

LUCIMARA CHIARI

**HERANÇA DO TEOR DE ISOFLAVONAS EM SEMENTES
DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

LUCIMARA CHIARI

HERANÇA DO TEOR DE ISOFLAVONAS EM SEMENTES
DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

APROVADA: 3 de abril de 2003.

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof. José Marcelo Soriano Viana

Prof. Valterley Soares Rocha

Dr. Ivan Schuster

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pela vida.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade concedida.

Ao Curso de Genética e Melhoramento. Todos os seus representantes, em especial ao ex-Coordenador Professor Paulo Sávio Lopes e atual Coordenador Professor Cláudio Horst Bruckner.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO. Seus profissionais (funcionários e professores) e estudantes (da pós-graduação e da graduação).

Ao Departamento de Biologia Geral.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros (Orientador), com toda a minha admiração, pela orientação e amizade, pela confiança, pelos conselhos e apoio que foram indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira (Conselheiro), pelos conselhos e pelo seu exemplo de profissionalismo e dedicação ao trabalho.

À Professora Elza Fernandes de Araújo (Conselheira), pelas excelentes aulas que sem dúvida passam muito mais que ensinamentos, possibilitando a formação de pesquisadores capacitados.

Ao Dr. Ivan Schuster, pela pouca, mas excelente convivência quando cheguei a Viçosa, sempre um exemplo profissional e pessoal.

Ao professor José Marcelo Soriano Viana pelo auxílio nas análises e interpretação dos dados biométricos.

Aos membros da banca de defesa de tese: Prof. Maurilio Alves Moreira, Prof. José Marcelo Soriano Viana, Dr. Ivan Schuster e Prof. Valterley Soares Rocha, agradeço pelas sugestões e colaboração.

Aos Professores Sebastião Tavares de Rezende e Valéria Monteze Guimarães, pela amizade, conselhos e pela força para desenvolver com garra e alegria o meu trabalho.

A todos os professores e colegas do curso de Genética e Melhoramento.

À Dr^a Arlete Parrilha Sendra pelas correções do português e pelas palavras de incentivo.

Aos amigos Newton Deniz Piovesan e Lucas Koshy Naoe, pela amizade, pela assessoria nas análises e também na interpretação dos resultados e pela agradável convivência.

A amiga Inês Chamel José, pela amizade, pelos conselhos e ensinamentos.

A Rita Maria Alves de Moraes e Gerardo D. L. Cervigni, companheiros de Seminário e Defesa de Tese, pelo apoio e colaboração.

Aos colegas dos laboratórios com os quais tive o prazer de trabalhar e conviver ao longo desses quatro anos: Laboratório de Análises Bioquímicas: Angélica, Anna Cristina, Carlos, Daniel, Inês, Jander, Lília, Marcelo, Maria Cristina, Maria Isaura, Rita, Simone, Tadeu, Tião e Valéria. Laboratório de Genética Molecular de Plantas (BIOMOL): Abelmon, Andréia, Arlindo, Beatriz, Cândida, Cíntia, Demerson, Fernanda, Francisco, Fábio, Gerardo, João Paulo, Júlio, Klever, Luciano, Lucinete, Luciane, Marcelo, Márcia Flores, Marcinha, Magda, Marcinho, Pedro Ivo, Reginaldo, Taís, Telma, Thiago, Vagner, Vilmar.

As meninas que trabalharam como minhas estagiárias e que foram tão amigas e prestativas: Maria Andréia, Sabrina e em especial a Cíntia.

A minha amiga e companheira de república: Maria Fernanda S. Salla, pela amizade e excelente convivência.

As amigas: Flávia Antunes, Paula C. Silva e Silvane Vestena. “Viçosa não teria sido a mesma sem vocês”.

Aos demais amigos e colegas de Viçosa que, certamente, ficarão em minhas lembranças, entre eles: Ângela, Viviane, Paula, Neuci, Bruno, Filipe, Fred, Leandro Diniz, Luís Eduardo e Luís Felipe, Robinho.

Ao casal amigo Lucinete R. Colombo e Walder Antônio Gomes de Albuquerque Nunes e a minha afilhada Mariana, com todo carinho.

As pessoas mais importantes na minha vida, meus familiares: José Carlos, Maria de Lourdes, Edilaine, Adriana, Júnior e Eduardo. Pelo apoio constante, compreensão, convivência e pelo imenso amor que me dedicam.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente participaram para que este trabalho pudesse ser realizado.

BIOGRAFIA

LUCIMARA CHIARI, filha de José Carlos Chiari e Maria de Lourdes Messa Chiari, nasceu em Jaú, Estado de São Paulo, aos 14 de junho de 1972.

Cursou o primeiro grau e parte do segundo grau em Jaú (SP) e terminou o segundo grau em Barra Bonita (SP).

Em março de 1996, graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina, Estado do Paraná.

Em março de 1997, concluiu o Bacharelado em Ciências Biológicas, também pela Universidade Estadual de Londrina (PR).

Neste mesmo ano, 1997, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na mesma instituição, tendo defendido tese em 26 de fevereiro de 1999.

Em abril de 1999, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em 3 de abril de 2003.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Isoflavonas – Considerações Gerais.....	3
2.2. Fatores que Afetam os Teores de Isoflavonas em Sementes de Soja.....	5
2.3. Herdabilidades e Correlações entre Características.....	7
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
CAPÍTULO 1 - ESTUDOS BIOMÉTRICOS DO TEOR DE ISOFLAVONAS EM SEMENTES DE SOJA.....	14
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1. Material Genético e Cruzamentos.....	20
2.2. Extração e Quantificação das Isoflavonas em Sementes de Soja	21
2.3. Estudo do Efeito do Genótipo e do Citoplasma Maternos Sobre os Teores das Isoflavonas.....	22
2.4. Análise de Médias de Gerações.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
3.1. Detecção e Seleção das Isoflavonas.....	27
3.2. Efeito do Genótipo e do Citoplasma Maternos Sobre os Teores das Isoflavonas.....	29
3.3 Análise de Médias de Gerações.....	32
4. CONCLUSÕES.....	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
CAPÍTULO 2 – ESTIMATIVAS DE HERDABILIDADES E CORRELAÇÕES ENTRE TEORES DE ISOFLAVONAS E DE PROTEÍNA EM SEMENTES DE SOJA.....	43

RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1. Material Genético e Cruzamentos.....	48
2.2. Extração e Quantificação das Isoflavonas de Sementes de Soja...	48
2.3. Análise do Teor de Proteína.....	49
2.4. Variâncias Fenotípicas, Genotípicas e de Ambiente nas Progênes F₃.....	50
2.5. Covariâncias Fenotípicas, Genotípicas e de Ambiente nas Progênes F₃....	51
2.6. Herdabilidades nas Progênes F₃.....	51
2.7. Correlações Fenotípicas, Genotípicas e de Ambiente nas Progênes F₃.....	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.1. Detecção e Seleção das Isoflavonas.....	54
3.2. Estimativas de Herdabilidades nas Progênes F₃.....	57
3.3. Correlações entre Características nas Progênes F₃.....	58
4. CONCLUSÕES.....	61
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

RESUMO

CHIARI, Lucimara, D. S. Universidade Federal de Viçosa, abril 2003. **Herança do Teor de Isoflavonas em Sementes de Soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Maurilio Alves Moreira e Elza Fernandes de Araújo.

Os efeitos benéficos à saúde associados às isoflavonas da soja incluem a atenuação dos sintomas da menopausa, redução da osteoporose, melhora dos níveis de colesterol do sangue, diminuição do risco de certos tipos de câncer e de doenças coronarianas. Os teores e a composição de isoflavonas variam de acordo com a parte morfológica da semente de soja (cotilédone, hipocótilo e tegumento); e, também, em função do genótipo e das condições ambientais. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar os efeitos do genótipo do embrião, do genótipo nuclear e citoplasmático da planta-mãe, bem como os mecanismos de ação gênica e grau de dominância para a característica teor de isoflavonas em sementes de soja; estimar herdabilidades e correlações entre as formas de isoflavonas encontradas e entre cada forma e a característica teor de proteína. Para isso, foram estudadas populações derivadas dos cruzamentos recíprocos entre IAC-100 (alto teor de isoflavonas) e BARC-8 (baixo teor de isoflavonas), obtidas no verão de 2000/2001. Os teores das isoflavonas foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência e o teor protéico pelo método de Kjeldahl. Foram analisados três contrastes para verificar efeitos de dominância, citoplasmático e materno. O efeito citoplasmático foi testado juntamente com os efeitos epistáticos entre genes citoplasmáticos e nucleares pela análise de variância (ANOVA) do modelo genético $Y_{ijk} = m + n_j + c_i + (cn)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$. Em que: Y_{ijk} = valor observado no citoplasma i no núcleo j na repetição k ; m = média geral; c_i = efeito do i -ésimo citoplasma; n_j = efeito do j -ésimo núcleo e; $(cn)_{ij}$ = efeitos epistáticos entre os genes citoplasmáticos e nucleares; ε_{ijk} = erro experimental. Os componentes de médias foram estimados utilizando dois modelos genéticos, um com e outro sem interação epistática citoplasma x núcleo, utilizando o método dos quadrados mínimos ponderados. A importância relativa de cada componente genético foi avaliada pelo método de eliminação de Gauss. Seis formas de isoflavonas foram detectadas nas sementes de soja: daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina. Glicitina e malonilglicitina não

foram significativamente contrastantes entre os progenitores. Os resultados indicam a existência de efeito materno e citoplasmático atuando sobre os teores das isoflavonas estudadas. Tais informações são relevantes nos processos de seleção para estas características, pois na presença de pelo menos um desses efeitos, a seleção praticada em sementes F_2 é inferior àquela baseada na média das plantas F_2 , ou na média de progênes. Na análise dos componentes de médias os resultados foram similares para o teor de daidzina e malonildaidzina, pois todos os parâmetros foram significativos pelo teste t e o efeito citoplasmático foi o de maior importância relativa. Porém, para o teor de genistina, os efeitos aditivos, de desvio de dominância e de interação citoplasma x dominância não foram significativos e o efeito citoplasmático foi o efeito mais importante. Já para o teor de malonilgenistina os parâmetros genéticos significativos foram: efeitos aditivos e epistáticos citoplasma x aditivo e citoplasma x dominante, sendo o efeito aditivo o de maior importância relativa. Tais informações podem ser úteis na escolha do melhor progenitor materno, o qual possua o melhor citoplasma, para aumentar o ganho na seleção. Devido à influência dos efeitos materno e citoplasmático sobre os teores das isoflavonas estudadas foi necessário estimar as herdabilidades para essas características com base na progênes F_3 . As sementes F_3 foram obtidas, juntamente com sementes dos progenitores, na safra 2001/2002. A herdabilidade no sentido amplo para os teores de daidzina, genistina, malonildaidzina, malonilgenistina e teor de isoflavonas totais foram superiores a 90%, sugerindo sucesso na seleção feita em gerações precoces. A herdabilidade no sentido amplo para o teor de proteína foi 33%. Os coeficientes de correlações fenotípicas entre as isoflavonas foram positivos e de grande magnitude ($>0,80$), indicando que essas características podem ser melhoradas simultaneamente. Os coeficientes de correlações fenotípicas entre as isoflavonas estudadas e o teor de proteína foram todos negativos, e entre isoflavonas totais e teor de proteína foi $-0,47$, confirmando a tendência de correlação negativa entre essas características.

ABSTRACT

CHIARI, Lucimara, D. S. Universidade Federal de Viçosa, April 2002. **Inheritance of the Isoflavone Content in Soybean Seeds (*Glycine max* (L.) Merrill).** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee members: Maurilio Alves Moreira and Elza Fernandes de Araújo.

The beneficial effects associated with isoflavone include the attenuation of the symptoms of menopause, reduction of osteoporosis, reduction on blood cholesterol levels, decrease on the risk of certain types of cancer and of coronary diseases. The objectives of this study were: to evaluate the effects of the genotype of the embryo, of the nuclear and cytoplasmic genotypes, as well as of the mechanisms of genic action and of dominance on the isoflavone contents of soybean seeds, to estimate heritabilities for the isoflavone contents in soybean seeds and to estimate correlations between total isoflavone and between each isoflavone type, and protein content. Populations derived from the reciprocals cross between BARC-8 (low isoflavone content) and IAC-100 (high isoflavone content) were produced during the summer of 2000/2001. The isoflavones content were determined by high-performance liquid chromatography and the protein content were determined by the Kjeldahl method. Three contrasts were analyzed for to verify the effects of dominance, cytoplasmic and maternal. The identified cytoplasmic effect were tested with the epistatic effects among cytoplasmic genes and nuclear genes by the analysis of variance (ANOVA) of the genetic model $Y_{ijk} = m + n_j + c_i + (cn)_{ij} + e_{ijk}$. In which: Y_{ijk} = value observed in the i cytoplasm in the j nucleus in the k repetition; m = general average; c_i = effect of the i -th cytoplasm; n_j = effect of the j -th nucleus and; $(cn)_{ij}$ = epistatic effects between cytoplasmic and nuclear genes, e_{ijk} = experimental error. The study of the components of means considered two genetic models, one with and the other without interaction cytoplasm x nucleus. The genetic components of the means were estimated by the weighted least square method squares and the relative importance of each genetic effect was evaluated by the Gauss elimination method. Six isoflavone kinds were detected: daidzin, genistin, glycitin, malonyldaidzin, malonylgenistin and malonylglycitin. Glycitin and malonylglycitin were not significantly contrasting among the progenitors. The results indicate the existence of maternal and cytoplasmic effects on the determination of

isoflavone contents in soybean seeds. Such information is important for breeders during the processes of selection for high isoflavone contents, because in the presence of at least one of these effects, the success of the selection in F₂ seeds is lower than that based on the average of the F₂ plants, or on the average of the progenies. The resulted of the genetic components of the means were similar to daidzin and malonyldaidzin contents, all the parameters were significant by the t test and the cytoplasmic effect was the most important one. However, for genistin content the additive effects, of dominance deviation and of interaction cytoplasm x dominance were not significant and the cytoplasmic effect and of interaction cytoplasm x nucleus were the first and the second, respectively, most important effects. For malonylgenistin content the genetic parameters significant were: the additive effects and of epistatic effects (cytoplasm x additive and cytoplasm x dominant). The additive effect was the one with the largest relative importance. Such information is especially important during the choice of the best maternal progenitor, with the best cytoplasm and interaction of the cytoplasm with the nucleus, increasing the probability of gain in the selection process. Due to the maternal and cytoplasmic effects on isoflavone contents it was necessary to estimate the heritability for that characteristic based on F₃ progenies. Heritability estimates for daidzin, genistin, malonyldaidzin, and malonylgenistin contents and for total isoflavone contents were superior to 90%, indicating a high probability of success in the selection in early generations. Heritability for protein content was 33%. The correlations coefficients for the kinds isoflavones were positives and of high magnitude (>0.80) among them, indicating that such characteristics can be breeding simultaneously. The correlations coefficients between isoflavone contents and protein contents were all negative. The phenotypic correlation between these characteristics was -0.47, agreeing with the literature.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Originária da China, a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é um dos produtos agrícolas que sofreu maior expansão no seu cultivo no Brasil e no mundo devido, principalmente, à excelente combinação que apresenta entre produtividade, normalmente acima de duas toneladas por hectare, e teores de proteína e óleo no grão, em torno de 40% e 20%, respectivamente. Essa combinação contribuiu para a formação de um vasto complexo agro-industrial destinado ao processamento dos produtos derivados da soja.

Mais recentemente a soja vem sendo reconhecida também por possuir diversos componentes biologicamente ativos, destacando-se entre os alimentos funcionais mais estudados. Possui um papel preventivo e terapêutico em diversas doenças crônicas. Alguns de seus componentes, tais como as isoflavonas, as saponinas e os inibidores de proteases, são tidos como responsáveis por essas propriedades.

