

CARLOS ANDRÉ GONÇALVES

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO ACÚMULO DE PROTEÍNAS DE
RESERVA EM SEMENTES DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientie”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

CARLOS ANDRÉ GONÇALVES

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO ACÚMULO DE PROTEÍNAS DE
RESERVA EM SEMENTES DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Magister Scientie".

APROVADA: 12 de julho de 2002.

Prof. Carlos Alberto Martinez Y Huaman
(Conselheiro)

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof. João Marcos Araújo

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

Aos meus Mentores...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus,
por ter me presenteado a vida e sempre iluminá-la.
Aos meus Pais e Irmãos,
que incondicionalmente sempre me apoiaram nos diversos momentos de
minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e ao BIOAGRO pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CAPES e à FAPEMIG pela concessão de fomento.

Ao Prof. Everaldo Gonçalves de Barros, pela paciência, confiança, ensinamentos, apoio e convívio, pelos quais, foi primordial para a conclusão do curso.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal e Biologia Geral que muito contribuíram para o meu aperfeiçoamento e aquisição de conhecimentos.

Ao professor João Marcos Araújo, pela presença e contribuição acadêmica.

À professora Elza Fernandes que decisivamente contribui para o meu ingresso na UFV.

Aos professores Antonio Wilson e Maria Lúcia Almeida, pela confiança e iniciação nos trabalhos científicos.

Ao professor Zenon Silva pela amizade e orientações profissionais.

A todos os colegas e amigos do BIOAGRO que proporcionaram-me o melhor convívio de amizade e trabalho.

Ao Antônio Vieira, Francisco de Alcântara, Lucas Koshi, Newton Piovesan e à Rita Moraes. Especialmente estes que além da amizade, muito contribuíram instruindo-me.

A todos os colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, que por muito estavam ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos amigos pessoais: Andréa Ávila, Alair Silva, Fábio Acosta, Marilene Dias, Thiago Soares e Valéria Acosta; pelo encorajamento e apoio.

Aos amigos Carlos Menezes e Geraldo Sadoyama, pela confiança e apoio.

Ao meu sempre querido avô Romero Mariano, que muito lutou para presenciar as conquistas em minha vida.

Ao inesquecível amigo Jair Júnior. Simplesmente por tudo.

Ao Sr. Manoel Inácio, até mesmo por eu ter vida!

Obrigado.

BIOGRAFIA

CARLOS ANDRÉ GONÇALVES, filho de Reni Neiva Gonçalves e Carlos de Souza Gonçalves, nasceu em Paracatu no estado de Minas Gerais, aos 03 dias do mês de fevereiro de 1976.

Em fevereiro de 1994, iniciou o curso de Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia, MG, vindo a graduar-se em fevereiro de 1999. Em fevereiro de 2000, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, MG.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Origem, expansão e diversidade genética da soja.....	4
2.2. Proteínas da soja.....	6
2.3. Composição química da semente da soja <i>versus</i> ambiente.....	8
2.4. Produtividade da soja: ganhos nos programas de melhoramento.....	9
2.5. Produtividade <i>versus</i> teor de proteína.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Material vegetal, plantio e delineamento experimental.....	12
3.2. Monitoramento da temperatura.....	13
3.3. Determinação das proteínas totais.....	13
3.4. Quantificação das proteínas de reserva.....	14
3.5. Tratamento estatístico dos dados.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
CONCLUSÕES.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

RESUMO

GONÇALVES, Carlos André, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2002. **Influência da temperatura no acúmulo de proteínas de reserva em sementes de soja.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Carlos Alberto Martinez Y Huaman e Maurílio Alves Moreira.

O intensivo processo de melhoramento ao qual a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) vem sendo submetida ao longo de várias décadas tem causado um decréscimo substancial no conteúdo de proteínas acumulado na semente. O processo de melhoramento tem favorecido a seleção de características, como a produtividade, a adaptabilidade e o conteúdo de óleo da semente. Esta última correlaciona-se negativamente com o teor de proteína, o que provavelmente explica o decréscimo do conteúdo protéico em variedades brasileiras, especialmente as desenvolvidas para a região sul do país. A aparente correlação negativa entre teor de proteína e produção de grãos em soja não parece oferecer nenhuma limitação ao desenvolvimento de variedades que sejam simultaneamente produtivas e com altos teores de proteínas. O programa de melhoramento de qualidade da soja desenvolvido pelo BIOAGRO/UFV, tem obtido uma série de linhagens de soja com elevados teores de proteínas (maiores que 45%), e com alto potencial produtivo. Porém, estes materiais quando submetidos a diferentes condições de plantio (como por exemplo, o regime da temperatura ambiental), apresentam variações no seu

conteúdo protéico. Buscando fornecer respostas quanto à influência dos diferentes regimes de temperatura na determinação do teor de proteína em soja, o presente trabalho teve como principais objetivos: determinar o conteúdo de proteínas de sementes maduras do cultivar CAC-1 e da isolinha CAC-1 PTN (com elevado teor protéico), comparar, durante o enchimento do grão, o perfil protéico de sementes entre estes cultivares e avaliar, durante o enchimento do grão, a influência dos diferentes regimes de temperatura ambiental, sobre o conteúdo de proteína dos dois cultivares. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com ventilação forçada (temperatura média de cerca de 20 °C) ou em casa de vegetação com aquecimento (temperatura média de cerca de 28 °C). A determinação do conteúdo de proteína foi feita pelo método Kjeldhal e ou por densitometria em gel de poliacrilamida. Por meio da análise de variância (ANOVA) verificou-se que o regime de alta temperatura ambiental determinou um maior acúmulo de proteínas na semente. As proteínas de reserva também acumularam de maneira diferencial e em maior quantidade no regime de alta temperatura. Verificou-se, ainda, que o cultivar CAC-1 PTN acumulou maior quantidade de proteínas na semente nos dois regimes de temperatura, quando comparado à isolinha CAC-1. Isso ocorreu mesmo quando comparados os dados obtidos para o cultivar CAC-1 sob regime de alta temperatura e aqueles obtidos para a isolinha CAC-1 PTN em regime de baixa temperatura.

ABSTRACT

GONÇALVES, Carlos André, M.S. Universidade Federal de Viçosa, July 2002.

The influence of the temperature on the accumulation of storage proteins in soybean seeds. Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Advisory committee members: Carlos Alberto Martinez Y Huaman and Maurílio Alves Moreira.

The intensive breeding process to which soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) has been submitted along several decades has caused a substantial decrease on the protein content deposited in the seed. The breeding process has favored the selection of traits such as productivity, adaptability, and oil content. The negative correlation between the later and protein content probably explains the decrease on the protein levels of Brazilian varieties, especially those developed for Southern Brazil. The apparent negative correlation between protein content and grain production in soybean does not seem to prevent the creation of cultivars which are productive and accumulate high levels of protein at the same time. The soybean breeding program conducted at BIOAGRO (Federal University of Viçosa) has developed several advanced lines with high protein contents (greater than 45%), and with high yield potential. However, it has been noticed that the protein content of these materials varies considerably depending on the environmental conditions they are cultivated. The present work tries to elucidate the influence of temperature

on the accumulation of protein in the soybean seed. The specific goals of the work were: to determine the protein content in mature seeds of cultivar CAC-1 and of the high-protein isolate CAC-1 PTN and to compare the protein accumulation profile of these two cultivars grown under different temperature regimes. The plants were cultivated in a greenhouse with forced ventilation, with an average temperature of 20 °C or in a heated greenhouse, with an average temperature of 28 °C. Protein content was determined by the Kjeldhal method or by densitometry in polyacrylamide gels. Variance analyses (ANOVA) showed that under high temperature the amount of protein accumulated in the seeds was greater than at lower temperatures. The accumulation of the storage proteins paralleled that of the total seed protein. The data also showed that cultivar CAC-1 PTN accumulated more protein in the seed under both temperature regimes when compared to CAC-1. This was observed even when the comparison was between CAC-1 grown under high temperature and CAC-1 PTN grown under low temperatures.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) constitui um dos produtos agrícolas de maior importância econômica para o Brasil, sendo cultivada desde o Rio Grande do Sul até a região amazônica. Como resultado dos esforços do melhoramento genético, atualmente, existe um grande número de cultivares disponíveis e adaptados a todas as regiões brasileiras.

O interesse mundial pelo cultivo da soja deve-se à excelente combinação que ela apresenta entre produtividade, conteúdo de óleo e conteúdo de proteína (WOBUS et al., 2000). Portanto, o melhoramento genético da soja depende do entendimento dos fatores genéticos e fisiológicos que afetam tais caracteres. Os programas de melhoramento de soja têm se concentrado no desenvolvimento de variedades mais produtivas; mais recentemente, há também uma preocupação com características de qualidade, tais como conteúdo e composição do óleo e da proteína de reserva. Para isto, o melhorista tem recorrido ao germoplasma, tanto o adaptado como o silvestre, à busca de variabilidade genética. Esses novos materiais e as linhagens deles derivadas precisam ser caracterizadas sob o ponto de vista fisiológico.

As primeiras variedades de soja cultivadas no Brasil, no início dos anos 70 foram introduções de variedades americanas ou derivadas de cruzamentos entre elas. Sabe-se também que os programas de melhoramento nessa época, principalmente nos Estados Unidos, priorizavam o desenvolvimento de variedades produtivas e com teor elevado de óleo. Pelo fato deste último estar

negativamente correlacionado com teor de proteína, este tem se mantido em torno de 40%, embora o potencial de acúmulo de proteínas da soja seja maior (cerca de 50%), de acordo com KRISHNAN et al. (2000).

Atualmente, o farelo de soja é o principal subproduto das indústrias de processamento no Brasil, sendo que a maior parte dele (cerca de 65%) destina-se à exportação. O teor de proteína no farelo influencia na formação do seu preço, sendo assim, há um interesse no desenvolvimento de variedades produtivas e com alto teor de proteína. No entanto, existe uma limitação de natureza genética: o germoplasma de soja adaptado ao Brasil não apresenta genes para alto teor de proteína. Uma das alternativas para solucionar esse problema seria a introdução de genótipos exóticos com alto teor de proteína nos programas de melhoramento. Todavia, deve-se ter em mente que os genótipos exóticos normalmente apresentam baixo potencial produtivo e que o programa deve ser direcionado no sentido de recuperar os genes ligados à produtividade presentes no material adaptado.

A aparente correlação negativa entre teor de proteína e produção de grãos em soja não parece oferecer nenhuma limitação ao desenvolvimento de variedades que sejam simultaneamente produtivas e com altos teores de proteínas. Isto foi demonstrado no trabalho desenvolvido por WILCOX & CAVINS (1995) que, utilizando uma série crescente de retrocruzamentos, obtiveram, ao final do terceiro retrocruzamento, progênies com alto teor de proteína e alta produtividade.

O programa de melhoramento de qualidade da soja desenvolvido pelo BIOAGRO/ UFV, tem obtido uma série de linhagens de soja com elevados teores de proteínas (maiores que 45%), e com alto potencial produtivo. Porém, estes materiais quando submetidos a diferentes condições de plantio, apresentam variações no seu conteúdo protéico. Segundo SEDIYAMA et al. (1996), fatores ambientais, como o regime da temperatura, não parecem afetar a produção de proteínas na semente. De fato, WOLF et al. (1982) demonstraram que o conteúdo de proteína da semente é bastante estável entre 18 e 30 °C, no entanto, aumenta significativamente quando a temperatura diurna se eleva a 33 °C. A influência ambiental sobre esse caráter constitui

excelente tema para estudos fisiológicos utilizando metodologias bioquímico-moleculares.

À medida em que tais interações são elucidadas, procedimentos mais eficientes de melhoramento podem ser desenvolvidos para a criação de variedades mais produtivas e com alto conteúdo de proteínas.

Buscando fornecer respostas quanto à influência dos diferentes regimes de temperatura na determinação do teor de proteína em soja, o presente trabalho teve como principais objetivos:

1. Determinar o conteúdo de proteínas de sementes maduras do cultivar CAC-1 e da isolinha CAC-1 PTN (com elevado teor protéico);
2. Comparar, durante o enchimento do grão, o perfil protéico de sementes do cultivar CAC-1 e da isolinha CAC-1 PTN;
3. Avaliar, durante o enchimento do grão, a influência dos diferentes regimes de temperatura ambiental, sobre o conteúdo de proteína do cultivar CAC-1 e da isolinha CAC-1 PTN.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Origem, expansão e diversidade genética da soja

A espécie *Glycine soja* é considerada o mais provável ancestral da qual a *Glycine max*, a soja cultivada, teria evoluído. Uma vez que *Glycine soja* e *Glycine max* são tetraplóides, acredita-se que a forma cultivada tenha derivado de *Glycine soja*, em razão do acúmulo de características qualitativas e quantitativas resultantes de mutações genéticas, sem que houvesse alteração no número de cromossomos. Não há concordância entre diferentes autores quanto ao local específico a partir do qual a soja cultivada surgiu. Entretanto, há um consenso de que sua origem se deu na região Leste da Ásia (BONETTI, 1981; BURTON, 1997).

A partir da Ásia, a soja chegou à Europa no início do século XVIII, na América do Norte no início do século XIX e no final desse mesmo século, na América do Sul (BONETTI, 1981). No Brasil, os relatos indicam que a soja foi introduzida ainda no século XIX. Mas, somente a partir de 1950, motivada pela crescente demanda de óleos comestíveis e pelo apoio governamental, passou a ter importância, ficando definitivamente estabelecida no país em meados de 1960. Entretanto, seu cultivo somente alcançou uma larga escala na década de 70, quando, no período de 1970 a 1977, a produção teve um crescimento anual de 32% (BONATO & DALL'AGNOLL, 1985).

No início do cultivo da soja no Brasil, a introdução de linhagens e variedades, seguida de seleção, constituiu o principal método de melhoramento adotado. Segundo BONATO & BONATO (1987), a fácil adaptação de variedades norte-americanas de ciclo médio e tardio à região Sul do Brasil e a importação de técnicas de cultivo oriundas do Sul dos EUA foram alguns dos principais fatores que contribuíram para a fixação e desenvolvimento da cultura no Brasil.

A diversidade genética em soja tem sido estudada com base em características morfológicas, coeficiente de parentesco, isozimas e marcadores moleculares do tipo RFLP, RAPD, AFLP e microssatélites (GIZLICE et al., 1993; MAUGHAN et al., 1996; GERBER et al., 1999; WOBBUS et al., 2000).

GIZLICE et al. (1993) citam que nos EUA a base genética das variedades recomendadas é constituída de pouco mais que 15 progenitores. HIROMOTO & VELLO (1986) determinaram a base genética do germoplasma da soja cultivada no Brasil e compararam o grau de similaridade do germoplasma brasileiro com o norte-americano. Utilizando o coeficiente de parentesco de Malècot, os autores identificaram 26 ancestrais do terceiro ciclo de melhoramento brasileiro da soja. Destes, 11 progenitores contribuíram individualmente com proporções variáveis de 3 a 15% e contribuição acumulada de 89% do conjunto gênico das variedades brasileiras. Seis destes são também os mais freqüentes nas variedades norte-americanas. Alguns destes ancestrais foram procedentes das mesmas regiões da China e da Coréia. Esses dados mostram que a base genética do germoplasma adaptado às condições brasileiras é muito restrita. VELLO et al. (1988) afirmaram que das 74 variedades recomendadas para o cultivo no ano agrícola 1983/ 84, 15% eram oriundas de introduções de variedades norte-americanas, enquanto as 85% restantes foram obtidas de cruzamentos biparentais entre introduções norte-americanas.

Em geral, os trabalhos realizados a respeito da divergência genética em plantas têm como objetivos: caracterizar variedades, buscar informações sobre a constituição genética de germoplasmas e ter acesso à variabilidade das culturas.

2.2. Proteínas da soja

As proteínas de soja constituem cerca de 35 a 45% da matéria seca da semente. As proteínas de reserva, glicinina (11S) e β -conglucina (7S), que pertencem ao grupo das globulinas, representam em torno de 70% da proteína do grão de soja (HILL & BREIDENBACH, 1974).

