

ARLINDO INÊS TEIXEIRA

HERDABILIDADES E CORRELAÇÕES ENTRE CONCENTRAÇÕES
DE PROTEÍNA EM SOJA AVALIADAS POR DIFERENTES
METODOLOGIAS

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

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

T

T266h
2003

Teixeira, Arlindo Inês, 1978-

Herdabilidades e correlações entre concentrações de
proteína em soja avaliadas por diferentes metodologias /
Arlindo Inês Teixeira. – Viçosa : UFV, 2003.
53p. : il.

Orientador: Maurílio Alves Moreira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de

Viçosa

1. Proteínas de soja - Herdabilidade. 2. Proteínas de
soja - Correlações. 3. Globulinas. 4. Eletroforese de gel
poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio. 5. Densitometria.

6. Soja - Melhoramento genético. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

CDD. 19 ed. 574.19245

CDD. 20 ed. 574.19245

ARLINDO INÊS TEIXEIRA

**HERDABILIDADES E CORRELAÇÕES ENTRE CONCENTRAÇÕES
DE PROTEÍNA EM SOJA AVALIADAS POR DIFERENTES
METODOLOGIAS**

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

APROVADA: 31 de julho de 2003

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Prof. Sebastião Tavares de Rezende
(Conselheiro)

Prof. Maria Goreti de Almeida Oliveira

Prof. Carlos Sigueyuki Sedyama

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Orientador)

*Aos meus pais, Geraldo e Geralda,
A todos aqueles que lutam por um mundo mais justo.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela oportunidade da realização do Curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola.

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

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

À Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira e ao Professor Carlos Sigukeyuki Sedyama pelas críticas e valiosas sugestões, que possibilitaram o aprimoramento desta pesquisa.

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

À pesquisadora da EMBRAPA MILHO E SORGO Claudia Teixeira Guimarães, que nos disponibilizou o seu laboratório para a realização das análises densitométricas.

À doutora Rita Maria Alves de Moraes e a estudante de doutorado Inês Chanel José pelo convívio e pelas inúmeras sugestões que aprimoraram o trabalho realizado.

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

Aos amigos Pedro Ivo Vieira Good God e Taís Cristina Bastos Soares, pelo convívio, pelas importantes sugestões e pela amizade.

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

BIOAGRAFIA

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

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

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

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

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Proteínas de Reserva da Soja.....	5
2.2. Herança e modo de ação gênica na determinação do teor protéico em soja.....	8
2.3. Herdabilidade do teor de proteínas em soja.....	9
2.4. Melhoramento para quantidade e qualidade da proteína em soja.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Material genético.....	14
3.2. Procedimentos experimentais.....	14
3.2.1. Determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Kjeldahl.....	15
3.2.2. Determinação da concentração de proteínas totais pelo método do ácido bicinonínico (BCA) em placas de ELISA.....	17
3.2.3. Determinação da concentração das subunidades das proteínas de reserva por SDS- PAGE/densitometria.....	18
3.3. Análises Genético Estatísticas.....	19
3.3.1. Estimativa das herdabilidades da concentração de proteína avaliada pelas diferentes metodologias.....	19
3.3.2. Estimativa das correlações entre as metodologias de quantificação	

de proteína.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Concentração de proteínas totais pelo método de Kjeldahl.....	22
4.2. Concentração de proteínas totais pelo método do ácido bicinconínico (BCA) em placas de Elisa.....	27
4.3. Concentração das subunidades das proteínas de reserva por SDS- PAGE/densitometria.....	28
4.4. Herdabilidades.....	35
4.5. Correlações.....	40
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

RESUMO

TEIXEIRA, Arlindo Inês, M.S. Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2003.
Herdabilidades e correlações entre concentrações de proteína em soja avaliadas por diferentes metodologias. Orientador: Maurílio Alves Moreira.
Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Sebastião Tavares de Rezende.

Os principais objetivos deste trabalho foram estimar a herdabilidade no sentido amplo e restrito da concentração de proteína em soja, avaliada pelas metodologias do ácido bicinconínico (BCA) e pelo método de Kjeldahl, estimar a herdabilidade da concentração das proteínas de reserva da soja (frações 7S e 11S), avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) seguida de densitometria e estimar as correlações entre as concentrações de proteína obtidas pelas diferentes metodologias. Para isso, cortou-se com o auxílio de uma lâmina uma parte do cotilédono das sementes originadas da população F₂ derivada do cruzamento entre uma linhagem de alto teor protéico com a variedade comercial Elite, e dos dois progenitores, tomando-se o cuidado para não danificar o embrião, o que prejudicaria o poder germinativo da semente. Esta parte da semente foi utilizada nas análises para determinação da concentração de proteínas totais pelos métodos de Kjeldahl, adaptado para pequenas quantidades de semente (15 mg), e do Ácido Bicinconínico; e também na análise da concentração das proteínas de reserva por SDS-PAGE/densitometria. A outra parte da semente foi cultivada em casa de vegetação, obtendo-se por auto-fecundação a população F₃. Após a colheita, 10 sementes de cada planta obtida foram moídas e utilizadas na análise da concentração de proteínas totais pelo método de Kjeldahl e na análise da concentração das subunidades das proteínas de reserva por SDS-

PAGE/densitometria. A análise dos resultados permitiu concluir que a maior estimativa de herdabilidade no sentido amplo para teor de proteínas na geração F_2 foi obtida pelo método de Kjeldahl (56,2%). Para as concentrações das proteínas de reserva estes valores foram de 62,1% para a concentração de 7S, 43,4% para a concentração de 11S e 50,5% para a soma da concentração das duas frações, indicando que a quantificação da concentração das proteínas de reserva por SDS-PAGE/densitometria pode ser útil em programas de melhoramento para qualidade protéica em soja. As herdabilidades no sentido restrito apresentaram baixos valores para todas metodologias, variando de 1,87 a 7,14%. Os efeitos do ambiente e da interação genótipo x ambiente sobre o teor de proteína das populações foram significativos. Os coeficientes de correlação de Spearman entre as concentrações das proteínas de reserva 7S e 11S com a concentração de proteínas totais determinada pelo método de Kjeldahl e entre as concentrações de 7S e 11S foram positivos e significativos nas duas gerações, F_2 e F_3 . Os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman entre as concentrações de proteína na população F_2 determinadas pelos métodos BCA e Kjeldahl foi de 0,131 e 0,385 respectivamente, indicando baixa correlação e baixa coincidência entre os métodos. Os coeficientes de correlação de Spearman entre as concentrações das proteínas 7S e 11S da população F_2 com as concentrações destas proteínas na população F_3 foram pequenos e negativos. O coeficiente de correlação de Spearman entre as concentrações de proteínas totais na população F_2 e na população F_3 determinada pelo método de Kjeldahl foi de 0,16, indicando também que aqueles indivíduos que apresentaram altas concentrações de proteína em F_2 não geraram indivíduos com o mesmo desempenho em F_3 , indicando que a seleção precoce não seria eficiente no cruzamento estudado.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Arlindo Inês, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2003.
Heritabilities and correlations between protein contents of soybean seeds evaluated by different methodologies. Adviser: Maurilio Alves Moreira.
Committee members: Everaldo Gonçalves de Barros and Sebastião Tavares de Rezende.

The main objectives of this work were to estimate the broad and narrow sense heritabilities of soybean seed protein content evaluated by the Bincinchoninic Acid method (BCA), by the Kjeldahl method, and through the content of soybean seed storage proteins (7S and 11S) evaluated by SDS-PAGE followed by densitometry, and estimate the correlations between protein contents evaluated by the different methodologies. For that, a small fraction of the soybean seed cotyledones was cut with the aid of a blade from the F_2 population from the cross between a line with high protein content and the commercial cultivar Elite, from the two progenitors, without damaging the seed embryo, which would affect the seed germination. This seed fraction was used for the analyses of protein content by the Kjeldahl method, adapted to small amount of seeds (15 mg), Bincinchoninic Acid method, and also for the analyses of protein content through seed storage proteins determined by SDS-PAGE and densitometry. The other part of the seed was sown in the green house, obtaining the F_3 seed population. After harvesting, part of the seeds from each plant was grinded and used to measure the protein content by the Kjeldahl method and by SDS-PAGE/densitometry of the seed storage proteins. The results permitted to conclude that the greatest value estimated for broad sense heritability for protein content in the F_2 generation was obtained by the Kjeldahl method (56.2%). For protein content determined through seed storage proteins estimates these values were

62.1% for 7S content, 43.4% for 11S content and 50.5% for the sum of both protein fractions, indicating that the quantitation of total protein content through the amount of seed storage proteins by SDS-PAGE/densitometry can be useful in breeding programs for protein quality in soybean. The narrow sense heritabilities presented low values for all methodology used, varying from 1.87 to 7.14%. The environment effects and the genotype x environment interaction upon the populations were highly significant. Spearman correlation coefficient values between protein content estimated by the content of seed storage protein 7S and 11S with total seed protein content determined by the Kjeldahl method and between 7S and 11S contents were high and positive in the two generations, F_2 and F_3 . Pearson and Spearman correlation coefficients between protein content in the F_2 population determined by BCA and Kjeldahl methods were 0.131 and 0.385 respectively, indicating low relationship and low coincidence between these two methods. Spearman correlation coefficient values between 7S and 11S protein content in the F_2 population with content of these proteins in the F_3 population were small and negative. Spearman correlation coefficient between total protein content in F_2 and F_3 populations determined by the Kjeldahl method was 0.16. This low value point out that F_2 seeds selected for high protein content did not hold the trait in the F_3 generation, indicating that selection for high protein content in early generations would not be efficient for this cross.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das principais fontes de proteína e óleo vegetal do mundo. Ela tem sido cultivada comercialmente e utilizada na alimentação humana e animal por milênios.

A soja é uma leguminosa domesticada pelos chineses há cerca de cinco mil anos. Sua espécie mais antiga, a soja selvagem, crescia principalmente nas terras baixas e úmidas, junto aos juncos nas proximidades dos lagos e rios da China Central. Há três mil anos a soja se espalhou pela Ásia, onde começou a ser utilizada como alimento. Foi no início do século XX que passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. A partir de então, houve um rápido crescimento na produção, com o desenvolvimento dos primeiros cultivares comerciais.

No Brasil, o grão chegou com os primeiros imigrantes japoneses em 1908, mas foi introduzida oficialmente no Rio Grande do Sul em 1914. Porém, a expansão da soja no Brasil aconteceu nos anos 70, com o interesse crescente da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional.

O interesse mundial pelo cultivo da soja deve-se à excelente combinação que ela apresenta em termos de produtividade (geralmente superior a 2.000 kg/ha) e porcentagens de óleo e proteína, em média, 20 e 40% do peso das sementes, respectivamente (VELLO *et alli*, 1988).

Até 1975, a maioria da produção brasileira de soja era realizada com cultivares e técnicas importadas dos Estados Unidos, onde as condições climáticas e os solos são diferentes do Brasil. Assim, a soja só produzia bem, em escala comercial, nos estados do Sul, onde os cultivares americanos encontravam condições semelhantes à de seu país de origem. A criação do cultivar Tropical pelos melhoristas da Embrapa Soja levou a soja para as regiões de clima tropical do Brasil (Centro-Oeste, Nordeste e Norte). A partir daí, inúmeros outros cultivares nacionais foram criados para dar estabilidade ao cultivo de soja nas chamadas regiões de fronteira agrícola. Isso possibilitou a fixação do homem em suas propriedades, já que a soja era utilizada como cultura desbravadora, deixando na terra, após sua colheita, nutrientes necessários para o cultivo do feijão e do milho. Além disso, a soja viabilizou a implantação de indústrias de óleo, fomentou o mercado de

sementes e deu estabilidade à exploração econômica das terras onde antes só existiam matas e cerrados. Hoje, o Centro-Oeste é responsável por quase 50% da produção nacional de soja, registrando produtividades que já ultrapassam os 3500 kg/ha.

Os principais produtores mundiais de soja são os Estados Unidos, o Brasil, a Argentina e a China. No Brasil, as principais áreas produtoras estão nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso e Goiás. A produção comercial de soja está sendo ampliada, também, nas regiões Norte e Nordeste do País. Essa amplitude se deve principalmente ao grande número de cultivares disponíveis e adaptados a todas as regiões brasileiras, cultivares estes desenvolvidos por vários grupos de pesquisadores brasileiros. Assim, técnicas que venham auxiliar na caracterização desses cultivares e direcionar a obtenção de novos outros são de fundamental importância para a manutenção deste potencial produtivo nacional.

A soja no Brasil é predominantemente utilizada para o processamento do grão em óleo e proteína. Na safra 2001/2002 o País produziu aproximadamente 45 milhões de toneladas, e ao redor de 20 milhões foram exportadas em grão e o restante destinado ao processamento no parque industrial brasileiro (ABIOVE, 2003). O processamento basicamente consiste no esmagamento do grão para extrair o óleo, amplamente utilizado pela população brasileira, e o resíduo resulta no farelo de soja, um importante suplemento protéico na ração animal, sendo o Brasil, juntamente com os Estados Unidos, os principais fornecedores desta matéria-prima a nível mundial (BORÉM, 1999). O consumo da soja *in natura* é desprezível no Brasil, em razão dos hábitos alimentares dos brasileiros, mas tem se observado uma procura crescente por produtos a base de soja (ABIOVE, 2003).

A proteína da soja é inferior em qualidade quando comparada com a proteína animal no que tange ao teor de aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína, que estão presentes nesta leguminosa em quantidades limitantes. O nível de metionina na soja situa-se entre 1,0 a 1,9 %, representando cerca de 43% do nível padrão considerado pela FAO (WOLF & COWAN, 1975).

Diversos grupos de pesquisadores têm conseguido a obtenção de variedades de soja contendo altas concentrações de proteína (geralmente acima de 50% da matéria seca) e alta produtividade, usando o melhoramento clássico (MORAIS e SILVA, 1996). O problema da concentração de aminoácidos sulfurados ainda

persiste, pois não têm sido obtidas variedades com teores mais elevados destes aminoácidos por métodos de melhoramento tradicional.

