



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

ESMAEL LOPES DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO SOBRE AS
CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA E ÓLEO EM
SEMENTES DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]**

**Londrina
2006**

ESMAEL LOPES DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO SOBRE AS
CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA E ÓLEO EM
SEMENTES DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. CÁSSIO EGÍDIO CAVENAGHI PRETE

Londrina
2006

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. CÁSSIO EGÍDIO CAVENAGHI PRETE

Dr. ANTONIO EDUARDO PÍPOLO

Prof. Dr. RICARDO TADEU DE FARIA

Prof. Dr. DEONISIO DESTRO

Dr. CARLOS ALBERTO ARRABAL ARIAS

Londrina, 26 de junho de 2006.

DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais pelo incentivo e grandes lições para a vida, e à minha namorada e amiga Gheisa Helen, pela contribuição em todas as etapas desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível graças à colaboração de muitas pessoas e das instituições que contribuíram de maneira significativa.

Ao Prof. Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete, pela valiosa orientação, apoio, amizade e demonstração de respeito.

Ao Dr. Antonio Eduardo Pípolo, pela valiosa orientação, apoio, amizade e contribuição para a realização desta etapa.

Ao Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria, pelo apoio e disponibilidade para solução dos problemas e auxílio na concretização das metas deste trabalho.

Ao departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, em especial ao Prof. Raúl J. H. C. Gómez, pela disponibilidade para a realização das análises de proteína e óleo.

À Prof^a Dra. Inês Cristina de Batista Fonseca, pelo interesse demonstrado em auxiliar nas interpretações das análises estatísticas.

Ao colegiado do curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, pela dedicação e pelos conhecimentos transmitidos durante a realização do curso.

À Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento do Agronegócio - FAPEAGRO, pelo apoio para a realização deste curso, assim como aos funcionários e amigos, pela colaboração e incentivo.

À Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola COODETEC, em especial ao colega Eng^o Agr^o Marco Antonio Rott de Oliveira, pela doação de sementes para instalação do experimento.

Aos colegas da Pós-Graduação, em especial à Lílian e à Magda, pelo convívio, pelos conselhos e ajudas freqüentes a mim dispensadas.

A família Dutra/Signolfi que me recebeu de braços abertos e sempre soube dar uma palavra de incentivo e afeto de família.

Aos meus pais e meus irmãos, que, apesar da distância, sempre acreditaram e incentivaram essa caminhada.

RESUMO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] a cada ano vem confirmando a sua posição ímpar como produto agrícola brasileiro de maior importância, quer na geração de divisas para o país, quer no incremento das atividades da agroindústria, da produção de carnes, de óleo e derivados. A principal utilização da soja, tanto no Brasil como no restante do mundo, é como matéria prima para a indústria de esmagamento que produz óleo degomado e farelo. O óleo é utilizado como matéria prima para a indústria alimentícia na produção de óleo refinado, e seus derivados, e o farelo é utilizado, principalmente, na indústria de rações como enriquecedor protéico. A qualidade do farelo de soja é dada pelo seu conteúdo de proteína. O farelo obtido da soja produzida no Brasil, especialmente na região Sul, tem apresentado conteúdo de proteína abaixo das especificações exigidas pelo mercado, o que tem depreciado seu valor. A concentração de óleo e proteína na semente de soja é herdada como uma característica quantitativa que sofre grande influência do meio ambiente. Em condições de cultivo *in vivo* é difícil controlar precisamente o fornecimento de carbono e nitrogênio destinado às sementes. Com o objetivo de avaliar a influência de genótipos de soja sobre a concentração de proteína e óleo na semente com desenvolvimento *in vivo* e *in vitro*, sementes imaturas das cultivares CD 202 e CD 206 foram retiradas da planta mãe no estágio R₅, cultivadas *in vitro* em meio de cultura líquido, contendo 20, 40 e 60 mM de glutamina. As sementes foram incubadas em frascos de vidro em constante agitação, por oito dias a 25 ± 0,2°C, com concentração de sacarose de 204,5 mM. Após esse período de incubação, foi determinado o ganho de massa fresca das sementes. Posteriormente, foi determinado o teor de óleo e proteína das sementes desenvolvidas *in vitro* e das desenvolvidas *in vivo*. O ganho de massa fresca não apresentou diferença significativa (P>0,05) em uma mesma cultivar quando houve alteração da concentração de glutamina. Entre as cultivares o ganho de massa fresca apresentou diferença significativa (P<0,05) nas concentrações de 40 e 60 mM de glutamina na cultivar CD 206 em relação à CD 202. A porcentagem de proteína na concentração de 20 mM de glutamina não apresentou diferença significativa (P>0,05) na cultivar CD 206 cultivada *in vitro* quando comparada com a cultivada *in vivo*. Porém o inverso ocorreu para as concentrações de 40 e 60 mM de glutamina. A cultivar CD 202 quando cultivada *in vitro* na concentração de 20 mM apresentou porcentagem de proteína menor que as sementes cultivadas *in vivo*. Porém, acima da concentração de 20 mM de glutamina, a cultivar CD 202 apresentou uma alta porcentagem de proteína, respondendo positivamente ao aumento da concentração de glutamina. Com suprimento adequado de nitrogênio para as sementes com desenvolvimento *in vitro* o genótipo não limitou o acúmulo de proteína. Entre as duas cultivares estudadas, a proteína se apresentou sempre em maior porcentagem na cultivar CD 206. As concentrações de óleo e proteína foram inversamente relacionadas. O genótipo influencia na composição da semente de soja, pois mesmo quando houve variação no suprimento de nitrogênio para as sementes com desenvolvimento *in vitro* diferenças estatísticas apresentadas na porcentagem de proteína e óleo, foram mantidas entre os genótipos.

Palavras chave: *Glycine max* (L.) Merrill, concentração de glutamina, massa fresca, composição da semente.

ABSTRACT

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] confirms every year its unparalleled position of most important agricultural Brazilian product as regards the flow of money to the country and the increasing of agro-industry activities and also meat, oil and respective sub products production. In Brazil as well as in the rest of the world, soybean is mainly used as raw material of the grinding industry which produces degummed oil and meal. Soybean oil is the raw material of the food industry for the production of refined oil and its sub products and the meal is mainly used to increase the protein content in animal food. The quality of soybean meal is evaluated by its protein content. Meal resulting from soybean produced in Brazil, specifically in southern region of Brazil, has been presenting a protein content lower than the demands of the market, what results in the product's devaluation. The concentration of oil and protein in soybean seed is an inherited qualitative trait, but it is greatly influenced by the environment. Under the condition of cultivation *in vitro* it is difficult to control precisely the supply of carbon and nitrogen destined for the seeds. With the purpose of evaluating soybean's genotype on the concentration of protein and oil of seeds developed *in vivo* and *in vitro*, immature seeds of cultivars CD 202 and CD 206 were removed from the mother-plant in the stage R₅ and were cultivated *in vitro*, in a liquid milieu of cultivation which contained 20, 40 and 60 mM of glutamine. The seeds were incubated in glass flasks and agitated constantly during eight days at 25± 0,2 ° C with 204,5 mM sucrose concentration. After that period of incubation it was determined the gain of fresh mass of the seeds. Afterwards it was also determined the oil and protein contents of the seeds developed *in vitro* and those developed *in vivo*. The fresh mass gain did not present a significant difference (P>0,05) in the same cultivar when the glutamine concentration was altered, but between the two cultivars, fresh mass gain showed a significant difference (P<0,05) in the concentration of 40 and 60 mM of glutamine in the cultivar CD 206 as compared to the cultivar CD 202. The protein percentage in the 20 mM glutamine concentration did not present a significant difference (P>0,05) in the cultivar CD 206 cultivated *in vivo*. Nevertheless the opposite occurs in 40 and 60 mM of glutamine concentrations. Cultivar 202 when cultivated *in vitro* in 20 mM concentration showed a lower protein percentage than that of the seed cultivated *in vivo*. However, over 20 mM glutamine concentration, the cultivar CD 202 showed a high percentage of protein, what represents a good response to the increase of glutamine concentration. With an adequate supply of nitrogen for the seeds cultivated *in vitro*, the genotype did not limit the protein gain. Between the studied cultivars, protein percentage was always higher in the cultivar CD 206. Oil and protein concentrations were inversely related. The genotype has influence on soybean seeds composition, since it was observed that statistical differences in the oil and protein percentage remained unchanged even when a variation in the nitrogen supply to the seeds developed *in vitro* occurred.

Key words: *Glycine max* (L.) Merrill, glutamine concentration, fresh mass, composition of seed.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Exigências da cultura da soja em nitrogênio (N).....	5
2.2. Fatores que afetam a composição da semente.....	7
2.3. Cultivo <i>in vitro</i> como isolamento de fatores ambientais.....	11
2.4. Referências Bibliográficas.....	15
3. ARTIGO: INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA E ÓLEO EM SEMENTES DE SOJA [<i>Glycine max</i> (L.) Merrill].....	25
3.1. Resumo.....	25
3.2. Abstract.....	26
3.3 Introdução.....	27
3.4. Material e Métodos.....	31
3.4.1. Fontes de sementes imaturas.....	31
3.4.2. Condições de estudos <i>in vitro</i>	32
3.4.3. Determinação da massa fresca das sementes.....	34
3.4.4. Determinação das concentrações de proteína e óleo.....	35
3.4.5. Análise estatística.....	36
3.5. Resultados e Discussão.....	37
3.6. Conclusão.....	46
3.7. Referências Bibliográficas.....	47

1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] vem confirmando a cada ano a sua posição ímpar como produto agrícola brasileiro de maior importância, quer na geração de divisas para o país, quer no incremento das atividades da agroindústria, da produção de carnes, de óleo e derivados. Esta leguminosa também tem forte participação no desenvolvimento de novos bioprodutos de origem vegetal, propiciando aos agricultores, ao ambiente, ao país e aos consumidores um grande número de alternativas rentáveis e seguras, com crescente disponibilidade de novos produtos derivados da soja.

É a produção de proteína e óleo que desperta o interesse mundial, sendo desejável que a alta produtividade de grãos seja também acompanhada de altas concentrações desses componentes.

A principal utilização da soja, tanto no Brasil como no restante do mundo, é como matéria prima para a indústria de esmagamento que produz óleo degomado e farelo. O óleo é utilizado como matéria prima para a indústria alimentícia na produção de óleo refinado e seus derivados e o farelo é utilizado, principalmente, na indústria de rações como enriquecedor protéico.

A qualidade do farelo de soja é dada pelo seu conteúdo de proteína. O farelo obtido da soja produzida no Brasil, especialmente na região Sul, tem apresentado conteúdo de proteína abaixo das especificações exigidas pelo mercado, o que tem depreciado seu valor.

A soja apresenta concentrações médias de 40% de proteína e 20% de óleo, mas existe grande variabilidade quanto a estes teores nos brancos de

germoplasmas. A concentração de proteína e óleo é herdada como uma característica quantitativa, influenciada pelo meio ambiente. Embora exista variabilidade genotípica para a composição de proteína e óleo, tem sido difícil melhorar estas características através do melhoramento de plantas devido à correlação negativa existente entre proteína e óleo e à consistente relação inversa entre produtividade de grãos e concentração de proteína. Por outro lado, tem-se dado maior ênfase ao incremento na produtividade de grãos e à resistência às doenças, do que a composição química dos grãos.

Pesquisadores relatam a dificuldade em isolar os efeitos de fatores ambientais em experimentos *in vivo* que poderiam influenciar as concentrações de proteína e óleo das sementes de soja. Também há evidências na literatura de que a composição das sementes de soja é afetada pelo suprimento de nitrogênio fornecido pela planta mãe, sendo difícil controlar precisamente a quantidade de carbono e nitrogênio transportado para a semente *in vivo*.

Diante dessas considerações, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de genótipos sobre as concentrações de proteína e óleo em sementes de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivada e seu ancestral selvagem (*Glycine soja*) pertencem ao subgênero soja, contêm número de cromossomos $2n = 40$ e possuem genomas similares e apresentam compatibilidade sexual, podendo produzir híbridos viáveis (Palmer *et al.*, 1996).

A soja é uma leguminosa originária das regiões central e norte da China. Segundo Probst e Judd (1973), já estavam disponíveis descrições sobre plantas de soja entre 3000 e 2000 a.C. e, a partir de 200 a.C., a soja foi introduzida na Coréia e no Japão, de acordo com relato de Hymowitz (1970). Nos Estados Unidos, a introdução da soja ocorreu a partir do ano de 1765 (Hymowitz e Harlan, 1983). No Brasil, os primeiros registros são de 1882, ocorridos no estado da Bahia (Hasse, 1996) e, a partir da década de 70, a cultura da soja apresentou notável expansão em nosso país, até os dias atuais.

A semente de soja madura contém aproximadamente 40% de proteína, 20% de óleo, 17% de celulose e hemicelulose, 7% de açúcares, 5% de fibras e 6% de cinzas em base seca (Krober *et al.*, 1962).

A soja é produzida para atender à demanda humana e animal de proteína e óleo, sendo desejável que a alta produtividade de grãos seja também acompanhada de altas concentrações daqueles componentes, pois isso diminui o custo dos produtos derivados da soja (Tanaka *et al.*, 1995).

A melhoria do potencial produtivo das cultivares de soja é um dos principais objetivos de todos os programas de melhoramento genético conduzidos no país. A produtividade de grãos de soja, em geral, é inversamente correlacionada com o

teor de proteína nos grãos (Johnson *et al.*, 1955; Kwon e Torrie, 1964; Thorne e Fehr, 1970; Hartwig e Hinson, 1972; Hymowitz *et al.*, 1972; Shannon *et al.*, 1972; Voldeng *et al.*, 1997; Wilcox e Guodong, 1997).

Relação negativa entre produtividade de grãos e teor de proteína foi encontrada por Wilcox e Guodong (1997) em populações de tipo de crescimento indeterminado e não foi encontrada em populações de hábito determinado.

A correlação entre teor de óleo e produtividade de grãos de soja, dependendo dos genótipos avaliados, pode ser elevada e positiva (Johnson *et al.*, 1955), pequena, e variar de positiva à negativa (Simpson Junior e Wilcox, 1983) ou ausente (Kwon e Torrie, 1964).

Os teores de proteína e de óleo são inversamente correlacionados (Johnson *et al.*, 1955; Kwon e Torrie, 1964; Thorne e Fehr, 1970; Hymowitz *et al.*, 1972; Simpson Junior e Wilcox, 1983; Burton, 1985).

A concentração de proteína e óleo na semente tem controle genético quantitativo e sofre grande influência do meio ambiente (Wilcox, 1985; Burton, 1989). A inversa e consistente relação entre produtividade de grãos e concentração de proteína, assim como a correlação negativa entre concentração de proteína e óleo nas sementes de soja, constituem barreiras para aumentar os teores de proteína e óleo das linhagens comerciais (Burton, 1985).

2.1. Exigências da cultura da soja em nitrogênio (N)

A necessidade de nitrogênio (N) pelas plantas de soja, em condições de campo, é suprida pela simbiose e pelo elemento disponível no solo. A escassez de N pode ocorrer ocasionalmente quando o fornecimento ou a falta de umidade superficial do solo forem fatores limitantes.

O nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura da soja, pois os grãos são ricos em proteína, apresentando um teor médio de 6,5% de N. Desse modo, para produzir 1000 kg de grãos de soja são necessários 65 kg de N, sendo que adicionando-se mais 15 kg de N para as folhas, caule e raízes tem-se 80 kg de N. Conseqüentemente, para obtenção de produtividades de grãos de 3000 kg/ha são necessários 240 kg de N, dos quais 195 kg são retirados da lavoura pelos grãos (Hungria *et al.*, 2001). Existem duas fontes básicas de nitrogênio para a planta de soja: nitrato e nitrogênio da atmosfera. O nitrato vindo principalmente da decomposição da matéria orgânica do solo e de fertilizantes e o nitrogênio da atmosfera (N_2) que as bactérias fixam em compostos nitrogenados chamados de ureídeos. Os ureídeos são metabolizados em aminoácidos nos tecidos, tornando o nitrogênio disponível para a planta em crescimento.

Essas duas fontes de N são normalmente complementares. As plantas na fase inicial do desenvolvimento usam o nitrogênio acumulado nos cotilédones da semente e o nitrato do solo, antes da planta ter formado um conjunto adequado de nódulos e a assimilação alcança seu máximo, normalmente, no florescimento pleno (estádio R_2) e declina em seguida. As máximas taxas de fixação de nitrogênio ocorrem no final do florescimento e durante o enchimento de grãos. O nitrogênio assimilado

entre o desenvolvimento da vagem (estádio R₃) e o começo da maturação (estádio R₇) é a fonte predominante de nitrogênio para a semente (Warembourg e Fernandez, 1985; Zapata *et al.*, 1987).

Em estudos realizados com aplicação de nitrogênio em soja nodulada e não-nodulada, na premissa de que naqueles genótipos não nodulados haveria maior eficiência na utilização de N pela planta devido à economia na energia dispendida na manutenção de um sistema nodular, não se verificou produção superior nas plantas não noduladas em relação às noduladas em nenhuma das doses de nitrogênio aplicadas (Wagner, 1962 e Weber, 1966). De fato, Weber (1966) relatou que, em linhagens isogênicas noduladas, sempre houve maior produtividade de grãos do que nas não noduladas, utilizando-se a mesma quantidade de fertilizante. O autor sugere que o nitrogênio simbiótico seria uma fonte mais aproveitável de N do que aquele proveniente de fertilizante, ainda que a necessidade de energia para a simbiose e a redução do N fixado fossem menores do que aquela requerida para a absorção de nitrato e sua subsequente redução pela linhagem isogênica não nodulada.

Também há controvérsia sobre a necessidade de suplementação de N em soja no período final da formação de suas sementes (R₅, R₆ ou R₇) devido à diminuição da atividade simbiótica durante o enchimento das vagens. Cabe salientar que o nitrato do solo é antagonista à fixação atmosférica do nitrogênio, pois mantém os nódulos em formação e interfere na fixação dos nódulos existentes. Um fator complicador desse quadro é que a fixação atmosférica do nitrogênio começa a declinar durante a fase de enchimento de grãos. Então, o crescimento da semente fica fortemente dependente da remobilização do nitrogênio dos tecidos vegetais, principalmente das folhas. A perda de nitrogênio pelas folhas faz com que estas

percam sua capacidade fotossintética, o que finalmente levaria a planta à senescência e morte. Em função dessa seqüência de eventos, Sinclair e de Wit (1975) classificam a soja como sendo autodestrutiva.

2.2. Fatores que afetam a composição da semente

A qualidade do farelo de soja é dada pelo seu conteúdo de proteína. Como a cultura da soja é semeada no Brasil desde trinta graus de latitude sul até cinco graus de latitude norte, é de se esperar que ocorram variações nas concentrações de proteína e óleo na semente de soja.

Oliveira *et al.* (2004) salientam que o farelo obtido da soja produzida no Brasil, especialmente na região Sul, tem apresentado conteúdo de proteína abaixo das especificações exigidas pelo mercado, o que tem depreciado seu valor. Levando em consideração as adversidades ambientais, Pípolo (2002) estudou os efeitos da temperatura sobre as concentrações de proteína e óleo de sementes de soja e verificou que as concentrações de proteína e óleo e a taxa de acúmulo de massa seca da semente não apresentavam diferenças significativas quando a temperatura variava entre 21 e 29°C, em sementes submetidas ao desenvolvimento *in vitro*, a partir do estágio R₅, durante oito dias. Esse mesmo autor também constatou que as maiores diferenças na concentração de proteína obtidas a campo, dentro de um mesmo local, foram melhor explicadas pela distribuição de chuvas durante o período de enchimento de grãos. Hayati *et al.*, (1996) sugerem que mudanças na disponibilidade de nitrogênio

para as sementes, induzidas pelo meio ambiente, pode ser o mecanismo que explica as variações na concentração de nitrogênio na semente em condições de campo. As mudanças da disponibilidade de nitrogênio para as sementes podem estar relacionadas diretamente com a fixação biológica do nitrogênio. Tem sido largamente documentado que a fixação biológica de N em soja é extremamente sensível ao déficit hídrico, sendo o primeiro processo a ser afetado quando ocorre estresse hídrico (Serraj *et al.*, 1999; Purcell e King, 1996). Para Hungria e Vargas (2000) o estresse hídrico afeta a sobrevivência do *Bradyrhizobium*, a formação e a longevidade dos nódulos, a síntese de leghemoglobina e o estresse mais severo pode levar à paralização irreversível da fixação biológica.

Variações nos teores de proteína e óleo de soja resultantes do manejo da adubação ou da correção da acidez do solo têm sido relatadas na literatura (Tanaka *et al.*, 1991, 1995; Mascarenhas *et al.*, 1996). Spehar (1994) observou alterações na composição mineral dos grãos de diferentes cultivares de soja em função da calagem em solo ácido.

Mascarenhas *et al.* (1990) obtiveram aumento de 3 a 9% no teor de proteína e também uma melhora na qualidade fisiológica de sementes, aplicando calcário dolomítico para redução da acidez e utilizando adubação adequada em fósforo, potássio, enxofre e micronutrientes, quando necessário. Cabe ressaltar que o importante é a quantidade produzida de proteína e óleo ou seja, a produção de sementes multiplicada pelo teor de proteína e óleo.

Streeter (1978) estudou o efeito da deficiência de N em plantas de soja em vários estádios de crescimento sobre a produtividade de grãos e sobre a concentração deste elemento em partes da planta na maturidade. O N foi retirado aos 65, 76 e 87 dias depois da semeadura. O mais curto período de estresse de N resultou em decréscimo de sua concentração e do peso individual de sementes. Períodos mais longos de estresse de N causaram redução do número de vagem e de sementes, assim como, redução de peso e de concentração de N.

Burton (1994) estudou a influência do incremento da fotossíntese, através do aumento da interceptação de luz sobre a concentração de proteína na semente de soja. Para aumentar a interceptação de luz no estágio R₅, a linha central de uma parcela de três linhas foi cortada ou foram cortadas as duas laterais. Ambos os tratamentos resultaram em significativo aumento na produtividade de grãos e na concentração de proteína da semente. A concentração de óleo decresceu em quase todas as linhas, mas não foi estatisticamente significante. O autor concluiu que a relação negativa entre a produtividade de grãos e a concentração de proteína nas sementes não ocorre devido a um inerente antagonismo fisiológico entre as duas características e que o melhoramento de soja, visando o aumento da fotossíntese e/ou a fixação biológica de N, podem aumentar a produtividade de grãos e a concentração de proteína nas sementes.

Paek *et al.* (1997) estudaram em casa de vegetação as mudanças na concentração de proteínas nas sementes devido ao suprimento de N e concluíram que

a soja tem a capacidade de aumentar a concentração de proteína na semente quando mais N é disponibilizado para a semente.

Hayati *et al.* (1995) avaliaram a relação entre a demanda de N pela semente e a senescência das folhas. As plantas de soja cresceram sob a sombra de R₁ até R₅, então, a sombra foi removida com o objetivo de aumentar a fotossíntese e a acumulação de matéria seca e N na semente. Os experimentos incluíram tratamentos com plantas com nodulação sem nodulação e em sistema hidropônico. O aumento da fotossíntese no estágio R₅, quando N estava disponível para as plantas, aumentou seu acúmulo nas sementes em direta proporção com o peso seco, resultando em sua constante concentração. Onde o N não estava disponível para a planta, a retirada da sombra não aumentou seu acúmulo, então, o aumento do peso seco das sementes causou decréscimo na sua concentração.

Nakasathien *et al.* (2000) testaram a hipótese de que a característica de alta concentração de proteína na semente é regulada pelo suprimento de N para as sementes em desenvolvimento e avaliaram o efeito do suprimento de dose extra de N sob a concentração de proteína em semente de soja *in vivo*. Um maior aumento no acúmulo de proteína do que no acúmulo de matéria seca resultou em aumento na concentração de proteína na semente de uma linhagem normal e em uma com nível intermediário de proteína na semente. O aumento da disponibilidade de N também aumentou a concentração de proteína nas linhagens com alto teor protéico, mas este aumento resultou em decréscimo de produtividade de grãos. Isto sugere que linhagens com concentração normal de proteína na semente têm a capacidade bioquímica de

sintetizar mais proteína quando o substrato está disponível e que a concentração de proteína é regulada pela disponibilidade de N para as sementes em desenvolvimento.

Esses resultados implicam que um genótipo de soja, com concentração normal de proteína, tem a capacidade de sintetizar alta concentração de proteína e que a disponibilidade de N no meio pode regular a concentração de proteína na semente.

2.3. Cultivo *in vitro* como isolamento de fatores ambientais

Existem evidências sugerindo que o crescimento e a composição da semente de soja são controlados pela disponibilidade de assimilados disponibilizados pela planta mãe. Portanto, o cultivo de sementes *in vitro* em condições controladas permite estudos dos fatores que regulam o crescimento e a composição da semente sem a interação com a planta mãe. Thompson *et al.* (1977) e Obendorf *et al.* (1984), descreveram o sucesso do cultivo de sementes de soja *in situ* e *in vitro*. Um grande número de avanços no entendimento do desenvolvimento de sementes de soja *in vitro*, incluindo: 1) estimativas de efeito da temperatura sobre a razão de crescimento das sementes (Egli e Wardlaw, 1980; Pípolo, *et al.*, 2004a); 2) relação entre as diferenças genéticas e a taxa de crescimento das sementes e o número de células do cotilédone (Egli *et al.*, 1981); 3) síntese de proteína de armazenamento (Madison *et al.*, 1981); 4) utilização de ureídeos, amidas e aminoácidos na síntese de proteína em cotilédones imaturos de soja (Thompson *et al.*, 1981; Skokut *et al.*, 1982; Rainbird *et al.*, 1984; Holowash *et al.*, 1984; Haga e Sodek, 1987; Wettlaufer e Obendorf, 1991); 5) taxa de crescimento e composição das sementes de soja afetadas pelo suprimento de

carboidrato e/ou nitrogênio assimilado pela semente (Saravitz e Raper, 1995; Hayati *et al.*, 1996; Pípolo, *et. al.*, 2004b).

Thompson *et al.* (1977) e Obendorf *et al.* (1984) demonstraram, ainda, que a semente de soja apresenta desenvolvimento normal em condições *in vitro* a partir de um conjunto simples de materiais. Sacarose é a forma primária de translocação de carboidratos, tendo papel fundamental na partição do carbono para síntese de proteína óleo (Smith *et al.*, 1989). Por outro lado, as principais fontes de nitrogênio que suprem o crescimento da semente e a síntese das proteínas de armazenamento são: glutamina, contribuindo com 55% do requerimento de N da semente e asparagina contribuindo com 20% (Rainbird *et al.*, 1984; Thorne, 1985).

Ureídeos, asparagina e glutamina são importantes na biossíntese de proteínas de reserva nas sementes. Em cotilédones imaturos de soja, Coker e Schaefer (1985) verificaram que todos os nitrogênios da alantoína foram incorporados em proteína, de maneira similar ao nitrogênio amida da glutamina, e que os ureídeos foram degradados, principalmente, no integumento e o NH_4 resultante é usado na síntese protéica.

Saravitz e Raper (1995) avaliaram o requerimento de carbono e nitrogênio em sementes de soja em cultura de sementes *in vitro*. A sacarose nas concentrações de 1,5 a 150 mM foi utilizada como fonte de carbono e a glutamina, 0,6; 6,0; e 120 mM foi utilizada como fonte de N. O acúmulo máximo de matéria seca ocorreu quando as sementes foram cultivadas com 120 mM de sacarose e 6,0 mM de glutamina. O aumento do suprimento de glutamina para 120 mM elevou a concentração de proteína sem o aumento do acúmulo de matéria seca. A concentração de óleo decresceu quando a concentração de glutamina aumentou de 6,0 para 120 mM. A 120

mM de glutamina e 150 mM de sacarose a concentração de proteína alcançou 690 g kg⁻¹ em base seca. Esses resultados indicam que as sementes de soja têm capacidade de produzir mais proteína que as 400 g kg⁻¹ usualmente observadas *in vitro*, e que a concentração de proteína e óleo da semente de soja é, pelo menos parcialmente, regulada pelo suprimento de assimilados provenientes da planta mãe e pela variação desse suprimento durante o desenvolvimento da semente.

Hayati *et al.* (1996) investigaram o efeito do suprimento de N no crescimento de sementes de soja cultivadas *in vitro*. A sacarose foi mantida a 200 mM de concentração e o N foi suprido por asparagina e metionina de 0 a 270 mM. A concentração de N no meio teve pouco efeito no acúmulo de matéria seca. O acúmulo de N aumentou em direta proporção à concentração de N no meio e a concentração de óleo decresceu.

Thompson *et al.* (1977) constataram que a concentração de glutamina de 31, 62,5 e 125 mM teve pouco efeito no acúmulo de matéria seca em cotilédones de soja cultivados *in vitro*, mas a concentração de proteína foi máxima em 62,5 mM. Pípolo *et al.* (2004b) estudaram a influência da concentração crescente de glutamina no incremento de proteína e óleo em sementes de soja. Estes autores sugerem que a porcentagem de proteína na semente aumenta à medida que há uma maior disponibilidade de glutamina para a semente. As porcentagens de proteína e óleo foram inversamente relacionadas quando variou a concentração de glutamina. Dessa forma, os resultados mostraram uma relação negativa entre as porcentagens de proteína e óleo o que se deve ao balanço de carbono e nitrogênio disponibilizados para a semente.

Hsu *et al.* (1984) estudaram a concentração de sacarose e de compostos nitrogenados no apoplasto de sementes de soja em desenvolvimento. As amostras foram coletadas oito vezes do 22º ao 46º dia após o florescimento, cobrindo mais que dois terços do período do enchimento de grão. A concentração encontrada foi de 40 a 80 mM de N e essa variação foi atribuída a picos de rápido crescimento da semente e influxo de nitrogênio remobilizado dos tecidos em senescência.

2.4. Referencias Bibliográficas

BURTON, J.W. Breeding soybean cultivars for increase seed protein percentage. In: CONFERENCIA MUNDIAL DE INVESTIGACION EN SOJA, 4., 1989. Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires: AASoja, 1989, v.2, p. 1079-1085.

BURTON, J.W. Breeding soybean for improved protein quantity and quality. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., 1985. Boulder. **Proceedings...** Boulder: Westview Press, 1985. p. 361-367.

BURTON, J.W. Effects of increase light on soybean seed yield and protein concentration. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 5., 1994. Chiang Mai. **Proceedings...** Chiang Mai: Kasetsart University Press, 1994. p. 362-366.

COKER, G. T. e SCHAEFER, J. ^{15}N and ^{13}C NMR determination of allantoin metabolism in developing soybean cotyledons. **Plant Physiology**, v. 7, p. 129-135, 1985.

EGLI, D.B., FRASER, J.; LEGGETT, J.E.; PONELEIT, C.G. Control of seed growth in soya beans [*Glycine Max* (L.) Merrill]. **Annals of Botany**, v.48 p. 171-176, 1981.

EGLI, D.B., WARDLAW, I.F. Temperature response of seed growth characteristics of soybeans. **Agronomy Journal**, v.72, p. 560-564, 1980.

HAGA, K.L.; SODEK, L. Utilization of nitrogen sources by immature soybean cotyledons in culture. **Annals of Botany**, v.59, p. 597-601, 1987.

HARTWIG, E.E.; HINSON, K. Association between chemical composition of seed and seed yield of soybeans. **Crop Science**, v.12, p. 829-830, 1972.

HASSE, G. **O Brasil da soja: abrindo fronteiras, semeando cidades**. Porto Alegre, RS: Ceval Alimentos, 1996. 256p.

HAYATI, R.; EGLI, D.B.; CRAFTS-BRANDNER, S.J. Carbon and nitrogen supply during seed filling and leaf senescence in soybean. **Crop Science**, v.35, p. 1063-1069, 1995.

HAYATI, R.; EGLI, D.B.; CRAFTS-BRANDNER, S.J. Independence of nitrogen supply and seed growth in soybean: studies using an *in vitro* culture system. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p. 33-44, 1996.

HOLLOWASH, L.P.; THOMPSON, J.F.; MADISON, J.T.; Effects of exogenous methionine on storage protein composition of soybean cotyledons cultured *in vitro*. **Plant Physiology**, v.74, p. 576-584, 1984.

HSU, F.C.; BENNET, A.B.; SPANSWICK, R.M. Concentration of sucrose and nitrogenous compounds in the apoplast of developing soybean seed coats and embryos. **Plant Physiology**, v.75, p. 181-186, 1984.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja**. Londrina, PR: Embrapa, CNPSo, 2001. 48p. (EMBRAPA CNPSo. Circular Técnica, 35).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

HYMOWITZ, T. On the domestication of soybean. **Economic Botany**, Lawrence, v. 24, p. 408-421, 1970.

HYMOWITZ, T.; COLLINS, F.I.; PANCZNER, J.; WALKER, W.M. Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. **Agronomy Journal**, v.64, p. 613-616, 1972.

HYMOWITZ, T.; HARLAN, J.R. Introduction of soybean to north America by Samuel Brown in 1765. **Economic Botany**, v. 37, p. 371-379, 1983.

JOHNSON, H.W.; ROBINSON, H.F.; COMSTOCK, R.E. Genotypic and phenotypic correlations in soybeans and these implications in selection. **Agronomy Journal**, v.47, p. 477-483, 1955.

KROBER, O.A.; CARTER, J.C. Quantitative interrelations of protein and nonprotein constituents of soybean. **Crop Science**, v.2, p. 171-172, 1962.

KWON, S.H.; TORRIE, J.H. Heritability and interrelationship among traits of two soybean populations. **Crop Science**, v.4, p. 196-198, 1964.

MADISON, J.T.; THOMPSON, J.F.; MUENSTER, A.E. Turnover of storage protein in seeds of soya bean and pea. **Annals of Botany**, v.47, p. 65-73, 1981.

MASCARENHAS, H.A.A.; TANAKA, R.T.; GALLO, P.B.; PEREIRA, J.C.V.N.A.; AMBROSANO, G.M.B.; CARMELLO, Q.A.C. Efeito da calagem sobre a produtividade de grãos, proteína e óleo em cultivares precoces de soja. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.53, n.1, p. 164-172, 1996.

MASCARENHAS, H.A.A.; TEIXIERA, J.P.F.; NAGAI, V; TANAKA, R.T.; GALLO, P.B. e PEREIRA, J.C.V. N.A. A calagem nos teores de óleo e proteína em soja. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n. 1, p. 171-182, 1990.

MASCARENHAS, H.A.A.; WUTKE, E.B.; BRAGA, N.R.; TANAKA, R.T; MIRANDA, M. A.C. Cultura da Soja: adubar ou não com nitrogênio? **O Agrônomo**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 46-48, 2001.

NAKASATHIEN, S.; ISRAEL, D.W.; WILSON, R.F.; KWANYUEN, P. Regulation of seed protein concentration in soybean by supra-optimal nitrogen supply. **Crop Science**, v.40, p. 1277-1284, 2000.

OBENDORF, R.L.; TIMPO, E.E., BYRNE, M.C., TOAI, T.V., RYTKO, G.T., HSU, F.C., e ANDERSON, B.G., Soya bean seed growth and maturation *in vitro* without pods. **Annals of Botany**, v. 53, p. 853-863, 1984.

OLIVEIRA, M.A.R.; VICENTE, D.; DELLAGOSTIN, M.; SCHUSTER, I. Introgessão de alto conteúdo de proteína em soja: avaliação em diferentes locais. In: 50º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2004, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. p. 1409.

PAEK, N.C.; INSANDE, J.; SHOEMAKER, R.C.; SHIBLES, R. Nutritional control of soybean seed storage protein. **Crop Science**, v.37, p. 489-503, 1997.

PALMER, R.G.; HYMOWITZ, T.; NELSON, R.L. Germoplasm diversity within soybean. In: **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. Ohio, USA: CAB INTERNATIONAL, 1996. p. 1-35.

PÍPOLO, A.E. **Influência da temperatura sobre as concentrações de proteína e óleo em sementes de soja (*Glycine Max (L) Merrill*)**. 2002. 128 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

PÍPOLO, A.E.; SINCLAIR, T.R.; CAMARA, G. M. S. Effects of temperature on oil and protein concentration in soybean seeds cultured *in vitro*. **Annals of Applied Biology**, v. 144, p. 71-76, 2004a.

PÍPOLO, A.E.; SINCLAIR, T.R.; CAMARA, G. M. S. Protein and oil concentration of soybean seed cultured *in vitro* using nutrient solutions of differing glutamine concentration. **Annals of Applied Biology**, v. 144, p. 223-227, 2004b.

PROBST, A H.; JUDD, R W. Origin, US History, development and world distribution. In: CALDWELL, B.E. (Ed.) **Soybeans**: improvent, production and uses. Madison: American Society of Agronomy, 1973. p. 1-19.

PURCELL, L.C.; KING, C.A. Drought and nitrogen source effects on nitrogen nutrition, seed growth, and yield in soybean. **Journal of Plant Nutrition**, v. 19, p. 969-993, 1996.

RAINBIRD, R.; THORNE, J.H.; HARDY, R.W.F. Role of amides, amino acids, and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, v.74, p. 329-334, 1984.

SARAVITZ, C.H.; RAPER JR, C.D. Responses to sucrose and glutamine by soybean embryos grown *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.93, p. 799-805, 1995.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R.; PURCELL, L.C. Symbiotic N₂ fixation response to drought. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 143-155, 1999.

SHANNON, J.G.; WILCOX, J.R.; PROBST, A.M. Estimated gains from selection for protein and yield in the F4 generation of six soybean populations. **Crop Science**, Madison, v.12, p. 824-826, 1972.

SIMPSON JUNIOR, A.M.; WILCOX, J.R. Genetic and phenotypic associations of agronomic characteristics in four high protein soybean populations. **Crop Science**, Madison, v.23, p. 1077-1081, 1983.

SINCLAIR, T.R.; WIT, C.T. de. Photosynthate and nitrogen requirements for seed production by various crops. **Science**, v. 18, p. 565-567, 1975.

SKOKUT, T.A.. VARNER, J.E.; SCHAFER, J.; STEJSKAL, E.O.; MCKAY, R.A. [¹⁵N] NMR. Determination of asparagine and glutamina nitrogen utilization for syntesis of storage protein in developing cotyledons of soybean in culture. **Plant Physiology**, v.69, p.308-313, 1982.

SMITH, A. M.; RINNE, R.W.; SELF, R.D. Phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase involent in protein and oil biosynthesis during soybean seed development. **Crop Science**, v.29, p.349-353, 1989.

SPEHAR, C.R. Seed quality of soya bean based on mineral composition of seeds of 45 varieties grown in a Brazilian Savanna acid soil. **Euphytica**, Dordrecht, v.76, p.127-132, 1994.

STREETER, J.G. Effect of N starvation of soybean plants at various stages of growth on seed yeld and N concentration of parts at maturity. **Agronomy Journal**, v.70, p.74-76, 1978.

TANAKA, R.T.; MASCARENHAS, H.A.A.; MIRANDA, M.A.C. Effect of liming on soybean protein and oil yield. **Better Crops International**, Atlanta, v.7, n.2, p.9, 1991.

TANAKA, R.T.; MASCARENHAS, H.A.A.; REGITANO D'ARCE, M.A.B.; GALLO, P.B. Concentração e produtividade de óleo e proteína de soja em função da adubação potássica e da calagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.4, p.463-469, 1995.

THOMPSON, J.F.; MADISON, J.T.; MUENSTER, A.E. *In vitro* culture of immature cotyledons of soya bean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Annals of Botany**, v.41, p.29-39, 1977.

THOMPSON, J.F.; MADISON, J.T.; WATERMAN, M.A.; MUENSTER, A.E. Effect of methionine on growth and protein composition of cultured soybean cotyledons. **Phytochemistry**, v.20, p.941-945, 1981.

THORNE, J.C.; FEHR, W.R. Incorporation of highprotein, exotic germplasm into soybean populations by 2- and 3-way crosses. **Crop Science**, Madison, v.10, p.652-655, 1970.

THORNE, J.H. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, v.36, p.317-343, 1985.

VOLDENG, H.D.; COBER, E.R.; HUME, D.J.; GILLARD, C.; MORRISON, M.J. Fifty-eight years of genetic improvement of short-season soybean cultivars in Canada. **Crop Science**, Madison, v.37, p.428-431, 1997.

WAGNER, G.H. Nitrogen fertilization of soybeans. Mo. Agr, Exp. sta. Res. Bull. 797, 1962.

WAREMBOURG, F.R.; FERNANDEZ, M.P. Distribution and remobilization of symbiotical fixed nitrogen in soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.65, p. 281-286, 1985.

WEBER, C.R. Nodulation and non-nodulation soybeans isolines. I Agronomic and chemical attributes. Agron. J. 58:43-46, 1966.

WEISS, M.G.; WEBER, C.R.; WILLIAMS, L.T.T.; PROBST, A.H. Correlations of agronomic characters and temperature with seed compositional characters in soybean, as influenced by variety and time of planting. **Agronomy Journal**, Madison, v.44, p.289-297, 1952.

WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L. Ureides and amides as nitrogen sources for soybean seed growth and maturation *in vitro*. **Crop Science**, v.31, p.1319-1323, 1991.

WILCOX, J.R. Breeding soybeans for improved oil quantity and quality. in: World Soybean Research Conference, 3, Boulder, 1985. **Proceeding**. Boulder: Westview Press, 1985. p.380-386.

WILCOX, J.R.; GUODONG, Z. Relationship between seed yield and seed protein in determinate and indeterminate soybean populations. **Crop Science**, Madison, v.37, p.361-364, 1997.

ZAPATA, F.; DANSO, S.K.A.; HARDARSON, M. *et al*. Time course of nitrogen fixation in field-grown soybean using nitrogen-15 methodology. **Agronomy Journal**, v. 79, p. 172-176, 1987.

3. INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA E ÓLEO EM SEMENTES DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]

3.1. Resumo

A principal utilização da soja, tanto no Brasil como no restante do mundo, é como matéria prima para a indústria de esmagamento que produz óleo degomado e farelo. A concentração de proteína e óleo na semente de soja é herdada como uma característica quantitativa, mas sofre grande influência do meio ambiente. Em condições de cultivo *in vivo* é difícil controlar precisamente o fornecimento de carbono e nitrogênio destinado às sementes. Com o objetivo de avaliar a influência de genótipos de soja sobre a concentração de proteína e óleo na semente com desenvolvimento *in vivo* e *in vitro*, sementes imaturas das cultivares CD 202 e CD 206 foram retiradas da planta mãe no estágio R₅, cultivadas *in vitro* em meio de cultura líquido, contendo 20, 40 e 60 mM de glutamina. As sementes foram incubadas em frascos de vidro em constante agitação, por oito dias, a $25 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, com concentração de sacarose de 204,5 mM. Após esse período de incubação, foi determinado o ganho de massa fresca das sementes. Posteriormente, foi determinado o teor de proteína e óleo das sementes desenvolvidas *in vitro* e das desenvolvidas *in vivo*. O ganho de massa fresca não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) em uma mesma cultivar quando houve alteração da concentração de glutamina. Entre as cultivares, o ganho de massa fresca apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) nas concentrações de 40 e 60 mM de glutamina na cultivar CD 206 em relação à CD 202. A porcentagem de proteína na concentração de 20 mM de glutamina não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) na cultivar CD 206 cultivada *in vitro* quando comparada com a cultivada *in vivo*. Porém o inverso ocorreu para as concentrações de 40 e 60 mM de glutamina. A cultivar CD 202, quando cultivada *in vitro* na concentração de 20 mM, apresentou porcentagem de proteína menor do que a das sementes cultivadas *in vivo*. Porém, acima da concentração de 20 mM de glutamina, a cultivar CD 202 apresentou uma alta porcentagem de proteína, respondendo positivamente ao aumento da concentração de glutamina. Com suprimento adequado de nitrogênio para as sementes com desenvolvimento *in vitro*, o genótipo não limitou o acúmulo de proteína. Entre as duas cultivares estudadas, a proteína se apresentou sempre em maior porcentagem na cultivar CD 206. As concentrações de proteína e óleo foram inversamente relacionadas. O genótipo influencia na composição da semente de soja, pois mesmo quando houve variação no suprimento de nitrogênio para as sementes com desenvolvimento *in vitro* as diferenças estatísticas foram mantidas entre os genótipos.

Palavras Chave: *Glycine max* (L.) Merrill, concentração de glutamina, massa fresca, composição da semente.

3. INFLUENCE OF GENOTIPE ON PROTEIN AND OIL CONCENTRATION OF SOYBEAN SEEDS [*Glycine max* (L.) Merrill]

3.2. ABSTRACT

In Brazil as well as in the rest of the world, soybean is mainly used as raw material of the grinding industry which produces degummed oil and meal. The concentration of oil and protein in soybean seed is an inherited qualitative trait, but it is greatly influenced by the environment. Under the condition of cultivation *in vitro* it is difficult to control precisely the supply of carbon and nitrogen destined for the seeds. With the purpose of evaluating soybean's genotype on the concentration of protein and oil of seeds developed *in vivo* and *in vitro*, immature seeds of cultivars CD 202 and CD 206 were removed from the mother-plant, in the stage R₅, and were cultivated *in vitro*, in a liquid milieu of cultivation which contained 20, 40 and 60 mM of glutamine. The seeds were incubated in glass flasks and agitated constantly during eight days at 25± 0,2 ° C with 204,5 mM sucrose concentration. After that period of incubation it was determined the gain of fresh mass of the seeds. Afterwards it was also determined the oil and protein contents of the seeds developed *in vitro* and those developed *in vivo*. The fresh mass gain did not present a significant difference (P>0,05) in the same cultivar when the glutamine concentration was altered , but between the two cultivars, fresh mass gain showed a significant difference (P<0,05) in the concentration of 40 and 60 mM of glutamine in the cultivar CD 206 as compared to the cultivar CD 202. The protein percentage in the 20 mM glutamine concentration did not present a significant difference (P>0,05) in the cultivar CD 206 cultivated *in vivo*. Nevertheless the opposite occurs in 40 and 60 mM of glutamine concentrations. Cultivar 202 when cultivated *in vitro* in 20 mM concentration showed a lower protein percentage than that of the seed cultivated *in vivo*. However, over 20 mM glutamine concentration, the cultivar CD 202 showed a high percentage of protein what represents a good response to the increase of glutamine concentration. With an adequate supply of nitrogen for the seeds cultivated *in vitro*, the genotype did not limit the protein gain. Between the studied cultivars, protein percentage was always higher in the cultivar CD 206. Oil and protein concentrations were inversely related. The genotype has influence on soybean seeds composition, since it was observed that statistical differences in the oil and protein percentage remained unchanged even when a variation in the nitrogen supply to the seeds developed *in vitro* occurred.

Key words: *Glycine max* (L.) Merrill, glutamine concentration, fresh mass, composition of seed.

3.3. Introdução

A soja é produzida para atender à demanda humana e animal de proteína e óleo, sendo desejável que a alta produtividade de grãos seja também acompanhada de altas concentrações daqueles componentes, pois diminui o custo dos produtos derivados da soja (Tanaka *et al.*, 1995).

A melhoria do potencial produtivo das cultivares de soja é um dos principais objetivos de todos os programas de melhoramento genético conduzidos no país. A produtividade de grãos de soja, em geral, é inversamente correlacionada com o teor de proteína nos grãos (Johnson *et al.*, 1955; Kwon e Torrie, 1964; Thorne e Fehr, 1970; Hartwig e Hinson, 1972; Hymowitz *et al.*, 1972; Shannon *et al.*, 1972; Voldeng *et al.*, 1997; Wilcox e Guodong, 1997).

Oliveira *et al.* (2004) salientaram que o farelo obtido da soja produzida no Brasil, especialmente na região Sul, tem apresentado conteúdo de proteína abaixo das especificações exigidas pelo mercado, o que tem depreciado seu valor. A concentração de proteína e óleo na semente tem controle genético, mas sofre grande influência do meio ambiente (Wilcox, 1985; Burton, 1989). A inversa e consistente relação entre produtividade e concentração de proteína e a correlação negativa entre concentração de proteína e óleo nas sementes de soja constituem barreiras para aumentar os teores de proteína e óleo das linhagens comerciais (Burton, 1985).

Existem evidências sugerindo que o crescimento e a composição da semente de soja são controlados pela disponibilidade de assimilados disponibilizados pela planta mãe. Portanto, o cultivo de sementes *in vitro* em condições controladas permite estudos dos fatores que regulam o crescimento e a composição da semente

sem a interação com a planta mãe. Thompson *et al.* (1977) e Obendorf *et al.* (1984), descreveram o sucesso do cultivo de sementes de soja *in situ* e *in vitro*. Os estudos representaram grandes avanços no entendimento do desenvolvimento de sementes de soja *in vitro*, incluindo: 1) estimativas de efeito da temperatura sobre a razão de crescimento das sementes (Egli e Wardlaw, 1980; Pípolo, *et al.*, 2004a); 2) relação entre as diferenças genéticas e a taxa de crescimento das sementes e o número de células do cotilédone (Egli *et al.*, 1981); 3) síntese de proteína de armazenamento (Madison *et al.*, 1981); 4) utilização de ureídeos, amidas e aminoácidos na síntese de proteína em cotilédones imaturos de soja (Thompson *et al.*, 1981; Skokut *et al.*, 1982; Rainbird *et al.*, 1984; Holowash *et al.*, 1984; Haga e Sodek, 1987; Wettlaufer e Obendorf, 1991); 5) taxa de crescimento e composição das sementes de soja afetadas pelo suprimento de carboidrato e/ou nitrogênio assimilado pela semente (Saravitz e Raper, 1995; Hayati *et al.*, 1996; Pípolo, *et al.*, 2004b).

Thompson *et al.* (1977) e Obendorf *et al.* (1984) demonstraram, ainda, que a semente de soja apresenta desenvolvimento normal em condições *in vitro* a partir de um conjunto simples de materiais. Sacarose é a forma primária de translocação de carboidratos, tendo papel fundamental na partição do carbono para síntese de proteína e óleo (Smith *et al.*, 1989). Por outro lado, as principais fontes de nitrogênio que suprem o crescimento da semente e síntese das proteínas de armazenamento são: glutamina, contribuindo com 55% do requerimento de N da semente e asparagina, contribuindo com 20% (Rainbird *et al.*, 1984; Thorne, 1985).

Ureídeos, asparagina e glutamina são importantes na biossíntese de proteínas de reserva nas sementes. Em cotilédones imaturos de soja, Coker e Schaefer (1985) verificaram que todos os nitrogênios da alantoína foram incorporados

em proteína, de maneira similar ao nitrogênio amida da glutamina, e que os ureídeos foram degradados principalmente no integumento e o NH_4 resultante é usado na síntese protéica.

Saravitz e Raper (1995) avaliaram o requerimento de carbono e nitrogênio em sementes de soja em cultura de sementes *in vitro*. A sacarose nas concentrações de 1,5 a 150 mM foi utilizada como fonte de carbono e a glutamina, 0,6; 6,0; e 120 mM foi utilizada como fonte de N. O acúmulo máximo de matéria seca ocorreu quando as sementes foram cultivadas com 120 mM de sacarose e 6,0 mM de glutamina. O aumento do suprimento de glutamina para 120 mM elevou a concentração de proteína sem o aumento do acúmulo de matéria seca. A concentração de óleo decresceu quando a concentração de glutamina aumentou de 6,0 para 120 mM. A 120 mM de glutamina e 150 mM de sacarose a concentração de proteína alcançou 690 g kg^{-1} em base seca. Estes resultados indicam que as sementes de soja têm capacidade de produzir mais proteína que as 400 g kg^{-1} usualmente observadas *in vitro* e que a concentração de proteína e óleo da semente de soja é, pelo menos parcialmente regulada pelo suprimento de assimilados provenientes da planta mãe e pela variação desse suprimento durante o desenvolvimento da semente.

Hayati *et al.* (1996) investigaram o efeito do suprimento de N no crescimento de sementes de soja cultivadas *in vitro*. A sacarose foi mantida a 200 mM de concentração e o N foi suprido por asparagina e metionina de 0 a 270 mM. A concentração de N no meio teve pouco efeito no acúmulo de matéria seca. O acúmulo de N aumentou em direta proporção à concentração de N no meio e a concentração de óleo decresceu.

Thompson *et al.* (1977) constataram que a concentração de glutamina de 31, 62,5 e 125 mM teve pouco efeito no acúmulo de matéria seca em cotilédones de soja cultivados *in vitro*, mas a concentração de proteína foi máxima em 62 mM. Pípolo *et al.* (2004b) estudaram a influência da concentração crescente de glutamina na incremento de proteína e óleo em sementes de soja. Esses autores sugerem que a porcentagem de proteína na semente aumenta à medida que há uma maior disponibilidade de glutamina para a semente, enquanto que as porcentagens de proteína e óleo foram inversamente relacionadas quando variou a concentração de glutamina. Dessa forma, os resultados mostraram uma relação negativa entre as porcentagens de proteína e óleo, o que se deve ao balanço de carbono e nitrogênio disponibilizado para a semente.

Hsu *et al.* (1984) estudaram a concentração de sacarose e de compostos nitrogenados no apoplasto de sementes de soja em desenvolvimento. As amostras foram coletadas oito vezes do 22º ao 46º dia após o florescimento, cobrindo mais que dois terços do período do enchimento de grão. A concentração encontrada foi de 40 a 80 mM de N e esta variação foi atribuída a picos de rápido crescimento da semente e influxo de nitrogênio remobilizado dos tecidos em senescência.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de genótipos sobre as concentrações de proteína e óleo em sementes de soja.

3.4. Material e Métodos

3.4.1. Fontes de sementes imaturas

Os trabalhos foram conduzidos na Universidade Estadual de Londrina - UEL - Paraná, em laboratórios do departamento de Agronomia.

Foram selecionadas cultivares de soja, de alto e de baixo teor de proteína e óleo, com base em resultados apresentados por Oliveira *et al.* (2004), sendo a cultivar cv. CD 202 (CEPS 77-16 X Invicta) com 36,45% proteína¹ e 22,72% óleo e a CD 206 (OC 87-5085 X FT Abyara) com 40,56% de proteína¹ e 22,10% de óleo. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação em vasos de cerâmica, conduzindo-se duas plantas por vaso. As sementeiras foram realizadas em intervalos de 15 dias para proporcionar contínuo suprimento de sementes imaturas para uso nos experimentos. As práticas culturais adotadas foram sempre realizadas para as duas cultivares sementeiras.

Os vasos foram preparados com solo retirado de barranco a 2 m de profundidade, adubados com 30g da fórmula 04-14-08 e irrigados diariamente.

Vagens do terço médio da planta que apresentavam três sementes foram removidas quatro a cinco semanas depois do florescimento (fase linear do crescimento da semente) quando se apresentavam totalmente alongadas e as sementes ocupando entre 70 a 90% do lúmen da vagem (estádio R₅), quando vistas contra o brilho da luz. As sementes no estágio R₅ foram submetidas a desenvolvimento

¹ Análise de grãos safra 2003/2004, local Cascavel/PR, Fonte: Guia de Produtos COODETEC 2006, p 44 e p 52.

in vitro por oito dias. As plantas continuaram o desenvolvimento e ao fim do período de oito dias, foram coletadas sementes das vagens do terço médio da planta e assim como as sementes desenvolvidas *in vitro*, foram submetidas à determinação de proteína e óleo.

3.4.2. Condições de cultivo *in vitro*

As condições de cultivo *in vitro* foram realizadas conforme Pípolo (2002), com as vagens esterilizadas, utilizando-se o seguinte procedimento: em constante agitação as vagens foram submersas em água com 10 gotas de detergente líquido por dois a três minutos, lavadas três vezes em água para remover o sabão e então, imersas em de 200 ml L⁻¹ de hipoclorito de sódio e duas gotas de Tween 20 por 100 ml de água, por 15 minutos. Em uma câmara de fluxo laminar a solução foi decantada e as vagens lavadas cinco vezes com água destilada.

Em condição estéril, as sementes foram retiradas das vagens com auxílio de tesoura e pinça e colocadas em frascos de vidro com capacidade de 300 ml, contendo o meio com a seguinte concentração (mM) dos componentes: KCl, 10; MgSO₄. 7H₂O, 8.0; MnSO₄. H₂O, 0.499; ZnSO₄. 7H₂O, 0.150; CuSO₄. 5H₂O, 0.0025; CaCl₂. 2H₂O, 2.99; KI, 0.005; KH₂PO₄, 1.25; H₃BO₃, 0.100; Na₂MoO₄. 2H₂O, 0.001; FeSO₄. 7H₂O, 0.100; Na EDTA, 0.100; glycina, 0.027; ácido nicotínico, 0.004; tiamina HCl, 0.001; piridoxina HCl, 0.0005 e mio-inositol, 0.555 (Obendorf *et al.* 1983). De acordo Obendorf e Wettlaufer (1984), para prevenir a germinação precoce a concentração de sacarose foi de 204,5 mM. As soluções estoque dos meios de cultura foram preparadas, previamente, sem sacarose, mio-inositol e glutamina. No dia da

instalação do experimento, sacarose e mio-inositol foram adicionados à solução. Oito ml do meio (sem glutamina) foram colocados em cada frasco, tampado e autoclavado a 121°C e 18 PSI por 15 minutos.

Na câmara de fluxo laminar, foram adicionados em cada frasco, 4 ml de água destilada autoclavada. A glutamina foi esterilizada por ultrafiltração, ainda dentro da câmara de fluxo laminar, e adicionada aos frascos os seguintes tratamentos: 20, 40 e 60 mM.

Os tratamentos foram realizados através de incubação das sementes em frascos de vidro com capacidade de 300 ml, em constante agitação. As sementes foram cultivadas em temperatura $25 \pm 0,2$ °C em um ambiente com luz contínua de lâmpadas fluorescentes compactas (Empalux, modelo FL 1276) de 27W e 127V, proporcionando uma faixa de 1.300 lux, sobre agitador de 100 rotações/minutos, envolvido em material para que não houvesse a passagem da luz externa.

Os experimentos foram instalados contemplando as três concentrações de glutamina (20, 40 e 60 mM) em cinco repetições das duas cultivares estudadas, distribuídas sobre o agitador de forma aleatória. As sementes foram mantidas em cultura por oito dias (Obendorf *et al.* 1984) e os experimentos repetidos por três vezes. Os frascos que apresentaram contaminação visível foram descartados (Figura 1).



Figura 1. Cultivo *in vitro* de sementes de soja por 8 dias com variação na dose de glutamina em 20, 40 e 60 mM.

3.4.3. Determinação da massa fresca das sementes

Os frascos com o meio de cultura foram pesados antes e depois de ser colocada a semente, para se obter o peso inicial da semente. Ao final de cada experimento, com oito dias de cultivo, duas a três sementes foram removidas dos frascos, enxugadas em papel-toalha e pesadas para a obtenção do peso final. O

acúmulo de massa fresca foi determinado a partir da diferença de valores do peso final em relação ao peso inicial.

3.4.4. Determinação das concentrações de proteína e óleo

As amostras obtidas de duas a três sementes para determinação da massa fresca, assim como amostras das sementes que continuaram o desenvolvimento *in vivo*, foram utilizadas para a determinação das porcentagens de proteína e óleo das sementes.

A concentração de óleo foi determinada conforme descrito por Sasser (1990), Thomas (2001) e Pípolo (2002). As sementes foram moídas manualmente e colocadas em tubos de ensaio pré-pesados e pesados novamente para determinar o peso da amostra. As amostras foram cobertas com 5,0 ml de hexano: metil tertibutil ether (1:1). A mistura foi homogeneizada através do vórtex por dois minutos e deixada em repouso por 24 horas a 25° C. Os tubos foram homogeneizados novamente por dois minutos e então centrifugados por dez minutos a 1500 rpm. A maior parte do solvente foi removida com pipeta de Pasteur, seguida de adição de mais solvente à amostra. Este processo foi repetido três vezes, mas a segunda e a terceira extrações foram incubadas por 4 horas. Após a terceira extração o solvente remanescente após a pipetagem foi evaporado injetando-se gás N₂ sobre a amostra aquecida a 45° C em banho-maria. O conteúdo de óleo foi determinado como a diferença de massa entre a

amostra inicial e o farelo remanescente depois das extrações. A concentração de óleo foi expressa com a quantidade de óleo em 100 mg da amostra inicial.

Para análise de nitrogênio, o farelo remanescente em cada frasco, após a extração de óleo, foi analisado usando-se o procedimento de Kjeldahl, conforme descrito por Pregnoatto e Pregnoatto (1985). As amostras foram digeridas por meio da digestão em bloco de alumínio modificado de Gallaher *et al.* (1975). O catalizador foi 1,5 g de 9:1 K_2SO_4 : $CuSO_4$ e a digestão foi conduzida por pelo menos 4 horas a 375°C, usando 6 ml de H_2SO_4 e 2 ml de H_2O_2 . O nitrogênio foi determinado por colorímetro semi-automatizado e a concentração de proteína foi calculada multiplicando-se a concentração de N por 6,25.

3.4.5. Análise Estatística

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados esquema fatorial 2X3 (2 cultivares e 3 doses de glutamina), onde cada período de cultivo foi considerado um bloco. Os resultados das avaliações dos experimentos foram analisados pelo procedimento ANOVA. Quando o efeito de tratamento foi significativo ao nível de 5% de probabilidade, o teste de Tukey foi utilizado para comparação entre as médias. Análises de regressão foram realizadas para avaliação das porcentagens de proteína e óleo.

3.5. Resultados e Discussão

Os ganhos de massa fresca das sementes em cultura, apresentados na Tabela 1, mostram que em uma mesma cultivar não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as concentrações de 20, 40 e 60 mM de glutamina. Quando comparado entre as cultivares, o ganho de massa fresca também não apresentou diferenças na concentração de 20 mM de glutamina, porém nas concentrações de 40 e 60 mM o acúmulo de massa fresca foi mais intenso na cultivar CD 206 que na CD 202. Para a realização do estudo foi utilizada a concentração de sacarose no meio de 204,49 mM para prevenir a germinação precoce (Obendorf e Wettlaufer, 1984), enquanto que Saravitz e Raper (1995) reportaram em estudo *in vitro* que o maior acúmulo de massa fresca foi obtido a 150 mM de sacarose e que, quando a sacarose limitou o crescimento, a semente de soja foi capaz usar glutamina como fonte de energia, assim como fonte de N.

Tabela 1. Efeito da concentração de glutamina sobre o ganho de massa fresca (mg) de sementes de soja cultivadas *in vitro* por 8 dias.

Cultivar	Peso Inicial ¹	Glutamina (mM)		
		20	40	60
CD 206	0,16	0,20 ² Aa	0,24 Aa	0,25 Aa
CD 202	0,15	0,19 Aa	0,19 Ba	0,20 Ba

CV% = 11,15

¹ = Peso médio da semente no início do desenvolvimento *in vitro*.

² = Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Assim como nos resultados obtidos por Pípolo (2002), a concentração de glutamina afetou a composição da semente de soja. A porcentagem de proteína na

semente aumentou quando houve o aumento da concentração de glutamina no cultivo *in vitro* (Tabela 2), diferindo-se estatisticamente ($P < 0,05$) para a mesma cultivar, tanto na CD 206 quanto na CD 202.

As cultivares estudadas apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$), para o cultivo *in vivo*, onde a cultivar CD 206 apresentou 41,33% e a CD 202 37,09% de proteína, uma diferença de 4,24% entre as duas cultivares.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) na cultivar CD 206 cultivada *in vivo* (41,33%) para o cultivo *in vitro* (40,97%) com concentração de 20 mM de glutamina. Nessa mesma concentração de glutamina a cultivar CD 202 apresentou diferença significativa, com média inferior no cultivo *in vitro* (35,93%), se comparada com o cultivo *in vivo* (37,09%), uma diferença, portanto, de 1,16% de proteína.

Tabela 2. Conteúdo de proteína¹ (%) nas sementes de soja com desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* cultivadas por 8 dias com variações nas concentrações de glutamina.

Cultivar	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i> (Glutamina (mM))		
		20	40	60
CD 206	41,33 ² Ac	40,97 Ac	42,63 Ab	43,51 Aa
CD 202	37,09 Bc	35,93 Bd	41,95 Bb	42,97 Ba

CV% = 0,59

¹ = Base seca;

² = Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Quando comparadas as cultivares, houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) para todas as concentrações de glutamina no cultivo *in vitro*, assim como para o cultivo *in vivo*, sendo a cultivar CD 206 a que apresentou as maiores médias de porcentagem de proteína.

O ganho obtido na porcentagem de proteína no cultivo *in vitro* entre as concentrações de 20 e 40 mM de glutamina foi de 1,66% para a cultivar CD 206 e de 6,02% para a cultivar CD 202. Estes resultados mostram um grande aumento na porcentagem de proteína quando houve o aumento de glutamina, com um acentuado ganho na porcentagem de proteína na cultivar CD 202. Houve, portanto, uma diferença significativa entre as cultivares na concentração de 20 mM, sendo que a cultivar CD 206 apresentou 5,04% de proteína a mais que a CD 202. Na concentração de 40 mM, a diferença entre as cultivares foi de 0,68%, com a cultivar CD 206 apresentando maior valor, e apesar de pequena, houve diferença significativa entre as cultivares.

Entre as concentrações de 40 e 60 mM de glutamina, as diferenças na porcentagem de proteína na cultivar CD 206 foram de 0,88%, apresentando o maior valor na concentração de 60 mM. Para a cultivar CD 202, a diferença foi de 1,02%, também apresentando o maior valor na concentração de 60 mM. Quando comparadas as cultivares, a diferença entre a cultivar CD 206 e a CD 202 na concentração de 60 mM de glutamina foi de 0,54% de proteína. Da mesma forma que na concentração de 40 mM houve uma pequena, porém significativa diferença entre as cultivares.

A cultivar CD 202, apresenta uma diferença bastante acentuada entre as concentrações de 20 e 40 mM de glutamina (6,02%), mas o mesmo não ocorre entre as concentrações de 40 e 60 mM (1,02%). Na cultivar CD 206 há uma menor variação nas diferenças apresentadas entre as concentrações de 20 e 40 mM de glutamina (1,66%) e as concentrações de 40 e 60 mM (0,88%); isto pode ser melhor observado na Figura 2, pode-se verificar que a concentração de 20 mM glutamina, seria a disponibilidade crítica de N, para formação de proteína na semente. Para Saravitz e Raper (1995), a concentração de proteína e óleo da semente de soja é

regulada pelo suprimento de assimilados provenientes da planta mãe e pela variação daquele suprimento durante o desenvolvimento da semente.

O ganho obtido na porcentagem de proteína da cultivar CD 202, entre a concentração de 20 mM (35,93%) e a concentração de 60 mM glutamina (42,97%), foi de 7,04% de proteína. Para a cultivar CD 206 o ganho de proteína entre a concentração de 20 mM (40,97%) e a concentração de 60 mM glutamina (43,51%) foi de 2,54% de proteína.

Comparando os resultados de ganho de massa fresca com as porcentagens de proteína das sementes, pode-se verificar que as sementes com maior ganho de massa fresca, no caso a cultivar CD 206, também obtiveram uma maior porcentagem de proteína.

Na regressão de ajuste da parábola, as porcentagens de proteína entre as cultivares se equivalem na concentração de 45,2 mM de glutamina. Nakasathien *et al.* (2000) sugerem que linhagens com concentração normal de proteína na semente têm a capacidade bioquímica de sintetizar mais proteína quando o substrato está disponível.

Thompson *et al.* (1977) testaram diferentes concentrações de glutamina e a proteína foi máxima a 62,5 mM. Esse comportamento foi observado na cultivar CD 202 que apresentou tendência de diminuição na porcentagem de proteína, mas o mesmo não foi observado na cultivar CD 206. Talvez isso pudesse acontecer em uma concentração maior de glutamina.

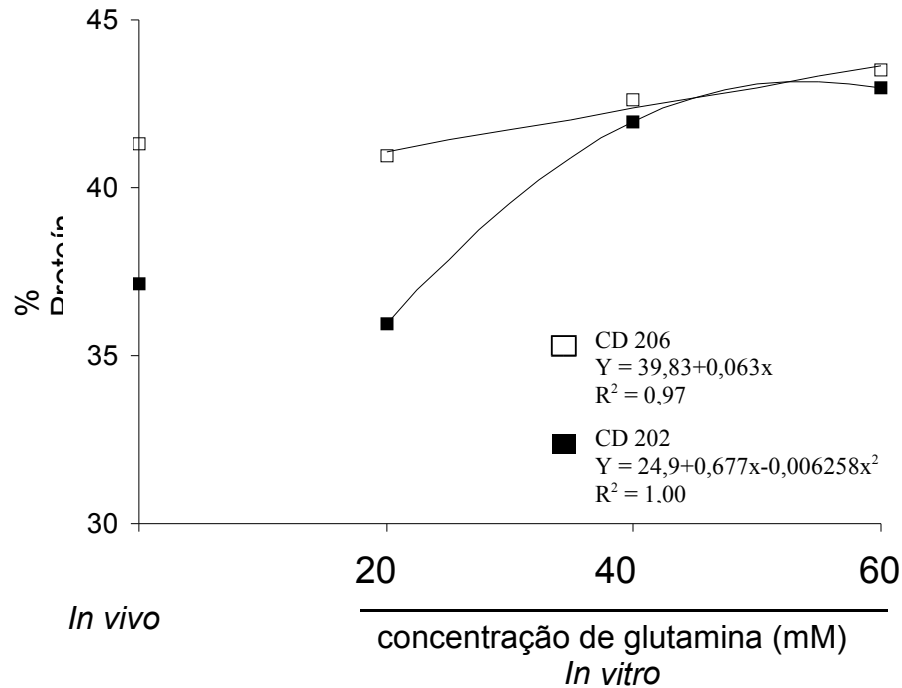


Figura 2. Conteúdo de proteína (%) em base seca nas sementes de soja com desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* cultivadas por 8 dias com variações nas concentrações de glutamina.

O aumento da porcentagem de proteína resultou em decréscimo na porcentagem de óleo (Tabela 3), sugerindo, então, a relação negativa entre proteína e óleo (Johnson *et al.*, 1955; Kwon e Torrie, 1964; Thorne e Fehr, 1970; Hymowitz *et al.*, 1972; Simpson Junior e Wilcox, 1983; Burton, 1985; Wilcox e Guodong, 1997).

A semente de soja madura contém aproximadamente 40% de proteína, 20% de óleo, 17% de celulose e hemicelulose, 7% de açúcares, 5% de fibras e 6% de cinzas em base seca (Krober *et al.*, 1962). Os resultados mostram que a relação negativa entre proteína e óleo não apresentaram as mesmas taxas de variação, pois quando a proteína alcançou valores de 6,02%, entre as concentrações de 20 e 40 mM

de glutamina na cultivar CD 202, a porcentagem de óleo nessa mesma cultivar, entre essas mesmas concentrações de glutamina, apresentou uma variação de 0,45%. Nas mesmas condições a cultivar CD 206 apresentou variação de proteína de 1,66% e de óleo foi de 2,78%. Pode-se inferir que outros constituintes da semente podem ter sofrido alterações em função da disponibilidade de N no substrato.

No cultivo *in vivo* a concentração de óleo nas cultivares estudadas apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$); a cultivar CD 202 apresentou 16,53% a cultivar CD 206 15,55% de óleo, uma diferença, portanto, de 0,98% entre as duas cultivares.

Tabela 3. Conteúdo de óleo (%) nas sementes de soja com desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* cultivadas por 8 dias com variações nas concentrações de glutamina.

Cultivar	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i> (Glutamina (mM))		
		20	40	60
CD 202	16,53 ¹ Ab	17,86 Aa	15,08 Ac	14,67 Ad
CD 206	15,55 Bab	15,68 Ba	15,23 Ab	14,24 Bc

CV% = 0,99

¹ = Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

A cultivar CD 206 não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre o cultivo *in vivo* (15,55%) e o cultivo *in vitro* na concentração de 20 mM de glutamina (15,68%), enquanto que a cultivar CD 202 apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) para o cultivo *in vitro* na concentração de 20 mM de glutamina (17,86%) sobre o cultivo *in vivo* (16,53%). Entre as cultivares, a diferença no cultivo *in vitro* na concentração de 20 mM de glutamina foi de 2,18%.

O ganho obtido na porcentagem de óleo no cultivo *in vitro* entre as concentrações de 20 e 40 mM de glutamina foi de 0,45% para a cultivar CD 206 e de 2,78% para a cultivar CD 202. Houve, também, diferença significativa entre as cultivares na concentração de 20 mM, sendo que a cultivar CD 206 apresentou 2,18% de óleo menos que a CD 202. Na concentração de 40 mM não houve diferença significativa entre as cultivares.

Entre as concentrações de 40 e 60 mM de glutamina, as diferenças na porcentagem de óleo na cultivar CD 206 foram de 0,99%, apresentando o maior valor na concentração de 40 mM. Os valores apresentados no cultivo *in vitro* na concentração de 40 mM de glutamina (15,23%) não diferem estatisticamente dos valores apresentados por esta cultivar no cultivo *in vivo* (15,55%). Para a cultivar CD 202, a diferença foi de 0,41%, também apresentando o maior valor na concentração de 40 mM. Quando comparadas as cultivares, a diferença entre a cultivar CD 202 sobre a CD 206 na concentração de 60 mM de glutamina foi de 0,43% de óleo. Neste caso houve uma pequena, porém significativa diferença entre as cultivares.

O queda na porcentagem de óleo da cultivar CD 202 entre a concentração de 20 mM (17,86%) e a concentração de 60 mM glutamina (14,67%), foi de 3,19%. Para a cultivar CD 206 a perda de óleo entre a concentração de 20 mM (15,68%) e a concentração de 60 mM glutamina (14,24%) foi de 1,44% de óleo.

Na concentração de 40 mM de glutamina não houve diferença significativa para teor de óleo entre as duas cultivares. Isto pode ser melhor visualizado na figura 3, pois a cultivar CD 202 apresenta uma média menor que a CD 206. Na concentração de 60 mM há uma inversão da porcentagem de óleo nas sementes das cultivares estudadas.

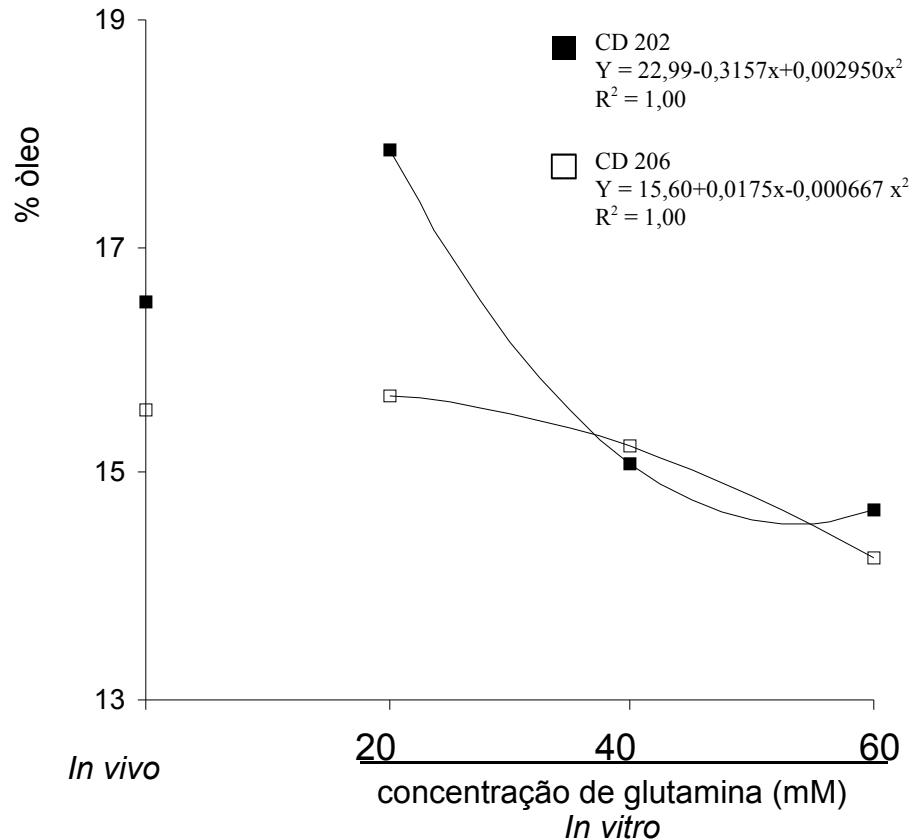


Figura 3. Conteúdo de óleo (%) nas sementes de soja com desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* cultivadas por 8 dias com variações nas concentrações de glutamina.

Pípolo (2002) salienta que o aumento na concentração de N resultou na utilização da fonte de carbono disponibilizada pelo meio para a síntese de proteína, restando menos carbono para síntese de óleo. Se a síntese de proteína é afetada, mais recursos tornam-se disponíveis para a síntese de óleo e a relação pode ser alterada. Em experimentos de curta duração, perante o constante suprimento de carbono, quando a concentração de N aumenta, a tendência da semente é parar de sintetizar proteína. Dessa forma, apesar do controle genético da concentração de proteína e óleo

de uma cultivar específica, a disponibilidade de N regula a concentração de proteína na semente.

3.6. Conclusão

Houve o aumento do conteúdo protéico na semente com o aumento da concentração de glutamina, tanto na cultivar CD 202 quanto na CD 206.

Quanto às concentrações de proteína entre as cultivares estudadas, apesar de apresentarem diferenças pequenas nas concentrações de 40 e 60 mM de glutamina, os genótipos foram estatisticamente diferentes, levando a afirmar que o genótipo influencia a concentração de proteína na semente.

As concentrações de proteína e óleo foram inversamente relacionadas quando variou a concentração de glutamina. Para a concentração de óleo, as diferenças permaneceram nas concentrações de 20 e 60 mM de glutamina, demonstrando, também, haver influencia do genótipo.

3.7. Referencias Bibliográficas

BURTON, J.W. Breeding soybean cultivars for increase seed protein percentage. In: CONFERENCIA MUNDIAL DE INVETIGACION EN SOJA, 4., 1989. Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires: AASoja, 1989, v.2, p. 1079-1085.

BURTON, J.W. Breeding soybean for improved protein quantity and quality. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., 1985. Boulder. **Proceedings...** Boulder: Westview Press, 1985. p. 361-367.

COKER, G. T. e SCHAEFER, J. ^{15}N and ^{13}C NMR determination of allantoin metabolism in developing soybean cotyledons. **Plant Physiology**, v. 7, p. 129-135, 1985.

EGLI, D.B., FRASER, J.; LEGGETT, J.E.; PONELEIT, C.G. Control of seed growth in soya beans [*Glycine Max* (L.) Merril]. **Annals of Botany**, v.48 p. 171-176, 1981.

HAGA, K.L; SODEK, L. Utilization of nitrogen sources by immature soybean cotyledons in culture. **Annals of Botany**, v.59, p. 597-601, 1987.

HARTWIG, E.E.; HINSON, K. Association between chemical composition of seed and seed yield of soybeans. **Crop Science**, v.12, p. 829-830, 1972.

HAYATI, R.; EGLI, D.B.; CRAFTS-BRANDNER, S.J. Independence of nitrogen supply and seed growth in soybean: studies using an *in vitro* culture system. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p. 33-44, 1996.

HOLLOWASH, L.P.; THOMPSON, J.F.; MADISON, J.T.; Effects of exogenous methionine on storage protein composition of soybean cotyledons cultured *in vitro*. **Plant Physiology**, v.74, p. 576-584, 1984.

HSU, F.C.; BENNET, A.B.; SPANSWICK, R.M. Concentration of sucrose and nitrogenous compounds in the apoplast of developing soybean seed coats and embryos. **Plant Physiology**, v.75, p. 181-186, 1984.

HYMOWITZ, T.; COLLINS, F.I.; PANCZNER, J.; WALKER, W.M. Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. **Agronomy Journal**, v.64, p. 613-616, 1972.

JOHNSON, H.W.; ROBINSON, H.F.; COMSTOCK, R.E. Genotypic and phenotypic correlations in soybeans and these implications in selection. **Agronomy Journal**, v.47, p. 477-483, 1955.

KROBER, O.A.; CARTER, J.C. Quantitative interrelations of protein and nonprotein constituents of soybean. **Crop Science**, v.2, p. 171-172, 1962.

KWON, S.H.; TORRIE, J.H. Heritability and interrelationship among traits of two soybean populations. **Crop Science**, v.4, p. 196-198, 1964.

MADISON, J.T.; THOMPSON, J.F.; MUENSTER, A.E. Turnover of storage protein in seeds of soya bean and pea. **Annals of Botany**, v.47, p. 65-73, 1981.

NAKASATHIEN, S.; ISRAEL, D.W.; WILSON, R.F.; KWANYUEN, P. Regulation of seed protein concentration in soybean by supra-optimal nitrogen supply. **Crop Science**, v.40, p. 1277-1284, 2000.

OBENDORF, R.L.; RYTKO, G.T. e BYRNE, M.C., Soya bean seed growth and maturation by *in vitro* pod culture. **Annals of Botany**, v. 51, p. 217-227, 1983.

OBENDORF, R.L.; TIMPO, E.E., BYRNE, M.C., TOAI, T.V., RYTKO, G.T., HSU, F.C., e ANDERSON, B.G., Soya bean seed growth and maturation *in vitro* without pods. **Annals of Botany**, v. 53, p. 853-863, 1984.

OBENDORF, R.L.; WETTLAUFER, S.H. Precocious germination during *in vitro* growth of soybean seeds. **Plant Physiology**, v.76, p. 1024-1028, 1984.

OLIVEIRA, M.A.R.; VICENTE, D.; DELLAGOSTIN, M.; SCHUSTER, I. Introgressão de alto conteúdo de proteína em soja: avaliação em diferentes locais. In: 50º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2004, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. p. 1409.

PÍPOLO, A.E. **Influência da temperatura sobre as concentrações de proteína e óleo em sementes de soja (*Glycine Max (L) Merrill*)**. 2002. 128 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

PÍPOLO, A.E.; SINCLAIR, T.R.; CAMARA, G. M. S. Effects of temperature on oil and protein concentration in soybean seeds cultured *in vitro*. **Annals of Applied Biology**, v. 144, p. 71-76, 2004a.

PÍPOLO, A.E.; SINCLAIR, T.R.; CAMARA, G. M. S. Protein and oil concentration of soybean seed cultured *in vitro* using nutrient solutions of differing glutamine concentration. **Annals of Applied Biology**, v. 144, p. 223-227, 2004b.

PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N.P. (Coord.). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v.1, p.25-26,42-45.

RAINBIRD, R.; THORNE, J.H.; HARDY, R.W.F. Role of amides, amino acids, and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, v.74, p. 329-334, 1984.

SARAVITZ, C.H.; RAPER JR, C.D. Responses to sucrose and glutamine by soybean embryos grown *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.93, p. 799-805, 1995.

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatografia of cellular fatty acids**. Newark, DE: MIDI, 1990. 7p (MIDI, Technical Note 101).

SHANNON, J.G.; WILCOX, J.R.; PROBST, A.M. Estimated gains from selection for protein and yield in the F4 generation of six soybean populations. **Crop Science**, Madison, v.12, p. 824-826, 1972.

SIMPSON JUNIOR, A.M.; WILCOX, J.R. Genetic and phenotypic associations of agronomic characteristics in four high protein soybean populations. **Crop Science**, Madison, v.23, p. 1077-1081, 1983.

SKOKUT, T.A.. VARNER, J.E.; SCHAFFER, J.; STEJSKAL, E.O.; MCKAY, R.A. [¹⁵N] NMR. Determination of asparagine and glutamina nitrogen utilization for syntesis of storage protein in developing cotyledons of soybean in culture. **Plant Physiology**, v.69, p.308-313, 1982.

SMITH, A. M.; RINNE, R.W.; SELF, R.D. Phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase involvement in protein and oil biosynthesis during soybean seed development. **Crop Science**, v.29, p.349-353, 1989.

TANAKA, R.T.; MASCARENHAS, H.A.A.; REGITANOD'ARCE, M.A.B.; GALLO, P.B. Concentração e produtividade de proteína e óleo de soja em função da adubação potássica e da calagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.4, p.463-469, 1995.

THOMAS, J.M.G. **Impact of elevated temperature and carbon dioxide on development and composition of soybean seed.** Gainesville, 2001. 187p. Thesis (Ph.D) – University of Florida.

THOMPSON, J.F.; MADISON, J.T.; MUENSTER, A.E. *in vitro* culture of immature cotyledons of soya bean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Annals of Botany**, v.41, p.29-39, 1977.

THOMPSON, J.F.; MADISON, J.T.; WATERMAN, M.A.; MUENSTER, A.E. Effect of methinine on growth and protein composition of cultured soybean cotyledons. **Phytochemistry**, v.20, p.941-945, 1981.

THORNE, J.C.; FEHR, W.R. Incorporation of highprotein, exotic germplasm into soybean populations by 2- and 3-way crosses. **Crop Science**, Madison, v.10, p.652-655, 1970.

THORNE, J.H. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, v.36, p.317-343, 1985.

VOLDENG, H.D.; COBER, E.R.; HUME, D.J.; GILLARD, C.; MORRISON, M.J. Fifty-eight years of genetic improvement of short-season soybean cultivars in Canada. **Crop Science**, Madison, v.37, p.428-431, 1997.

WEISS, M.G.; WEBER, C.R.; WILLIAMS, L.T.T.; PROBST, A.H. Correlations of agronomic characters and temperature with seed compositional characters in soybean, as influenced by variety and time of planting. **Agronomy Journal**, Madison, v.44, p.289-297, 1952.

WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L. Ureides and amides as nitrogen sources for soybean seed growth and maturation *in vitro*. **Crop Science**, v.31, p.1319-1323, 1991.

WILCOX, J.R. Breeding soybeans for improved oil quantity and quality. in: World Soybean Research Conference, 3, Boulder, 1985. **Proceeding**. Boulder: Westview Press, 1985. P.380-386.

WILCOX, J.R.; GUODONG, Z. Relationship between seed yield and seed protein in determinate and indeterminate soybean populations. **Crop Science**, Madison, v.37, p.361-364, 1997.