais). OPENSHAW e HADLEY (1981) estimaram a herdabilidade do teor de açúcares totais numa população nas gerações F_2 e F_3 e encontraram valores de 38,0% e 69,0%, respectivamente.

A herdabilidade no sentido amplo para a concentração de proteína foi de 77,5% (Quadro 2), significando que a maior parte da variação observada é devido a causas genéticas. Este valor esta dentro da faixa de valores encontrados por vários

outros autores que fizeram estimativas desta característica em gerações precoces (PIOVESAN, 2000; SHORTER *et al.*, 1976; BRIM e BURTON, 1979; ERICKSON *et al.*, 1981; McKENDRY *et al.*, 1985, SOARES, 2000 e 2004; TEIXEIRA, 2003).

É preciso ressaltar que as estimativas de herdabilidade apresentadas no Quadro 2 se referem especificamente à população empregada neste trabalho, não podendo ser generalizada para outras populações originadas de outros cruzamentos envolvendo outros progenitores recorrentes. É interessante também que se avalie esta mesma população em outros locais, para determinar se existe interação genótipo X ambiente, e em outras gerações, como a F_3 e F_4 . JOHSON e BERNARD (1963), estudando herdabilidades para várias características em soja, dentre elas o teor de proteína, mostraram que em gerações precoces (F_2) a herdabilidade apresenta baixos valores quando comparada com aquela obtida em gerações mais avançadas (F_4). Isso implica que é mais difícil identificar e selecionar genótipos superiores em gerações precoces, resultando em pouco progresso por seleção.

Quadro 2: Valores estimados das variâncias fenotípica (σ^2_F), ambiental (σ^2_E) e genética (σ^2_G) e da herdabilidade no sentido amplo (h^2_a) para as características avaliadas na população $F_{2:3}$. Sacarose-CLAE = concentração de sacarose determinada por CLAE; Sacarose-GOD = concentração de sacarose determinada pelo método GOD/invertase; P100sementes = peso de 100 sementes; AST = açúcares solúveis totais.

Características	σ^2_F	* σ^2_{P1}	* σ^2_{P2}	σ^2_E	σ^2_G	h^2_a
Sacarose-CLAE	0,501	0,030	0,124	0,096	0,405	0,808
Sacarose-GOD	0,924	0,603	0,140	0,294	0,630	0,681
Rafinose	0,303	0,029	0,117	0,088	0,216	0,711
Estaquiose	0,393	0,067	0,365	0,266	0,127	0,323
AST	2,545	0,041	1,093	0,743	1,802	0,708
Proteína	6,391	1,461	1,422	1,435	4,956	0,775
P100sementes	-	-	-	-	-	-

* Estimativa da variância da característica avaliada nos progenitores 1 e 2, usada na estimativa da variância ambiental.

- Valores não determinados.

3.6. Correlações fenotípicas

As estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson e Spearman entre as características avaliadas (concentrações de sacarose pelos métodos CLAE e GOD/invertase, concentrações de proteína total, rafinose, estaquiose, açúcares solúveis e peso de 100 sementes), referentes à população F_2 , estão apresentadas no Quadro 3. As correlações acima de 0,400 foram consideradas altas.

Como destaca RIBEIRO Jr. *et alli* (2001), o coeficiente de correlação linear de Pearson mede a intensidade com a qual se manifesta uma associação entre duas variáveis. O coeficiente de correlação é um número puro, sem unidade ou dimensão, que varia entre -1 e 1 . Este coeficiente é usado para expressar o quanto os pontos se aproximam de uma reta imaginária. Um coeficiente próximo da unidade, positivo ou negativo, significa uma grande concentração dos pontos em torno da reta, enquanto que um coeficiente menor significa maior dispersão dos pontos em relação a esta reta. Valores positivos indicam a tendência de uma variável aumentar quando a outra aumenta. Quando o coeficiente é negativo, valores altos de uma variável estão associados a valores baixos da outra. Já o coeficiente de correlação de Spearman é uma medida do grau de concordância entre duas variáveis. Um alto coeficiente de correlação de Spearman entre duas variáveis indica que os indivíduos que ocupam os maiores postos numa variável coincidem com aqueles que ocupam os maiores postos na outra variável.