As sementes de soja contêm células especiais que produzem e estocam as proteínas de reserva em vacúolos. Estudos usando as técnicas de ultracentrifugação e eletroforese revelaram que são poucas as proteínas armazenadas nestes vacúolos. Apenas duas proteínas, a glicinina e a β -conglícinina, que possuem coeficiente de sedimentação 11S e 7S respectivamente, constituem cerca de 70% das proteínas de reserva, sendo geralmente a glicinina a mais abundante (HILL E BREIDENBACH, 1974). Estudos posteriores revelaram que a β -conglícinina é mais deficiente em aminoácidos sulfurados quando comparada à glicinina, e que têm sido encontrado diferenças nos conteúdos dos componentes (subunidades) destas proteínas em linhagens de soja com alta concentração de proteína (YAKLICH, 2001). A concentração destas duas proteínas poderá variar nas diferentes variedades e nos diferentes ambientes onde a soja é cultivada. Logicamente, onde a aplicação de produtos derivados da soja requer maior quantidade de aminoácidos sulfurados, um maior conteúdo de glicinina é preferido. Foi observado também que a relação da quantidade destas duas proteínas é importante na fabricação de produtos alimentícios. Por exemplo, mudanças na razão β -conglícinina/glicinina resultam em diferenças nas propriedades físicas do *tofu*, também chamado “queijo de soja”, resultante da coagulação do extrato aquoso de sementes de soja. As variedades que apresentam menor razão β -conglícinina/glicinina tem mostrado serem melhores para a produção deste importante produto à base de soja (YAKLICH, 1999).

O fato de ocorrer variações genéticas naturais na composição de subunidades nas duas principais proteínas de reserva da soja, e sabendo que estas variações podem ser devidas a mecanismos de regulação da expressão dos genes que codificam estas subunidades, o conhecimento destes mecanismos pode ser usado para aumentar seletivamente o tipo de proteína de reserva para usos específicos. Por exemplo, já se caracterizou que seria desejável que a soja destinada à ração de suínos contivesse mais β -conglícinina e para a ração de aves contivesse mais glicinina (YAKLICH, 1999).

O programa de melhoramento genético da soja em desenvolvimento no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, que têm como um dos objetivos obter variedades de soja com

alta concentração de proteína e alta produtividade, tem conseguido, através do melhoramento tradicional assistido por microanálises bioquímicas e marcadores moleculares, a obtenção de linhagens com alta concentração de proteína. Isto foi possível, entre outros fatores, pelo uso de técnicas de microanálises, que permitem a quantificação da concentração de proteínas totais de cada semente individualmente sem a destruição do poder germinativo, o que permite realizar uma seleção de sementes com alta concentração de proteína para o plantio, o que tem agilizado bastante o programa de melhoramento.

Contudo, a metodologia que tem sido usada, baseada no método do ácido bicinconínico (SMITH *et alli*, 1985), permite quantificar apenas a concentração total de proteínas na semente. Com o intuito de ampliar o programa de melhoramento de soja desenvolvido, a fim de produzir variedades com alto teor de proteína e também de melhor qualidade, principalmente em relação ao teor de aminoácidos sulfurados, o presente trabalho propõe utilizar uma metodologia baseada na separação eletroforética e na análise quantitativa por densitometria das proteínas de reserva, que permite selecionar sementes com alta concentração de proteína e de melhor qualidade nutricional.

Especificamente, este trabalho teve como objetivos: (i) estimar a herdabilidade da concentração de proteínas totais em soja, avaliada pelas metodologias do ácido bicinconínico e pelo método de Kjeldahl modificado; (ii) estimar a herdabilidade da concentração de subunidades das proteínas de reserva da soja, avaliado pela eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) acompanhada de densitometria; (iii) estimar as correlações entre as concentrações de proteína obtidas pelas diferentes metodologias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteínas de Reserva da Soja

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

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

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

variações na composição polipeptídica, como mutantes naturais com ausência do complexo G4 (FONTES *et alli* 1984).

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

Estes autores identificaram que o Grupo 1 é codificado por três genes presentes em dois domínios cromossomais distintos. Um domínio contém dois genes de glicinina ligados (*Gy1* e *Gy2*) e o outro contém o gene *Gy3*. Os dois domínios têm alto grau de homologia e contêm outros genes que são expressos tardiamente nos embriões ou em folhas de plantas maduras. Dois destes outros genes têm sido identificados e designados como glicinina-relacionados, e podem codificar outras famílias de subunidades de glicinina que se acumulam em menor quantidade nas sementes. DIERS *et alli* (1994) mapearam os genes *Gy4* e *Gy5* da glicinina em uma população obtida do cruzamento interespecífico de *Glycine max* x *G. soja* e encontraram que estes genes estão localizados nos grupos de ligação “O” e “F” respectivamente.

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

A β -conglycinina é uma glicoproteína com massa molecular estimada em 150-170 kDa e possui três subunidades principais α' , α e β , sendo codificadas pelos genes *Cgy1*, *Cgy2* e *Cgy3*, respectivamente (THANH & SHIBASAKI, 1977). As subunidades α e α' possuem dois e três resíduos de metionina, respectivamente, e a subunidade β não possui esse aminoácido (COATES et al. 1985). Existe

polimorfismo genético na composição polipeptídica de β -conglícinina, sendo que tem sido identificando genótipos com ausência de α' (KITAMURA *et alli* 1984). Subunidades menores dessa globulina, designadas β' , γ e δ , também têm sido descritas (COATES *et alli*, 1985).

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

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

A mesma metodologia foi usada também por FEHR *et alli* (2003) visando estudar a influência do genótipo e do ambiente sobre a composição de subunidades das proteínas de reserva da soja. Estes autores, trabalhando com 14 cultivares, alguns de uso amplo e outros de uso específico, como cultivares livre de

lipoxigenases e cultivares com alto teor de proteína, que foram cultivados em 8 localidades diferentes por 3 anos consecutivos, concluíram que a concentração de 7S, 11S e a razão 11S/7S são influenciados pelo ambiente. Por outro lado, ressaltaram que não são esperadas alterações significativas nestes parâmetros de um ano para o outro a nível industrial, em virtude dos grãos colhidos em localidades próximas serem misturados nas indústrias de processamento de alimentos.

2.2. Herança e modo de ação gênica na determinação do teor protéico em soja

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

Dos trabalhos disponíveis, vários autores, entre eles SINGH e HADLEY (1972), WILCOX e SIMPSON (1977), ISHIGE (1984) e PULCINELLI (1992) concluíram que o teor de proteína nas sementes é determinado, em grande parte, pelo genótipo da planta mãe, sofrendo também influência do ambiente. Efeitos do citoplasma e dos genótipos do embrião e do grão de pólen não foram evidenciados por estes autores.

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

A composição da variância genética foi demonstrada por COCKERHAM (1954) e depois expandida por HORNER e WEBER (1956) e COCKERHAM (1963), que apresentaram um amplo conjunto de maneiras para estimar os componentes da variação genética. Para o teor de proteína em soja, diversos trabalhos têm relatado a existência de efeitos gênicos epistáticos e de dominância, contudo os efeitos gênicos aditivos foram sempre superiores (BRIM e COCKERHAM, 1961; HANSON *et alli*, 1967; McKENDRY *et alli*, 1985; LEE e WANG, 1986).

2.3. Herdabilidade do teor de proteínas em soja

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

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

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

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

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

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

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

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

Objetivando estudar os componentes genéticos envolvidos no controle do teor de proteína e em outros 8 caracteres agrônômicos, PIOVESAN (2000) encontrou, com base nos componentes de variância, estimativas de herdabilidade para teor de proteína nas 6 populações F_2 estudadas variando de 22 a 81%.

2.4. Melhoramento para Quantidade e Qualidade da Proteína em Soja

Os cultivares comerciais de soja, em geral, apresentam cerca de 40% de proteína. Entretanto, HARTWIG e EDWARDS (1975) destacam que no germoplasma de soja há considerável variabilidade nos teores de proteína, que oscila de 29 a 50%.

Apesar do potencial para o aumento do teor de proteína em soja, pouco sucesso tem sido obtido no desenvolvimento de cultivares com altos conteúdos protéicos (MORAIS e SILVA, 1996). Segundo BURTON (1985), isso se deve às correlações negativas entre teor de proteína, produtividade e teor de óleo, que dificultam a seleção para o aumento de proteína, já que a fração óleo sempre foi economicamente mais importante, o que acentuou a seleção de cultivares com altos teores de óleo, evidenciada pela correlação positiva entre óleo e produtividade.

MOREIRA *et alli* (1979) destacam que o desenvolvimento de variedades comerciais de soja contendo tanto alta concentração de proteína quanto níveis mais elevados de aminoácidos sulfurados passaram a ser prioridade em muitos grupos de pesquisa que atuam na área do melhoramento da soja.

Nos dias atuais o farelo de soja (fração protéica) tornou-se o principal subproduto das indústrias de processamento de grãos no Brasil, sendo que cerca de 65% deste destina-se à exportação. O teor de proteína no farelo influencia na formação do preço do produto, sendo necessário o desenvolvimento de novas variedades produtivas e com alto teor de proteína, para que o Brasil mantenha e até mesmo aumente sua participação no mercado mundial da soja.

Atualmente, vários estudos permitiram a identificação de métodos de melhoramento, que possibilitam o desenvolvimento de cultivares com alto teor de proteína e níveis de produtividade aceitáveis.

ERICKSON *et alli* (1981) estudaram o uso de seleção para proteína em gerações precoces do cruzamento entre *Glycine soja* e *Glycine max*. A herdabilidade do teor de proteína foi medida em F_2 e F_3 e a seleção massal e seleção de famílias foram comparadas na geração F_3 destes cruzamentos. A herdabilidade para proteína na geração F_2 , obtida pela regressão pai-filho, foi de 27%. A herdabilidade no sentido amplo em famílias F_3 cultivadas em dois locais durante o mesmo período foi de 78%. A média do teor de proteína em cada população selecionada foi maior do que a média da população não selecionada (controle). As médias dos teores de

proteína pelos diferentes métodos de seleção foram: seleção massal em F2 e F3 48%; seleção massal em F3 seguido de uma única semente por descendência 48,8%; seleção entre famílias F3 47,6%; seleção entre e dentro de famílias F3 47,5%. O método de seleção massal foi superior ao método de seleção de famílias em nível de 1% de significância. Estes autores comentam que apesar da seleção precoce ter elevado o teor de proteína da população, a segregação continuou a originar genótipos de baixo teor de proteína, conseqüentemente, passos adicionais de seleção são necessários.

WILCOX (1998) conduziu um programa de seleção recorrente para aumentar a concentração de proteína nas sementes em duas populações de soja, utilizando macho-esterilidade. A seleção recorrente aumentou a média da concentração de proteína nas sementes de 5,8 g kg⁻¹ e diminuiu a média da concentração de óleo de 2,3 g kg⁻¹ por ciclo. Nos últimos ciclos, foram observadas uma forte correlação inversa entre proteína e óleo e uma diminuição da variabilidade destas duas características. A maioria dos alelos para alta concentração de proteína foi acumulada até o quinto ciclo de seleção recorrente. Uma média de 53% das plantas do sexto até o oitavo ciclo apresentou cerca de 480 g kg⁻¹.

MORAIS e SILVA (1996) relataram que no projeto "Desenvolvimento de cultivares de soja adaptados para consumo humano *in natura* e para a indústria de alimentos" conduzido por ALMEIDA e KIIHL de 1980 a 1984, foram obtidas linhagens com alto teor protéico e boa produtividade. As linhagens BR 80-14887, BR 80-14853 e BR 80-15000 apresentaram concentrações de 48,7, 48,6 e 47,0% de proteína, respectivamente, e apresentaram potencial de produção equivalente ao cultivar Bossier, que possui 40,7% de proteína.

KAIZUMA e FUKUI (1975) encontraram correlações não significativas entre porcentagem de proteína e teor de metionina, tanto em *Glycine soja* quanto em *Glycine max*. BURTON *et alli* (1982) observaram que o teor de metionina não foi alterado com o aumento do teor de proteína, através de cinco ciclos de seleção recorrente. Significantes correlações positivas têm sido observadas entre metionina e cisteína, bem como entre metionina e total de aminoácidos sulfurados (KAIZUMA *et alli*, 1974; TAIRA *et alli*, 1976).

Cerca de 90% das proteínas da semente da soja são do tipo globulinas, que representam em média 36% do peso seco da semente (HUGHES e MURPHY, 1983). Essas globulinas apresentam duas frações principais, uma com coeficiente de

sedimentação 11S, composta pela proteína glicinina, e outra com coeficiente de sedimentação 7S, composta principalmente pela β -conglícinina, sendo a fração 11S a que contém maior conteúdo de aminoácidos sulfurados (FUKUSHIMA, 1968). Em decorrência dessa característica, KROBER e CARTER (1966) sugeriram que a elevação da razão 11S/7S poderia resultar em aumento no teor de aminoácidos sulfurados da proteína da soja.

Variações da razão 11S e 7S tem sido observadas entre genótipos de soja. TAIRA e TAIRA (1972) encontraram uma variação de 1,41 a 0,71 na razão 11S/7S entre 30 cultivares, média de 3 ambientes de cultivo. KITAMURA e KAIZUMA (1981) analisaram 1.700 linhagens de soja e encontraram 2 com razão 11S/7S igual a 2,59 e 1,61, enquanto o valor médio é de 1,12 para linhagens comuns. HARADA *et al* (1983) observaram que a razão 11S/7S não se correlacionava com o conteúdo de proteína na semente, o qual foi igual para genótipos normais e genótipos com alta concentração de 11S.

Uma outra estratégia para obter variedades de soja com maiores teores de metionina foi usada por IMSANDE (2001), que trabalhou com sementes de soja induzidas por mutação com EMS (Etil Metano Sulfonato) obtendo linhagens com maior concentração de metionina, as quais foram separadas e cruzadas. Sementes de um cruzamento apresentaram uma concentração normal de nitrogênio e um aumento de 18% na concentração de metionina. As concentrações de metionina e cisteína foram em torno de 20% maior do que aquelas da linhagem parental. Este autor observou que a concentração de metionina na proteína da soja era regulada pela maior ou menor síntese do polipeptídeo β da proteína de reserva β -conglícinina, o qual não possui nenhum resíduo de metionina em sua estrutura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

Foram utilizadas 80 progênies F_2 e F_3 derivadas do cruzamento entre uma isolinha de alta concentração protéico (48%) derivada de CAC-1 e a variedade comercial de soja Elite. Das sementes da população F_2 , foi cortada uma parte do seu cotilédono para a realização da análise da concentração de proteína total e a concentração das proteínas de reserva. A outra parte da semente, contendo o embrião, foi cultivada em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, obtendo-se a população F_3 por auto-fecundação. Juntamente com a população F_2 , 20 plantas de cada progenitor (materno e paterno) também foram analisadas, visando calcular a variância ambiental e, conseqüentemente, a herdabilidade no sentido amplo. A população F_2 e seus progenitores foram cultivados no período de verão dos anos 2001/2002. Já a população F_3 foi cultivada no período de inverno do ano de 2002, juntamente com os progenitores materno e paterno.

3.2. Procedimentos experimentais

A Figura 1 apresenta um esquema dos experimentos realizados durante a condução dos trabalhos. Basicamente, cortou-se, com o auxílio de uma lâmina, uma parte do cotilédono das sementes da população F_2 e dos dois progenitores, tomando-se o cuidado para não atingir o embrião da semente, o que prejudicaria a germinação. Esta parte da semente foi utilizada nas análises para determinação da concentração de proteínas totais pelos métodos de Kjeldahl adaptado para pequenas quantidades de semente (15 mg), e do Ácido Bicinconínico; e também na análise da concentração de subunidades das proteínas de reserva por SDS-PAGE e densitometria. A outra parte da semente foi cultivada em casa de vegetação, obtendo-se por auto-fecundação a população F_3 . Após a colheita, 10 sementes de cada planta obtida foram moídas e utilizadas na análise da concentração de proteínas totais pelo método de Kjeldahl e na análise da concentração de subunidades das proteínas de reserva por SDS-PAGE/densitometria.

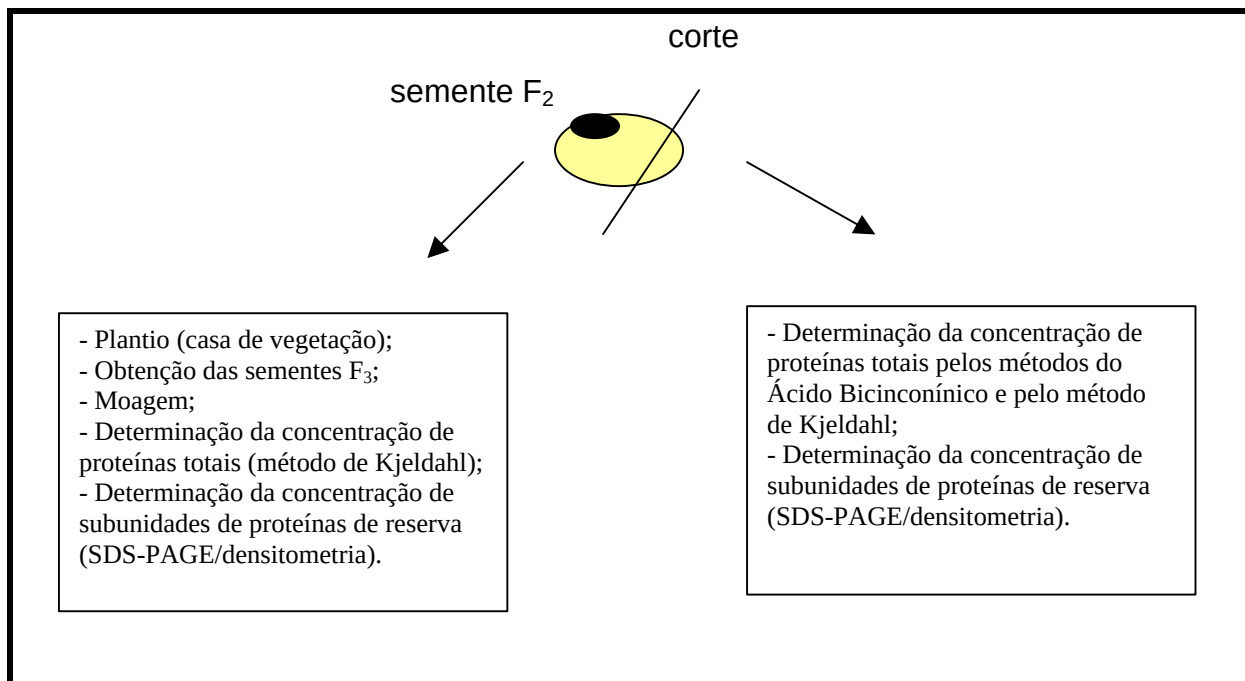


Figura 1: Esquema explicativo dos procedimentos experimentais utilizados na análise do conteúdo de proteína total e das subunidades componentes das proteínas de reserva em sementes de soja das populações F₂ e F₃.

3.2.1. Determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Kjeldahl

Nas sementes das populações F₂ e F₃, a concentração de proteínas totais de cada semente foi determinado com base no método de Kjeldahl, descrito nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985) para análises físico-químicas de alimentos.

Para a população F₂ foi utilizado o método de Kjeldahl adaptado para, aproximadamente, 15 mg de semente, e dessa forma foram realizadas duas repetições desta análise. As amostras foram liofilizadas antes da pesagem.

A análise foi realizada como descrito a seguir:

1. Digestão da amostra: Em um tubo de digestão, colocou-se a amostra pesada (~15 mg de semente) e em seguida adicionou-se 10,0 mL da mistura digestora, formada

por 1,0 L de ácido sulfúrico 98%, 10,0 g de selênio em pó e 10,0 g de sulfato de cobre. Os tubos foram levados para um bloco digestor e aquecidos gradativamente até uma temperatura entre 250 e 300 °C, permanecendo nesta temperatura por mais uma hora, quando foram retirados e resfriados à temperatura ambiente por 15 minutos. Decorrido este período, adicionou-se 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) e voltou-se com os tubos ao digestor por mais uma hora, após o qual foram resfriados e adicionou-se 10,0 mL de água destilada, ficando a amostra preparada para a próxima fase da análise, a destilação. Para cada análise realizada foi necessário preparar também o branco das amostras, que era formado pela mistura digestora e pelo papel empregado na pesagem das amostras.

2. Destilação: O tubo contendo o material digerido diluído com água após o resfriamento foi conectado ao aparelho de destilação, que apresenta a ponta do condensador mergulhada em um erlenmeyer contendo um solução de ácido bórico 4% (m/v) e o indicador misto de Tashiro (200 mg de vermelho de metila, 100 mg de azul de metileno e 100 mL de etanol 97%), sendo que para cada litro de solução de ácido bórico 4% adicionou-se 2,5 mL do indicador misto de Tashiro. Adicionou-se, aproximadamente, 25 mL de solução de hidróxido de sódio 40% (m/v) ao tubo contendo a amostra. Deixou-se destilar até se atingir o volume de 125 mL.

3. Titulação: O destilado coletado foi titulado com solução de HCl 0,01M. Para o cálculo da porcentagem de proteínas totais usou-se a seguinte equação:

$$\%PT = \left(\frac{(V_A - V_B) \times M \times f \times 1,4}{P} \right) \times FCN$$

Onde :

%PT= porcentagem de proteínas totais.

V_A= volume (em mL) de solução de HCl gastos na titulação da amostra.

V_B= volume (em mL) de solução de HCl gastos na titulação do branco.

M= molaridade da solução de HCl.

f= fator de correção da concentração da solução de HCl.

P= massa (em g) da amostra.

FCN= fator de conversão de nitrogênio para proteína, que para soja é igual a 6,25.

No caso das sementes da população F₃, o procedimento foi praticamente o mesmo, com exceção de que a massa de amostra empregada foi de

aproximadamente 300 mg de semente moída e a concentração da solução de HCl usada na titulação, que foi de 0,05 M. Antes da pesagem, uma amostra de 10 sementes de cada planta foi moída e seca por 12 horas em estufa a 105 °C.

3.2.2. Determinação da concentração de proteínas totais pelo método do Ácido Bicinconínico (BCA) em placas de ELISA.

Para esta análise, foi utilizada a metodologia proposta por SMITH *et alli* (1985), adaptada para análises de sementes de soja, de modo a não prejudicar o poder germinativo das mesmas, o que se faz utilizando uma pequena quantidade de amostra que é cortada da semente. Como envolve uma quantidade pequena de reagentes, esta análise foi realizada em placas de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays), o que permite a realização de um grande número de análises de uma única vez. Uma amostra de aproximadamente 10 mg de semente foi macerada com 750 µL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) 1,0%. Ao macerado adicionou-se 1250 µL da mesma solução e centrifugou-se em microcentrífuga eppendorf 3415 C a 14000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. Retirou-se 90 µL do sobrenadante e adicionou-se 1250 µL da solução de SDS 1,0%. Da solução resultante retirou-se 100 µL e aplicou-se na placa de ELISA. Foram adicionados 200 µL da solução reagente (50 mL de ácido bicinconínico (BCA) e 1 mL de CuSO₄) e a placa deixada por 30 minutos em banho maria a 37 °C, após o qual foi resfriada por 20 minutos e fez-se a leitura em espectrofotômetro a 560 nm. Para converter os valores de absorvância em concentração de proteína adicionou-se em todas as placas três repetições de 8, 10, 15 e 20 ng da proteína soroalbumina bovina. Foi utilizado para cada amostra um fator de correção, com base na análise pelo método de Kjeldahl de uma amostra-padrão de semente de soja, que também foi adicionada em todas as análises.

3.2.3. Determinação das concentrações das proteínas de reserva por SDS-PAGE/densitometria.

Para quantificação das proteínas de reserva glicinina (11S) e β -conglucina (7S) nas populações F₂ e F₃, estas frações proteicas foram separadas por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE), de acordo com a metodologia proposta por LAEMMLI (1970) e quantificadas por densitometria.

Para isto, cortou-se aproximadamente 10 mg de semente, que foram colocadas em tubos de 1,5 mL e adicionados 1,0 mL do tampão de extração (tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,6; NaCl 0,4 M; β -mercaptoetanol 0,28%). Os tubos ficaram 45 minutos em banho de ultrassom, após o qual foram centrifugados durante 15 minutos a 14.000 rpm em microcentrífuga eppendorf 3415C. Do sobrenadante, 60 μ L foram retirados e adicionados a outro tubo, contendo 30 μ L do tampão de amostra (TRIS 0,1875 M; SDS 6,9%; glicerol 30%; pH 6,8), 20 μ L do corante azul de bromofenol 0,05% e 20 μ L de β -mercaptoetanol. Posteriormente, os tubos foram colocados em banho maria a 100 °C por 3 minutos e aplicou-se 25 μ L da solução em gel de poliacrilamida 12,5%. A corrida foi conduzida inicialmente a 60 Volts, até a banda do corante atingir a superfície do gel de separação (~1,0 h), quando a voltagem foi aumentada para 80 Volts, permanecendo assim até o final da corrida (~5h), que foi determinado como sendo 30 minutos após o corante sair na extremidade inferior do gel. Terminada a corrida, os géis foram retirados da placa e colocados em solução corante (1,5 g de Coomassie Brilliant Blue G, 90 mL de ácido acético, 450 mL de metanol e 460 mL de água) por 12 horas e depois em solução descorante (75 mL de ácido acético, 250 mL de metanol e 675 mL de água) por 24 horas. Os géis, após descorados, foram armazenados em solução de glicerol 10% até o momento da análise por densitometria.

A análise densitométrica foi realizada em um densitômetro fabricado pela Molecular Dynamics, pertencente ao Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, obtendo-se as áreas correspondentes a cada subunidade de interesse. As subunidades das proteínas de reserva foram identificadas com base na mobilidade eletroforética constantes em trabalhos publicados na literatura (FONTES *et alli*, 1984; YAKLICH, 2001).

Foi realizada uma única extração para cada amostra e cada extrato foi aplicado em três géis, sendo que o valor para cada subunidade de cada amostra foi tomado como sendo a média dos três géis. Em todas as análises foi usada uma amostra padrão que foi extraída, aplicada no gel e quantificada junto com as outras amostras. Esta amostra, que foi denominada de padrão de extração, foi adicionada nas análises para corrigir as diferenças de extração que ocorrem entre uma análise e outra. Os fatores de correção para as concentrações de cada subunidade protéica foram obtidos dividindo-se o maior valor obtido (área integrada) de cada subunidade da amostra padrão pelos valores destas subunidades da amostra padrão em cada gel. Este fator de correção foi multiplicado pelos valores das concentrações das subunidades correspondentes de cada amostra. Dessa forma, o conteúdo de cada subunidade analisada de cada gel teve um fator de correção.

A análise densitométrica forneceu o valor da área de cada banda que aparece no gel. Com o intuito de transformar o valor da área da banda em quantidade de proteína em mg, e daí expressar o resultado para cada subunidade em porcentagem de proteína, adicionou-se em todos os géis quatro padrões de concentração, que foram 2, 4, 8 e 10 g da proteína anidrase carbônica. Desta forma, como os géis usados possuíam 20 canaletas, cada gel continha 15 amostras, 4 padrões de concentração e 1 padrão de extração.

3.3. Análises Genético Estatísticas

3.3.1. Estimativa das herdabilidades da concentração de proteína avaliada pelas diferentes metodologias

Para estimar as herdabilidades no sentido amplo, em nível de indivíduo, nas populações F_2 e F_3 , utilizou-se a expressão abaixo descrita por NAOE (1999):

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

onde,

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

σ^2_G = estimador da variância genotípica na população F_2 ou F_3 ;

σ^2_P = estimador da variância fenotípica na população F_2 ou F_3 .