As isoflavonas estão presentes em grandes quantidades em sementes de soja. Os efeitos benéficos à saúde atribuídos a elas incluem: redução de doenças cardiovasculares, redução da osteoporose, alívio dos sintomas da menopausa e redução do risco para certos tipos de câncer como os de mama, pulmão, cólon, reto, estômago e próstata. Várias empresas no mundo inteiro já começaram a explorar comercialmente o uso desses compostos.

Os programas de melhoramento genético da soja têm dado maior ênfase à produtividade, resistência a doenças e adaptabilidade. Os programas que visam o desenvolvimento de cultivares de melhor qualidade nutricional têm se concentrado no aumento do teor de proteínas, na alteração da composição da fração óleo e na diminuição de fatores antinutricionais das sementes. O teor de isoflavonas não tem merecido grande atenção por parte dos melhoristas até o presente, sobretudo no Brasil, onde as informações sobre esta característica são raras e pouco conclusivas.

Para dar início a um programa de melhoramento genético, informações precisas a respeito da herança das características de interesse são fundamentais. Informações referentes à influência do genótipo do embrião, do genótipo nuclear e citoplasmático da planta mãe, bem como dos mecanismos de ação gênica e grau de dominância, entre outras, são de suma importância.

Além disso, o conhecimento das estimativas de herdabilidades e de correlações entre características agronômicas é extremamente relevante nos processos de seleção em programas de melhoramento de qualquer espécie, pois possibilita a avaliação da potencialidade da população para o melhoramento e facilita as decisões de escolha do método de seleção mais adequado e eficiente.

Dentro deste contexto, os objetivos deste trabalho foram: avaliar os efeitos do genótipo do embrião, do genótipo nuclear e citoplasmático da planta mãe, bem como os mecanismos de ação gênica e grau de dominância para a característica teor de isoflavonas em sementes de soja; estimar herdabilidades; estimar correlações fenotípicas entre as formas de isoflavonas detectadas nas sementes, entre cada forma e a característica teor de proteína e entre o teor de isoflavonas totais e teor de proteína, no cruzamento entre IAC-100 (alto teor de isoflavonas) e BARC-8 (baixo teor de isoflavonas).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Isoflavonas - Considerações Gerais

As isoflavonas são fenóis heterocíclicos, com o núcleo muito semelhante aos hormônios esteróides estrogênicos, tais como o 17 β -estradiol, o que faz com que essas substâncias recebam a denominação de fitoestrógenos (Pratt e Birac, 1979).

Elas representam o maior subgrupo de isoflavonóides, com cerca de 364 formas agliconas e várias formas de glicosídeos conjugados (Dewick, 1994). As formas de isoflavonas mais conhecidas e estudadas são: genistina, daidzina, glicitina e suas formas acetiladas e maloniladas: 6''-*O*-acetilgenistina, 6''-*O*-acetildaidzina, 6''-*O*-acetilglicitina, 6''-*O*-malonilgenistina, 6''-*O*-malonildaidzina, 6''-*O*-malonilglicitina, bem como suas agliconas correspondentes, genisteína, daidzeína e gliciteína (Song et al., 1998) (Figura 1).

As isoflavonas são sintetizadas por um ramo da via dos fenilpropanóides, do metabolismo secundário, comum a via dos flavonóides até os substratos (2S) liquiritigenina e (2S) naringenina, quando ocorre a migração do anel 1,2-aril, mediada pela isoflavona sintase, a qual é a enzima chave do metabolismo das isoflavonas. Outros ramos dessa via produzem lignina e antocianina (Jung et al., 2000) (Figura 2).

Dados experimentais e clínicos têm mostrado que as isoflavonas representam uma alternativa promissora na prevenção e/ou tratamento de diversas doenças crônicas, incluindo câncer, sintomas da menopausa, osteoporose e doenças cardiovasculares (Setchell, 1998; Messina, 2000).

As evidências de que as isoflavonas, em especial a genisteína da soja, reduzem os níveis de colesterol total sanguíneo são tantas que tal efeito é atualmente informado ao consumidor norte-americano, através dos rótulos dos alimentos, conforme autorização do FDA (Food and Drug Administration, 1999.). Muitos estudos, tais como Kanazawa et al. (1995), Honoré et al. (1995) e Nilausen e Meinertz (1999) apontam para conclusões que têm sido unânimes: as isoflavonas diminuem os níveis de colesterol total, diminuem a fração LDL e aumentam a fração HDL no sangue.

Por outro lado, as isoflavonas são responsáveis pelo sabor amargo e adstringente observados na soja e nos produtos derivados. Pela ação da enzima β -glicosidase, os glicosídeos daidzina e genistina são hidrolisados, formando as agliconas daidzeína e genisteína, que têm sido relacionadas com o aumento do gosto amargo e da sensação de adstringência da soja, que limitam o consumo da mesma pelos países ocidentais (Carrão-Panizzi et al., 1999). O grande dilema da indústria de alimentos está justamente entre melhorar o gosto ou aumentar o valor nutricional dos alimentos derivados da soja (Drewnowski e Gomez-Carneros, 2000).

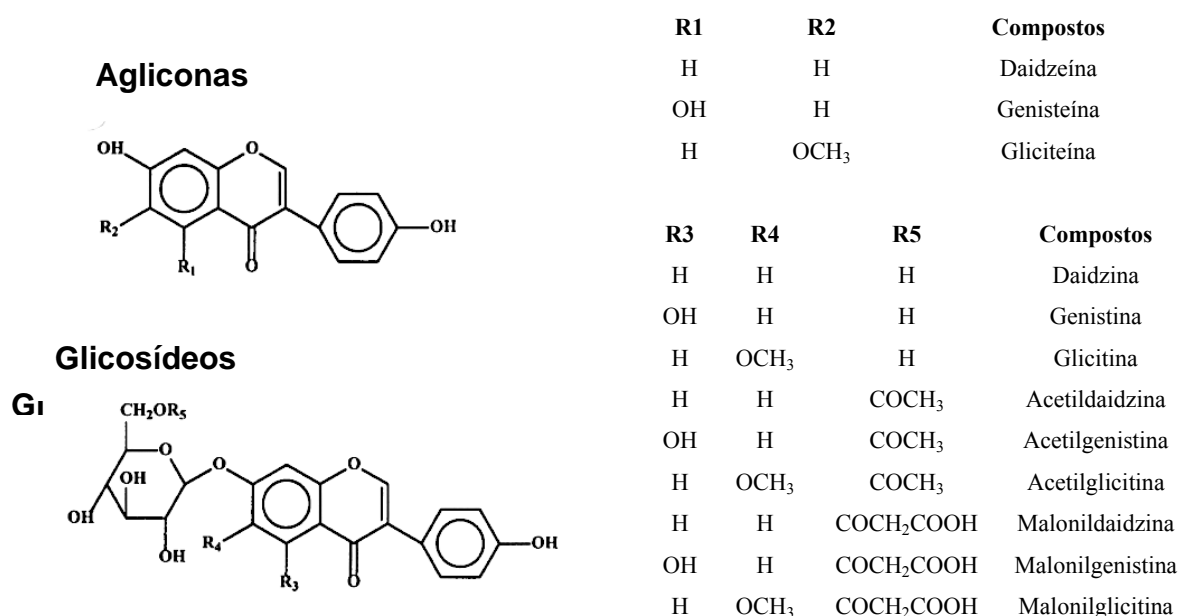


Figura 1: Estruturas químicas dos doze isômeros de isoflavonas mais estudados.

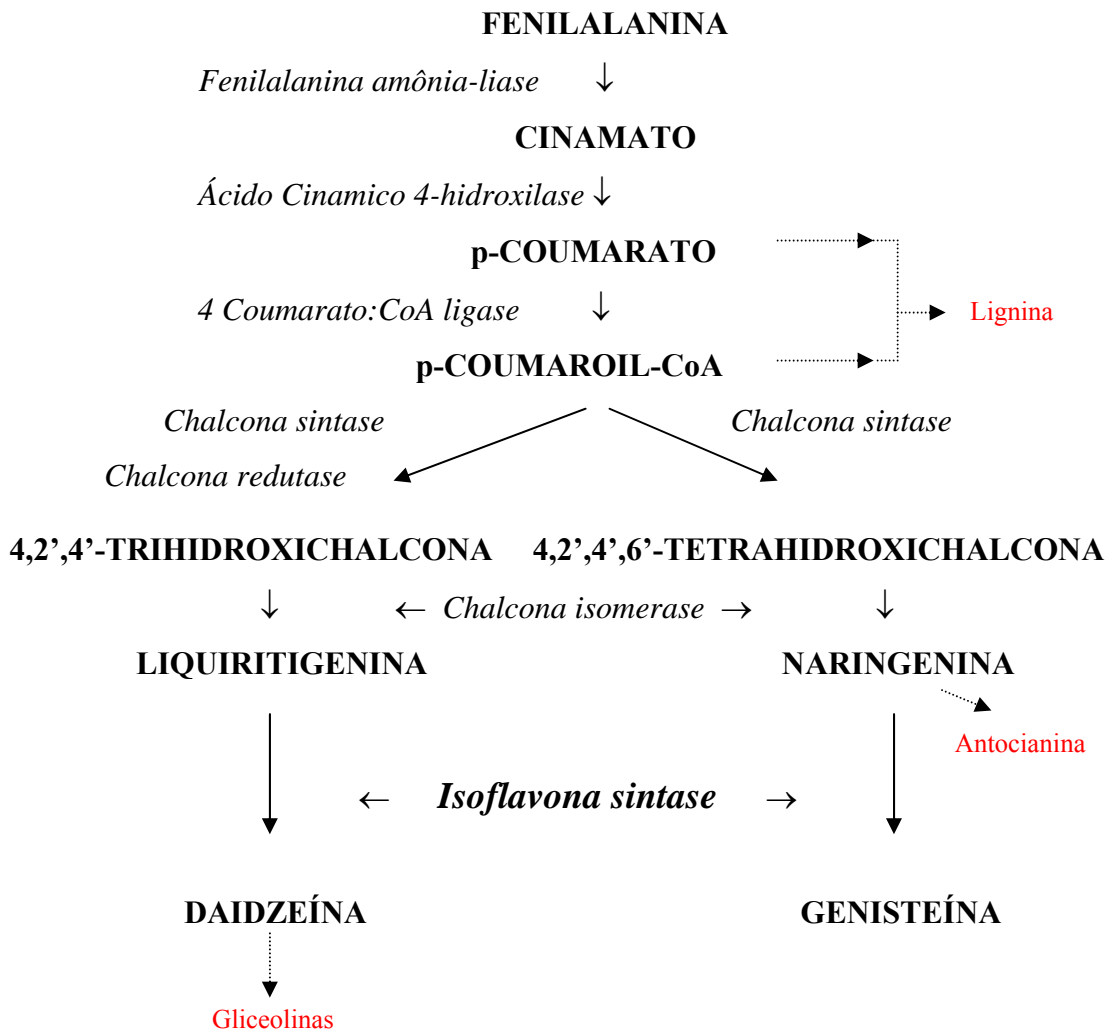


Figura 2: Diagrama simplificado da via dos fenilpropanóides, mostrando intermediários e enzimas envolvidas na síntese das isoflavonas genisteína e daidzeína. As setas pontilhadas representam múltiplos passos enzimáticos.

2.2. Fatores que Afetam o Teor e a Composição de Isoflavonas em Sementes de Soja

A soja é uma fonte rica e quase que única de isoflavonas na dieta humana. O teor de isoflavonas apresenta uma grande variabilidade em função do genótipo,

variando aproximadamente de 1–4 mg.g⁻¹ (Messina, 2000), e, também, devido a fatores ambientais, tais como temperatura, localização e ano de plantio.

Eldridge e Kwolek (1983) investigaram o efeito do genótipo e do ambiente no teor de isoflavonas em quatro variedades de soja cultivadas em quatro localidades, e observaram uma variação de 1160 a 3090 µg.g⁻¹, entre as variedades cultivadas no mesmo ambiente, e de 460 a 1950 µg.g⁻¹, entre as localidades.

Wang e Murphy (1994) mostraram que o ano de plantio tem grande influência sobre o teor de isoflavonas, pois para um único cultivar o conteúdo total de isoflavonas variou de 1176 a 3309 µg.g⁻¹ entre anos diferentes, e de 1176 a 1749 µg.g⁻¹, entre localidades diferentes dentro do mesmo ano.

Tsukamoto et al. (1995) estudaram o efeito da temperatura sobre o teor de isoflavonas em sementes de soja e mostraram que este foi significativamente mais baixo em sementes que se desenvolveram em altas temperaturas, do que aquelas expostas à baixa temperatura.

Para determinar o papel do genótipo, do ambiente e das interações genótipo x ambiente no teor total de isoflavonas e nas isoflavonas individuais presentes em sementes de soja, Hocck et al. (2000) avaliaram seis variedades comerciais, cultivadas em oito localidades durante dois anos, e mostraram que as interações genótipo x ambiente foram significativas. No entanto, concluíram que o efeito do genótipo foi o mais importante, tanto para as isoflavonas individuais, quanto para o teor total de isoflavonas. Por outro lado, Lee et al. (2002) investigaram os mesmos efeitos e concluíram que os efeitos do ambiente (ano e interação ano x localidade) e das interações genótipo x ambiente (genótipo x ano e genótipo x ano x localidade) foram as mais importantes fontes de variação para o teor de isoflavonas nas sementes.

Diferenças no teor de isoflavonas também foram observadas entre os cultivares de soja brasileiros. Carrão-Panizzi e Kitamura (1995) avaliaram 22 cultivares de diferentes grupos de maturação (precoce, intermediário e tardio) em dois anos consecutivos e encontraram ampla variabilidade entre os cultivares do mesmo grupo e de diferentes grupos de maturação e entre os anos avaliados.

Carrão-Panizzi et al. (1999) analisaram os efeitos do genótipo e dos fatores ambientais no teor de isoflavonas, nos cultivares de soja provenientes de diferentes locais do Brasil. Além das diferenças genéticas entre os cultivares, encontraram

também grande variação no teor de isoflavonas entre as diferentes localidades. Os menores teores foram observados nos locais onde as médias de temperatura eram mais elevadas.

Além do efeito do genótipo e do ambiente, o teor e composição de isoflavonas nas sementes de soja variam nas diferentes partes das mesmas (cotilédone, hipocótilo e tegumento). Kudou et al. (1991) evidenciaram que o teor de isoflavonas no hipocótilo é 5,5 a 6,0 vezes maior que nos cotilédones e que o tegumento não apresenta nenhuma forma de isoflavona. A gliciteína e seus derivados foram encontrados apenas no hipocótilo. Verificaram ainda que o acúmulo das diferentes isoflavonas varia durante o desenvolvimento das sementes de soja. As seis formas encontradas nas sementes, daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilglicitina e malonilgenistina, acumularam-se entre 35 e 60 dias após o florescimento. Porém, malonilgenistina e genistina acumularam muito mais no final do período de enchimento da semente; malonildaidzina e daidzina acumularam com uma taxa constante e malonilglicitina e glicitina mantiveram seus níveis durante todo período.

Em todos os trabalhos citados, as formas mais abundantes encontradas nas sementes de soja foram a malonilgenistina e a malonildaidzina que, em média, representam cerca de 65% do total de isoflavonas.

2.3. Herdabilidades e Correlações entre Características

A herdabilidade é um dos parâmetros genéticos mais informativos para o trabalho do melhorista. Ela fornece a proporção da variância genética presente na variância fenotípica total. Dessa forma, ela mede a confiabilidade do valor fenotípico como indicador do valor reprodutivo (Ramalho, 1993). Ela pode ser definida como herdabilidade no sentido amplo e herdabilidade no sentido restrito. A segunda considera apenas a variância genética aditiva – aquela que é fixada pela seleção – sendo evidentemente mais importante para o melhorista.

É importante observar que uma estimativa de herdabilidade refere-se a uma característica de uma população, e é específica para as condições experimentais nas quais os genótipos foram estudados. Logo, é difícil generalizar estimativas de uma

população para outra, ou para diferentes condições experimentais (Dudley e Moll, 1969), o que significa que a herdabilidade de uma certa característica não é imutável. Na realidade, a herdabilidade pode ser aumentada pela introdução de mais variação genética na população, como também estabilizando mais o ambiente no qual as plantas irão se desenvolver (Ramalho, 1993).