A glicinina apresenta massa molecular de aproximadamente 350 kDa, sendo constituída por polipeptídeos de caráter ácido e de caráter básico, os quais diferem da β -conglucina em seus conteúdos de metionina (MOREIRA et al., 1979; COATES et al., 1985). A glicinina é constituída de seis polipeptídeos ácidos (A1a, A1b, A2, A3, A4 e A5) e cinco básicos (B1a, B1b, B2, B3 e B4), que se encontram associados de modo específico, por meio de ligações dissulfídicas, geralmente entre um ácido e um básico, formando as subunidades A1aB2, A1bB1b, A2B1a, A3B4 e A5B3 (MOREIRA et al., 1979, 1981). O polipeptídeo A4 está associado ao B3, por meio de ligações não covalentes, formando a subunidade A5A4B3 (STASWICK et al., 1981). Atualmente, essas subunidades são denominadas G1 (A1aB2), G2 (A1bB1b), G3 (A2B1b), G4 (A5A4B3) e G5 (A3B4) e seus genes, *Gy1*, *Gy2*, *Gy3*, *Gy4* e *Gy5*, respectivamente. Os polipeptídeos A1a, A1b, A2, B1 e B2 possuem de três a seis vezes mais metionina que A3, A4, A5, B3 e B4 (MOREIRA et al., 1979). Em glicinina têm sido observadas variações na composição polipeptídica, como mutantes naturais com ausência do complexo G4 (FONTES et al., 1984).

As cinco subunidades da glicinina podem ser divididas em dois grupos baseados na homologia da seqüência de aminoácidos (NIELSEN et al., 1989). G1, G2 e G3 são subunidades do Grupo 1; G4 e G5 são subunidades do Grupo 2. A homologia das seqüências entre subunidades de um mesmo grupo está em torno de 90% mas, está em torno de somente 50%, quando membros de grupos diferentes são comparados.

O Grupo 1 é codificado por genes presentes em dois domínios cromossômicos distintos. Um domínio contém dois genes de glicinina ligados (*Gy1* e *Gy2*) e o outro contém o gene *Gy3*. Os dois domínios têm alto grau de homologia e contêm no mínimo cinco genes cada, que são expressos em

embriões ou em folhas de plantas maduras. Dois outros genes têm sido identificados e designados como glicinina-relacionados e podem codificar outras famílias de subunidades de glicinina que se acumulam em menor quantidade nas sementes (NIELSEN et al., 1989). DIERS et al. (1994), mapearam os genes *Gy4* e *Gy5* da glicinina em uma população obtida do cruzamento inter-específico de *Glycine max* x *G. soja* e encontraram que estes genes estão localizados nos grupos de ligação “O” e “F”, respectivamente.

A β -conglucina é uma glicoproteína com massa molecular estimada em 150-170 kDa e possui três subunidades, α' , α e β , sendo codificadas pelos genes *Cgy1*, *Cgy2* e *Cgy3*, respectivamente (THANH & SHIBASAKI, 1977; UTUMI et al., 1998; KRISHMAN et al., 2000). As subunidades α e α' possuem dois e três resíduos de metionina, respectivamente, e a subunidade β não possui esse aminoácido (COATES et al., 1985). Existe polimorfismo genético na composição polipeptídica de β -conglucina, tendo sido identificado genótipo com ausência de α' (KITAMURA et al., 1984). Subunidades menores dessa globulina, designadas β' , γ e δ , também têm sido descritas (COATES et al., 1985). HARADA et al (1989) verificaram que a família de genes da β -conglucina contém no mínimo 15 membros que estão distribuídos entre seis regiões distintas do genoma. Três destas regiões contêm genes múltiplos (região A, cinco genes; região B, dois; região C, três; regiões D, E e F, um cada).

Existe também, uma terceira classe de proteínas de reserva pertencente ao grupo das globulinas, denominada 8S, que é composta por um polipeptídeo básico unido por meio de ligação bissulfídrica a um polipeptídeo ácido. Esta globulina representa de 5 a 10% da proteína total da semente de soja (NIELSEN, 1996). Além destas proteínas de reserva, as sementes de soja possuem outras proteínas, algumas delas com atividade catalítica, tais como lipoxigenases e ureases, além de inibidores de proteases e lectinas. Estas proteínas representam menos de 8% da proteína total (NIELSEN, 1996; UTUMI et al., 1998).

Ao comparar o conteúdo de glicinina e β -conglucina em várias linhagens de soja, YAKLICH (2001) verificou que estas proteínas se acumulam

em maior quantidade e diferencialmente nas linhagens com maior conteúdo de proteínas na semente.

2.3. Composição química da semente de soja *versus* ambiente

A composição de proteínas e óleo em sementes de soja é influenciada pelo ambiente durante o processo de enchimento de sementes (GIBSON & MULLEN, 1996a; GIBSON & MULLEN, 1996b). A concentração protéica da soja produzida no sul dos Estados Unidos é geralmente maior que a da região norte, entretanto, a concentração de óleo é geralmente maior na soja produzida nas regiões norte e oeste daquele país (GIBSON & MULLEN, 1996a). Segundo estes autores, temperaturas médias altas (dia e noite) estão correlacionadas com alta concentração de óleo. A concentração de proteínas em sementes maduras de soja é geralmente inversamente correlacionada com a concentração de açúcares e óleos. Um aumento de 1% na concentração de proteína foi associada a um declínio de 0,43% na concentração de óleo (GIBSON & MULLEN, 1996a).

Segundo GIBSON & MULLEN (1996b), a concentração de proteínas, óleo e composição de ácidos graxos têm uma forte relação com a temperatura ambiente durante a fase de enchimento das sementes. A concentração de proteínas diminuiu entre 21 e 27°C e aumentou com o incremento da temperatura até 35°C. Ainda segundo estes autores, a concentração de óleo aumentou entre 21 e 29°C e depois diminuiu com o aumento da temperatura até 35°C.

Os resultados dos trabalhos de GIBSON & MULLEN (1996b) demonstraram que as concentrações dos ácidos graxos específicos na soja, também são influenciadas pelo ambiente durante o desenvolvimento das sementes. Em trabalhos de pesquisa realizados em oito ambientes diferentes, a temperatura foi a principal variável na determinação da composição de ácidos graxos. Temperaturas mais elevadas foram associadas com o aumento na percentagem de ácido oléico e com a diminuição nas concentrações de ácido linoléico e linolênico. A soja produzida no sul dos Estados Unidos continha menos ácido linolênico e mais ácido oléico que as produzidas no norte.

SEDIYAMA et al. (1996) demonstraram que no Brasil a situação não é diferente. O conteúdo de óleo em sementes de soja, por exemplo, depende da temperatura durante o desenvolvimento da vagem. Sementes desenvolvidas em temperaturas de 21°C apresentaram um conteúdo de óleo de 19,5%, enquanto aquelas desenvolvidas a 30°C apresentaram 22,3% de óleo. SEDIYAMA et al. (1996) ainda relatam que, o conteúdo de proteína na semente de soja está, em geral, inversamente associado ao teor de óleo.

WOLF et al. (1982) acompanharam o acúmulo de proteínas em sementes da variedade de soja Fiskeby V, em casa de vegetação, sob o seguinte regime de temperatura (dia e noite): 24 e 19°C, respectivamente, até o começo da germinação e com os seguintes regimes até a maturidade: 18 e 13°C; 24 e 19°C; 27 e 22°C; 30 e 25°C ou 33 e 28°C. Verificaram que há um aumento do conteúdo de proteína na semente com o aumento da temperatura durante o período de enchimento da semente. Demonstraram, também, que o conteúdo de proteínas é bastante estável entre 18 e 30°C, mas tem um aumento significativo em temperatura diurna de 33°C.

Segundo SEDIYAMA et al. (1996), a temperatura não parece estar fortemente associada com o conteúdo de proteína. Estudos conduzidos por estes autores em casa de vegetação demonstraram que a temperatura diurna afetou o conteúdo de metionina da proteína em soja. A 32°C, o teor de metionina no cultivar Lincoln foi de 1,40% e a 21°C, o teor de metionina foi de 1,13%. Os autores concluíram que a soja produzida em ambientes mais quentes podem ter melhor qualidade de proteína para uso na alimentação.

2.4. Produtividade da soja: ganhos nos programas de melhoramento

WAKAWKAR et al. (1976) sugeriram levar em conta, em programas de seleção, visando o aumento de produção em soja, os caracteres número de ramos, número de dias para florescimento e maturação e número de vagens por planta, pois foram os caracteres que tiveram altos efeitos positivos diretos e indiretos, perante todos os componentes de produção.

Para produtividade tem sido detectadas correlações genéticas altas e positivas com maturação e altura da planta (KNOW & TORRIE, 1964; BYTH et al., 1969). Em quatro populações (geração F6) BYTH et al. (1969) detectaram correlações genéticas positivas entre produtividade e maturação, com magnitudes variando de 0,33 a 0,52. As correlações entre produtividade e altura de planta foram negativas, com magnitudes variando de -0,06 a -0,26.

SIMPSON & WILCOX (1983) encontraram correlações fenotípicas altamente significativas e positivas entre produtividade e maturação, altura da planta e acamamento.

THORNE & FEHR (1970) estudaram cruzamento entre cultivares de soja adaptados e introduções com alto teor de proteína. As populações foram avançadas até F6 para cruzamentos biparentais e F5 para cruzamentos triparentais. A correlação fenotípica estimada para as diversas populações variou entre -0,84 e -0,54 para teor de proteína e teor de óleo, e entre -0,38 e -0,28 para teor de proteína e produção de grãos, o que seria suficiente para permitir seleção de linhagens com alta produção e alto teor de proteína.

BRIM & BURTON (1979) praticaram ciclos de seleção recorrente para teor de proteína em quatro populações de soja. Obtiveram aumentos de 0,30 a 0,70% por ciclo, na média do caráter. Como a seleção não levou em consideração a produção de grãos, ocorreu uma diminuição desta em duas populações.

WEHRMANN et al. (1987) utilizaram o método de retrocruzamentos na tentativa de transferir genes que aumentam o teor protéico para três cultivares de alta produção e de ciclos diferentes a partir de linhagens pouco adaptadas. Esses autores trabalharam com três populações formadas por cruzamentos biparentais, avançadas até F3 e retrocruzadas duas vezes com os materiais recorrentes. Os autores chegaram à conclusão que dois retrocruzamentos possibilitaram selecionar linhagens com alto teor protéico e produtivas, principalmente na população de ciclo tardio.

HOLBROOK et al. (1989) avaliaram a utilização de índices de seleção para aumento de produção com a manutenção do teor de proteína na semente. Apesar da freqüente correlação negativa entre estes dois caracteres, obtiveram

aumentos significativos na produção, sem alteração no teor de proteína, por meio da utilização de índices de seleção restrito.

2.5. Produtividade *versus* teor de proteína

WILCOX & CAVINS (1995) estudaram correlações entre teor de proteína e produção de grãos, por meio de uma série crescente de retrocruzamentos entre dois progenitores contrastantes para estas duas características. Esses autores verificaram uma correlação negativa decrescente entre teor de proteína e produção de grãos, à medida que se avançaram os retrocruzamentos, obtendo no final do terceiro retrocruzamento linhagens produtivas e com alto teor de proteína.

Estudando o comportamento de linhagens de soja F5, derivadas de oito cruzamentos entre materiais adaptados e entre materiais adaptados *versus* não-adaptados, com níveis diferentes de proteína, encontraram correlações positivas, entre produção de grãos e teor de proteína em todos os cruzamentos (SCOTT & KEPHART, 1997).

XINHAI et al. (1999) determinaram correlações genéticas entre teor de proteína e produção de grãos e entre teor de proteína e componentes de produção em uma população derivada do cruzamento entre *Glycine max* e *Glycine soja*, utilizando cinco diferentes métodos de seleção. Em seus resultados, os autores encontraram correlações entre teor de proteína e produção de grãos, variando de $-0,117$ a $-0,271$.

Correlações genéticas entre teor de proteína e produção de grãos parecem não oferecer obstáculos para a obtenção de novos genótipos de soja superiores quanto ao teor de proteína e a produção de grãos, desde que estratégias de genética quantitativa, e até mesmo ferramentas bioquímico-moleculares, sejam aplicadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal, plantio e delineamento experimental

Foram avaliados os conteúdos de proteínas, ao longo do enchimento das sementes, da variedade comercial CAC-1 e da linhagem quase-isogênica dela derivada, CAC-1 PTN. A variedade comercial CAC-1, desenvolvida pela COOPADAP (Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba), contém aproximadamente 40% de proteína. A linhagem CAC-1 PTN, desenvolvida pelo programa de melhoramento do BIOAGRO/UFV via retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares e técnicas de análises bioquímicas não destrutivas, contém aproximadamente 50% de proteína. Para a obtenção dessa isolinha, foram realizados após cada retrocruzamento seleção para teor de proteína em sementes da geração F2 por meio da técnica do ácido bicinconínico (SMITH et al., 1985). Ao final do segundo retrocruzamento as sementes F2 selecionadas foram autofecundadas até a geração F4 obtendo-se assim, isolinhas RC2F4. O teor de proteínas das plantas RC2F4 foi confirmado pelo método Kjeldhal (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC, 1975).

As sementes do cultivar CAC-1 e as sementes RC2F5 da isolinha de alto teor de proteína, foram semeadas em vasos de 3 litros contendo solo homogeneamente adubados ($73,2 \text{ mg/ dm}^3$ de P e 668 mg/ dm^3 de K) e então, mantidas em casa de vegetação no período de inverno do ano de 2001 (junho

a agosto). Para garantir uma maior disponibilidade de nitrogênio, as sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* (NITRAL URBANA).

Seguindo a metodologia de WOLF et al. (1982), as sementes plantadas germinaram em casa de vegetação com temperatura dia/noite de aproximadamente 24/19 °C até o estágio R2 (FEHR & CAVINESS, 1977) de desenvolvimento do grão. As plantas foram mantidas sob fotoperíodo de 14 horas de luz, com a utilização de luz artificial, a fim de garantir um crescimento homogêneo das mesmas; a soja é considerada uma planta de dia-longo.

A partir do estágio de desenvolvimento R2 (FEHR & CAVINESS, 1977), vasos foram distribuídos em duas casas de vegetação com temperaturas ambientes distintas. Em uma das casas de vegetação a temperatura ambiente foi controlada com o uso de ventilação forçada. Esta casa de vegetação foi denominada de ambiente com regime climático de baixa temperatura que também, deve-se ao o período de plantio. A outra casa de vegetação sofreu aquecimento artificial através de resistências elétricas. Nesta casa de vegetação, denominou-se ambiente com regime climático de alta temperatura.

O experimento foi montado utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições em arranjo fatorial (2x2x7), constituindo-se de dois genótipos, duas temperaturas e sete estádios de desenvolvimento. Cada parcela foi constituída de três plantas.

3.2. Monitoramento da temperatura

Em cada ambiente de temperatura ambiental foi realizada a leitura da temperatura máxima e mínima do dia, obtendo-se uma média. Para tal, utilizou-se um termômetro que registra a temperatura ambiental máxima e mínima de determinado dia. A leitura da temperatura ambiental foi tomada diariamente às 17:00 horas.

3.3. Determinação das proteínas totais

Foi analisado o acúmulo de proteína total ao longo do enchimento da semente, entre os estádios R3 e R8 (FEHR & CAVINESS, 1977) de

desenvolvimento. Para isso, foram coletadas sementes nas seguintes faixas de peso e designados os seguintes estádios de desenvolvimento da semente: até 75 mg (estádio 1), de 76 a 150 mg (estádio 2), de 151 a 225 mg (estádio 3), 226 a 300 mg (estádio 4), 301 a 375 mg (estádio 5), 376 a 450 mg (estádio 6) e semente madura (estádio 7).

O conteúdo de proteína total em cada estágio foi determinado pelo método de Kjeldhal (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC, 1975), quantificando-se o nitrogênio total e multiplicando o valor obtido pelo fator 6,25, para conversão do teor de nitrogênio em teor de proteína. Foram analisadas três repetições para cada estágio de desenvolvimento. As amostras para análise foram constituídas de frações de 0,3 g cada, obtidas a partir da moagem das sementes em moinho do tipo “Wiley”.

3.4. Perfil eletroforético das proteínas de reserva

Foram coletados 10 mg de fragmentos de sementes para extração das proteínas. A extração foi realizada por meio de maceração das amostras em gral contendo 600 μ L de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 8,5. Assumiu-se que a eficiência de extração das proteínas tenha sido a mesma para todos os estádios de desenvolvimento das sementes. Os extratos obtidos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 15 minutos em microcentrífuga Eppendorf 5415 C, à temperatura ambiente. Ao término da centrifugação, 60 μ L do sobrenadante foram retirados, evitando-se a porção oleosa que geralmente se forma na superfície do mesmo, e acrescentados de 30 μ L de tampão de amostra (3X) [Tris-HCl 0,187 M, pH 6,8, contendo glicerol 30% e SDS 6,9%], 20 μ L de azul de bromofenol 0,05% e 20 μ L de β -mercaptoetanol. Foram aplicados 25 μ L dessa mistura em cada poço do gel. A quantificação das subunidades protéicas foi corrigida utilizando-se um fator de correção. Este tem como base, a relação entre a quantidade teórica de 100 μ g de proteínas dividida pela quantidade real que foi aplicada. A quantidade aplicada foi calculada em função do peso da amostra extraída, das diluições realizadas e do teor de proteínas totais feita pela metodologia de Kjeldhal nos vários

estádios de desenvolvimento das sementes. Desta forma, as quantidades de proteínas aplicadas nos poços foram normalizadas para um valor de 100 µg.