As herdabilidades no sentido restrito foram estimadas segundo SMITH e KINMAN (1965), conduzindo a população F_2 em casa de vegetação até a geração F_3 , e utilizou-se os coeficientes de regressão padronizados conforme o método proposto por FREI e HORNER (1957) que emprega a seguinte equação:

$$h^2_r = (2/3) \cdot \beta_p = (2/3) \cdot (\sigma_{F_2}/\sigma_{F_3}) \cdot \beta$$

onde,

h^2_r = estimador da herdabilidade no sentido restrito;

β_p = estimador do coeficiente de regressão padronizado;

σ_{F_2} = estimador do desvio-padrão da concentração de proteínas das plantas F_2 ;

σ_{F_3} = estimador do desvio-padrão da concentração de proteínas das plantas F_3 ;

β = estimador do coeficiente de regressão da concentração de proteínas da população F_3 em função da concentração de proteínas das plantas da geração F_2 .

3.3.2. Estimativa das correlações entre as metodologias de quantificação de proteína

Para estimar os coeficientes de correlação entre os métodos empregados na determinação da concentração de proteínas e de subunidades de proteínas de reserva foram utilizados dois tipos de correlações: a correlação de Pearson e a correlação de Spearman.

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

$$r_{(X_1, X_2)} = \text{Cov}(X_1, X_2) / (\sigma^2_{X_1} \cdot \sigma^2_{X_2})^{1/2}$$

onde,

$r_{(X_1, X_2)}$ = estimador do coeficiente de correlação entre a concentração de proteínas determinado pelos métodos 1 e 2;

$Cov(X_1, X_2)$ = estimador da covariância entre a concentração de proteínas determinado pelos métodos 1 e 2;

$\sigma^2_{X_1}$ e $\sigma^2_{X_2}$ = estimador das variâncias da concentração de proteínas determinado pelos métodos 1 e 2, respectivamente.

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

$$r_{(X_1, X_2)} = 1 - \{ 6 \sum d_i^2 / n(n^2 - 1) \}$$

onde,

d_i = diferença de posto para cada par de observações;

n = número de observações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Concentrações de proteínas totais determinadas pelo método de Kjeldahl

Tendo em vista a disponibilidade de uma pequena quantidade de amostra retirada da semente para a realização de todas as análises, foi necessária a adaptação do método de Kjeldahl para pequenas quantidades de amostra. Para isto, visando descobrir se a concentração de proteínas totais da semente de soja determinada pelo método citado quando se trabalha com 15 mg de amostra não difere significativamente da concentração determinado quando se trabalha nas condições recomendadas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985), que emprega 300 mg de semente de soja, foi realizada uma análise onde se comparou a concentração protéica determinada nas duas condições. Os resultados destas análises estão contidos no Quadro 1.

Foram analisadas três repetições para as amostras com aproximadamente 300 mg e 20 repetições para as amostras com aproximadamente 15 mg (Quadro 1). Determinou-se a concentração protéica e calcularam-se as médias, os desvios padrão e os coeficientes de variação. Pôde-se constatar no Quadro 1, observando os coeficientes de variação, que a análise realizada com 300 mg de amostra foi mais precisa do que análise com 15 mg, pois esta apresentou um desvio padrão e, conseqüentemente, um coeficiente de variação menor. Para determinar se as médias das análises diferiam significativamente entre si foi realizado um teste “t” a 5% de probabilidade, tomando a média da concentração protéica da análise com 300 mg como a média populacional. Este teste mostrou que a média da concentração protéica das amostras de 15 mg foi inferior à média da concentração protéica das amostras de 300 mg, ao nível de 5% de significância. Entretanto, este experimento mostrou que a análise da concentração de proteínas totais pelo método de Kjeldahl empregando-se 15 mg de amostra, apesar de menos precisa, apresenta um coeficiente de variação pequeno (2,35%), o que indica o uso desta metodologia na seleção de sementes com alta concentração protéica em gerações precoces.

Quadro 1. Concentrações de proteínas totais determinadas pelo método de Kjeldahl utilizando aproximadamente 300 e 15 mg de semente de soja (variedade Cristalina). M (massa de amostra em gramas), Vc (volume corrigido) em mL de solução de HCl gastos na titulação, PT (porcentagem de proteínas totais) e CV (coeficiente de variação).

	m (g)	Vc¹(mL)	PT(%)	Desvio padrão	Média(%)	CV(%)
~300 mg	0,3057	28,10	41,85	0,0856	41,76	0,205
	0,3004	27,50	41,68			
	0,2992	27,45	41,77			
~15mg	0,0141	6,50	39,93	0,9316	39,67	2,348
	0,0152	6,80	38,75			
	0,0153	6,70	37,93			
	0,0142	6,30	38,43			
	0,0157	7,30	40,28			
	0,0167	7,60	39,42			
	0,0165	7,70	40,43			
	0,0147	6,45	38,01			
	0,0156	7,25	40,26			
	0,0153	7,25	41,05			
	0,0152	7,15	40,75			
	0,0152	6,85	39,04			
	0,0153	7,05	39,92			
	0,0154	7,10	39,94			
	0,0158	7,30	40,02			
	0,0145	6,85	40,92			
	0,0152	7,10	40,46			
	0,0162	7,45	39,84			
	0,0153	6,85	38,78			
	0,0159	7,20	39,23			

¹ Para as amostras de aproximadamente 300 mg de semente de soja usou-se solução de HCl 0,05 N (f=1,01406) e para as amostras de aproximadamente 15 mg de semente usou-se solução de HCl 0,01 N (f=0,99). O volume gasto na titulação de cada amostra é subtraído do volume gasto na titulação do branco, que contém apenas o papel usado na pesagem das amostras e a solução digestora.

Com o intuito de avaliar o coeficiente de variação das concentrações de proteínas totais determinadas pelo método de Kjeldahl empregando-se uma pequena quantidade de amostra, foi desenvolvido um experimento cujos resultados estão apresentados na Quadro 2. Esta análise foi conduzida tomando-se amostras com aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35 e 40 mg de amostra, sendo que foram feitas 6 repetições para cada massa testada; determinou-se a concentração protéico pelo método de Kjeldahl e calcularam-se as médias, os desvios padrão e os coeficientes de variação.

Pode-se observar no Quadro 2 que os coeficientes de variação para as massas testadas ficou sempre abaixo de 5% para amostras com massas entre 15 e 40 mg de semente de soja.

Os resultados contidos nos Quadros 1 e 2 forneceram o suporte para a realização das determinações das concentrações de proteínas totais pelo método de Kjeldahl na população F_2 , empregando-se aproximadamente 15 mg de semente de soja, preservando desta maneira o poder germinativo das sementes analisadas.

Quadro 2. Coeficientes de variação (CV) nas análises das concentrações de proteínas totais pelo método de Kjeldahl empregando amostras com 15, 20, 25, 30, 35 e 40 mg de semente de soja da variedade Cristalina.

Massa aproximada (mg)	Proteína¹ (%)	CV(%)
15	41,40	2,84
20	41,09	3,25
25	42,26	4,06
30	43,45	1,54
35	41,97	1,65
40	42,65	0,84

¹ Médias de 6 repetições. A solução de HCl usada na titulação foi de 0,01 M, $f=0,99$.

O gráfico da Figura 2 apresenta os resultados da determinação das concentrações de proteínas totais obtidas pelo método de Kjeldahl na população F_2 e nos progenitores. A população F_2 apresentou concentrações variando de 38,9 a 50,2% de proteína, com média igual a 44,6%. Nos progenitores as médias foram de 39,5 e 53,9%.

Já o gráfico da Figura 3 apresenta os resultados obtidos para a população F_3 . Nesta geração a concentração de proteína variou de 32,3 a 42,9%, com média de 36,4%. Nos progenitores as médias foram de 36,9 e 40,8%. Pôde-se perceber que na geração F_3 , a população e os progenitores apresentaram uma menor concentração protéica quando comparados com a população e progenitores da geração F_2 . A população F_2 e seus progenitores foram cultivados no período de verão dos anos 2001/2002 e a população F_3 , juntamente com os mesmos progenitores da geração F_2 , foram cultivados no período de inverno de 2002. Estudos têm demonstrado que a temperatura ambiente durante o cultivo da soja influencia a concentração protéica do grão. Uma mesma variedade cultivada em dois ambientes diferentes apresentou maior teor protéico no ambiente em a temperatura média noturna foi maior (SMITH e CIRCLE, 1978), o que explicaria a grande redução observada nas concentrações protéicas da população F_3 e dos progenitores no presente trabalho.

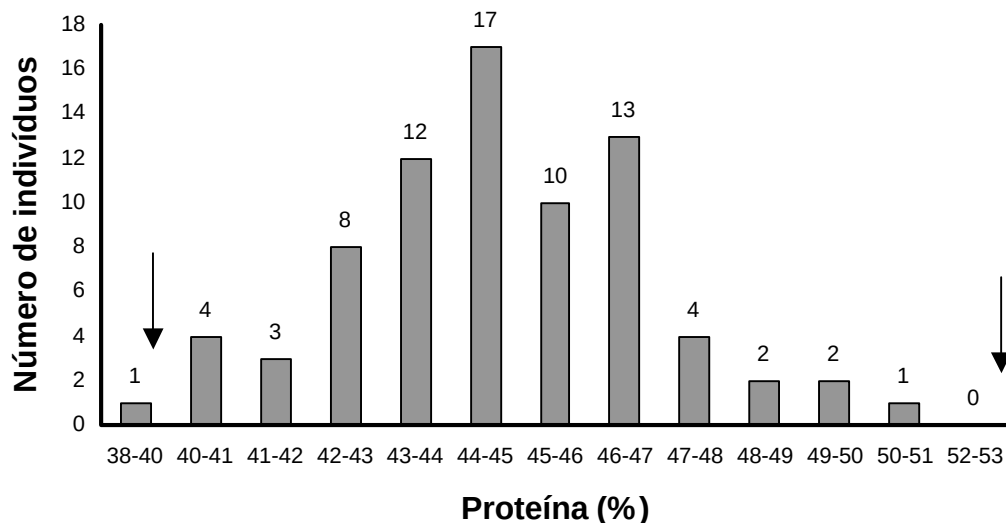


Figura 2: Concentrações de proteínas totais determinadas pelo método de Kjeldahl na população F_2 , derivada do cruzamento entre a variedade Elite e uma isolinha de alto teor protéico derivada de CAC-1. As médias dos progenitores paterno (39,5%) e materno (53,9%) estão indicadas pelas setas.

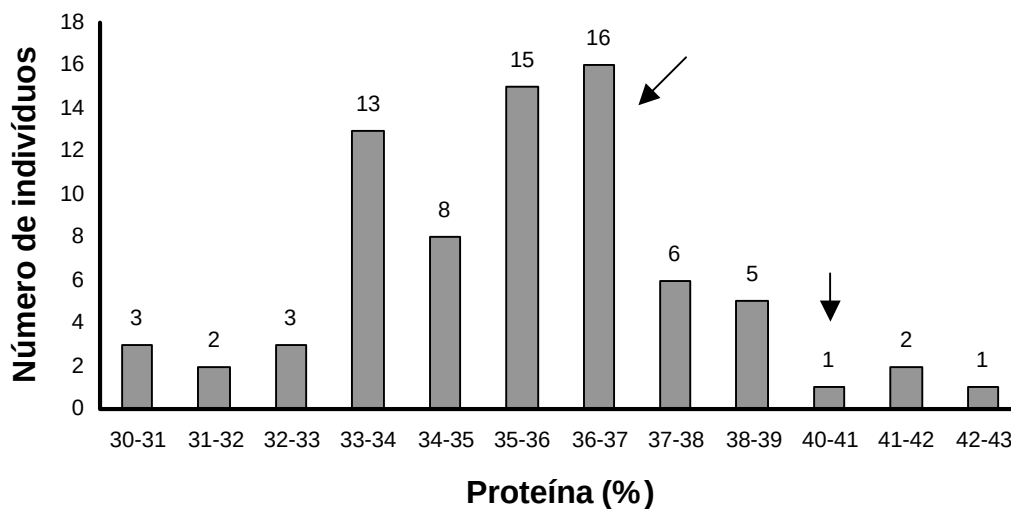


Figura 3: Concentrações de proteínas totais determinados pelo método de Kjeldahl na população F_3 , obtida pela autofecundação das plantas F_2 . As médias dos progenitores paterno (36,9%) e materno (40,8%) estão indicadas pelas setas.

4.2. Concentrações de proteínas totais determinadas pelo método do ácido bicinconínico (BCA) em placas de ELISA.

O reagente ácido bicinconínico (BCA) é um sal de sódio solúvel em água, muito estável e que forma um intenso complexo violeta com íons Cu^{+1} em meio básico. O método descrito por SMITH *et alli* (1985) para quantificação da concentração protéica, usado neste trabalho, se baseia na reação entre íons Cu^{+2} e as ligações peptídicas da proteína em meio básico, a qual resulta na formação de íons Cu^{+1} , que reagem com o BCA formando um complexo violeta estável com absorção em 562 nm. A Figura 4 apresenta a concentração de proteínas totais determinado pelo método BCA na população F_2 e nos progenitores. Na população F_2 a concentração protéica variou de 37,7 a 52,8%, com média igual a 44,2%. Nos progenitores as médias foram de 41,4 e 49,9%.

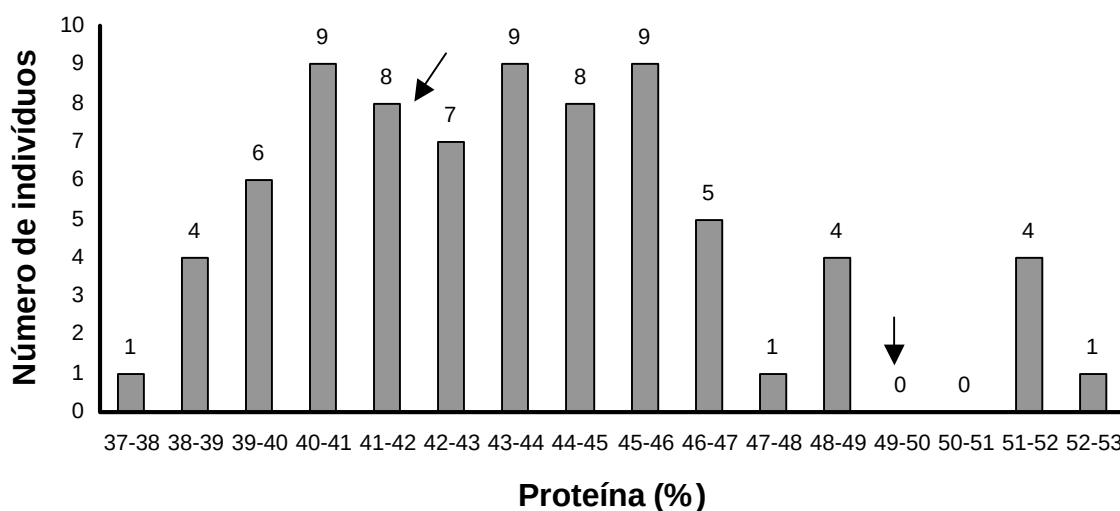


Figura 4: Concentrações de proteínas totais determinadas pelo método do ácido bicinconínico (BCA) na população F_2 , derivada do cruzamento entre a variedade Elite e uma isolinha de alto teor protéico derivada de CAC-1. As médias dos progenitores paterno (41,4%) e materno (49,9%) estão indicadas pelas setas.

4.3. Concentrações das proteínas de reserva 7S e 11S determinadas por SDS-PAGE/densitometria.

A Figura 5 apresenta a foto de um dos géis obtidos para a população F₂ e progenitores. As subunidades das proteínas de reserva destacadas foram aquelas quantificadas por densitometria, que são as subunidades α' , α e β da γ -conglucina (7S), as subunidades acídicas, A₃ e A_{1a}A_{1b}A₂A₄ (não se separam nessas condições), e as subunidades básicas da glicina (11S). De posse das áreas integradas de cada banda, fornecidas após a quantificação por densitometria, determinaram-se os conteúdos de 7S e 11S para todas as amostras da população F₂ e dos progenitores materno e paterno estudados.

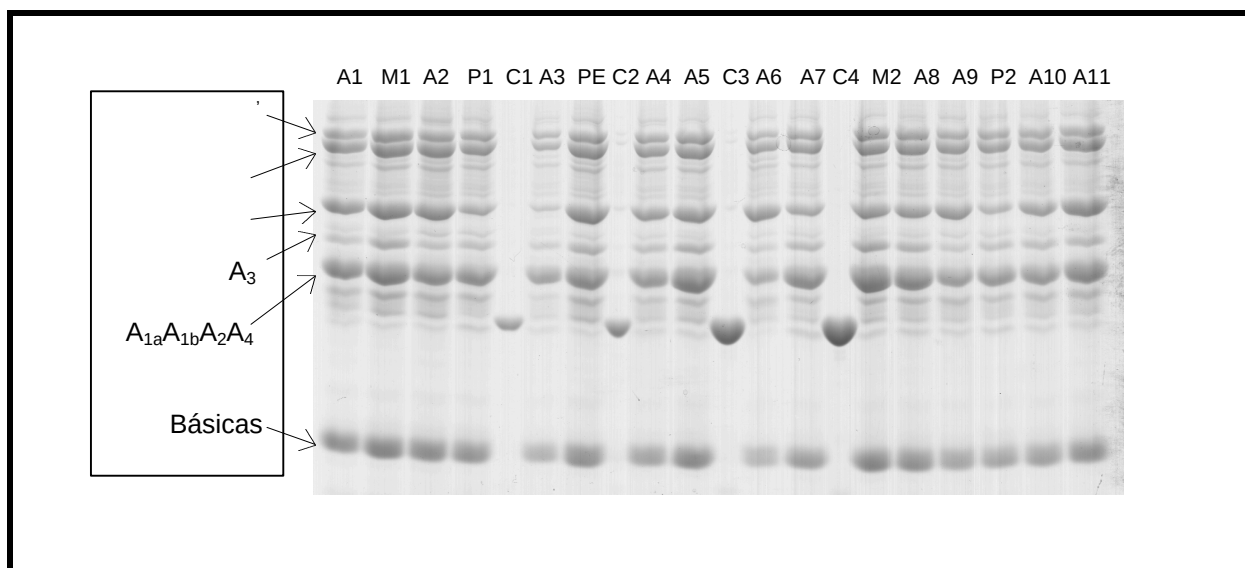


Figura 5: Padrão eletroforético obtido por SDS-PAGE dos extratos protéicos analisados da população F₂. Foram aplicados 25 μ L de extrato obtido de 10 mg de semente por 1 mL de tampão de extração. População F₂ (canaletas A1 a A11); progenitor materno (canaletas M1 e M2); progenitor paterno (canaletas P1 e P2); padrão de extração (canaleta PE) para o qual foi usado a variedade BARC-8; padrões de concentração (canaletas C1 a C4) que continha 2, 4, 8 e 10 μ g da proteína anidrase carbônica. A identificação das subunidades foi feita com base em trabalhos publicados na literatura (FONTES *et al*, 1984; YAKLICH, 2001).

Somente pela comparação visual da intensidade das bandas na foto do gel na Figura 5 pode ser observado que o progenitor paterno (canaletas P₁ e P₂), que possui menor teor de proteína total do que o progenitor materno (canaletas M₁ e M₂), também apresenta menor conteúdo de proteínas de reserva. Observa-se na Figura 2 também a variabilidade presente na população F₂, comparando-se, por exemplo, os indivíduos A3 e A5. O cultivar BARC-8, desenvolvido pelo USDA-ARS (Beltsville, MD, EUA), usado como padrão de extração (PE), possui uma concentração aproximada de 52% de proteína. Pode-se observar na Figura 5 que este cultivar também apresentou um teor mais elevado de proteínas de reserva.

Obtidos os géis, as amostras foram quantificadas por densitometria, análise na qual se mede a densidade ótica em todos os pontos do gel. As subunidades das proteínas de reserva que se separam no gel de poliacrilamida 12,5% formam bandas no gel que geram picos de densidade ótica cuja área é diretamente proporcional à concentração da subunidade. Como em todos os géis foram adicionados 4 padrões de concentração, que foram 2, 4, 8 e 10 g de anidrase carbônica, pôde-se relacionar, por meio de regressão linear, área e quantidade de proteína. Dessa forma, foi possível estimar a quantidade em g das subunidades analisadas presentes no extrato protéico e, conseqüentemente, a porcentagem desta subunidade nos indivíduos da população F₂ bem como nos progenitores. As porcentagens das subunidades α , β e da α -conglucina foram somadas, resultando na porcentagem de 7S. As subunidades A₃, A_{1a}A_{1b}A₂A₄ e básicas foram somadas, resultando na porcentagem de glicina (11S). De posse das áreas integradas de cada banda, fornecidas após a quantificação por densitometria, determinou-se o conteúdo de 7S, 11S e a relação 11S/7S para todas as amostras da população F₂, F₃ e progenitores materno e paterno estudados, resultados estes que estão contidos no Quadro 3. O Quadro 3 também contém as concentrações de proteína dos indivíduos das populações F₂, F₃ e dos progenitores, determinados pelos métodos de Kjeldahl e BCA.

Os valores encontrados para a relação 11S/7S na população F₂ variaram de 0,67 a 1,97, estando de acordo com resultados encontrados na literatura. TAIRA e TAIRA (1972) encontraram uma variação de 0,71 a 1,41 para a razão 11S/7S entre 30 cultivares. KITAMURA e KAIZUMA (1981), analisando 1.700 linhagens de soja, encontraram um valor médio de 1,12 para genótipos comuns, sendo que encontraram dois com razão 11S/7S igual a 2,59 e 1,61. FEHR *et alli* (2003)

encontraram uma relação variando de 1,51 a 2,04 para 14 cultivares analisados. Valores mais elevados da relação 11S/7S, como destacaram KROBER e CARTER (1966), sugerem uma maior concentração de aminoácidos sulfurados na proteína da soja. Estes resultados servem para exemplificar a utilidade que a técnica de SDS-PAGE/densitometria pode vir a ter em programas de melhoramento para qualidade protéica, permitindo a seleção de indivíduos com elevada relação 11S/7S em gerações precoces, os quais poderão resultar em linhagens com maiores concentrações de aminoácidos sulfurados.

Na população F_3 , a relação 11S/7S variou de 2,29 a 7,65 (Quadro 3), sugerindo que nesta população a síntese de 7S foi menor do que em F_2 , o que pode ser observado também pelos géis de SDS-PAGE mostrados nas Figuras 2 e 3, onde percebe-se que a subunidade da fração 7S na população F_3 praticamente desaparece.

Quadro 3. Médias das concentrações (%) das proteínas de reserva 7S e 11S, da relação 11S/7S e das concentrações de proteínas totais nas populações F₂ (sementes A1 a A99), F₃ (plantas A1 a A99) e nos progenitores (p1 a p20 e m1 a m20). Método SDS-PAGE/densitometria, método do Ácido Bicinconínico (BCA), método de Kjeldahl adaptado (K).

Amostra	SDS-PAGE/dens. (F ₂)%			SDS-PAGE/dens. (F ₃)%			BCA(%)	K (F ₃)%	K (F ₂)%
	7S	11S	11S/7S	7S	11S	11S/7S			
A1	8,719	12,781	1,466	1,995	8,533	4,278	48,850	38,002	49,262
A2	7,029	10,297	1,465	2,231	9,773	4,380	39,889	38,122	43,502
A3	6,232	9,061	1,454	2,661	9,019	3,390	43,759	37,833	40,357
A4	8,196	10,052	1,226	1,598	6,965	4,359	48,143	33,582	48,331
A5	7,133	7,200	1,009	1,789	6,084	3,400	45,613	37,522	40,817
A6	8,491	9,774	1,151	1,676	5,592	3,337	46,137	35,524	47,850
A7	10,517	14,322	1,362	2,574	7,335	2,849	40,178	37,682	-
A8	9,773	11,678	1,195	1,919	5,921	3,086	37,704	33,203	46,624
A10	8,361	12,444	1,488	2,290	9,482	4,141	45,027	36,776	43,699
A11	6,308	8,360	1,325	1,091	6,529	5,987	41,526	35,596	42,420
A12	3,319	6,433	1,938	2,297	8,524	3,711	44,469	36,675	45,669
A15	5,437	7,023	1,292	1,647	5,972	3,627	44,216	33,253	43,012
A16	4,833	7,863	1,627	-	-	-	41,474	33,392	44,253
A17	5,035	8,090	1,607	2,091	8,028	3,839	39,025	35,373	43,197
A18	5,840	8,321	1,425	1,776	5,951	3,351	43,761	36,860	46,320
A19	7,283	5,378	0,738	2,127	8,466	3,981	39,574	35,607	42,088
A20	4,628	6,596	1,425	3,818	12,676	3,320	44,055	39,987	45,527
A21	5,810	5,455	0,939	2,865	9,981	3,484	44,989	36,719	46,297
A22	6,199	11,174	1,802	1,749	7,208	4,121	43,142	35,308	45,340
A23	7,809	10,299	1,319	2,367	8,807	3,721	45,451	34,956	49,080
A27	10,265	12,229	1,191	1,722	6,317	3,669	39,943	34,645	43,335
A28	6,436	11,840	1,840	2,099	5,889	2,805	42,644	33,282	38,881
A30	10,181	10,795	1,060	1,495	5,720	3,825	42,154	33,163	50,193
A32	8,380	7,855	0,937	0,214	0,817	3,825	41,268	35,379	44,282
A33	7,345	13,882	1,890	1,139	5,809	5,102	51,551	-	45,512
A34	5,613	8,128	1,448	2,444	6,978	2,855	44,379	36,634	40,552
A35	6,151	10,119	1,645	-	-	-	43,022	36,467	44,902
A38	9,650	8,590	0,890	2,627	10,657	4,057	46,107	36,922	48,321
A39	6,924	5,935	0,857	1,490	7,075	4,749	46,657	34,022	46,456
A41	4,209	5,275	1,253	2,562	5,880	2,295	40,613	33,104	41,818
A44	7,596	10,056	1,324	1,947	5,075	2,606	41,458	34,551	46,613
A45	7,337	8,867	1,209	-	-	-	40,165	39,861	44,734
A46	6,485	9,554	1,473	1,314	8,527	6,491	45,923	35,631	43,056
A47	11,309	9,243	0,817	1,629	9,709	5,961	45,688	36,634	46,771
A48	5,061	8,898	1,758	-	-	-	40,301	36,419	46,619
A49	4,588	7,038	1,534	2,291	11,758	5,132	38,151	34,979	42,407

Quadro 3 - continuação									
Amostra	SDS-PAGE/dens. (F ₂)%			SDS-PAGE/dens. (F ₃)%			BCA(%)	K (F ₃)%	K (F ₂)%
	7S	11S	11S/7S	7S	11S	11S/7S			
A50	5,187	4,973	0,959	1,649	6,403	3,883	47,888	34,839	42,912
A51	9,334	11,105	1,190	1,792	7,839	4,374	40,360	33,355	42,278
A52	6,488	9,516	1,467	1,789	6,070	3,393	46,793	36,054	44,728
A54	5,753	9,133	1,587	2,412	7,417	3,075	40,102	35,872	44,402
A55	7,977	8,023	1,006	0,663	5,782	8,723	40,845	32,778	44,465
A56	8,434	11,299	1,340	1,031	6,311	6,124	43,293	33,564	44,434
A57	7,892	12,256	1,553	2,131	9,361	4,394	-	35,784	46,609
A58	6,131	10,329	1,685	1,596	5,673	3,555	44,302	36,059	47,242
A60	7,070	10,105	1,429	2,182	6,918	3,171	43,525	33,066	46,613
A61	11,157	15,664	1,404	1,804	6,850	3,798	45,927	-	44,489
A62	8,844	9,707	1,098	1,408	4,369	3,103	52,804	30,439	46,162
A63	7,213	7,696	1,067	2,087	8,198	3,928	51,330	34,362	44,416
A64	4,771	7,898	1,656	1,966	8,047	4,093	44,310	33,917	43,751
A66	7,073	11,291	1,596	-	-	-	51,126	-	47,383
A67	7,688	8,684	1,130	2,565	9,789	3,817	38,732	38,143	45,033
A70	5,018	8,362	1,666	0,853	5,437	6,375	43,516	32,933	41,187
A71	8,264	12,975	1,570	1,794	8,610	4,798	42,261	36,799	46,141
A72	12,123	13,787	1,137	1,554	9,954	6,405	40,846	36,418	41,441
A73	4,205	8,312	1,977	1,238	9,278	7,494	41,723	32,263	45,094
A76	9,613	9,016	0,938	2,002	5,978	2,986	42,354	35,496	45,588
A77	7,226	11,104	1,537	1,577	6,500	4,123	48,264	-	42,502
A78	5,652	5,797	1,026	1,858	7,942	4,274	45,538	33,728	44,567
A79	7,956	7,452	0,937	2,256	10,652	4,721	39,757	37,317	44,138
A80	7,260	4,871	0,671	2,274	10,121	4,452	41,772	37,251	44,747
A82	9,474	14,053	1,483	2,242	11,837	5,279	46,431	41,314	44,283
A83	6,297	6,703	1,065	1,909	9,439	4,944	43,320	36,370	45,656
A84	6,140	8,342	1,359	1,131	5,620	4,967	-	34,176	44,248
A85	7,581	11,545	1,523	1,458	7,114	4,879	41,772	35,919	43,501
A86	10,069	13,702	1,361	1,452	6,583	4,534	42,927	36,177	43,150
A87	9,981	14,539	1,457	1,422	6,178	4,346	40,937	36,695	46,755
A88	8,281	12,334	1,489	1,963	8,350	4,254	42,107	35,801	43,851
A89	5,703	7,423	1,302	2,607	10,674	4,095	38,309	38,925	47,543
A90	7,258	6,916	0,953	4,020	12,626	3,141	42,208	40,856	44,893
A91	5,102	9,744	1,910	1,736	9,911	5,710	45,727	37,057	45,186
A92	6,471	8,015	1,239	2,358	11,592	4,917	41,756	42,899	45,357
A93	8,576	12,455	1,452	2,871	10,153	3,536	38,868	33,676	46,457
A94	12,462	12,970	1,041	1,635	6,593	4,032	39,923	38,022	43,463
A95	8,584	10,130	1,180	1,974	6,442	3,263	44,094	35,015	42,848
A96	6,567	7,565	1,152	2,407	8,822	3,665	51,982	39,976	44,552
A97	4,235	4,441	1,049	1,171	8,953	7,648	43,216	35,637	43,037
A98	6,858	7,493	1,093	1,443	7,357	5,098	45,682	35,156	42,400
A99	6,024	7,478	1,241	2,620	11,960	4,565	48,940	41,983	40,237
p1	4,734	9,841	2,079	-	-	-	45,515	36,589	46,434
p3	3,813	8,100	2,125	2,314	7,888	3,409	46,114	34,080	41,132
p4	3,758	8,525	2,268	2,287	9,619	4,206	45,324	38,416	38,480

Quadro 3 - continuação									
Amostra	SDS-PAGE/dens. (F ₂)%			SDS-PAGE/dens. (F ₃)%			BCA(%)	K (F ₃)%	K (F ₂)%
	7S	11S	11S/7S	7S	11S	11S/7S			
p6	5,352	10,924	2,041	3,340	12,698	3,801	39,910	41,469	39,775
p7	5,044	10,857	2,152	2,410	9,192	3,814	38,764	36,505	39,040
p8	2,607	5,586	2,143	2,235	8,651	3,871	41,182	37,682	35,767
p9	3,326	7,375	2,217	2,620	7,860	3,000	41,944	43,627	38,871
p10	2,506	5,957	2,377	2,417	10,148	4,198	54,295	37,814	38,775
p12	3,991	9,707	2,432	2,368	8,462	3,574	48,584	36,623	45,392
p13	3,870	7,987	2,064	4,319	14,217	3,292	13,212	42,061	39,180
p14	3,459	7,042	2,036	2,480	8,657	3,491	38,400	39,143	40,615
p15	4,800	9,168	1,910	2,379	10,606	4,459	35,916	37,932	42,488
p16	4,394	10,214	2,325	2,832	10,566	3,731	39,728	37,705	40,468
p17	1,749	4,477	2,559	2,934	9,699	3,306	36,555	37,477	38,438
p18	2,725	4,964	1,822	2,858	7,521	2,632	40,174	42,449	39,729
p19	3,124	8,220	2,631	2,936	8,736	2,976	51,292	40,855	39,597
m1	10,258	19,399	1,891	2,468	7,258	2,942	50,466	37,922	55,859
m2	5,564	11,066	1,989	1,997	6,665	3,337	50,920	38,647	53,448
m3	8,899	18,310	2,058	2,461	11,887	4,830	47,141	41,624	50,050
m4	6,502	12,154	1,869	2,007	7,681	3,827	53,519	39,560	50,206
m5	9,152	18,773	2,051	1,246	7,479	6,001	56,027	36,295	56,411
m6	6,810	14,545	2,136	2,293	12,015	5,239	46,383	39,678	57,434
m7	8,325	19,574	2,351	1,454	7,457	5,130	50,152	37,983	56,357
m8	10,668	21,537	2,019	2,237	10,492	4,691	49,611	40,446	53,632
m9	7,481	15,271	2,041	2,047	11,086	5,415	45,322	37,883	54,846
m10	12,278	17,745	1,445	2,310	11,157	4,829	47,873	40,653	54,378
m11	6,080	16,176	2,661	3,240	11,381	3,512	52,930	39,185	53,688
m12	8,106	14,297	1,764	2,080	9,842	4,732	53,146	39,368	52,778
m13	9,155	15,051	1,644	2,448	9,279	3,790	50,555	37,340	52,598
m14	8,446	15,704	1,859	3,853	14,311	3,715	51,096	43,673	52,110
m15	8,182	16,055	1,962	2,811	12,421	4,419	45,476	41,420	53,955
m16	9,995	14,781	1,479	2,528	12,377	4,895	52,307	39,630	55,134
m17	10,885	17,038	1,565	2,978	12,712	4,269	48,882	43,027	54,031
m18	8,718	18,163	2,083	2,957	12,653	4,279	48,276	42,639	54,427
m19	5,468	12,444	2,276	-	-	-	48,576	39,996	52,915
m20	7,613	16,494	2,167	2,805	10,386	3,702	43,313	39,981	52,814

- Valores não determinados

A Figura 6 apresenta a foto de um dos géis obtidos para a população F_3 . Pode-se perceber que o padrão eletroforético nesta geração foi diferente daquele obtido na geração F_2 , diferença esta que pode ser percebida na subunidade da fração 7S, que na geração F_3 praticamente não aparece no gel. Pelo Quadro 3 pode ser observado que na população F_3 a concentração de proteínas de reserva foi menor que na geração F_2 , o que era esperado pois as concentrações de proteínas totais determinados na geração F_3 foram bem inferiores que da população F_2 .

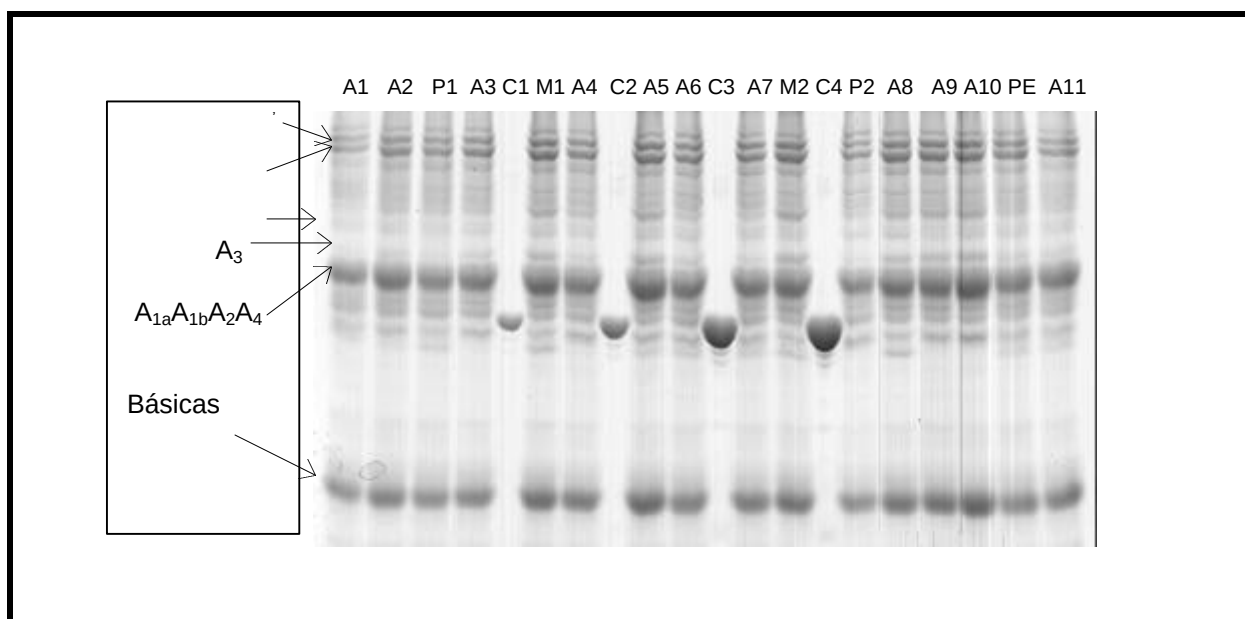


Figura 6: Padrão eletroforético obtido por SDS-PAGE dos extratos proteicos analisados na população F_3 . Foram aplicados 25 μ L do extrato obtido de 10 mg de semente por 1 mL de tampão de extração. População F_3 (canaletas A1 a A11); progenitores maternos (canaletas M1 e M2); progenitores paternos (canaletas P1 e P2); padrão de extração (canaleta PE), para o qual foi usado o indivíduo A32 da população F_3 ; padrões de concentração (canaletas C1 a C4), que continham 2, 4, 8 e 10 μ g da proteína anidrase carbônica. A identificação das subunidades foi feita com base em trabalhos publicados na literatura (FONTES *et al*, 1984; YAKLICH, 2001).

4.4. Herdabilidades

Terminada a quantificação da concentração de proteínas totais pelos métodos do ácido bicinconínico (BCA) e pelo método de Kjeldahl e as concentrações das proteínas de reserva por SDS-PAGE/densitometria, nas populações F₂, F₃ e nos dois progenitores, estimou-se a herdabilidade da concentração de proteínas no sentido amplo (h^2_a) para cada metodologia de análise empregada. Estas estimativas foram obtidas dividindo-se a variância genotípica pela fenotípica, conforme metodologia utilizada por MAHMUD e KRAMER (1951).

No presente trabalho, a variância fenotípica (σ^2_F) foi estimada tomando-se o valor estimado da variância das concentrações de proteína nas populações F₂ e F₃. A variância ambiental (σ^2_E) foi estimada com base na variação das concentrações protéicas nos progenitores pela equação:

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

onde σ^2_{P1} e σ^2_{P2} são os estimadores das variâncias das concentrações de proteínas nos progenitores 1 e 2, respectivamente; n_{P1} e n_{P2} são os números de indivíduos analisados dos progenitores 1 e 2, respectivamente. Como pode ser considerado que a variância fenotípica total corresponde à soma da variância ambiental com a variância genética, a estimativa da variância genética (σ^2_G) foi determinada subtraindo-se da variância fenotípica a variância ambiental. As concentrações de proteína dos progenitores foram usadas na estimativa da variância ambiental pelo fato das plantas de cada progenitor poderem ser consideradas geneticamente idênticas, o que permite inferir que a variação ocorrida nas concentrações protéicas entre as plantas de cada progenitor é devida unicamente a causas ambientais. Como os progenitores foram cultivados no mesmo ambiente da população F₂ analisada, a variância ambiental na população F₂ pode ser considerada como sendo igual à variância ambiental estimada para os progenitores.

Estimaram-se também as herdabilidades da concentração de proteínas no sentido restrito (h^2_r) para cada metodologia de análise empregada na população F₂, combinando-se as metodologias propostas por SMITH e KINMAN (1965),

conduzindo a população F_2 em casa de vegetação até a geração F_3 , e utilizando-se os coeficientes de regressão padronizados, conforme o método proposto por FREI e HORNER (1957). Ao invés da herdabilidade no sentido amplo, que é estimada dividindo-se a variância genotípica pela fenotípica, RAMALHO *et alli* (1993) destaca que a herdabilidade no sentido restrito considera apenas a variância genética aditiva, aquela que é fixada pela seleção, sendo evidentemente a mais importante para os melhoristas.

O Quadro 4 apresenta os valores estimados das variâncias fenotípica, genotípica e ambiental e os valores estimados das herdabilidades no sentido amplo e restrito para a concentração de proteínas totais determinada pelos métodos BCA e Kjeldahl e a concentração de proteínas de reserva (11S + 7S), de glicinina (11S) e -conglucina (7S), determinadas por SDS-PAGE/densitometria, nas populações F_2 , F_3 e progenitores.

Pelos resultados apresentados no Quadro 4 observa-se que as estimativas de herdabilidade no sentido amplo para teor de proteínas diferiram de acordo com a metodologia de análise da concentração protéica empregada na geração F_2 . A maior estimativa encontrada foi para o método de Kjeldahl (56,2%) e a menor para o método do ácido bicinconínico (44,4%). Para a concentração das proteínas de reserva as estimativas foram de 62,1% para a concentração de 7S, 43,4% para a concentração de 11S e 50,5% para a soma das concentrações das duas frações.

Segundo FALCONER (1987), caracteres com herdabilidade superiores a 50% indicam que a contribuição de causas genéticas será mais pronunciada do que a atribuída a fatores do ambiente na expressão fenotípica do caráter. Logo, as estimativas de herdabilidade encontradas sugerem que na população estudada existe potencial para se realizar a seleção para teor de proteínas totais e para as concentrações de 7S e 11S. Sugerem também que o método de Kjeldahl seria melhor método de quantificação não destrutivo da concentração de proteínas totais em gerações precoces do que o método BCA. Estes resultados indicam que a quantificação das concentrações das proteínas de reserva por SDS-PAGE/densitometria pode ser muito útil em programas de melhoramento para qualidade protéica em soja.

