

## Uso de marcadores moleculares em soja visando identificar caracteres da fixação biológica do nitrogênio

---

Michele Asai<sup>1,4</sup>; Maria Aparecida dos Santos<sup>2,4</sup>; Marisa Fabiana Nicolás<sup>3,4</sup>; Mariangela Hungria<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de Iniciação Científica do CNPq; <sup>2</sup>Bolsista de mestrado da CAPES; <sup>3</sup>Bolsista de DTI do CNPq; <sup>4</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para o crescimento e reprodução das plantas, sendo um fator limitante as culturas, conseqüentemente, a agricultura moderna utiliza fertilizantes nitrogenados, o que eleva os custos de produção, além de ser fonte de contaminação ambiental. No entanto, algumas plantas são capazes de utilizar o nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>), que constitui cerca de 78% dos gases da atmosfera, através da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. A interação entre bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium* e plantas leguminosas tem sido extensivamente estudada. Durante essa interação, as bactérias induzem nódulos nas raízes das leguminosas, convertendo o N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>, através do complexo enzimático da nitrogenase. A planta fornece às bactérias os compostos de carbono (C) e outros nutrientes para sustentar o crescimento bacteriano, enquanto a bactéria fornece N à planta hospedeira.

A associação entre a soja e as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* contribui, significativamente, para o sucesso da cultura no Brasil, uma vez que a demanda de nitrogênio (N) das cultivares brasileiras pode ser suprida totalmente pelo processo biológico. Estudos de quantificação da FBN no país indicam que o processo biológico pode suprir a soja em até 300 kg de N ha<sup>-1</sup>, resultando em uma economia estimada em US\$ 3 bilhões por safra (Hungria et al., 2005).

O conhecimento sobre genes nos rizóbios envolvidos na nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) e no processo de FBN (*nif* e *fix*) são elevados (Stougaard,

2000), entretanto, pouco se sabe sobre os genes das leguminosas hospedeiras que estão relacionados à simbiose. O estudo dos fatores genéticos das plantas relacionados com a FBN é dificultado pelo tamanho e complexidade do genoma (Thoquet, et al., 2002).

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular tem possibilitado a construção de mapas genéticos saturados para várias culturas de interesse econômico. Esses mapas constituem ferramentas importantes para estudos de genética e genômica dessas espécies, revelando novas possibilidades para o estudo da herança quantitativa e aplicação no melhoramento genético destas culturas, como o mapeamento de QTLs, monitoramento da resposta à seleção e identificação de germoplasma com alelos superiores. Com isso, é possível determinar os QTL relacionados com a produção de sementes, o peso de plantas, o tempo de florescimento, a maturidade, a qualidade e a resistência a estresses bióticos e abióticos. O emprego dessa tecnologia no mapeamento e clonagem baseada em mapeamento de genes de plantas leguminosas relacionados com a FBN tem sido relatado (Colebatch et al., 2001; Thoquet et al., 2002). Cregan et al. (1999) e Song, et al. (2004) desenvolveram um mapa genético de ligação do genoma da soja com marcadores microsatélites (SSR – Simple Sequence Repeat) integrado com outros marcadores moleculares e marcadores clássicos. Alguns desses marcadores moleculares disponíveis no mapa do genoma da soja já estão sendo empregados em programas de melhoramento.

Na soja, Nicolás et al. (2005) identificaram, pela utilização de marcadores do tipo microsatélites (SSR), em uma população de 160 famílias  $F_{2,3}$  do cruzamento BRS 133 (baixa capacidade de FBN) X Embrapa 20 (média capacidade de FBN), 16 associações significativas entre marcadores SSR e QTL para parâmetros de crescimento e nodulação das plantas. Sete marcadores foram confirmados em outra população composta por 157 linhagens  $F_{2,7}$  do cruzamento das cultivares Bossier (alta) e Embrapa 20 (média) (Santos et al., 2005).

Atualmente, busca-se identificar novos marcadores SSR que sejam polimórficos para essas duas populações, visando uma maior saturação das regiões onde foram detectados os QTL para crescimento e nodulação.

## Objetivos

Verificar a existência de polimorfismo dos marcadores SSR entre os parentais Bossier e Embrapa 20 e avaliar a segregação dos marcadores polimórficos na população.

## Material e Métodos e Resultados

As análises estão sendo conduzidas em uma população de mapeamento composta por 157 linhagens endogâmicas recombinantes derivadas do cruzamento de duas cultivares previamente identificadas como tendo distintas capacidades de FBN, Bossier (alta) X Embrapa 20 (média) (Nicolás et al., 2002).

As amostras de DNA foram extraídas a partir de duas a três folhas (primeiras folhas trifoliadas) de cada uma das 157 linhagens  $F_{2.7}$  e dos parentais Bossier e Embrapa 20 pelo método descrito por Keim et al. (1988). A seguir, cada amostra de DNA genômico total é amplificada com "primers" microssatélites escolhidos a partir do mapa do genoma da soja (Cregan et al., 1999). Os fragmentos são separados por eletroforese em gel de poli(acrilamida) (29:1, acrilamida:bis-acrilamida) 10%, corados em uma solução de brometo de etídio ( $0,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e fotografados sob luz UV. A partir do perfil das bandas nos géis, é construída uma matriz de dados numéricos para cada marcador, considerando-se 1 (presença de banda da parental Bossier) e 2 (presença da banda da parental Embrapa 20).

Os cálculos da frequência de recombinação, da distância genética entre os diferentes marcadores genéticos e da determinação do posicionamento dos marcadores estão sendo feitos como auxílio do programa MAPMAKER/EXP. O agrupamento dos marcadores está sendo feito adotando um valor limite de detecção (LOD) de 3,0 e a conversão da frequência de recombinação para centimorgans (cM) com a distância de mapeamento de Haldane ( $r = 0,50$ ).

Na Figura 1, pode-se verificar os resultados obtidos com a amplificação de um dos "primers" do tipo microssatélite.

## Considerações Finais

Quarenta e dois marcadores apresentaram-se polimórficos para os parentais Bossier e Embrapa 20 e estão sendo amplificados na população. Até o presente momento, sete marcadores foram amplificados na população.

## Agradecimentos

Projeto financiado parcialmente pelo CNPq 400710/2004-8 e 301241/2004-0) e pelo PRONEX.

## Referências

- COLEBATCH, G.; TREVASKIS, B.; UDVARDI, M. Symbiotic nitrogen fixation research in the postgenomics era. **New Phytologist**, v.153, p.37-42, 2002.
- CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; Madison, v. 39, p. 1464-1490, 1999.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K., eds. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2005. (no prelo).
- KEIM, P.; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v. 15, p. 150-152, 1988.
- NICOLÁS, M.F.; ARIAS, C.A.A.; HUNGRIA, M. Genetics of nodulation and nitrogen fixation in Brazilian soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 36, p. 109-117, 2002.
- NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M.; ARIAS, C.A.A. Identification of quantitative

trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars. **Field Crops Research**, Amsterdam, 2005. (no prelo).

SANTOS, M. A.; NICOLÁS, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e a soja [*Glycine max* (L) Merr.]. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 2005 (corrigido e retornado ao editor).

SONG, Q. J.; MAREK, L.K.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.122-128, 2004.

STOUGAARD, J. Regulators and regulation of legumes root nodule development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124: p. 531-540, 2000.

THOQUET, P.; CHÉRARDI, M. JOUNET, E-P.; KERESCT, A., ANÉ, J-M.; PROSPERI, J-M.; HUGUEST, T. The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume e genomics and the isolation of agronomically important genes. **BioMed Central Plant Biology**, v. 2, 13p., 2002.