A eletroforese (SDS-PAGE) foi desenvolvida em géis de poliacrilamida 12,5% (YAKLICH, 2001) por aproximadamente quatro horas a 100 Volts. As bandas protéicas foram reveladas com Coomassie Blue R-250, segundo metodologia de KWANYUEN & WILSON (2000).

As concentrações relativas das subunidades das proteínas de reserva foram determinadas com auxílio do “software” One Dscan (Scanalytics). Foram computadas, em três repetições, as densidades relativas de cada uma das bandas componentes das proteínas de reserva, tomando como referência as intensidades dos padrões de ovoalbumina (45,0 KDa) e de inibidor de tripsina de soja (21,5 KDa), ambos aplicados em igual quantidade de 1 µg (SIGMA).

3.5. Tratamento estatístico dos dados

Os dados dos caracteres avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) empregando-se o “software” SAS System (SAS INSTITUTE INC).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de soja foram cultivadas em dois ambientes distintos: na casa de vegetação com sistema de aquecimento (Figura 1) a temperatura média foi em torno de 28 °C, enquanto que na casa de vegetação com sistema de ventilação (Figura 2) a temperatura média foi em torno de 20 °C.

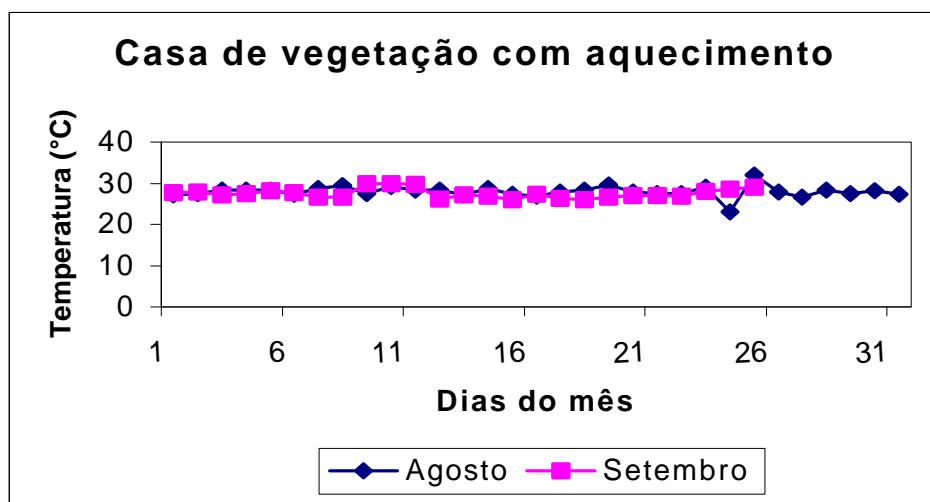


Figura 1 – Médias das temperaturas durante o período de condução do experimento em casa de vegetação com sistema de aquecimento.

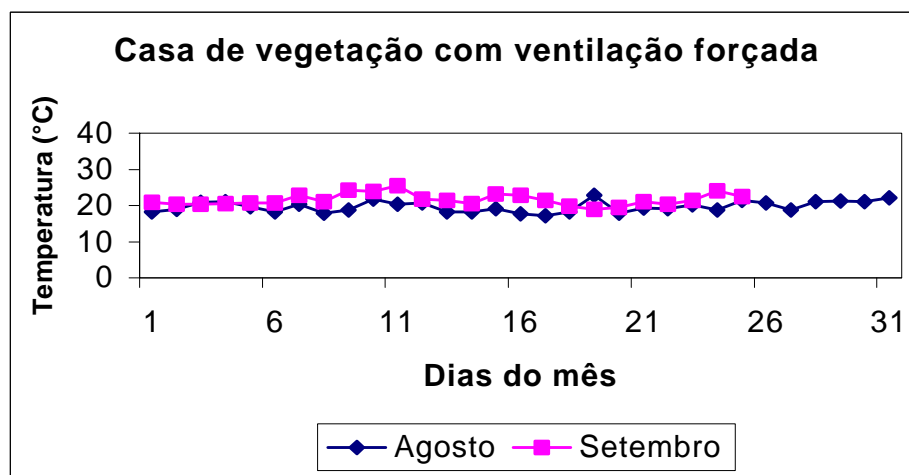


Figura 2 – Médias das temperaturas durante o período de condução do experimento em casa de vegetação com sistema de ventilação forçada

A Figura 3 mostra o acúmulo de proteínas totais no cultivar CAC-1 determinadas pelo método de Kjeldhal. O acúmulo foi maior quando o cultivar foi submetido ao ambiente de casa de vegetação com sistema de aquecimento do que quando as plantas foram crescidas em casa de vegetação com ventilação forçada. Estes dados estão de acordo com aqueles encontrados por GIBSON & MULLEN (1996a e 1996b) e SEDIYAMA et al. (1996). Na realidade, as proteínas totais se acumularam em maior quantidade no ambiente com sistema de aquecimento, em quase todos os estádios de desenvolvimento. Com base na análise de variância (ANOVA), a quantidade de proteína total durante o enchimento do grão, diferiu significativamente em maior proporção para o cultivar que se desenvolveu em ambiente com sistema de aquecimento. Somente para os estádios de desenvolvimento 3 e 4, não foram observados estes resultados.

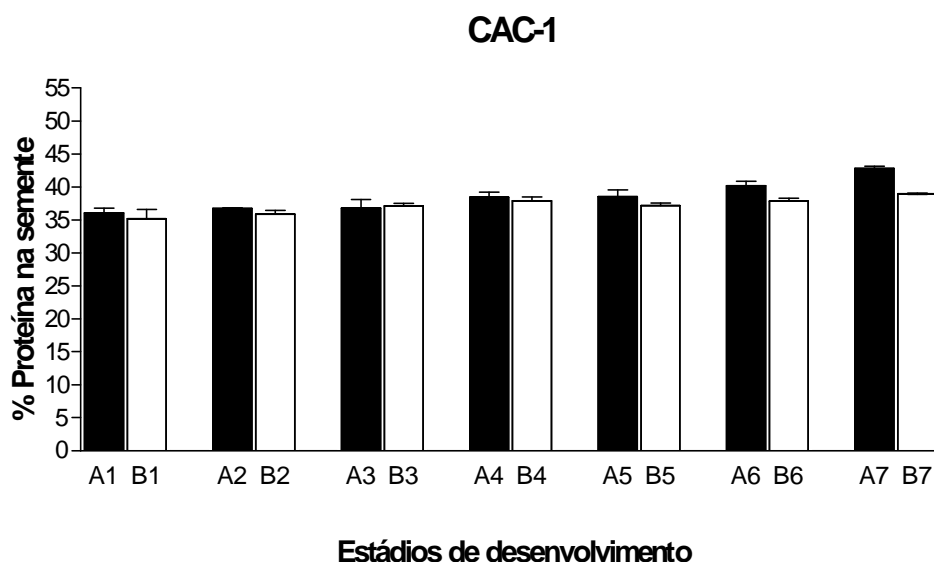


Figura 3 – Conteúdo de proteínas totais do cultivar CAC-1 em alta (A) ou baixa temperatura (B) em diferentes estádios de desenvolvimento (1 a 7).

A Figura 4 mostra o acúmulo de proteínas totais no cultivar CAC-1 PTN. O acúmulo, assim como para a cultivar CAC-1, ocorreu em maior proporção quando o cultivar foi submetido ao ambiente de casa de vegetação com sistema de aquecimento. Segundo a análise de variância, a quantidade de proteína total durante o enchimento do grão, diferiu significativamente em maior proporção para o cultivar que se desenvolveu em ambiente com sistema de aquecimento em todos os estádios de desenvolvimento. Observou-se, ainda, que mesmo quando submetido a ambiente de casa de vegetação com ventilação forçada (baixa temperatura), o cultivar CAC-1 PTN acumulou maior quantidade de proteínas totais do que o cultivar CAC-1, independente da temperatura em que este foi cultivado. Esse é um dado altamente significativo, que certamente influenciará o sucesso das variedades de alto teor protéico que estão sendo desenvolvidas pela equipe de melhoramento do BIOAGRO/UFV, que visa acumular genes que aumentem o teor protéico em soja, independente do ambiente de cultivo.

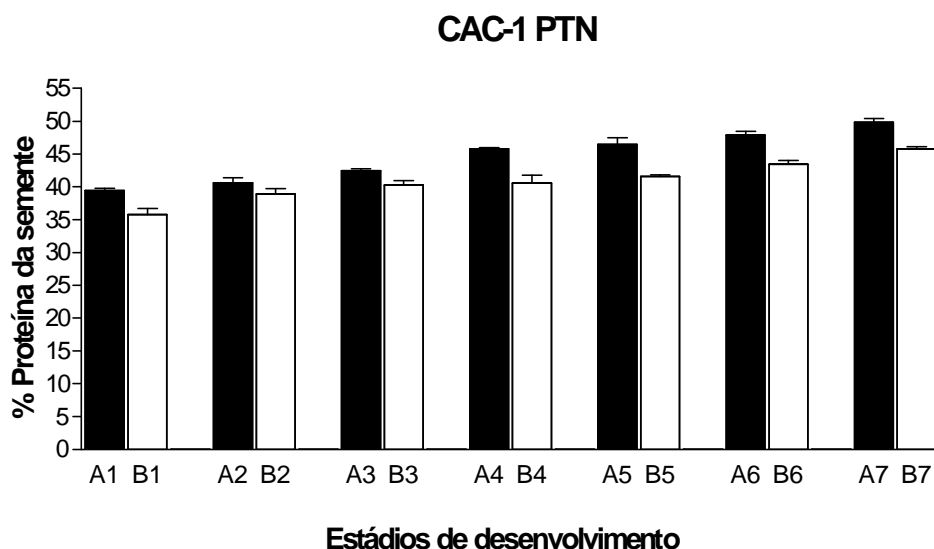


Figura 4 – Conteúdo de proteínas totais do cultivar CAC-1 PTN em alta temperatura (A) ou baixa temperatura (B) em diferentes estádios de desenvolvimento (1 a 7).

Os dados obtidos indicam que fatores ambientais, como a temperatura, afetam diretamente no acúmulo de proteínas totais da semente, possivelmente favorecendo o metabolismo no sentido de biossíntese de proteínas quando a temperatura se aproxima a 30 °C, segundo o que foi sugerido por WOLF et al. (1982), que acompanhou o acúmulo de proteínas em sementes do cultivar de soja Fiskeby V.

Numa tentativa de determinar se frações protéicas específicas da proteína de reserva acumulavam diferencialmente ao longo do enchimento de sementes de plantas de soja cultivadas em diferentes temperaturas, foi determinado o perfil eletroforético dessas proteínas. As Figuras 5 e 6 mostram géis de poliácridamida contendo frações protéicas ao longo do enchimento da semente.

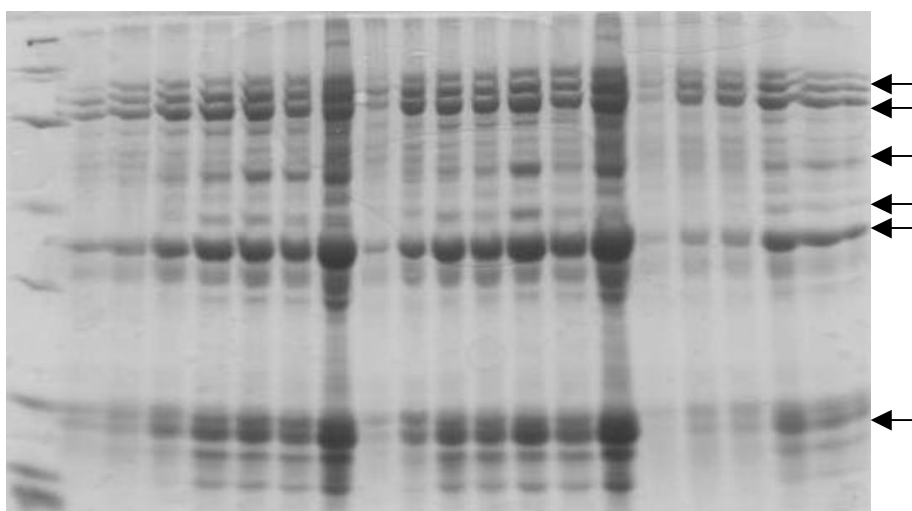


Figura 5 – Perfil eletroforético das proteínas de reserva dos cultivares CAC-1 e CAC-1 PTN ao longo do enchimento das sementes. Da esquerda para a direita têm-se: marcador de massa molecular (SIGMA), cultivar CAC-1 cultivado em alta temperatura (estádios 1 a 7), cultivar CAC-1 PTN cultivado em alta temperatura (estádios 1 a 7) e cultivar CAC-1 cultivado em baixa temperatura (estádios 1 a 5). As setas indicam as subunidades que foram quantificadas.

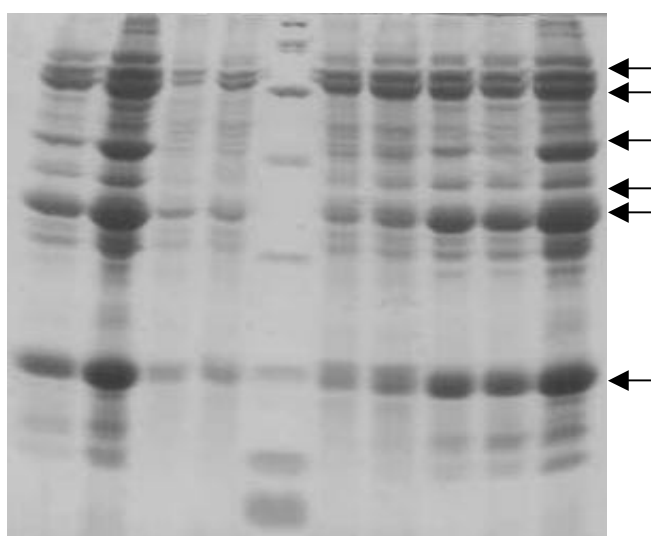


Figura 6 – Perfil eletroforético das proteínas de reserva dos cultivares CAC-1 e CAC-1 PTN ao longo do enchimento das sementes. Da esquerda para a direita têm-se:, cultivar CAC-1 cultivado em baixa temperatura (estádios 6 e 7), CAC-1 PTN cultivado em baixa temperatura (estádios 1 e 2), marcador de massa molecular (SIGMA) e cultivar CAC-1 PTN cultivado em baixa

temperatura (estádios 3 a 7). As setas indicam as subunidades que foram quantificadas.

As Figuras 7 e 8 mostram a variação no conteúdo relativo de uma das proteínas de reserva da soja: a β -conglícinina. Como pode ser observado na Figura 6, o cultivar CAC-1, de um modo geral, acumulou maior quantidade de β -conglícinina quando as plantas foram crescidas em casa de vegetação com aquecimento (alta temperatura). Portanto, essa proteína de reserva apresentou um perfil de acúmulo semelhante ao da proteína total e deve ser afetada pela temperatura de modo semelhante.

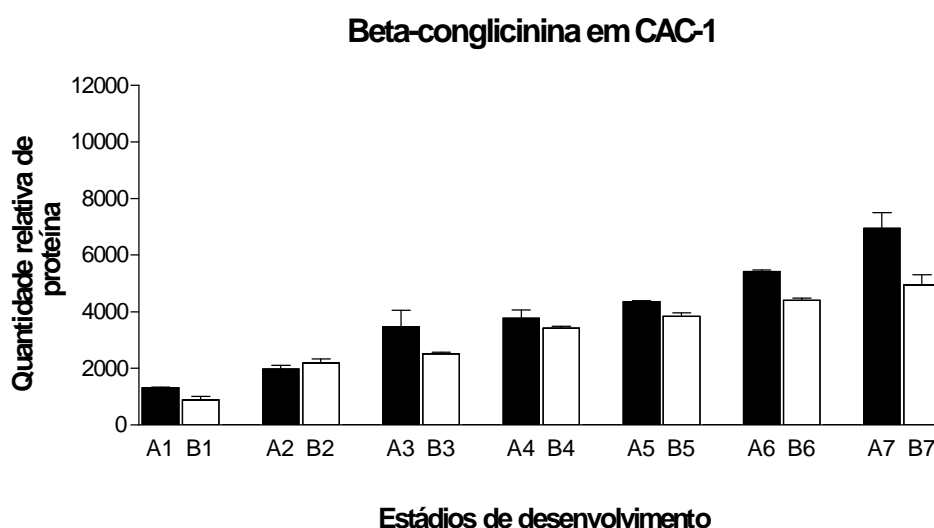


Figura 7 – Conteúdo relativo de β -conglícinina do cultivar CAC-1 em alta (A) ou baixa temperatura (B) em diferentes estádios de desenvolvimento (1 a 7).

A determinação da variação do conteúdo de β -conglícinina no cultivar CAC-1 PTN mostrou um maior conteúdo desta fração protéica neste cultivar do que em CAC-1, mesmo quando aquela foi cultivada em temperaturas mais baixas (Figuras 7 e 8). Além disso, mais uma vez a temperatura ambiental foi primordial para a determinação de um maior conteúdo desta proteína em ambiente com aquecimento (alta temperatura), o que pode ser observado na Figura 8.

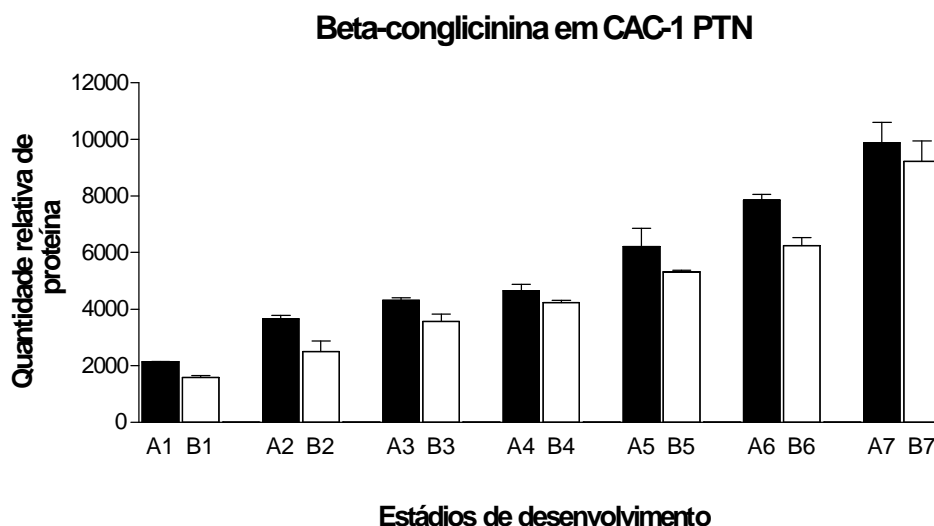


Figura 8 – Conteúdo relativo de β -conglicinina do cultivar CAC-1 PTN em alta (A) ou baixa temperatura (B) em diferentes estádios de desenvolvimento (1 a 7).

Em relação à outra importante proteína de reserva da soja, a glicinina, observou-se que para o cultivar CAC-1 (Figura 9) houve um acréscimo em seu conteúdo, quando as plantas foram crescidas em casa de vegetação com aquecimento (alta temperatura). O mesmo também foi encontrado para o cultivar CAC-1 PTN em relação ao acúmulo desta proteína (Figura 10).

Ressalta-se ainda, que o conteúdo acumulado de glicinina foi maior para o cultivar CAC-1 PTN do que para a cultivar CAC-1 em todos os estádios de desenvolvimento da semente, principalmente no último estágio de desenvolvimento (semente madura), independentemente da temperatura (Figuras 9 e 10).

A glicinina e a β -conglicina representam cerca de 70% do conteúdo total de proteínas do grão de soja (HILL & BREIDENBACH, 1974). YAKLICH (2001) verificou que estas proteínas acumulam em maior quantidade em cultivares selecionados para maior conteúdo de proteínas totais. Neste trabalho, as observações daquele autor foram confirmadas e, além disso, verificou-se que, em altas temperaturas, estas frações protéicas também acumulam em maior proporção.

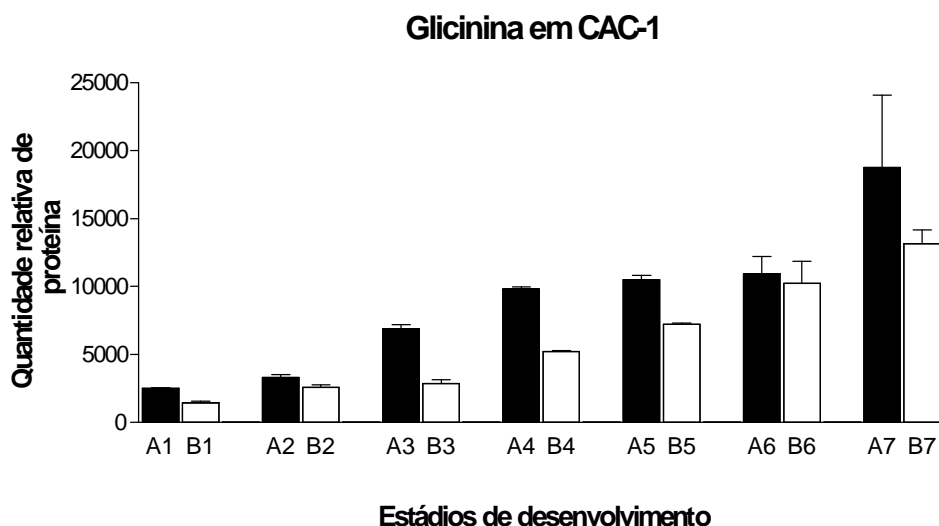


Figura 9 – Conteúdo relativo de glicinina do cultivar CAC-1 em alta (A) ou baixa temperatura (B) em diferentes estádios de desenvolvimento (1 a 7).

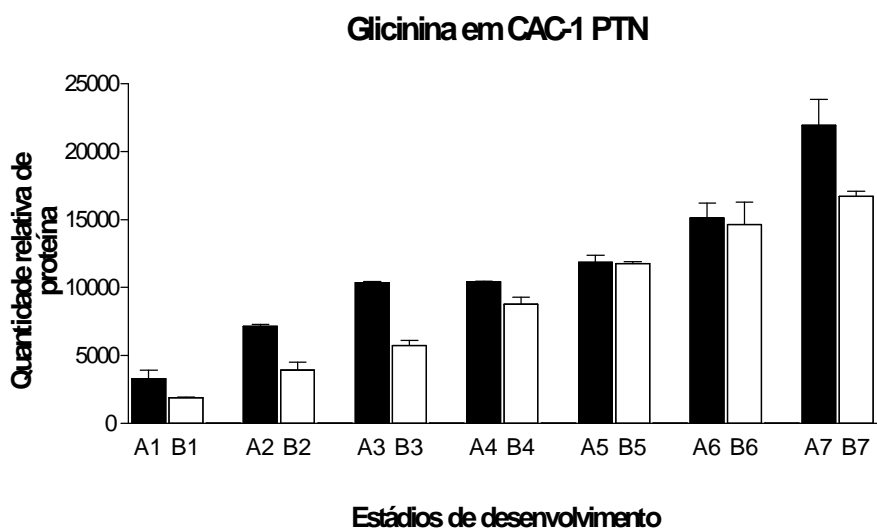


Figura 10 – Conteúdo relativo de glicinina do cultivar CAC-1 PTN em alta (A) ou baixa temperatura (B) em diferentes estádios de desenvolvimento (1 a 7).

CONCLUSÕES

A temperatura ambiental interfere no conteúdo de proteínas totais da semente de soja, às quais se acumulam em maior quantidade diante de ambiente com temperatura em torno de 30 °C.

As proteínas de reserva da semente de soja se acumulam em maior quantidade em variedades selecionadas para maior conteúdo das mesmas. O acúmulo de proteínas de reserva de soja, também é dependente da temperatura ambiental, nas quais se acumulam em maior quantidade em ambientes com temperaturas em torno de 30 °C.

