

## POTENCIAL APLICACIÓN DE MARCADORES SSR PARA EL MEJORAMIENTO EN LA CAPACIDAD DE NODULACIÓN Y CARACTERES DE CICLO EN SOJA.

RD Salvucci, MB Aulicino, MA Santos, M Hungria, R Rossi, C Sala y PA Balatti\*  
Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE)-CONICET, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, CC 327 (1900) La Plata, Argentina.  
Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Cx. Postal 231, 86001-970 Londrina, PR, Brazil. \* pbalatti@gmail.com

**Palabras claves:** SSR, soja (*Glycine max*), biplot, nodulación.

### Introducción

La soja establece simbiosis con bacterias gran (-) que fijan nitrógeno conocidas como rizobios. El cultivo es originario de Asia, y por ello los suelos sin historia del cultivo, habitualmente carecen de los simbioses específicos, lo que dio lugar al proceso de inoculación que consiste en adicionar una suspensión bacteriana en el momento de la siembra. Una inoculación exitosa resulta en el desarrollo de nódulos en el cuello de la planta, en cuyo interior la bacteria, por medio de una enzima, la nitrogenasa, fija el nitrógeno del aire (Oke y Long, 1999; Loh y Stacey, 2003). En síntesis, la capacidad de fijación de nitrógeno depende de la masa de nódulos (Döbereiner, 1966; Bohrer y Hungria, 1998; Hungria y Bohrer, 2000) y de la actividad específica de la nitrogenasa (Stougaard, 2000).

Diversos estudios demostraron que los genotipos de soja muestran una respuesta diferencial a la nodulación y que la misma tiene una base genética (Nicolás et al., 2002); Greder et al. (1986); Salvucci et al., 2007). Se esperaría entonces encontrar genes que confieran capacidad de nodular preservados tanto en especies nativas, colecciones de germoplasma o materiales elite. Las estirpes de rizobios han sido el principal objeto de selección por parte de las compañías productoras de inoculantes, lo que junto con la compatibilidad estirpe de rizobio-cultivar han sido objetivo de los programas de mejoramiento en soja en algunos países (Hungria et al., 2005). Sin embargo, en muchos países la capacidad de nodulación de los cultivares no ha sido objeto del mejoramiento. Solo en África se ha trabajado en seleccionar cultivares promiscuos que nodulen con rizobios naturalizados del suelo. Recientemente se identificaron marcadores SSR ligados a QTLs relacionados con el número y peso seco de nódulos, y peso seco de parte aérea, en poblaciones segregantes avanzadas provenientes de cruzamientos entre cultivares comerciales brasileiros de soja (Nicolás et al., 2002; Nicolás et al., 2006; Dos Santos et al., 2006). Además, 101 materiales (cultivares y poblaciones) de soja fueron caracterizados en base a RAPDs y SSR, encontrando en esos materiales un alto nivel de polimorfismos y más aún, que estos marcadores estuvieron asociados con ciclo de vida (Keim et al., 1990; Li et. al, 2008).

El objetivo de este trabajo es utilizar marcadores moleculares asociados a la capacidad de nodulación de la soja para caracterizar cultivares argentinos.

### Materiales y Métodos

**Materiales:** Los cultivares comerciales de soja argentinos evaluados fueron desarrollados por Nidera, se encuentran listados en la tabla 1.

**Ensayo de nodulación:** Las semillas esterilizadas superficialmente con alcohol etílico al 50% e hipoclorito de Na, se transfirieron luego del lavado a placas de petri con agar-agua, las que se incubaron a 30°C durante 48 hs en oscuridad. En el momento del trasplante de las plántulas estas se inocularon sumergiendo las raíces en un inoculante comercial conteniendo  $\sim 10^9$  CFU/ml células de *B. japonicum* E109. Las plántulas se colocaron en jarras de Leonard modificadas, rellenas con vermiculita y regadas con solución nutritiva de Jensen (libre de N) (Vincent, 1970). Las plantas crecieron a 25°C, con un fotoperíodo de 14 h de luz. El diseño