A herdabilidade no sentido amplo para a concentração de proteínas determinada pelo método de Kjeldahl na população F_3 foi de 69,8%, maior do que o valor estimado para a população F_2 , que foi de 56,2%. Já para a concentração das

proteínas de reserva as estimativas foram de 72,4% para a concentração de 7S, 56,1% para a concentração de 11S e 62,1% para a soma das concentrações das duas frações (Quadro 4). Este resultado está de acordo com JOHNSON e BERNARD (1963), que mostraram que em gerações precoces as estimativas de herdabilidade apresentam menores valores quando comparadas com gerações mais avançadas. Os valores de herdabilidade no sentido amplo estimados para a concentração de proteínas determinada pelas diferentes metodologias estão dentro da faixa de valores encontrados por vários outros autores que fizeram estimativas desta característica em gerações precoces (PIOVESAN, 2000; SHORTER *et alli*, 1976; BRIM e BURTON, 1979; ERICKSON *et alli*, 1981 e McKENDRY *et alli*, 1985).

As herdabilidades no sentido restrito apresentaram baixos valores para todas metodologias, variando de 1,87 a 7,14%. Em parte esses valores são explicados, segundo DUDLEY e MOLL (1969) porque a herdabilidade no sentido restrito depende apenas da fração aditiva da variância genética, enquanto, no sentido amplo, envolve toda a variação. Porém, provavelmente esses valores baixos se devem principalmente ao efeito ambiental, visto que as populações F_2 e F_3 foram cultivadas em ambientes de temperatura média diferente.

Visando quantificar o efeito ambiental atuante sobre as populações realizou-se a análise de variância que está apresentada no Quadro 5. Como fonte de variação foram considerados os dois progenitores (genótipo), as duas épocas de plantio (ambiente) e a interação genótipo x ambiente. Isto foi possível pois os mesmos progenitores foram cultivados juntamente com as populações F_2 e F_3 , ou seja, em duas épocas diferentes, sendo úteis para estimar o efeito ambiental atuante sobre as duas populações.

No Quadro 5 pode-se observar que os efeitos do genótipo, do ambiente e da interação genótipo x ambiente foram significativos pelo teste F a 1% de probabilidade. O efeito significativo do genótipo era esperado devido ao fato de que os dois progenitores usados serem contrastantes para teor de proteína. O efeito significativo da época de plantio se explica pelo fato destes ambientes diferirem na temperatura média noturna, sendo que no ambiente onde esta temperatura foi maior ocorreu um maior acúmulo de proteínas na semente. A interação significativa entre genótipo e ambiente encontrada indica que os progenitores responderam de maneira diferenciada ao efeito ambiental atuante, comprometendo de certa forma os valores de herdabilidade encontrados.

Como foram encontrados valores significativos de herdabilidade no sentido amplo, porém baixos valores no sentido restrito, e como ficou evidenciado um forte efeito ambiental atuando nas populações, a determinação da concentração de proteínas totais e da concentração das proteínas de reserva destes mesmos indivíduos na geração F_4 e progenitores seria desejável na obtenção de dados mais conclusivos a respeito da melhor metodologia não destrutiva de análise para quantificar a concentração de proteína em programas de melhoramento. É preciso também ressaltar que as estimativas de herdabilidade se referem especificamente à população empregada neste trabalho, derivada do cruzamento entre uma linhagem de alta concentração protéica (48%) derivada de CAC-1 e a variedade comercial de soja Elite, não podendo ser generalizada para outras populações originadas de outros cruzamentos envolvendo outros progenitores recorrentes.

Quadro 4. Valores estimados das variâncias fenotípica (σ^2_F), ambiental (σ^2_E) e genética (σ^2_G) e das herdabilidades no sentido amplo (h^2_a) e restrito (h^2_r) para as concentrações de proteína avaliadas pelos métodos de Kjeldahl e SDS-PAGE/densitometria (população F_2 , F_3 e progenitores) e do ácido bicinconínico (população F_2 e progenitores). Proteínas de reserva (11S+7S), glicinina (11S), -conglucina (7S), método do ácido bicinconínico (BCA), método de Kjeldahl (K).

	SDS-PAGE/densit.			SDS-PAGE/densit.			BCA(F ₂)	K(F ₂)	K(F ₃)
	(F ₂)			(F ₃)					
	11S+7S	7S	11S	11S+7S	7S	11S			
S ² _F	17,40	6,71	3,82	6,94	0,384	4,70	11,97	4,93	6,26
*S ² _{P1}	7,18	0,783	3,40	1,11	0,067	1,05	9,56	1,78	1,47
*S ² _{P2}	9,77	1,97	4,12	3,70	0,139	2,94	4,72	2,42	2,15
S ² _E	8,63	1,45	3,80	2,50	0,106	2,06	6,65	2,16	1,89
S ² _G	8,76	2,38	2,91	4,44	0,278	2,64	5,32	2,77	4,37
h ² _a	0,505	0,621	0,434	0,621	0,724	0,561	0,444	0,562	0,698
h ² _r	0,0514	0,0702	0,0279	-	-	-	0,0187	0,0714	-

* Estimativa da variância da concentração de proteína nos progenitores 1 e 2, usada na estimativa da variância ambiental.

- Valores não determinados.

Quadro 5. Análise de variância realizada sobre as médias da concentração protéica, quantificada pelo método de Kjeldahl, dos dois progenitores (variedade Elite e isolinha derivada de CAC-1) nas duas épocas de plantio (verão e inverno).

FV	GL	QM	F
Genótipo	1	659,9378	337,43**
Ambiente	1	498,4975	258,41**
Genótipo X ambiente	1	209,1845	108,44**
Resíduo	32	1,9291	

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

4.5. Correlações

As estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson e Spearman entre as metodologias de determinação da concentração protéica usadas neste trabalho, referentes às populações F_2 e F_3 , estão apresentadas no Quadro 6.

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

Os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman entre as concentrações de proteína na população F_2 determinadas pelos métodos BCA e Kjeldahl foi de 0,131 e 0,385, respectivamente (Quadro 6). Considerando que o método de Kjeldahl é o método considerado padrão para análise da concentração de proteínas em grãos, pode-se concluir que o método do ácido bicinonínico (BCA) não proporcionou valores confiáveis para a concentração de proteína, pois apresentou correlação muita baixa com o método de Kjeldahl. Também, o baixo valor para a correlação de Spearman indica baixa concordância entre os métodos, ou seja, poucos dos indivíduos que apresentaram maior concentração protéica pelo método BCA coincidem com os indivíduos que apresentaram maior concentração protéica pelo método de Kjeldahl. As concentrações das proteínas de reserva e a concentração de proteínas totais determinado pelo método BCA também não apresentaram correlação, sendo que os valores dos coeficientes de Pearson foram 0,025 (11S+7S), -0,002(11S) e 0,05(7S) e os coeficientes de Spearman foram 0,251(11S+7S), 0,29(11S) e 0,134(7S).

Os valores dos coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre as concentrações das proteínas 7S e 11S com a concentração de proteína total determinada pelo método de Kjeldahl na população F_2 , 0,207 e 0,156, respectivamente, diferiram daqueles encontrados por FEHR *et alli* (2003). Estes autores obtiveram coeficientes de correlação entre as concentrações de 7S e 11S com os concentração total de proteína de -0,34 e 0,37, respectivamente. Apesar da diferença numérica, ambos resultados foram baixos e não significativos. O fato de não haver uma correlação significativa entre as concentrações das proteínas de reserva 7S e 11S com a concentração total de proteína na semente torna possível a seleção de cultivares com conteúdos variados de 7S e 11S e com concentrações de proteína total similares, o que seria uma vantagem para a produção de produtos a base de soja que requerem cultivares com alta concentração de proteína e com composições variadas das frações 7S e 11S.

Coeficientes de correlação de Pearson positivos e elevados foram encontrados neste trabalho entre os concentrações de 7S e 11S na população F_2 (0,679) e F_3 (0,69) (Quadro 6), contrastando com o valor encontrado por FEHR *et alli* (2003), os quais encontraram um coeficiente de correlação de -0,92 entre as concentrações de 7S e 11S determinadas em 14 cultivares. Este contraste é explicado pelas características dos cultivares analisados por estes autores. Como

exemplo, um destes cultivares foi o Vinton 81, que é considerado um excelente cultivar para produção do “tofu”, importante produto fabricado a base de extrato protéico de soja. O Vinton 81 apresenta alta relação 11S/7S, como também outros cultivares usados na análise, o que contribuiu para a alta e negativa correlação entre as frações 7S e 11S, encontrada pelos autores citados.

Observa-se no Quadro 6 que os valores dos coeficientes de correlação de Spearman entre as concentrações das frações 7S e 11S com a concentração de proteína total determinada pelo método de Kjeldahl na população F_2 , foram 0,582 e 0,52, respectivamente. Para a soma (7S+11S) o valor foi de 0,621. Esses valores relativamente altos e positivos para os coeficientes de correlação de Spearman indicam que boa parte daqueles indivíduos que apresentaram maiores concentrações de proteínas totais determinada pelo método de Kjeldahl apresentaram também as maiores concentrações das frações 7S e 11S. As concentrações das frações 7S e 11S também apresentaram um alto coeficiente de correlação de Spearman (0,66). Este resultado é similar ao encontrado por YAKLICH (2001), o qual determinou as concentrações das frações 7S e 11S em linhagens com altas concentrações de proteína e concluiu que estas linhagens apresentam um acúmulo maior de ambas as frações de proteínas de reserva em suas sementes.

Pode-se observar no Quadro 6 que na população F_3 os valores do coeficiente de correlação de Pearson e de Spearman obtidos entre as concentrações das frações 7S e 11S com a concentração de proteínas totais determinada pelo método de Kjeldahl foram similares aos da população F_2 , respectivamente 0,639 e 0,525 (11S+7S), 0,625 e 0,524(11S); 0,531 e 0,422 (7S). Entre as concentrações das proteínas 7S e 11S o coeficiente de correlação de Pearson foi igual a 0,69 e o de Spearman foi 0,682.

Os valores elevados dos coeficientes de correlação de Spearman e de Pearson obtidos entre as porcentagens de 7S e 11S com a concentração de proteínas totais da semente indicam que a seleção de indivíduos com alta concentração de proteínas totais, determinada pelo método de Kjeldahl, na população F_2 , leva também à seleção de indivíduos com alta concentração das proteínas de reserva 7S e 11S. Este resultado é interessante para o melhoramento uma vez que indica que linhagens com alta concentração de proteína obtidas em programas de melhoramento terão também qualidades similares às linhagens

normais no que se refere à concentração de aminoácidos sulfurados, pois não ocorre maior acúmulo da fração 7S em relação à 11S.

Os resultados encontrados para os coeficientes de correlação de Spearman entre as concentrações das proteínas 7S e 11S da população F_2 com as concentrações destas proteínas da população F_3 não foram muito satisfatórios (Quadro 6). Os pequenos e negativos coeficientes que constam no Quadro 5 indicam que a seleção para maiores concentrações, avaliadas por SDS-PAGE/densitometria, de glicinina (11S), de β -conglucina (7S) ou de ambas, não seria eficiente em gerações precoces do cruzamento analisado. O mesmo pode ser concluído para a concentração de proteínas totais avaliada pelo método de Kjeldahl. Como pode ser observado no Quadro 6, o coeficiente de correlação de Spearman entre a concentração de proteínas totais na população F_2 e na população F_3 determinada pelo método de Kjeldahl foi de 0,16.

Pelos resultados encontrados nas condições experimentais relatadas pode ser afirmado que a seleção em gerações precoces para concentrações de proteína total e de proteínas de reserva no cruzamento analisado não seria eficiente. Portanto, como já ressaltado anteriormente, seria desejável a determinação das concentrações protéicas e das concentrações das proteínas de reserva da população F_4 deste cruzamento e dos progenitores e se possível estudar populações derivadas de outros cruzamentos, visando a obtenção de dados mais conclusivos a respeito da confiabilidade dos métodos BCA e SDS-PAGE/densitometria na quantificação da concentração de proteínas totais e proteínas de reserva em programas de melhoramento.

Quadro 6. Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman entre as metodologias utilizadas na determinação da concentração de proteínas em sementes nas populações F₂ e F₃. BCA (Método do Ácido Bicinconínico), 11S, 7S e 7S+11S (SDS-PAGE/densitometria), Kjeldahl (Método de Kjeldahl adaptado).

Metodologias	Correlação de Pearson	Correlação de Spearman
BCA(F ₂) X Kjeldahl(F ₂)	0,131	0,385*
(11S+7S)(F ₂) X Kjeldahl(F ₂)	0,195	0,621*
11S(F ₂) X Kjeldahl(F ₂)	0,156	0,582*
7S(F ₂) X Kjeldahl(F ₂)	0,207	0,520*
(11S+7S)(F ₂) X BCA(F ₂)	-0,025	0,251*
11S(F ₂) X BCA(F ₂)	-0,002	0,290*
7S(F ₂) X BCA(F ₂)	-0,050	0,134
(11S+7S)(F ₃) X Kjeldahl(F ₃)	0,639*	0,525*
11S(F ₃) X Kjeldahl(F ₃)	0,625*	0,524*
7S(F ₃) X Kjeldahl(F ₃)	0,531*	0,422*
7S(F ₂) X 11S(F ₂)	0,679*	0,660*
7S(F ₃) X 11S(F ₃)	0,690*	0,682*
(11S+7S)(F ₂)X(11S+7S)(F ₃)	-0,176	-0,207
7S(F ₂)X7S(F ₃)	-0,144	-0,194
11S(F ₂)X11S(F ₃)	-0,158	-0,164
Kjeldahl(F ₂)X Kjeldahl(F ₃)	-0,046	0,160

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

5. Resumo e Conclusões

O desenvolvimento de novas variedades de soja que associem alta produtividade, elevado teor protéico e melhor qualidade nutricional se faz necessário para que o Brasil, o segundo maior produtor mundial desta leguminosa, mantenha e até aumente a sua competitividade no mercado internacional. O melhoramento desta leguminosa para alto teor de proteína na semente e boa produtividade já está sendo conseguido por vários grupos de pesquisadores no Brasil e em outros países como Estados Unidos e Japão. Quanto à qualidade protéica do grão, principalmente no que se refere à concentração de aminoácidos sulfurados, pouco sucesso tem sido relatado na literatura. Alguns autores sugerem que maiores concentrações de aminoácidos sulfurados podem ser obtidas produzindo-se cultivares que apresentem uma maior relação 11S/7S, pois a fração 7S contém menor teor de metionina e cisteína do que a fração 11S.