Devido à sua utilidade, na literatura existem várias metodologias para estimar o coeficiente de herdabilidade. A aplicação de uma metodologia que utiliza a variância entre as plantas na geração F_2 e a variância entre os progenitores foi proposta por Mahmud e Kramer (1951). Warner (1952) propôs uma metodologia para a obtenção da estimativa de herdabilidade a partir dos progenitores, gerações F_1 e F_2 e dos dois retrocruzamentos. Hanson et al. (1963) determinaram estimativas do coeficiente de herdabilidade com base nos componentes de variância.

Com o propósito de determinar a herdabilidade para as isoflavonas daidzeína, genisteína e gliciteína, Meksem et al. (2001) avaliaram 40 linhagens recombinantes endogâmicas (RIL) do cruzamento entre duas variedades que contrastavam para o conteúdo dessas isoflavonas e encontraram herdabilidades de 79% para daidzeína, 22% para genisteína e 88% para gliciteína.

Outra medida de grande valor para o melhorista é a estimativa das correlações entre características, pois mostra como a seleção de uma característica pode influenciar na expressão de outras. Os programas de melhoramento, geralmente, visam o aprimoramento de uma característica principal buscando, também, melhorar a expressão de características correlacionadas.

A correlação pode ser estimada em três níveis: fenotípico, genotípico e de ambiente. A correlação fenotípica é a associação observada diretamente entre duas características, sendo em parte de natureza genética e, em parte, causada pelo ambiente. O pleiotropismo e o desequilíbrio proporcionado pela ligação gênica são causas de correlação genética. O ambiente também é causa de correlação, quando duas características são influenciadas pelas mesmas diferenças nas condições ambientais. Se ambas as características correlacionadas possuem baixas herdabilidades, então a correlação fenotípica é determinada, principalmente, pela correlação de ambiente. Se ambos possuem altas herdabilidades, então a correlação genética é a mais importante (Falconer, 1987).

Atualmente, os programas de melhoramento genético da soja visam, além de aumentar a produtividade, melhorar a qualidade nutricional dos grãos. Nesse novo contexto, características como teor de proteína e qualidade da fração protéica dos grãos são de alta relevância. Portanto, os programas que visam melhorar uma característica importante do ponto de vista nutricional, como teor de isoflavonas, devem levar em conta os coeficientes de correlações existentes entre essa característica desejada e teor de proteína, por exemplo.

Alguns estudos, citados por Wilson (2001), relataram que embora variedades com 44% de proteína sejam boas fontes de isoflavonas, outras com conteúdos elevados de proteína (maior que 50%) apresentam baixos níveis de isoflavonas, indicando uma correlação negativa entre essas duas características.

Chamel José et al. (2002) determinaram as correlações entre o teor de isoflavonas, o teor de proteína e o teor de óleo no grão em 30 genótipos de soja provenientes do banco de germoplasma do programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV, cultivados em campo experimental da UFV, em Viçosa, MG, na safra 2000/2001, e verificaram uma correlação negativa de -0,41 entre o teor de isoflavonas e o teor de proteína e uma correlação negativa de pequena magnitude (-0,11) entre o teor de isoflavonas e teor de óleo. Esses resultados indicam a necessidade de um monitoramento simultâneo das características teor de isoflavonas e teor de proteína nos programas de melhoramento visando a qualidade nutricional da soja.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carrão-Panizzi, M.; Kitamura, K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Sci.**, v. 45, n. 3, p. 295-300, 1995.
- Carrão-Panizzi, M.; Beléia, A. D. P.; Prudêncio-Ferreira, S. H.; Oliveira, M. C. N.; Kitamura, K. Effects of isoflavones on beany flavor and astringency of soymilk and cooked whole soybean grains. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 34, n. 6, p. 1045-1052, 1999.
- Chamel José, I.; Chiari, L.; Piovesan, N. D.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Correlações entre teores de isoflavonas e de proteína e óleo de sementes de soja. *In: Anais do II Congresso Brasileiro de Soja e Mercosoja*, p. 347, 2002.
- Dewick, P. M. Isoflavonoids. In: HARBORNE, J. B. (Ed.). **The flavonoids: advances in search since 1986**. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London, 1994, p. 117-238.
- Drewnowski, A.; Gomez-Carneros, C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 1424-1435, 2000.
- Dudley, J. M.; Moll, R. H. Interpretation and use of estimates of heritability and genetics variances in plant breeding. **Crop Sci.**, v. 9, n. 3, p. 257-262, 1969.
- Eldridge, A. C.; Kwolek, W. F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 31, p. 394-396, 1983.
- Falconer, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1987. 279 p.
- Food and Drug Administration. Food labeling, health claims, soy protein, and coronary heart disease. **Fed Reg.**, v. 57, p. 699 – 733, 1999.

- Hanson, D. W.; Weber, C. R. Analysis of genetic variability from generations of plant-progeny lines in soybeans. **Crop Sci.**, v. 2, n. 1, p. 63-67, 1963.
- Hocck, J. A.; Fehr, W. R.; Murphy, P. A.; Welke, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Sci.**, v. 40, p. 48-51, 2000.
- Honoré, E. K.; Williams, J. K.; Anthony, M. S. Enhancement of coronary vasodilatation by soy phytoestrogens and genistein. **Circulation**, v. 92 (abstract), p. 349, 1995.
- Jung, W.; YU, O.; Lau, S-M. C.; O'Keefe, D. P.; Odell, J.; Fader, G.; McGonigle, B. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. **Nature Biotech.**, v. 18, p. 208-212, 2000.
- Kanazawa, T.; Osanai, T.; Zhang, X. S. Protective effects of soy protein on the peroxidisability of lipoproteins in cerebral vascular diseases. **J. Nutr.**, v. 125, p. 639S-646S, 1995.
- Kudou, S.; Fleury, Y.; Welti, D.; Magnolato, D.; Uchida, T.; Kitamura, K.; Okubo, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill). **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.
- Lee, S. J.; Yan, W.; Ahn J. K.; Chung, M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Res.**, v. 4150, p. 1-12, 2002.
- Mahamud, I.; Kramer, H. H. Segregation for yield, height, and maturity following a soybean cross. **Agron. J.**, v. 43, n. 3, p. 605-609, 1951.
- Meksem, K; Njiti, V. N.; Banz, W. J.; Iqbal, M. J.; Kassem, My. M.; Hyten, D. L.; Yuang, J.; Winters, T. A.; Lightfoot, D. A. Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content. **J. Biomed. Biotech.**, v. 1, n. 1, p. 38-44, 2001.

- Messina, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European J. Cancer**, v. 36, p. S71-S77, 2000.
- Nilausen, K.; Meinertz, H. Lipoprotein (a) and dietary proteins: casein lowers lipoprotein (a) concentrations as compared with soy protein. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p. 419-425, 1999.
- Pratt, D. E.; Birac, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **J. Food Sci.**, v. 44, p. 1720-1722, 1979.
- Ramalho, M. A. P. **Genética quantitativa em plantas autógamas; aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Magno A. P. Ramalho, João Bosco dos Santos e Maria José de O. Zimmermann. Goiânia: Editora da UFG, 1993. 271 p.
- Setchell, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 6 (Suppl.), p. 1333S-1346S, 1998.
- Song, T.; Barua, K.; Buseman, G.; Murphy, P. A. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68 (suppl.), p. 1474S-1479S, 1998.
- Tsukamoto, C.; Shimada, S., Igita, K.; Kudou, S.; Kokubun, M.; Okubo, K.; Kitamura, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 1184-1192, 1995.
- Wang, H. J.; Murphy, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.

Warner, J. N. A method for estimating heritability. **Agron. J.**, v. 44, n. 2, p. 427-430, 1952.

Wilson, R. F. Developing agronomic high-protein soybeans. **Innov. Food Technol.**, September, p. 14-15, 2001.

CAPÍTULO 1

ESTUDOS BIOMÉTRICOS DO TEOR DE ISOFLAVONAS EM SEMENTES DE SOJA

RESUMO

Os efeitos benéficos à saúde associados às isoflavonas da soja incluem a atenuação dos sintomas da menopausa, redução da osteoporose, melhora dos níveis de colesterol do sangue, diminuição do risco de certos tipos de câncer e de doenças coronarianas. Os teores e a composição de isoflavonas variam de acordo com a parte morfológica da semente de soja (cotilédone, hipocótilo e tegumento); e, também, em função do genótipo e das condições ambientais. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar os efeitos do genótipo do embrião, do genótipo nuclear e citoplasmático da planta-mãe, bem como os mecanismos de ação gênica e grau de dominância para a característica teor de isoflavonas em sementes de soja. Para isso, foram estudadas populações derivadas dos cruzamentos recíprocos entre IAC-100 (alto teor de isoflavonas) e BARC-8 (baixo teor de isoflavonas), obtidas no verão de 2000/2001. Os teores das isoflavonas foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência e o teor protéico pelo método de Kjeldahl. Foram analisados três contrastes para verificar efeitos de dominância, citoplasmático e materno. O efeito citoplasmático foi testado juntamente com os efeitos epistáticos entre genes citoplasmáticos e nucleares pela análise de variância (ANOVA) do modelo genético $Y_{ijk} = m + n_j + c_i + (cn)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$. Em que: Y_{ijk} = valor observado no citoplasma i no núcleo j na repetição k ; m = média geral; c_i = efeito do i -ésimo citoplasma; n_j = efeito do j -ésimo núcleo e; $(cn)_{ij}$ = efeitos epistáticos entre os genes citoplasmáticos e nucleares; ε_{ijk} = erro experimental. Os componentes de médias foram estimados utilizando dois modelos genéticos, um com e outro sem interação epistática citoplasma x núcleo, utilizando o método dos quadrados mínimos ponderados. A importância relativa de cada componente genético foi avaliada pelo método de eliminação de Gauss. Seis formas de isoflavonas foram detectadas nas sementes de soja: daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e

malonilglicitina. Glicitina e malonilglicitina não foram significativamente contrastantes entre os progenitores. Os resultados indicam a existência de efeito materno e citoplasmático atuando sobre os teores das isoflavonas estudadas. Tais informações são relevantes nos processos de seleção para estas características, pois na presença de pelo menos um desses efeitos, a seleção praticada em sementes F_2 é inferior àquela baseada na média das plantas F_2 , ou na média de progênies. Na análise dos componentes de médias os resultados foram similares para o teor de daidzina e malonildaidzina, pois todos os parâmetros foram significativos pelo teste t e o efeito citoplasmático foi o de maior importância relativa. Porém para o teor de genistina, os efeitos aditivos, de desvio de dominância e de interação citoplasma x dominância não foram significativos e o efeito citoplasmático foi o efeito mais importante. Já para o teor de malonilgenistina os parâmetros genéticos significativos foram: efeitos aditivos e epistáticos citoplasma x aditivo e citoplasma x dominante, sendo o efeito aditivo o de maior importância relativa. Tais informações podem ser úteis na escolha do melhor progenitor materno, o qual possua o melhor citoplasma, para aumentar o ganho na seleção.

ABSTRACT

The beneficial effects associated with isoflavone include the attenuation of the symptoms of menopause, reduction of osteoporosis, reduction on blood cholesterol levels, decrease on the risk of certain types of cancer and of coronary diseases. The objectives of this study were: to evaluate the effects of the genotype of the embryo, of the nuclear and cytoplasmic genotypes, as well as of the genic and dominance mechanisms of action on the isoflavone contents of soybean seeds. Populations derived from the reciprocals cross between BARC-8 (low isoflavone content) and IAC-100 (high isoflavone content) were produced during the summer of 2000/2001. The isoflavones content were determined by high-performance liquid chromatography and the protein content were determined by the Kjeldahl method. Three contrasts were analyzed for to verify the effects of dominance, cytoplasmic and maternal. The identified cytoplasmic effect were tested with the epistatic effects among cytoplasmic genes and nuclear genes by the analysis of variance (ANOVA) of the genetic model $Y_{ijk} = m + n_j + c_i + (cn)_{ij} + e_{ijk}$. In which: Y_{ijk} = value observed in the i cytoplasm in the j nucleus in the k repetition; m = general average; c_i = effect of the i -th cytoplasm; n_j = effect of the j -th nucleus and; $(cn)_{ij}$ = epistatic effects between cytoplasmic and nuclear genes, e_{ijk} = experimental error. The study of the components of means considered two genetic models, one with and the other without interaction cytoplasm x nucleus. The genetic components of the means were estimated by the weighted least square method squares and the relative importance of each genetic effect was evaluated by the Gauss elimination method. Six isoflavone kinds were detected: daidzin, genistin, glycitin, malonyldaidzin, malonylgenistin and malonylglycitin. Glycitin and malonylglycitin were not significantly contrasting among the progenitors. The results indicate the existence of maternal and cytoplasmic effects on the determination of isoflavone contents in soybean seeds. Such information is important for breeders during the processes of selection for high isoflavone contents, because in the presence of at least one of these effects, the success of the selection in F_2 seeds is lower than that based on the average of the F_2 plants, or on the average of the progenies. The resulted of the genetic components of the means were similar to daidzin and malonildaidzin contents, all the parameters were significant by the t test and the cytoplasmic effect was the most important one.

However, for genistin content the additive effects, of dominance deviation and of interaction cytoplasm x dominance were not significant and the cytoplasmic effect and of interaction cytoplasm x nucleus were the first and the second, respectively, most important effects. For malonylgenistin content the genetic parameters significant were: the additive effects and of epistatic effects (cytoplasm x additive and cytoplasm x dominant). The additive effect was the one with the largest relative importance. Such information is especially important during the choice of the best maternal progenitor, with the best cytoplasm and interaction of the cytoplasm with the nucleus, increasing the probability of gain in the selection process.

1. INTRODUÇÃO

As plantas produzem uma variedade de compostos de baixo peso molecular, denominados metabólitos secundários, que desempenham diversas funções na planta, principalmente na defesa contra patógenos e predadores (Genovese e Lajolo, 2001). Alguns desses compostos, tais como as isoflavonas e as saponinas, têm sido associados à prevenção e/ou tratamento de diversas doenças crônicas. Os efeitos benéficos associados às isoflavonas incluem a atenuação dos sintomas da menopausa, prevenção e tratamento da osteoporose, melhora dos níveis de colesterol do sangue e diminuição do risco de certos tipos de câncer e doenças coronarianas (Setchell, 1998; Messina, 2000).

As isoflavonas possuem estrutura química semelhante à dos hormônios sexuais, os estrógenos. Por esse motivo elas vêm sendo tratadas na literatura como fito-hormônios, ou ainda, fito-estrógenos (Pratt e Birac, 1979). As mais estudadas até agora são: genistina, daidzina, glicitina, genisteína, daidzeína, gliciteína, 6"-*O*-acetilgenistina, 6"-*O*-acetildaidzina, 6"-*O*-acetilglicitina, 6"-*O*-malonilgenistina, 6"-*O*-malonildaidzina e 6"-*O*-malonilglicitina (Kudou et al., 1991).

Segundo Griffith e Collison (2001), as sementes de soja "in natura" contêm apenas os glicosídeos daidzina, genistina, glicitina e suas formas maloniladas 6"-*O*-malonildaidzina, 6"-*O*-malonilgenistina e 6"-*O*-malonilglicitina. Os 6"-*O*-acetilglicosídeos e agliconas resultam do processamento da soja e produtos da soja ou do preparo de amostras para análise.

A soja é uma fonte rica e quase única de isoflavonas na dieta humana. O teor e a composição de isoflavonas nas sementes de soja apresentam uma grande variabilidade entre diferentes cultivares, em função do genótipo e devido a fatores ambientais (Eldridge e Kwolek, 1983; Kitamura et al., 1991; Carrão-Panizzi e Kitamura, 1995; Tsukamoto et al., 1995; Choi et al., 1996; Wang e Murphy, 1994; Carrão-Panizzi et al., 1999; Hocck et al., 2000; Lee et al., 2002).