del ensayo fue completamente al azar con 12 réplicas por tratamiento (Sokal and Rohlf, 1995). A la quinta semana las plantas fueron cosechadas y separada su parte aérea, nódulos y raíces (Nicolás et al., 2006 y el material se secó a 65°C hasta peso constante. Se evaluaron como indicadores de nodulación el: número y peso seco de los nódulos (NN); como indicador de fijación de N el peso seco de la parte aérea (PSA) que se ha encontrado esta correlacionado con la disponibilidad de N)). Caracteres cuantitativos y caracteres cualitativos, usados ampliamente como descriptores, fueron también considerados: AP: altura de la planta (en cm), NDM: días a maduración, HC: Hábito de crecimiento (1: determinado, 0: indeterminado), CF: Color de flor (0: Blanco, 1: púrpura) y PUB: color de pubescencia (0: gris, 1: castaña) (Tabla 1).

Cultivar	PSN	NN	PSA	HC	CF	PUB	NDM	AP
NA2018	38.52	22.86	629.67	0	1	1	112	75
A3302	23.24	21.42	591.25	0	1	0	120	82
A3550	31.8	25	692.75	0	1	1	126	85
NA4209	27.5	22	582.11	0	1	1	132	93
A4725	30.45	22	690.75	0	1	1	140	108
NA5009	28.06	22.27	480.14	0	0	1	151	100
NA5485	37.75	32.25	747.17	1	1	0	152	95
NA5920	46.04	32.17	857.58	0	1	0	162	
NA6126	26.48	18.36	690.5	1	0	0	166	106
A6411	19.96	12	209.08	1	1	0	167	105
A7053	19.42	20	217.27	1	1	0	171	119
NA7708	25.39	19.27	444.25	1	1	0	177	119
A8000	28.34	17.8	575.6	1	0	0	180	118
NA8010	22.3	19.64	441.42	1	1	0	181	125
NA8499	24.62	17.75	492.5	1	1	0	187	88

**Tabla 1.** Matriz de datos de variedades por características morfológicas cuantitativas y cualitativas. Todos los cultivares son resistentes a glifosato.

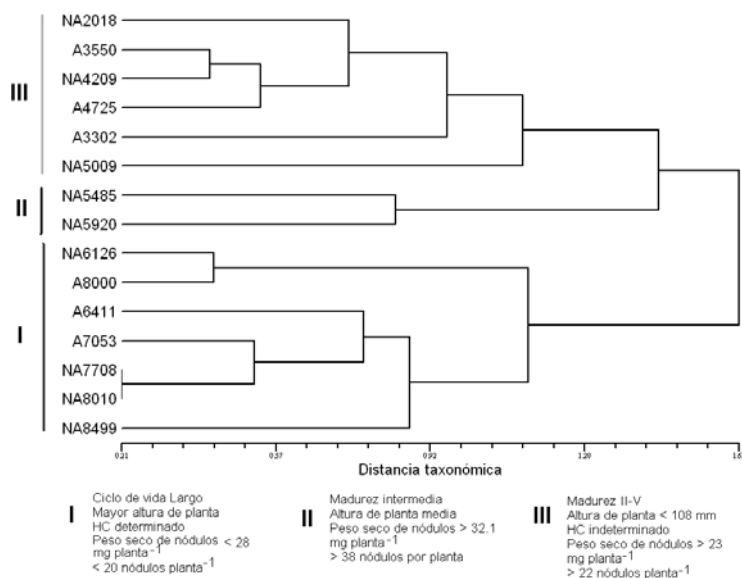
Aislamiento de ADN. El ADN de las plantas se aisló de acuerdo al protocolo modificado (Bornet y Branchard, 2001). Este ADN se utilizó como molde para amplificar por medio de la reacción de PCR utilizada por Nicolás et al (2006). Los once pares de primers ubicados en los extremos 5' y 3' de las regiones microsatélites (Cregan et al. 1999) ligados a caracteres de nodulación y fijación biológica de nitrógeno (Nicolás et al., 2002; Nicolás et al., 2006; Santos et al., 2006) fueron, Satt066, Sat\_123, Satt181, Satt187, Satt197, Satt216, Satt232, Satt233, Satt251, Satt296 y Satt509. Las secuencias de estos primers se encuentran disponibles en USDA-ARS Soybean Genome Database (<http://129.186.26.94/SSR.html>). Los productos de reacción se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida y fueron revelados con bromuro de etidio. Se utilizó un equipo de fotodocumentación Syngene.