Ressalta-se a importância do programa de melhoramento de qualidade da soja desenvolvido pelo BIOAGRO/ UFV, onde tem obtido uma série de linhagens de soja com elevados teores de proteínas da semente (maiores que 45%), e com alto potencial produtivo. Estes materiais quando submetidos a condições de plantio de baixa temperatura, apresentam variações no seu conteúdo protéico mas estas variações são compensatórias em relação a cultivares com baixos teores de proteínas da semente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R. V.; BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. **Revista Brasileira de Genética**. (18) 265-273, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. Washington, D. C. 1975. 1094 p.
- BONATO, E. R. & BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1987. 61 p. (Documentos, 21).
- BONATO, E. R. & DALL'AGNOLL, A. Soybean in Brazil-production and research. In: WORD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3, 1984, Ames. **Proceedings**. Boulder: Westview Press, 1985. p. 1248-1256.
- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Eds.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 1-6.
- BRIM, C. A. & BURTON, J. W. Recurrent selection in soybeans II. Selection for increased percent protein in seeds. **Crop Science**, (19) 494-498, 1979.
- BURTON, J. W. Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Field Crops Research**, (53) 171-186, 1997.
- BYTH, D. E.; WEBER, C. R. & CALDWELL, B. E. Correlated truncation selection for yield in soybeans. **Crop Science**, (9) 699-702, 1969.

- COATES, J. B.; MEDEIROS, J. S.; THANH, V. H. & NIELSEN, N. C. Characterization of the subunits of β -conglycinin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, (243) 184-194, 1985.
- DIERS, B.W.; BEILINSON, V.; NIELSEN, N. C. & SHOEMAKER, R. C. Genetic mapping of the *Gy4* e *Gy5* glycinin genes in soybean and the analysis of a variant of *Gy4*. **Theoretical and Applied Genetics**, (89) 297-304, 1994.
- FEHR, W. R. & CAVINESS, C. E. Stages of soybean development. Special Report 80. Co-operative Extension Service, Iowa State University, Ames, Iowa, 1977. 11p.
- FONTES, E. P. B.; MOREIRA, M. A.; DAVIES, C. S. & NIELSEN, N. C. Urea-elicited changes in relative electrophoretic mobility of certain glycinin and β -conglycinin subunits. **Plant Physiologi**, (76) 840-842, 1984.
- GERBER, S.; FABRE, F. & PLANCHON C. Genetics of seed quality in soybean analysed by capillary gel electrophoresis. **Plant Science**, (152) 181-189, 1999.
- GIBSON, L. R. & MULLEN, R. E. Influence of day and night temperature on soybean seed yield. **Crop Science**, (36) 98-104, 1996a.
- GIBSON, L. R. & MULLEN, R. E. Soybean seed composition under high day and night growth temperatures. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, (73) 733-737, 1996b.
- GIZLICE, Z.; CARTER, T. E. & BURTON, J. W. Genetic diversity in North american soybean: I. Multivariate analysis of founding stock and relation to coefficient of parentage. **Crop Science**, (33) 314-620, 1993.
- HARADA, J. J.; BARKER, S. J. & GOLDEBERG, R. B. Soybean β -conglycinin gene are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes. **The Plant Cell**, (1) 415-425, 1989.
- HILL, J. E. & BREIDENBACH, R. W. Protein of soybean seeds. **Plant Physiology**, (53) 742-746, 1974.
- HIROMOTO, D. M. & VELLO, N. A. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, (9) 295-306, 1986.

- HOLBROOK, C. C.; BURTON, J. W. & CARTER JÚNIOR, T. E. Evolution of recurrent restricted index selection for increasing yield while holding seed protein constant in soybean. **Crop Science**, (29) 324-329, 1989.
- KITAMURA, K.; DAVIES, C. S. & NIELSEN, N. C. Inheritance of alleles for Ggy1 and Gy4 storage protein genes in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, (68) 253-254, 1984.
- KNOW, S. H. & TORRIE, J. H. Heritability of and interrelationships among traits of two soybean populations. *Crop Science*, (4) 196-198, 1964.
- KRISHNAN, H. B.; JIANG, G.; KRISHNAN, A. H. & WIEBOLD, W. J. Seed storage protein composition of non-nodulating soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and its influence on protein quality. **Plant Science**, (157) 191-199, 2000.
- KWANYUEN, P. & WILSON, R. F. Optimization of Coomassie staining for quantitative densitometry of soybean storage proteins in gradient gel electrophoresis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, (77) 1251-1254, 2000.
- MAUGHAN, P. J.; MARROF, M. A. S.; BUSS, G. R. & HUESTIS, G. M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, (93) 392-401, 1996.
- MOREIRA, M. A.; HERMADSON, M. & LARKINS, B. A. Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. **Journal Biological Chemistry**, (254) 9921-9926, 1979.
- MOREIRA, M. A.; HERMADSON, M.; LARKINS, B. A. & NIELSEN, N. C. Comparison of the primary structure of the acidic polypeptides of glycinin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, (210) 636-642, 1981.
- NIELSEN, N. C.; DICKINSON, C. D.; CHO, T-J; THANH, V. H.; SCALLON, B. J.; FISCHER, R. L.; SIMS, T. L.; DREWS, G. N. & GOLDEBERG, R. B. Characterization of the glycinin gene family in soybean. **The Plant Cell**, (1) 313-328, 1989.
- NIELSEN, N. C. Soybean seed composition. In: VERMA, D. P. S. & SHOEMAKER, R. C. (Eds.). **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. Wallingford: Cab International, 1996. p. 127-163.

- SAS INSTITUTE INC (Cary, NC). **SAS System**. Cary, 1993. 18v.
- SCOTT, R. A. & KEPHART, K. D. Selection for yield, protein and oil in soybean crosses between adapted and introduced parents. **Field Crops Research**, (49) 177-185, 1997.
- SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M. G.; SEDIYAMA, C. S. & GOMES, J. L. L. **Cultura da soja**. 3 reimp., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1996. I Parte, 96 p.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J. & KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**. (150) 76-85, 1985.
- SIMPSON, A. C. & WILCOX, J. R. Genetic and phenotypic associations of agronomi characteristics in four high protein soybean populations. **Crop Science**, (23) 1077-1081, 1983.
- STASWICK, P. E.; HERMODSON, M. A. & NIELSEN, N. C. Identification of the acidic and basics subunits complexes of glycinin. **Agricultural and Biological Chemistry**, (256) 8752-8755, 1981.
- THANH, V. H. & SHIBASAKI, K. Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. *Biochimica et Biophysica Acta*, (490) 370-384, 1977.
- THORNE, J. C. & FEHR, W. R. Incorporation of high-protein, exotic germplasm into soybean populations by 2- and 3-way crosses. **Crop Science**, (10) 652-655, 1970.
- UTUMI, M. M.; BARROS, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; SEDIYAMA, C. S. & MOREIRA, M. A. Effect of genetic elimination of lipoxygenases and storage protein subunits on soybean protein quality. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, (10) 203-212, 1998.
- VELLO, N. A.; HIROMOTO, D. M. & AZEVEDO FILHO, A. J. B. V. Coefficient of parentage and breeding of Brazilian soybean germplasm. **Revista Brasileira de Genética**. (11) 679-697, 1988.
- WAKAWKAR, S. M; YADAV, L. N. & KELKAR, G. M. Path coefficient analysis for some caracters in soybean. **Plant Breeding Abstracts**, (46) 905, 1976.

- WEHRMANN, V. K.; FEHR, W. R.; CIANZIO, S. R. & CAVINS, J. F. Transfer of high seed protein to high-yielding soybean cultivars. **Crop Science**, (27) 927-931, 1987.
- WILCOX, J. R. & CAVINS, J. F. Backcrossing higher seed protein to a soybean cultivar. *Crop Science*, (35) 1036-1041, 1995.
- WOBUS, U.; BÄUMLEIN, H.; CONRAD, U.; MÜNTZ, K. & WEBER, H. Seeds of change. **Meeting Report**, (5) 512-513, 2000.
- WOLF, R. B.; CAVINS, J. F.; KLEIMAN, R. & BLACK, L. T. Effect of temperature on soybean seed constituents: oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids and sugars. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, (59) 230-232, 1982.
- YAKLICH, R. W. β -conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds. **Journal Agricultural Food Chemistry**. (49) 729-735, 2001.
- XINHAI, L.; JINLING, W.; QINGKAI, Y.; SHAOJIE, J. & LIMING, W. The effect of selection method on the association of yield and seed protein with agronomic characters in an interspecific cross of soybean. **Soybean Genetics Newsletter**, (26) 11-19, 1999.
- XU, H. & WILCOX, J. R. Recurrent selection for maturity and percent seed protein in *Glycine max* based on S_0 plant evaluations. **Euphytica**, (62) 51-57, 1992.