



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARIA APARECIDA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE QTL ASSOCIADOS À SIMBIOSE  
ENTRE *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* E A SOJA [*Glycine  
max* (L.) Merr.]**

---

LONDRINA

2005

MARIA APARECIDA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE QTL ASSOCIADOS À SIMBIOSE  
ENTRE *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* E A SOJA [*Glycine  
max* (L.) Merr.]**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação Em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria

LONDRINA

2005

MARIA APARECIDA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE QTL ASSOCIADOS À SIMBIOSE ENTRE  
*Bradyrhizobium japonicum*/B. *elkanii* E A SOJA [*Glycine max* (L.) Merr.]**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação Em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Mariangela Hungria

---

---

Londrina \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2005

## **Dedicatória**

Aos meus queridos pais Antônio e Amélia pela vida e pelo carinho que me dedicam, aos meus seis irmãos que compartilharam comigo este sonho e a todos os amigos que fiz nesta caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, fonte de vida e criador de todo o nosso material de estudo.

À Dra. Mariangela Hungria, pela orientação, pela confiança depositada durante a execução o trabalho e pelo exemplo de profissionalismo.

À Dra. Marisa Fabiana Nicolás, pelo companheirismo, pela participação ativa no desenvolvimento do trabalho e principalmente pela amizade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa-soja pela estrutura cedida.

Ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

A Taila, Manezinho, Rinaldo e Edneia pelo apoio indispensável na avaliação do experimento.

À Ligia, pela amizade, pela paciência e pelo suporte técnico que foram muito importantes.

Aos colegas do laboratório, que me ensinaram que além das afinidades, as diferenças também podem unir um grupo.

À Luciana, ao Fernando e ao Dino, pela amizade, pela disponibilidade em ouvir, por me fazerem admitir erros e acertos e por me incentivarem a seguir sempre em frente.

Aos colegas da turma de mestrado, pela amizade e pelo companheirismo.

Em especial a amiga Lucélia pela amizade e por dividir comigo os mesmos temores na busca do conhecimento.

À minha família, pelo carinho e pelo incentivo.

**“A possibilidade da realização de um sonho é o que torna a vida interessante”**

## RESUMO

O nitrogênio (N) necessário para a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] pode ser suprido pelo processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*/ *B. elkanii*, de tal forma que, hoje, não se recomenda o uso de fertilizantes nitrogenados para essa cultura no Brasil. Contudo, nos últimos anos, os parâmetros de FBN não vêm sendo avaliados nos programas de melhoramento, que priorizam o rendimento de grão e a resitência a doenças. O objetivo deste estudo foi identificar QTL (Quantitative Trait Loci), utilizando marcadores microssatélites (SSR), relacionados com a FBN em uma população F<sub>2:7</sub> de 157 linhagens endogâmicas recombinantes derivadas do cruzamento entre as cultivares contrastantes quanto as características de nodulação e crescimento de plantas, relacionadas com a FBN, Bossier (alta) x Embrapa 20 (média). As linhagens foram avaliadas em casa de vegetação quanto às características relacionadas com o crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS) e nodulação (massa de nódulos secos, MNS; número de nódulos, NN e massa média de nódulos secos, MNS/NN). Todas as características avaliadas apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ), indicando a existência de variabilidade genética entre as linhagens. A cultivar Bossier apresentou as maiores médias para todas as características avaliadas. Foram mapeados 16 marcadores distribuídos em seis dos vinte grupos de ligação, cobrindo uma região de 5% do genoma da soja (151,6 cM). A análise de regressão identificou doze associações significativas em quatro grupos de ligação (B1, C2, D1b, e H): três para a massa da parte aérea, quatro para número de nódulos, duas para massa de nódulos e três para a massa média de nódulos. Todos os QTL detectados foram de efeitos menores ( $R^2$  variando de 2,5% a 8,0%), semelhante ao encontrado na população F<sub>2:3</sub> de Embrapa 20 (média) x BRS 133 (baixa) (Nicolas et al., 2005). Contudo, sete marcadores foram confirmados nas duas populações, indicativo de uso potencial em programas de melhoramento visando a FBN.

**Palavras-chaves:** Soja. Simbiose. Microbiologia.

## ABSTRACT

Nitrogen (N) demand of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] can be supplied via biological nitrogen fixation (BNF) through the inoculation with selected *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* strains, such that today no N-fertilizer is recommended for the crop in Brazil. However, traits related to BNF have not been lately evaluated in soybean breeding programs, with priority given to yield and resistance to diseases. The objective of this study was the identification of QTL (Quantitative Trait Loci) related to BNF using microsatellites (SSR) markers, in an F<sub>2:7</sub> population of 157 Recombinant Inbred Lines (RILs), derived from the cross between parental cultivars with contrasting capacities of BNF, Bossier (high) and Embrapa 20 (medium). Soybean lines were grown under greenhouse conditions for the evaluation of the parameters of plant growth (shoot dry weight, SDW), and nodulation (nodule number, NN; nodule dry weight, NDW and the relation nodule dry weight/nodule number, NDW/NN). All parameters evaluated showed statistical differences ( $P \leq 0.05$ ), indicating genetic variability among soybean lines. Sixteen markers located in six out of the twenty soybean linkage groups have been mapped, covering about 5% of the genome (151.6 cM). The regression analysis identified twelve significant associations in four linkage groups (B1, C2, D1b and H): three for shoot weight, four for nodule number, four for nodule weight and three for the medium value of nodule weight. All QTL had minor effects ( $R^2 = 2,5$  to 8,0%) similar to previous reports in an F<sub>2:3</sub> of BRS 133 (low) x Embrapa 20 (medium) (Nicolás et al., 2005). However, seven QTL were confirmed in both populations, indicating that they might be effective in increasing BNF in soybean breeding programs.

**Key words:** Soybean. Symbiosis. Microbiology.



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS) e relação MNS/NN nas linhagens  $F_{2:7}$  do cruzamento Bossier x Embrapa 20 ..... 52

**Tabela 2.** Distribuição da ligação de marcadores SSR mostrando associações significativas com as diferenças fenotípicas para massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS) e relação MNS/NN, como resultado da a ..... 52

## LISTA DAS FIGURAS

**Figura 1.** Distribuição de frequências para massa da parte aérea seca e nodulação em linhagens endogâmicas recombinantes  $F_{2:7}$  do cruzamento das cultivares de soja Bossier x Embrapa 20, inoculadas com *Bradyrhizobium*. As setas indicam as médias das parentais com o desvio padrão ..... 53

**Figura 2.** Mapa parcial de ligação genética baseado na informação de 24 locos SSR da população de 157 linhagens recombinantes ( $F_{2:7}$ ) do cruzamento Bossier x Embrapa 20. O mapa foi construído com limite de detecção (LOD) igual a 3,0 e máxima frequência de recombinação de 0,50 ..... 54

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
1.1 A soja .....	11
1.2 Fixação biológica de nitrogênio .....	12
1.3 Interação planta bactéria .....	13
1.4 Bactérias que nodulam a soja .....	15
1.5 Mapeamento de características quantitativas .....	16
1.5.1 Características quantitativas .....	16
1.5.2 Mapeamento genético .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 Objetivos Específicos .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>Identificação de QTL associado à simbiose entre <i>Bradyrhizobium japonicum</i>/<i>B. elkanii</i> e a soja [<i>Glycine Max</i> (L.) Merr]</b> .....	31
Resumo .....	31
Abstract .....	32
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	33
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
Material vegetal .....	36
Análise das características de fixação biológica de nitrogênio e herdabilidade .....	37
Obtenção dos marcadores moleculares .....	38
Identificação e mapeamento de QTL .....	39

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
Análise das características de nodulação e crescimento da planta .....	40
Polimorfismo dos marcadores microssatélites e construção do mapa de ligação .....	41
Marcadores associados com o crescimento da planta e a nodulação .....	42
Verificação de QTL mapeados nas famílias $F_{2:3}$ do cruzamento BRS 133 x Embrapa 20 .....	43
<b>CONCLUSÕES</b> .....	46
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 A Soja

A soja [*Glycine Max* (L) Merrill] é uma das principais fontes de óleo vegetal do mundo (48%) e também é uma importante fonte de proteínas para o homem e outros animais (Zhang et al., 2004). É considerada uma das plantas cultivadas mais antigas, pois os relatos da literatura chinesa sobre a cultura datam de 2.500 anos a.C. A região central da China seria o provável centro genético primário da soja e, com a movimentação da população para a Manchúria, esta região tornou-se o centro genético secundário (Vargas e Hungria, 1997). A cultura da soja foi introduzida no Brasil em 1882 na Bahia, mas somente em 1940 o cultivo comercial do grão se estabeleceu na região sul do País, com considerável expansão das áreas de cultivo depois de 1960 (Hungria et al., 2001).

Atualmente o Brasil ocupa o segundo lugar na produção mundial, sendo que, a cada safra são registrados incrementos, tanto em área plantada, quanto em toneladas produzidas. O levantamento da Companhia Nacional de Agricultura e Abastecimento, na safra 2004/2005, indicou um incremento na área plantada de 4,9%, comparativamente à safra anterior. Em termos nacionais, houve um incremento na produção de 23,4%, atingindo um volume de 61,4% milhões de toneladas, enquanto o aumento na produtividade foi estimado em 17,6%, resultando em uma média nacional de 2.751 Kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2005). Desse modo constitui-se como a mais importante oleaginosa em produção sob cultivo extensivo no Brasil, bem como, a que produz mais proteínas por hectare e a que rende mais divisas para o País.

## 1.2 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para o crescimento e reprodução das plantas. A falta de N no solo frequentemente limita a produção agrícola. No solo, as principais fontes fornecedoras de N são: 1) N proveniente principalmente da decomposição da matéria orgânica; 2) N fornecido por fertilizantes; 3) N fornecido pelo processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) (Hungria, 1994).

Cerca de 78% da constituição gasosa da atmosfera é formada por nitrogênio molecular ( $N_2$ ). No entanto, as plantas e os demais organismos eucariontes são incapazes de absorver o  $N_2$  e convertê-lo a uma forma assimilável. Devido à estabilidade da molécula de  $N_2$  atmosférico é necessário o fornecimento de temperatura e pressão muito elevadas (fixação industrial), ou a presença de um sistema enzimático apropriado no caso da fixação biológica.

Os microrganismos desempenham um papel importante no ciclo do N. A fixação biológica de  $N_2$  (FBN) é mediada por uma parcela dos procariotos chamados de fixadores de nitrogênio ou diazotróficos, que possuem a enzima nitrogenase capaz de reduzir o  $N_2$  para a forma inorgânica  $NH_3$ , e, pelo ambiente protonado da célula, em  $NH_4^+$ . Essa forma nitrogenada pode, então, tornar-se disponível para as plantas e, caso seja excretada, para outros organismos do solo. Além disso, indiretamente, os produtos da FBN podem ser assimilados por outros organismos, inclusive o homem. A maioria das espécies de diazotróficos é de vida livre ocorrendo em todos os tipos de solo, na rizosfera e filosfera de plantas, em águas doces e salgadas e no trato intestinal de certos animais como os cupins. Alguns diazotróficos são encontrados em simbiose com fungos, diatomáceas e/ou com várias espécies de vegetais, enquanto outros estabelecem relações menos especializadas com plantas denominadas, de modo geral, como associações (Moreira e Siqueira, 2002).

A simbiose entre bactérias da ordem Rhizobiales, gêneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium*) e plantas leguminosas é a mais estudada. Durante esta interação, as bactérias induzem nódulos nas raízes das leguminosas convertendo o  $N_2$  a  $NH_3$ , através do complexo enzimático da nitrogenase. A planta fornece às bactérias os compostos de carbono (C) e outros nutrientes para sustentar o crescimento bacteriano, a fixação de  $N_2$  e incorporar o  $NH_3$  em compostos orgânicos, como aminoácidos, amidas e ureídos (Moat e Foster, 1996).

### 1.3 Interação Planta Bactéria

A interação simbiótica entre as bactérias diazotróficas pertencentes à ordem Rizobiales e as plantas leguminosas é complexa, compreendendo diversos estágios, envolvendo a expressão de genes tanto do hospedeiro, como do microssimbionte (Hungria, 1994; Schultze e Kondorosi, 1998). A interação inicia-se com a troca de sinais moleculares entre a raiz da planta e os rizóbios estabelecidos no solo. A seguir ocorre a colonização dos pêlos radiculares das plantas, a invasão de tecidos da raiz via uma invaginação dos pêlos formando o cordão de infecção, com posterior invasão das células do córtex radicular e o desenvolvimento do nódulo (Stougaard, 2000; Trevaskis et al., 2002; Buendía-Clavería et al., 2003).

Cada espécie de leguminosa libera um grupo de sinais, que foram identificados como compostos fenólicos, os flavonóides. Essas moléculas se ligam à proteína regulatória Nod D, ativando-a através de uma mudança na conformação da proteína. A proteína NodD ativada se liga a seqüências de nucleotídeos que precedem os genes estruturais

comuns *nodABC* e os transcritos desses genes induzem as bactérias a sintetizar sinais moleculares, denominados fatores Nod, e identificados como lipooligossacarídeos quitínicos. Com adição de radicais diferentes, o fator Nod se torna específico para cada hospedeiro, induzindo os fenótipos radiculares associados com a infecção pelo rizóbio, tais como deformação dos pêlos radiculares, divisão das células do córtex e formação do meristema do nódulo (Hungria, 1994; Haeze e Holsters, 2002).

Muitos genes da planta são expressos somente nos nódulos e em tecidos de raízes inoculadas. Esses genes são chamados de nodulinas e codificam proteínas que são requeridas ao desenvolvimento e manutenção do processo de FBN pelos nódulos. As nodulinas podem ser divididas em duas classes, com base nos padrões de expressão dos genes. As nodulinas iniciais que são expressas imediatamente após o contato com o rizóbio, sendo necessárias para a infecção e estágios iniciais de desenvolvimento do nódulo. As nodulinas tardias são expressas em nódulos maduros e devem ter um papel importante no metabolismo, manutenção e senescência dos nódulos (Stougaard, 2000; Geurts e Bisseling, 2002).

Exemplos de nodulinas iniciais incluem as nodulinas *Enod2*, *Enod12* que são proteínas de parede celular ricas em prolina, o aumento na expressão destas proteínas produz modificações na estrutura da parede celular, ressaltando o papel da constituição bioquímica da parede durante a infecção e desenvolvimento do nódulo, e a nodulina *Enod40* que estimula a divisão de células corticais, (Schultze e Kondorosi, 1998). Exemplos de genes de nodulinas tardias são os genes que codificam leghemoglobina encontrada em grandes concentrações no citoplasma de células infectadas, é responsável pelo transporte de oxigênio para os bacteróides e tampão do oxigênio livre, contribuindo para manter ativo o complexo da nitrogenase, que é extremamente sensível ao oxigênio (Papadopoulou et al. 1995). A nodulina *UricaseII* localiza-se nos peroxissomos de células não infectadas de nódulos maduros e tem um papel essencial

na biosíntese de ureídos que é uma das principais formas de transporte do nitrogênio fixado nos nódulos de algumas leguminosas que formam nódulos determinados (Trevaskis et al., 2002).

#### **1.4 Bactérias que nodulam a soja**

Dois gêneros de rizóbios, *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium*, formam nódulos e fixam nitrogênio em raízes de soja (Jiang e Krishnan, 2000).

As bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* são bastonetes Gram negativos com 0,5 µm a 3,0 µm por 1,2 a 3,0 µm, movem-se através de flagelos e utilizam oxigênio como receptor final de elétrons na cadeia respiratória. A temperatura adequada para seu crescimento oscila entre 25 a 30 °C e o pH entre 6 e 7 (Urenha et al., 1994).

O gênero *Bradyrhizobium* (*B. japonicum* e *B. elkanii*) tem crescimento lento e reação alcalina em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono. As velocidades específicas máximas de crescimento desta bactéria oscilam em torno de 0,07/h, com tempo de geração de, aproximadamente, 10 horas. (Urenha et al., 1994).

A soja também pode ser nodulada por rizóbios de crescimento rápido capazes de acidificar o meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono, isolados primeiramente na China (Keyser et al., 1982), inicialmente classificadas como *Rhizobium fredii* (Scholla e Elkan, 1984) e reclassificadas como *Sinorhizobium fredii* e *S. xinjiangensis* (Chen et al., 1988). No Brasil, as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* vêm sendo utilizadas em inoculantes comerciais desde a expansão da cultura no País em inoculantes comerciais. Como resultado da inoculação intensiva com algumas bactérias, existe um predomínio nos



solos brasileiros, de estirpes dos sorogrupos SEMIA 566, SEMIA 5019 (29W) e SEMIA 587, (Hungria et al., 1994).

## **1.5 Mapeamento de Características Quantitativas**

### **1.5.1 Características quantitativas**

Mendel, em 1896, estabeleceu as bases dos estudos genéticos, analisando a segregação de características que dividiam as ervilhas em categorias fenotípicas claramente distintas, como sementes enrugadas ou lisas, flores vermelhas ou brancas, vagens verdes ou amarelas. Estes fenótipos são exemplos de variação descontínua, em que existem categorias fenotípicas discretas, estas características são chamadas de qualitativas. (Mather e Jinks, 1984; Klug e Cummings, 1999).

No entanto, nem todas as características apresentam segregação descontínua. Muitas características de importância econômica, como a produção de sementes em plantas, a concentração de proteínas nos grãos, produção de leite em bovinos, etc., apresentam segregação contínua, isto é, entre os tipos mais extremos aparecem inúmeros fenótipos intermediários. Estes fenótipos podem ser descritos em termos quantitativos, e as características são conhecidas como características poligênicas ou quantitativas. Um loco individual controlando uma característica quantitativa tem sido referenciado como poligênico ou locos de característica quantitativa (QTL), ( Tanksley, 1993).

As diferenças básicas entre as características qualitativas e quantitativas englobam o número de genes que contribuem para a variabilidade fenotípica de um caráter e em que grau o fenótipo pode ser modificado por fatores do ambiente. As características

quantitativas são, geralmente, controladas por muitos genes, também chamados de poligenes, cada um contribuindo com uma diminuta parcela para o fenótipo. A variação contínua ocorre devido à segregação destes genes, aos efeitos do ambiente e à interação genótipo X ambiente (Klug e Cummings, 1999). Em função disso, os efeitos individuais desses poligenes não podem ser identificados pelos métodos mendelianos, sendo caracterizados pela soma de seus efeitos, por meio de procedimentos biométricos.

As abordagens estatísticas tradicionais permitem estabelecer um perfil da herança de uma dada característica, como o número aproximado de locos afetando o caráter em um cruzamento, o tipo de ação gênica (dominância, aditiva), e o grau com que vários poligenes interagem entre eles e com o ambiente na determinação de um fenótipo, essas abordagens são úteis para a compreensão dos componentes da variação e a resposta à seleção. No entanto, a falta de conhecimento sobre a identidade específica dos genes envolvidos dificulta o estudo de detalhes da herança poligênica. Análises que permitam determinar a magnitude do efeito, a herança e a ação gênica de um loco específico afetando o caráter, envolvem ferramentas estatísticas mais complexas (Tanksley, 1993).

### **1.5.2 Mapeamento genético**

A troca de segmentos entre cromátides homólogas, que ocorre durante a meiose, permite que genes ligados, isto é, presos entre si por estarem no mesmo cromossomo, se recombinem com seus alelos no cromossomo homólogo. A frequência com que esta recombinação ocorre está relacionada com a distância entre dois locos ligados, ou seja, conhecendo-se a frequência de recombinação entre dois locos ligados é possível calcular a distância entre eles. Uma unidade arbitrária chamada *centimorgan* (cM) é usada para

descrever a distância entre genes ligados, um *centimorgan* representa a distância linear para a qual um por cento de permuta é observada (Guerra, 1988; Ramalho et al., 1989). A localização de genes em cromossomos específicos é denominada de mapeamento gênico. Mapas de ligação constituem ferramentas importantes para os geneticistas, tanto na seleção assistida por marcadores, como na clonagem baseada em mapeamento em biologia molecular.

Recentes avanços em técnicas de biologia molecular e de ferramentas estatísticas têm possibilitado aos geneticistas fazerem a conexão entre fenótipos quantitativos e genes específicos influenciando esses fenótipos. Quando segmentos importantes do genoma podem ser identificados e correlacionados com a variação fenotípica, tem-se a identificação de um loco de característica quantitativa (QTL – Quantitative Trait Loci). A abordagem básica para a identificação de QTL é possível com a utilização de técnicas de mapeamento baseadas em marcadores (Quijada et al., 2004).

A segregação de um gene marcador pode ser usada para detectar e estimar os efeitos de poligenes ligados ao gene marcador. A determinação da ligação genética entre marcadores e QTLs depende da existência de desequilíbrio de ligação entre os alelos no loco marcador e os alelos do QTL. Esse desequilíbrio gera efeitos quantitativos associados ao marcador, que podem ser detectados e estimados através de análises estatísticas adequadas. Em experimentos de mapeamento, uma associação significativa entre marcador e gene é, invariavelmente, interpretada como sendo evidência de ligação física (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Sax, em 1933 foi o primeiro a relatar uma associação entre um marcador de herança simples com um caráter quantitativo em plantas, observando a segregação do tamanho da semente associado com a segregação para um marcador da cor do tegumento da semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. (citado por Tanksley, 1993).

No entanto, a construção de mapas genéticos com marcadores morfológicos é limitada, pela existência de poucos marcadores morfológicos disponíveis e pelos efeitos indesejáveis nos fenótipos, que são afetados pelas condições ambientais. Outros problemas com os genes marcadores são, a dominância, a epistasia, e a falta de polimorfismo na população.

O emprego de isoenzimas como ferramenta no mapeamento de poligenes possibilitou um avanço na identificação de caracteres de importância agrônômica. Marcadores isoenzimáticos foram utilizados para identificar QTL em milho (*Zea mays*), tomate (*Lycopersicon spp*), aveia (*Avena fatua* L.) e soja (revisado em Stuber, 1992).

Com o uso de marcadores morfológicos e isoenzimáticos, pouco foi feito com soja, pois os estudos de ligação gênica envolvendo essa cultura também envolvem, freqüentemente, cruzamentos em que poucos marcadores estão segregando, o que torna ineficiente a detecção de ligação (Keim et al., 1989). Com a utilização desses marcadores, um mapa clássico de ligação de soja foi construído, contendo 49 marcadores ligados e uma cobertura de 530 cM em 17 grupos de ligação (Palmer e Kiang, 1990).

Um avanço maior ocorreu com a introdução de marcadores genéticos baseados no DNA. O primeiro marcador utilizado foi o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism). Em soja, Keim et al., (1990) construíram um dos primeiros mapas genéticos de ligação com 150 marcadores RFLP, em conjunção com vários marcadores morfológicos clássicos estendendo-se em 1200 cM. Entretanto, a técnica de RFLP esbarra em problemas técnicos que dificultam a eficiência na produção de dados, como a necessidade de pessoal habilitado e de instalações adequadas para o manuseio de material radioativo. Esses aspectos têm tornado difícil a transferência da tecnologia para estações experimentais (Ferreira e Grattapaglia, 1995). A soja apresenta ainda, um agravante, que é o baixo polimorfismo por loco RFLP (medida pela diversidade

gênica), uma vez que em 90% dos locos analisados, somente dois alelos diferentes foram encontrados (Lorenzem et al., 1995).

Em virtude disso, o uso de marcadores baseados na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction), usando oligonucleotídeos iniciadores (primers) para detectar polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA) e microssatélites, ou seqüências simples repetidas (SSR – Simple Sequence Repeats). Assim como as isoenzimas a variação alélica dos marcadores baseados no DNA usualmente não apresentam efeitos fenotípicos detectáveis. Contudo ao contrário das isoenzimas a variação genética é observada diretamente no DNA e, assim, pode revelar mais polimorfismo (Tanksley, 1993). Desta forma, o uso de marcadores baseados em PCR tem sido crescente em programas de melhoramento genético de plantas. A tecnologia de RAPD, que envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando “primers” mais curtos de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando, assim, a necessidade do conhecimento prévio da seqüência.

A técnica de RAPD teve grande aceitação e aplicação para análises genéticas em vários sistemas biológicos, uma vez que é uma tecnologia bastante acessível e que pode ser transferida diretamente para estações experimentais de melhoramento. No entanto, o RAPD pode apresentar sérios problemas de reprodutibilidade, que dificultam a sua aplicação em larga escala, bem como o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, o segmento amplificado. Ao se observar uma banda RAPD no gel, não é possível distinguir se aquele seguimento se originou a partir de uma ou de duas cópias da seqüência amplificada. Ou seja, um indivíduo diplóide homozigoto para aquele loco RAPD possui dois “alelos” RAPD idênticos (AA) a partir das quais a amplificação ocorre. Por outro lado um indivíduo heterozigoto (Aa) para o mesmo loco RAPD possui um alelo (A) que é amplificado e o outro (a) que não o é. Por isso, enquanto o genótipo homozigoto “recessivo”

(aa) é identificado pela ausência da banda no gel (fenótipo nulo), os genótipos homozigoto “dominante” (AA) e heterozigoto (Aa) são colocados juntos na mesma classe fenotípica, isto é a presença da banda no gel. A técnica RAPD detecta, assim, apenas um alelo em cada loco, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Esta limitação é descrita como “dominância” dos marcadores RAPD (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Em relação às complicações no uso de RFLP e RAPD, surgiram outros sistemas de marcadores de DNA. Um deles foi o uso de marcadores do tipo microssatélites. Esses marcadores são compostos de pequenas seqüências de dois a cinco nucleotídeos de comprimento, tais como (CA), (ATT), ou (AGAT), repetidas em tandem, ou seja, uma pequena seqüência (“sequence motif”) que se repete várias vezes sucessivamente. A variação do número de repetições dessas seqüências gera uma grande quantidade de polimorfismos. Cada segmento amplificado de tamanho diferente (geralmente de várias dezenas até algumas centenas de pares de bases) representa um alelo diferente do mesmo loco. A detecção de seqüências microssatélites é feita via PCR a partir de “primers” específicos (20 a 30 bases) complementares às extremidades que flanqueiam o microssatélite, seguido por fracionamento em gel de agarose ou poliacrilamida, dependendo do tamanho do fragmento amplificado (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Senior et al., 1998).

Cada loco de microssatélite é analisado individualmente ao se utilizar o par de “primers” específicos. Locos microssatélites possuem expressão co-dominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados e são altamente multialélicos, numa população onde potencialmente todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados. Devido a isto, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético. Assim, a escolha da população para mapeamento não precisa mais ser feita com base na maximização da distância

genética, e sim visando a população mais informativa do ponto de vista das características biológicas ou agronômicas de interesse (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Senior et al., 1998; He et al., 2003).

Cregan et al., (1999) desenvolveram um mapa genético de ligação do genoma da soja com marcadores SSR integrado com outros marcadores moleculares (RAPD, RAPD e AFLP) e marcadores clássicos (morfológicos e isoenzimáticos). Um total de 606 locos SSR foram mapeados em um ou em três populações: uma população de linhagens puras recombinantes do cruzamento Minsoy X Noir (Univ. of Utah) e uma população  $F_2$  do cruzamento Clark X Harasoy (Univ. of Nebraska). Muitos locos SSR segregam em uma ou nas três populações. Foi possível alinhar os marcadores em 20 grupos de ligação que, possivelmente, correspondem a 20 pares de cromossomos da soja.

O avanço das técnicas moleculares permitiu o desenvolvimento de mapas genéticos detalhados de várias culturas de importância agrônômica, revelando novas possibilidades para o estudo da herança quantitativa e aplicação no melhoramento genético destas culturas, como o mapeamento de QTL para o monitoramento da resposta à seleção e identificação de germoplasma com alelos superiores. Com isso, é possível determinar os QTL relacionados com produção de sementes, peso de plantas, tempo de florescimento, maturidade, qualidade, resistência a estresses bióticos e abióticos.

Meksem et al., (2001) identificaram regiões genômicas da soja relacionadas com a produção de isoflavonóides. Marcadores RFLP e SSR foram utilizados para mapear QTLs envolvidos com o aumento da concentração de proteínas em grãos de soja (Sebolt et al, 2000). Maughan et al., (2000) identificaram um QTL controlando o conteúdo de sacarose em soja. Schuster et al., (2001) identificaram e mapearam quatro marcadores SSR ligados ao QTL 1 0

do cruzamento entre a cultivar resistente Hatwing com a linhagem brasileira BR- 92 – 1983. QTLs relacionados com resistência a nematóides de galha também foram mapeados através de marcadores SSR em uma população de 96 F associada com a resistência ao nematóide do cisto (*Heterodera glycine*) em soja em populações BC<sub>3</sub>F<sub>2:3</sub> e F<sub>2:3</sub>F<sub>2:3</sub> linhagens do cruzamento entre a PI96354 resistente e a cultivar Bossier suscetível ao nematóide de galha (*Meloidogyne incognita*), por Li et al. (2001).

Estudos de mapeamento também têm sido empregados no estudo de características envolvidas com desenvolvimento de variedades precoces de trigo (hábito de crescimento, dias para a maturidade, peso de plantas) utilizando marcadores SSR e RFLP (Kulwal et al., 2003).

Com relação a FBN, Nodari et al., (1993) detectaram quatro QTLs afetando o número de nódulos em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Nicolas et al.; (2002), estudaram a herança de características quantitativas de FBN em cultivares brasileiras de soja com diferentes capacidades de FBN, e identificaram dois cruzamentos de parentais contrastantes quanto à capacidade de FBN: Bossier (alta) X Embrapa 20 (média) e BRS 133 (baixa) X Embrapa 20 (média), que se apresentaram adequados para o uso em estudos sobre QTL controlando a nodulação e a FBN. Um estudo de mapeamento de 160 plantas de uma população F<sub>2</sub> derivadas do cruzamento Embrapa 20 X BRS 1333 com 45 marcadores SSR, avaliando-se os fenótipos para nodulação e FBN nas progênies F<sub>2:3</sub>, foi realizado por Nicolas et al., (2005). Foram mapeados 21 locos SSR, distribuídos em nove grupos de ligação, em uma região de 251,2 cM. Foram detectadas regiões genômicas associadas com o crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS) e nodulação (número de nódulos, NN; massa de nódulos secos, MNS e a massa média de nódulos secos, MNS/NN). Através deste trabalho, foi possível construir um mapa genético não saturado, estabelecendo um estágio inicial para o uso potencial desses marcadores em programas de melhoramento genético da soja.



Em características quantitativas, são avaliados muitos indivíduos, para se detectar aqueles que possuem o máximo de alelos favoráveis e o mínimo de alelos desfavoráveis. Nesse contexto, marcadores moleculares ligados a QTL com influência para uma característica podem aumentar a precisão e reduzir o número de avaliações necessárias para se detectar indivíduos com combinações superiores de genes. Estes estudos se embasam na premissa de que, a identificação de QTL para características complexas pode aumentar a eficiência no melhoramento de plantas por meio da seleção assistida por marcadores e, eventualmente, a clonagem destes QTL. Entretanto, a identificação inicial dos efeitos de um QTL pode não ser verdadeira, tornando-se necessária a confirmação de QTL antes da sua utilização em programas de melhoramento ou clonagem. (Quijada et al., 2004).

Diferentes abordagens têm sido usadas para confirmar QTL. Para características de efeitos maiores, a abordagem mais comum é a introgressão dos alelos de um QTL individual em um material genético homocigoto, através de múltiplas gerações de retrocruzamento. Isto pode levar à segregação qualitativa dos efeitos fenotípicos que podem ser usados para um mapeamento fino e a clonagem do QTL. Para QTL de pequeno efeito esta abordagem não leva a um mapeamento preciso, a transferência de alelos do QTL em diferentes materiais genéticos pode ser usado para a confirmação de QTL. Fasoula et al., (2004) utilizaram duas populações para confirmar QTL relacionados com o peso de sementes, teor de proteína e óleo em soja.

O desenvolvimento de bases de dados com seqüências expressas (EST-Expressed Sequence Tags), para algumas culturas de interesse como a soja, tem permitido o uso destas ESTs como marcadores. A associação de marcadores EST com características quantitativas pode permitir uma maior compreensão sobre as vias bioquímicas e os mecanismos que afetam características de interesse, uma vez que ESTs propiciam maior informação sobre a função gênica do que outros marcadores moleculares. Algumas ESTs têm

sido encontradas associadas a QTL para tempo de florescimento e área foliar em soja (Zhang et al., 2004).

A construção de mapas de ligação e os projetos de sequenciamento de genomas de *Lótus japonicum* e *Medicago truncatula* duas espécies modelos para estudos sobre fixação, tem possibilitado a identificação e a clonagem de genes simbióticos (Udvardi, 2002; Stougaard, 2001; Thouquet et al., 2002). Desta forma, a interação entre genética clássica e genética molecular têm contribuído para a descoberta de genes da planta envolvidos com a FBN.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi confirmar QTL ligados a marcadores microssatélites, já detectados previamente numa população de 160 linhagens  $F_{2:3}$  oriundas do cruzamento BRS133 x Embrapa20 por Nicolás et. al., 200... e identificar novos QTLs, em outra população de 157 linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) do cruzamento Bossier x Embrapa 20.

### 2.1 Objetivos Específicos

- a) Analisar 24 marcadores microssatélites em plantas de soja de uma população de mapeamento formada por 157 linhagens endogâmicas recombinantes derivadas do cruzamento entre as cultivares Bossier e Embrapa 20.
- b) Avaliar as características de nodulação: número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS), relação entre massa de nódulos secos e o número de nódulos (MNS/NN) e crescimento de plantas: a massa da parte aérea seca (MPAS) nas 157 linhagens do cruzamento Bossier x Embrapa 20.

## REFERÊNCIAS

BUENDÍA-CLAVERÍA, A. M.; MOUSSAID, A.; OLLERO, F.J.; VINARDELL, J. M.; RODRÍGUES-CARJAL, M.; TEJERO-MATEO, P.; PEART, J. L.; BREWIN, N. J.; RUIZ-SAINZ. A purL mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. **Microbiology**, v 149, p 1807-1818, 2003.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomia study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 393 -397, 1988.

CONAB (Companhia Nacional de Agricultura e Abatecimento). Disponível em: <[www.conab.gov.br/download/safra/SojaSerieHist.xls](http://www.conab.gov.br/download/safra/SojaSerieHist.xls)>. Acesso em: 28 jan. 2005.

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.

FASOULA, V. A.; HARRIS, D. K.; BOERMA, H. R. Validation and designation of quantitative trait loci for seed protein, seed oil, and seed weight from two soybean populations. **Crop Science**, v.44, p. 1218-1225, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, Embrapa Cenargem, 1995. 220 p.

GEURTS, R.; BISSELING, T. Rhizobium nod factor perception and signaling. **The Plant Cell**, 2002

GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro, Guanbara, 1988, 142 p

HAEZE, W. D'; HOLSTERS, M. Nod factors structures, responsesm and perception during initiation of nodule development. **Glycobiology**, v12, p 79-105, 2002.

HE, G.; MENG, R.; NEWMAN, M.; GAO, G.; PITTMAN, R. N.; PRAKASH, CS. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BioMed Central Plant Biology**, v. 3, p 1-6, 2003.

HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 339-364, 1994.

HUNGRIA, M. ParteII: Estudos sobre a associação rizóbio-leguminosas. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (eds). **Manual de métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, p. 95-137, 1994.

HUNGRIA, M.; BOHER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; COCA, R. G.; MEGÍAS, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1349-1361, 2001.

JIANG, G.; KRISHNAN, H. B. *Sinorhizobium fredii* USDA 257, a cultivar - specific soybean symbionte, carries two copies of y4 y4 and y4 yB, two open reading frames that are located in a region that encodes the type III protein secretion system. **Molecular-Plant Microb Interaction**, v.13, p. 1010-1014, 2000.

KEIM, P.; SHOEMAKER, R. C.; PALMER, R. G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, p. 786-792, 1989. 1 5

KEIM, P.; DIERS, B.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. **Genetics**, v. 126, p. 735-742, 1990.

KEYSER, H. H.; BOHLOOL, B. B.; HU, T. S.; WEBER, D. F. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. **Science**, v 215, p. 1631-1632, 1982.

KLUG, W.; GUMMINGS, R. **Essentials of Genetics 3 ed.** New Jersey Upper Saddle River, 1999, 567 p.

KULWAL, P.L.; Roy, J.K. Balyan, H.S.; Gupta, P.K. QTL mapping for growth and leaf characters in bread wheat. **Plant Science** v 164, p 267-277, 2003.

LI, Z. L.; JAKKULA, L.; HUSSEY, R. S.; TAMULONIS, J. P.; BOERMA, H. R. SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p. 1167-1173, 2001.

LORENZEN, L.L.; BOUTIN, S.; YOUNG, N.; SPECHT, J. E.; SHOEMAKER, R.C. Soybean pedigree analysis using map-based molecular markers: tracking RFLP markers in cultivar. **Crop Science**, v. 35, p. 1326-1336, 1995.

MATHER, K.; JINKS, J. L. **Introdução à Genética Biométrica.** Ribeirão Preto/SP, Sociedade Brasileira de Genética, 1984. 241 p.

MAUGHAN, P. J.; SAGHAI, M. M. A.; BUSS, G. R. Identification of quantitative trait loci controlling sucrose content in soybean *Glycine max*. **Molecular Breeding**, v. 6, p. 105-111, 2000.

MEKSEM, K.; NJITI, V. N.; BANZ, W. J.; IQBAL, M. J.; KASSE, My. M.; HYTEN, D. L.; YUANG, J.; WINTERS, T. A.; LIGHTFOOT, D. A. Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. V. 1, p. 38-45,2001.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W. **Microbial Physiology 3 ed.** New York: Wiley – Liss, p. 437-461, 1996.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** UFLA, p. 305-471, 2002.

NICOLÁS, M. F.; ARIAS, C. A. A.; HUNGRIA, M. Genetics of nodulation and nitrogen fixation in Brazilian soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils.**, 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. (corrigido e retornado ao editor).

NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GUZMÁN, R.L; GUZMÁN, R.L.G.; GEPSTS, P. Toward and integrated linkage map of common bean. III. Genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics.** v. 134, p. 431-350, 1993.

PALMER, R. G.; KIANG, Y. T. Linkage map of soybean (*Glycine max* L. Merr.). In: **Genetic map**, Ed 5. O'BRIEN, S.J. (Ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. P. 668-693.

PAPADOPOULOU, K.; ROUSSIS, A.; KUIN, H.; KATINAKIS, P. Expression pattern of uricase II gene during root nodule development in *Phaseolus vulgaris*. **Experientia**, v.51, p. 90-94, 1995.

QUIJADA, P. A.; MAUREIRA, I. J.; OSBORN, T.C. Confirmation of QTL controlling seed yield in spring canola (*Brassica napus* L.) hybrids. **Molecular Breeding**, v. 13, p 193-200, 2004.

RAMALHO, A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária 7 ed.** São Paulo, Editora Globo, 1989. 357p.

SCHOLLA, M. H.; ELKAN, G. H. *Rhizobium fredii* sp. Nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 484-486, 1984.

SEBOLT, A. M.; SHOEMAKER, R. C.; DIERS, B. W. Analysis of a quantitative trait locus allele from wild soybean that increases seed protein concentration in soybean. **Crop Science**, v. 40, p.1438-1444, 2000.

SENIOR, M. L.; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Science.** v.38, p 1088-1098, 1998.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review of Genetics.**, V. 32, p. 33 – 57, 1998.

SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R. V.; MARIN, S. R. R.; CARVALHO, V. P.; KIIHL, R. A. S.; SILVA, J. F. V.; SEDIYAMA, C. S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Identification of new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Theoretical And Applied Genetics**, v. 102, p. 91-96, 2001.

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

STOUGAARD, J. Genetics and genomics of root symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.328-335, 2001.

STUBER, C. W. Biochemical and molecular markers in plant breeding. In: JANICK (Ed.) **Plant Breeding Reviews**. New York: JOHN WILEY and SINS, Inc., 1992. P. 37-61.

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.

TANKSLEY, S .D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p. 205-233, 1993.

TREVASKIS, B.; WANDREY, M.; COLEBATCH, G.; UDVARDI, M. K. The soybean GmN6L gene encodes a late nodulin expressed in the infected zone of nitrogen-fixing nodules. **Molecular Plant- Microbe Interactions**, v. 15, p. 630-636, 2002.

TREVASKIS, B.; COLEBATCH, G.; DESBROSSES, G.; WANDREY, M.; WIENKOOP, S.; SAALBACH, G.; UDVARDI, M. Differentiation of plant cells during symbiotic nitrogen fixation. **Comparative and functional genomics**, v3, p 151-157, 2002.

UDVARDI, M. K. Legume genomes and discovery in symbiosis research. **Genome biology**, v.3 (9), p. 4028.1-4028.3, 2002.

URENHA, L.C.; PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M.; BONOMI, A. Produção de biomassa microbiana celular de rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (eds). **Manual de métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, p. 95-137, 1994.

VARGAS, M. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M. T.; HUNGRIA, M. (eds). **Biologia dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa – CPAC, 1997, p. 297-360.

ZHANG, W.-K.; WANG, Y. -J.; LUO, G. -Z.; ZHANG, J.-S.; HE, C.-Y.; WU, X.-L.; GAI, J.-Y. CHEN, S.-Y. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean ( *Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v 108, p 1131-1139, 2004.

## Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* e a soja [*Glycine max* (L.) Merr]<sup>1</sup>

Maria Aparecida dos Santos<sup>2, 3</sup>, Marisa F. Nicolás<sup>4</sup>, Mariangela Hungri<sup>5, \*</sup>

Resumo - Dentre os principais fatores bióticos que contribuem para o sucesso da cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] no Brasil, destaca-se a fixação biológica do nitrogênio (FBN), pois a simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* consegue suprir a demanda de N das plantas. Contudo, os parâmetros de FBN não vêm sendo avaliados nos programas de melhoramento, que priorizam o rendimento de grãos e a resistência a doenças. O objetivo deste estudo foi identificar QTL (Quantitative Trait Loci), utilizando marcadores do tipo microssatélites (SSR), relacionados à FBN em uma população F<sub>2:7</sub> de cultivares com diferentes capacidades de FBN, Bossier (alta) e Embrapa 20 (média). Nesta etapa inicial, foram mapeados 16 marcadores distribuídos em seis grupos de ligação, cobrindo uma região de 5% do genoma (151,6 cM). A análise de regressão identificou 12 associações significativas em quatro grupos de ligação (B1, C2, D1b e H): três para a massa da parte aérea, quatro para número de nódulos, duas para a massa de nódulos e três para a massa média de nódulos. Todos os QTL detectados foram de efeitos menores, semelhante ao encontrado na população F<sub>2:3</sub> de BRS 133 (baixa) x Embrapa 20 (média) (Nicolás et al., 2005).

Contudo, sete marcadores foram confirmados nas duas populações, indicativo de uso potencial em programas de melhoramento visando a FBN.

Termos para indexação: Fixação biológica do nitrogênio, marcadores moleculares, mapa genético, microssatélites, nodulação, SSR.

---

1 Aceito para publicação em .....

Extraído da Dissertação de Mestrado da primeira Universidade Estadual de Londrina, PR

2 Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja), Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. E-mail: mapsan@cnpsso.embrapa.br, hungria@cnpsso.embrapa.br

3 Bolsista de mestrado da CAPES

4 Laboratório Nacional de Computação Científica, Av. Getúlio Vargas, 333, Quitandinha, CEP: 25651-075 Petrópolis, RJ. E-mail: marisa@lncc.br

5 Bolsista de Pesquisa do CNPq.

\* Autor para correspondência.



Identification of QTL associated with the symbiosis of *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]

Abstract - The success of the soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] crop in Brazil is greatly supported by the biological nitrogen fixation (BNF) process, as the symbiosis with *Bradyrhizobium* bacteria can supply the plant's N needs. However, traits related to BNF have not been evaluated in soybean breeding programs, with priority given to yield and resistance to diseases. The objective of this study was the identification of QTL (Quantitative Trait Loci) related to BNF using microsatellites (SSR) markers, in an  $F_{2:7}$  population derived from a crossing between cultivars with contrasting capacities of BNF, Bossier (high) and Embrapa 20 (medium). At this point, 16 markers located in six linkage groups have been mapped, covering about 5% of the genome (151.6 cM). The regression analysis identified 12 significant associations in four linkage groups (B1, C2, D1b and H): three for shoot weight, four for nodule number, four for nodule weight and three for the medium value of nodule weight. All QTL had minor effects, similar to previous reports in an  $F_{2:3}$  of BRS 133 (low) x Embrapa 20 (medium) (Nicolás et al., 2005). However, seven QTL were confirmed in both populations, indicating that they might be effective in increasing BNF in soybean breeding programs.

Index terms: Biological nitrogen fixation, molecular markers, genetic map, microsatellites, nodulation, SSR.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja [*Glycine max* (L.) Merr.]. O levantamento da Companhia Nacional de Agricultura e Abastecimento, na safra 2004/2005, indicou um incremento na área plantada de 4,9%, comparativamente à safra anterior. Em termos nacionais, houve um incremento na produção de 23,4%, atingindo um volume de 61,4 milhões de toneladas, enquanto o aumento na produtividade foi estimado em 17,6%, resultando em uma média nacional de 2.751 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2005).

Dentre os principais fatores bióticos que contribuem para essa elevada produção de soja destaca-se a fixação biológica do nitrogênio (FBN), uma vez que a demanda de nitrogênio (N) das cultivares brasileiras pode ser suprida totalmente pelo processo biológico, através da inoculação com estirpes selecionadas de *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii*. Estudos de quantificação da FBN no país indicam que esta pode suprir a soja em até 300 kg de N ha<sup>-1</sup>, conseqüentemente, não se recomenda a utilização de fertilizantes nitrogenados, resultando em uma economia estimada em US\$ 3 bilhões por safra (Hungria et al., 2005). O sucesso da FBN no Brasil resulta de pesquisas e seleção de estirpes compatíveis com as cultivares brasileiras, com alta eficiência de FBN e adaptadas às diferentes condições ambientais em que a soja é cultivada no país. Contudo, particularmente na última década, os caracteres da FBN não têm sido contemplados diretamente nos programas de melhoramento genético da soja, que priorizam características relacionadas com a produção e com a resistência às doenças. Diferenças quanto à eficiência no processo de FBN entre genótipos comerciais de soja utilizados atualmente foram relatadas por Bohrer & Hungria (1998) e Hungria & Bohrer (2000), havendo indicações de perdas de até 30% na contribuição da FBN para as plantas, em comparação com as cultivares parentais.

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. Alguns estudos sobre nodulação em soja descrevem mutantes simbióticos tolerantes ao nitrato (*nts*) (Gremaud & Harper, 1989; Akao & Kouchi, 1992), ou com restrição à nodulação por determinados sorogrupos de *Bradyrhizobium*, incluindo genótipos não-nodulantes (Caldwell, 1966; Vest et al., 1972; Devine, 1976). Recentemente, foi obtido um mapa integrado de ligação do genoma da soja (Cregan et al., 1999; Song et al., 2004) e alguns locos relacionados com restrição à nodulação (*Rj1* e *Rj2*) e tolerância a nitrato (*nts*) foram incluídos.

Alguns marcadores moleculares disponíveis no mapa do genoma da soja (Cregan et al., 1999) vêm sendo utilizados para a identificação de QTL (quantitative trait loci, locos de caráter quantitativo), visando o seu emprego na seleção assistida em programas de melhoramento de soja. Meksem et al. (2001), por exemplo, identificaram regiões genômicas relacionadas com a produção de isoflavonóides utilizando marcadores do tipo microssatélites (simple sequence repeat, SSR). Marcadores RFLP (restriction fragment length polymorphism, polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) e SSR também foram utilizados para mapear QTL envolvidos com o incremento no teor de proteínas nos grãos (Sebolt et al., 2000). Schuster et al. (2001) mapearam quatro marcadores SSR ligados ao QTL associado com a resistência ao nematóide do cisto (*Heterodera glycine*). QTL relacionados com resistência a nematóides de galha também foram mapeados através de marcadores SSR em uma população de 96 F<sub>2:3</sub> linhagens do cruzamento entre a PI96354, resistente e a cultivar Bossier, suscetível ao nematóide de galha (*Meloidogyne incognita*) (Li et al., 2001). Diversos QTL para características relacionadas com o rendimento de grãos também foram descritos (Orf et al., 1999a; Orf et al., 1999b; Chung et al., 2003).

