

JOSIE GOMES DE ALMEIDA BARROS

**SELEÇÃO DE MUTANTES PARA CONTEÚDO DE PROTEÍNA E ÓLEO  
POR ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO EM SOJA  
SUBMETIDAS À RADIAÇÃO GAMA**

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  
2011**

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

T

B277s  
2011

Barros, Josie Gomes de Almeida, 1980-  
Seleção de mutantes para conteúdo de proteína e óleo por  
espectroscopia do infravermelho próximo em soja submetidas  
à radiação gama / Josie Gomes de Almeida Barros. – Viçosa,  
MG, 2011.  
x, 51f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Soja. 2. Plantas - Mutação. 3. Espectroscopia de  
infravermelho. 4. Raios gama. 5. Proteínas. 6. Óleo.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

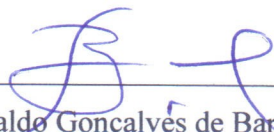
CDD 22. ed. 633.342

JOSIE GOMES DE ALMEIDA BARROS

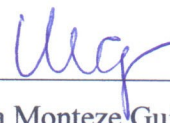
**SELEÇÃO DE MUTANTES PARA CONTEÚDO DE PROTEÍNA E ÓLEO  
POR ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO EM SOJA  
SUBMETIDAS À RADIAÇÃO GAMA**

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 outubro de 2011.



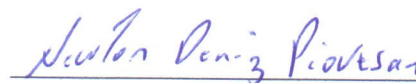
Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Coorientador)



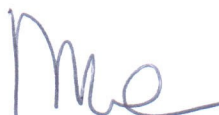
Prof.ª Valéria Monteze Guimarães  
(Coorientadora)



Dr.ª Rita Maria Alves de Moraes



Dr. Newton Deniz Piovesan



Prof. Maurilio Alves Moreira  
(Orientador)

*Ao meu pai José,*

*Ao meu irmão Augusto,*

*Ao meu sobrinho Gustavo,*

*Aos meus familiares.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela oportunidade de realização desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela infraestrutura adequada ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Maurilio Alves Moreira, pela orientação e apoio durante toda minha vida acadêmica.

Aos meus coorientadores, professor Everaldo Gonçalves de Barros e professora Valéria Monteze Guimarães, pelo apoio e amizade.

A Dr<sup>a</sup>. Rita Maria Alves de Moraes pela participação na banca examinadora.

Ao Dr. Newton Deniz Piovesan pela participação na banca examinadora e ajuda na condução dos experimentos.

Ao Klever, pelo apoio na condução dos experimentos, pela amizade e paciência.

Aos amigos dos laboratórios Proteína, Biomol e Análises Bioquímicas, pela amizade e pelo agradável convívio.

Aos funcionários Reginaldo (Naldo) e Sandra Machado pela imensa colaboração nas análises bioquímicas e pela amizade.

A amiga Ana Paula e aos irmãos da igreja, pela amizade e pelas orações.

## **BIOGRAFIA**

JOSIE GOMES DE ALMEIDA BARROS, filha de José de Almeida Barros e Eliêta Gomes Pinto Barros, nasceu no dia 01 de maio de 1980 na cidade de Ubá, Minas Gerais.

Em março de 2000 ingressou no curso de Química na Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se com os títulos de Licenciatura e de Bacharelado em julho de 2004.

Em agosto de 2004 iniciou o curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa de dissertação em agosto de 2006.

Ingressou, em outubro de 2006, no curso de doutorado em Bioquímica Agrícola da UFV, submetendo-se à defesa de tese em Outubro de 2011.

## CONTEÚDO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Mutações	4
2.2. Agentes mutagênicos	5
2.3. Mutações induzidas no melhoramento de plantas	6
2.4. Mutações induzidas no melhoramento da soja	8
2.5. Detecção de mutação induzida	11
2.6. Espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS)	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
4. OBJETIVOS	21
4.1. Objetivo geral	21
4.2. Objetivos específicos	21
CAPÍTULO 1	22
DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CONSTITUINTES DE SOJA POR ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO	22
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. Amostras	25
2.2. Metodologias padrão	25
2.2.1. Determinação de umidade	25
2.2.2. Determinação de proteína	26
2.2.3. Determinação de óleo	26
2.3. Espectroscopia no infravermelho próximo	26
2.3.1. Desenvolvimento dos modelos de calibração	26

2.3.2. Parâmetros de validação dos modelos	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4. CONCLUSÃO	34
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO 2	37
DETECÇÃO DE MUTAÇÕES EM SOJA ( <i>Glycine max</i> (L.) Merrill) POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS)	37
RESUMO	37
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1. Amostras	41
2.2. Metodologias	41
2.2.1. Obtenção dos dados experimentais	41
2.2.1.1. Condução das sementes irradiadas	41
2.2.1.2. Determinação da composição da soja por espectroscopia NIR	43
2.2.1.3. Correção ambiental dentro do experimento	43
2.2.1.4. Análise de variância	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4. CONCLUSÃO	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

## RESUMO

BARROS, Josie Gomes de Almeida, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2011. **Seleção de mutantes para conteúdo de proteína e óleo por espectroscopia do infravermelho próximo em soja submetidas à radiação gama.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Coorientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Valéria Monteze Guimarães.

A indução de mutações por agentes mutagênicos físicos ou químicos tem sido muito utilizada nos programas de melhoramento de diversas culturas, inclusive no melhoramento da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). A combinação da indução da mutação com uma eficiente análise das características cuja variação é desejada tem contribuído significativamente para o melhoramento vegetal. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação de diferentes dosagens de radiação gama (100, 200 e 300 Gy) sobre o conteúdo de proteína e óleo de grãos de soja e selecionar genótipos mutantes com características bioquímicas desejáveis ao Programa de Melhoramento da Soja do BIOAGRO/UFV. Modelos de calibração foram desenvolvidos para quantificar os conteúdos de umidade, proteína e óleo por espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo para serem utilizados na determinação destes constituintes em linhagens de soja. Os coeficientes de correlação e erros quadráticos médio das calibrações (RMSEC) foram, respectivamente, 0,997 e 0,117 para umidade; 0,998 e 0,202 para proteína e 0,988 e 0,421 para óleo. Estes resultados demonstraram que a espectroscopia NIR forneceu resultados satisfatórios para análise dos constituintes em soja. Com os valores dos conteúdos de proteína e óleo da soja tratada com diferentes dosagens de raios gama e da não tratada (testemunha cultivar Vencedora) foi realizada uma avaliação do efeito das diferentes dosagens sobre essas características. A correção dos conteúdos de proteína e óleo em relação ao efeito ambiental foi realizada a partir das informações das testemunhas que foram intercaladas no ensaio. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade para testar o efeito da mutação nas progênies  $M_{1:4}$ . A dose de radiação gama de 300 Gy forneceu maior porcentagem de plantas  $M_1$  irradiadas com diferenças significativas em relação à testemunha para as duas características avaliadas. Das plantas  $M_1$  selecionadas que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos irradiado e não irradiado, as que apresentaram menor e maior conteúdo

máximo de proteína, superiores ao da testemunha (39,87%) foram as plantas 934 (43,03%) e 100 (46,64%), respectivamente. Os conteúdos de proteína dessas plantas foram maiores que da testemunha em 8% e 17%, respectivamente, indicando que as mutações nas plantas  $M_1$  selecionadas favoreceram o conteúdo de proteína. Para óleo, as plantas a que apresentaram menor e maior conteúdo máximo de óleo, superiores ao da testemunha (19,33%) foram as plantas 177 (20,46%) e 421 (21,89%) que apresentaram conteúdo de óleo maior que da testemunha em 6% e 13%, respectivamente, indicando que as mutações nas plantas  $M_1$  selecionadas favoreceram o conteúdo de óleo. As progênies  $M_4$  das plantas  $M_1$  que foram selecionadas como possíveis mutantes para aumento dos conteúdos de proteína e óleo através deste trabalho serão conduzidas a um novo ensaio de seleção de progênies para confirmar os dados obtidos e após essa nova seleção as progênies mutantes poderão ser utilizadas no Programa de Melhoramento da Soja do BIOAGRO/UFV.

## ABSTRACT

BARROS, Josie Gomes de Almeida, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2011. **Selection of protein and oil mutants content by near infrared spectroscopy in soybean submitted to gamma radiation.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-Advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Valéria Monteze Guimarães.

Induction of mutations by physical or chemical mutagens has been widely used in genetic improvement programs of several cultures, including soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). The combination of mutation induction with an efficient analysis of the characteristics whose variation is desired has contributed significantly to plant breeding. The objective of this study was to evaluate the effects of applying different doses of gamma radiation (100, 200 and 300 Gy) on the protein and oil content of soybeans and select mutant genotypes with the desired biochemical characteristics at the Soybean Breeding Program of BIOAGRO/UFV. Calibration models were developed to quantify the contents of moisture, protein and oil by near infrared reflectance spectroscopy for use in the determination of these constituents in soybean lines. The correlation coefficients and root mean square errors of calibration (RMSEC) were, respectively, 0.997 and 0.117 for moisture, 0.998 and 0.202 for protein and 0.988 and 0.421 for oil content. These results demonstrated that NIR spectroscopy provided satisfactory results for analysis of the constituents in soybean. An evaluation of protein and oil contents of soybeans treated with different doses of gamma rays and that untreated (control cultivar Vencedora) was performed. Correction of protein and oil content in relation to the environmental effect was made based on information from controls which were interspersed in the trial. The data was subjected to analysis of variance by the F-test at 5% probability to determine the effect of mutation on the progenies  $M_{1;4}$ . The radiation dose of 300 Gy resulted in a greater percentage of  $M_1$  plants irradiated with significant differences compared to control for the two traits. Of the  $M_1$  plants selected that showed significant differences between irradiated and non-irradiated treatments, those with the lowest and highest maximum content of protein, higher than the control (39.87%), were the plants 934 (43.03%) and 100 (46.64%), respectively. The protein contents of these plants were higher than the control by 8% and 17%, respectively, indicating that mutations in the  $M_1$  plants selected favored protein content. For oil, the plants presenting lower and higher maximum oil contents, greater than

the control (19.33%), were the plants 177 (20.46%) and 421 (21.89%) showed oil contents greater than the control by 6% and 13%, respectively, indicating that mutations in M<sub>1</sub> plants selected favored the oil content. The M<sub>4</sub> progenies of M<sub>1</sub> plants were selected as possible mutants to increase protein and oil content, and a new selection of progeny will be performed to confirm the data obtained and this mutant progenies will be used in the Soybean Breeding Program of BIOAGRO/UFV.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das principais culturas oleaginosas do mundo. Seu plantio teve início a quase cinco mil anos, na costa leste da Ásia, principalmente na China e é considerada uma das mais antigas plantas já cultivadas. A soja cultivada atualmente é muito diferente dos seus ancestrais, que eram espécies de plantas rasteiras. A evolução da cultura começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies selvagens e que depois passou a ser melhorada por agricultores chineses (Cavalcante *et al.*, 2011; Dorneles *et al.*, 2011; [http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=22&cod\\_pai=16](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16)).

No Ocidente o plantio teve início no século vinte, nos Estados Unidos (EUA), onde era cultivada como forrageira e, posteriormente, como produtora de grão. A partir daí houve rápido crescimento na produção devido ao desenvolvimento dos primeiros cultivares comerciais ([http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=22&cod\\_pai=16](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16)).

A soja chegou ao Brasil em 1882, vinda dos EUA, mas o primeiro registro de cultivo é de 1914 e também foi usada como forrageira e, eventualmente, na produção de grão. A expansão do plantio brasileiro teve início em 1960, na região sul do país, onde os cultivares encontraram condições climáticas semelhantes à americana e em 1980 passou a ser plantada no cerrado. Essa expansão aconteceu devido ao crescente interesse da indústria de óleo e a demanda de venda para o mercado internacional (Teixeira, 2003; [http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=22&cod\\_pai=16](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16)).

O desenvolvimento de variedades adaptadas ao cultivo nas diversas regiões brasileiras (diferentes latitudes, tipos de solos e condições climáticas) foi conseguido com trabalhos de melhoramento genético.

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja em grão, farelo e óleo, perdendo posição apenas para os EUA. A produção brasileira do grão na safra 2010/2011 foi de 68,9 milhões de toneladas e a previsão para a safra 2011/12 é de 71,1 milhões de toneladas. O Complexo Soja que envolve a cadeia produtiva de grão, farelo e óleo é um dos principais itens da Balança Comercial Brasileira, exportando aproximadamente US\$ 17,1 bilhões em 2010, com previsão de exportar cerca de US\$ 22,6 bilhões em 2011 ([http://www.abiove.com.br/exporta\\_br.html](http://www.abiove.com.br/exporta_br.html)).

A soja é uma das culturas mais importante cultivadas no Brasil e isso se deve a seu elevado valor nutricional e propriedades funcionais, por ser fonte de óleo e proteína, além de ser utilizada como alternativa energética na produção de biocombustível.

Os cultivares comerciais apresentam em média 40% de proteína, 20% de óleo, 35% de carboidratos e 5% de cinzas em base seca (Lee *et al.*, 2011).

Os trabalhos iniciais de melhoramento da soja tinham como objetivo a seleção de genótipos com alta produtividade e conteúdo de óleo, posteriormente houve interesse por variedades com elevado conteúdo de proteína (Yaklich, 2001; Dorneles *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2011).

Para alterar o conteúdo de um componente qualquer numa cultura por meio do melhoramento genético convencional é necessária a ocorrência de variabilidade genética na população original para servir como fonte de germoplasma que será usado no melhoramento da cultura, possibilitando a seleção de genótipos promissores. Uma base genética restrita dificulta o trabalho dos melhoristas limitando ou inviabilizando a criação de novos cultivares (Borges *et al.*, 2010; Dorneles *et al.*, 2011).

A variabilidade genética vem da ocorrência de mutações, que são modificações na estrutura genética, ou seja, alterações na seqüência de bases do ácido desoxirribonucléico (DNA). Como a taxa de mutações espontâneas é baixa, a indução de mutações por agentes mutagênicos físicos ou químicos têm sido muito utilizada. A principal limitação das mutações em geral é a não especificidade da característica mutada (Costa *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2011; Dorneles *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2011; Patil e Wakode, 2011).

Para obtenção de genótipos superiores é necessária a reunião de uma série de atributos que satisfaçam às exigências do mercado, além de conferir maior produtividade à cultura. A seleção de genótipos baseada em uma ou poucas características mostra-se inadequada, conduzindo a um produto final superior apenas em relação à(s) característica(s) selecionada(s). Selecionar genótipos superiores não é tarefa fácil, uma vez que as características de maior importância (em sua maioria características quantitativas) apresentam comportamento complexo por serem influenciadas pelo ambiente e por estarem inter-relacionadas.

Um fator fundamental no processo de obtenção de linhagens melhoradas de soja consiste em realizar a análise das características de interesse, e também fazer uma avaliação

dos genótipos em ensaios, onde fica caracterizado seu desempenho em relação aos cultivares conhecidos de alto potencial produtivo e ampla adaptação (Dorneles *et al.*, 2011).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Mutações

Mutações são alterações do material genético que podem ser transmitidas para a descendência e por isso desempenham um papel importante na evolução (Coimbra *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2009).

A ocorrência de mutações podem levar à variabilidade genética, essencial para o sucesso dos programas de melhoramento, portanto sua identificação é de extrema importância para o melhoramento das culturas (Coimbra *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2010; Cabral *et al.*, 2011; Patil e Wakode, 2011; Tabasum *et al.*, 2011).