Além disso, Kudou et al. (1991) evidenciaram que o teor e a composição das isoflavonas variam com a parte morfológica da semente (hipocótilo, cotilédone e tegumento). No hipocótilo o conteúdo é 5,5 a 6,0 vezes maior que nos cotilédones. A gliciteína e suas demais formas glicosiladas foram detectadas somente no hipocótilo, enquanto que o tegumento não apresentou nenhuma forma de isoflavona.

Embora as propriedades terapêuticas das isoflavonas da soja venham sendo amplamente estudadas, informações precisas a respeito da herança deste caráter são raras e pouco conclusivas. Informações referentes à natureza e magnitude dos efeitos gênicos que controlam uma característica são de suma importância para subsidiar programas de melhoramento (Cruz e Regazzi, 1997).

Segundo Viana (2000), os melhoristas de plantas podem avaliar o potencial das populações-base a serem utilizadas em seus programas de melhoramento e a eficiência da seleção, determinando a importância relativa dos efeitos gênicos aditivos, dominantes e epistáticos na expressão de uma dada característica.

Além disso, determinar a importância relativa dos efeitos materno e citoplasmático da planta-mãe (herança materna) sobre uma dada característica é relevante nos programas de melhoramento, especialmente no caso de ocorrer efeito citoplasmático significativo, pois tal efeito pode dificultar o processo de seleção numa população F_2 segregante e mascarar estimativas de herdabilidades e correlações (Pulcinelli, 1992). Efeito materno foi descrito para várias características de importância agrônômica em sementes de soja. Singh e Hadley (1968) e Brim et al. (1968) encontraram forte efeito materno atuando sobre o teor de óleo e teor de ácidos graxos, respectivamente. Singh e Hadley (1972); Ishige (1984) e Pulcinelli (1992) para teor de proteína; e Openshaw e Hadley (1978) para os teores de açúcares (sacarose, rafinose e estaquiose). Porém o efeito citoplasmático, nesses mesmos trabalhos, mostrou-se variável, dependendo dos parentais utilizados nos cruzamentos e das características estudadas.

Dentro desse contexto, os objetivos deste trabalho foram: avaliar o efeito do genótipo do embrião, do genótipo (efeito materno) e do citoplasma (efeito citoplasmático) da planta-mãe, bem como determinar os mecanismos de ação gênica e grau de dominância para o teor de isoflavonas em sementes de soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Genético e Cruzamentos

A linhagem BARC-8, com baixo teor de isoflavonas e elevado teor protéico, desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-ARS, Beltsville, MD) (Leffel, 1992), foi cruzada com a variedade comercial IAC-100, desenvolvida pelo Instituto Agronômico de Campinas, a qual apresenta alto teor de isoflavonas, conforme descrito por Carrão-Panizzi e Kitamura (1995) e nível normal de proteínas.

Dos cruzamentos recíprocos realizados entre os progenitores, obtiveram-se as sementes $F_{1(I)}$ (IAC-100 utilizado como progenitor materno) e $F_{1(B)}$ (BARC-8 utilizado como progenitor materno).

A seguir, as sementes $F_{1(I)}$ e $F_{1(B)}$, confirmadas como híbridas pela análise de DNA, utilizando pares de *primers* de microssatélites (SSR) para locos polimórficos entre os progenitores, foram autofecundadas, obtendo-se as gerações $F_{2(I)}$ e $F_{2(B)}$, e retrocruzadas com ambos os progenitores, obtendo-se as gerações $RC_{1(I)}$ (IAC-100 utilizado como progenitor materno) e $RC_{1(B)}$ (BARC-8 utilizado como progenitor materno), em dezembro de 2000 (Figura 1). Nesta etapa, as sementes das gerações P_I , P_B , e novas sementes $F_{1(I)}$ e $F_{1(B)}$ foram obtidas, juntamente com $F_{2(I)}$, $F_{2(B)}$, $RC_{1(I)}$ e $RC_{1(B)}$, para diminuir o efeito ambiental. A Figura 1, esquematiza como foram obtidas as gerações estudadas.

Todo o experimento foi conduzido em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. E todas as sementes das gerações foram plantadas em vasos contendo três litros de solo previamente adubado, cultivando-se duas plantas por vaso.

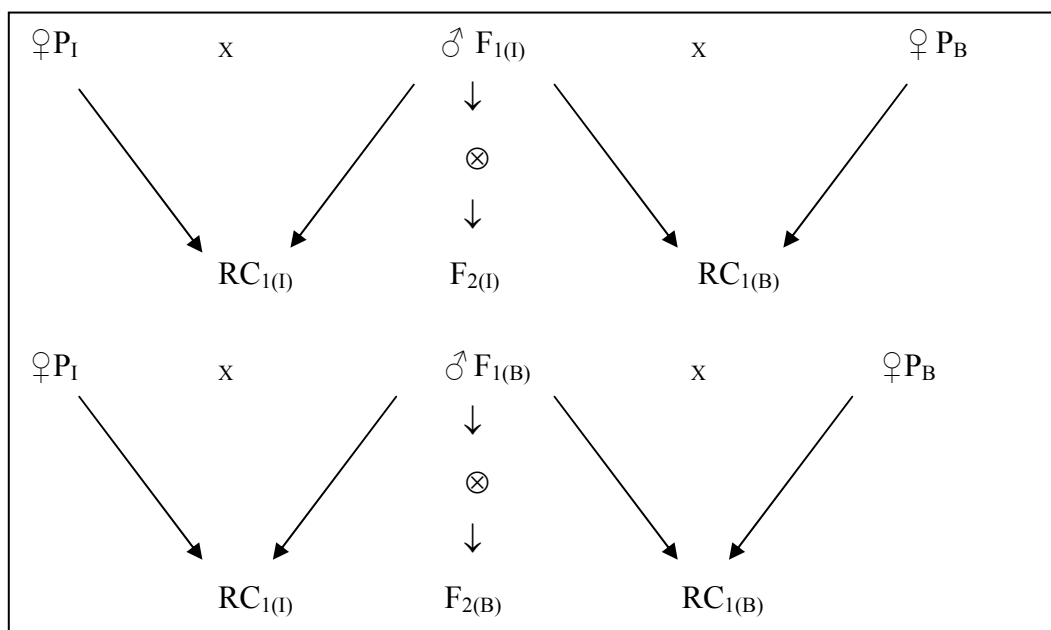


Figura 1: Esquema das gerações utilizadas. Sendo: P_1 = IAC-100, P_B = BARC-8, ♀ = progenitor materno, ♂ = progenitor paterno, ⊗ = Autofecundação, x = fecundação cruzada, _(I) = citoplasma de IAC-100 e _(B) = citoplasma de BARC-8.

2.2. Extração e Quantificação das Isoflavonas de Sementes de Soja

De acordo com Kudou et al. (1991), o teor e a composição das isoflavonas variam com a parte morfológica da semente de soja. Portanto, para quantificar todas as formas de isoflavonas presentes nas sementes, foi necessário destruir totalmente a semente.

As sementes foram moídas individualmente e amostras de 25 mg foram utilizadas para extração em 500 μ L de metanol 80%, em microtubos de 1,4 mL. Os tubos foram mantidos por 1h no gelo, com agitação a cada 15 min em agitador mecânico do tipo vórtex. Após centrifugação a 10.144 g por 5 min, sob refrigeração, os extratos foram filtrados em membrana PTFE (0,45 μ m) e 20 μ L do filtrado foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A análise foi realizada em cromatógrafo SHIMADZU, série LC10, coluna Shim-pack CLC-ODS(M) (4,6 x 250 mm, SHIMADZU), mantida a 40°C. A eluição foi realizada a um fluxo de 1,0 mL/min, em sistema gradiente de acetonitrila,

utilizando duas soluções: A) ácido acético 0,1% em água Milli-Q e B) ácido acético 0,1% em acetonitrila. O sistema gradiente de eluição iniciou com 15% da solução B mantida por 1 min, elevando-se gradativamente para 24% em 23 min, depois para 29% em 16 min, 35% em 4 min e 65% em 20 min, manteve-se assim por 1 min. E por fim, elevou-se para 80% gradativamente durante 5 min, para a lavagem da coluna, retornando para 15% em 10 min, totalizando 80 min. A detecção dos compostos foi realizada por meio de detector espectrofotométrico a 260 nm e a identificação, por comparação com os tempos de retenção dos padrões.

A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa. Padrões genuínos de daidzeína, genisteína e genistina foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA) e de gliciteína, glicitina, daidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilglicitina, 6''-O-malonilgenistina, 6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilglicitina da Fujicco Co, LTD (Tóquio, Japão).

Foram analisadas seis sementes por planta das gerações P_(I), P_(B), F_{1(I)}, F_{1(B)}, RC_{1(I)} e RC_{1(B)} e quarenta sementes de cada planta F₂ (F_{2(I)} e F_{2(B)}), as quais foram moídas individualmente para a avaliação do teor das isoflavonas detectadas. O número de plantas das gerações P_(I), P_(B), F_{1(I)}, F_{1(B)}, RC_{1(I)} e RC_{1(B)} variou de acordo com a disponibilidade das mesmas para análise.

Os resultados foram expressos em µg de isoflavona por g de soja, sendo cada resultado a média de duas repetições.

Os dados obtidos para os dois progenitores dos teores das diferentes isoflavonas detectadas nas sementes, foram preliminarmente submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar a existência de variabilidade genética significativa entre eles. As isoflavonas que não foram significativamente diferentes entre os progenitores não foram incluídas nas análises.

2.3. Estudo do Efeito do Genótipo e do Citoplasma Maternos Sobre o Teor das Isoflavonas

Uma nova ANOVA foi realizada para as isoflavonas que contrastavam entre os progenitores e três contrastes foram testados:

- ✓ \bar{P} vs \bar{F}_1 (progenitores médios *versus* F_1 médios);
- ✓ $F_{2(I)}$ (P_1 como progenitor materno) vs $F_{2(B)}$ (P_B como progenitor materno);
- ✓ ($F_{1(I)}$ vs $F_{1(B)}$) vs ($F_{2(I)}$ vs $F_{2(B)}$), sendo que: $F_{1(I)}$ ($P_1 \times P_B$, sendo P_1 o progenitor materno) e $F_{1(B)}$ ($P_B \times P_1$, sendo P_B o progenitor materno).

A significância do contraste entre os progenitores médios *versus* F_1 médios indica a presença de efeitos devido a dominância; a significância do contraste entre as F_2 's indica a presença de efeito citoplasmático e o contraste entre os contrastes das F_1 s e F_2 s testa o efeito materno.

2.4. Análise de Médias de Gerações

Detectado efeito citoplasmático, foi verificado se ocorre interação epistática entre genes nucleares e citoplasmáticos pela ANOVA considerando o seguinte modelo genético:

$$Y_{ijk} = m + n_j + c_i + (cn)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} = valor observado no citoplasma i no núcleo j na repetição k;

m = média geral;

n_j = efeito do j-ésimo núcleo;

c_i = efeito do i-ésimo citoplasma;

$(cn)_{ij}$ = efeitos epistáticos entre genes citoplasmáticos e nucleares; e

ε_{ijk} = erro experimental.

Os componentes genéticos de médias foram estimados por dois modelos genéticos, um considerando as interações epistáticas entre genes citoplasmáticos e nucleares e o outro não, conforme segue:

a) Com interação epistática núcleo x citoplasma:

$$Y = m + d + h + c + cd + ch + \varepsilon$$

b) Sem interação epistática núcleo x citoplasma:

$$Y = m + d + h + c + \varepsilon$$

Em que:

Y = valor fenotípico de uma dada geração;

m = média geral;

d = efeitos aditivos de todos os genes que controlam a característica;

h = desvios da dominância de todos os genes que controlam a característica;

c = efeitos citoplasmáticos;

cd = interações citoplasma x aditivo;

ch = interações citoplasma x dominante; e

ε = erro experimental.

Para a estimativa dos parâmetros foi utilizado o método dos quadrados mínimos ponderados (Mather e Jinks, 1971) servindo como pesos a razão inversa das variâncias das médias de cada população. O peso para ponderação é dado pela

expressão: $\frac{n_i}{\sigma_i^2}$, onde:

n_i = número de plantas avaliadas na geração i; e

σ_i^2 = variância da característica na geração i.

Para a utilização do método dos quadrados mínimos ponderados foram realizados os seguintes passos e nomenclatura descritos por Rowe e Alexander (1980):

1.) Definir as matrizes N, S, Y, C e M, onde:

$$N = \begin{bmatrix} n(P_1) & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & n(P_B) & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & n(F_{1(I)}) & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & n(F_{1(B)}) & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & n(F_{2(I)}) & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & n(F_{2(B)}) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & n(RC_{1(I)}) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & n(RC_{1(B)}) \end{bmatrix}$$

$$S = \begin{bmatrix} \sigma^2(P_1) & & & & & & & & \\ & \sigma^2(P_B) & & & & & & & \\ & & \sigma^2(F_{1(I)}) & & & & & & \\ & & & \sigma^2(F_{1(B)}) & & & & & \\ & & & & \sigma^2(F_{2(I)}) & & & & \\ & & & & & \sigma^2(F_{2(B)}) & & & \\ & & & & & & \sigma^2(RC_{1(I)}) & & \\ & & & & & & & \sigma^2(RC_{1(B)}) \end{bmatrix}$$

a) Modelo sem interação epistática núcleo x citoplasma:

$$Y = \begin{bmatrix} P_1 \\ P_2 \\ F_{1(I)} \\ F_{1(B)} \\ F_{2(I)} \\ F_{2(B)} \\ RC_{1(I)} \\ RC_{1(B)} \end{bmatrix} \quad C = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 1 \\ 1 & -1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & -1 \\ 1 & 0 & 1/2 & 1 \\ 1 & 0 & 1/2 & -1 \\ 1 & 1/2 & 1/2 & 1 \\ 1 & -1/2 & 1/2 & -1 \end{bmatrix} \quad M = \begin{bmatrix} m \\ a \\ d \\ c \end{bmatrix}$$

b) Modelo com interação:

$$Y = \begin{bmatrix} P_1 \\ P_2 \\ F_{1(l)} \\ F_{1(B)} \\ F_{2(l)} \\ F_{2(B)} \\ RC_{1(l)} \\ RC_{1(B)} \end{bmatrix} \quad C = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & -1 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & -1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & 1/2 & 1 & 0 & 1/2 \\ 1 & 0 & 1/2 & -1 & 0 & -1/2 \\ 1 & 1/2 & 1/2 & 1 & 1/2 & 1/2 \\ 1 & -1/2 & 1/2 & -1 & 1/2 & -1/2 \end{bmatrix} \quad M = \begin{bmatrix} m \\ a \\ d \\ c \\ ca \\ cd \end{bmatrix}$$

2.) Resolvendo para obter o vetor dos parâmetros, isto é:

$$\hat{M} = (C'NS^{-1}C)^{-1}(C'NS^{-1}Y)$$

3.) Obter as somas de quadrados:

$$SQ = (\hat{M}'C'NS^{-1}Y)$$

4.) As variâncias das estimativas de M são os elementos da diagonal da matriz $(C'NS^{-1}C)^{-1}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Detecção e Seleção das Isoflavonas

Dez plantas de cada progenitor (BARC-8 e IAC-100) tiveram suas sementes avaliadas quanto ao teor de isoflavonas. Seis formas foram encontradas: daidzina, glicitina, genistina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina, utilizando metanol 80% como meio extrator. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Tsukamoto et al. (1995), que utilizaram ácido acético 0,1% em etanol 70%, mas diferem dos resultados de Wang e Murphy (1994) e Hocck et al. (2000), que utilizaram HCl 0,1 M em acetonitrila como meio extrator e encontraram doze formas de isoflavonas: daidzeína, genisteína, gliciteína, daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilgenistina, malonilglicitina, acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina.