Com relação à FBN, Nodari et al. (1993) detectaram quatro QTL afetando o número de nódulos em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Na soja, Nicolás et al. (2005) identificaram, 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.

Com a finalidade de verificar os QTL descritos previamente por Nicolás et al. (2005) e de identificar novos QTL foi desenvolvida uma população de mapeamento de 157 linhagens  $F_{2:7}$  entre cultivares de soja com diferentes capacidades de FBN, Bossier (alta) e Embrapa 20 (média). As avaliações quantitativas e o mapeamento desses QTL são apresentados neste estudo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Vegetal

As análises foram 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) e com potencial genético de gerar linhas superiores (Nicolás et al., 2002). Uma amostra de 157 sementes  $F_2$  foi avançada até a geração  $F_7$  através do método do descendente de uma única semente (SSD, single seed descent). As linhagens  $F_{2:7}$  foram avaliadas em casa de vegetação quanto às características relacionadas com o crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS) e nodulação (massa de nódulos secos, MNS; número de nódulos, NN e massa média de nódulos secos, MNS/NN). O N total acumulado nos tecidos não foi analisado porque, em estudos prévios com 152 cultivares de soja, Bohrer & Hungria (1998) e Hungria & Bohrer (2000) constataram alta correlação entre os parâmetros de MPAS e N total acumulado pelas plantas ( $r=0,87^{**}$  e  $r=0,92^{**}$ ), respectivamente, dispensando a necessidade de análise do teor de N nos tecidos.

### Análise das características de fixação biológica de nitrogênio e herdabilidade

O experimento para avaliação das características de FBN (MNS, NN, MNS/NN, MPAS) foi conduzido em casa de vegetação, em vasos de plástico contendo 4 kg de solo não esterilizado e areia. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições, com uma planta por repetição de cada uma das 157 linhagens  $F_{2:7}$  (totalizando 1256 plantas) e 15 repetições de cada genótipo parental. Para garantir uma boa nodulação as plantas receberam 1 mL de inoculo misto (v:v 1:1) de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e *B. elkanii* SEMIA 587. As estirpes foram crescidas em meio YM (yeast-mannitol, extrato-de-levedura e manitol; Vincent, 1970) por sete dias, as duas culturas foram ajustadas para uma concentração de  $10^9$  células mL<sup>-1</sup> e, depois, misturadas. A inoculação foi realizada quando as plantas atingiram o estágio V2 (primeira folha trifoliada estendida e a segunda folha suficientemente aberta) (Fehr & Caviness, 1977). Trinta dias após a inoculação, as plantas foram coletadas individualmente. O sistema radicular e a parte aérea foram separados e mantidos em estufa com circulação forçada de ar, a 65°C, por quatro dias. A seguir, avaliaram-se os parâmetros de MPAS, NN, MNS e a relação MNS/NN foi calculada. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância, usando o procedimento PROC GLM do SAS (SAS, 1989). A herdabilidade para cada característica foi obtida através da fórmula:  $h^2 = \sigma_g^2 / [\sigma_g^2 + (\sigma_e^2 / r)]$ , onde  $\sigma_g^2$  = variância genotípica,  $\sigma_e^2$  = variância do erro, r = repetições. (Wricke & Weber, 1986).

## Obtenção dos marcadores moleculares

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 foi amplificada com 24 pares de primers microssatélites escolhidos a partir do mapa do genoma da soja (Cregan et al., 1999). O volume total das reações de PCR foi modificado para 10  $\mu$ L, contendo: tampão de PCR 1X (2,5 mM Tris-HCL pH 8,3 e 62,5 mM de KCl); 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; 125  $\mu$ M de cada dNTP; 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo (“primer”) (“forward” e “reverse”), uma unidade de *Taq* DNA polimerase e 20 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em um termociclador (MJ Research modelo PT – 200), com um programa iniciado com 7 min a 94°C, seguidos de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e 2 min a 72 °C e finalizando com uma etapa de 7 min a 72°C para a extensão da fita. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato 0,09 M e EDTA 0,002 M) por, aproximadamente, 4 h de corrida a 90 V, ou em gel de poliacrilamida (29:1, acrilamida:bis-acrilamida) a 40%, quando não foi possível visualizar o polimorfismo em gel de agarose. Os géis foram corados em uma solução de brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) por 30 min e fotografados sob luz UV com câmera digital Kodak DC 120 e o software para PC Kodak Digital Science 1D (Eastman Kodak Company). A partir do perfil das bandas nos géis, foi 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). Testes de  $\chi^2$  foram usados para confirmar a herança monogênica dos marcadores moleculares.

## Identificação e mapeamento de QTL

O mapa genético foi construído com base nos marcadores moleculares que segregaram de acordo com a proporção esperada de herança monogênica em cada linhagem, ou seja, 1:1. Os cálculos da frequência de recombinação, da distância genética entre os diferentes marcadores genéticos e da determinação do posicionamento dos marcadores foram feitos com o auxílio do programa MAPMAKER/EXP (Lander et al., 1987). O agrupamento dos marcadores foi feito adotando um valor limite de detecção (LOD) de 3,0 e a conversão da frequência de recombinação para centimorgans (cM) foi feita utilizando a distância de mapeamento de Haldane ( $r= 0,50$ ). A identificação de marcadores moleculares associados às características MPAS, MNS, NN, MNS/NN foi determinada pela análise de regressão simples. As linhagens heterozigotas para os marcadores foram incluídas nas análises, mas suas médias não foram apresentadas. A existência de ligação entre um loco marcador e um caráter quantitativo foi admitida quando houve uma diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre o valor fenotípico médio da linhagem  $F_{2:7}$  e o marcador. A proporção da variação fenotípica explicada pela associação caráter-marcador foi estimada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), (Edwards et al., 1987). Todas as análises foram feitas com o procedimento PROC GLM (SAS, 1989).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise das Características de Nodulação e Crescimento da Planta

A distribuição de frequência das características relacionadas com o crescimento da planta (MPAS) e nodulação (MNS, NN e MNS/NN) para as 157 linhagens não apresentou desvios significativamente diferentes da normalidade, confirmando que as características fenotípicas são quantitativas (Figura 1). A cultivar parental Bossier apresentou as maiores médias para todas as características avaliadas, MPAS ( $10,19 \pm 2,35 \text{ g pl}^{-1}$ ), MNS ( $699,93 \pm 331,77 \text{ mg pl}^{-1}$ ), NN ( $206,40 \pm 86,96 \text{ nódulos pl}^{-1}$ ), MNS/NN ( $4,04 \pm 2,28$ ) em relação à Embrapa 20 (MPAS,  $9,11 \pm 4,02 \text{ g pl}^{-1}$ ; MNS,  $529,96 \pm 347,30 \text{ mg pl}^{-1}$ ; NN,  $183,57 \pm 95,81 \text{ nódulos pl}^{-1}$  e MNS/NN,  $2,75 \pm 1,28$ ). O comportamento dos parentais foi semelhante ao verificado por Nicolás et al. (2002).

Na análise de variância, foram observadas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre as linhagens para todas as características avaliadas (Tabela 1), indicando a existência de variabilidade genética entre as linhagens. Os coeficientes de variação (CV) para MPAS, MNS, NN, MNS/NN foram de 25,6%, 49,5%, 50,1%, 45,6%, mas valores superiores a 30% são comumente relatados para os parâmetros de nodulação (Bohrer & Hungria, 1998; Hungria & Bohrer, 2000; Nicolás et al., 2002). A importância de avaliação dos parâmetros de MNS foi salientada nos estudos de Bohrer & Hungria (1998) e Hungria & Bohrer (2000), na avaliação de 152 cultivares de soja, em que foi demonstrado que a MNS estava altamente correlacionada tanto com a MPAS (valores entre  $r=0,68^{**}$  e  $r=0,80^{**}$ ), como com o N total acumulado na planta (valores entre  $r=0,65^{**}$  e  $r=0,74^{**}$ ). As linhagens apresentaram segregação transgressiva, semelhante aos resultados previamente descritos por Nicolás et al. (2002) para o cruzamento Embrapa 20 X BRS 133.

Os valores de herdabilidade estimados foram de 49% para MPAS, 30% para NN, 33% para MNS e 27% para MNS/NN (dados não mostrados). Estes valores estão de acordo com os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) (tabela 1), denotando a natureza complexa dos caracteres relacionados ao crescimento e nodulação que estão sujeitos à interação com o ambiente.

### **Polimorfismo dos Marcadores Microssatélites e Construção do Mapa de Ligação**

Ao todo, 136 marcadores microssatélites (SSR) foram testados quanto ao polimorfismo, sendo 66 polimórficos entre as parentais Bossier e Embrapa 20. Até o presente momento, foram avaliados 24 desses marcadores polimórficos nas 157 linhagens. Todos os marcadores segregaram de acordo com a proporção esperada (1:1), segundo o teste do  $\chi^2$  ( $P \leq 0,05$ ). Foi possível mapear 16 marcadores em seis grupos de ligação (LG, linkage group), correspondendo aos grupos B1, C2,

D1b, H, N e B2 do mapa de Cregan et al. (1999). Em alguns casos, foram constatadas diferenças em relação às distâncias entre os marcadores SSR neste trabalho e as populações descritas por Cregan et al., (1999) e Nicolás et al. (2005) (figura 2), que podem ser devidas a diferenças entre os parentais e/ou fatores não controláveis. Resultados semelhantes foram relatados por Ghassemi & Gresshoff (1998) e Chung et al. (2003). Os locos mapeados no presente trabalho cobrem uma região de 5% do genoma da soja (151,6 cM), desse modo, outros marcadores estão sendo utilizados para se conseguir uma maior cobertura do genoma e saturar as regiões mapeadas.

### **Marcadores associados com o crescimento da planta e a nodulação.**

Os resultados da análise de regressão com os locos marcadores como variáveis independentes e os fenótipos (MPAS, NN, MNS, MNS/NN) como variáveis dependentes identificaram 12 associações significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre locos marcadores e locos de QTL devido a efeitos aditivos (Tabela 2). Os marcadores que apresentaram associações significativas com QTL para crescimento e nodulação foram mapeados em quatro grupos de ligação: B1 (Satt509, Satt197, Satt332), C2 (Satt307, Satt202), D1b (Satt296), H (Satt192, Satt434) (Figura 2). Dois marcadores Satt232 e Satt325 que também apresentaram associações significativas para as características fenotípicas não foram agrupados.

Para a característica MPAS, três marcadores foram significativamente associados: Satt332 ( $P \leq 0,01$ ), Satt 434 ( $P \leq 0,03$ ) e Satt232 ( $P \leq 0,005$ ). Para o NN, quatro associações foram significativas: Satt509 ( $P \leq 0,04$ ), Satt197 ( $P \leq 0,05$ ), Satt307 ( $P \leq 0,0025$ ) e Satt325 ( $P \leq 0,016$ ). Para a MNS, duas associações foram significativas: Satt307 ( $P \leq 0,0005$ ) e Satt202 ( $P \leq 0,016$ ). Na relação MNS/NN, três associações foram significativas: Satt296 ( $P \leq 0,03$ ), Satt509 ( $P \leq 0,05$ ) e Satt192 ( $P \leq 0,03$ ). O percentual de variação fenotípica ( $R^2$ ) explicado pelas associações loco marcador e loco QTL variou de 3,7% a 5% para MPAS, de 2,5% a 5,25% para NN, de 3% a 8% para MNS e de 2,5% a 3,9% para MNS/NN (Tabela 2).

Todos os QTL detectados foram de efeitos menores, sendo este similar ao encontrado na população  $F_{2:3}$  BRS 133 x Embrapa 20 (Nicolás et al., 2005). A baixa magnitude dos efeitos dos QTL detectados coincide com os baixos valores de herdabilidade das características avaliadas. Resultados semelhantes têm sido relatados em vários estudos de QTL para características com moderada ou baixa herdabilidade. Loudet et al. (2003) identificaram 57 QTL relacionados com a eficiência no uso do N em linhagens

recombinantes de *Arabidopsis thaliana* com efeitos pequenos ( $R^2$  variando de 2 a 21). Em soja, QTL de efeitos menores também foram relatados para características relacionadas com o rendimento de grãos (Orf et al., 1999a; Orf et al., 1999b; Yuan et al., 2002), bem como QTL relacionados com a concentração de proteínas e óleo na semente (Sebolt et al., 2000).

Por outro lado, os marcadores Satt509 e Satt307 foram associados com mais de uma característica fenotípica (figura 2b e 2c). Marcadores associados a mais de uma característica também foram identificados na população  $F_{2:3}$  BRS 133 x Embrapa 20 (figura 2a, 2b e 2d). Isso pode sugerir que essas características fenotípicas são controladas por QTL estreitamente ligados, ou pela ação de um único QTL com efeito pleiotrópico (Lebreton et al., 1995; Loudet et al., 2003). QTL com efeitos pleiotrópicos têm sido observados para vários caracteres morfológicos e de desenvolvimento na soja e no feijoeiro (Keim et al., 1990; Mansur et al., 1993; Nodari et al. 1993, Souza et al., 2000, Nicolás et al., 2005). A maior dificuldade que se apresenta frente a esse tipo de interações consiste em distinguir QTL fortemente ligados que afetam várias características, de um único QTL com efeitos pleiotrópicos.

### **Verificação de QTL mapeados nas famílias $F_{2:3}$ do cruzamento BRS 133 x Embrapa 20**

Entre os marcadores utilizados na população  $F_{2:7}$  Bossier x Embrapa 20, oito haviam sido mapeados anteriormente na população  $F_{2:3}$  BRS 133 x Embrapa 20, estando associados significativamente às características de crescimento e nodulação (figura 2). Os marcadores Satt296, Satt232 e Satt197, que foram associados com a MPAS na população BRS 133 x Embrapa 20 (Nicolás et al., 2005), foram utilizados para verificar MPAS na

população Bossier x Embrapa 20. A associação com o Satt232 ( $P \leq 0,005$ ) foi confirmada, mas ainda não foi ancorada com outro marcador no grupo L, razão pela qual não está representada na figura 1. Para seis marcadores (Sat296, Satt509, Satt197, Satt332, Sat307 e Satt192) associados com parâmetros de nodulação (MNS, NN ou MNS/NN) na população Embrapa 20 x BRS 133 (Nicolás et al., 2005), foi confirmada a associação a QTL na população Bossier x Embrapa 20 (figura 2). Além disso, o Satt232 foi associado à MPAS nas duas populações e, como as plantas cresceram em condições de maximização de FBN, onde existe alta correlação entre a massa nodular e a biomassa das plantas (Bohrer & Hungria, 1998; Hungria & Bohrer, 2000), esse marcador também deve estar associado à FBN.

Alguns QTL encontrados em Embrapa 20 x BRS 133 (Nicolás et al., 2005), porém, não foram confirmados em Bossier x Embrapa 20, e vice-versa. Uma hipótese provável da não confirmação de alguns QTL poderia ser a de que os alelos no loco QTL estejam fixados na população (ambos parentais possuem os mesmos alelos para esse QTL) e, nesse caso, os eventos de segregação não podem ser detectados (Mian et al., 1998). É possível, também, que marcadores detectados em  $F_{2:3}$  BRS 133 x Embrapa 20 não fossem confirmados em uma população mais avançada, como a deste estudo. Avaliando a ocorrência de QTL para características relacionadas com a produção em soja, em três diferentes populações de linhagens recombinantes, Orf et al., (1999) verificaram que alguns QTL eram identificados nas três populações, outros em duas, bem como constataram a ocorrência QTL identificados em apenas uma população. Nesse contexto, a base genética também pode contribuir para a identificação de QTL. Entretanto, a ausência de um QTL não pode ser simplesmente atribuída à falta de oportunidade de estabelecimento de ligação entre o loco marcador e o loco QTL. Em muitos casos, a associação entre um marcador e o QTL pode ser uma associação falso-positiva, ou erro tipo 1 (Dudley, 1993). Os estudos sobre confirmação de QTL detectados em soja são limitados e conflitantes, sendo necessária a avaliação da

consistência dos mesmos em diferentes populações e em diferentes ambientes, para o posterior uso desses QTL nos programas de melhoramento (Fasoula et al., 2004).

Os marcadores Satt251, Satt373 (Figura 2b e 2e) que apresentaram associação significativa para MNS e MPAS, respectivamente e Satt066 (Figura 2f), associado aos parâmetros MNS e MNS/NN na população BRS 133 x Embrapa 20, ainda não foram avaliados na população deste estudo. Contudo, já se constatou polimorfismo entre os genótipos parentais, desse modo, novas análises estão sendo realizadas. Para o marcador Sat\_123 associado a MNS e MNS/NN (figura 2b), será verificada a existência de polimorfismo entre as cultivares parentais Bossier e Embrapa 20. Além disso, outros marcadores deverão ser testados quanto ao polimorfismo e analisados nesta população, para saturar as regiões já mapeadas e identificar novas associações.

Este estudo representa a etapa inicial para a identificação e confirmação de QTL associados com a FBN em cultivares brasileiras de soja. Sete marcadores previamente identificados na população  $F_{2:3}$  do cruzamento BRS 133 x Embrapa 20 foram confirmados neste trabalho, na população  $F_{2:7}$  de Bossier X Embrapa 20. Esses microssatélites representam a primeira indicação para utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento, visando incrementar a contribuição da FBN em soja.

## CONCLUSÕES

Foram identificados seis marcadores moleculares do tipo microsatélite (Sat296, Satt509, Satt197, Satt332, Sat307 e Satt192) relacionados à nodulação e um marcador (Satt232) relacionado à produção de biomassa em soja.

Os marcadores podem ser utilizados em programas de melhoramento visando o incremento na contribuição da fixação biológica do nitrogênio em soja.

## **AGRADECIMENTOS**

A Taila C.S. Vedovati, Ednéia Borges, Manoel P. da Silva, Rinaldo B. Conceição e Ligia M.O. Chueire, pelo apoio na condução do experimento na casa de vegetação e nas análises laboratoriais; aos Drs. Fernando G. Barcelos, pelas sugestões no manuscrito e Dr. Carlos A. Arias, pelo esclarecimento das dúvidas nas análises do experimento. Os reagentes utilizados foram parcialmente financiados pelo CNPq (35116/1992-3).



## REFERÊNCIAS

- AKAO, S.; KOUCHI, H. A supernodulating mutant isolated from soybean cultivar Enrei. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 38, p.183-187, 1992.
- BOHRER, T.R.J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 937-953, 1998.
- CALDWELL, B. E. Inheritance of a strain-specific ineffective nodulation in soybean. **Crop Science**, Madison. v. 6, p.427-428, 1966.
- CHUNG, J.; BABKA, H.L.; GRAEF, G.L.; STASWICK, P.E.; LEE, D.J.; CREGAN, P.B.; SHOEMAKER, K.C.; SPECHT, J.E. The seed protein, oil, and yield QTL on soybean linkage group I. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 1053-1067, 2003.
- CONAB (Companhia Nacional de Agricultura e Abatecimento). Disponível em: <[www.conab.gov.br/download/safra/SojaSerieHist.xls](http://www.conab.gov.br/download/safra/SojaSerieHist.xls)>. Acesso em: 28 jan. 2005.
- CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1464-1490, 1999.
- DEVINE, T.E. Genetic studies of soybean host cultivar interactions with *Rhizobium* strains. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v. 3, p. 19-20, 1976.
- DUDLEY, J.W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Science**, Madison, v. 33, p. 660-668, 1993.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of genes action. **Genetics**, Maryland, v. 116, p. 113-125, 1987.
- FASOULA, V.A.; HARRIS, D.K.; BOERMA, H.R. Validation and designation o quantitative trait loci for seed protein, seed oil, and seed weight from two soybean populations. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 1218-1225, 2004.
- FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University. 1977. (Special report, 80).
- GHASSEMI, F.; GRESSHOFF, P.M. The early *enod2* and the leghemoglobin (*Ib13*) genes segregate independently from other known soybean symbiotic genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 6, p. 6-13, 1998.