Análisis estadístico: Los datos morfológicos fueron estandarizados y un dendrograma con los 15 cultivares de soja fue construido con un coeficiente de distancia taxonómica y el método UPGMA, (Sneath y Sokal, 1973).

El tamaño de los fragmentos de ADN microsatélites se estimó en base al marcador de ADN de 1 Kb (Weir, 1990). Las bandas se consideraron como presente (1) o ausente (0) por alelo para cada SSR, y se construyó una matriz (cultivar x alelo SSR). Se realizó un biplot GGE biplot (Yan et al., 2000) para clasificar los microsatélites (alelos SSR) y los cultivares simultáneamente y de esta forma analizar la interacción entre ambos. Se aplicó el modelo SRG1. El Biplot fue construido con la MACRO de Excel (Lypkovich and Smith, 2001). El análisis numérico fue realizado con el programa NTSYS-pc 2.0 (Rohlf, 1998).

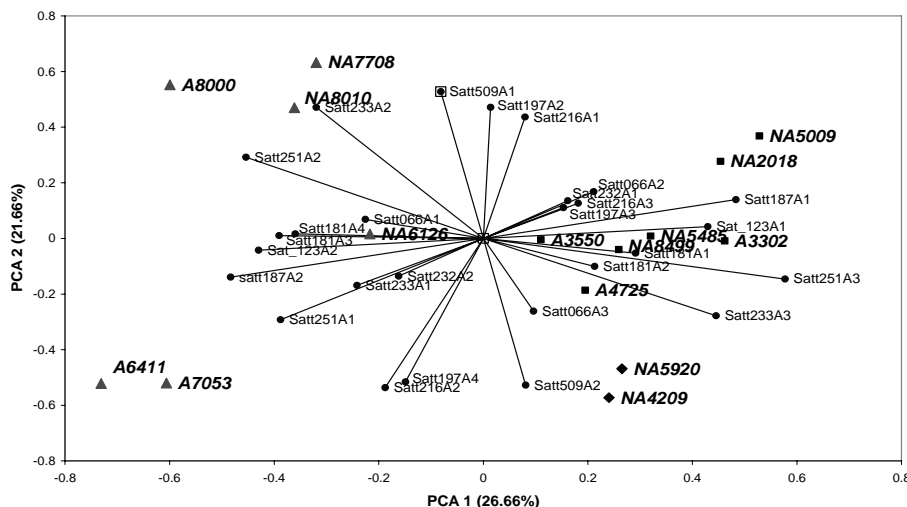
## Resultados

Se construyó un fenograma en base a características fenotípicas utilizando una matriz de datos cuali y cuantitativos. El análisis de clusters agrupó a las cultivares en tres grupos principales que coinciden con clases de variedades con capacidades de nodulación distintas: aja (Cluster I), media (Cluster III) y alta (cluster II), y con ciclos de vida diferenciales (Figura 1).



**Figura 1.** Fenograma en base a características fenotípicas de los cultivares construido aplicando la distancia taxonómica y la técnica de agrupamiento UPGMA.