No entanto, segundo Griffith et al. (2001), as sementes de soja “in natura” apresentam as formas glicosiladas de isoflavonas (daidzina, genistina e glicitina) e suas respectivas formas maloniladas. As formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) e acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina) resultam do processamento da soja e produtos da soja ou do preparo de amostras para análise. Pelos resultados apresentados pode-se concluir que o método utilizado neste trabalho foi satisfatório, pois foi capaz de detectar as isoflavonas presentes nas sementes de soja “in natura”.

A Figura 2 mostra a comparação entre o teor das isoflavonas encontradas nas sementes de IAC-100 e BARC-8. O teor médio de isoflavonas totais (soma de todas as formas de isoflavonas encontradas) foi 1.028 e 416 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para IAC-100 e BARC-8, respectivamente. Carrão-Panizzi e Kitamura (1995) avaliaram o teor de isoflavonas (daidzina e genistina) em 22 variedades comerciais de soja, em duas safras consecutivas. Somando os teores das duas isoflavonas quantificadas por esses autores, IAC-100 foi a variedade com o maior teor nas duas safras avaliadas, 338,95 $\mu\text{g.g}^{-1}$ na safra 1990/91 e 203,15 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em 1991/92.

As formas maloniladas foram as mais abundantes, tanto para IAC-100 quanto para BARC-8, representaram juntas cerca de 72% do total de isoflavonas para IAC-100 e 68% para BARC-8, concordando com os dados apresentados por Kudou et al.

(1991); Wang e Murphy (1994); Hocck et al. (2000); Lee et al. (2002), nos quais essas formas juntas representam, em média, cerca de 65% do teor total de isoflavonas encontradas em sementes de soja.

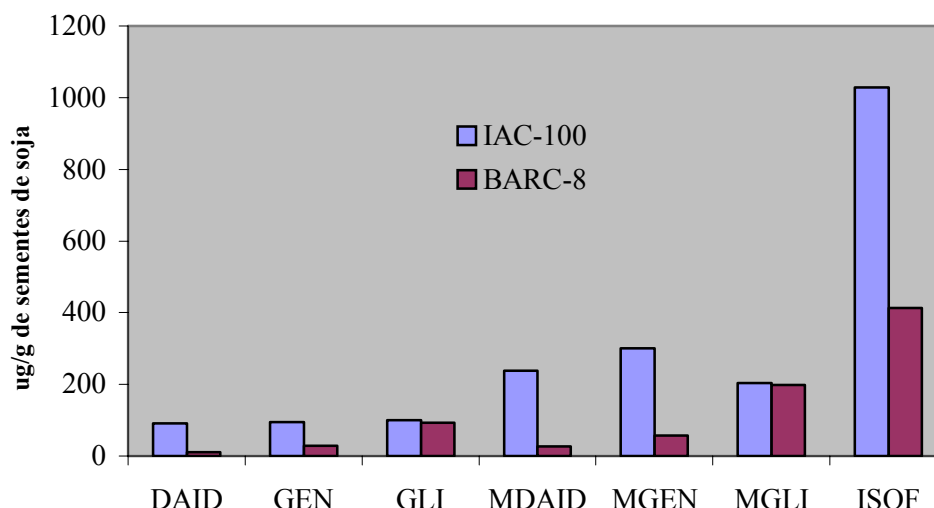


Figura 2: Teores médios das isoflavonas em sementes de IAC-100 e BARC-8. DAID = daidzina; GEN = genistina; GLI = glicitina; MDAID = malonildaidzina; MGEN = malonilgenistina; MGLI = malonilglicitina e ISOF = isoflavonas totais.

A Tabela 1 mostra os resultados das análises de variância utilizando os progenitores (IAC-100 e BARC-8), bem como os respectivos coeficientes de variação experimental, para os dos teores das isoflavonas detectadas. Os teores das isoflavonas: daidzina, genistina, malonildaidzina e malonilgenistina foram significativamente contrastantes entre os progenitores a 1% de probabilidade pelo teste F. Enquanto, os teores de glicitina e malonilglicitina não foram significativamente contrastantes entre os progenitores IAC-100 e BARC-8 a 5% de probabilidade pelo teste F e não foram incluídas nas análises posteriores.

Os coeficientes de variação experimental observados foram satisfatórios, pois a literatura relata, de maneira geral, que os teores das diferentes isoflavonas apresentam altos valores de desvio-padrão, portanto uma grande variação em torno da média (Carrão-Panizzi e Kitamura, 1995; Tsukamoto et al., 1995; Carrão-Panizzi

et al., 1999; Meksem et al., 2001). Além disso, deve-se considerar que as formas de malonilglicosídeos e acetilglicosídeos são sensíveis à temperatura, podendo ser convertidas às suas respectivas formas glicosiladas durante o processo de extração (Kudou et al., 1991), sendo esta mais uma fonte de variação.

Tabela 1: Valores dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação experimental (CV%) obtidos das análises de variância do delineamento inteiramente casualizado, utilizando os pais (IAC-100 e BARC-8), para os teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), glicitina (GLI), malonildaidzina (MDAID), malonilgenistina (MGEN) e malonilglicitina (MGLI).

FV	GL	QM					
		DAID	GEN	GLI	MDAID	MGEN	MGLI
Progenitores	1	33.116,77**	22.087,32**	230,99 ^{ns}	221.271,37**	293.461,66**	127,26 ^{ns}
Resíduo	18	1.081,29	3.222,77	1.811,45	6.325,89	25.654,33	4.805,21
CV (%)		30,34	19,72	7,89	38,32	35,33	5,72

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

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

3.2. Efeito do Genótipo e do Citoplasma Maternos sobre o Teor de Isoflavonas

Além dos progenitores, as sementes das gerações derivadas dos cruzamentos recíprocos entre eles também foram analisadas quanto aos teores de daidzina, genistina, malonildaidzina e malonilgenistina. Na Tabela 2 são apresentadas as análises de variância, bem como os respectivos coeficientes de variação experimental e as médias para as gerações P₁, P_B, F_{1(I)}, F_{1(B)}, F_{2(I)}, F_{2(B)}, dos teores dessas isoflavonas.

Todas os tratamentos diferem significativamente a 1% de probabilidade pelo teste F, indicando que ocorre segregação na população ou, pelo menos, existe variabilidade genética entre os progenitores para as características avaliadas, conforme já observado na Tabela 1. Essas diferenças sugerem a presença de alelos

diferentes entre os locos dos progenitores, tal fato é fundamental para o sucesso na seleção de plantas promissoras.

Os resultados dos contrastes avaliados estão apresentados na Tabela 2. O contraste entre \bar{P} vs \bar{F}_1 foi significativo a 1% de probabilidade pelo teste F para os teores de genistina e malonilgenistina e a 5% de probabilidade para o teor de daidzina, indicando que existem efeitos de dominância para esses teores. Porém o resultado foi não significativo para o teor de malonilgenistina, o que pode sugerir que outros efeitos que não os de dominância estão atuando sobre essa característica, tais como efeitos aditivos e epistáticos.

Para verificar a existência de efeito citoplasmático, testou-se o contraste entre as gerações F_2 ($F_{2(I)}$ vs $F_{2(B)}$). As diferenças encontradas nessas gerações podem ser tomadas como uma medida do efeito citoplasmático, visto que se tratam dos mesmos genótipos associados a citoplasmas diferentes. O contraste $F_{2(I)}$ versus $F_{2(B)}$ foi significativo a 1% de probabilidade em todos os casos, o que sugere a existência de efeito citoplasmático para as quatro formas de isoflavonas avaliadas. Segundo Openshaw e Hadley (1978), efeitos citoplasmáticos para constituintes químicos de sementes de soja são pouco freqüentes. Esses autores estudaram os teores de sacarose, rafinose e estaquiose em sementes de soja e não encontraram efeito citoplasmático para quatro cruzamentos por eles estudados. O mesmo foi observado por Singh e Hadley (1968) para o teor de óleo. Por outro lado, Singh e Hadley (1972), estudando a herança do teor de proteína, encontraram efeito citoplasmático significativo em dois dos cinco cruzamentos por eles estudados.

A avaliação do contraste ($F_{1(I)}$ vs $F_{1(B)}$) versus ($F_{2(I)}$ vs $F_{2(B)}$) para os teores de daidzina, genistina, malonildaidzina e malonilgenistina, mostrou que também há efeito materno influenciando esses teores. A literatura relata vários casos de ocorrência de efeito materno para características importantes de sementes de soja, como teor de óleo e ácidos graxos (Singh e Hadley, 1972; Brim et al., 1968), de proteínas (Singh e Hadley, 1972; Ishige; 1984; Pulcinelli, 1992) e de açúcares (Openshaw e Hadley, 1978).

Pode-se concluir, com os dados aqui obtidos, que a herança dos teores de daidzina, genistina, malonildaidzina e malonilgenistina envolve genes nucleares da planta-mãe (efeito materno) como do citoplasma (efeito citoplasmático). Tais informações são relevantes para o melhorista nos processos de seleção para estas

características, pois na presença de pelo menos um desses efeitos, a seleção praticada em sementes F_2 é inferior à seleção baseada na média das plantas F_2 ou baseada na média de progênes; pois os teores observados na F_2 são reflexo da planta-mãe que a originou.

Tabela 2: Valores dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação experimental (CV%), juntamente com as médias, obtidos das análises de variância do delineamento inteiramente casualizado, para os tratamentos (P_1 , P_B , $F_{1(I)}$, $F_{1(B)}$, $F_{2(I)}$, $F_{2(B)}$), dos teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), malonildaizina (MDAID) e malonilgenistina (MGEN).

FV	GL	QM			
		DAID	GEN	MDAID	MGEN
Tratamentos	5	137714,21**	11922,36**	67133,32**	77306,90**
$P_{(I)}$ vs $P_{(B)}$	1	42009,61**	22087,32**	221271,37**	293461,65**
\bar{P} vs \bar{F}_1	1	1082,35*	1563,15**	7991,62**	1035,53 ^{ns}
$F_{2(I)}$ vs $F_{2(I)}$	1	15678,32**	17868,24**	85363,44**	33660,19**
$(F_{1(I)}$ vs $F_{1(B)})$ vs $(F_{2(I)}$ vs $F_{2(I)})$	1	7460,65**	13811,53**	30608,31**	49268,87**
Resíduo	100	237,62	205,38	648,83	1743,96
CV (%)		38,13	29,41	24,24	28,32
Média $P_{(I)}$		91,75	95,44	237,51	299,53
Média $P_{(B)}$		10,36	28,98	27,14	57,27
Média $F_{1(I)}$		61,87	115,41	132,10	236,86
Média $F_{1(B)}$		20,08	45,81	49,33	89,98
Media $F_{2(I)}$		49,87	57,02	131,97	159,04
Media $F_{2(B)}$		21,88	28,02	66,64	118,02

** , * significativo a 1 e 5 % de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

3.3. Análise de Médias de Gerações

Os efeitos nucleares (aditivos e/ou de dominância), citoplasmático e de interação epistática entre genes citoplasmáticos e nucleares, foram testados pela análise de variância (ANOVA) do modelo genético $Y_{ijk} = m + c_i + n_j + (cn)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ (Tabela 3).

Os efeitos nucleares e citoplasmáticos foram significativos a 1% de probabilidade pelo teste F para o teor de todas as isoflavonas estudadas. A interação epistática citoplasma x núcleo foi significativa apenas para os teores das isoflavonas genistina e malonilgenistina. Era esperado que as formas maloniladas seguissem o mesmo padrão de herança de suas respectivas formas glicosiladas, pois na via de biossíntese apenas uma reação separa as formas glicosiladas das maloniladas, a adição de um grupo malonil por uma maloniltransferase (Winkel-Shirley, 2001). Por outro lado, daidzina e genistina seguem ramos distintos na via de biossíntese a partir os substratos (2S) liquiritigenina e (2S) naringenina, respectivamente (Jung et al., 2000; Winkel-Shirley, 2001).

Tabela 3: Análise de variância do modelo genético, o qual considera os efeitos citoplasmáticos, nucleares e de interação citoplasma x núcleo, dos teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), malonildaidzina (MDAID) e malonilgenistina (MGEN).

FV	GL	DAID	GEN	MDAID	MGEN
Citoplasma	1	6795,61**	13812,01**	17273,14**	49268,51**
Núcleo	5	2066,37**	3310,03**	17930,88**	17244,79**
Cit x núcleo	1	265,36 ^{ns}	2200,41**	4113,06 ^{ns}	15636,61**
Resíduo	114	266,47	190,69	1197,72	1689,74
CV (%)		42,58	28,84	34,30	28,02

* significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Estes resultados, a princípio, indicam que modelos mais parametrizados devem ser utilizados para o estudo dessas duas características, considerando os efeitos citoplasmáticos e a epistasia citoplasma x núcleo, que pode ser dividida em

citoplasma x aditivo e citoplasma x dominante. O modelo aditivo dominante parece não ser o mais adequado pois não leva tais efeitos em consideração.

O estudo dos componentes de média foi realizado considerando dois modelos genéticos, um com e outro sem interação epistática citoplasma x núcleo. Os parâmetros foram estimados pelo método dos quadrados mínimos ponderado e a importância relativa de cada efeito genético foi avaliada pelo método de eliminação de Gauss.

Para o teor de daidzina (Tabelas 4 e 5) e o teor de malonildaidzina (Tabelas 6 e 7) os resultados foram similares. Todos os parâmetros foram significativos pelo teste t a 5% de probabilidade e o efeito citoplasmático foi o de maior importância relativa e o efeito gênico aditivo foi o segundo mais importante.

Porém, para o teor de genistina (Tabelas 8 e 9), os efeitos gênicos aditivos, de desvio de dominância e de interação epistática citoplasma x dominância não foram significativos pelo teste t a 5% de probabilidade. O efeito citoplasmático foi o de maior importância relativa seguido do efeito de interação epistática citoplasma x aditivo.

A característica teor de malonilgenistina foi a única para a qual o efeito citoplasmático não foi significativo pelo teste t a 5% de probabilidade. Porém, os efeitos de interação epistática citoplasma x aditivo e citoplasma x dominante, e também o efeito aditivo, foram significativos, sendo este último o de maior importância relativa pelo método de eliminação de Gauss (Tabelas 10 e 11).

Tabela 4: Teste de significância da hipótese de que os parâmetros (m, d, h, c), para o teor de daidzina, estimados a partir das médias de plantas de soja das gerações: P_I, P_B, F_{1(I)}, F_{1(B)}, F_{2(I)}, F_{2(B)}, RC_{1(I)} e RC_{1(B)}, são nulos.

Parâmetros	Estimativa	$\hat{\sigma}(\mathbf{X})$	t	Significância
m	53,2190	1,6308	32,63	< 0,0001
d	23,5005	2,1841	10,76	< 0,0001
h	-16,8598	2,4451	-6,90	< 0,0001
c	19,9064	1,5675	12,70	< 0,0001

m = média; d = efeito aditivo; h = efeito de dominância; c = efeito citoplasmático.

Tabela 5: Decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros (m, a, d, c), para o teor de daidzina, pelo método de eliminação de Gauss.

FV	SQ	R² (%)
m/d, h, c	1.628,0763	76,64
d/m, h, c	176,9859	8,33
h/m, d, c	72,6827	3,42
c/m, d, h	246,5298	11,61
Total	2.124,2747	100

m = média; d = efeito aditivo; h = efeito de dominância; c = efeito citoplasmático.

Tabela 6: Teste de significância da hipótese de que os parâmetros (m, a, d, c), para o teor de malonildaidzina, estimados a partir das médias de plantas de soja das gerações: P₁, P_B, F_{1(I)}, F_{1(B)}, F_{2(I)}, F_{2(B)}, RC_{1(I)} e RC_{1(B)}, são nulos.

Parâmetros	Estimativa	$\hat{\sigma}$ (X)	t	Significância
m	116,3379	3,8814	29,97	< 0,0001
d	57,9928	4,8451	11,97	< 0,0001
h	-35,2915	5,7308	-6,16	< 0,0001
c	33,3038	1,6737	19,90	< 0,0001

m = média; d = efeito aditivo; h = efeito de dominância; c = efeito citoplasmático.

Tabela 7: Decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros (m, a, d, c), para o teor de malonildaidzina, pelo método de eliminação de Gauss.

FV	SQ	R² (%)
m/d, h, c	984,8565	60,89
d/m, h, c	157,0514	9,71
h/m, d, c	41,5730	2,57
c/m, d, h	434,0159	26,83
Total	1.617,4968	100

m = média; d = efeito aditivo; h = efeito de dominância; c = efeito citoplasmático.

Tabela 8: Teste de significância da hipótese de que os parâmetros (m, d, c, ca, cd), para o teor de genistina, estimados a partir das médias de plantas de soja das gerações: P_I, P_B, F_{1(I)}, F_{1(B)}, F_{2(I)}, F_{2(B)}, RC_{1(I)} e RC_{1(B)}, são nulos.

Parâmetros	Estimativa	$\hat{\sigma} (X)$	t	Significância
m	33,6243	6,1606	5,46	< 0,0001
d	8,9542	6,0854	1,47	0,1439
h	18,6863	10,1140	1,85	0,0672
c	21,6644	6,1606	3,52	0,0006
cd	20,3036	6,0854	3,34	0,0011
ch	-13,4388	10,1140	-1,33	0,1865

m = média; d = efeito aditivo; h = efeito de dominância; c = efeito citoplasmático; cd = efeito epistático citoplasma x aditivo; ch = efeito epistático citoplasma x dominante.

Tabela 9: Decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros (m, a, d, c, ca, cd), para o teor de genistina, pelo método de eliminação de Gauss.

FV	SQ	R ² (%)
m/d, h, c, cd, ch	44,9543	49,13
d/m, h, c, cd, ch	3,2673	3,57
h/m, d, c, cd, ch	5,1512	5,63
c/m, d, h, cd, ch	18,6620	20,39
cd/m, d, h, c, ch	16,7987	18,36
ch/m, d, h, c, cd	2,6643	2,91
Total	91,4978	100

m = média; d = efeito aditivo; h = efeito de dominância; c = efeito citoplasmático; cd = efeito epistático citoplasma x aditivo; ch = efeito epistático citoplasma x dominante.

Tabela 10: Teste de significância da hipótese de que os parâmetros (m, d, c, ca, cd), para o teor de malonilgenistina, estimados a partir das médias de plantas de soja das gerações: P_I, P_B, F_{1(I)}, F_{1(B)}, F_{2(I)}, F_{2(B)}, RC_{1(I)} e RC_{1(B)}, são nulos.

Parâmetros	Estimativa	$\hat{\sigma}^2(X)$	t	Significância
m	131,9761	15,2711	8,64	< 0,0001
a	123,8712	15,8314	7,82	< 0,0001
d	13,1132	27,2474	0,48	0,6312
c	-15,9408	15,2711	-1,04	0,2987
ca	31,5118	15,8314	1,99	0,0489
cd	72,9061	27,2474	2,68	0,0085

m = média; d = efeito aditivo; h = efeito de dominância; c = efeito citoplasmático; cd = efeito epistático citoplasma x aditivo; ch = efeito epistático citoplasma x dominante.

Tabela 11: Decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros (m, a, d, c, ca, cd), para o teor de malonilgenistina, pelo método de eliminação de Gauss.

FV	SQ	R ² (%)
m/d, h, c, cd, ch	76,0763	50,35
d/m, h, c, cd, ch	62,3594	41,27
h/m, d, c, cd, ch	0,2359	0,16
c/m, d, h, cd, ch	1,1098	0,73
cd/m, d, h, c, ch	4,0355	2,67
ch/m, d, h, c, cd	7,2925	4,82
Total	151,1094	100

m = média; d = efeito aditivo; h = efeito de dominância; c = efeito citoplasmático; cd = efeito epistático citoplasma x aditivo; ch = efeito epistático citoplasma x dominante.

Na Tabela 12 estão apresentadas as estimativas dos coeficientes de determinação (R²) para os modelos genéticos propostos considerando o efeito

citoplasmático com e sem interação epistática citoplasma x núcleo, e para o modelo genético aditivo-dominante. Em todos os casos houve uma diminuição no valor de R^2 , indicando a importância dos efeitos citoplasmáticos e de interação citoplasma x núcleo para as características avaliadas, concordando com os resultados anteriores.

Tabela 12: Estimativa do coeficiente de determinação (R^2) para os modelos a) sem interação citoplasma x núcleo e b) com interação citoplasma x núcleo e o modelo genético aditivo-dominante para os teores das diferentes isoflavonas.

Modelo Genético	R^2 (%)			
	Daidzina	Malonildaidzina	Genistina	Malonilgenistina
m, d, h, c	94,78	97,47	-	-
m, d, h, c, cd, ch	-	-	94,43	94,66
m, d, h	87,64	89,01	89,92	92,55

m = média; d = efeito aditivo; h = efeito de dominância; c = efeito citoplasmático; cd = efeito epistático citoplasma x aditivo; ch = efeito epistático citoplasma x dominante.

Os programas de melhoramento que visam aumentar os teores de isoflavonas podem tirar vantagem dessas informações, pois, quando se quer realizar, por exemplo, retrocruzamentos, para a introgressão de genes de alto teor de daidzina, genistina, malonildaidzina e malonilgenistina em variedades comerciais, deve-se utilizar o progenitor de alto teor de isoflavona como mãe, devido à importância do efeito citoplasmático, principalmente nos casos onde há interação epistática citoplasma x núcleo. Com o passar dos ciclos de retrocruzamentos, os efeitos aditivos possibilitarão o ganho.

4. CONCLUSÕES

- Seis formas de isoflavonas foram encontradas nas sementes de soja analisadas: daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina. Sendo que as formas maloniladas corresponderam juntas cerca de 65% do teor total de isoflavonas encontradas na sementes.
- Os teores das isoflavonas daidzina, genistina, malonildaidzina e malonilgenistina são primariamente influenciados pelo progenitor materno (efeitos materno e citoplasmático).
- A interação epistática dos genes citoplasmáticos x genes nucleares foi significativa para os teores de genistina e malonilgenistina, mas não para os teores de daidzina e malonildaidzina.
- Para os teores das isoflavonas avaliadas, exceto para malonilgenistina, o efeito citoplasmático foi o que apresentou maior importância relativa, pelo método de eliminação de Gauss. Para o teor de malonilgenistina o efeito genético aditivo foi o de maior importância relativa.
- A comparação dos dois modelos propostos, contendo o efeito citoplasmático com e sem interação epistática citoplasma x núcleo, com o modelo genético aditivo-dominante confirmou a importância do citoplasma na determinação do teor das isoflavonas.
- A presença de efeito materno e citoplasmático influenciando o teor das isoflavonas torna ineficiente a seleção em sementes F_2 e também os cálculos das estimativas de herdabilidades, sugerindo fazer a seleção e também estimar h_a , baseando-se na média das plantas F_2 .
- O melhorista pode tirar proveito da existência do efeito citoplasmático na escolha do progenitor que utilizará como mãe no programa de melhoramento, principalmente nos casos onde há interação epistática citoplasma x núcleo, possibilitando maiores ganhos na seleção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brim, C. A.; Schutz, W. M.; Collins, F. I. Maternal effect on fatty acid composition and oil content of soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Sci.**, v. 8, p. 517-518, 1968.
- Carrão-Panizzi, M.; Kitamura, K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Sci.**, v. 45, n. 3, p. 295-300, 1995.
- Carrão-Panizzi, M.; Beléia, A. D. P.; Prudêncio-Ferreira, S. H.; Oliveira, M. C. N.; Kitamura, K. Effects of isoflavones on beany flavor and astringency of soymilk and cooked whole soybean grains. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 34, n. 6, p. 1045-1052, 1999.
- Choi, J. S. C.; Kwon, T. W.; Kim, J. S. Isoflavone contents in some varieties of soybean. **Foods Biotech.**, v. 5, p. 167-169, 1996.
- Cruz, C. D.; Regazzi, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2^aed., 1997, 390 pp.
- Eldridge, A. C.; Kwolek, W. F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 31, p. 394-396, 1983.
- Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 1, p. 86-93, 2001.
- Griffith, A. P.; Collison, M. W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatography A**, v. 913, p. 397-413, 2001.
- Hocck, J. A.; Fehr, W. R.; Murphy, P. A.; Welke, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Sci.**, v. 40, p. 48-51, 2000.

- Ishige, T. Biometrical analysis and estimation of the number of genes for seed protein content of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. **Japan Agric. Res. Quartely.**, v. 17, n. 4, p. 230-235, 1984.
- Jung, W.; YU, O.; Lau, S-M. C.; O'Keefe, D. P.; Odell, J.; Fader, G.; McGonigle, B. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. **Nature Biotech.**, v. 18, p. 208-212, 2000.
- Kitamura, K.; Igita, K.; Kikuchi, A.; Kudou, S.; Okubo, K. Low isoflavone content in some early maturing cultivars, so-called "summer-tupe soybeans" (*Glycine max* (L.) Merrill). **Japan. J. Breed.**, v. 41, p. 651-654, 1991.
- Kudou, S.; Fleury, Y.; Welti, D.; Magnolato, D.; Uchida, T.; Kitamura, K.; Okubo, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine Max* Merrill). **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.
- Lee, S. J.; Yan, W.; Ahn J. K.; Chung, M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Res.**, v. 4150, p. 1-12, 2002.
- Leffel, R.C. Registration of high-protein soybean germplasm lines BARC-6, BARC-7, BARC-8 and BARC-9. **Crop Sci.**, v. 32, p. 502, 1992.
- Mather, K.; Jinks, J. L. **Biometrical genetics: the study of continuous variation.** New York: Cornell University Press, 1971, 382 pp.
- Meksem, K; Njiti, V. N.; Banz, W. J.; Iqbal, M. J.; Kassem, My. M.; Hyten, D. L.; Yuang, J.; Winters, T. A.; Lightfoot, D. A. Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content. **J. Biomed. Biotech.**, v. 1, n. 1, p. 38-44, 2001.
- Messina, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European J. Cancer**, v. 36, p. S71-S77, 2000.

- Openshaw, S. J.; Hadley, H. H. Maternal Effects on sugar content in soybean seeds. **Crop Sci.**, v. 18, p. 581-584, 1978.
- Pratt, D. E.; Birac, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **J. Food Sci.**, v. 44, p. 1720-1722, 1979.
- Pulcinelli, C. E. **Herança do teor de proteína em soja**. Piracicaba, SP, ESALQ, (Tese M. S.), 1992, 67 pp.
- Rowe, K. E.; Alexander, W. L. Computations for estimating the genetic parameters in joint-scaling tests. **Crop Sci.**, v. 20, p. 109-110, 1980.
- Setchell, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 6 (Suppl.), p. 1333S-1346S, 1998.
- Sing, L.; Hadley, H. H. Maternal control of oil synthesis in soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Sci.**, v. 8, p. 622-625, 1968.
- Sing, L.; Hadley, H. H. Maternal and cytoplasmic effects on seed protein content in soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Sci.**, v. 12, p. 583-585, 1972.
- Tsukamoto, C.; Shimada, S., Igita, K.; Kudou, S.; Kokubun, M.; Okubo, K.; Kitamura, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 1184-1192, 1995.
- Viana, J. M. S. Components of variation of polygenic systems with digenic epistasis. **Gen. Mol. Biol.**, v. 23, n. 4, p. 883-892, 2000.
- Wang, H. J.; Murphy, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.

Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiol.**, v. 126, p. 485-493, 2001.

CAPÍTULO 2

ESTIMATIVAS DE HERDABILIDADES E CORRELAÇÕES ENTRE TEORES DE ISOFLAVONAS E DE PROTEÍNA EM SEMENTES DE SOJA

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram estimar herdabilidades no sentido amplo para os teores das isoflavonas detectadas nas sementes de soja e estimar correlações entre essas isoflavonas, entre o teor de cada forma de isoflavona e o teor de proteína e, também, entre o teor de isoflavonas totais e o teor de proteína, utilizando sementes F₃, do cruzamento entre BARC-8 (baixo teor de isoflavonas) e IAC-100 (alto teor de isoflavonas). As sementes dos progenitores e as sementes F₃ foram plantadas em casa de vegetação no verão 2001/2002 e foram analisadas para o teor de isoflavonas, por cromatografia líquida de alta eficiência, e para o teor de proteína pelo método de Kjeldahl. Seis formas de isoflavonas foram detectadas: daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina. Glicitina e malonilglicitina não foram significativamente contrastantes entre os progenitores. A herdabilidade no sentido amplo para os teores de daidzina, genistina, malonildaidzina, malonilgenistina e teor de isoflavonas totais foram superiores a 90%, indicando que essas características podem ser selecionadas em gerações precoces. Os teores de daidzina, genistina, malonildaidzina e malonilgenistina apresentaram coeficientes de correlação fenotípica positivos e de grande magnitude entre elas e com teor de isoflavonas totais, indicando que tais características podem ser melhoradas simultaneamente. Os coeficientes de correlação fenotípica entre os teores das isoflavonas estudadas e teor de proteína foram todos negativos confirmando a tendência de correlação negativa entre o teor de isoflavonas e o teor de proteína observada por outros autores.

ABSTRACT

The objectives of this study were to estimate heritabilities for the isoflavone contents in soybean seeds and to estimate correlations between total isoflavone and between each isoflavone type, and protein content, of sementes F₃ from the cross between BARC-8 (low isoflavone content) and IAC-100 (high isoflavone content). Seeds of the progenitors and seeds of the F₃ progenies were obtained in the summer 2001/2002, and were analyzed for isoflavone was done by high-performance liquid chromatography, and protein contents was done by the Kjeldahl method. Six isoflavone types were detected in the seeds: daidzin, genistin, glycitin, malonyldaidzin, malonylgenistin and malonylglycitin. Glycitin and malonylglycitin were not significantly contrasting among the progenitors. The heritabilities for the daidzin, genistin, malonyldaidzin, and malonylgenistin contents and also for total isoflavone content were superior to 90%, indicating that selection for these characteristics can be done in early generations. Daidzin, genistin, malonyldaidzin and malonylgenistin contents presented positive phenotypic correlation coefficients positive and of great magnitude among them and with total isoflavone content, indicating that such characteristics can be bred simultaneously. Phenotypic correlations between isoflavones and protein content were all negative as reported by other authors.

1. INTRODUÇÃO

Em virtude de seu alto valor nutricional, a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é cultivada no mundo inteiro. As indústrias alimentícias, em especial, têm explorado comercialmente o potencial energético-protéico da soja, estimulando, assim, sua produção em larga escala.

Dados clínicos e epidemiológicos têm indicado que o consumo de soja está associado à prevenção e tratamento de diversas doenças crônicas. Alguns de seus compostos, tais como as isoflavonas, as saponinas e os inibidores de proteases, têm sido associados a essas propriedades terapêuticas da soja (Setchell, 1998, Messina, 2000).

Os efeitos benéficos à saúde atribuídos às isoflavonas incluem: redução do risco de vários tipos de câncer, como os de mama, pulmão, cólon, reto, estômago e próstata (Barnes et al., 1999); de doenças cardiovasculares (Tikkanen et al., 1998), de osteoporose (Erdman e Potter, 1997) e pela atenuação dos sintomas da menopausa (Kurzer, 2000). Além disso, há evidências de que as isoflavonas, em especial a genisteína da soja, reduzem os níveis de colesterol total, provocam uma diminuição da fração LDL e um aumento da fração HDL no sangue (Kanazawa et al., 1995; Honoré et al., 1995 e Nilausen e Meinertz, 1999).

Por outro lado, isoflavonas e saponinas afetam negativamente o processamento da soja, porque são responsáveis pelo sabor amargo e adstringente observados nos produtos derivados da soja (Kitamura et al., 1991; Kudou et al., 1991, Carrão-Panizzi et al. 1999, Drewnowski e Gomez-Carneros, 2000).

A soja contém grande quantidade de isoflavonas, sendo a principal fonte desses compostos na dieta humana. As sementes “in natura” contém os glicosídeos daidzina, genistina, glicitina e suas formas maloniladas 6”-*O*-malonildaidzina, 6”-*O*-malonilgenistina e 6”-*O*-malonilglicitina. Os 6”-*O*-acetilglicosídeos e agliconas resultam do processamento da soja e de seus produtos e podem também resultar do preparo das amostras para análise (Griffith e Collison, 2001).

Os teores e a composição de isoflavonas variam de acordo com a parte morfológica da semente da soja (cotilédone, hipocótilo e tegumento) (Kudou et al., 1991). E, também, em função do genótipo e das condições ambientais durante o cultivo (Wang e Murphy, 1994; Carrão-Panizzi e Kitamura, 1995; Tsukamoto et al.,

1995; Choi et al., 1996; Carrão-Panizzi et al., 1999; Hocck et al., 2000; Lee et al., 2002).

Como há uma grande variabilidade entre as variedades de soja, tanto no teor quanto na composição de isoflavonas, é possível fazer a seleção de genótipos com alto teor de isoflavonas totais, selecionar para as formas individuais e modificar os seus teores de acordo com o interesse do programa de melhoramento. Para tanto, informações sobre as estimativas de herdabilidades e de correlações para essas características são de suma importância para os programas de melhoramento de soja, principalmente nos processos de seleção.

A herdabilidade é um dos parâmetros genéticos mais informativos para o trabalho do melhorista, pois fornece a proporção da variância genética presente na variância fenotípica total e dessa forma, mede a confiabilidade do valor fenotípico como indicador do valor reprodutivo (Ramalho, 1993). E a correlação é uma medida do grau de associação entre características e pode ser utilizada para o melhoramento conjunto de características correlacionadas (Johnson et al., 1955).

A herdabilidade pode ser definida como: herdabilidade no sentido amplo e herdabilidade no sentido restrito. A segunda considera apenas a variância genética aditiva – aquela que é fixada pela seleção – sendo, evidentemente, mais importante para o melhorista (Ramalho, 1993). Segundo Dudley e Moll, (1969), uma estimativa de herdabilidade refere-se a uma característica de uma população e é específica para as condições experimentais nas quais os genótipos foram estudados.

Com o propósito de determinar a herdabilidade para as formas agliconas de isoflavonas (daidzeína, genisteína e gliciteína), Meksem et al. (2001) avaliaram 40 linhagens recombinantes endogâmicas (RIL) do cruzamento entre duas variedades que contrastavam para essas isoflavonas e encontraram herdabilidades de 79% para daidzeína, 22% para genisteína e 88% para gliciteína. É importante enfatizar que este estudo foi realizado em um determinado ambiente em um ano de cultivo.

Outra medida de grande valor para o melhorista é a estimativa de correlação entre características, pois mostra como a seleção de um caráter pode influenciar na expressão de outros (Falconer, 1987). O conhecimento das estimativas de correlação para a característica “teor de isoflavonas” pode ser de uso prático na modificação dos teores dos outros constituintes das sementes de soja, como óleo e proteína, dependendo da natureza e intensidades das correlações existentes entre esses

constituintes. Os programas de melhoramento, geralmente, visam o aprimoramento de uma característica principal, buscando melhorar, também, a expressão de outras características de interesse que sejam correlacionadas.

Trabalhos citados por Wilson (2001) relatam que embora variedades com 44% de proteína sejam boas fontes de isoflavonas, outras com alto teor de proteína (mais que 50%) possuem baixos níveis de isoflavonas o que indica a existência de uma correlação negativa entre essas duas características.

Chamel José et al. (2002) estimaram as correlação entre as características teor de isoflavonas e teor de proteína e teor de isoflavonas e teor de óleo no grão de 30 genótipos de soja cultivados no mesmo campo experimental, em um mesmo ano, e encontraram uma correlação negativa (-0,41) entre os teores de isoflavonas totais e de proteína. Entre as características teor de isoflavona e teor de óleo a correlação estimada também foi negativa, porém de menor magnitude (-0,11). Estes resultados sugerem a necessidade de um monitoramento simultâneo das características teor de isoflavonas e teor de proteína em programas de melhoramento que visam aumentar a fração protéica, bem como o teor de isoflavonas.

Os programas que visam o desenvolvimento de cultivares de melhor qualidade nutricional têm se concentrado no aumento do teor de proteínas, na alteração da composição da fração óleo e na diminuição de fatores antinutricionais das sementes. Logo, é importante conhecer a correlação existente entre o teor de isoflavonas e essas características.

Dentro deste contexto, os objetivos deste trabalho foram determinar as herdabilidades para os teores das isoflavonas presentes em sementes de soja, estimar as correlações existentes entre elas e estimar as correlações entre o teor de cada isoflavona e teor de proteína e o teor de isoflavonas totais e teor de proteína nas progênes F_3 do cruzamento entre IAC-100 (com alto teor de isoflavonas e teor moderado de proteína) e BARC-8 (com baixo teor de isoflavonas e alto teor de proteínas).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Genético e Cruzamentos

A linhagem BARC-8, com baixo teor de isoflavonas e elevado teor protéico, desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-ARS, Beltsville, MD) (Leffel, 1992) foi cruzada com a variedade comercial IAC-100, desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas, a qual apresenta alto teor de isoflavonas, conforme descrito por Carrão-Panizzi e Kitamura (1995) e teor normal de proteínas.

No capítulo anterior, os resultados mostraram que há influência do genitor materno, tanto efeito materno, quanto efeito citoplasmático, nos teores de daidzina, genistina, malonildaidzina e malonilgenistina. A existência de efeito citoplasmático diminui a eficiência para estimar as herdabilidades e correlações com base na geração F_2 , uma medida das médias das plantas F_2 é o mais indicado para calcular tais estimativas (Singh e Hadley, 1972).

Portanto, em dezembro de 2001, as sementes $F_{2(1)}$ foram plantadas para a obtenção das sementes $F_{3(1)}$, juntamente com os progenitores BARC-8 e IAC-100, para reduzir o efeito do ambiente. Foram analisadas, quanto aos teores de isoflavonas e de proteína, sementes $F_{3(1)}$ provenientes de noventa e sete plantas $F_{2(1)}$ e sementes de sete plantas de cada um dos progenitores.

2.2. Extração e Quantificação das Isoflavonas de Sementes de Soja

De cada planta tomou-se uma amostra de vinte sementes que foram moídas e sub-amostras de 500 mg foram utilizadas para extração em 10 mL de metanol 80% em tubos de centrífuga com tampa. Os tubos foram mantidos por 1h no gelo, com agitação a cada 15 min em agitador mecânico do tipo vórtex. Após centrifugação a 10.144 g por 5 min, sob refrigeração, os extratos foram filtrados em membrana PTFE (0,45 μ m) e 20 μ L do filtrado foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A análise foi realizada em cromatógrafo SHIMADZU, série LC10, coluna Shim-pack CLC-ODS(M) (4,6 x 250 mm, SHIMADZU), mantida a 40°C. A eluição foi realizada a um fluxo de 1,0 mL/min, em sistema gradiente de acetonitrila, utilizando duas soluções: A) ácido acético 0,1% em água Milli-Q e B) ácido acético 0,1% em acetonitrila. O sistema gradiente de eluição iniciou com 15% da solução B mantida por 1 min, elevando-se gradativamente para 24% em 23 min, depois para 29% em 16 min, 35% em 4 min e 65% em 20 min, manteve-se assim por 1 min. E por fim, elevou-se para 80%, gradativamente, durante 5 min, para a lavagem da coluna, retornando para 15% em 10 min, totalizando 80 min. A detecção dos compostos foi realizada por meio de detector espectrofotométrico a 260 nm e a identificação, por comparação com os tempos de retenção dos padrões.

A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa. Padrões genuínos de daidzeína, genisteína e genistina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA) e de gliciteína, glicitina, daidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilglicitina, 6''-O-malonilgenistina, 6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilglicitina da FUJICCO CO., LTD (Tóquio, Japão).

Os resultados foram expressos em µg de isoflavona por g de soja, com base na matéria seca, constituindo a média de duas repetições.

2.3. Análise do Teor de Proteína

Das mesmas amostras de vinte sementes utilizadas para quantificar o teor de isoflavonas, foram retiradas sub-amostras de 300 mg para a determinação do teor de proteína das 97 plantas F₂ e de sete planta de cada progenitor (IAC-100 e BARC-8).

A determinação de proteínas foi efetuada segundo o método Kjeldahl, para a quantificação de nitrogênio total descrito pela AOAC (1975), com modificações. Na fase de digestão, após obtenção do material aparentemente digerido, adicionou-se peróxido de hidrogênio 30% e a mistura foi aquecida por mais 30 min. Na fase de destilação, a amônia liberada foi recolhida em solução de ácido bórico 4%. Obteve-se o teor de nitrogênio pela titulação da amônia com ácido clorídrico 0,05%. A partir do teor de nitrogênio, foi calculada a porcentagem de proteínas totais da amostra, empregando-se o fator de 6,25.

Os resultados dos teores de proteína foram expressos em porcentagem, com base na matéria seca, constituindo a média de duas repetições.

Os dados observados para os dois progenitores foram, preliminarmente, submetidos a uma análise de variância para verificar a existência de variabilidade genética significativa entre eles, as isoflavonas que não tiverem seus teores significativamente contrastantes entre os progenitores não serão incluídas nas análises posteriores.

2.4. Variâncias Fenotípicas, Genóticas e de Ambiente nas Progênes F₃

A variância fenotípica foi estimada utilizando os valores fenotípicos obtidos das médias das plantas F₂, segundo a expressão:

$$\hat{\sigma}_F^2 = \sum (X_i - \bar{X})^2 / n - 1$$

Em que:

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

X_i = dados fenotípicos da característica avaliada em cada planta;

\bar{X} = média da característica avaliada; e

n = número de plantas avaliadas.

Estimou-se a variância de ambiente pela média ponderada das variâncias dos progenitores:

$$\hat{\sigma}_E^2 = \frac{n_1 \hat{\sigma}_{P_1}^2 + n_2 \hat{\sigma}_{P_2}^2}{n_1 + n_2}$$

Sendo:

$\hat{\sigma}_E^2$ = variância de ambiente estimada;

$\hat{\sigma}_{P_1}^2$ e $\hat{\sigma}_{P_2}^2$ = variâncias fenotípicas estimadas dos progenitores P₁ (IAC-100) e

P₂ (BARC-8), respectivamente; e

n_1 e n_2 = número de plantas dos progenitores P₁ e P₂, respectivamente.

E a variância genotípica foi estimada pela diferença entre as estimativas da variância fenotípica e da variância de ambiente, ou seja:

$$\hat{\sigma}_G^2 = \hat{\sigma}_F^2 - \hat{\sigma}_E^2$$

2.5. Covariâncias Fenotípicas, Genotípicas e de Ambiente nas Progenies F₃

Estimou-se a covariância fenotípica diretamente, utilizando-se os valores fenotípicos das características X₁ e X₂, obtidas nas progenies F₃.

A covariância ambiental foi estimada pela expressão:

$$\hat{CÔV}_E(X_1, X_2) = \frac{\hat{CÔV}_F(X_1, X_2)_{P_1} + \hat{CÔV}_F(X_1, X_2)_{P_B}}{2}$$

Em que:

$\hat{CÔV}_E(X_1, X_2)$ = covariância de ambiente entre as características X₁ e X₂;

$\hat{CÔV}_F(X_1, X_2)_{P_1}$ e $\hat{CÔV}_F(X_1, X_2)_{P_B}$ = covariância fenotípica entre as características X₁ e X₂, nos progenitores P₁ e P_B, respectivamente.

E a covariância genotípica foi obtida pela diferença entre a covariância fenotípica das características X₁ e X₂ [$\hat{CÔV}_F(X_1, X_2)$] e a covariância de ambiente [$\hat{CÔV}_E(X_1, X_2)$].

2.6. Herdabilidades nas Progenies F₃

As herdabilidades no sentido amplo foram estimadas segundo a expressão:

$$h_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_G^2}{\hat{\sigma}_F^2}$$

Sendo:

h_a^2 = estimativa da herdabilidade no sentido amplo;

$\hat{\sigma}_G^2$ = estimador da variância genotípica na progênie F₃; e

$\hat{\sigma}_F^2$ = estimador da variância fenotípica na progênie F₃.

2.7. Correlações Fenotípicas, Genotípicas e de Ambiente nas Progênies F₃

As correlações fenotípicas para os teores das seis isoflavonas (daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina) e para o teor de proteína foram estimadas da seguinte maneira (Falconer, 1987):

$$r_{F_{X_1 X_2}} = \frac{\widehat{COV}_F(X_1 X_2)}{\sqrt{\widehat{\sigma}_{F_{X_1}}^2 \times \widehat{\sigma}_{F_{X_2}}^2}}$$

Sendo:

$r_{F_{X_1 X_2}}$ = estimador do coeficiente de correlação fenotípica entre os caracteres

X_1 e X_2 ;

$\widehat{COV}_F(X_1 X_2)$ = estimador da covariância fenotípica entre os caracteres X_1 e X_2 ;

$\widehat{\sigma}_{F_{X_1}}^2$ e $\widehat{\sigma}_{F_{X_2}}^2$ = estimadores das variâncias fenotípicas dos caracteres X_1 e X_2 , respectivamente.

Os coeficientes de correlações genotípica e de ambiente foram obtidos pelas expressões:

$$r_{G_{X_1 X_2}} = \frac{\widehat{COV}_G(X_1 X_2)}{\sqrt{\widehat{\sigma}_{G_{X_1}}^2 \times \widehat{\sigma}_{G_{X_2}}^2}} \quad \text{e} \quad r_{E_{X_1 X_2}} = \frac{\widehat{COV}_E(X_1 X_2)}{\sqrt{\widehat{\sigma}_{E_{X_1}}^2 \times \widehat{\sigma}_{E_{X_2}}^2}}$$

Em que:

$r_{G_{X_1 X_2}}$ = estimador do coeficiente de correlação genotípica entre as características X_1 e X_2 ;

$\widehat{CÔV}_G(X_1, X_2)$ = estimador do covariância genotípica entre as características X_1 e X_2 ;

$\widehat{\sigma}^2_{GX_1}$ e $\widehat{\sigma}^2_{GX_2}$ = estimadores das variâncias genotípicas das características X_1 e X_2 ;

$r_{E_{X_1X_2}}$ = estimador do coeficiente de correlação de ambiente entre as características X_1 e X_2 ;

$\widehat{CÔV}_E(X_1, X_2)$ = estimador do covariância de ambiente entre as características X_1 e X_2 ;

$\widehat{\sigma}^2_{EX_1}$ e $\widehat{\sigma}^2_{EX_2}$ = estimadores das variâncias de ambiente das características X_1 e X_2 ;

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Detecção e Seleção das Isoflavonas

Foram detectadas seis formas de isoflavonas nas sementes dos progenitores IAC-100 e BARC-8 e nas progêneses F₃: daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilglicitina e malonilgenistina. Esse resultado está de acordo com aquele obtido por Tsukamoto et al. (1995), mas diferem daqueles encontrados por Wang e Murphy (1994) e Hocck et al. (2000), que encontraram, além dessas formas, as agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) e as formas acetilglicosiladas (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina e 6''-O-acetilglicitina). No entanto, segundo Griffith e Collison (2001), as sementes de soja “in natura” contém os glicosídeos de isoflavonas: daidzina, genistina, glicitina e suas formas maloniladas, os 6''-O-acetilglicosídeos e agliconas podem resultar do processamento da soja e de seus produtos, ou do preparo das amostras para análise.

As médias e respectivos desvios-padrão, bem como a análise de variância e coeficientes de variação experimental para os teores das isoflavonas e de proteína dos progenitores estão apresentados na Tabela 1.

Em média, o teor de isoflavonas totais (somatória de todas as formas de isoflavonas detectadas nas sementes) foi 427,92 e 965,89 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e de proteína 45,17 e 34,95% para BARC-8 e IAC-100, respectivamente.