As mutações podem ocorrer espontaneamente ou podem ser provocadas experimentalmente através de agentes mutagênicos físicos ou químicos (Nóbrega, 1998; Predieri, 2001; Coimbra *et al.*, 2005; Shibata, 2008; Rocha *et al.*, 2009; Patil *et al.*, 2011; <http://dreyfus.ib.usp.br/bio201/>; <http://www.ufv.br/dbg/gbolhtm/gbol16.htm>; <http://www.ufsm.br/blg220/hide/locoalelos.htm>).

As mutações são chamadas espontâneas quando não se pode correlacionar nenhuma causa conhecida à alteração no DNA, ou seja, não são devidas à exposição a nenhum agente mutagênico (<http://dreyfus.ib.usp.br/bio201/>).

Embora as mutações espontâneas sejam propícias a promoverem o aumento da variabilidade genética, a maioria dos mutantes é provavelmente perdida dentro da população. Um gene mutante pode ser perdido principalmente durante as primeiras gerações, caso não resulte em nenhuma vantagem seletiva. Caso exista essa vantagem, mesmo que pequena, existe a possibilidade de o gene permanecer na população indefinidamente. Tais mutações raras e não direcionadas apresentam uso limitado no melhoramento de plantas, pois a chance de que ocorra uma mutação favorável de modo espontâneo é muito pequena (Silva *et al.*, 2007).

A indução de mutação é um método alternativo altamente eficaz que tem contribuído de forma significativa para o melhoramento vegetal proporcionado a criação e incorporação de novos genes de interesse agrônômico (Coimbra *et al.*, 2005).

A indução da mutação combinada com uma seleção eficiente da(s) característica(s) cuja variação é desejada contribui significativamente para o melhoramento vegetal.

## 2.2. Agentes mutagênicos

Os agentes mutagênicos físicos são as radiações ionizantes (raios X, raios gama, partícula alfa, partícula beta, prótons e nêutrons) e as não ionizantes (raios ultravioletas). Os raios X e os raios gama têm sido os principais agentes físicos utilizados para induzir mutações, pois possuem boa penetração nos tecidos e por isso são muito utilizados no tratamento de sementes (IAEA/FAO, 2001; Zaha *et al.*, 2003; IAEA, 2006; Borém e Miranda, 2009; Rocha *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010; Moturi e Charya, 2010; <http://www.ufv.br/dbg/gbolhtm/gbol16.htm>).

Os agentes mutagênicos químicos mais utilizados são etil metano sulfonato (EMS), dietil sulfato (DES) e etilenimina (EI), mas existem outros, como por exemplo, hidrazina hidrato (HZ), metil metano sulfonato (MMS), azida sódica (SA), etc (Zaha *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010; Moturi e Charya, 2010; <http://www.ufv.br/dbg/gbolhtm/gbol16.htm>). Exemplos práticos de mutagênicos físicos e químicos são apresentados na Tabela 1.

Alguns autores citam que os mutagênicos físicos são mais eficientes na obtenção de mutantes, mas que seu uso tem a principal desvantagem de depender de aparelhos com custo elevado. Outros autores citam que os mutagênicos químicos são mais eficientes para induzir mutações em sementes (Konzak, 2001; Zaha *et al.*, 2003; Coimbra *et al.*, 2005; Borém e Miranda, 2009; Henry, 2009; Moturi e Charya, 2010).

Ambos mutagênicos foram testados em várias culturas tais como trigo, cevada, arroz, tabaco, milho, frutas e leguminosas. Estes estudos ajudaram a iniciar, em larga escala, os experimentos de melhoramento utilizando mutações induzidas (Chopra, 2005).

Na prática, nos programas de melhoramento de plantas é comum o uso de mais de um agente mutagênico para promover a indução de um número máximo de mutações. O tratamento mutagênico em que dois diferentes agentes mutagênicos são combinados tem sido utilizado como forma de aumentar a efetividade e a eficiência na indução de mutação. Algumas combinações de mutagênicos utilizadas mais frequentemente são raios gama e dietil sulfato (DES) e raios gama e etil metano sulfonato (EMS) (Borém e Miranda, 2009).

**Tabela 1:** Exemplos de mutagênicos físicos e químicos utilizados em plantas propagadas por semente (adaptado de Micke e Donini, 1993).

Espécie	Material vegetal	Mutagênicos	Dose ou concentração
<i>Arachis hypogaea</i> (Amendoim)	Semente seca	Raios gama	20-30 krad
<i>Capsicum annuum</i> (Pimenta)	Gametas	Raios gama	750 rad
	Semente seca	Nêutrons rápidos	2,4 krad
		Raios gama	14-22 krad
<i>Cicer arietinum</i> (Grão de bico)	Semente seca	Raios X	10-16 krad
<i>Glicine max</i> (Soja)	Semente seca	Raios gama	10-20 krad (100-200 Gy)
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Feijão)	Semente seca	Raios gama	8-14 krad
<i>Lycopersicum esculentum</i> (Tomate)	Semente seca	EMS	0,8 %, 24h., 24°C
<i>Lupinus albus</i> (Tremoço)	Semente seca	Raios gama	16-28 krad
<i>Pisum sativum</i> (Ervilha)	Semente seca	DES	2 %, 15h, 20°C
		Raios X	
		Raios gamas	
<i>Avena sativa</i> (Aveia)	Semente seca	Raios X	12-24 krad
<i>Hoedeum vulgare</i> (Cevada)	Semente seca	Raios X	10-22 krad
		Raios gama	
<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	Semente seca	Raios X	4-28 krad
<i>Triticum aestivum</i> (Trigo para pão)	Semente seca	Raios gama	10-25 krad
<i>Triticum durum</i> (Trigo duro)	Semente seca	Raios gama	10-25 krad
		Nêutrons rápidos	600-800 rad
		EMS	3,76 %
		Pólen	Raios gama
<i>Zea mays</i> (Milho)	Semente seca	Raios gama	14-28 krad

Gray = dose absorvida de 1 Joule/kilograma de material;  
Rad = 0,01 Gray.

### 2.3. Mutações induzidas no melhoramento de plantas

As mutações induzidas foram utilizadas quase que exclusivamente no melhoramento vegetal no período de 1960 a 1990 e os resultados obtidos foram notáveis, cerca de 2.250 novos cultivares foram desenvolvidos (Ahloowalia *et al.*, 2004).

Estes resultados são ainda mais significativos se considerarmos que: (1) apenas um número limitado de melhoristas tem utilizado a indução de mutação em seus programas; (2)

que muitas variedades mutantes se tornaram variedades líderes nos mercados, como por exemplo, as variedades de arroz Yuanfengzao em 1970 e no início de 1980 e Zhefu 802 no final de 1980 e início de 1990; (3) que vários alelos derivados de mutação induzida foram integrados em cultivares comerciais, como por exemplo, o alelo sd1, responsável pela redução da altura do arroz, induzido na variedade Reimei no Japão e na variedade Calrose 76 nos Estados Unidos e que são agora completamente integrados às novas variedades de arroz nestes dois países; (4) que mutações induzidas foram utilizadas para promover a melhora de muitas características importantes, tais como tolerância a estresse abiótico (salinidade, frio, acidez, etc), resistência às doenças, melhora na qualidade alimentar e nutricional; (5) que mutações induzidas são, por vezes, a única forma de melhorar o desempenho global mantendo características particulares inalteradas, como por exemplo a variedade de arroz Basmati na Índia e no Paquistão. Estes resultados provam que mutações induzidas são úteis como ferramenta no melhoramento de plantas (Yamaguchi *et al.*, 2001; Ahloowalia *et al.*, 2004; Rutger e Bryant, 2006; Henriques, 2009).

Embora a aplicação prática da indução artificial de mutações para o desenvolvimento de novas variedades esteja bem demonstrada, o número de variedades obtidas pela técnica é muito pequeno quando comparado ao obtido por hibridação e seleção. Mutações induzidas têm sido usadas para melhorar culturas como a soja, trigo, arroz, cevada, algodão, alface, tomate, amendoim, feijão, entre outras. Atualmente mais de 2.500 variedades oficialmente lançadas, obtidas diretamente como mutantes induzidos por radiações ou derivadas de cruzamentos envolvendo tais mutantes, podem ser encontradas no banco de dados de variedades mutantes da FAO/IAEA *Mutant Varieties Database*. Os caracteres pelos quais os cultivares têm sido melhorados são variados e envolve rendimento, resistência ao acamamento, resistência às doenças, maturidade, comprimento da haste, etc (Micke, 1993; <http://www.arroz.agr.br/site/arrozemfoco/050829.php>).

No Brasil o uso de indução de mutação no melhoramento de plantas é relativamente recente e pelos trabalhos relatados na literatura, pode-se dizer que tem aumentado desde 1966, com a criação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), no campus de Piracicaba. Poucas variedades agrícolas foram obtidas por meio da indução de mutações e atualmente têm-se apenas variedades de arroz, feijão e trigo lançadas comercialmente.

O arroz corresponde ao cultivar SCS 114 Andosan lançado em 2005 pela empresa EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). Para a obtenção dos mutantes as sementes de arroz foram irradiadas com raios gama. A irradiação foi realizada no CENA. O novo cultivar foi selecionado a partir dos descendentes mutantes do cultivar IR 841 após tratamento com 150 Gy de raios gama e apresentou um aumento na produtividade de 7,4% a 9,6% comparado ao cultivar IR 841, maior conteúdo de amilase (28%), alta tolerância à toxicidade de ferro e aumento na resistência às doenças (Ishiy *et al.*, 2006; <http://www.arroz.agr.br/site/arrozemfoco/050829.php>).

O feijão corresponde ao cultivar BRS Campeiro e foi lançado em 2004 pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), IAC (Instituto Agrônômico) e FT-sementes. As sementes de feijão foram submetidas à irradiação com raios gama, no CENA. O novo cultivar originou-se de um programa de indução de mutação visando alterar a cor do tegumento da cultivar de feijão Corrente e se tornou mais uma opção para os produtores interessados em produzir feijão preto, uma vez que apresenta alto potencial produtivo, porte ereto, resistência ao acamamento e excelentes qualidades culinárias (<http://www.cnpaf.embrapa.br/conafe/pdf/conafe2005-0066.pdf>).

As variedades de trigo foram lançadas pelo IAC e pela EMBRAPA. As sementes de trigo foram irradiadas com raios gama. As novas variedades apresentaram variação quanto à altura da planta, resistência às doenças e tolerância ao alumínio (Tulmann Neto e Camargo, 2001a, 2001b; Camargo *et al.*, 2005; IAC, 2005).

É importante ressaltar que as linhagens mutantes obtidas por radiação ou agentes químicos não sofrem restrições do ponto de vista legal no Brasil, sendo permitidos sua comercialização e consumo (Silva *et al.*, 2007).

#### **2.4. Mutações induzidas no melhoramento da soja**

O melhoramento vegetal por meio da indução de mutação não tem sido restrito a uma espécie de planta, seu uso tem sido estendido inclusive a grãos de leguminosas como a soja (Micke *et al.*, 1990; Micke e Swiecicki, 1998).

Diversas linhagens mutantes (M<sub>4</sub> a M<sub>7</sub>) de diferentes variedades, incluindo soja, têm sido testadas e caracterizadas para tolerância à seca e salinidade. Além disso, mutações

induzidas têm demonstrado ser também uma ferramenta apropriada para melhorar o processo de fixação de nitrogênio em leguminosas (Micke, 1984; IAEA/FAO, 2007).

Apesar dos excelentes resultados experimentais obtidos com a indução de mutação, o desenvolvimento de variedades mutantes de soja utilizando esta ferramenta é relativamente recente. O primeiro trabalho para promover mutação em sementes de soja foi realizado por Hammond e Fehr (1975). Os pesquisadores utilizaram raios X e etil metano sulfonato (EMS), obtendo o mutante A5 contendo de 2,9% a 4,1% de ácido linolênico e possibilitou que outros pesquisadores utilizando o mesmo mutagênico obtivessem diferentes mutantes para a mesma característica, como o mutante C1640 contendo 3,6% de ácido linolênico (Hammond e Fehr, 1983; Wilcox *et al.*, 1984).

Conger *et al.* (1976) induziram mutações em sementes de soja com raios gama, nêutrons e EMS com a finalidade de obter variabilidade para produtividade. Os autores concluíram que os tratamentos foram efetivos, principalmente aqueles com EMS. Uma ampla variabilidade foi observada e algumas plantas individuais apresentando alta produtividade foram identificadas e selecionadas.

Hajika *et al.* (1992) utilizaram raios gama com intensidade de 40 krad em sementes de soja do cultivar Kanto 101 na qual as enzimas lipoxigenase 1 e 3 estavam ausentes e identificaram um mutante para ausência de lipoxigenase 2. As gerações M<sub>4</sub> a M<sub>6</sub> foram avaliadas em campo apresentando desenvolvimento e produtividade semelhantes a cultivar original.

Takahashi *et al.* (1994) irradiaram com raios gama a cultivar de soja Karikei 434 a qual apresenta ausência da subunidade protéica  $\alpha'$  da fração 7S e obteve um mutante com ausência da subunidade  $\alpha$ . O mutante avaliado após três gerações de autofecundações não mostrou redução no teor total de proteína nem no desenvolvimento da semente ou na germinação.

Tulmann Neto e Alves (1997) induziram mutações em sementes de soja do cultivar Paraná utilizando raios gama com intensidade de 22 Krad. Após avaliarem 15.000 plantas na geração M<sub>3</sub> obtiveram duas plantas com florescimento mais precoces (7 e 10 dias), se comparadas ao cultivar original.

Bathia *et al.* (1999) apresentaram em sua revisão sobre melhoramento de oleaginosas por mutação induzida visando a alteração da composição de ácidos graxos, alguns dados que confirmam a importância deste método no desenvolvimento de cultivares,

mostrando que foram desenvolvidas até 1991 cerca de 163 cultivares de plantas oleaginosas, sendo que 53 cultivares eram de soja. Dentre as 53 cultivares de soja, 38 foram obtidas pelo uso de raios gama e raios X, cinco pelo uso de nêutrons, oito por mutagênicos químicos e dois cultivares pela associação entre mutagênicos físicos e químicos.

Sebastian *et al.* (2000) obtiveram uma mutação recessiva em soja que conferia às sementes aumento do conteúdo de fosfato inorgânico, diminuição de ácido fítico e diminuição do conteúdo total de oligossacarídeos de rafinose (Sebastian *et al.*, 2000; Hitz *et al.*, 2002).

Wilcox *et al.* (2000) irradiaram sementes de soja da linhagem CX1515-4 com EMS e relataram o isolamento de mutantes com conteúdo reduzido de fitato (29% a 55%) e com quantidade de fósforo aumentada de três a seis vezes em relação ao conteúdo normal. A progênie M<sub>6</sub> de um dos mutantes apresentou cerca de 6,84 g.kg<sup>-1</sup> de ácido fítico e de 2,34 a 4,41 g.kg<sup>-1</sup> de fosfato inorgânico. Em outro mutante a progênie M<sub>6</sub> apresentou cerca de 10,89 g.kg<sup>-1</sup> de ácido fítico e de 1,21 a 3,84 g.kg<sup>-1</sup> de fósforo inorgânico. Em contraste, as sementes não mutadas continham em média 15,33 g.kg<sup>-1</sup> de ácido fítico e 0,74 g.kg<sup>-1</sup>. Os mutantes apresentando acentuada redução nos níveis de ácido fítico não apresentaram nenhuma alteração no desenvolvimento das sementes ou no crescimento da planta.