Os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman entre as concentrações de sacarose na população $F_{2:3}$ determinadas pelos métodos CLAE e GOD/invertase foi de 0,548 e 0,674, respectivamente (Quadro 3). Estes valores são considerados altos e foram significativos pelo teste “t” a 5% de probabilidade. Este resultado vem corroborar o que havíamos afirmado no capítulo 1 desse trabalho, que a metodologia GOD/invertase é um método de boa exatidão para a quantificação de sacarose, visto que o método CLAE é um dos mais precisos e exatos para quantificar os carboidratos solúveis em alimentos. No capítulo 1 desse trabalho encontramos um coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,968 entre essas duas metodologias, sendo avaliadas 14 amostras diferentes. Quando avaliamos a população $F_{2:3}$, que possui 119 indivíduos, encontramos um coeficiente de correlação um pouco menor, igual 0,548. Esta diferença entre os valores de

correlação não tira a credibilidade do método, visto que este valor ainda pode ser considerado alto e é significativo.

A concentração de sacarose determinada por CLAE correlacionou-se positiva e significativamente com as concentrações de rafinose, estaquiose e açúcares solúveis totais. Os coeficientes de correlação de Pearson e Spearman entre a concentração de sacarose com os outros açúcares foram, respectivamente (Quadro 3): 0,607 e 0,509, com rafinose; 0,601 e 0,504, com estaquiose; 0,889 e 0,812, com açúcares solúveis totais. Esses valores indicam que aqueles indivíduos da população que possuem alta concentração de sacarose possuem também altas concentrações de rafinose, estaquiose e, logicamente, de açúcares solúveis totais.

As concentrações de rafinose e estaquiose também se correlacionaram positivamente com o teor de açúcares solúveis totais e entre si. Os coeficientes de correlação de Pearson e Spearman foram, respectivamente (Quadro 3): 0,809 e 0,787, entre rafinose e açúcares solúveis totais; 0,830 e 0,860, entre estaquiose e açúcares solúveis totais; 0,494 e 0,602, entre rafinose e estaquiose. Esses resultados sugerem que sacarose, rafinose e estaquiose acumulam-se conjuntamente na semente de soja. Isso acontece provavelmente por compartilharem a mesma rota metabólica. Esses resultados estão de acordo com a hipótese proposta por DEY (1985), que propôs uma rota de síntese da rafinose e da estaquiose, mostrada abaixo:

UDP-galactose + mio-inositol \longrightarrow galactinol + UDP

Galactinol + sacarose \longrightarrow rafinose + mio-inositol

Galactinol + rafinose \longrightarrow estaquiose + mio-inositol

Galactinol + estaquiose \longrightarrow verbascose + mio-inositol

Galactinol + verbascose \longrightarrow ajucose + mio-inositol

Analisando esta rota podemos concluir que, havendo disponibilidade de galactinol, quanto maior a concentração de sacarose maior será a de rafinose e quanto maior a concentração de rafinose maior será a de estaquiose.

Logo, pode-se concluir por esses resultados que a seleção de indivíduos com alto teor de sacarose e baixos teores de rafinose e estaquiose nessa população estudada é impossível usando-se métodos clássicos de melhoramento. Ou seja, para obtermos uma variedade de soja contendo altos teores de sacarose e baixos

teores de rafinose e estaquiose teremos que recorrer a técnicas de biologia molecular. Poderíamos por exemplo tentar inibir a enzima rafinose sintase, inibindo a síntese de rafinose e conseqüentemente de estaquiose. Isso poderia ser conseguido silenciando o gene que codifica esta enzima.

