

Comportamiento de glicinina, β -conglucina y α -amilasa en semillas de soja deterioradas y no deterioradas⁽¹⁾

Adriana Rita Salinas⁽²⁾, Ana Maria Yoldjian⁽³⁾, María Lucrecia Dietrich⁽²⁾, Roque Mario Craviotto⁽³⁾ y Vilma Bisaro⁽²⁾

Resumen – El objetivo del trabajo fue estudiar el comportamiento de glicinina y β -conglucina y la actividad de α -amilasa en semillas deterioradas y no deterioradas de 10 cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merr.]. Las semillas se sometieron a dos tratamientos: deterioradas por envejecimiento acelerado y no deterioradas. Se determinó la presencia de las proteínas de reserva a partir de semillas con 0, 3 y 8 días de germinadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). La actividad de la α -amilasa se determinó bioquímicamente en semillas con 0, 3, 8 y 12 días de germinadas. No hubo diferencias en la presencia de bandas de glicinina y β -conglucina en semillas no deterioradas hasta los 8 días de germinadas. Las semillas deterioradas se comportaron en forma similar a las no deterioradas. La actividad de la α -amilasa aumentó en semillas germinadas hasta 8 días y disminuyó a los 12 días. En semillas deterioradas la actividad enzimática disminuyó con respecto a las no deterioradas. El deterioro artificial no afectó la presencia de glicinina y β -conglucina pero alteró la actividad de la α -amilasa hasta los 12 días de germinación. Los cultivares estudiados mostraron comportamiento diferencial frente a la actividad de esta enzima.

Términos para índice: *Glycine max*, germinación, electroforesis, proteínas de reserva, deterioro, actividad enzimática.

Glycinin, β -conglycinin and α -amylase behaviour in artificially deteriorated and not deteriorated soybean

Abstract – The objective of this research was to study the behaviour of the storage proteins glycinin and β -conglycinin and the α -amylase activity in artificially deteriorated and not deteriorated soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds of 10 cultivars. The seeds were submitted to two treatments: deteriorated by accelerated aging and not deteriorated seeds. The presence of glycinin and β -conglycinin were determined in seeds with 0, 3 and 8 days of germination using polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE). The α -amylase activity was biochemically determined in seeds with 0, 3, 8 and 12 days of germination. There were no differences in the presence of glycinin and β -conglycinin electrophoretic bands in not deteriorated seeds until 8 days of germination. The deteriorated seeds showed a similar behaviour to the not deteriorated seeds. The α -amylase activity increased in seeds until the eighth day of germination and decreased to the twelfth day. The enzymatic activity of the deteriorated seeds decreased with respect to that not deteriorated. The artificially deterioration did not affect the presence of glycinin and β -conglycinin but modified the α -amylase activity until the twelfth day of germination. The studied cultivars showed a differential behaviour to the activity of this enzyme.

Index terms: *Glycine max*, germination, electrophoresis, storage proteins, deterioration, enzymic activity.

⁽¹⁾ Aceptado para publicación en 12 de septiembre de 2001.

⁽²⁾ Universidad Nacional de Rosario, Fac. de Ciencias Agrarias, Casilla de Correo 14, Código Postal S2125ZAA, Zavalla, Santa Fe, Argentina. E-mail: arsalinas@ciudad.com.ar, mldietrich@ciudad.com.ar, vbisaro@fcagr.unr.edu.ar

⁽³⁾ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria, Ruta 11, km 353, Código Postal 2206, Oliveros, Santa Fe, Argentina. E-mail: anayoldjian@hotmail.com, rcraviotto@arnet.com.ar

Introducción

Los constituyentes de las semillas son determinados genéticamente, pero las cantidades relativas de los mismos son dependientes en muchos casos de factores ambientales como nutrición mineral y condiciones climáticas (Ching, 1986; Carvalho & Nakagawa, 1988; Bewley & Black, 1994). Así en la semilla

de soja, el suministro de azufre afecta las cantidades relativas de glicinina y β -conglucina (Gailer & Sykes, 1985), mientras que las cantidades de ácido fítico en estas semillas pueden ser reguladas por las variaciones en los niveles de fósforo suministradas por el suelo a la planta madre (Raboy & Dickinson, 1984; Raboy et al., 1985; Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989). Por otro lado, la provisión de nitrógeno aparentemente no tiene efecto sobre la composición de las proteínas de reserva de las semillas.

Mayer & Poljakoff-Mayber (1989) consideraron que tales cambios en la composición química tendrían poco efecto en la germinación de la semilla. Probablemente éstos sean de ocurrencia normal y puedan ser tolerados por la semilla en germinación. Sin embargo, los cambios en las proteínas enzimáticas o en las proteínas estructurales de los orgánulos pueden ser mucho menos tolerados.

El conocimiento de la composición química de la semilla es importante para la tecnología de semillas, pues influye tanto en el vigor como en el potencial de almacenamiento de las mismas, pudiendo influir en el mayor o menor vigor de las plántulas originadas (Carvalho & Nakagawa, 1988). La observación de las diferencias en el vigor, asociadas a otras características de las semillas, es en general atribuida a su composición química, principalmente en la cantidad de reservas y eficiencia en el metabolismo (Hampton & Coolbear, 1990).

El principal evento metabólico en la semilla germinada es la hidrólisis de las proteínas de reserva de las mismas para proveer a la plántula en crecimiento los nutrientes necesarios antes que comience a fotosintetizar. Hay dos proteínas de almacenamiento principales en la semilla de soja, la glicinina y β -conglucina, las que en conjunto representan hasta el 70% de las proteínas de reserva en base al peso seco. La glicinina está constituida por seis subunidades no idénticas y cada subunidad posee una cadena ácida de pesos moleculares (PM) entre 37 y 42 kDa y subunidades básicas de PM entre 17 y 20 kDa ligadas a un único puente disulfuro. La β -conglucina es una glicoproteína compuesta por tres subunidades, α' , α y β , con PM de 76, 66 y 47 kDa, respectivamente. Durante los primeros estadios de la germinación las proteínas de almacenamiento son degradadas por proteólisis a polipéptidos de menor PM o a aminoácidos.

Las variaciones enzimáticas durante el deterioro han sido investigadas por muchos autores. Generalmente las enzimas involucradas en reacciones catabólicas, especialmente hidrolasas, son más estables que aquellas enzimas involucradas en reacciones de síntesis (Osborne, 1980).

La electroforesis en gel de poliacrilamida es un método sensible, fácil, económico, que presenta alta resolución y la capacidad de analizar gran número de muestras de proteínas en un período de tiempo corto (Sathe et al., 1987). La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturilizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), es muy utilizada para el estudio de proteínas en soja (Hu & Esen, 1981; Hughes & Murphy, 1983).

En el comienzo de la germinación, los cambios en las actividades enzimáticas en semillas envejecidas son una función de la pérdida en la capacidad de las semillas para sintetizar proteínas. Algunos investigadores (Ching, 1972; Perl et al., 1978; Blowers et al., 1980), demostraron que los primeros estadios de deterioro de las semillas están asociados a una reducida síntesis proteica y que los daños en los mismos ocurrirían a nivel de traducción y transcripción.

El objetivo del trabajo fue estudiar el comportamiento de las proteínas de reserva glicinina y β -conglucina y la actividad de α -amilasa en semillas no germinadas y germinadas de 10 cultivares de soja deterioradas artificialmente y no deterioradas.

Material y Métodos

Se utilizaron semillas de 10 cultivares de soja cosechadas en 1999: María 55, Asgrow 6001, Asgrow 5435, Mercedes 70, Asgrow 5818, Pioneer 9492, Campeona, Andrea 66, Asgrow 6444 y Fainta 6686.

Se evaluó la calidad inicial de las semillas sometiendo a las pruebas de germinación y vigor (envejecimiento acelerado). La prueba de germinación se realizó de acuerdo con las reglas de análisis de semillas (International Seed Testing Association, 1996). En la prueba de envejecimiento acelerado realizado según el manual de pruebas de vigor (International Seed Testing Association, 1995), las semillas de los diferentes cultivares se colocaron dentro de una cámara de plástico conteniendo 100 mL de agua (cámara interna), las que a su vez se colocaron dentro de una cámara de envejecimiento acelerado (cámara externa). La prueba de envejecimiento acelerado se llevó a cabo mediante el uso

de una cámara de envejecimiento acelerado a 41°C durante 48 horas y luego las semillas se sometieron a la prueba de germinación.

Para la realización de las pruebas de germinación y envejecimiento acelerado se utilizaron cuatro repeticiones de 100 semillas para cada cultivar. Luego de realizado el análisis de la variancia, las medias de los tratamientos se compararon a través de la prueba de comparaciones múltiples de Duncan al nivel del 5% de probabilidad. Los resultados se expresaron en porcentaje y sus datos se transformaron en $\arcsin(\%/100)^{0.5}$.

Para determinar la presencia de glicinina y β -conglucina se utilizaron semillas con 0, 3 y 8 días de germinadas, sometidas a dos tratamientos: semillas deterioradas artificialmente a través de la prueba de envejecimiento acelerado y semillas no deterioradas. Se obtuvieron los extractos solubles de proteínas y se determinaron las concentraciones proteicas de los mismos según metodología de Ching (1986). La presencia de ambas proteínas se estudió a través de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en cubas "mini protean II 2-D cell" de Bio-Rad. Se utilizaron geles de concentración al 5% y de separación al 15% (P/V), siendo tris-glicina el buffer de corrida. Se sembraron 100 μ g de proteínas para cada cultivar y la corrida se realizó a 70 voltios (V) para el gel de concentración y 100 V para el gel de separación. La tinción de las bandas se realizó con Comassie Blue.

La determinación de la actividad específica de la α -amilasa se realizó de acuerdo a la metodología de Ching (1986). Se prepararon los extractos libres de células para semillas no deterioradas y para las sometidas a envejecimiento acelerado, se molieron 5 semillas secas de cada tratamiento y semillas germinadas durante 3, 8 y 12 días en un mortero conteniendo 20 mL de solución buffer acetato de potasio 50 mM pH 5,0 en una bandeja con hielo. Se centrifugó la mezcla a 15.000 g durante 60 minutos a 0°C en centrífuga refrigerada y se colocó el sobrenadante en tubos de ensayo en baño de hielo, obteniendo el extracto libre de células. Éste se incubó a 70°C durante 20 minutos, se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos y se recolectó el sobrenadante. Se tomaron alícuotas de 20 μ L del mismo y 80 μ L de solución buffer de acetato de potasio 50 mM, pH 5,0. Para el blanco se utilizaron 100 μ L de solución buffer de acetato de potasio 50 mM, pH 5,0. Se agregaron 100 μ L de almidón con una concentración de 1,7 μ g/ μ L a cada tubo y se incubó a 30°C durante 5 minutos. Luego se adicionaron 100 μ L de la solución iodo-ioduro de potasio, se mezcló bien y se agregaron 900 μ L de agua destilada. Se realizó la lectura de absorbancia del sustrato a 620 nm en espectrofotómetro.

El experimento de determinación de la α -amilasa se constituyó de un factorial 10x2x4 (10 cultivares x 2 tratamientos: semillas deterioradas y no deterioradas x 4 días de germinación: 0, 3, 8 y 12 días). Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con tres repeticiones. Después del análisis de la variancia las medias de los tratamientos fueron comparadas a través de la Prueba de Duncan y de la Prueba de F al nivel del 5% de probabilidad. El análisis de la variancia se realizó con el programa MSTATC (Michigan State University, 1989).

Resultados y Discusión

Los resultados de la germinación y el vigor inicial mostraron que las semillas de los cultivares analizados presentaron una muy buena calidad fisiológica, con valores de germinación y vigor superiores al 90% en la mayoría de los casos (Cuadro 1).

La presencia de bandas de glicinina y β -conglucina en semillas no deterioradas con 0 y 3 días de germinación fue similar para todos los cultivares estudiados, mientras que con ocho días de germinación hubo desaparición de bandas entre 29 y 36 kDa y entre 45 y 70 kDa, no evidenciándose la desaparición de aquellas correspondientes a glicinina y β -conglucina (Figura 1). Sin embargo, Wilson (1987) trabajando con semillas de soja del cultivar Amsoy 71 encontraron que de las tres subunidades de β -conglucina, la α y α' fueron rápidamente degradadas generando nuevos polipéptidos de

Cuadro 1. Germinación y vigor (envejecimiento acelerado) en semillas de 10 cultivares de soja⁽¹⁾.

Cultivar	Germinación (%)	Vigor (%)
María 55	83e	79c
Asgrow 6001	97bc	93b
Asgrow 5435	95bcd	93b
Mercedes 70	97ab	94b
Asgrow 5818	94cd	92b
Pioneer 9492	95bcd	91b
Campeona	96bcd	93b
Andrea 66	92d	80c
Asgrow 6444	94cd	93b
Fainta 6686	99a	97a
CV (%)	3,99	3,40

⁽¹⁾Medias seguidas de igual letra minúscula en la vertical no difieren significativamente entre sí por la prueba de Duncan al 5% de probabilidad.

β -conglucina de 51,2 kDa al comienzo de la imbibición de las semillas y luego de los seis días de germinadas la subunidad β también fue hidrolizada. Asimismo, Qi et al. (1992) en trabajos de electroforesis en gel para analizar la degradación de

las subunidades de β -conglucina en semillas de soja del cultivar Amsoy, germinadas a diferentes días durante los primeros 12 días posteriores a la imbibición, encontraron que de las tres subunidades de β -conglucina, la subunidad β se degradó a una

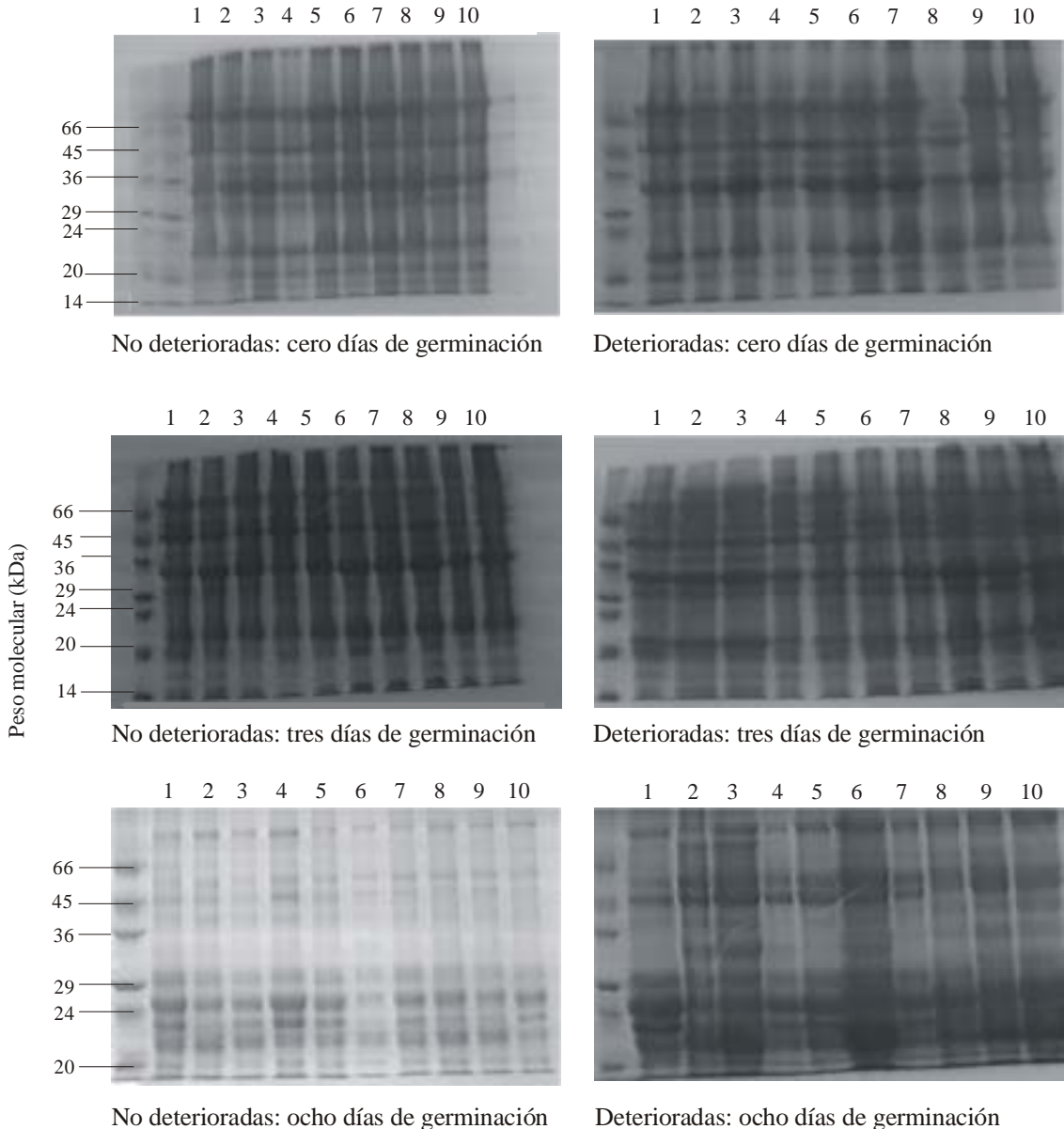


Figura 1. Patrón proteico de semillas de 10 cultivares de soja (1: María 55; 2: Asgrow 6001; 3: Asgrow 5435; 4: Mercedes 70; 5: Asgrow 5818; 6: Pioneer 9492; 7: Campeona; 8: Andrea 66; 9: Asgrow 6444 y 10: Fainta 6686) sin deteriorar y sometidas a envejecimiento acelerado.

tasa más lenta, persistiendo hasta el sexto día. Por otro lado, las subunidades α y α' fueron rápidamente degradadas en un crecimiento temprano habiendo desaparecido en gran medida al cuarto día. En su lugar aparecieron polipéptidos de menor peso molecular que los de las subunidades α y α' pero mayores que las de las subunidades β . Igualmente, en las semillas de soja deterioradas artificialmente, tampoco se observaron alteraciones en el patrón electroforético de β -conglucina y glicinina, las cuales mostraron un comportamiento semejante al de las semillas no deterioradas con 0, 3 y 8 días de germinación (Figura 1). Evidentemente, la calidad inicial de las semillas de todos los cultivares fue muy alta, de modo que el deterioro artificial al que fueron sometidas las semillas a través del envejecimiento acelerado durante 48 horas, no fue lo suficientemente drástico como para provocar alteraciones en la presencia de las principales proteínas de reserva de los cultivares de soja ensayados (Cuadro 1).

Las actividades de la α y β -amilasa fueron detectadas por Adams et al. (1981) en tejidos en desarrollo, maduros y germinados de semillas de soja. Según estos autores, en semillas inmaduras la actividad de la α -amilasa es máxima en la mitad del llenado de los granos acompañando los cambios que ocurren en la acumulación de almidón en los cloroplastos. Sin embargo, la actividad de la β -amilasa aumentó durante los últimos estadios del desarrollo de las semillas y fue una fuente predominante de la actividad amilolítica en tejidos maduros. Aparentemente, la hidrólisis de los granos de almidón se inicia por la α -amilasa mientras que la β -amilasa reacciona con los fragmentos de almidón resultantes. Así, la α -amilasa sería una enzima hidrolítica clave en la degradación del almidón en semillas de soja (Adams et al., 1981).

Con respecto a la actividad de la α -amilasa evaluada a los 0, 3, 8 y 12 días de germinación de las semillas, se observó un aumento de la misma al comienzo de la germinación hasta los ocho días y posteriormente una disminución a los 12 días, probablemente debido a un agotamiento de las sustancias de reserva de los cotiledones (Cuadro 2). Resultados similares fueron obtenidos por Salinas et al. (1998) al evaluar la actividad de la α -amilasa en semillas de soja de los cultivares Bragg e IAS-5 almacenadas en condiciones ambientales de Pelotas, RS, Brasil, durante 180 días y por Salinas et al. (1989) en semillas de soja producidas bajo condiciones de estrés hídrico y anegamiento en el suelo. Asimismo, Wilson (1987) encontró que a pesar de que las reservas de almidón en las semillas de soja son bajas al comienzo de la germinación, se detectaron picos de actividad de α y β -amilasa después de los cinco días de imbibición.

Cuando se analizó el efecto del deterioro artificial sobre la actividad amilásica, se observó una disminución de la actividad de la enzima α -amilasa en las semillas sometidas a envejecimiento acelerado con respecto a las no envejecidas, tanto en semillas no germinadas como en aquellas con 3, 8, 9 y 12 días de germinación (Cuadro 2).

En las semillas de soja deterioradas artificialmente y no deterioradas de los 10 cultivares estudiados, se observaron diferencias genotípicas en la actividad de la α -amilasa (Cuadro 3). Coincidentemente con estos resultados, Gorman & Kiang (1977), Cardy & Beversdorf (1984), Norby & Rinne (1985), concluyeron que existen variaciones genéticas en la actividad amilásica entre cultivares de soja, demostrando Norby & Rinne (1985) que además algunos de ellos no presentaron actividad amilásica o que ésta fue muy baja.

Cuadro 2. Actividad específica de α -amilasa (μg almidón hidrolizado/min/ μg proteína) en semillas de soja deterioradas y no deterioradas a los 0, 3, 8 y 12 días de germinación⁽¹⁾.

Tratamientos	0	3	8	12	Médias
Semillas no deterioradas	0,584aC	0,903aB	1,262aA	0,907aB	0,914
Semillas deterioradas	0,422bC	0,510bBC	1,003bA	0,742bB	0,669
Medias	0,503	0,706	1,133	0,825	

⁽¹⁾ Medias seguidas por igual letra, minúscula en la columna y mayúscula en la línea, no difieren entre sí por la prueba de Duncan al 5% de probabilidad; CV: 27,74%.

Cuadro 3. Actividad específica de α -amilasa (μg almidón hidrolizado/min/ μg proteína) en semillas deterioradas y no deterioradas de 10 cultivares de soja⁽¹⁾.

Tratamiento	Semillas no deterioradas	Semillas deterioradas	Medias
María 55	1,57aAB	1,04bA	1,31
Asgrow 6001	1,04aC	1,00bA	1,14
Asgrow 5435	1,43aB	0,82bBC	1,13
Mercedes 70	2,03aA	1,08bA	1,56
Asgrow 5818	0,86aCD	0,64bCD	0,75
Pioneer 9492	0,60aDE	0,63bCD	0,63
Campeona	0,29aEF	0,27bE	0,28
Andrea 66	0,42aE	0,35bDE	0,39
Asgrow 6444	0,74aCD	0,46bCDE	0,60
Fainta 6686	0,20aF	0,09bF	0,15
Medias	0,914	0,669	-

⁽¹⁾Medias seguidas por igual letra, minúscula en la línea y mayúscula en la columna, no difieren entre sí por la prueba de Duncan al 5% de probabilidad; CV: 27,74%.

Evidentemente, la actividad de la enzima α -amilasa fue más sensible que la presencia de proteínas de reserva para evidenciar la disminución de la calidad fisiológica provocada por el envejecimiento acelerado en semillas de soja.

Conclusiones

1. El envejecimiento acelerado no afecta la presencia de glicinina y β -conglucina, pero altera la actividad de la α -amilasa en semillas deterioradas artificialmente hasta los ocho días de germinación.

2. Los cultivares de soja estudiados muestran comportamiento diferencial frente a la actividad de la α -amilasa, pero no se modifica el patrón electroforético de glicinina y β -conglucina en semillas deterioradas artificialmente hasta los días doce de germinación.

Referencias

ADAMS, C. A.; BROMAN, T. H.; NORBY, S. W.; RINNE, R. W. Occurrence of multiple forms of α -amylase and absence of starch phosphorylase in soybean seeds. **Annals of Botany**, London, v. 48, p. 895-903, 1981.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BLOWERS, L. E.; STORMONTH, D. A.; BRAY, C. M. Nucleic acid and protein synthesis and loss of vigour in germinating wheat embryos. **Planta**, Berlin, v. 150, p. 19-25, 1980.

CARDY, B. J.; BEVERSDORF, W. D. Identification of soybean cultivars using isoenzyme electrophoresis. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 12, p. 943-954, 1984.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424 p.

CHING, T. M. **Fisiologia do desenvolvimento da semente**. Pelotas: Ufpel, 1986. 63 p. Curso Cetreisem.

CHING, T. M. Metabolism of germinating seeds. In: KOZLOWSKI, T. T. (Ed.). **Seed biology**. New York: Academic, 1972. v. 2, p. 103-218.

GAILER, K. R.; SYKES, G. E. Effects of nutritional stress on the storage proteins of soybeans. **Plant Physiology**, Rockville, v. 78, p. 582-585, 1985.

GORMAN, M. B.; KIANG, Y. T. Variety-specific electrophoretic variants of four soybean enzymes. **Crop Science**, Madison, v. 17, n. 6, p. 963-965, 1977.

HAMPTON, J. G.; COOLBEAR, P. Potential versus actual seed performance can vigour testing provided and answer? **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 18, p. 215-228, 1990.

HU, B.; ESEN, A. Heterogeneity of soybean seed proteins: one dimensional electrophoretic profiles of six different solubility fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 29, p. 497-501, 1981.

HUGHES, S. A.; MURPHY, P. A. Varietal influence on the quality of glycinin in soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 31, p. 376-379, 1983.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (Zurich, Suiza). **Handbook of vigor test methods**. 2. ed. Zurich, 1995. 117 p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (Zurich, Suiza). Rules. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 24, p. 1-335, 1996. Supplement.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteria phage T. **Nature**, London, v. 227, p. 680-684, 1970.

- MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 4. ed. Oxford: Pergamon, 1989. 270 p.
- MICHIGAN STATE UNIVERSITY. Michigan Statistics Group. MSTAT Development Team. **MSTAT-C**: a software program for the design, management, and analysis of agronomic research experiments. East Lansing: Michigan State University, 1989. 1 CD-ROM.
- NORBY, S. W.; RINNE, R. W. Further studies on the electrophoretic patterns of the multiple forms of amylase in soybean seeds. **Crop Science**, Madison, v. 25, p. 990-994, 1985.
- OSBORNE, D. J. Senescence in seeds. In: THIMMAN, K. V. (Ed.). **Senescence in plants**. Boca Raton: CRC, 1980. p. 13-37.
- PERL, M.; LURIA, D.; GERLMOND, H. Biochemical changes in sorghum seeds affected by accelerated ageing. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 29, p. 497-509, 1978.
- QI, X.; WILSON, K.; TAN-WILSON, A. Characterization of the major protease involved in the soybean β -conglucinin storage protein mobilization. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 725-733, 1992.
- RABOY, V.; DICKINSON, D. B. Effects of phosphorus and zinc nutrition on soybean seed phytic acid and zinc. **Plant Physiology**, Rockville, v. 75, p. 1094-1097, 1984.
- RABOY, V.; HUDSON, S. J.; DICKINSON, D. B. Reduced phytic acid content does not have an adverse effect on germination of soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 79, p. 123-126, 1985.
- SALINAS, A. R.; SANTOS, D. S. B.; SANTOS FILHO, B. G.; MELLO, V. D. C.; GOMES, A. S. Evaluación de la calidad fisiológica de semillas de soja producidas en diferentes niveles de humedad en el suelo. In: CONFERENCIA MUNDIAL DE INVESTIGACIÓN EN SOJA, 4., 1989, Buenos Aires. **Anales...** Buenos Aires: J. Pascale, 1989. p. 391-397.
- SALINAS, A. R.; SANTOS, D. S. B.; VILLELA, F. A.; SANTOS FILHO, B. G.; SOARES, L. A. S.; OLIVEIRA, M. F. Fisiologia da deterioração em sementes de soja durante o armazenamento. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 3, n. 2, p. 106-118, 1998.
- SATHE, S. K.; LILLEY, G. G.; MASON, A. C.; WEAVER, C. M. High resolution sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of soybean (*Glycine max* L.) seed proteins. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 64, n. 6, p. 380-384, 1987.
- WILSON, R. F. Seed metabolism. In: WILCOX, J. R. (Ed.). **Soybeans: improvement, production and uses**. 2. ed. Madison: American Society of Agronomy, 1987. p. 643-686.