O uso de metodologias de análise da concentração de proteínas que não destruam o poder germinativo da semente permite que se selecione aqueles indivíduos que apresentem as características desejadas, o que agiliza bastante um programa de melhoramento. Sendo assim, este trabalho buscou comparar metodologias não destrutivas de análise da concentração de proteínas visando selecionar a que proporcionaria a maior herdabilidade para ser aplicada em programas de melhoramento para quantidade e qualidade de proteína em soja. Uma destas metodologias estudadas, baseada na separação eletroforética e análise quantitativa por densitometria das proteínas de reserva da soja, contidas nas frações 7S e 11S, poderá ser aplicada num programa de melhoramento que visa aumentar geneticamente a concentração de proteínas de melhor qualidade nutricional nos grãos desta leguminosa.

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

- A maior estimativa de herdabilidade no sentido amplo para concentração de proteínas totais na geração F_2 foi obtida quando a quantificação foi realizada pelo método de Kjeldahl (56,2%). Para as proteínas de reserva as estimativas foram de 62,1% para a concentração de 7S, 43,4% para a concentração de 11S e 50,5% para a soma da concentração das duas frações, indicando que a

metodologia SDS-PAGE/densitometria poderá ser útil no desenvolvimento de linhagens com alto teor de aminoácidos sulfurados;

- As herdabilidades no sentido restrito apresentaram baixos valores para todas metodologias, variando de 1,87 a 7,14%;
- Os coeficientes de correlação de Spearman entre as concentrações das frações 7S e 11S com a concentração de proteínas totais determinada pelo método de Kjeldahl, que foram significativos e positivos nas duas gerações, F_2 e F_3 , indicaram que linhagens com alta concentração de proteínas totais contêm também altas concentrações das frações 7S e 11S;
- Os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman entre as concentrações de proteína na população F_2 determinadas pelos métodos BCA e Kjeldahl foram de 0,131 e 0,385, respectivamente, que indicaram baixa correlação e baixa coincidência entre os dois métodos de quantificação de proteínas totais;
- A seleção em gerações precoces de sementes com elevada concentração de proteínas totais e também de sementes com elevada concentração das frações 11S ou 7S não seria eficiente para o cruzamento estudado.

6. Referências Bibliográficas

- BORÉM, A. Escape Gênico. **Biotecnologia**, ano II, n.10, p.101-107, 1999.
- BRIM, C.A., COCKERHAM, C.C. Inheritance of quantitative characters in soybeans. **Crop Science**, v.1, p.187-190, 1961.
- BURTON, J.W. **Breeding soybeans for improved protein quantity and quality**. p. 361-367. In: R. SHIBLES (ed.) World Soybean Research Conference. Westview Press, Boulder, Colorado, 1985.
- BURTON, J.W.; PURCELL, A.E.; WALTER Jr., W.M. Methionine concentration in soybean protein from populations selected for increased percent protein. **Crop Science**, v.22, p.430-432, 1982.
- COATES, J.B., MEDEIROS, J.S., THANH, V.H., NIELSEN, N.C. Characterization of the subunits of β -conglucinin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.243, n.1, p.184-194, 1985.
- COCKERHAM, C.C. An extension of the concept of partitioning hereditary variance for analysis of covariances among relatives when spistasis is present. **Genetics**, v.39, p.859-892, 1954.
- COCKERHAM, C.C. Estimation of genetic variance. In: HANSON, W.D., ROBINSON, H.F. **Statistical genetics and plant breeding**. Madison: National Academy of Sciences, 1963. p.53-94.
- CRUZ, C.D. **Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 648p.
- DICKINSON, C.D.; HUSSEIN, E.H.A.; NIELSEN, N.C. Role of Posttranslational Cleavage in Glycinin Assembly, **The Plant Cell**, v.1, n.4, p.459-469, 1989.
- DIERS, B.W., BEILINSON, V., NIELSEN, N.C., SHOEMAKER, R.C. Genetic mapping of the Gy4 e Gy5 glycinin genes in soybean and the analysis of a variant of Gy4. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, n.2, p.297-304, 1994.

- ERICKSON, L.R.; VOLDENG, H.D.; BEVERSDORF, W.D. Early generations selection for protein in *Glicine max* X *Glicine soja* crosses. **Canadian Journal of Plant Science**, v.61, p.901-908, 1981.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. (Trad. de Silva, M.A.). Viçosa: UFV, 1987. 279p.
- FEHR, W.R., HOECK, J.A., JOHNSON, S.L., MURPHY, J.D.N., PADILLA, G.I., WELKE, G.A. Genotype and Environment Influence on Protein Components of Soybean. **Crop Science**, v.43, p.511-514, 2003.
- FONTES, E.P.B., MOREIRA, M.A, DAVIES, C.S. , NIELSEN, N.C. Urea-elicited changes in relative electrophoretic mobility of certain glycinin and β -conglycinin subunits. **Plant Physiology**, v.76, n.3, p.840-842, 1984.
- FREY, K.J., HORNER, T. Heritability in standard units. **Agronomy Journal**, v.49, n1, p.59-62, 1957.
- FUKUSHIMA, D. Internal structure of 7S and 11S globulin molecular in soybean proteins. **Cereal Chemistry**, v.45, p.203-224, 1968.
- HANSON, D.W., WEBER, C.R. Analysis of genetic variability from generations of plant-progeny lines in soybeans. **Crop Science**, v.2, n.1, p.63-67, 1962.
- HANSON, W.D., PROBST, A.H., CALDWELL, B.E. Evaluation of a population of soybean genotypes with implications for improving self-pollinated crops. **Crop Science**, v.7, p.99-103, 1967.
- HARADA, J.J., BARKER, S.J., GOLDEBERG, R.B. Soybean β -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes. **The Plant Cell**, v.1, n.4, p.415-425, 1989.
- HARADA, K.; TOYOKAMA, Y.; KITAMURA, K. Genetic analysis of the most acidic 11S globulin subunit and related characters in soybean seeds. **Japan Journal of Breeding**, v.33, p.23-30, 1983.

- HARTWIG, E.E.; EDWARDS Jr., C.J. **Evaluation of Soybeans germoplasm maturity group V to X**. Stoneville, Delta Branch Experiment Station, 1975, 126p.
- HILL, J.E., BREIDENBACH, R.W. Protein of soybean seeds. **Plant Physiology**, v.53, n.5, p.742-746, 1974.
- HORNER, T.W., WEBER, C. Theoretical and experimental study of self fertilized populatiuons. **Biometrics**, v.12, p.404-416, 1956.
- HUGHES, S.A.; MURPHY, P.A. Varietal influence on the quality of glycinin in soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.31, p.376-379, 1983.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo: 1985. v.1, 533p.
- ISHIGE, T. Biometrical analysis and estimation of the number of genes for seed protein content of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. **Japan Agricultural Research Quartely**, v.17, p.230-235, 1984.
- JOHNSON, H.W., BERNARD, R.L. Soybean genetics and breeding. In: NORMAN, A.G. (Ed.). **The soybean genetics, breeding, physiology, nutrition, management**. New York: Academic Press, 1963. p.1-73.
- KAIZUMA, N.; FUKUI, J. Breeding for chemical quality of soybean in Japan. **Tropical Agricultural Reserch**, v.6, p. 55-68, 1975.
- KAIZUMA, N.; TAIRA, H.; TAIRA, H.; FUKUI, J. On the varietal differences and heritabilities for seed protein percentage and sulfur-containing amino-acid, contents in cultivated soybeans, *Glicine max* Merril. **Japan Journal of Breeding**, v.24, p.81-87, 1974.
- KITAMURA, K., DAVIES,C.S., NIELSEN, N.C. Inheritance of alleles for *Ggy1* and *Gy4* storage protein genes in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.68, n.3, p.253-254, 1984.

- KITAMURA, K.; KAIZUMA, N. Mutant strains with low level of subunits of 7S globulin in soybean (*Glycine max* Merr.) seed. **Japan Journal of Breeding**, v.31, p.353-359, 1981.
- KROBBER, O.A.; CARTTER, J.L. Relation of methionine content to protein levels in soybean. **Cereal Chemistry**, v.43, p.320-325, 1966.
- KWANYUEN, P.; PANTALONE, V.R.; BURTON, J.W.; WILSON, R.F. A new approach to genetic alteration of soybean protein composition and quality. **JAACS**, v.74, n.8, p.983-987, 1997.
- KWON, S.H., TORRIE, J.H. Heritability and interrelationships among traits of two soybean populations. **Crop Science**, v.4, n.2, p.196-198, 1964.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LEE, W.B., WANG, J.L. Comparison of inheritance of several agronomic characters between *Glycine max* X *G. soja*, *G. max* X *G. gracilis*, and *G. max* X *G. max*. **Soybean Genetic Newsletter**, v.13, p.59-61, 1986.
- LEI, M.G.; REECK, G.R. Two-Dimensional Electrophoretic Analysis of the Proteins of Isolated Soybean Protein Bodies and of the Glycosylation of Soybean Proteins, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.35, p.296-300, 1987.
- MAHAMUD, I., KRAMER, H.H. Segregation for yield, height, and maturity following a soybean cross. **Agronomy Journal**, v.43, n.3, p.605-609, 1951.
- McKENDRY, A.L., MCVETTY, P.B.E., VOLDENG, H.D. Inheritance of seed protein and seed oil content in early maturing soybean. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.27, p.603-607, 1985.
- MORAIS, A.A.C., DA SILVA, A.L. **Soja: Suas Aplicações**, Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 1996, 260p.

- MOREIRA, M.A., HERMADSON, M., LARKINS, B.A. Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. **Journal of Biological Chemistry**, v.254, n.20, p.9921-9926, 1979.
- MOREIRA, M.A., HERMADSON, M., LARKINS, B.A., NIELSEN, N.C. Comparison of the primary structure of the acidic polypeptides of glycinin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.210, n.2, p.636-642, 1981.
- NAOE, L.K. **Parâmetros Genéticos Estimados em Populações Segregantes de Cruzamentos entre Progenitores Divergentes de Soja**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 91p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- NIELSEN, N.C., DICKINSON, C.D., CHO, T-J, THANH, V.H., SCALLON, B.J., FISCHER, R.L., SIMS, T.L., DREWS, G.N., GOLDEBERG, R.B. Characterization of the glycinin gene family in soybean. **The Plant Cell**, v.1, n.3, p.313-328, 1989.
- PIOVESAN, N.D. **Aplicação de Cruzamentos Dialélicos no Melhoramento Genético da concentração Protéico em Soja**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 91p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- PULCINELLI, C.E. **Herança da concentração de proteína em soja**. Piracicaba: ESALQ, 1992. 67p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1992.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; ZIMMERMANN, M.J.O. **Genética Quantitativa em Plantas Autógamas: Aplicações ao melhoramento do Feijoeiro**, Goiânia: Editora UFG, 1993, 272p.
- RIBEIRO Jr., J.I. **Análises Estatísticas no SAEG**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 302p.
- SHORTER, R., BYTH, D.E., MUNGOMERY, V.E. Estimates of selection parameters associated with protein and oil content of soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.28, p.211-222, 1976.

- SINGH, L., HADLEY, H.H. Maternal and cytoplasmic effects on seed protein content in soybeans, *Glicine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v.12, p.583-585, 1972.
- SMITH, A.K., CIRCLE, S.J. **Soybeans: chemistry and technology**. Madison: Avi, 1978. 470p.
- SMITH, J.D., KINMAN, M.L. The use of parent-offspring regression as an estimator of heritability. **Crop Science**, v.5, n.6, p.595-596, 1965.
- SMITH, P.K.;KROHN, R.I.;HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, **Analytical Biochemistry**, v.150, p.76-85, 1985.
- STASWICK, P.E., HERMODSON, M.A., NIELSEN, N.C. Identification of the acidic and basic subunits complexes of glycinin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.256, n.6, p.8752-8755, 1981.
- STRICKBERGER, M.W. **Genetics**. New York: The McMillan, 1985. 842p.
- TAIRA, H.; TAIRA, H. Influence of location on the chemical composition of soybean seeds. III Protein component content by disc eletrophoresis. **Proc. Crop. Sci. Soc. Japan**, v.41, p.235-243, 1972.
- TAIRA, H.; TAIRA, H.; KAIZUMA, N.; FUKUI, J. Varietal differences of seed weight, protein and sulfur containing amino acid content of soybean seed. **Proc. Crop. Sci. Soc. Japan**, v.45, p.381-393, 1976.
- THANH, V.H., SHIBASAKI, K. Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.490, n.2, p.370-384, 1977.
- VELLO, N.A.; HIRAMOTO, D.M.; AZEVEDO FILHO, A.J.B.V. Coefficient of parentage and breeding of Brazilian soybean germplasm. **Revista Brasileira de Genética**, v.11, p.679-697, 1988.

WARNER, J.N. A method for estimating heritability. **Agronomy Journal**, v.44, n.2, p.427-430, 1952.

WILCOX, J.R. Increasing seed protein in soybean whit eight cycles of recurrent selection. **Crop Science**, v. 38, p.1536-1540, 1998.

WILCOX, J.R., SIMPSON Jr.,A.M. Performance of reciprocal soybean hybrids. **Crop Science**, v.17, p.351-352, 1977.

WOLF, W.J. **Food Proteins**, AVI Publishing Company, Westport, Connecticut, 1977, 603p.

YAKLICH, R. beta-Conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.2, 2001, p 729-735.