Os valores dos coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre a concentração de sacarose determinada por CLAE com a concentração de proteína total foi de -0,475 (Quadro 3). A concentração de açúcares solúveis totais apresentou comportamento semelhante, com coeficiente de correlação de Pearson igual a -0,333. As concentrações de rafinose e estaquiose também se correlacionaram negativamente com a concentração de proteína, porém com valores pequenos e não significativos: -0,174 e -0,159, respectivamente (Quadro 3). Este alto valor negativo e significativo entre a concentração de proteína e de sacarose também foi encontrado por HYMOWITZ et al. (1972), o qual encontrou porém uma correlação positiva entre o teor de estaquiose e o de proteína. Já HARTWIG et al. (1997) encontraram valores não significativos de correlação entre os teores de rafinose e estaquiose com o teor de proteína e uma alta e negativa correlação entre os teores de sacarose e proteína. Este mesmo resultado foi também obtido por WILCOX e SHIBLES (2001), que encontraram um coeficiente de correlação entre os teores de sacarose e proteína igual a -0,66. Estes resultados indicam a dificuldade de se obter uma variedade contendo tanto um alto teor de sacarose quanto de proteína.

A concentração de sacarose determinada por CLAE apresentou coeficientes de correlação de Pearson e Spearman pequenos e positivos, apesar de significativos, em relação à característica peso de 100 sementes. Os valores encontrados foram, respectivamente, 0,197 e 0,363 (Quadro 3). Esse dado indica a dificuldade de se conseguir variedades contendo altos teores de sacarose e sementes grandes, como é requerido para a elaboração de alguns produtos a base de soja.

Quanto às concentrações de rafinose, estaquiose e açúcares solúveis totais, todas apresentaram correlações não significativas com o peso de 100 sementes. Os valores para as correlações de Pearson foram respectivamente, -0,005, 0,015 e 0,092 (Quadro 3). A concentração de proteína também não apresentou correlação significativa com o peso de 100 sementes ($r=-0,069$). Com isso podemos concluir que a seleção de plantas com sementes grandes, ou seja, que possuem elevado

peso de 100 sementes, nessa população $F_{2:3}$ analisada não implicará num concomitante aumento dos teores de sacarose, rafinose, estaquiose, açúcares solúveis totais e proteína total.

Quando analisamos as correlações entre a concentração de sacarose analisada pelo método GOD/invertase com as demais características, encontramos valores diferentes daqueles apresentados quando essa característica foi analisada pelo método cromatográfico (CLAE). Podemos observar no Quadro 3 que os coeficientes de correlação de Pearson entre a concentração de sacarose determinada pelo método GOD/invertase com as concentrações de rafinose, estaquiose, açúcares solúveis totais, proteína e peso de 100 sementes foram, respectivamente, 0,201, 0,162, 0,313, -0,390 e 0,191. Esses valores foram todos menores quando comparados com aqueles encontrados para a concentração de sacarose determinada por CLAE. Em parte podemos explicar essa diferença quando observamos que a correlação entre os dois métodos de quantificação de sacarose não foi tão alta ($r=0,548$). Essa discrepância nos indica que precisamos avaliar melhor esse método, principalmente realizando essas mesmas análises em outras populações.

Pelos resultados encontrados nas condições experimentais relatadas pode ser afirmado que a seleção em gerações precoces para altas concentrações de sacarose seria eficiente apenas em relação à essa característica, a qual apresentou elevada herdabilidade. Entretanto, pelas correlações encontradas com as outras características estudadas, essa seleção para altos teores de sacarose implicaria na seleção de altos teores de rafinose e estaquiose, baixos teores de proteína e não afetaria o peso de 100 sementes. Portanto, seria desejável a determinação das concentrações dessas características nas gerações posteriores (F_3 e F_4) deste cruzamento e se possível estudar populações derivadas de outros cruzamentos, visando à obtenção de dados mais conclusivos a respeito da confiabilidade do método GOD/invertase na quantificação da concentração de sacarose em programas de melhoramento. Também é necessário estudos em nível de biologia molecular que visem diminuir os teores de oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) na semente de soja e procurar variedades naturais que apresentem baixos teores destes, o que poderia acelerar bastante a produção de variedades apropriadas para o consumo humano.

Quadro 3: Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman entre as características analisadas nas sementes da população F₂. Sacarose-CLAE = concentração de sacarose determinada por CLAE; Sacarose-GOD = concentração de sacarose determinada pelo método GOD/invertase; AST (açúcares solúveis totais).

Características correlacionadas	Correlação de Pearson	Correlação de Spearman
sacarose (CLAE) x sacarose (GOD)	0,548*	0,674*
sacarose (CLAE) x rafinose	0,607*	0,509*
sacarose (CLAE) x proteína	-0,475*	-0,490*
sacarose (CLAE) x peso 100 sementes	0,197*	0,363*
sacarose (CLAE) x estaquiose	0,601*	0,504*
sacarose (CLAE) x AST	0,889*	0,812*
sacarose(GOD) x estaquiose	0,162	0,111
sacarose(GOD) x rafinose	0,201*	0,381*
sacarose (GOD) x proteína	-0,390*	-0,357*
sacarose (GOD) x peso 100 sementes	0,191*	0,301*
sacarose (GOD) x AST	0,313*	0,337*
rafinose x proteína	-0,174	-0,217*
rafinose x peso 100 sementes	-0,005	0,020
rafinose x estaquiose	0,494*	0,602*
rafinose x AST	0,809*	0,787*
estaquiose x proteína	-0,159	-0,145
estaquiose x peso 100 sementes	0,015	-0,018
estaquiose x AST	0,830*	0,860*
proteína x peso 100 sementes	-0,069	-0,231*
proteína x AST	-0,333*	-0,328*
AST x peso 100 sementes	0,092	0,137

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste "t".

3.7. Testes de normalidade

Visando determinar se as características avaliadas na população $F_{2:3}$ apresentaram uma distribuição aproximadamente normal, o que é requerido para a estimação de QTLs, aplicamos testes de normalidade para cada característica analisada, usando o programa GQMOL. As características analisadas foram a concentração de sacarose, determinada por CLAE e pelo método GOD/invertase, e as concentrações de rafinose, estaquiose, açúcares solúveis totais, proteína e peso de 100 sementes. Os resultados estão apresentados no Quadro 4. Vale ressaltar que valores significativos a 1% ou a 5% de probabilidade indicam que os dados experimentais não seguem uma distribuição aproximadamente normal.

Podemos observar no Quadro 4 que no conjunto dos três testes nenhuma das características analisadas apresentaram distribuição aproximadamente normal. Apenas a concentração de estaquiose, pelo teste de Lilliefors, a concentração de proteína, pelo teste de curtose, e a concentração de sacarose quantificada pelo método GOD/invertase foram não significativos. Sendo assim, caso sejam detectados QTLs relacionados com qualquer uma dessas 7 características, eles deverão ser analisados com ressalva, já que o método de estimação de QTLs pressupõe que a característica apresente distribuição normal.

Quadro 4: Média das características, testes de Lilliefors, de assimetria e de curtose para as características avaliadas na população $F_{2:3}$. Sacarose-CLAE = concentração de sacarose determinada por CLAE; Sacarose-GOD = concentração de sacarose determinada pelo método GOD/invertase; P100sementes = peso de 100 sementes; AST = açúcares solúveis totais.

Características	Média (%)	Teste de Lilliefors	Simetria	Curtose
Sacarose-CLAE	3,93	0,1181 ^{**}	1,1642 ^{**}	5,5036 ^{**}
Sacarose-GOD	4,41	0,1091 ^{**}	0,6989 ^{**}	3,207 ^{ns}
Rafinose	1,55	0,286 ^{**}	3,1602 ^{**}	16,6855 ^{**}
Estaquiose	4,64	0,0619 ^{ns}	0,5928 ^{**}	5,7741 ^{**}
AST	10,13	0,1244 ^{**}	1,3418 ^{**}	6,6639 ^{**}
Proteína	39,93	0,1029 ^{**}	0,6202 ^{**}	3,2809 ^{ns}
P100sementes	15,18 [#]	0,166 ^{**}	3,4163 ^{**}	26,8298 ^{**}

valor em gramas.

** significativo a 1% de probabilidade.

* significativo a 5% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

4. Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram apontar algumas conclusões:

- As herdabilidades no sentido amplo das características concentração de sacarose, rafinose, açúcares solúveis totais e proteína total foram altas, significando que a maior parte da variação observada nessas características é devida a causas genéticas. Para a concentração de estaquiose a herdabilidade foi baixa;
- As concentrações de sacarose determinadas por CLAE e pelo método GOD/invertase apresentaram coeficientes de correlação de Pearson e Spearman relativamente altos, evidenciando a aplicabilidade do método enzimático desenvolvido;
- A concentração de sacarose determinada por CLAE apresentou altos e positivos coeficientes de correlação com as concentrações de rafinose, estaquiose e açúcares solúveis totais, indicando a impossibilidade de se fazer a seleção direta de indivíduos com alto teor de sacarose e baixos teores de rafinose e estaquiose;
- A concentração de sacarose determinada por CLAE se correlacionou negativamente com a concentração de proteínas totais, indicando a impossibilidade de se fazer seleção direta de indivíduos contendo altos teores de ambas características; A correlação entre as concentrações de rafinose e estaquiose com a concentração de proteína foram não significativas;
- A correlação entre a concentração de sacarose determinada por CLAE com o peso de 100 sementes não foi significativa. O mesmo comportamento foi observado para as concentrações de rafinose, estaquiose e açúcares solúveis totais;
- As correlações entre a concentração de sacarose determinadas pelo método GOD/invertase com as demais características foram menores do que aquelas encontradas entre a concentração de sacarose determinadas por CLAE com as outras características. Uma possível explicação pode estar no fato da correlação entre as duas metodologias não ter sido tão alta (54,8%). Isso sugere a necessidade de análises semelhantes em outras populações para aumentar a abrangência desses resultados;

- Apenas a concentração de estaquiose, pelo teste de Lilliefors, e a concentração de proteína, pelo teste de curtose, foram não significativos, evidenciando uma distribuição aproximadamente normal. As demais características não apresentaram esta distribuição. Logo, caso sejam detectados QTLs relacionados com qualquer uma dessas 7 características, eles deverão ser analisados com ressalva, já que o método de estimação de QTLs pressupõe que a característica apresente distribuição normal;

5. Referências Bibliográficas

- BRIM, C.A., COCKERHAM, C.C. Inheritance of quantitative characters in soybeans. **Crop Science**, v.1, p.187-190, 1961.
- CERVIGINI, G.D.L. **Análise genômica da resistência às raças 3 e 9 do nematóide de cisto e avaliação da variabilidade genética de caracteres agronômicos em soja**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 82p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- CHEN, P., BUSS, G.R. Breeding soybeans for the soyfood market: specific traits and strategies for selection. In: **IV International Soybean Processing and Utilization Conference**. Foz do Iguassu, PR, Brazil. *Proceedings*, 2004 . p.830-838.
- CICEK, M. **Genetic analysis of quantitative trait loci associated with seed sucrose content using molecular markers in an interspecific *Glycine* cross**. Blacksburg, VA: FVPIST, 1997. 46p. Dissertation (Master of Science in Crop and Soil Environmental Sciences) – Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State university, 1997.
- COCKERHAM, C.C. An extension of the concept of partitioning hereditary variance for analysis of covariances among relatives when epistasis is present. **Genetics**, v.39, p.859-892, 1954.
- COCKERHAM, C.C. Estimation of genetic variance. In: HANSON, W.D., ROBINSON, H.F. **Statistical genetics and plant breeding**. Madison: National Academy of Sciences, 1963. p.53-94.
- CREGAN, P.B., JARVIK, T., BUSH, R.C., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., KAHLER, A.L., KAYA, N., VANTOAI, T.T., LOHNES, D.G., CHUNG, J., SPEXHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v.39, p.1464-1490, 1999.
- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Ed. UFV, Viçosa-MG, 390p., 1997.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- DUDLEY, J.W., MOLL, R.H. Interpretation and use of estimates of heritability and genetics variances in plant breeding. **Crop Science**, v.9, p.257-262, 1969.

- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. (Trad. de Silva, M.A.). Viçosa: UFV, 279p., 1987
- FREY, K.J., HORNER, T. Heritability in standard units. **Agronomy Journal**, v.49, n1, p.59-62, 1957.
- GEATER, C.W., FEHR, W.R. Association of total sugar content with other seed traits of diverse soybean cultivars. **Crop Science**, v.40, p.1552-1555, 2000.
- GEATER, C.W., FEHR, W.R., WILSON, L.A. Soybean seed traits influence natto quality. **Crop Science**, v.40, p.1529-1534, 2000.
- GRIFFITS, G., WIEDERMANN, L. **Marketing food-quality soybeans in Japan**. American Soybean Association, P.O. Box 27300, St. Louis, Mo. 63141. 1990.
- HANSON, D.W., WEBER, C.R. Analysis of genetic variability from generations of plant-progeny lines in soybeans. **Crop Science**, v.2, n.1, p.63-67, 1962.
- HARTWIG, E.E., KUO, T.M., KENTY, M.M. Seed protein and its relationship to soluble sugars in soybean. **Crop Science**, v.37, p.770-773, 1997.
- HAYWARD, M.D., McADAM, N.J., JONES, J.G., EVANS, C., EVANS, G.M., FORSTER, J.W., USTIN, A., HOSSIN, K.G., QUADER, B., STAMMERS, M., WILL, J.K. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, v.77, p.269-275, 1994.
- HILL, J.E., BREIDENBACH, R.W. Protein of soybean seeds. **Plant Physiology**, v.53, n.5, p.742-746, 1974.
- HYMOWITZ, T., COLLINS, F.I., PANZNER, J., WALKER, W.M. Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. **Agronomy Journal**, v.64, p.613-616, 1972.
- HYMOWITZ, T., COLLINS, F.I. Variability of sugar content in seed of *Glycine max* (L.) Merrill and *G. soja* Sieb. And Zucc. **Agronomy Journal**, v.66, p.239-240, 1974.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo: 1985. v.1, 533p.
- JANSEN, R.C. Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm. **Biometrics**, v.49, n.1, p.227-231, 1993.
- JOHNSON, H.W., BERNARD, R.L. Soybean genetics and breeding. In: NORMAN, A.G. (Ed.). **The soybean genetics, breeding, physiology, nutrition, management**. New York: Academic Press, p.1-73, 1963.

- KAWAMURA, S. Review of PL 480 work on soybean carbohydrates. In: **International Conference of Soybean Protein Foods**. Peoria, Illinois, 1966. *Proceedings*, Washington DC, U.S. Department of Agriculture, 1967 . p.249-54.
- KEIM, P., SCUPP, J.M., TRAVIS, S.E., CLAYTON, K., WEBB, D.M. A high-density soybean genetic map based upon AFLP markers. **Crop Science**, v.37, n.2, p.537-543, 1997.
- KOSTER, K.L., LEOPOLD, A.C. Sugar and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, v.88, p.829-832, 1988.
- KROBER, O.A.; CARTTER, J.L. Quantitative interrelationships of protein and nonprotein constituents of soybeans. **Crop Science**, v.2, p.171-172, 1962.
- KUO, T.K., LOWELL, C.A., SMITH, P.T. Changes in soluble carbohydrates and enzymic activities in maturing soybean seed tissues. **Plant Science**, v.125, p.1-11, 1997.
- KWON, S.H., TORRIE, J.H. Heritability and interrelationships among traits of two soybean populations. **Crop Science**, v.4, n.2, p.196-198, 1964.
- LEE, W.B., WANG, J.L. Comparison of inheritance of several agronomic characters between *Glycine max* X *G. soja*, *G. max* X *G. gracilis*, and *G. max* X *G. max*. **Soybean Genetic Newsletter**, v.13, p.59-61, 1986.
- LOWELL, C.A., KUO, T.M. Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. **Crop Science**, v.29, p.459-465, 1989.
- MACDONALD, F.D., REES, T. Enzymic properties of amyloplasts from suspension cultures of soybean. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.755, p.81-89, 1983.
- MAHAMUD, I., KRAMER, H.H. Segregation for yield, height, and maturity following a soybean cross. **Agronomy Journal**, v.43, n.3, p.605-609, 1951.
- MAUGHAN, P.J., MAROOF, M.A.S., BUSS, G.R. Identification of quantitative trait loci controlling sucrose content in soybean (*Glycine max*). **Molecular Breeding**, v.6, p.105-111, 2000.
- McKENDRY, A.L., MCVETTY, P.B.E., VOLDENG, H.D. Inheritance of seed protein and seed oil content in early maturing soybean. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.27, p.603-607, 1985.
- MORAES, R.M.A. **Introgessão de alelos para alto teor de proteína em soja assistida por marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 139p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

- MORAIS, A.A.C., DA SILVA, A.L. **Soja: Suas Aplicações**, Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 1996, 260p.
- MORGANTE, M., RAFALSKI, A., BIDDLE, P., TINGEY, S., OLIVIERI, A.M. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. **Genoma**, v.37, n.5, p.763-769, 1994.
- MULLIN, W.J., XU, W. A study of the intervarietal differences of cotyledon and seed coat carbohydrates in soybeans. **Food Research International**, v.33, p.883-891, 2000.
- OPENSHAW, S.J., HADLEY, H.H. Maternal effects on sugar content in soybean seeds. **Crop Science**, v.18, p.581-584, 1978.
- OPENSHAW, S.J., HADLEY, H.H. Selection to modify sugar content of soybean seeds. **Crop Science**, v.21, p.805-808, 1981.
- PIOVESAN, N.D. **Aplicação de Cruzamentos Dialélicos no Melhoramento Genético da concentração Protéico em Soja**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 91p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- PULCINELLI, C.E. **Herança da concentração de proteína em soja**. Piracicaba: ESALQ, 1992. 67p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1992.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; ZIMMERMANN, M.J.O. **Genética Quantitativa em Plantas Autógamas: Aplicações ao melhoramento do Feijoeiro**, Goiânia: Editora UFG, 1993, 272p.
- SHOEMAKER, R.C. RFLP map of soybean. In: PHILLIPS, R.L., VASIL, I.K., (Eds). **DNA-based markers in plants**. [s.l.]: Kluwer Academic, p.2990-3009, 1994.
- SINGH, L., HADLEY, H.H. Maternal and cytoplasmic effects on seed protein content in soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v.12, p.583-585, 1972.
- SMITH, J.D., KINMAN, M.L. The use of parent-offspring regression as an estimator of heritability. **Crop Science**, v.5, n.6, p.595-596, 1965.
- SOARES, T.C.B. **Mapeamento de locos associados ao conteúdo de proteínas de reserva em soja**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 113p. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- STITT, M.; LILLEY, R.M.; GERHERDT, R.; HELDT, H.W. 1989. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. **Methods Enzymology**.174:518-552.

- STRICKBERGER, M.W. **Genetics**. New York: The McMillan, 842p,1985.
- SUNG, S.S., XU, D., BLACK, C.C. Identification of actively filling sucrose sinks. **Plant Physiology**, v.89, p.1117-1121, 1989.
- TEIXEIRA, A.I. **Herdabilidades e correlações entre concentrações de proteína em soja avaliadas por diferentes metodologias**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 53p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2003
- VELLO, N.A.; HIRAMOTO, D.M.; AZEVEDO FILHO, A.J.B.V. Coefficient of parentage and breeding of Brazilian soybean germplasm. **Revista Brasileira de Genética**, v.11, p.679-697, 1988.
- VERNOOY, C.D., THORME, J.H., LIN, W., RAINBIRD, R.M. Cessation of assimilate uptake in maturing soybean seeds. **Plant Physiology**, v.82, p.222-225, 1986.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T.V., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.
- WARNER, J.N. A method for estimating heritability. **Agronomy Journal**, v.44, n.2, p.427-430, 1952.
- WILCOX, J.R., SIMPSON Jr.,A.M. Performance of reciprocal soybean hybrids. **Crop Science**, v.17, p.351-352, 1977.
- WILCOX, J.R., SHIBLES, R.M. Interrelationships among seeds quality attributes in soybean. **Crop Science**, v.41, p.11-14, 2001.
- XIAO, J., LI, J., YUAN, L., TANKSLEY, S.D. Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, n.2, p.230-244, 1996.
- ZENG, Z.B. Precison mapping quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, n.9, p.1457-1468, 1994.
- ZENG, Z.B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effect in mapping quantitative trait loci. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, n.20, p.10972-10976, 1993.