

# Emprego de Marcadores Moleculares no Estudo da Fixação Biológica do Nitrogênio Visando Incrementos na Nodulação e na Fixação Biológica do Nitrogênio em Soja.

---

BORTOLATO, N.M<sup>1</sup>; SANTOS, M.A<sup>2</sup>; HUNGRIA, M<sup>3</sup>; GERALDI, I.O<sup>2</sup>; <sup>1</sup>Centro Universitário Filadélfia – UniFil, CEP 86 020 000, Londrina-PR. nagilabortolato@yahoo.com.br; <sup>2</sup>Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ, Piracicaba-SP; <sup>3</sup>Embrapa Soja.

## Introdução

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) juntamente com a fotossíntese são os processos biológicos fundamentais para a manutenção dos ecossistemas terrestres. Apesar de representar 78% da constituição gasosa da atmosfera, o nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>) não é absorvido pelos eucariotos, que não dispõem de um sistema enzimático para quebrar a tripla ligação entre os átomos de N. Os microrganismos que possuem o complexo enzimático da nitrogenase são os únicos capazes de fixar o N<sub>2</sub> e convertê-lo em produtos assimiláveis pelos demais organismos.

Esses microrganismos são de vida livre ou associativa sendo que, a associação mais estudada é a relação Rhizobiaceae-leguminosas. Estima-se que cerca de 90 Tg por ano de N<sub>2</sub> são fixados simbioticamente principalmente por *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium* nas raízes de leguminosas cultivadas (Graham e Vance, 2000). Dentre estas se destaca a associação entre a soja (*Glycine max* L. Merrill) e as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* pela importância mundial da cultura.

No cenário atual, o Brasil é o segundo maior produtor de soja e a FBN contribui significativamente para a produção deste grão, uma vez que toda a demanda de N da cultura no País é suprida por esse processo.

Além da importância econômica, a FBN tem um papel fundamental na sustentabilidade dos sistemas agrícolas, pois, o N proveniente dessa fonte é usado diretamente pela planta, sendo menos susceptível à volatilização, a desnitrificação e à lixiviação. Os esforços dos pesquisadores para potencializar a FBN compreendem a seleção de estipes de rizóbios mais eficientes, a adoção de técnicas de manejo como o sistema de plantio direto e o melhoramento da capacidade de fixar  $N_2$  das leguminosas cultivadas. (Rengel, 2002).

No entanto, a avaliação das características relacionadas com a nodulação e com a fixação de  $N_2$  é trabalhosa e envolve a destruição de plantas, o que dificulta avaliação destes parâmetros pelos programas de melhoramento que trabalham com um grande número de genótipos e selecionam para múltiplas características. A seleção assistida por marcadores caracteriza-se como uma alternativa para características de difícil avaliação como a FBN.

Estudos iniciais empregando marcadores para mapeamento de QTL (Quantitative Trait Loci) relacionados com nodulação e fixação foram desenvolvidos por Nicolás et al., (2006) e Santos et al., (2006) na Embrapa soja. Nestes trabalhos, duas populações de mapeamento foram avaliadas em casa-de-vegetação quanto à nodulação e o crescimento da planta e genotipadas com marcadores microssatélites (SSR) sendo identificadas associações significativas entre marcadores e os parâmetros de nodulação e crescimento da planta nas duas populações.

Os objetivos deste trabalho compreenderam a saturação do mapa genético de ligação da população descrita no trabalho de Santos et al., (2006) com marcadores microssatélites e a identificação de novos QTL relacionados com nodulação e fixação de  $N_2$ .

## **Materiais e Métodos**

Para a construção do mapa, amostras de DNA de 157 linhagens endogâmicas recombinantes oriundas do cruzamento entre as cultivares Bossier

e Embrapa 20 foram amplificadas com marcadores microssatélites. Os parâmetros fenotípicos relacionados com a fixação de nitrogênio e a nodulação: massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS), e relação MNS/NN das linhagens, foram obtidos por Santos, et al., 2006. A associação entre marcador e QTL foi determinada pela análise de regressão simples utilizando o programa SAS, 1990.

## Resultados e Discussão

A primeira etapa deste trabalho consistiu na busca por marcadores SSR polimórficos entre os parentais Bossier e Embrapa 20. Foram avaliados na população até o momento 48 marcadores que apresentaram polimorfismo e 21 regiões relacionadas com os parâmetros de crescimento da planta e nodulação foram mapeadas, sendo 7 para MPAS, 6 para NN, 5 para MNS/NN e 3 para MNS. Para algumas regiões, faz-se necessária à busca por outros marcadores polimórficos para assegurar uma cobertura total do genoma.

Todas as associações detectadas foram de pequeno efeito, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) variou de 2,5 – 8, ver tabela 1. A baixa magnitude destes efeitos coincide com os baixos valores de herdabilidade das características avaliadas. Resultados semelhantes têm sido relatados em estudos de características com moderadas ou baixas herdabilidade, como características relacionadas com rendimento de grãos em soja (Orf et al., 1999; Yuan et al., 2002).

**Tabela 1.** Distribuição da ligação de marcadores SSR mostrando associações significativas com a massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos (NN), Massa média de nó nódulos secos (MNS/NN), massa de nódulos secos (MNS), como resultado da análise de regressão.

Característica Quantitativa	Marcador	Grupo de Ligação†	Nível de significância do teste <i>F</i>	R <sup>2</sup> %
MPAS mg.pl <sup>-1</sup>	Satt332	MLG B1	0,01	3,7
	Satt583	MLG B1	0,0059	5
	Satt434	MLG H	0,03	3,1
	Satt232	MLG L	0,005	5,0
	Satt495	MLG L	0,11	4
	Satt185	MLG E	0,021	3
	Satt045	MLG E	0,044	3
NN nódulo.pl <sup>-1</sup>	Satt197	MLG B1	0,05	2,5
	Satt509	MLG B1	0,004	5,25
	Satt307	MLG C2	0,0025	6,2
	Satt325	MLG F	0,016	3,8
	Satt252	MLG F	0,048	3
	Satt573	MLG E	0,046	4
MNS mg.planta <sup>-1</sup>	Satt202	MLG C2	0,022	3,3
	Satt307	MLG C2	0,0005	8,0
	Satt180	MLG C1	0,034	3
MNS/NN	Satt296	MLG D1b	0,03	3,0
	Satt192	MLG H	0,03	3,8
	Satt509	MLG B1	0,05	2,5
	Satt252	MLG F	0,0099	5
	Satt394	MLG G	0,027	3

†. Grupo de ligação descrito em Cregan et al., (1999).

## Referências

CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; Van TOAL, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. Na integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v. 39, p. 1464 - 1491, 1999.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v. 65, p. 93-106, 2000.

LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLON, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.; NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkages maps or experimental and natural populations. **Genomics**, Washington, v. 1, p. 174-181, 1987.

ORF, J.H.; CHASE, K.; ADLER, F.L.; MANSUR, L.M.; LARK, K.G. Genetics of soybean agronomic traits: II. Interactions between yield quantitative trait loci in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1652-1657, 1999.

RENGEL, Z. Breeding for better symbiosis. **Plant and Soil**, v. 245, p. 147-162, 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**, v. 95, p. 355-366, 2006.

SANTOS, M. A.; NICOLÁS, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 67-75, 2006.

YUAN, J.; NJITI, V.N.; MEKSEM, K.; IQBAL, M.J.; TRIWITAYAKORN, K.; KASSEM, My.A.; DAVIS, G.T.; SCHMIDT, M.E.; LIGHFOOT, D.A. Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line popu-

lations segregating for yield and disease resistance. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 271-277, 2002.

SAS Institute Inc. 1990. SAS/STAT user's guide, Version 6, fourth ., ed., vol. 2. SAS Institute Inc., Cary, NC.