Si bien el biplot explicó un bajo porcentaje de la variabilidad genética (48.32 %), la misma no se debe confundir con la variación total, ya que el biplot sólo incluye la variación debida a las cultivares y a la interacción "genotipos x marcadores" (Yan et al., 2000). Este método gráfico resultó útil para asociar el patrón fenotípico deseado con el genotípico. La observación del gráfico ayudará a seleccionar potenciales padres putativos de futuras poblaciones segregantes, permitiendo identificar los clusters que involucran cultivares con alta y baja nodulación. Considerando ésto, los cultivares de alta capacidad de nodulación NA 5485 y NA 5920 fijaron más N, lo que se deduce a partir de los altos valores de producción de materia seca. Por otro lado los progenitores de baja capacidad de nodulación serían A 7053 y A 6411 y aquellos cultivares del cluster I: NA 7708, A 8000 y NA 8010. Todos estos cultivares tuvieron pesos secos de la parte aérea bajos lo que sugiere que también fijaron menos N. Considerando que se cruzarán cultivares contrastantes en su capacidad de nodular, el cultivar NA 5485 se cruzará con A 7053 y A 6411, por ubicarse en sectores opuestos, lo que implicaría mayor divergencia genética. Pero además otra posibilidad sería cruzar a NA5920 con los cultivares NA7708, A 8000 y NA 8010 (Figura 2).



**Figura 2.** Análisis GGE Biplot (Modelo I). Relación entre variedades y Marcadores SSR (círculos). El Biplot fue construido con el primer componente principal (PCA I) contra el Segundo componente principal (PCA II), explicando el 48.32 % del total de la variación. B) Cluster I (triángulo). Cluster II (rombo). Cluster III (cuadrado).

## Conclusión

Los 11 marcadores moleculares empleados discriminaron a los cultivares de baja y alta capacidad de nodulación. Este contraste se reflejó en el peso seco de las plantas, que es una medida indirecta de fijación de N.

La alta asociación encontrada entre los fenotípicos y los clusters definidos por los microsatélites, sugiere la existencia de ligamiento entre genes de nodulación y aquellos que controlan características de interés agronómico.

## Bibliografía

- BORNET, B. AND BRANCHARD, M. 2001. Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19, 209-215.
- DÖBEREINER, J. 1966. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by regression of total plant nitrogen with nodule weight. *Nature* 204, 153-166.
- DOS SANTOS, M.A., NICOLÁS, M.F., HUNGRIA, M. 2006. Identificação de QTL asociados à simbiosis entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 1-9.
- GREDER, R.R., ORF, J.H. AND LAMBERT, J.W. 1986. Heritabilities and associations of nodule mass and recovery of *Bradyrhizobium japonicum* serogroup USDA110 in soybean. *Crop Science* 26, 33-37.
- HUNGRIA, M., FRANCHINI, J.C., CAMPO, R.J., GRAHAM, P.H. 2000. The importance of nitrogen fixation to the soybean cropping in South America. In: Werner, D., Newton, W.E. (Eds.), *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment*. Springer, Dordrecht, in press.
- KEIM, P., OLSON, T.C., SHOEMAKER, R.C. 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean. Genetic Newsletters* 15, 150-152.
- LIPKOVICH, I. y SMITH, E.P. 2001. Biplot and singular value decomposition macros for Excel. *Journal of Statistic Software* 7, 1-13.
- LOH, J.; STACEY, G. 2003. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. *Applied and Environmental Microbiology* 69(1), 10-17.
- NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M.; ARIAS, C.A.A. 2006. Identification of quantitative trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars. *Field Crops Research* 95, 355-366.
- OKE, V.; LONG, S.R. 1999. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology* 2, 641-646.

- ROHLF, F.J. 1998. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.02. Exeter Publications Setauket, New York.
- SALVUCCI, R.D., AULICINO, M.B., BALATTI, P.A. 2007. Nodulación de distintos cultivares de soja comerciales de Argentina. VI Reunion nacional científico técnica de biología del suelo, VI encuentro sobre fijación biológica de nitrógeno. Libro de resúmenes pág. 85.
- SNEATH, P. H. A., SOKAL, R. R. 1973. Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification. Freeman and Co. (ed). San Francisco.
- SOKAL, R. R., ROHLF, F. J. 1995. Biometry. Freeman and Co. (ed) San Francisco.
- STOUGAARD, J. 2000. Regulators and regulation of root nodule development. Plant Physiology 124, 531-540.
- VINCENT, J.M. 1970. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell, Oxford.
- WEIR, B.S. 1990. Genetic data analysis. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- YAN, W., HUNT, L.A., SHENG, Q. y SZLAVNICS., Z. 2000. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE