

# CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ELETROFORÉTICA DE 20 CULTIVARES DE SOJA<sup>1</sup>

GERARDO CAMPS<sup>2</sup>, FRANCISCO DE JESUS VERNETTI<sup>3</sup>, ELIANE AUGUSTIN<sup>4</sup> e DIANA IRIGON<sup>5</sup>

**RESUMO** - O presente trabalho teve como objetivos: a) o ajuste e padronização do método de eletroforese de proteínas da semente, que ajude a diferenciar as cultivares; b) caracterização eletroforética das cultivares em estudo; c) caracterização morfológica das sementes e plântulas das cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em estudo. Foram estudadas 20 cultivares comerciais provenientes do Uruguai e do Rio Grande do Sul. As cultivares foram semeadas no campo, em duas épocas. A partir de amostras de plantas desse experimento, fizeram-se as determinações em laboratório das características das sementes e plântulas, e respectiva caracterização eletroforética. Dos resultados obtidos conclui-se que: a) os descritores "forma da semente" e "brilho do tegumento" têm valor apenas complementar na caracterização de cultivares de soja; b) melhor resolução e separação das bandas eletroforéticas foi obtida através do acréscimo de gelatina na homogeneização de amostras, e de sucrose ou amido no preparo de géis de poliacrilamida; c) a eletroforese é um método confiável e de grande potencial para caracterizar cultivares de soja, já que outros sistemas enzimáticos e outras técnicas podem ser usados, ou vir a ser desenvolvidos.

Termos para indexação: identificação de cultivares, *Glycine max*.

## MORPHOLOGICAL AND ELECTROPHORETICAL CHARACTERIZATION OF TWENTY SOYBEAN CULTIVARS

**ABSTRACT** - The objectives of this research were: a) to adjust and set patterns for a method to differentiate soybean cultivars (*Glycine max* (L.) Merrill) through seed protein electrophoresis; b) to perform the electrophoretic bands of the cultivars under study; and c) morphological characterization of seed and seedlings of the cultivars under study. Twenty commercial cultivars from Uruguay and from the Brazilian state of Rio Grande do Sul, were planted in the field, in two seeding dates, and their traits and morphological descriptions performed. Samples of plants were harvested and threshed separately and their seeds were taken to the laboratory to have their external traits described and to be submitted to electrophoretic analysis. Under the conditions of the experiment, the results allowed the following conclusions: a) the seed descriptors "seed form" and "tegument luster", have only a complementary value in the characterization of soybean cultivars; b) better resolution and separation of electrophoretic bands was obtained when powder gelatin was used to homogenize the samples, or when sucrose or starch were used to prepare polyacrylamide gels; and c) the electrophoresis is a reliable method bearing high potential to be used to describe soybean cultivars, or to be employed for other polymorphic enzymes and techniques.

Index terms: cultivar identification, *Glycine max*.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o número de lançamentos de novas cultivares de soja tem aumentado. Em geral, um grande número delas foram selecionadas de ancestrais comuns, apresentando grande semelhança (Mc. Kee, 1973; Orf et al., 1980; Wagner & Mc. Donald Junior, 1981). Essa situação aumentou a dificuldade de distinguir as cultivares entre si utilizando apenas o método tradicional de descrição de características morfológicas. O de-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 10 de agosto de 1994.

Extraído da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada à Univ. Fed. de Pelotas, RS.

<sup>2</sup> Eng.-Agr., M.Sc., Técnico em Sementes Ministério de Ganadería, Agricultura y Pesca do Uruguai. Av. Uruguay 1016 - Montevideo.

<sup>3</sup> Eng.-Agr., M.Sc., C/PACT/EMBRAPA, CEP 96001-970, Pelotas, RS.

<sup>4</sup> Enga.-Agra., Ph.D., C/PACT/EMBRAPA.

<sup>5</sup> Enga.-Agra., M.Sc., Profª.-Adjunta, Univ. Fed. de Pelotas, CEP 96001-970 Pelotas, RS.

envolvimento de procedimentos químicos para caracterizar cultivares tem possibilitado um grande avanço nos métodos de sua identificação. Dentre eles, a eletroforese constitui poderosa ferramenta para a análise qualitativa e quantitativa de compostos químicos presentes na semente e em partes da plântula. Portanto, pode ser usada para caracterizar cultivares, pois cada uma delas pode diferir das outras em uma ou mais proteínas, ou constituintes enzimáticos.

As proteínas (enzimáticas ou não) são a expressão mais direta dos genes, e a principal vantagem desse uso, em relação à técnica descritiva clássica, é a de possibilitar a determinação direta de uma expressão genética do organismo, independentemente das influências ambientais (Pontikis et al., citado por Machado et al., 1986). Além disso, os estudos genéticos têm revelado predominância de herança monogênica, para as isoenzimas, razão pela qual, desde que as cultivares tenham pureza e estabilidade genética, as expressões de um grande número de isoenzimas podem ser sistematicamente reproduzidas (Oliveira, 1976). Outras vantagens do uso da eletroforese de proteína, para a caracterização varietal, são: custo relativamente baixo dos equipamentos, rapidez de análise, facilidade de operação dos equipamentos e uso de pequenas quantidades de homogenizados de tecidos; não é imprescindível a purificação das proteínas.

Os estudos das proteínas em cereais, através da eletroforese, iniciaram-se em 1960, com Schwartz, citado por Oliveira (1977), trabalhando com milho. Na soja, as primeiras referências datam de 1967, quando Larsen, estudando 61 cultivares dos Estados Unidos e Canadá, determinou a presença de 21 bandas de proteína, das quais uma, que denominou "A", era característica de 13 cultivares, enquanto que outra, denominada "B" (de migração mais rápida que "A"), foi detectada nas restantes 48 cultivares. Estes padrões eletroforéticos demonstraram serem estáveis e repetíveis, quando usadas sementes da mesma cultivar, desenvolvidas em diferentes ambientes. Payne & Koszykowski (1978) estudaram as isoenzimas de esterase de sementes de 44 cultivares comerciais de soja. Usaram SDS na extração e posterior eletroforese de disco em gel de poli(acrilamida). Observaram a existência de três padrões, com base na diferença

de intensidade (medida com o auxílio de um densitômetro) de duas das bandas.

Wagner & Mc Donald Junior (1981) analisaram as enzimas amilase, fosfatase ácida, urease, glutamato-oxalacetato transaminase, lactato desidrogenase e malato desidrogenase de 36 cultivares comerciais de soja. As amostras foram obtidas em sementes secas, e a técnica usada foi a de eletroforese de disco. Das seis enzimas estudadas, somente a -amilase e a urease apresentaram padrões eletroforéticos diferentes entre as cultivares (dois padrões para cada enzima). Através da técnica eletroforética, nenhuma cultivar foi identificada inequivocamente, mas somando estes resultados aos de outras avaliações (cor do hilo, cor do hipocótilo, atividade da peroxidase do tegumento da semente), conseguiram identificar 15 das 36 cultivares.

Para Cardy & Beverdorf (1984), existe suficiente evidência para afirmar que, na medida em que mais enzimas polimórficas sejam incluídas num sistema de caracterização das cultivares, a eletroforese de isoenzimas pode ser um instrumento de identificação muito útil. Estes autores estudaram onze sistemas enzimáticos presentes em cotilédones de plântulas de quatro dias, de 174 cultivares de soja. Desta forma, conseguiram identificar 134 (77%) das cultivares. Quando os padrões eletroforéticos foram combinados com características morfológicas (cor de flor, da pubescência e do hilo), o número de cultivares identificadas foi de 165 (95%).

Com base nessas considerações, foram estabelecidos os objetivos deste trabalho: a) ajuste e padronização do método de eletroforese para proteínas da semente, que ajude a diferenciar rapidamente as cultivares; b) caracterização eletroforética das cultivares; c) caracterização morfológica de sementes e plântulas através de alguns testes de laboratório, d) identificação das cultivares em laboratório.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 20 cultivares comerciais provenientes do Uruguai e do Rio Grande do Sul, que foram semeadas num experimento, no campo, em duas épocas. Na maturidade, foram tomadas amostras de dez plantas

de cada cultivar, em cada época, as quais foram usadas para o estudo das características da semente e da eletroforese.

### Caracterização morfológica

#### Sementes

**Cor do hilo** - Sabe-se, segundo Vernetti (1983), da existência de sete cores do hilo: cinza, amarela (ou verde), preta, preta imperfeita, marrom claro rosado, marrom e marrom avermelhado. As cultivares em estudo foram incluídas em uma dessas categorias.

**Forma da semente** - Para cada época foi efetuada a apreciação visual da semente, e as cultivares, classificadas como de semente esférica, esférica achatada, alongada ou alongada achatada.

**Brilho do tegumento** - Para essa característica, foram consideradas três categorias: brilhante, intermediária e fosco.

**Atividade da peroxidase no tegumento da semente** - Este teste foi conduzido seguindo o procedimento descrito por Buttery & Buzzell (1968). Cinco sementes de cada cultivar e de cada época (total de dez sementes de cada cultivar) foram utilizadas para caracterizar a atividade da peroxidase das cultivares. Nos casos de cultivares que apresentavam sementes com alta atividade e outras com baixa atividade, foram usadas dez sementes de cada época (total de 20 sementes).

#### Plântulas

**Cor do hipocótilo** - Esta característica foi observada no campo, mas é possível usá-la em plântulas desenvolvidas em casa de vegetação, ou em câmaras de germinação. As cultivares foram classificadas como tendo hipocótilo de cor verde ou púrpura.

### Caracterização eletroforética

Foi utilizada a técnica de eletroforese horizontal, em gel de poliacrilamida. Usaram-se entre seis e 20 sementes para caracterizar cada cultivar.

#### Sistemas de tampão

**Foram usados dois:** Sistema de tampão descontínuo, descrito por Scandalios (1969), usado para a obtenção dos eletroforogramas de proteína (PROT) e da esterase (EST).

- Sistema de tampão contínuo Tris-citrato pH 6.2. Tampão das pontes: 26.642 g de Tris 0.22 M, 18.072 g

de ácido cítrico 0.086 M, água até completar 1000 ml; ajuste do pH com NaOH. Tampão do gel: 35 ml de tampão das pontes e água até completar 1000 ml. Este sistema adotou-se para a leucina aminopeptidase (LAP).

**Preparo da amostra** - Colocaram-se as sementes imersas em água destilada, durante aproximadamente 18 horas. Foram utilizados os seguintes tecidos: para PROT, cotilédone; para EST, cotilédone e endosperma; para LAP, eixo embrionário. O endosperma da soja é constituído, segundo Williams (1950), citado por Gandolfi et al. (1983), por uma camada de células cúbicas repletas de aleurona e várias camadas de células parenquimáticas comprimidas. Este tecido era retirado da parte interna do tegumento, com o auxílio de uma pinça de aço de ponta fina.

As quantidades de cada tecido, usadas como amostra, eram as seguintes: 10 mg de cotilédone, todo o eixo embrionário (entre 9 e 12 mg) e 10 mg de endosperma. A solução de extração estava constituída de nove partes do tampão B de Scandalios, uma parte de tampão A e 0.15% de 2-mercaptoetanol. A melhor relação do tecido: solução de extração foi de 1:3 para EST do endosperma, 1:2 para EST do cotilédone e 1:1 para LAP.

Antes da maceração do endosperma e do cotilédone, foi acrescentado 20% do peso da amostra em gelatina em pó para análise, com a finalidade de melhorar a resolução das bandas.

As amostras eram então maceradas com um bastão de vidro e a solução sobrenadante absorvida em pequenos retângulos de papel Whatman 3 MM, de 4,00 mm x 1,5 mm, para posterior aplicação nos géis.

**Preparo dos géis e migração** - Usaram-se géis a 6, 8 e 9%, sendo a composição a seguinte: Cyanogum (6,0 g, 8,0 g ou 9,0 g, segundo a concentração desejada), 100 ml de tampão, 0,1 ml de TEMED, 1,0 ml de persulfato de amônio (sol. a 10%). Colocava-se o gel, com as amostras aplicadas, a migrar em cubas eletrolíticas mantidas em câmara fria a 4°C.

Submetia-se o gel a uma diferença de potencial máxima de 10 V/cm linear, deixando-se migrar até que a linha de frente, indicada por uma gota de azul de bromo fenol colocada no orifício central, atingisse 9,0 cm, desde o ponto de aplicação. Após a migração, o gel era retirado cuidadosamente da canaleta e colocado em um recipiente adequado, para a sua coloração.

**Coloração dos géis** - Para a EST, a técnica da revelação foi a de Scandalios (1969), com modificações:

1 - Água destilada	: 20 ml
2 - Naphthyl acetato (1% em 1:1 acetona- -água)	: 1,5 ml
3 - Fast Blue RR salt	: 50 ml

4 - Tampão C	: 25 ml
5 - Tampão D	: 5 ml

O gel era incubado a 37°C, até o aparecimento das bandas, depois lavado com água de torneira e fixado com solução 5:5:1 de água destilada-metanol-ácido acético.

Para a LAP, empregou-se, também, o sistema descrito por Scandalios (1969), com algumas modificações:

1 - Água destilada	: 15 ml
2 - L-Leucyl -naphthylamide HCl dissolvido em 0,5 ml de metanol e 5 ml de água destilada)	: 10 mg
3 - Black-k Salt ou Fast Garnet GBC	: 20 mg
4 - Tampão E	: 25 ml
5 - Tampão F	: 10 ml
6 - MnCl <sub>2</sub>	: 5 gotas
7 - FeCl <sub>3</sub> (solução a 3%)	: 1 ml

O gel era incubado, lavado e fixado, conforme descrito para EST.

Para a obtenção dos eletroforogramas da PROT, foi seguida a seguinte técnica:

1 - Coomassie Blue	: 60 mg
2 - Fixador (5:5:1 de água destilada-álcool metílico-ácido acético)	: 100 ml

O gel era incubado a temperatura ambiente, até o aparecimento das bandas; depois era descolorido com o fixador citado acima.

**Avaliação dos resultados** - Foi feita a avaliação qualitativa e semiquantitativa dos zimogramas obtidos.

A avaliação qualitativa foi efetuada através da medida da distância percorrida pelas isoenzimas, desde a origem. Dividindo-se esta distância pela percorrida por um banda padrão, calculou-se a mobilidade relativa.

A avaliação semiquantitativa foi feita segundo a concentração das isoenzimas, expressa pela intensidade das bandas, nos casos da EST do cotilédone e do endosperma e da PROT.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Cor do hipocótilo

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1.

**Cor do hilo** - Na Tabela 2 são apresentados os resultados do estudo da cor do hilo das sementes.

**TABELA 1. Cor do hipocótilo de 20 cultivares de soja.**

Cultivar	Hipocótilo*	Cultivar	Hipocótilo
A 6381	P	Hood 75	P
Bay	P	IAS 5	V
BR 8	P	Ivorá	V
BR 12	P	PEL 75004	P
Bragg	V	Planalto	P
Braxton	P	Ransom	P
CEP 12	V	Rendidora 627	V
CEP 16	P	Rendidora 801	P
Forrest	V	Rendidora J. Fé	V
GaSoy 17	V	RS 7	P

\* P: púrpura; V: verde.

**TABELA 2. Cor do hilo das sementes de 20 cultivares de soja, em duas épocas de semeadura.**

Cultivar	Cor do hilo*	Cultivar	Cor do hilo
A 6381	PI	Hood 75	MCR
Bay	MCR	IAS 5	MCR
BR 8	MCR	Ivorá	MCR
BR 12	MCR	PEL 75004	MCR
Bragg	P	Planalto	MCR
Braxton	P	Ransom	P
CEP 12	MCR	Rendidora 627	P
CEP 16	MCR	Rendidora 801	P
Forrest	P	Rendidora J. Fé	M
GaSoy 17	MCR	RS 7	MCR

\* PI: preta imperfeita; MCR: marrom claro rosado; P: preto e M: marrom.

No estudo das cultivares de cor de hilo preta, foi observado, nas duas épocas, que, em algumas, a cor do hilo ficava restrita ao hilo propriamente dito, e, em outras, a cor extravasava tenuemente para o tegumento circundante ao hilo. As cultivares que apresentavam cor preta fora do limite do hilo foram Forrest e Braxton. Nas restantes, a coloração limitava-se ao hilo. Se confirmada em pesquisa posterior, esta poderia ser uma característica e incluir na descrição de cultivares de cor de hilo preta.

Foi observado que a cor marrom claro rosado apresentou diferenças de tonalidade nas diferentes cultivares, entre plantas da mesma cultivar, e alguma variação na intensidade de uma época para outra, na mesma cultivar, como mencionado por

Vernetti 1983). Além disso, nas cultivares A 6381 e IAS 5, em algumas plantas, a cor variava em intensidade, até entre sementes da mesma planta.

**Forma da semente e brilho do tegumento -**

Quanto à forma da semente, pode-se observar, na Tabela 3, que em seis das cultivares ocorreu variação, conforme a época da semeadura. Isto pode ser atribuído ao fato de que, quanto mais cheia e maior a semente (como são em geral as da primeira época), maior a tendência de que ela se desenvolvesse mais no sentido da largura e comprimento do que na espessura, dando a aparência de esférica achatada. Segundo Payne (1979), a variação na forma das sementes da mesma cultivar pode ser devida à posição da semente na vagem e pode estar influenciada pelas condições ambientais, durante o seu enchimento.

Na característica brilho do tegumento, pode-se observar que duas das cultivares foram classificadas em categorias diferentes, em cada época. As sementes foram manipuladas cuidadosamente com

**TABELA 3. Forma da semente e brilho do tegumento, em cada época de semeadura.**

Cultivares	Forma da semente*		Brilho do tegumento**	
	1ª.	2ª.	1ª.	2ª.
	época	época	época	época
A 6381	E	E	B	B
Bay	EA	E	I	I
BR 8	EA	E	F	I
BR 12	EA	E	F	F
Bragg	E	E	B	B
Braxton	EA	E	B	B
CEP 12	E	E	I	I
CEP 16	EA	E	B	B
Forrest	EA	EA	I	I
Gasoy 17	E	E	I	I
Hood 75	EA	EA	I	I
IAS 5	EA	EA	I	I
Ivorá	EA	EA	F	F
PEL 75004	EA	EA	F	F
Planalto	EA	EA	I	B
Ransom	E	E	B	B
Rendidora 627	E	E	B	B
Rendidora 801	E	E	I	I
Rendidora J. Fé	E	E	I	I
RS 7	EA	E	F	F

\* E: esférica e EA esférica achatada.

\*\* B: brilhante; I: intermédio e F: fosco.

pinça de aço, para evitar que o contato com as mãos pudesse depositar oleosidade no tegumento e, com isso, modificar o brilho natural, o que, segundo Payne (1979), pode ocorrer.

**Atividade da peroxidase no tegumento da semente -** Na Tabela 4 são apresentados os resultados do teste da atividade da peroxidase no tegumento da semente.

A peroxidase catalisa a reação de degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e ½ O<sub>2</sub>. Quando a peroxidase tem alta atividade, a quantidade de O<sub>2</sub> liberado reage com o guaiaicol, produzindo a coloração marrom-avermelhado. A ausência dessa cor indica baixa atividade da peroxidase (reação negativa).

**Eletroforese**

**Esterase -** Foi observado que diferentes formas moleculares desta enzima estavam presentes no cotilédone e no endosperma, resultando em padrões diferentes para cada um desses tecidos.

**Esterase do cotilédone -** Nas cultivares estudadas, foram observados dois padrões eletroforéticos, denominados A (presente em 12 cultivares) e B (encontrado em oito cultivares), apresentados na Fig. 1. Um terceiro padrão, denominado C, foi encontrado em uma planta atípica da cultivar IAS 5 e em outra planta atípica da cultivar Ivorá.

Estudando o padrão anódico de 20 cultivares, Andrade & Heidrich-Sobrinho (1980), utilizando gel de amido no sistema de tampão descontínuo de Scandalios (1969), também observaram a existência de dois padrões eletroforéticos.

**Esterase do endosperma -** Neste tecido, a EST apresentou bandas de maior mobilidade que no

**TABELA 4. Atividade da peroxidase no tegumento da semente, nas duas épocas de semeadura.**

Cultivar	Ativ.*	Cultivar	Ativ.	Cultivar	Ativ.
A 6381	-	CEP 16	+	Planalto	+
Bay	+	Forrest	+	Ransom	+,-
BR 8	+	Gasoy 17	+	Rendidora 627	-
BR 12	+	Hood 75	+	Rendidora 801	+
Bragg	-	IAS 5	+	Rendidora J. Fé	+
Braxton	+,-	Ivorá	+	RS 7	-
CEP 12	+	PEL 75004	-		-

\* +: alta atividade; -: baixa atividade e +, -: sementes com alta atividade e sementes com baixa atividade.

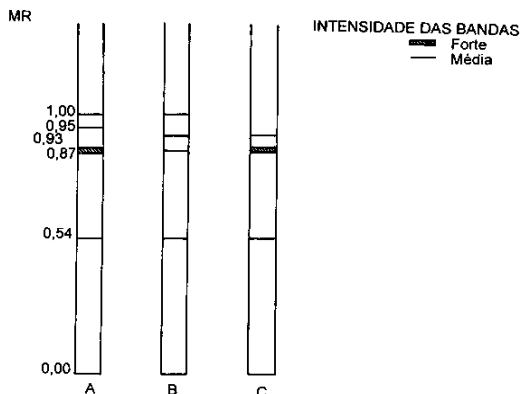


FIG. 1. Padrões de eletroforéticos da esterase do cotilédone da semente de soja.

cotilédone, mas não evidenciou diferenças entre as cultivares, resultando em um só padrão, conforme Fig. 2.

**Leucina aminopeptidase** - Foram observados dois padrões eletroforéticos denominados A (presente em quinze das cultivares) e B (presente em três cultivares). Duas cultivares, BR 8 e PEL 75004, apresentaram plantas com padrão A e plantas com padrão B. Essas duas cultivares são originárias do mesmo cruzamento (Tabela 5).

A existência de variabilidade intravarietal também foi observada, entre outros, por Cardy & Beversdorf (1984), que, estudando onze sistemas enzimáticos de 174 cultivares, encontraram, em 62 (36%) delas, duas ou mais sublinhas isoenzimáticas diferentes. Este fato não é inesperado, desde que a uniformidade isoenzimática não tem sido selecionada pelos melhoristas.

A diferença entre os padrões A e B está baseada na mobilidade de uma das bandas, tal como é observado na Fig. 3.

**Proteínas** - Com o método estabelecido, foram observados dois padrões eletroforéticos entre as cultivares estudadas. O padrão denominado A foi observado na cultivar Forrest, e o B, nas restantes.

Na mesma planta atípica que apresentou padrão C para EST do cotilédone, foram observadas sementes com padrão B, outras com um padrão denominado C e outras com um padrão híbrido de B x C, o que indica possível segregação.

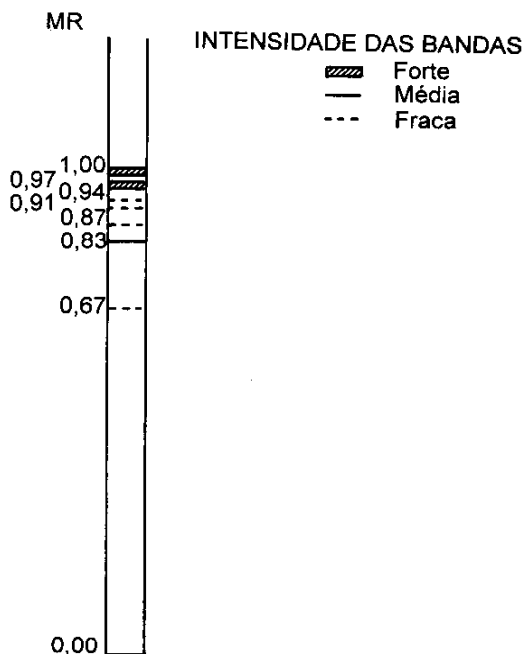


FIG. 2. Padrão eletroforético da esterase do endosperma da semente de soja.

Os padrões encontrados são apresentados na Fig. 4.

As condições de extração das proteínas e a técnica eletroforética usadas neste trabalho diferem das usadas por Larsen (1967) e das usadas por Orf et al. (1980), não permitindo a comparação dos resultados. Nesses estudos, Larsen (1967) observou, entre 61 cultivares, a existência de dois padrões, enquanto Orf et al. (1980), trabalhando com 3.338 cultivares e linhagens, observaram a existência de seis padrões.

#### Padronização eletroforética das cultivares -

Na Tabela 6 são apresentados os padrões eletroforéticos da proteína e das enzimas, característicos de cada cultivar.

Através das proteínas e duas enzimas, foi possível identificar inequivocamente as cultivares IAS 5 e Forrest, ficando as restantes agrupadas da seguinte forma: dois grupos de duas cultivares, um grupo de três cultivares, e outro de onze cultivares. Essa pequena diferenciação entre as cultivares era esperada, em face dos resultados obtidos pelos

TABELA 5. Genealogia das cultivares.

A6381	N 723038 - Essex
Bay	York - R 62-550
BR 8	Bienville - Hampton
BR 12	Bienville - Hood
Bragg	Jackson - D 49-2491
Braxton	F 59-1505 x Bragg - D 60-7965
CEP 12	Bragg - Hood
CEP 16	IAS 2 - Pérola
Forrest	Dyer - Bragg
GaSoy 17	Bragg - Hood
Hood 75	Composta de 12 linhas F4 do 7º. retrocruzamento Hood 8 - Arksoy
IAS 5	Hill x Roanoke - Ogden
Ivorá	Davis - Shinanomejiro x Howgyoku - Am. comum
PEL 75004	Bienville - Hampton
Planalto	Hood - Kedelee STB 452
Ransom	N 55-5931 - N 55-3818 x D 56-1185
Rendidora 627	Wabash x Boone - CNS
Rendidora 801	Bragg - Halesoy 71
Rendidora	
Juan. Fé	Halesoy 71 - Bragg
RS 7	Ivorá - PI 80837

autores citados e dada a estreita base genética das cultivares estudadas. Conforme consta na Tabela 5, cinco cultivares têm a Bragg como um dos progenitores, e uma cultivar a tem como mãe de um dos seus progenitores, sendo que a cultivar Hood (da qual deriva Hood 75) é progenitor de quatro das cultivares, enquanto a Ivorá foi usada como receptora de pólen no cruzamento que deu origem a RS 7. A cultivar Bienville foi usada como mãe nos cruzamentos que deram origem a PEL 75004, BR 8 e a BR 12. As cultivares GaSoy 17 e CEP 12 têm os mesmos progenitores (Hood e Bragg), assim como BR 8 e PEL 75004 (Bienville e Hampton), Rendidora Juan Fé e Rendidora 801 (Halesoy 71 e Bragg).

Considerando a estreita base genética que, em geral, existe nas cultivares comerciais de soja, faz-se necessário, para aumentar a diferenciação através dos padrões eletroforéticos, trabalhar com um maior número de enzimas, e dessa forma possibilitar a análise de uma porção maior do genoma. Foi assim que Cardy & Beversdorf (1984), utilizando onze sistemas enzimáticos, conseguiram identificar 77% das 174 cultivares estudadas.

MR

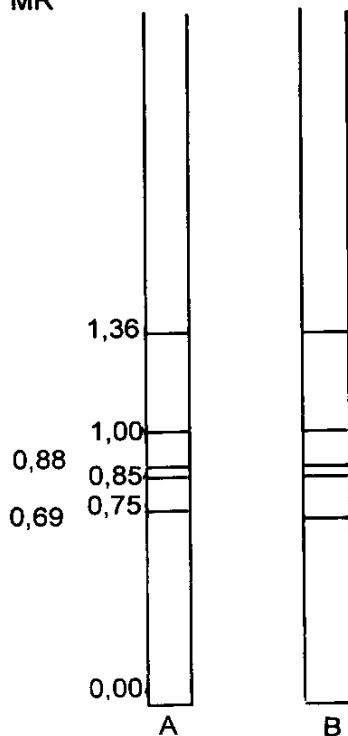


FIG. 3. Padrões eletroforéticos de leucina aminopeptidase do eixo embrionário da semente de soja.

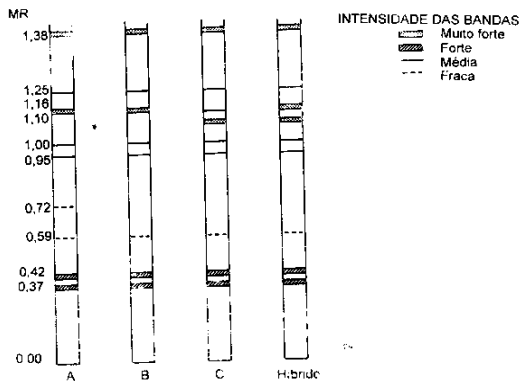


FIG. 4. Padrões eletroforéticos da proteína do cotilédone da semente de soja.

**TABELA 6. Padrões eletroforéticos de 20 cultivares de soja.**

Padrão*	Cultivares
A - A - A	A 6381, Bay, BR 12, Braxton, CEP 12, CEP 16, GaSoy 17, Hood 75, Ivorá, Planalto e RS 7
A - A - B	Bragg, Ransom e Rendidora 627
A - B - B	Rendidora 801 e Rendidora Juan Fé
A - A, B - B	BR 8 e PEL 75004
A - B - A	IAS 5
B - A - B	Forrest

\* Proteína - leucina aminopeptidase - esterase do cotilédone.

### Identificação das cultivares

A identificação de cultivares usando uma combinação de testes de laboratório é um importante auxílio para os organismos encarregados da certificação de sementes, pois possibilita rápida verificação da identidade dos lotes e permite comprovar se a pureza varietal de um lote é aceitável, para posterior semeadura dentro do esquema de certificação. Este tipo de teste também é de interesse para melhoristas e bancos de germoplasmas, pelo fato de permitir a detecção de genótipos discrepantes do padrão da cultivar e evidenciar mudanças na pureza genética de um estoque de semente genética ou básica.

Na Tabela 7 é apresentada uma chave para a identificação das cultivares estudadas, usando a cor do hilo, a cor do hipocótilo, reação à atividade da peroxidase, e alguns padrões eletroforéticos.

A Tabela 7 mostra que dez cultivares puderam ser identificadas inequivocamente através dos testes rápidos, enquanto que as restantes ficaram agrupadas da seguinte forma: um grupo com duas cultivares, um grupo com três cultivares e outro grupo com cinco cultivares.

Dentre os testes de laboratório efetuados, a eletroforese é o que tem maior potencialidade, já que outros sistemas enzimáticos conhecidos podem ser analisados e novas enzimas podem ser pesquisadas.

**TABELA 7. Chave para identificação de 20 cultivares de soja.**

Hilo marrom	Rendidora Juan Fé
Hilo preto imperfeito	A 6381
Hilo preto imperfeito e MCR*	RS 7
Hilo marrom claro rosado	
Hipocótilo verde	
Leucina aminopeptidase B	IAS 5
Leucina aminopeptidase A	CEP 12, GaSoy 17 e Ivorá
Hipocótilo púrpura	
Peroxidase -	PEL 75004
Peroxidase +	
Leucina aminopeptidase A, B	BR 8
Leucina aminopeptidase A	Bay, BR 12, CEP 16, Hood 75 e Planalto
Hilo preto	
Hipocótilo verde	
Peroxidase +	Forrest
Peroxidase -	Bragg e Rendidora 627
Hipocótilo púrpura	
Peroxidase +	Rendidora 801
Peroxidase +, -	
Esterase do cotilédone A	Braxton
Esterase do cotilédone B	Ransom

\* Marrom claro rosado.

### CONCLUSÕES

1. As características "forma da semente" e "brilho do tegumento" têm apenas valor complementar (ou mesmo secundário), para a caracterização de cultivares de soja.

2. Os padrões da eletroforese, graças à repetibilidade dos resultados, são de grande confiabilidade para a caracterização de cultivares e, conseqüentemente, têm grande potencial de uso, já que outros sistemas enzimáticos e outras técnicas eletroforéticas podem ser usadas ou vir a ser reveladas.

3. Acrescentando o equivalente a 20% do peso da amostra de gelatina em pó, na homogeneização dos tecidos, melhora-se a resolução das bandas da esterase do cotilédone e da proteína.

4. Acrescentando 8% de sucrose no preparo do gel, melhora-se a resolução das bandas da esterase do cotilédone.

5. Acrescentando 2% de amido solúvel no preparo do gel, obtém-se melhor separação de bandas de leucina-aminopeptidase.



6. A variação na tonalidade da cor do hilo, dentro e entre cultivares de uma mesma cor, principalmente as de preta imperfeita e de marrom claro rosado, merece ser pesquisada com profundidade, a fim de esclarecer suas causas.

7. Justifica-se o estudo, em futuros trabalhos, das causas do extravasamento da cor ao redor do hilo, em cultivares de hilo preto, visando sua possível inclusão como característica útil à descrição de cultivares.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R.N.D. de; HEIDRICH-SOBRINHO, E.E. Caracterização de cultivares de soja através da técnica eletroforética. *Revista Brasileira de Sementes*, v.2, n.3, p.97-104, 1980.
- BUTTERY, B.R.; BUZZELL, R.I. Peroxidase activity in seeds of soybean varieties. *Crop Science*, v.8, p.722-725, 1968.
- CARDY, B.J.; BEVERSDORF, W.D. Identification of soybean cultivares using isoenzyme electrophoresis. *Seed Science & Technology*, v.12, p.943-954, 1984.
- GANDOLFI, V.H.; BAN, A.D.; VILHORDO, B.W.; MULLER, L. In: VERNETTI, F. de J. *Soja*. Campinas: Fundação Cargill, 1983. v.2, p.17-89.
- LARSEN, A.L. Electrophoretic differences in seed proteins among varieties of soybean - *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, v.7, p.311-313, 1967.
- MACHADO, C.A.E.; NAKASU, B.H.; OLIVEIRA, E.A. Padrões isoenzimáticos de superóxido-dismutase de alguns genótipos de pessegueiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.21, n.11, p.1193-1199, 1986.
- Mc. KEE, G.W. Chemical and biochemical techniques for varietal identification. *Seed Science & Technology*, v.1, p.181-199, 1973.
- OLIVEIRA, E.A. Controle genético de isoenzimas de peroxidase e catecol oxidase em *Phaseolus vulgaris* (L.) e suas relações com *Uromyces phaseoli* (Rep.) Wint. *typica* Arth. Porto Alegre: UFRGS, 1977. Tese de Doutorado.
- OLIVEIRA, H.A. Padrões eletroforéticos e genética de isoenzimas na identificação de cultivares e linhagens de *Pisum sativum* (L.) e sua utilização no melhoramento genético. Porto Alegre: UFRGS, 1976. Tese de Doutorado.
- ORF, J.H.; KAIZUMA, J.H.; HYMOWITZ, T. Six soybean seed protein electrophoretic variants. *Seed Science & Technology*, v.8, p.401-406, 1980.
- PAYNE, R.C. Some new tests and procedures for determining variety (Soybeans. I). *Seed Technology*, v.3, p.61-76, 1979.
- PAYNE, R.C.; KOSZYKOWSKI, T.J. Esterase isoenzyme differences in seed extract among soybean cultivars. *Crop Science*, v.18, p.557-559, 1978.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochemical Genetics*, v.3, p.37-79, 1969.
- VERNETTI, F. de J. *Produção de sementes de soja*. I. Caracterização de cultivares. EMBRAPA-UEPAE Pelotas, 1983. 36p. (EMBRAPA-UEPAE Pelotas. Circular Técnica, 16).
- WAGNER, C.K.; Mc. DONALD JUNIOR, M.B. Identification of soybean *Glycine max* (L.) Merrill cultivars using rapid laboratory techniques. Wooster, Ohio: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1981. 21p. (Research Bulletin, 1133).