A significância observada para os teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), malonildaidzina (MDAID), malonilgenistina (MGEN), isoflavonas totais (ISOF) e proteína (PROT), indica a existência de variabilidade genética entre os progenitores, possibilitando a formação de uma população de base genética bastante ampla para essas características, a partir desses progenitores. Glicitina (GLI) e malonilglicitina (MGLI) não foram significativamente contrastantes entre os progenitores a 5% de probabilidade pelo teste F e não foram incluídas nas análises posteriores.

Os coeficientes de variação experimental observados foram satisfatórios, pois de maneira geral, os teores das diferentes isoflavonas apresentam altos valores de desvio-padrão, portanto uma grande variação em torno da média, como foi observado

neste trabalho e por outros autores (Carrão-Panizzi e Kitamura, 1995; Tsukamoto et al., 1995; Carrão-Panizzi et al., 1999; Meksem et al., 2001).

Tabela 1: Valores dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação experimental (CV%), obtidos das análises de variância do delineamento inteiramente casualizado, para os progenitores (IAC-100 e BARC-8), juntamente com as médias e desvios-padrão (SD), dos teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), glicitina (GLI), malonildaidzina (MDAID), malonilgenistina (MGEN), malonilglicitina (MGLI), isoflavonas totais (ISOFL) e de proteína (PROT).

FV	GL	QM							
		DAID	GEN	GLI	MDAID	MGEN	MGLI	ISOFL	PROT(%)
Progenitores	1	19919,18**	11361,81**	199,96 ^{ns}	174535,75**	106232,39**	0,76 ^{ns}	1012946,40**	365,37**
Resíduo	12	48,27	85,59	72,20	716,24	1135,80	177,19	1897,57	4,45
CV (%)		14,28	17,86	9,08	18,03	21,12	6,83	6,25	5,26
Média ± SD IAC-100		86,37±9,41	80,28±10,25	97,33±9,14	260,06±37,19	246,67±46,00	195,18±12,67	965,89±55,70	34,95±2,34
Média ± SD BARC-8		10,94±2,82	23,30±8,13	89,77±7,80	36,75±7,04	72,45±12,47	194,71±13,92	427,92±26,31	45,17±1,85

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

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

3.2. Estimativas de Herdabilidades nas Progênes F₃

As estimativas de herdabilidade no sentido amplo para as características daidzina, genistina, malonildaidzina, malonilgenistina, isoflavonas totais e proteína, referentes as progênes F₃, estão apresentadas na Tabela 2.

As estimativas obtidas foram superiores a 90%, para todas as características exceto teor de proteína, 37%. Os resultados obtidos sugerem que a seleção para os teores de daidzina, genistina, malonildaidzina, malonilgenistina e de isoflavonas totais pode ser eficiente em gerações precoces, pois os valores de herdabilidade no sentido amplo estimados foram superiores a 90%. Segundo Falconer (1987), quando as estimativas de herdabilidades são superiores a 50% isso indica que a contribuição das causas genéticas na expressão fenotípica da característica é mais pronunciada do que as atribuídas pelo ambiente.

Meksem et al. (2001) relataram altas estimativas de herdabilidades para as agliconas daidzeína (79%) e gliciteína (88%), mas não para genisteína (22%), utilizando 40 RILs obtidas do cruzamento entre duas variedades de soja que contrastavam para essas três formas de isoflavonas. O fato de esses autores encontrarem uma baixa herdabilidade para genisteína pode ser devido, entre outras razões, ao efeito de ambiente, pois a interação G x E sobre os teores de isoflavonas é bastante significativa (Wang e Murphy, 1994; Hocck et al., 2000; Lee et al., 2002). É importante lembrar que uma estimativa de herdabilidade refere-se a uma característica de uma população e é específica para as condições experimentais nas quais os genótipos foram estudados. Logo, é difícil generalizar estimativas de uma população para outra, ou para diferentes condições experimentais (Dudley e Moll, 1969).

O fato da população avaliada neste trabalho ter sido obtida em casa de vegetação, onde as condições ambientais são mais controladas, pode ter favorecido a obtenção de estimativas de herdabilidades mais altas do que aquelas obtidas por Meksem et al. (2001), que avaliaram as populações de RILs no campo.

A característica teor de proteína apresentou estimativa de herdabilidade de 37%. Segundo Piovesan (2000) as estimativas de herdabilidades para a teor de proteínas em sementes de soja são muito variadas. Este autor avaliou a herdabilidade para teor de proteína em nível de indivíduos na população F₂ de cruzamentos dialelos

e encontrou herdabilidades que variaram de 22% a 81%. Outros autores, incluindo Johnson e Bernard (1963), Know e Torrie (1964) e McKendry et al. (1985), obtiveram baixas estimativas de herdabilidades no sentido amplo em populações F₂ para teor de proteína em sementes de soja.

Tabela 2: Variâncias fenotípicas ($\hat{\sigma}_F^2$), de ambiente ($\hat{\sigma}_E^2$) e genotípicas ($\hat{\sigma}_G^2$) e herdabilidades no sentido amplo (h_a^2) para os teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), malonildaidzina (MDAID), malonilgenistina (MGEN), isoflavonas totais (ISOF) e proteína (PROT), estudadas nas progênes F₃.

Parâmetros	Características					
	DAID	GEN	MDAID	MGEN	ISOF	PROT
$\hat{\sigma}_F^2$	1015,13	3028,85	5886,11	24078,07	110838,64	6,05
$\hat{\sigma}_E^2$	41,37	73,37	613,88	973,53	1626,54	3,82
$\hat{\sigma}_G^2$	973,76	2955,48	5272,23	23104,55	109212,09	2,23
h_a^2	0,96	0,98	0,90	0,96	0,99	0,37

É importante ressaltar a importância dos dados aqui obtidos, pois a literatura é escassa quando se trata de informações a respeito da herança do teor de isoflavonas em sementes de soja. Apenas um trabalho foi encontrado na literatura no qual a herdabilidade é estimada para os teores das isoflavonas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) (Meksem et al., 2001). Informações a respeito das estimativas de herdabilidades são muito importantes para os processos de seleção em programas de melhoramento de qualquer espécie, pois possibilitam a avaliação da potencialidade da população para o melhoramento e facilita as decisões de escolha do método de seleção mais adequado e eficiente.

3.3. Correlações nas Progênes F₃

As estimativas dos coeficientes de correlação fenotípica entre os teores das formas de isoflavonas e entre o teor de cada isoflavona e teor de proteína estão apresentadas na Tabela 3.

Os teores de daidzina, genistina, malonildaizina e malonilgenistina apresentaram coeficientes de correlação fenotípica e genotípica positivos e de grande magnitude entre si e com teor de isoflavonas totais, variando de 0,80 a 0,98. Esse resultado indica que as plantas com maior teor de daidzina, por exemplo, também apresentam maiores teores de genistina, malonildaizina, malonilgenistina e de isoflavonas totais, possibilitando proceder a seleção de forma conjunta para essas características.

As correlações fenotípicas das formas de isoflavonas estudadas com teor de proteína foram todas negativas, variando de, -0,51 a -0,37, e entre isoflavonas totais e teor de proteína foi -0,47, confirmando a tendência de correlação negativa entre essas características. Pois, segundo Wilson (2001) variedades com alto teor de proteína (50% ou mais) apresentaram baixo teor de isoflavonas.

Os resultados observados estão de acordo com os obtidos por Chamel José et al. (2002), que encontraram um coeficiente de correlação negativo de -0,41, estudando 30 genótipos de soja provenientes do banco de germoplasma do programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV, cultivados em campo experimental na safra 2000/2001. Tal fato, revela a dificuldade em se realizar simultaneamente seleção para altos teores de isoflavonas e de proteína. Essa dificuldade pode ser um empecilho aos programas de melhoramento que visam aumentar o teor e a qualidade da fração protéica dos grãos de soja, podendo ser minimizada, caso a seleção seja feita de uma forma combinada para as duas características, utilizando-se índice de seleção.

Por outro lado, a existência de correlação negativa pode ser favorável para aqueles programas que visam obter variedades de soja com melhor sabor, diminuindo os teores dos constituintes que aumentam o sabor desagradável que limita o consumo da soja pelos países ocidentais, tais como as isoflavonas. Elas têm sido relacionadas com o aumento do gosto amargo e da sensação de adstringência da soja (Carrão-Panizzi et al., 1999). Neste caso pode ser interessante para o melhorista selecionar para o aumento do teor de proteína e indiretamente diminuir o teor de isoflavonas nas sementes, sem a necessidade de monitorar esta característica.

Deve-se salientar que o teor de isoflavonas, além de ser condicionado por fatores genéticos, sofre grande influência do ambiente (Wang e Murphy, 1994; Hocck et al., 2000; Lee et al., 2002). Portanto, as correlações observadas neste

trabalho deverão ser determinadas também em diferentes condições ambientais e em diferentes gerações e até mesmo diferentes populações para se tirar melhores conclusões.

Tabela 3: Coeficientes de correlação fenotípica (r_F) entre os teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), malonildaidzina (MDAID), malonilgenistina (MGEN), isoflavonas totais (ISOF) e proteína (PROT) estudadas nas progênes F₃.

	r_F				
	GEN	MDAID	MGEN	ISOF	PROT
DAID	0,87**	0,98**	0,83**	0,89**	-0,40**
GEN		0,82**	0,94**	0,89**	-0,51**
MDAID			0,80**	0,88**	-0,37**
MGEN				0,92**	-0,44**
ISOF					-0,47**

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

4. CONCLUSÕES

- Seis formas de isoflavonas foram encontradas nas sementes de soja analisadas: daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina. Glicitina e malonilglicitina não foram significativamente contrastantes entre os progenitores.
- Altas estimativas de herdabilidade no sentido amplo para o teor das isoflavonas indicam que a seleção pode ser realizada em gerações precoces.
- As estimativas de correlações fenotípicas entre os teores das isoflavonas foram todas positivas e de grande magnitude, o que torna possível melhorar simultaneamente para todas as formas de isoflavonas.
- Confirmou-se a tendência de correlação negativa entre teor de isoflavonas e teor de proteína em sementes de soja, pois as estimativas de correlações fenotípicas entre o teor de cada isoflavona estudada com o teor de proteína foram todas negativas e também entre o teor de isoflavonas totais e teor de proteína.
- A existência de correlação negativa pode ser um empecilho aos programas de melhoramento que visam aumentar o teor e a qualidade protéica dos grãos de soja, podendo ser minimizada, caso a seleção seja feita de uma forma combinada para as duas características, utilizando-se índice de seleção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, Washington, DC, 1975, 1094 pp.
- Barnes, S; Kim, H.; Xu, J. Soy the prevention and treatment of chronic diseases. *In: Anais do Congresso Brasileiro de Soja*, Londrina, p. 265-308, 1999.
- Carrão-Panizzi, M.; Kitamura, K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Sci.**, v. 45, n. 3, p. 295-300, 1995.
- Carrão-Panizzi, M.; Beléia, A. D. P.; Prudêncio-Ferreira, S. H.; Oliveira, M. C. N.; Kitamura, K. Effects of isoflavones on beany flavor and astringency of soymilk and cooked whole soybean grains. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 34, n. 6, p. 1045-1052, 1999.
- Chamel José, I.; Chiari, L.; Piovesan, N. D.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Correlações entre teores de isoflavonas e de proteína e óleo de sementes de soja. *In: Anais do II Congresso Brasileiro de Soja e Mercosoja*, p. 347, 2002.
- Choi, J. S. C.; Kwon, T. W.; Kim, J. S. Isoflavone contents in some varieties of soybean. **Foods Biotech.**, v. 5, p. 167-169, 1996.
- Drewnowski, A.; Gomez-Carneros, C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 1424-1435, 2000.
- Dudley, J. M.; Moll, R. H. Interpretation and use of estimates of heritability and genetics variances in plant breeding. **Crop Sci.**, v. 9, n. 3, p. 257-262, 1969.
- Erdman, J. W. Jr; Potter, S. M. Soy and bone health. **The Soy Connection**, v. 5, n. 2, p. 1-4, 1997.

- Falconer, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1987. 279 p.
- Griffith, A. P.; Collison, M. W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatography A**, v. 913, p. 397-413, 2001.
- Hocck, J. A.; Fehr, W. R.; Murphy, P. A.; Welke, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Sci.**, v. 40, p. 48-51, 2000.
- Honoré, E. K.; Williams, J. K.; Anthony, M. S. Enhancement of coronary vasodilatation by soy phytoestrogens and genistein. **Circulation**, v. 92 (abstract), p. 349, 1995.
- Johnson, H. W.; Robinson, H. F.; Constock, R. E. Genotypic and phenotypic correlations in soybeans and their implications in selection. **Agron. J.**, v. 47, p. 477-483, 1955.
- 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.
- Kanazawa, T.; Osanai, T.; Zhang, X. S. Protective effects of soy protein on the peroxidisability of lipoproteins in cerebral vascular diseases. **J. Nutr.**, v. 125, p. 639S-646S, 1995.
- Kitamura, K.; Igita, K.; Kikuchi, A.; Kudou, S.; Okubo, K. Low isoflavone content in some early maturing cultivars, so-called "summer-tupe soybeans" (*Glycine max* (L.) Merrill). **Japan. J. Breed.**, v. 41, p. 651-654, 1991.

- Kudou, S.; Fleury, Y.; Welti, D.; Magnolato, D.; Uchida, T.; Kitamura, K.; Okubo, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine Max* Merrill). **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.
- Kurzer, M. S. Hormonal effects of soy isoflavones: studies in premenopausal and postmenopausal women. **J. Nutr.**, v. 130, p. 660S-661S, 2000.
- Kwon, S. H.; Torrie, J. H. Heritability of and interrelationships among traits of two soybean populations. **Crop Sci.**, v. 4, p. 196-198, 1964.
- Lee, S. J.; Yan, W.; Ahn J. K.; Chung, M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Res.**, v. 4150, p. 1-12, 2002.
- Leffel, R.C. Registration of high-protein soybean germplasm lines BARC-6, BARC-7, BARC-8 and BARC-9. **Crop Sci.**, v. 32, p. 502, 1992.
- Meksem, K; Njiti, V. N.; Banz, W. J.; Iqbal, M. J.; Kassem, My. M.; Hyten, D. L.; Yuang, J.; Winters, T. A.; Lightfoot, D. A. Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content. **J. Biomed. Biotech.**, v. 1, n. 1, p. 38-44, 2001.
- Messina, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European J. Cancer**, v. 36, p. S71-S77, 2000.
- McKendry, A. L.; McVetty, P. B. E.; Voldeng, H. D. Inheritance of seed protein and seed oil content in early maturing soybean. **Canadian J. Gen. Cytol.**, v. 27, p. 603-607, 1985.
- Nilausen, K.; Meinertz, H. Lipoprotein (a) and dietary proteins: casein lowers lipoprotein (a) concentrations as compared with soy protein. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p. 419-425, 1999.

- Piovesan, N. D. **Aplicação de cruzamentos dialélicos no melhoramento genético do teor protéico em soja.** Viçosa, MG, UFV, 2000. 91 p. (Tese M. S.).
- Ramalho, M. A. P. **Genética quantitativa em plantas autógamas; aplicações ao melhoramento do feijoeiro.** Magno A. P. Ramalho, João Bosco dos Santos e Maria José de O. Zimmermann. Goiânia: Editora da UFG, 1993. 271 p.
- Setchell, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 6 (Suppl.), p. 1333S-1346S, 1998.
- Sing, L.; Hadley, H. H. Maternal and cytoplasmic effects on seed protein content in soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Sci.**, v. 12, p. 583-585, 1972.
- Tikkanen, M. J.; Wähälä, K. Ojala, S.; Wihma, V.; Adlercreutz, H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.95, p.3106-3110, 1998.
- Tsukamoto, C.; Shimada, S., Igita, K.; Kudou, S.; Kokubun, M.; Okubo, K.; Kitamura, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 1184-1192, 1995.
- Wang, H. J.; Murphy, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.
- Wilson, R. F. Developing agronomic high-protein soybeans. **Innov. Food Technol.**, September, p. 14-15, 2001.