Manjaya *et al.* (2007) irradiaram sementes de soja VLSoy-2 com doses de 250 Gy de raios gama para induzirem variabilidade e avaliaram as modificações ocorridas nas proteínas de reserva. Plantas M<sub>2</sub> apresentaram diversas alterações tais como na altura da planta, cor da flor, esterilidade, forma da folha e no ciclo vegetativo. Os mutantes foram avançados até a geração M<sub>5</sub> junto com o parental e então avaliados para a composição das proteínas de reserva. Foram encontrados três mutantes com ausência da subunidade A3 da fração 11S (Glicinina) sendo que dois destes também apresentaram ausência das subunidades  $\alpha'$  e  $\alpha$  da fração 7S (Beta-conglicinina) e o outro mutante apresentou baixos níveis de atividade do inibidor de tripsina.

Patil e Wakode (2011) trataram duas variedades de soja com várias doses de um mutagênico físico (raios gama) e um químico (EMS) com o objetivo de avaliar os efeitos na indução de variabilidade genética avaliando gerações precoces e tardias utilizando como indicadores iniciais mais importantes a germinação, sobrevivência, esterilidade de pólen e índice mitótico. As gerações mutantes M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e M<sub>3</sub> foram avaliadas. A redução máxima para a germinação e porcentagem de sobrevivência foi registrada com uso de 30krad de

raios gama e 0,15% de EMS em ambos os cultivares que podem ser devido a danos fisiológicos agudos e danos cromossômicos.

## **2.5. Detecção de mutação induzida**

A indução de mutações com agentes mutagênicos ocasionará variabilidade genética dentro de uma população. Após a indução é necessário realizar a seleção dos genótipos com as características de interesse do melhorista. Para composição bioquímica do grão de soja, a seleção de mutantes pode ser realizada utilizando-se diferentes metodologias. Para a determinação do conteúdo de proteína total utiliza-se o método Kjeldahl, para o conteúdo de óleo usa-se o método Soxhlet, para conteúdo de oligossacarídeos utiliza-se a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), etc (Ávila *et al.*, 2007; Fialho, 2007; Gonçalves *et al.*, 2007; Vallilo *et al.*, 2007).

Entretanto, muitos desses métodos são trabalhosos, consomem muito tempo e geram resíduos químicos. Em substituição a estes métodos, a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) vem sendo empregada para estimar o conteúdo dos variados caracteres de sementes. A vantagem de se utilizar a técnica NIRS para estas análises é que elas podem ser feitas em um curto período de tempo, com grande reprodutibilidade e precisão (Morgano *et al.*, 2005; Tillman *et al.*, 2006).

## **2.6. Espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS)**

A energia denominada infravermelha (IV) corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de número de onda ( $\bar{\nu}$ ) entre 12.500 e 10  $\text{cm}^{-1}$  ou na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) entre 800 e 1.000.000 nm (0,8 a 1.000  $\mu\text{m}$ ). O infravermelho pode ser dividido em três partes que são infravermelho próximo (NIR) que varia de 12.500 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$  (800 a 2.500 nm), infravermelho médio (MIR) variando de 4.000 a 200  $\text{cm}^{-1}$  (2.500 a 50.000 nm) e o infravermelho distante (FIR) que varia de 200 a 10  $\text{cm}^{-1}$  (50.000 a 1.000.000 nm). É usual caracterizar as bandas de absorção em unidades de número de ondas, que são expressas em centímetros recíprocos ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Mendham *et al.*, 2002; Skoog *et al.*, 2006; Barbosa, 2007; Lee *et al.*, 2011).

A espectroscopia no infravermelho é uma ferramenta versátil aplicada com o objetivo de adquirir informações qualitativas ou quantitativas por meio da interação de ondas eletromagnéticas na faixa do infravermelho com os constituintes de uma amostra (Mendham *et al.*, 2002; Pasquini, 2003; Skoog *et al.*, 2006).

A medida dos componentes presentes em uma amostra utilizando a técnica NIRS fornece um espectro que apresenta diversas bandas de absorção que são devidas, principalmente, a três tipos de ligações químicas: C-H (encontrada em gorduras, óleo e ácidos graxos), O-H (na água) e N-H (nas proteínas) e por isso mesmo são ideais para determinação quantitativa dos componentes citados. Outros tipos de ligações químicas podem aparecer, mas apresentam bandas de absorção mais fracas.

A espectroscopia no infravermelho vem se mostrando uma ferramenta ideal para a determinação de vários componentes como umidade, proteína, aminoácidos, gordura, óleo, ácidos graxos, açúcares, isoflavonas, amido, celulose entre outros componentes importantes em produtos agrícolas como grãos e sementes oleaginosas. A técnica também tem sido aplicada nas mais diversas áreas como indústria farmacêutica, de cosméticos, ambiental, petroquímica, de combustível, de polímeros, química, agrícola, de alimentos, de bebidas, têxtil, biomédica e clínica (Pasquini, 2003; Weir *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Sundaram *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011).

As determinações quantitativas dependem da medida da intensidade da radiação transmitida, absorvida ou refletida pela amostra em um determinado comprimento ou número de onda e os espectros são registrados, respectivamente, nos modos transmitância (T), absorbância (A) ou reflectância (R) (Mendham *et al.*, 2002; TQ Analyst User's Guide, 2004; Natalino, 2006).

Os registros das absorções na região do NIR podem ser obtidos nos modos de transmitância e absorbância são normalmente utilizados para amostras líquidas transparentes e o de reflectância para amostras sólidas (Mendham *et al.*, 2002; Pasquini, 2003; Skoog *et al.*, 2006; Barbosa, 2007).

Dentre os modos de reflectância destaca-se o de reflectância difusa, que é observado quando a luz penetra em uma amostra, percorre em seu interior um caminho considerado aleatório (difuso) e reflete dela contendo as informações espectrais (Mendham *et al.*, 2002; Pasquini, 2003; Morgano *et al.*, 2005; Skoog *et al.*, 2006; Barbosa, 2007).

Recentemente a região do infravermelho próximo (NIR) tem recebido muita atenção, e tem sido muito utilizada em particular com relação às análises quantitativas de amostras com matrizes complexas, como é o caso das análises dos constituintes da soja (Vallilo *et al.*, 2007).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahloowalia, B. S.; Maluszynski, M.; Nichterlein, K. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, v.135, n.2, p.187-204, 2004.
- Almeida, R. D.; Peluzio, J. M.; Afféri, F. S. Divergência genética entre cultivares de soja, sob condições de várzea irrigada, no sul do estado Tocantins. *Revista Ciência Agronômica*, v.42, n.1, p.108-115, 2011.
- Ávila, M. R.; Braccini, A. L.; Scapim, C. A.; Mandarino, J. M. G.; Albrecht, L. P.; Vidigal Filho, P. S. Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, v.29, n.3; p.111-127, 2007.
- Barbosa, L. C. A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Editora UFV, 189p., 2007.
- Bathia, C. R.; Nichterlein, K.; Maluszynski, M. Oilseed cultivars developed from induced mutations and mutations altering fatty acids composition. *Mutation Breeding Review*. Vienna, Austria, FAO/IAEA, n.11, 38p., 1999.
- Borém, A.; Miranda, G. V. Recursos Genéticos. Em: *Melhoramento de Plantas*. Viçosa: Editora UFV, 525p., 2009.
- Borges, K. C. F.; Santana, D. G.; Melo, B.; Santos, C. M. Rendimento de polpa e morfometria de frutos e sementes de pitangueira-do-cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.32, n.2, p.471-478, 2010.
- Cabral, P. D. S.; Soares, T. C. B.; Lima, A. B. P.; Soares, Y. J. B.; Silva, J. A. Análise de trilha do rendimento de grãos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e seus componentes. *Revista Ciência Agronômica*, v.42, n.1, p.132-138, 2011.
- Cavalcante, A. K.; Sousa, L. B.; Hamawaki, O. T. Determinação e avaliação do teor de óleo em sementes de soja pelos métodos de ressonância magnética nuclear e soxhlet. *Bioscience Journal*, v.27, n.1, p.8-15, 2011.
- Camargo, C. E. O.; Ferreira Filho, A. W. P.; Tulmann Neto, A.; Pettinelli, A.; Castro, J. L.; Felício, J. C.; Mistro, J. C.; Salomon, M. V. Avaliação de Linhagens de Trigo Originárias de Hibridação com e sem Irradiação Gama. *Bragantia*, v.64, p.61-74, 2005.
- Costa, A. C. T.; Geraldo, J.; Oliveira, L. B.; Pereira, M. B.; Carmo, M. G. F.; Pimentel, C. Variabilidade genética para caracteres de importância agronômica de meio-irmãos de

- milheto, semeadas na época da seca. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.5, n.1, p.130-138, 2006.
- Coimbra, J. L. M.; Carvalho, F. I. F.; Oliveira, A. C.; Guidolin, A. F. Criação de variabilidade genética no caráter estatura de planta em aveia: hibridação artificial x mutação induzida. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.10, n.3, p.273-280, 2004.
- Coimbra, J. L. M.; Carvalho, F. I. F.; Oliveira, A. C.; Silva, J. A. G. Lorencetti, C. Comparação entre mutagênicos químico e físico em populações de aveia. *Ciência Rural*, v.35, n.1, p.46-55, 2005.
- Conger, B. V.; Skinner, L. W.; Skold, L. N. Variability for components of yield induced in soybean bu seed treatment with gamma radiation, fission neutrons and ethylmethane sulfonate. *Crop Science*, v.16, p.49-52, 1976.
- Chopra, V. L. Mutagenesis: Investigating the process and processing the outcome for crop improvement. *Current Science*, v.89, n.2, 2005.
- Dorneles, L. M. C.; Rezende, D. F.; Souza, L. B.; Hamawaki, O. T. Diversidade genética entre linhagens de soja semiprecoce no município de Goiatuba-GO, safra 2009/2010. *Revista Verde*, v.6, n.1, p.22-27, 2011.
- Ferrão, M. F.; Carvalho, C. W.; Müller, E. I.; Davanzo, C. U. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. *Ciência e Tecnologia de Alimento*, v.24, n.3, p.333-340, 2004.
- Fialho, L. S. Purificação e caracterização de uma  $\alpha$ -galactosidase em sementes de Tachigali multijuga e clonagem parcial do gene da estaquiase sintase de soja. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, 140p., 2007.
- Gonçalves, A. C.; Soares, N. S.; Bolina, C. O.; Barros, E. G. Influência da temperatura no acúmulo de proteínas em sementes de soja. *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, p.1038-1040, 2007.
- Hajika, M.; Kitamura, K.; Igita, K.; Nakazawa, Y. Genetic relationships among the genes for lipoxygenase-1, -2 and -3 isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seed. *Japanese Journal of Breeding*, v.42, n.4, p.787-792, 1992.
- Hammond, E. G.; Fehr, W. R. Registration of A5 germplasm line of soybean (Reg. No. GP44). *Crop Science*. v.23, p.192-193, 1983.
- Henriques, F. S. The green revolution and the molecular biology. *Revista das Ciências Agrárias* v.32, n.2, p.245-254, 2009.

- Henry, F.C. Irradiation effects on meat: a review. *Revista de Ciências Agrárias*, v.32, n.2, p.255-262, 2009.
- Hitz, H. D.; Carlson, T. J.; Kerr, P. S.; Sebastian, S. A. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiology*, v.128, p.650-660, 2002.
- [http://www.abiove.com.br/exporta\\_br.html](http://www.abiove.com.br/exporta_br.html), acessada em Maio 2011.
- <http://www.arroz.agr.br/site/arrozemfoco/050829.php>, acessada em Janeiro 2009.
- <http://www.cnpaf.embrapa.br/conafe/pdf/conafe2005-0066.pdf>, acessada em Maio 2011.
- [http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=22ecod\\_pai=16](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22ecod_pai=16), acessada em Maio 2011.
- <http://dreyfus.ib.usp.br/bio201/>, acessada em Maio 2011.
- <http://www.ufsm.br/blg220/hide/locoalelos.htm>, acessada em Maio 2011.
- <http://www.ufv.br/dbg/gbolhtm/gbol16.htm>, acessada em Maio 2011.
- IAC. Com palestras e visitas ao campo, IAC orienta produtores de cereais de inverno. O Agrônomo - Boletim Técnico-Informativo do Instituto Agrônomo, v.57, n.2, p.28, 2005.
- IAEA/FAO. *Plant Breeding and Genetics Newsletter*, n.18, 2007.
- IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Plant mutation reports*, v.1, n.1, 56p., 2006a.
- IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY/FAO. *Plant Breeding and Genetics*, n.7, Vienna, 22p., 2001.
- Ishiy, T.; Schiocchet, M. A.; Bacha, R. E.; Morel, D. A.; Tulmann Neto, A.; Knoblauch, R. Rice Mutant Cultivar SCS114 Andosan. Em: *Plant Mutation Report*, Viena: IAEA, v.1, n.2, 2006.
- Jiao, Z.; Si, X.; Li, G.; Zhang, Z.; Xu, X. Unintended compositional changes in transgenic rice seeds (*Oryza sativa* L.) studied by spectral and chromatographic analysis coupled with chemometrics methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.1746–1754, 2010.
- Khan, S.; Parveen, K.; Goyal, S. Induced mutations in chickpea-morphological mutants. *Frontiers of Agriculture in China*, v.5, n.1, p.35-39, 2011.
- Konzak, C. F. Breeding in crop plants - mutations and in vitro mutation breeding. *Crop Science*, v.41, n.1, p.253-253, 2001.

- Kumar, P. R. R.; Ratman, S. V. Mutagenic effectiveness and efficiency in varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by separate and combined treatment with gamma-rays and sodium azide. African Journal of Biotechnology, v.9, n.39, p.6517-6521, 2010.
- Lee, J. D.; Shannon, J. G.; Choung, M. G. Selection for protein content in soybean from single F2 seed by near infrared reflectance spectroscopy. Euphytica, v.172, p.117-123, 2010.
- Lee, J. D.; Shannon, J. G.; Choung, M. G. Em Soybean - Applications and Technology; Ng, T. B., eds.; InTech, Janeza Trdine, Rijeka, Croatia, 2011.
- Manjaya, J. G.; Suseelan, K. N.; Gopalakrishna, T.; Pawar, S. E.; Bapat, V. A. Radiation induced variability of seed storage proteins in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). Food Chemistry v.100, p.1324-1327, 2007.
- Marques, M. C.; Hamawaki, O. T.; Sedyama, T.; Bueno, M. R.; Reis, M. S.; Cruz, C. D.; Nogueira, A. P. O. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de soja em diferentes épocas de semeadura. Bioscience Journal, v.27, n.1, p.59-69, 2011.
- Mendham, J.; Denney, R. C.; Barnes, J. D. Vogel - Análise Química Quantitativa, 6<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Editora LTC, 462p., 2002.
- Micke, A.; Mutation breeding of grain legumes. Plant and Soil, v.82, n.3, p.337-357, 1984.
- Micke, A.; Swiecicki, W.; Induced mutations in lupins. Em: Proceedings of 5th International Ludin Conference. Pozan, Poland, 110-127p., 1988.
- Micke, A.; Donini, B.; Maluszynski, M. Induced mutation for Crop Improvement. Mutation Breeding Review. Viena: Internatinal Atomic Energy Agency, n.7, 41p.,1990.
- Micke, A.; Donini, B.; Induced mutations. Em: Hayward, M. D.; Bosemark, N. D.; Romagosa, I.; Plant breeding: Principles and Prospects. Londres: Hapman e Hall, 1993.
- Micke, A. Mutation breeding of grain legumes. Plant and Soil, v.152, n.1, p.81-85, 1993.
- Morgano, M. A.; Faria, C. G.; Ferrão, M. F.; Bragagnolo, N.; Ferreira, M. M. C. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. Ciência e tecnologia de alimentos, v.25, n.1, p.25-31, 2005.
- Moturi, B.; Charya, M. A. S. Influence of physical and chemical mutagens on dye decolourising *Mucor mucedo*. African Journal of Microbiology Research, v.4, n.17, p. 1808-1813, 2010.

- Natalino, R. Caracterização de açúcar mascavo aplicando análise das componentes principais (PCA) a dados espectrofotométricos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 62p., 2006.
- Nóbrega, F. G. O perigo das mutações no RNA. *Ciência Hoje*, v.24, n.142, p.22-23, 1998.
- Pasquini, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.14, n.2, p.198-219, 2003.
- Patil, G. P.; Wakode, M. M. Effect of physical and chemical mutagens on soybean, *Current Botany*, v.2, n.4, p.12-14, 2011.
- Predieri, S.; Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.64, p.185-210, 2001.
- Rocha, F.; Barili, L. D.; Garcia, S. H.; Modena, R.; Coimbra, J. L. M.; Guidolin, A. F.; Bertoldo, J. G. Seleção em populações mutantes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para caracteres adaptativos. *Biotemas*, v.22, n.2, p.19-27, 2009.
- Rutger, J. N.; Bryant, R. J.; Moldenhauer, K. A. A. Registration of induced semidwarf rice mutant DR1. *Crop Science*, n.46, p.2340-2341, 2006.
- Sebastian, S. A.; Kerr, P. S.; Pearlstein, R. W.; Hitz, W. D. Soybean germplasm with novel genes for improved digestibility. Em: *Soy in Animal Nutrition*. Federation of Animal Science Societies; Drackley, J. K., ed; Savoy: Illinois, p.56, 2000.
- Shibata, M. Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding. *Plant Biotechnology*, v.25, p.3-8, 2008.
- Silva, M. P.; Villela, F. A.; Dode, L. B.; Magalães Júnior, A. M.; Tillmann, M. A. A. Detecção de sementes de arroz mutante tolerante ao herbicida imazethapyr. *Revista Brasileira de Sementes*, v.29, p.130-137, 2007.
- Shu, Q. Y.; Lagoda, P. J. L. Mutation Techniques for Gene Discovery and Crop Improvement. *Molecular Plant Breeding*. v.5, p.193-195, 2007.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5a ed., Porto Alegre: Bookman, 628p., 2006.
- Sundaram, J.; Kandala, C. V.; Holser, R. A.; Butts, C. L.; Windham, W. R. Determination of in-shell peanuts oil and fatty acid composition using near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.87, n.10, p.1103-1114, 2010.

- Tabasum, A.; Cheema, A. A.; Hameed, A.; Rashid, M.; Ashraf, M. Radio sensitivity of rice genotypes to gamma radiations based on seedling traits and physiological indices. *Pakistan Journal of Botany*, v.43, n.2, p.1211-1222, 2011.
- Takahashi, K.; Banda, H.; Kikuchi, A.; Ito, M.; Nakamura, S. An induced mutation line lacking the  $\alpha$ -subunit of  $\beta$ -conglycinin in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Breeding Science*, v.44, p.65-66, 1994.
- Teixeira, A. I. Herdabilidade e correlação entre concentrações de proteína em soja avaliadas por diferentes metodologias. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, 53p., 2003.
- Tillman, B. L.; Gorbet, D. W.; Person, G. Predicting oleic and linoleic acid content of single peanut seed using near-infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science*, v.46, p.2121-2126, 2006.
- TQ Analyst User's Guide, Technical Support. Thermo Electron Corporation, Madison, WI, 2004.
- Tulmann Neto, A.; Alves, M. C. Induction of mutations for earliness in the soybean cultivar Paraná. *Revista Brasileira de Genética*, v.20, n.1, p.45-50, 1997.
- Tulmann Neto, A.; Camargo, C. E. O.; Castro, J. L.; Ferreira Filho, A. W. P. Evaluation of 'Anahuac' wheat mutant lines for aluminum tolerance. *Euphytica*, v.120, n.3, p.339-343, 2001a.
- Tulmann Neto, A.; Camargo, C. E. O.; Castro, J. L.; Ferreira Filho, A. W. P. New wheat genotypes tolerant to aluminum toxicity obtained by mutation induction. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, n.1, p.61-70, 2001b.
- Vallilo, M. I.; Caruso, M. S. F.; Takemoto, E.; Pimentel, S. A. Caracterização química e físico-química do óleo das sementes de *platymiscium floribundum* vog. (sacambu), colhidas na fase de desenvolvimento e na época de maturação fisiológica. *Revista do Instituto Florestal*, v.19, n.2, p.73-80, 2007.
- Zaha, A.; Ferreira, H. B.; Passaglia, L. M. P.; *Biologia Molecular Básica*, 3a ed., Porto Alegre: Mercado Aberto, 424p., 2003.
- Weir, A. D.; Omielan, J.; Lee, E. A.; Rajcan, I. Use of NMR for predicting protein concentration in soybean seeds based on oil measurements. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.82, n.2, p.87-91, 2005.

- Wilcox, J. R.; Cavins, J. F.; Nielsen, N. C. Genetic alteration of soybean oil composition by a chemical mutagen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.61, p.97-100, 1984.
- Wilcox, J. R.; Premachandra, J. S.; Young, K. A.; Raboy, V. Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. *Crop Science*, v. 40, p.1601-1605, 2000.
- Yaklich, R. W. J.  $\beta$ -Conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.729-735, 2001.
- Yamaguchi, H.; Igarashi, I.; Sato, T. Release of a new lodging resistant mutant cultivar produced by gamma rays in glutinous rice. *Radioisotopes*, 50, 442-446, 2001.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação de diferentes dosagens de radiação gama (100, 200 e 300 Gy) sobre o conteúdo de proteínas e óleo da soja (*Glycine max* L. Merrill) e selecionar genótipos mutantes que apresentem características bioquímicas desejáveis ao Programa de Melhoramento da Soja do BIOAGRO/UFV.

### 4.2. Objetivos específicos

- Desenvolver modelos de calibração por espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) para determinar o conteúdo de umidade, proteína e óleo em soja.
- Estudar os efeitos da aplicação de diferentes dosagens de radiação gama (100, 200 e 300 Gy) nos conteúdos de proteína e óleo em soja e identificar possíveis mutantes para essas características.
- Selecionar genótipos que possuam características bioquímicas desejáveis para uso como progenitores no Programa de Melhoramento de Soja do BIOAGRO/UFV a fim de desenvolver diferentes linhagens de soja com alto teor de proteína e alto teor de óleo.

## **CAPÍTULO 1**

### **DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE CONSTITUINTES DE SOJA POR ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO**

#### **RESUMO**

A espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) é uma técnica utilizada para determinar umidade, proteína e óleo em soja. O objetivo do trabalho foi desenvolver modelos de calibração para quantificar estes constituintes empregando o método de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS). Os coeficientes de correlação e erros quadráticos médio das calibrações (RMSEC) foram, respectivamente, 0,997 e 0,117 para umidade; 0,998 e 0,202 para proteína e 0,988 e 0,421 para óleo. Os resultados demonstraram que a espectroscopia NIR fornece resultados satisfatórios para análise dos constituintes da soja.

## **ABSTRACT**

### **DEVELOPMENT OF CALIBRATION MODEL FOR MEASUREMENT OF SOYBEAN SEED COMPONENTS BY NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY**

Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) is a technique used to determine moisture, protein, and oil contents in soybean flour. Our goal was to develop calibration models to quantify these parameters. Correlation coefficients and root mean square errors of calibration (RMSEC) were, respectively, 0.997 and 0.117 for moisture; 0.998 and 0.202 for protein and 0.988 and 0.421 for oil. The results showed that NIR spectroscopy provides satisfactory results for analyzing these parameters in soybean flour.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as leguminosas cultivadas, a soja (*Glycine max* L.) é a que possui o maior conteúdo de proteínas e é uma das mais importantes oleaginosas cultivadas no país e em outras partes do mundo, respondendo por cerca de 90% da produção nacional de óleo vegetal. Em média, os cultivares comerciais apresentam cerca de 40% de proteína e 20% de óleo, entretanto, existem introduções com percentuais variando de 30% a 53% para proteína e de 13% a 28% para óleo.<sup>1,2</sup>

A soja é fonte de proteína tanto para a alimentação animal quanto para a humana. Por ser relativamente barata, pode ser usada na alimentação humana para amenizar a situação da população que sofre com a pobreza, subnutrição e deficiência protéica. A proteína de soja é muito utilizada para os mais variados fins, entre eles temos sua utilização na indústria farmacêutica e cosmética.<sup>3-6</sup>

O óleo de soja tem uso alimentício bastante diversificado podendo ser usado na fabricação de margarinas, gordura vegetal hidrogenada e maionese e também como óleo para saladas e frituras. A vantagem do óleo de soja em relação aos demais óleos deve-se ao seu baixo preço aliado à sua excelente qualidade.<sup>5,7-9</sup>

As metodologias padrão utilizadas para a determinação do conteúdo de proteína e óleo são trabalhosas e demoradas, requerendo a realização de várias etapas. A espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS), ao contrário, fornece resultados de forma rápida.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver modelos de calibração para determinar, via NIRS, a umidade, o conteúdo de proteína e de óleo em farelo de soja.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras**

Um conjunto de amostras de soja foi utilizado para desenvolver os modelos de calibração para cada uma das características bioquímicas avaliadas e outro conjunto foi utilizado para verificar a habilidade de previsão dos modelos de calibração construídos. Grãos de soja foram moídos utilizando um moinho modelo MA20 (Marconi Equipamentos para Laboratório, SP, Brasil) e o pó obtido foi passado em uma peneira de 20/30 Mesh. Para a construção do modelo de calibração para umidade foram utilizadas 59 amostras, para proteína 97 amostras e para óleo 98 amostras. Para a validação dos modelos através do conjunto de previsão, também chamado de conjunto de validação externa, foram utilizadas 223 amostras para umidade, 69 para proteína e 69 para óleo. Foram realizadas três leituras por amostra no espectrofotômetro NIR.

### **2.2. Metodologias padrão**

#### **2.2.1. Determinação de umidade**

A determinação da umidade no farelo de soja foi realizada pelo método direto de secagem em estufa (método gravimétrico) descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).<sup>10</sup> Cerca de 1 g do farelo foi pesado e seco em estufa por um determinado período. Após a secagem, foi feita nova pesagem. A amostra foi novamente colocada em estufa por mais um período e, em seguida, tornou-se a pesar. Isto foi repetido até a observação de peso constante da amostra. Tomando por base o peso inicial e final, determinou-se a quantidade de água eliminada, que foi transformada na porcentagem de umidade da amostra.

### **2.2.2. Determinação de proteína**

A determinação do conteúdo de proteína no farelo de soja foi realizada pelo método Kjeldahl descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).<sup>10</sup> Cerca de 300 mg do farelo foram utilizados para a análise. A partir do teor de nitrogênio obtido, foi calculada a porcentagem de proteína total da amostra, empregando-se nos cálculos o fator de 6,25.

### **2.2.3. Determinação de óleo**

A determinação do conteúdo de óleo no farelo de soja foi realizada em aparelho extrator de Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985)<sup>10</sup> com refluxo por 10 h. Cerca de 5 g do farelo foram utilizados para a análise.

## **2.3. Espectroscopia no infravermelho próximo**

Os espectros de reflectância na região do infravermelho próximo do farelo de soja foram coletados em um espectrômetro modelo Antaris<sup>TM</sup> II FT-NIR Analyser (Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA), cada amostra foi lida três vezes, foram realizadas 30 varreduras espectrais para cada amostra, com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Os dados espectrais foram expressos no formato  $\log(1/R)$ , onde R é a reflectância.

### **2.3.1. Desenvolvimento dos modelos de calibração**

O conteúdo de umidade, proteína e óleo dos grupos de amostras específicas para cada característica determinados por metodologia padrão foram relacionados com seus respectivos espectros obtidos pelo espectrofotômetro NIR para o desenvolvimento dos modelos de calibração utilizando o software TQAnalyst<sup>TM</sup> versão 6.1.1.356 da ThermoNicolet.

O método de regressão multivariada utilizado no tratamento dos dados espectrais para a construção dos modelos de calibração foi o método de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS = *Partial Least Squares*).

O método PLS serve para converter os dados multivariados em informações úteis para serem utilizadas na construção dos modelos de regressão, o qual permite estimar com eficiência os constituintes das amostras. Como qualquer outro método de regressão, o método PLS tem como objetivo encontrar uma relação entre a matriz de dados X (variáveis independentes) onde estão os dados espectrais das amostras e a matriz de dados Y (variáveis dependentes) onde estão contidas as propriedades a serem analisadas, por exemplo, a concentração. O método PLS é indicado quando X contém variáveis altamente correlacionadas (dados de espectroscopia) como os dados deste trabalho.<sup>11-16</sup>

Uma vantagem deste método é poder ser utilizado mesmo quando as amostras contêm interferentes, desde que estes também estejam presentes no conjunto de amostras que foram utilizadas na calibração. Outra vantagem é que quando se retira ou acrescenta novas amostras ao conjunto de calibração, os parâmetros do modelo criado inicialmente não se alteram significativamente, não prejudicando o modelo inicial.<sup>17</sup>

Para a construção dos modelos de regressão foram correlacionados os valores médios dos conteúdos de umidade, proteína e óleo, obtidos nas determinações empregando metodologias padrão com as médias dos respectivos espectros das amostras. As análises foram realizadas em triplicatas. Foram obtidos 177 espectros correspondentes a 59 amostras para umidade, 291 espectros correspondentes a 97 amostras para proteína e 294 espectros correspondentes a 98 amostras para óleo.

Na tentativa de minimizar os efeitos causados pela dificuldade de obtenção de um espectro ideal, ou seja, espectros sem variações aleatórias ou sistemáticas indesejáveis de diferentes origens, alguns tratamentos matemáticos foram empregados para que estas variações não tivessem influência nos resultados finais.

A primeira derivada foi empregada para todas as características, além disso, foi aplicada a correção multiplicativa de sinal (MSC = *Multivariate Scattering Correction*) para umidade. A primeira derivada foi utilizada para correção de deslocamento na linha de base e para reforçar pequenas diferenças espectrais, permitindo isolar bandas não distintas nos espectros originais, o que ajuda a resolver problemas de sobreposição espectral. A correção multiplicativa de sinal também é utilizada para correção de linha de base por

minimizar os efeitos de espalhamentos de luz decorrente, principalmente, da diferença de tamanho das partículas da amostra.<sup>14,15,19,20,22,24-28</sup>

Após a obtenção dos modelos de calibração estes foram testados por meio do método de previsão onde os modelos construídos foram utilizados para prever os conteúdos de umidade, proteína e óleo em novas amostras que não estavam presentes nos conjuntos de calibração com a finalidade de avaliar a eficiência dos modelos de calibração desenvolvidos.

### 2.3.2. Parâmetros de validação dos modelos

Os espectros foram divididos em dois conjuntos, um conjunto para a calibração e outro para a previsão. A habilidade dos modelos de calibração desenvolvidos em prever os conteúdos de umidade, proteína e óleo foi avaliada pelo coeficiente de correlação de calibração (R) e de previsão (r), obtidos pela relação entre os valores das características estimados por metodologia padrão e os valores estimados pelo modelo de calibração. O parâmetro de erro empregado foi a raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração (RMSEC = *Root Mean Square Error of Calibration*) e de previsão (RMSEP = *Root Mean Square Error of Prediction*). Os valores de RMSE foram obtidos pela Equação 1:<sup>17-20</sup>

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (1)$$

Onde:

$y_i$  = valor medido por metodologia padrão;

$\hat{y}_i$  = valor medido pelo NIRS;

n = número de amostras.

Outros parâmetros foram analisados para uma avaliação adicional da habilidade de previsão dos modelos de calibração sendo eles a média do erro (bias médio), a média do erro relativo e o desvio padrão (SD) obtidos pelas Equações 2, 3 e 4.<sup>14,16,17,19-23</sup>

O erro é também conhecido como resíduo, viés ou *bias*, que é a diferença entre o valor obtido pela metodologia padrão e o valor previsto pelo NIRS.<sup>17,20,21</sup>

$$\text{Média do erro} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)}{n} \quad (2)$$

$$\text{Média do erro relativo} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i) / y_i}{n} \quad (3)$$

$$\text{Desvio padrão} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-1}} \quad (4)$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As regiões espectrais utilizadas na leitura das amostras, em número de onda, foram de 4.000 a 10.000  $\text{cm}^{-1}$  para umidade, 4.000 a 9.500  $\text{cm}^{-1}$  para proteína e 4.000 a 9.500  $\text{cm}^{-1}$  para óleo. Heil (2010) utilizou a região de 4.000 a 10.000  $\text{cm}^{-1}$  para obter modelos de calibração para umidade, proteína e óleo em grãos de soja. Lee *et al.* (2010) utilizaram a faixa de 4.000 a 25.000  $\text{cm}^{-1}$  para leitura de proteína em grãos individuais de soja. Panero *et al.* (2008) utilizaram a região de 4.000 a 14.000  $\text{cm}^{-1}$  para desenvolverem um modelo de calibração para conteúdo de proteína em grãos de soja. Delwiche *et al.* (2007) utilizaram a região de 4.000 a 9.090  $\text{cm}^{-1}$  para obter modelos de calibração para proteína em farinha de soja.<sup>3,6,21,29</sup>

Diversos autores utilizaram praticamente as mesmas faixas de leitura para a obtenção de modelos de calibração para umidade, proteína e óleo nas mais variadas culturas.<sup>14,18,19,24,30-35</sup>

As amostras utilizadas na construção dos modelos de calibração apresentavam a faixa de concentração variando de 8,82% a 11,18% para umidade, 26,60% a 47,48% para proteína e de 11,92% a 22,13% para óleo (Tabela 1). Delwiche *et al.* (2007) utilizaram soja em grão e em farelo com conteúdo de proteína variando de 35,0% a 41,5% para o conjunto de calibração. Heil (2010) utilizou grãos de soja com concentrações de 8,9% a 14,6 % de umidade, 32,5% a 39,6 % de proteína e 16,0% a 20,8 % de óleo.<sup>21,29</sup>

Nos conjuntos de previsão foram utilizados 671 espectros correspondentes a 223 amostras para umidade, 207 espectros correspondentes a 69 amostras para proteína e 207 espectros correspondentes a 69 amostras para óleo.

As amostras utilizadas nos conjuntos de previsão apresentavam de 6,48% a 11,62% de umidade; 33,63% a 41,90% de proteína e 15,56% a 22,27% de óleo (Tabela 1). Delwiche *et al.* (2007) utilizaram soja com conteúdo de proteína variando de 35,7% a 40,4% para o conjunto de previsão.<sup>21</sup>

Para a seleção dos modelos de calibração melhores ajustados, os valores dos coeficientes de correlação de calibração (R), RMSEC e RMSEP devem ser considerados. Primeiro devem-se escolher os modelos de calibração com elevado coeficiente de correlação. Este parâmetro é utilizado para uma avaliação prévia dos modelos. O próximo parâmetro para análise do ajuste do modelo é o RMSEC, que é uma medida de como o

modelo de calibração ajusta o próprio conjunto de calibração, sendo um parâmetro pouco informativo sobre o futuro desempenho do modelo. Porém a melhor estimativa do futuro desempenho dos modelos de calibração é o RMSEP, por produzir resultados mais realistas e independentes dos dados empregados na construção dos modelos. Um bom modelo deve apresentar baixo valor de RMSEP, o que também foi obtido para todos os três modelos de calibração obtidos.<sup>17,19,20,25,27,36-38</sup>

**Tabela 1:** Resultados de alguns parâmetros de calibração e de previsão para os conteúdos de umidade, proteína e óleo em farelo de soja.

Parâmetro	Calibração			Validação externa		
	Intervalo <sup>1</sup>	RMSEC <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Intervalo <sup>1</sup>	RMSEP <sup>2</sup>	r <sup>3</sup>
Umidade	8,82 - 11,18	0,117	0,997	6,48 - 11,62	0,244	0,990
Proteína	26,60 - 47,48	0,202	0,998	33,63 - 41,90	0,529	0,971
Óleo	11,92 - 22,13	0,421	0,987	15,56 - 22,27	0,562	0,949

<sup>1</sup>Faixa de concentração das amostras utilizadas nos modelos de calibração e nos conjuntos de validação, em porcentagem (%);

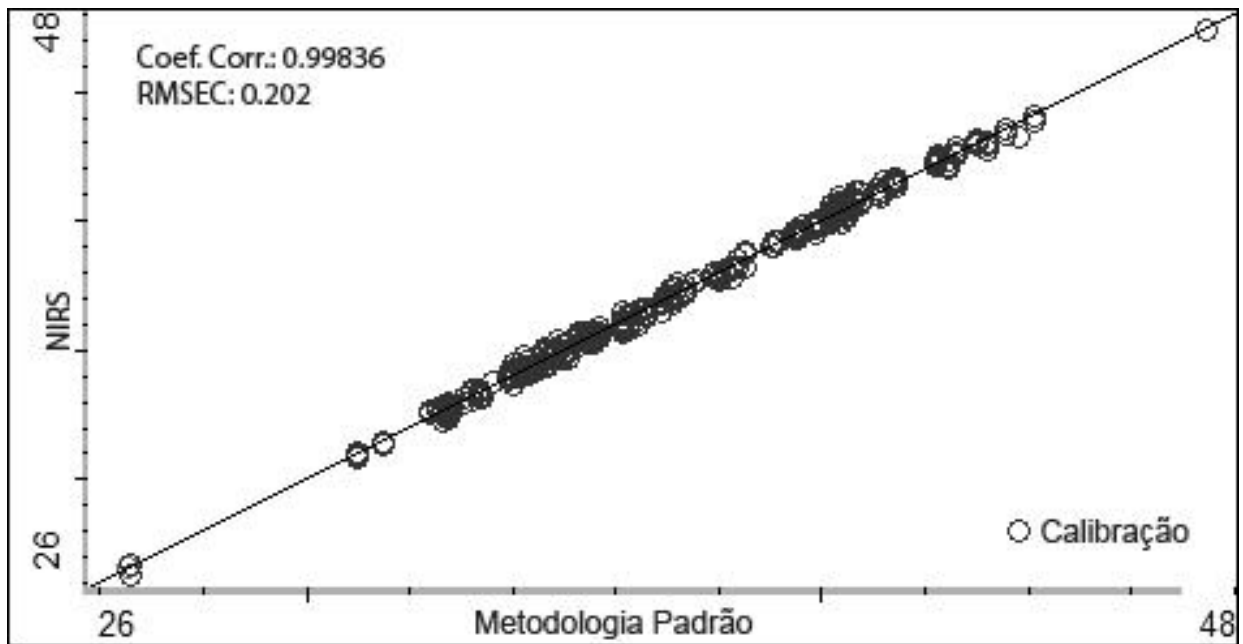
<sup>2</sup>Raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração (RMSEC) e de previsão (RMSEP);

<sup>3</sup>Coefficiente de correlação de calibração (R) e de previsão (r).

Para os conjuntos de calibração os valores dos coeficientes de correlação (R) e do RMSEC foram, respectivamente, 0,997 e 0,117 para umidade; 0,998 e 0,202 para proteína (Figura 1) e 0,988 e 0,421 para óleo. Para os conjuntos de previsão os valores dos coeficientes de correlação (r) e do RMSEP foram, respectivamente, 0,990 e 0,244 para umidade; 0,950 e 0,529 para proteína e 0,950 e 0,562 para óleo (Tabela 1).

Delwiche *et al.* (2007) obtiveram valores de R, RMSEC e RMSEP para proteína em farinha de soja de 0,732; 0,55 e 0,60, respectivamente e para as análises de um único grão de soja foram de, respectivamente, 0,668; 0,59 e 0,78. Panero *et al.* (2008) obtiveram valores de R, RMSEC, r e RMSEP para proteína em grãos de soja de 0,892; 0,493; 0,791 e 0,661, respectivamente. Heil (2010) obteve os valores de R, RMSEC e RMSEP de,

respectivamente, 0,98; 0,19 e 0,23 para umidade, 0,87; 0,67 e 0,73 para proteína e 0,85; 0,49 e 0,53 para óleo.<sup>3,21,29</sup>



**Figura 1:** Gráfico do modelo de calibração para proteína mostrando a boa correlação entre os valores da característica calculados pelo NIRS (eixo y) e pela metodologia padrão (eixo x).

Observa-se que os valores encontrados para estes parâmetros no atual trabalho apresentaram as mesmas faixas de valores encontradas pelos autores citados.

Os modelos das três características estudadas apresentaram bom desempenho, com elevados coeficientes de correlação de calibração, apresentando valores superiores a 0,98. Os valores de RMSEC obtidos para os três modelos foram baixos, o que também é desejável. Os valores de R e RMSEC, portanto indicam a obtenção de excelentes modelos de calibração (Tabela 1).<sup>17,19,20</sup>

Outra observação a ser feita para que se obtenha um modelo adequadamente ajustado é que o conjunto de previsão deve produzir um valor de RMSEP similar ao do RMSEC. Valores de RMSEP muito maiores que de RMSEC indicam modelos sobre ajustados, ou seja, a regressão pode estar considerando dados que não estão realmente correlacionados, como ruídos, erros sistemáticos, etc. A diferença entre esses valores pode ocorrer, em alguns casos, quando se aplica primeira derivada aos dados espectrais, o que introduz ruído maior que o do sinal original. Os modelos de calibração das três

características apresentaram proximidade entre os valores de RMSEC e RMSEP. Embora o modelo para proteína tenha apresentado um valor de RMSEP levemente superior ao RMSEC, porém um valor aceitável, este modelo levou a obtenção de valores baixos para média do erro, média do erro relativo e desvio padrão do conjunto de previsão que foram, respectivamente, de 0,06%; 0,15% e 0,53% (Tabela 2). Valores baixos para estes quesitos são desejáveis e são considerados como indicativos complementares do bom desempenho do modelo de calibração.<sup>14,16,19</sup>

A média do erro, média do erro relativo e desvio padrão para as outras características foram, respectivamente, -0,06%; -0,59% e 0,24% para umidade e 0,29%; 1,51% e 0,48% para óleo (Tabela 2). Panero (2007) obteve média do erro de 1,24% para umidade, 1,31% para proteína e 1,65% para óleo e os maiores valores do erro relativo encontrado para umidade, proteína e óleo foram de 4,09%; -4,54% e 3,73%, respectivamente.<sup>20</sup>

**Tabela 2:** Parâmetros adicionais de desempenho dos modelos de previsão para os conteúdos de umidade, proteína e óleo em farelo de soja.

Parâmetro	Umidade <sup>1</sup>	Proteína <sup>1</sup>	Óleo <sup>1</sup>
Média do Erro (bias, viés ou resíduo)	-0,06	0,06	0,29
Média do Erro relativo	-0,59	0,15	1,51
Desvio padrão (SD)	0,24	0,53	0,48

<sup>1</sup>Em porcentagem (%).

Observa-se que as médias do erro, do erro relativo e os desvios padrão dos conjuntos de previsão das três características apresentaram valores baixos indicando que os modelos de calibração desenvolvidos apresentaram boa capacidade de previsão e por isso podem ser utilizados para a determinação das características estudadas em farelo de soja.

#### 4. CONCLUSÃO

A técnica de espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) associada ao método de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS) apresentou resultados satisfatórios na construção de modelos de calibração para umidade, proteína e óleo em farelo de soja. Os modelos de calibração apresentaram elevados valores de coeficiente de correlação de calibração ( $R$ ) e de previsão ( $r$ ). Além disso, apresentaram baixos valores da raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração (RMSEC) e de previsão (RMSEP) e baixos valores para a média do erro (bias médio), média do erro relativo e do desvio padrão (SD) do conjunto de previsão das três características avaliadas, demonstrando ser a espectroscopia NIR uma boa alternativa em relação às metodologias padrão.

Além de apresentar resultados satisfatórios de análises, a espectroscopia NIR pode superar alguns inconvenientes apresentados pelo uso de metodologias padrão que normalmente requerem diversas etapas, muitas vezes demoradas e trabalhosas, podendo consumir grande quantidade de reagentes, sendo que algumas análises podem gerar resíduos químicos nocivos ao ambiente, além do alto consumo de energia devido ao uso do. A técnica NIRS, ao contrário equipamentos, fornece resultados de forma rápida e exata, é menos trabalhosa, requer pequenas quantidades de amostras, pouca manipulação das mesmas, não utiliza reagentes, possui custo reduzido de análise por amostra e não gera resíduos químicos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yaklich, R. W. J.; *Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 729.
2. Sediya, T.; Teixeira, R. C.; Reis, M. S.; *Melhoramento da soja*. Em: Borém, A.; *Melhoramento de espécies cultivadas*, 2<sup>a</sup> Ed., Viçosa: Editora UFV, **2005**.
3. Panero, J. S.; Panero, F. S.; Silva, H. E. B.; Rohwedder, J. J. R.; *Resumo da 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil*, **2008**.
4. Sbardelotto, A.; Leandro, G. V.; *Ciênc. Rural*, **2008**, 38(3), 614.
5. Souza, L. C. F.; Zanon, G. D.; Pedroso, F. F.; Anadrade, L. H. L.; *Ciênc. Agrotec.*, **2009**, 33(6), 1586.
6. Lee, J.; Shannon, J. G.; Choung, M.; *Euphyt.*, **2010**, 172, 117.
7. Töpfer, R.; Martini, N.; Schell, J.; *Sci.*, **1995**, 268, 681.
8. Yadav, N. S.; *Genetic modification of soybean oil quality*. Em: Vena, D. P. S.; Shoemaker, R. C.; *Soybean genetics, molecular biology and biotechnology*, WALLINGFORD, CT, **1996**, 127-188.
9. Dall'Agnol, A.; Roessing, A.C.; Lazarotto, J. J.; Hirakumi, M. H.; Oliveira, A. B.; *Circular Técnica 43 - EMBRAPA*; **2007**, 12.
10. Instituto Adolfo Lutz; *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3<sup>a</sup> ed., São Paulo, **1985**, 1.
11. Xie, L.; Ye, X.; Liu, D.; Ying, Y.; *Food Chem.*, **2009**, 114, 113.
12. Morgano, M. A.; Queiroz, S. C. N.; Ferreira, M. M. C.; *Braz. J. Food Technol.*, **1999**, 2, 73.
13. Ferrarini, H.; *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil*, **2004**.
14. Morgano, M. A.; Faria, C. G.; Ferrão, M. F.; Bragagnolo, N.; Ferreira, M. M. C.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **2005**, 25(1), 25.
15. Povia, G. S.; *Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil*, **2007**.
16. Lima, K. M. G.; Trevisan, M. G.; Poppi, R. J.; Andrade, J. C.; *Quím. Nova*, **2008**, 31(3), 700
17. Braga, J. W. B. B.; Poppi, R. J.; *Quím. Nova*, **2004**, 27(6), 1004
18. Ferrão, M. F.; Carvalho, C. W.; Müller, E. I.; Davanzo, C. U.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **2004**, 24(3), 333.

19. Morgano, M. A.; Faria, C. G.; Ferrão, M. F.; Bragagnolo, N.; Ferreira, M. M. C.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **2008**, 28(1), 12.
20. Panero, J. S.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Roraima, Brasil, **2007**.
21. Delwiche, S. R.; Pordesino, L. O.; Panthee, D. R.; Pantalone, V. R.; *JAOCS*, **2007**, 84, 1107.
22. Simas, R. C.; Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **2005**.
23. Saliba, E. O. S.; Gontijo Neto, M. M.; Rodriguez, N. M.; Miranda, L. F.; Obeid, J. A.; Teixeira, G. L.; Oliveira, M. A.; *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **2003**, 55, 3.
24. Jiao, Z.; Si, X.; Li, G.; Zhang, Z.; Xu, X.; *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 1746.
25. Ferrarini, H.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, **2004**.
26. Spielbauer, G.; Armstrong, P.; Baier, J. W.; Allen, W. B.; Richardson, K.; Shen, B.; Settles, A. M.; *Cereal Chem.*, **2009**, 86(5), 556.
27. Pasquini, C.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**, 14(2), 198.
28. Sirisomboon, P.; Hashimoto, Y.; Tanaka, M.; *J. Food Eng.*, **2009**, 93, 502.
29. Heil, C.; <https://fscimage.thermoscientific.com/images/D17443~.pdf>, acessada em Maio de **2011**.
30. Ren, G.; Chen, F.; *Food Chem.*, **1997**, 60, 3, 433.
31. Sinija, V. R.; Mishra, H. N.; *Food Bioprocess Technol*, **2011**, 4, 136.
32. Sundaram, J.; Kandala, C. V.; Holser, R. A.; Butts, C. L.; Windham, W. R.; *JAOCS*, **2010**, 87(10), 1103.
33. Yang, H.; Irudayaraj, J.; *JAOCS*, **2001**, 78(9), 889.
34. Velasco, L.; Goffman, F. D.; Becker, H. C.; *JAOCS*, **1999**, 76(1), 25.
35. Hacidalihoglu, G.; Larbi, B.; Settles, M.; *J. Agric. Food Chem*, **2010**, 58, 702.
36. Jiang, H. Y.; Zhu, Y. J.; Wei, L. M.; Dai, J. R.; Song, T. M.; Yan, Y. L.; Chen, S. J.; *Plant Breed.*, **2007**, 126, 492.
37. Vasconcelos, F. V. C.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, **2011**.
38. Liu, Y.; Sun, X.; Zhou, J.; Zhang, H.; Yang, C.; *Mathematical and Computer Modelling*, **2010**, 51, 1438.

## CAPÍTULO 2

### DETECÇÃO DE MUTANTES EM SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA E ÓLEO

#### RESUMO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das culturas economicamente mais importantes no mundo, sendo considerada uma excelente fonte de proteína e óleo. Para o melhoramento dos conteúdos de proteína, óleo ou outras características é necessária variabilidade genética e como a ocorrência de mutações espontâneas é rara, utiliza-se a indução de mutações por agentes mutagênicos físicos ou químicos. A radiação gama foi utilizada para induzir mutações em grãos de soja da variedade Vencedora. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação das diferentes dosagens de raios gama (100, 200 e 300 Gy) nos conteúdos de proteína e óleo em grãos de soja e identificar possíveis mutantes. Os grãos foram irradiados no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo em Piracicaba, São Paulo. A determinação do conteúdo de umidade, proteína e óleo foram realizadas em um espectrofotômetro de infravermelho próximo. A correção dos dados obtidos dos conteúdos de proteína e óleo em relação ao efeito ambiental foi realizada a partir das informações da testemunha (Vencedora não irradiada), cujas fileiras foram intercaladas no ensaio. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade para testar o efeito das mutações nas progênies  $M_{1:4}$ . A dose de radiação gama de 300 Gy forneceu maior porcentagem de plantas  $M_1$  irradiadas com diferenças significativas em relação à testemunha para as duas características avaliadas. Das plantas  $M_1$  selecionadas que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos irradiado e não irradiado, a que apresentou menor e maior conteúdo máximo de proteína e que foram superiores ao da testemunha (39,87%), foram, respectivamente, as plantas de número 934 (43,03%) e 100 (46,64%). Os conteúdos de proteína dessas plantas foram maiores que da testemunha em 8% e 17%, respectivamente, indicando que as mutações nas plantas  $M_1$  selecionadas favoreceram o conteúdo de proteína. Para óleo, as plantas a que apresentaram menor e maior conteúdo

máximo de óleo, superiores ao da testemunha (19,33%), foram as plantas 177 (20,46%) e 421 (21,89%) que apresentaram conteúdo de óleo maior que da testemunha em, respectivamente, 6% e 13% indicando que as mutações nas plantas  $M_1$  selecionadas favoreceram o conteúdo de óleo. As progênies  $M_4$  das plantas  $M_1$  selecionadas como possíveis mutantes por meio deste trabalho serão conduzidas a um novo ensaio de seleção de progênies para confirmar os dados obtidos e após essa nova seleção as progênies mutantes serão utilizadas no Programa de Melhoramento da Soja do BIOAGRO/UFV.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é considerada uma excelente fonte de proteína e óleo tanto para a alimentação humana quanto animal. O grão possui cerca de 40% de proteína e 20% de óleo (Lee *et al.*, 2007; Clemente e Cahoon, 2009; Pavadai *et al.*, 2010).

Para que uma cultura seja melhorada com melhoramento genético convencional é necessária a ocorrência de variabilidade genética na população para que sirva como fonte de germoplasma, possibilitando a seleção de genótipos promissores. Uma base genética restrita dificulta o trabalho dos pesquisadores, limitando ou inviabilizando a criação de novos cultivares (Borges *et al.*, 2010; Dorneles *et al.*, 2011).

A variabilidade genética ocorre devido às mutações. Como a taxa de mutações espontâneas é muito baixa, a indução das mutações têm sido usada nos programas de melhoramento para elevar a frequência das mutações e assim ampliar a variabilidade genética (Costa *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2011; Dorneles *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2011; Patil e Wakode, 2011).

Os mutantes induzidos são descritos por símbolos  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ , etc, os quais indicam, respectivamente, primeira, segunda, terceira gerações de mutantes e assim por diante, sendo que a população  $M_0$  é a população não tratada (Allard, 1960).

Os agentes mutagênicos podem ser físicos ou químicos. Os mutagênicos físicos são os raios ultravioletas, raios X, raios gama, partícula alfa, partícula beta, prótons e nêutrons. Os agentes mutagênicos químicos são diversos, porém os mais utilizados são etil metano sulfonato (EMS), dietil sulfato (DES) e etilenimina (EI) (Bodanese-Zanettini, 2001; Zaha *et al.*, 2003; Borém e Miranda, 2009; Rocha *et al.*, 2009; Kumar e Ratman, 2010; Moturi e Charya, 2010; Khan *et al.*, 2011; <http://www.ufv.br/dbg/gbolhtm/gbol16.htm>).

O fator chave para se obter sucesso na irradiação de material vegetal é a dosagem do mutagênico utilizado. Os mutagênicos químicos são expressos em termos de porcentagem (%). A unidade internacional de medida da dose dos mutagênicos físicos é o Gray (Gy), um gray é equivalente a uma dose absorvida de 1 Joule/quilograma do material. Rad é uma unidade especial de dose, um rad é igual a 0,01 gray (0,01 J/kg) (Ahloowalia e Maluszynski, 2001; Henry, 2009; <http://www.cena.usp.br/irradiacao/principios.htm>; <http://www.nrc.gov/reading-rm/doc-collections/cfr/part020/part020-1004.html>).

A intensidade da dose dos mutagênicos físicos é dividida em três categorias: baixa (< 1 kGy), média (1 a 10 kGy) e alta (10 a 50 kGy). Altas doses são utilizadas para esterilização de alimentos, as médias para pasteurização e as doses baixas são usadas para indução de mutação em sementes (na faixa de 60 a 700 Gy), além de ser utilizada para matar parasitas, insetos e larvas após a colheita, inibir a germinação e retardar o amadurecimento (Gusman *et al.*, 1975; Gaul, 1977; Zaha *et al.*, 2003).

A dosagem ideal de radiação varia de acordo com a espécie vegetal e o órgão a ser irradiado. No caso de sementes são utilizadas doses de raios X ou gama na faixa de 100 a 150 Gy (10 a 15 krad). Abaixo de 50 Gy (5 krad) a frequência das mutações é sensivelmente reduzida e doses maiores que 250 Gy (25 krad) provocam uma série de danos ao material vegetal, com conseqüente perda ou morte do mesmo. Já com o uso de nêutrons, doses muito menores têm se mostrado eficientes, na ordem de 5 Gy (0,5 krad) (Ahloowalia e Maluszynski, 2001).

A frequência das mutações aumenta linearmente com o aumento da dose de radiação, como conseqüência, o aumento da dose também determina o aumento dos efeitos fisiológicos que levam à morte do organismo irradiado (Gusman *et al.*, 1975; Gaul, 1977; Zaha *et al.*, 2003; Kumar e Ratman, 2010).

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da aplicação de diferentes dosagens de radiação gama (100, 200 e 300 Gy) nos conteúdos de proteína e óleo em grãos de soja e identificar possíveis mutantes para estas características, que possam ser eventualmente utilizados no Programa de Melhoramento da Soja do BIOAGRO/UFV.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras**

Foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) do cultivar Vencedora, fornecidas pela empresa COOPADAP (Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba). Esta variedade foi escolhida por possuir características agronômicas desejáveis.

### **2.2. Metodologias**

Como agente mutagênico físico foi utilizada a radiação gama de uma fonte de cobalto ( $\text{Co}^{60}$ ). O procedimento foi gentilmente realizado pelo Dr. Augusto Tulmann Neto, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. As doses da radiação utilizadas foram 100, 200 e 300 Gy. Oitocentas sementes de soja do cultivar Vencedora foram utilizadas para a irradiação com cada dose. Para serem submetidas à irradiação as sementes foram colocadas em saquinhos de papel e dispostas na fonte de  $\text{Co}^{60}$  de tal modo que todas as sementes fossem uniformemente irradiadas.

#### **2.2.1. Obtenção dos dados experimentais**

##### **2.2.1.1. Condução das sementes irradiadas**

As sementes  $M_1$ , irradiadas com as diferentes doses de radiação gama (800 sementes com cada dose de 100, 200 e 300 Gy), foram plantadas em blocos em função do nível de radiação, originando três blocos com espaçamento de 10 cm entre as plantas e 50 cm entre as linhas, no Campo Experimental da Sementeira em Visconde de Rio Branco, MG. O cultivo deu-se de junho a novembro de 2006.

As plantas  $M_1$  foram colhidas individualmente, suas sementes  $M_{1:2}$  foram plantadas em fileiras individuais no Campo Experimental da UFV denominado Horta Nova no distrito de São José do Triunfo (Fundão), Viçosa, MG. O cultivo foi efetuado de dezembro de 2006 a março de 2007.

As plantas  $M_2$  (ou  $M_{1:2}$  que significa fileiras individuais de plantas  $M_2$  derivadas de planta  $M_1$ ) que originaram as sementes  $M_{1:3}$  foram colhidas em bulks, sendo que de cada progênie foi colhida apenas uma vagem por planta.

As sementes  $M_{1:3}$  de cada progênie original foram plantadas em fileiras individuais na comunidade de Juncado, Sooretama, ES. O cultivo foi efetuado de junho a novembro de 2007.

Foram colhidas individualmente apenas 8 plantas  $M_3$  de cada progênie, mas destas apenas as sementes  $M_{1:4}$  de 6 plantas foram utilizadas no plantio seguinte. As sementes  $M_{1:4}$  foram plantadas na Estação Experimental da COOPADAP, Rio Paranaíba, MG. Este plantio foi utilizado para a avaliação fenotípica, com isso a avaliação de possíveis mutantes. O cultivo foi efetuado de novembro de 2007 a março de 2008. As sementes  $M_{1:4}$  das 6 plantas foram distribuídas cada uma em uma fileira, deste modo cada planta  $M_1$  originou 6 fileiras de plantas  $M_4$ . Este plantio foi realizado utilizando-se o arranjo experimental de progênies com testemunha intercalar, sendo a testemunha do cultivar Vencedora não irradiada.

Foram colhidas individualmente todas as plantas dentro de cada fileira, contendo as progênies  $M_4$ . Foram analisadas sementes  $M_5$  derivadas de cada progênie  $M_4$ .

A disposição do experimento seguiu um arranjo em que um conjunto de 18 progênies foram intercaladas com testemunhas. Cada unidade nesta conformação (18 progênies + 2 testemunhas = 20 parcelas) foi considerada como um bloco. Conjuntos de 29 blocos nessa conformação foram intercalados com blocos contendo somente testemunha (20 parcelas de Vencedora). Para o plantio das sementes irradiadas com 100 Gy de raios gama foram obtidos 1 bloco de testemunhas e 14 blocos de progênies, para a intensidade de 200 Gy foram obtidos 6 blocos de testemunhas e 167 de progênies e para 300 Gy obtidos 2 blocos de testemunhas e 30 de progênies. No total foram obtidos 9 blocos de testemunhas e 211 blocos de progênies, totalizando 220 blocos.

Dos tratamentos com a radiação gama de 100, 200 e 300 Gy foram avaliadas, respectivamente, 246 progênies  $M_4$  derivadas de 41 plantas  $M_1$ , 3348 progênies derivadas de 558 plantas  $M_1$  e 624 progênies  $M_4$  derivadas de 104 plantas  $M_1$ .

### **2.2.1.2. Determinação da composição da soja por espectroscopia NIR**

A determinação do conteúdo de umidade, proteína e óleo foram realizadas em um espectrofotômetro de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIRS: *Fourier Transform Near Infrared Spectrometer*) modelo Antaris<sup>TM</sup> II FT-NIR Analyser.

Os espectros de reflectância na região do infravermelho próximo foram coletados, sendo as leituras realizadas em triplicata. Foram feitas 30 varreduras espectrais para cada amostra, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. Os dados espectrais foram expressos no formato log(1/R), onde R é a reflectância.

### **2.2.1.3. Correção ambiental dentro do experimento**

Para se fazer a correção dos dados obtidos para os conteúdos de proteína e óleo nas amostras de farelo de soja em relação aos efeitos ambientais, estes foram estimados a partir das informações das testemunhas (cultivar Vencedora não irradiada), cujas fileiras foram intercaladas no ensaio.

#### **i. Variância ambiental**

Foram calculados os valores médios dos conteúdos de proteína e óleo das testemunhas de cada um dos blocos (2 parcelas de testemunhas intercalando 18 parcelas de progênies), a média geral das testemunhas de todos os blocos nesta conformação, a soma dos quadrados dos desvios (SQD) e o grau de liberdade (GL). Calculou-se também a SQD e o GL para as testemunhas pertencentes aos blocos de testemunhas (20 parcelas de testemunha, onde a primeira e a última parcela foram contabilizadas como testemunhas do bloco).

O efeito ambiental total foi obtido pela soma das informações da SQD e do GL dos dois tipos de conformação de blocos. Com o somatório da SQD e do GL foi possível obter o valor da variância ambiental.

## ii. Correção do efeito ambiental

A correção dos valores dos conteúdos de proteína e óleo de cada progênie foi realizada subtraindo-se do valor original da característica o fator de correção ambiental referente ao conteúdo de proteína e óleo da testemunha do bloco ao qual pertencia a progênie.

O fator de correção ambiental de cada bloco foi obtido subtraindo-se do valor médio da característica das testemunhas de cada bloco (média entre os valores das 2 parcelas de testemunhas do bloco) o valor da média geral da característica das testemunhas de todos os blocos nesta conformação.

### 2.2.1.4. Análise de variância

Para testar a significância do efeito da mutação nas progênies  $M_{1,4}$  foi realizada a comparação entre as variâncias fenotípicas de cada progênie em relação a variância ambiental utilizando o teste F (Fórmula 1) a 5% de probabilidade.

$$F = \frac{\hat{\sigma}_F^2}{\hat{\sigma}_A^2} \quad (1)$$

Onde:

$\hat{\sigma}_F^2$  = variância fenotípica;

$\hat{\sigma}_A^2$  = variância ambiental.

O teste de hipótese utilizado (Fórmula 2) foi:

$$\begin{aligned} H_0 : \hat{\sigma}_F^2 &= \hat{\sigma}_A^2 \\ H_1 : \hat{\sigma}_F^2 &\neq \hat{\sigma}_A^2 \end{aligned} \quad (2)$$

A análise de variância foi realizada considerando-se o método de testemunha intercalar, onde a informação da variância ambiental foi estimada com base nas informações das testemunhas (cultivar Vencedora não irradiada).

A variância fenotípica foi estimada entre plantas  $M_4$  derivadas de uma mesma planta  $M_1$  após a correção dos valores de proteína e óleo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram detectadas diferenças significativas entre alguns tratamentos irradiados e não irradiados (testemunha cultivar Vencedora) em relação aos conteúdos de proteína e óleo, pelo teste F a 5 % de significância.

Os tratamentos irradiados que obtiveram abaixo de quatro fileiras de plantas  $M_4$  foram descartados. Sendo assim, nos tratamentos com 100, 200 e 300 Gy de radiação gama foram consideradas para a análise de variância pelo teste F, respectivamente, 37 das 41 plantas  $M_1$  iniciais, 484 das 558 plantas  $M_1$  e 98 das 104 plantas  $M_1$ .

Para o tratamento com 100 Gy, 2 das 37 plantas  $M_1$  que participaram da análise apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos irradiado e não irradiado tanto para o conteúdo de proteína quanto para o conteúdo de óleo, ou seja, 5,4% das plantas  $M_1$ . No tratamento com 200 Gy, 57 das 484 plantas  $M_1$  apresentaram diferenças significativas para proteína (11,8% das plantas) e 54 plantas  $M_1$  para óleo (11,2% das plantas). Para o tratamento com 300 Gy, 18 das 98 plantas  $M_1$  apresentaram diferenças significativas para proteína (13,3% das plantas) e 13 plantas para óleo (18,4% das plantas).

Entre os três tratamentos o que apresentou maior porcentagem de plantas com diferenças significativas entre tratamentos irradiado e não irradiado foram os que utilizaram 300 Gy de raios gama.

Segundo Ahloowalia e Maluszynski (2001) as doses de mutagênicos físicos na faixa de 60 a 700 Gy, consideradas baixas, podem ser utilizadas em sementes para indução de mutação. Outros autores citam que no caso de sementes são utilizadas doses de raios gama na faixa de 100 a 150 Gy e que doses maiores que 250 Gy provocam danos ao material vegetal com conseqüente perda do mesmo (Gusman *et al.*, 1975; Gaul, 1977; Ahloowalia e Maluszynski, 2001; Zaha *et al.*, 2003). No atual trabalho a dose de 300 Gy de raios gama forneceu melhores resultados mesmo com a perda de parte do material.

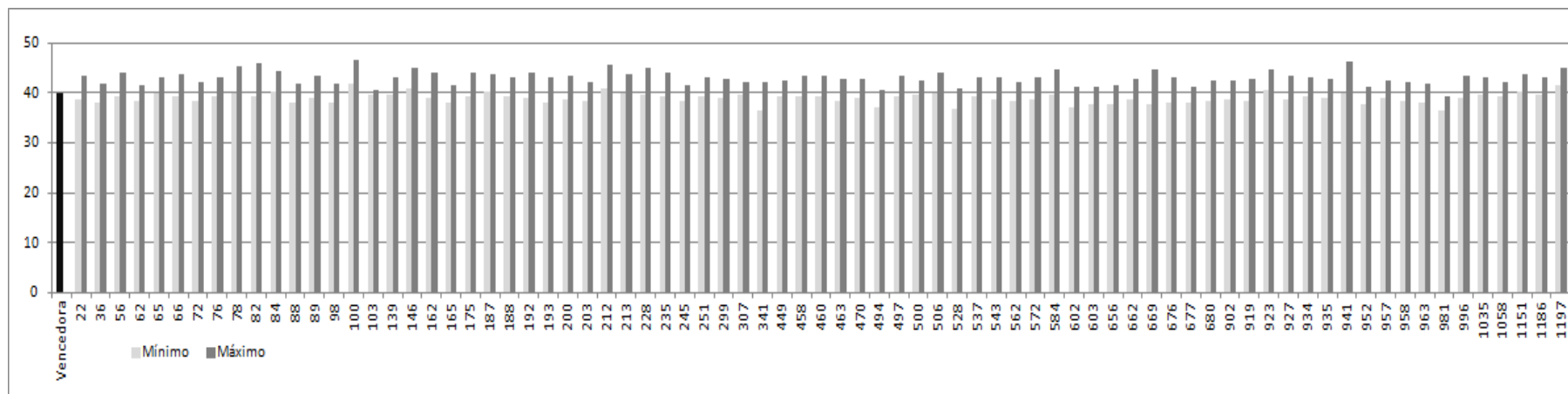
Srisombun *et al.* (2010) irradiaram a variedade de soja Chiang Mai 60 com 200 Gy de raios gama e avaliaram as gerações  $M_1$  a  $M_4$  selecionando 13 linhagens mutantes avaliadas para conteúdo de proteína e rendimento. Na geração  $M_4$  o resultado mostrou que as linhagens mutantes selecionadas apresentavam 0,78% maior conteúdo de proteína que o grupo controle.

Hanafiah *et al.* (2010) irradiaram a variedade de soja Argomulyo com doses de raios gama de 0, 50, 100, 150 e 200 Gy e avaliaram alguns caracteres nas gerações M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>. A maior variação genética média foi na geração M<sub>2</sub> com 200 Gy indicando que esta dose é eficaz em causar variação genética em plantas.

Padavai *et al.* (2010) avaliaram o efeito em soja das doses de 100, 200, 300, 400, 500 e 600 Gy de radiação gama nas gerações M<sub>2</sub> a M<sub>4</sub> no conteúdo de proteína e parâmetros de rendimento. Segundo os autores houve aumento na eficácia e na eficiência do mutagênico em baixas concentrações e redução em concentração elevada. O tratamento com 500 Gy apresentou melhores resultados comparados ao tratamento controle.

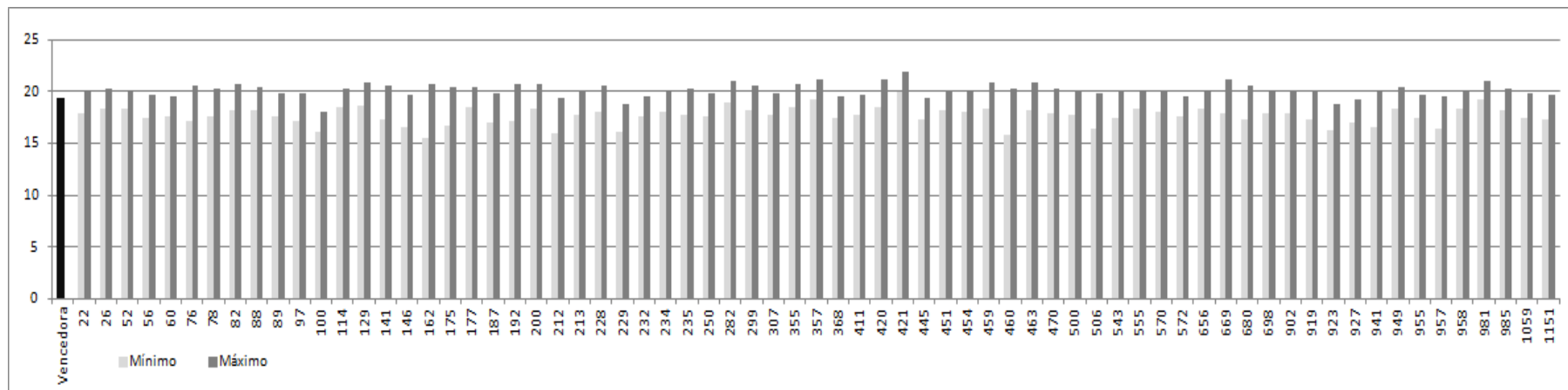
Nos três tratamentos com as diferentes doses de raios gama, 77 plantas M<sub>1</sub> apresentaram diferenças significativas entre tratamentos irradiado e não irradiado para conteúdo de proteína e 69 para óleo. Os valores mínimos e máximos dos conteúdos de proteína e óleo nas plantas selecionadas e os valores médios na testemunha Vencedora (tratamento não irradiado) foram apresentados em gráficos (Figuras 1 e 2).

Das plantas M<sub>1</sub> selecionadas, as que apresentaram conteúdo máximo de proteína superior ao conteúdo médio de proteína da testemunha (39,87%) foram as de número 78 (45,37%), 82 (45,98%), 100 (46,64%), 146 (45,02%), 212 (45,66%) , 228 (44,89%) , 235 (43,99%), 506 (43,97%), 584 (44,68%), 669 (44,63%), 923 (44,63%) , 927 (43,34%), 934 (43,03%), 941 (46,24%), 996 (43,62%), 1035 (43,29%), 1151 (43,75%) e 1197 (45,10%). O menor valor de proteína (planta 934) foi 8% maior que da testemunha e o maior valor (planta 100) foi 17% maior que da testemunha, indicando que as mutações nestas plantas favoreceram o conteúdo de proteína. A planta 981 foi a única que apresentou o conteúdo máximo de proteína menor que o da testemunha indicando que as mutações desfavoreceram o conteúdo de proteína nesta planta (Figura 1).



**Figura 1:** Plantas  $M_1$  selecionadas que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos irradiados e não irradiados (testemunha cultivar Vencedora) para proteína, indicando os valores mínimos e máximos obtidos entre suas progênes  $M_4$  e o conteúdo médio da testemunha.

Preto: valor médio do conteúdo de proteína da testemunha Vencedora; Cinza claro: valor mínimo do conteúdo de proteína da progênie  $M_4$ ; Cinza escuro: valor máximo do conteúdo de proteína da progênie  $M_4$ .



**Figura 2:** Famílias  $M_1$  selecionadas que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos irradiados e não irradiados (testemunha cultivar Vencedora) para óleo, indicando os valores mínimos e máximos obtidos entre suas progênes  $M_4$  e o conteúdo médio da testemunha.

Preto: valor médio do conteúdo de óleo da testemunha Vencedora; Cinza claro: valor mínimo do conteúdo de óleo da progênie  $M_4$ ; Cinza escuro: valor máximo do conteúdo de óleo da progênie  $M_4$ .

As que apresentaram maior amplitude entre o conteúdo máximo e mínimo para proteína foram as de número 82 (39,35% a 45,98%), 669 (37,61 a 44,63%) e 941 (39,98 a 46,24%). Isto indica que alguma(s) planta(s) entre as plantas M<sub>4</sub> derivadas destas plantas M<sub>1</sub> apresentaram mutações que favoreceram a característica.

Das plantas M<sub>1</sub> selecionadas, as que apresentaram conteúdo máximo de óleo superior ao conteúdo médio de óleo da testemunha (19,33%) foram as de número 76 (20,61%), 82 (20,65%), 129 (20,84%), 141 (20,60%), 162 (20,65%), 177 (20,46%), 192 (20,75%), 200 (20,71%), 228 (20,56%), 282 (21,05%), 299 (20,55%), 355 (20,75%), 357 (21,14%), 420 (21,10%), 421 (21,89%), 459 (20,94%), 463 (20,84%), 669 (21,21%) e 981 (21,07%) sendo que o menor valor de óleo (planta 177) foi 6% maior que da testemunha e o maior valor (planta 421) foi 13% maior que da testemunha, mostrando que as mutações nestas plantas favoreceram o conteúdo de óleo. As plantas 100, 212, 229, 460 e 923 apresentaram o conteúdo máximo de óleo menor que o da testemunha indicando que as mutações desfavoreceram o conteúdo de óleo nestas plantas (Figura 2).

As que apresentaram maior amplitude entre o conteúdo máximo e mínimo para óleo foram as de número 162 (15,55 a 20,65%) e 460 (15,87 a 20,27%). Isto indica que alguma(s) planta(s) entre as plantas M<sub>4</sub> destas plantas M<sub>1</sub> apresentou mutações que favoreceram tal característica.

As plantas M<sub>1</sub> de números 82, 228 e 669 apresentaram conteúdo máximo de proteína e máximo de óleo maiores que a testemunha (39,87% e 19,33%, respectivamente), sendo os conteúdos 45,98% e 20,65%; 44,89% e 20,56% e 44,63% e 21,21%. Isso indica a possibilidade de as mutações terem favorecido as duas características ao mesmo tempo.

Já as que apresentaram conteúdo máximo de proteína maior que a testemunha e máximo de óleo menor que a testemunha foram as de número 100 e 923 com os conteúdos de 46,64% e 18,09% e 44,63% e 18,73, respectivamente.

A de número 212 apresentou conteúdo máximo de proteína maior que a testemunha e de óleo praticamente o mesmo da testemunha, 45,66% e 19,36%, respectivamente. As mutações nessas plantas favoreceram o conteúdo de proteína.

A que apresentou conteúdo máximo de proteína menor que a testemunha e máximo de óleo maior que a testemunha foi a 981 com 39,23% e 21,07%, respectivamente. As mutações nessas plantas favoreceram o conteúdo de óleo.

Muitas das plantas  $M_1$  que apresentaram diferença significativa entre os tratamentos irradiado e não irradiado para o conteúdo de proteína coincidiram com as que apresentaram diferenças significativas para o conteúdo de óleo. No tratamento com 100 Gy de radiação gama não foram obtidas plantas coincidentes, no de 200 Gy foram obtidas 31 plantas coincidentes e no de 300 Gy apenas 1 planta. As plantas  $M_1$  coincidentes referentes ao tratamento com 200 Gy foram as de número 78 a 958 e para 300 Gy a de número 1151 (Tabela 1).

Foram verificadas quais dentre as progênes  $M_4$ , originadas das plantas  $M_1$  coincidentes, apresentaram o conteúdo máximo de proteína coincidindo com o mínimo de óleo e mínimo de proteína coincidindo com o máximo de óleo.

Observou-se que a maioria das progênes  $M_4$  que apresentaram conteúdo máximo de proteína estavam associadas a mínimo de óleo e vice-versa, indicando que as mutações favoreceram ou desfavoreceram uma das características por vez e não as duas ao mesmo tempo. É esperado que a mutação que favoreça o conteúdo de proteína desfavoreça o conteúdo de óleo e a que favoreça óleo desfavoreça proteína, pois a correlação entre proteína e óleo é negativa (Moraes *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2011; <http://www.planetasoya.com/index.php?sec=34&tra=24813&tit=24817>).

Algumas das plantas  $M_1$  apresentavam progênes  $M_4$  que coincidiam apenas para o conteúdo máximo de proteína associado a mínimo de óleo que foram as de número 89 (43,46% e 17,59%, respectivamente), 175 (44,24% e 20,35%), 187 (43,74% e 16,98%), 212 (45,66% e 15,90%), 307 (42,17% e 17,76%), 460 (43,60% e 15,87%), 543 (43,18% e 17,39%), 572 (43,28% e 17,63%), 680 (42,45% e 17,36%), 902 (42,51% e 17,88%), 927 (43,34% e 16,99%), 941 (46,24% e 16,62%) e 957 (42,41% e 16,44%). As que coincidiam apenas para mínimo de proteína associada a máximo de óleo foram as de número 470 (39,03% e 20,22%) e 500 (39,65% e 19,92%).

Ao todo foram encontradas 32 plantas  $M_1$  que apresentavam diferenças significativas entre tratamentos irradiado e não irradiado coincidentes para análise dos conteúdos de proteína e de óleo, sendo que 17 delas apresentavam mutações na mesma progênie  $M_4$  tanto para conteúdo máximo de proteína associado ao mínimo de óleo quanto para conteúdo mínimo de proteína associado ao máximo de óleo, 13 apresentavam mutações apenas para o conteúdo máximo de proteína associado ao mínimo de óleo e 2 apresentavam mutações apenas para o conteúdo mínimo de proteína associado ao máximo de óleo.

**Tabela 1:** Seleção das progênes M<sub>4</sub> derivadas das plantas M<sub>1</sub> que foram coincidentes na seleção de proteína e óleo.

Planta M <sub>1</sub>	Coincidências <sup>1</sup>	Progênie M <sub>4</sub>	Planta M <sub>1</sub>	Coincidências <sup>1</sup>	Progênie M <sub>4</sub>
78	Máx Ptn/Mín óleo <sup>2</sup>	1	460	Máx Ptn/Mín óleo	6
	Mín Ptn/Máx óleo <sup>3</sup>	2		Mín Ptn/Máx óleo	-
82	Máx Ptn/Mín óleo	2	470	Máx Ptn/Mín óleo	-
	Mín Ptn/Máx óleo	4		Mín Ptn/Máx óleo	1
88	Máx Ptn/Mín óleo	2	500	Máx Ptn/Mín óleo	-
	Mín Ptn/Máx óleo	6		Mín Ptn/Máx óleo	2
89	Máx Ptn/Mín óleo	3	543	Máx Ptn/Mín óleo	5
	Mín Ptn/Máx óleo	-		Mín Ptn/Máx óleo	-
146	Máx Ptn/Mín óleo	3	572	Máx Ptn/Mín óleo	3
	Mín Ptn/Máx óleo	5		Mín Ptn/Máx óleo	-
162	Máx Ptn/Mín óleo	1	656	Máx Ptn/Mín óleo	3
	Mín Ptn/Máx óleo	2		Mín Ptn/Máx óleo	4
175	Máx Ptn/Mín óleo	3	669	Máx Ptn/Mín óleo	1
	Mín Ptn/Máx óleo	-		Mín Ptn/Máx óleo	2
187	Máx Ptn/Mín óleo	6	680	Máx Ptn/Mín óleo	6
	Mín Ptn/Máx óleo	-		Mín Ptn/Máx óleo	-
192	Máx Ptn/Mín óleo	3	902	Máx Ptn/Mín óleo	6
	Mín Ptn/Máx óleo	4		Mín Ptn/Máx óleo	-
200	Máx Ptn/Mín óleo	4	919	Máx Ptn/Mín óleo	1
	Mín Ptn/Máx óleo	3		Mín Ptn/Máx óleo	5
212	Máx Ptn/Mín óleo	3	923	Máx Ptn/Mín óleo	1
	Mín Ptn/Máx óleo	-		Mín Ptn/Máx óleo	4
213	Máx Ptn/Mín óleo	1	927	Máx Ptn/Mín óleo	2
	Mín Ptn/Máx óleo	2		Mín Ptn/Máx óleo	-
228	Máx Ptn/Mín óleo	6	941	Máx Ptn/Mín óleo	3
	Mín Ptn/Máx óleo	3		Mín Ptn/Máx óleo	-
235	Máx Ptn/Mín óleo	3	957	Máx Ptn/Mín óleo	1
	Mín Ptn/Máx óleo	1		Mín Ptn/Máx óleo	-
299	Máx Ptn/Mín óleo	3	958	Máx Ptn/Mín óleo	1
	Mín Ptn/Máx óleo	6		Mín Ptn/Máx óleo	3
307	Máx Ptn/Mín óleo	3	1151	Máx Ptn/Mín óleo	2
	Mín Ptn/Máx óleo	-		Mín Ptn/Máx óleo	5

<sup>1</sup> Coincidência na seleção para conteúdo máximo de proteína e mínimo de óleo e mínimo de proteína e máximo de óleo entre as progênes M<sub>4</sub> originadas das plantas M<sub>1</sub> que apresentaram diferença significativa entre os tratamentos irradiado e não irradiado (testemunha cultivar Vencedora);

<sup>2</sup> Conteúdo máximo de proteína e mínimo de óleo;

<sup>3</sup> Conteúdos mínimo de proteína e máximo de óleo.

Entre as plantas M<sub>1</sub> que apresentaram progênes M<sub>4</sub> com conteúdo máximo de proteína maior que da testemunha coincidindo com máximo de óleo menor que da testemunha foram as de número 100 e 923. A planta de número 212 apresentou máximo de proteína maior que da testemunha coincidindo com conteúdo de óleo praticamente o mesmo que o da testemunha. A única que apresentou máximo de proteína associado ao mínimo de óleo e mínimo de proteína com máximo de óleo foi a 923. A planta de número 212 apresentou apenas máximo de proteína associado a mínimo de óleo e a número 100 não foi coincidente para proteína e óleo.

A planta M<sub>1</sub> que apresentou máximo de proteína menor que da testemunha coincidindo com máximo de óleo maior que da testemunha foi a número 981, mas não foi coincidente para análise de proteína e óleo.

Entre as plantas M<sub>1</sub> que apresentaram progênes M<sub>4</sub> com maior amplitude entre conteúdo máximo e mínimo de proteína, que foram as de número 82, 669 e 941, a única que não apresentou progênes M<sub>4</sub> coincidentes tanto para máximo de proteína associado a mínimo de óleo quanto mínimo de proteína a máximo de óleo foi a 941 que apresentou apenas máximo de proteína associada a mínimo de óleo.

As de maior amplitude entre conteúdo máximo e mínimo de óleo foram as de número 162 e 460. A 162 apresentou progênes M<sub>4</sub> coincidentes tanto para máximo de proteína associado a mínimo de óleo quanto mínimo de proteína a máximo de óleo, a 460 apresentou apenas máximo de proteína associada a mínimo de óleo.

As plantas M<sub>1</sub> de números 82, 228 e 669, coincidentes tanto para máximo de proteína maior que o valor médio da testemunha quanto máximo de óleo maior que o da testemunha, não apresentaram as mesmas progênes M<sub>4</sub> selecionadas para análise de proteína coincidindo com a selecionada para óleo, portanto não obteve-se a mesma progênie M<sub>4</sub> mutante para aumento das duas características ao mesmo tempo.

Todas as progênes M<sub>4</sub> derivadas das plantas M<sub>1</sub> que foram selecionadas como possíveis mutantes para aumento dos conteúdos de proteína e óleo neste trabalho serão conduzidas a um novo ensaio de seleção de progênes para confirmar os dados obtidos e após essa nova seleção as progênes mutantes poderão ser utilizadas no Programa de Melhoramento da Soja do BIOAGRO/UFV.

#### 4. CONCLUSÃO

A técnica de indução de mutação com radiação gama se mostrou eficiente na produção de mutantes para conteúdo de proteína e óleo em grãos de soja. Nos tratamentos com diferentes doses de raios gama (100, 200 e 300 Gy) a dose de 300 Gy foi a mais eficiente quando comparados ao tratamento não irradiado (testemunha variedade Vencedora) em relação aos outros dois tratamentos.

Entre as plantas M<sub>1</sub> selecionadas que apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos irradiado e não irradiado, as que apresentaram conteúdo máximo de proteína superior ao conteúdo médio de proteína da testemunha (39,87%) foram as de número 78 (45,37%), 82 (45,98%), 100 (46,64%), 146 (45,02%), 212 (45,66%), 228 (44,89%), 235 (43,99%), 506 (43,97%), 584 (44,68%), 669 (44,63%), 923 (44,63%), 927 (43,34%), 934 (43,03%), 941 (46,24%), 996 (43,62%), 1035 (43,29%), 1151 (43,75%) e 1197 (45,10%). O menor valor do conteúdo de proteína entre elas (planta 934) foi 8% maior que o conteúdo da testemunha e o maior valor (planta 100) foi 17% maior que da testemunha, mostrando que as mutações favoreceram o conteúdo de proteína.

Das que foram selecionadas, as que apresentaram conteúdo máximo de óleo superior ao conteúdo médio de óleo da testemunha (19,33%) foram as de número 76 (20,61%), 82 (20,65%), 129 (20,84%), 141 (20,60%), 162 (20,65%), 177 (20,46%), 192 (20,75%), 200 (20,71%), 228 (20,56%), 282 (21,05%), 299 (20,55%), 355 (20,75%), 357 (21,14%), 420 (21,10%), 421 (21,89%), 459 (20,94%), 463 (20,84%), 669 (21,21%) e 981 (21,07%). O menor valor do conteúdo de óleo entre elas (planta 177) foi 6% maior que o conteúdo da testemunha e o maior valor (planta 421) foi 13% maior que da testemunha, mostrando que as mutações favoreceram o conteúdo de óleo.

As progênies das plantas selecionadas como mutantes para o conteúdo de proteína e de óleo demonstram grande potencial para serem utilizadas no Programa de Melhoramento da Soja do BIOAGRO/UFV.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahloowalia, B. S.; Maluszynski, M. Induced mutations - A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, v.118, p.167-173, 2001.
- Allard, R. W.; Princípios de melhoramento genético das plantas. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 536p.,1960.
- Almeida, R. D.; Peluzio, J. M.; Afférri, F. S. Divergência genética entre cultivares de soja, sob condições de várzea irrigada, no sul do estado Tocantins. *Revista Ciência Agrônômica*, v.42, n.1, p.108-115, 2011.
- Bodanese-Zanettini, M. H. Análise de risco: alimentos vegetais derivados do melhoramento convencional x plantas geneticamente modificadas. *Memorias V Jornadas Nacionales de Enseñanza de la Biología*. Posadas, Argentina, 2001.
- Borém, A.; Miranda, G. V.; Recursos Genéticos. Em: Melhoramento de Plantas. Viçosa: Editora UFV, 525p., 2009.
- Borges, K. C. F.; Santana, D. G.; Melo, B.; Santos, C. M. Rendimento de polpa e morfometria de frutos e sementes de pitangueira-do-cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.32, n.2, p.471-478, 2010.
- Clemente, T. E.; Cahoon, E. B. Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content. *Plant Physiology*, v.151, p.1030-1040, 2009.
- Costa, A. C. T.; Geraldo, J.; Oliveira, L. B.; Pereira, M. B.; Carmo, M. G. F.; Pimentel, C. Variabilidade genética para caracteres de importância agrônômica de meio-irmãos de milho, semeadas na época da seca. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.5, n.1, p.130-138, 2006.
- Dorneles, L. M. C.; Rezende, D. F.; Souza, L. B.; Hamawaki, O. T. Diversidade genética entre linhagens de soja semiprecoce no município de Goiatuba-GO, safra 2009/2010. *Revista Verde*, v.6, n.1, p.22-27, 2011.
- Gaul, H. Mutagen effects in the first generation after seed treatment: Plant injury and lethality. Em: *Manual on Mutation breeding*. 2 ed., Vienna, IAEA, p.87-91, 1977.
- Gusman, A. B.; Ando, A.; Ferraz, E. S. B. Boletim didático - Radiossensitividade em sementes. Piracicaba, CENA, USP, 1975.
- Hanafiah, D. S.; Trikoesoemaningtyas; Yahya, S.; Wirnas, D. Induced mutations by gamma ray irradiation to Argomulyo soybean (*Glycine max*) variety. *Nusantara Bioscience*, v.2, n.3, p.121-125, 2010.

- Henry, F. C. Irradiation effects on meat: a review. *Revista de Ciências Agrárias*, v.32, n.2, p.255-262, 2009.
- <http://www.cena.usp.br/irradiacao/principios.htm>, acessada em Maio 2011.
- <http://www.nrc.gov/reading-rm/doc-collections/cfr/part020/part020-1004.html>, acessada em Setembro 2011.
- <http://www.planetasoya.com/index.php?sec=34&tra=24813&tit=24817>, acessada em Setembro 2011.
- <http://www.ufv.br/dbg/gbolhtm/gbol16.htm>, acessada em Maio 2011.
- Khan, S.; Parveen, K.; Goyal, S. Induced mutations in chickpea-morphological mutants. *Frontiers of Agriculture in China*, v.5, n.1, p.35-39, 2011.
- Kumar, P. R. R.; Ratman, S. V. Mutagenic effectiveness and efficiency in varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by separate and combined treatment with gamma-rays and sodium azide. *African Journal of Biotechnology*, v.9, n.39, p.6517-6521, 2010.
- Lee, J. D.; Bilyeu, K. D.; Shannon, J. G. Genetics and breeding for modified fatty acid profile in soybean seed oil. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, v.10, n.4, p.201-210, 2007.
- Marques, M. C.; Hamawaki, O. T.; Sedyama, T.; Bueno, M. R.; Reis, M. S.; Cruz, C. D.; Nogueira, A. P. O. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de soja em diferentes épocas de semeadura. *Bioscience Journal*, v.27, n.1, p.59-69, 2011.
- Moraes, R. M. A.; José, I. C.; Ramos, F. G.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.5, p.725-729, 2006.
- Moturi, B.; Charya, M. A. S.; Influence of physical and chemical mutagens on dye decolourising *Mucor mucedo*. *African Journal of Microbiology Research*, v.4, n.17, p. 1808-1813, 2010.
- Patil, G. P.; Wakode, M. M. Effect of physical and chemical mutagens on soybean, *Current Botany*, v.2, n.4, p.12-14, 2011.
- Pavadai, P.; Girija, M.; Dhanavel D. Effect of gamma rays on some yield parameters and protein content of soybean in M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> and M<sub>4</sub> generation. *Journal of Experimental Sciences*, v.1, n.6, p.8-11, 2010.
- Rocha, F.; Barili, L. D.; Garcia, S. H.; Modena, R.; Coimbra, J. L. M.; Guidolin, A. F.; Bertoldo, J. G. Seleção em populações mutantes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para caracteres adaptativos. *Biotemas*, v.22, n.2, p.19-27, 2009.

Srisombun, S.; Kumseub, B.; Yathaputhanon, C.; Kansup, J.  
<http://www.oard1.org/techniqustory/29042552/Somsak%20SRI-HP-VN09.pdf>,  
acessada em Setembro 2011.

Zaha, A.; Ferreira, H. B.; Passaglia, L. M. P. *Biologia Molecular Básica*, 3<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Mercado Aberto, 424p., 2003.