GREMAUD, M.G.; HARPER, J.E. Selection and initial characterization of partially nitrate tolerant nodulation mutants of soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 89, p. 169-173, 1989.

HUNGRIA, M.; BOHER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 31, p. 45-52, 2000.

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.; DIERS, B.; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. **Genetics**, Maryland, v. 126, p.735-742, 1990.

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.

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.

LEBRETON, C.; LAZIC-JANCIC, V.; STEED, A.; PEKIC, S.; QUARRIE S.A. Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 853-865, 1995.

LI, Z.L.; JAKKULA, L. HUSSEY, R.S.; TAMULONIS, J.P.; BOERMA, H.R. SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 103, p. 1167-1173, 2001.

LOUDET, O.; CHAILLOU, S.; MERIGOUT, P.; TALBOTEC, J.; DANIEL-VEDELE, F. Quantitative trait loci analysis of nitrogen use efficiency in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 345-358, 2003.

MANSUR, L.M.; LARK, K.G; KROSS, H.; OLLIVEIRA, H. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morphological, and seed traits of soybean (*Glycine max* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 86, p. 907-913, 1993.

MEKSEM, K.; NJITI, V.N.; BANZ, W.J.; IQBAL, M.J.; KASSEM, M.A.; HYTEN, D.; YUAN, J.; WINTERS, T.A.; LIGHTFOOT, D.A. Genomic regions that underlie soybean

seed isoflavone content. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Sylvania v. 1, p. 38-45, 2001.

MIAN, R.A.R.; ASHLEY, D.A.; BOERMA, H.R. An additional QTL for water use efficiency in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 38, p.390-393, 1998.

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. (corrigido e retornado ao editor).

NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GUZMÁN, R.L.; GILBERTSON, R.L.; GEPSTS, P. Toward an integrated linkage map of common bean III. Genetics factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, Maryland, v. 134, p. 341-350, 1993.

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.

ORF, J.H.; CHASE, K.; JARVIK, T.; MANSUR, L.M.; CREGAN, P.B.; ADLER, F.L.; LARK, K.G. Genetics of soybean agronomic traits: I. Comparison of three related recombinant inbred populations. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1642-1651, 1999.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. version 6, v. 2, 4<sup>th</sup> ed. Cary, NC: SAS institute Inc, 1989.

SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R.V.; MARIN, S.R.R.; CARVALHO, V.P.; KIIHL, R.A.S.; SILVA, J.F.V.; SEDIYAMA, C.S.; BARROS, E.G; MOREIRA, M.A. Identification of new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 102, p. 91-96, 2001.

SEBOLT, A.M.; SHOEMAKER, R.C.; DIERS, B.W. Analysis of a quantitative trait locus allele from wild soybean that increases seed protein concentration in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 1438-1444, 2000.

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

SOUZA, A.A.; BOSCARIOL, R.L.; MOON, D.H.; CAMARGO, L.E.A.; TSAI, S.M. Effects of *Phaseolus vulgaris* QTL in controlling host bacteria interaction under levels of nitrogen fertilization. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 155-161, 2000.

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

VEST, G.; GRANT; CALDWELL, B. E. Rj4 – A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 12, p. 692 – 694, 1972.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p.

WRICKE, G.; WEBER, W. E. Quantitative genetics. In: WRICKE, G.; WEBER, W.E., eds. **Quantitative and selection in plant breeding**. Berlin: Walter de Gruyter & Co., 1986. p.41-46, 1986.

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

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS) e relação MNS/NN nas linhagens F<sub>2:7</sub> do cruzamento Bossier x Embrapa 20.

Variável	QM	GL	F	P	R <sup>2</sup>	CV (%) <sup>45</sup>
MPAS	17,1176	156	1,98	0,0001	0,2280	25,60
NN	16.831,6510	156	1,44	0,0008	0,1768	50,12 <sup>446</sup>
MNS	210.989,8000	156	1,49	0,0002	0,1822	49,85
MNS/NN	4,1040	156	1,37	0,0034	0,1695	45,60 <sup>447</sup>

**Tabela 2.** Distribuição da ligação de marcadores SSR mostrando associações significativas com as diferenças fenotípicas para massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS) e relação MNS/NN, como resultado da análise de regressão.

Característica Quantitativa	Marcador	Grupo de Ligação <sup>(1)</sup>	Nível de significância do teste F	R <sup>2</sup> (%)	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> <sup>(2)</sup>	A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> <sup>(2)</sup>
MPAS mg.pl <sup>-1</sup>	Satt332	LG B1	0,01	3,7	11,19b	11,76a
	Satt434	LG H	0,03	3,1	11,18b	11,72a
	Satt232	LG L	0,005	5,0	11,84a	11,20b
NN nódulo.pl <sup>-1</sup>	Satt197	LG B1	0,05	2,5	207,47a	222,27b
	Satt509	LG B1	0,004	5,25	203,19b	224,93a
	Satt307	LG C2	0,0025	6,2	228,58a	205,28b
	Satt325	LG F	0,016	3,8	229,88a	209,67b
MNS mg.planta <sup>-1</sup>	Satt202	LG C2	0,022	3,3	783,00a	718,30b
	Satt307	LG C2	0,0005	8,0	802,51a	706,90b
MNS/NN	Satt296	LG D1b	0,03	3,0	3,71b	3,98a
	Satt192	LG H	0,03	3,8	3,93a	3,68b
	Satt509	LG B1	0,05	2,5	3,93a	3,69a

<sup>(1)</sup> Grupo de ligação como descrito em Cregan et al. (1999).

<sup>(2)</sup> Médias alélicas do marcador associadas aos parentais Bossier (A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>) e Embrapa 20 (A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>). Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey P≤0,05.

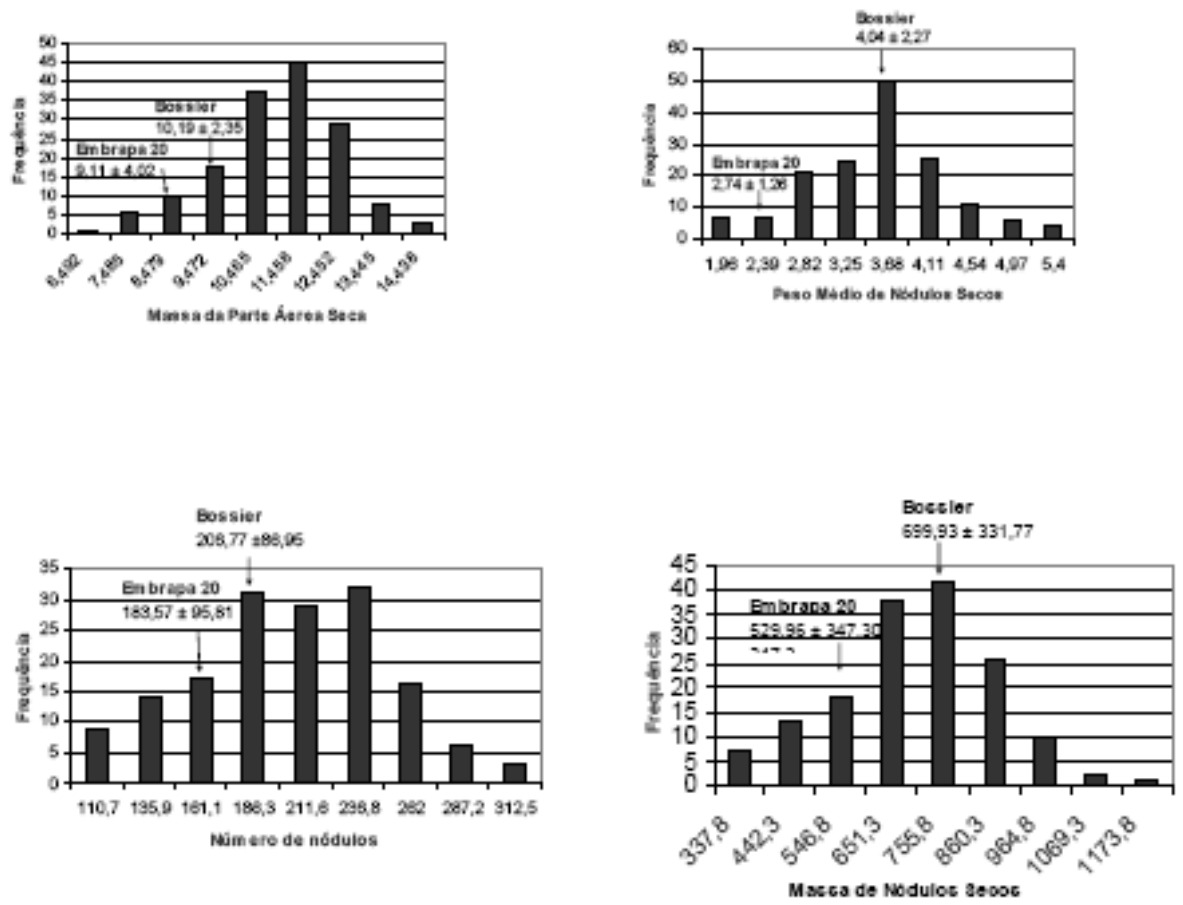


Figura 1.

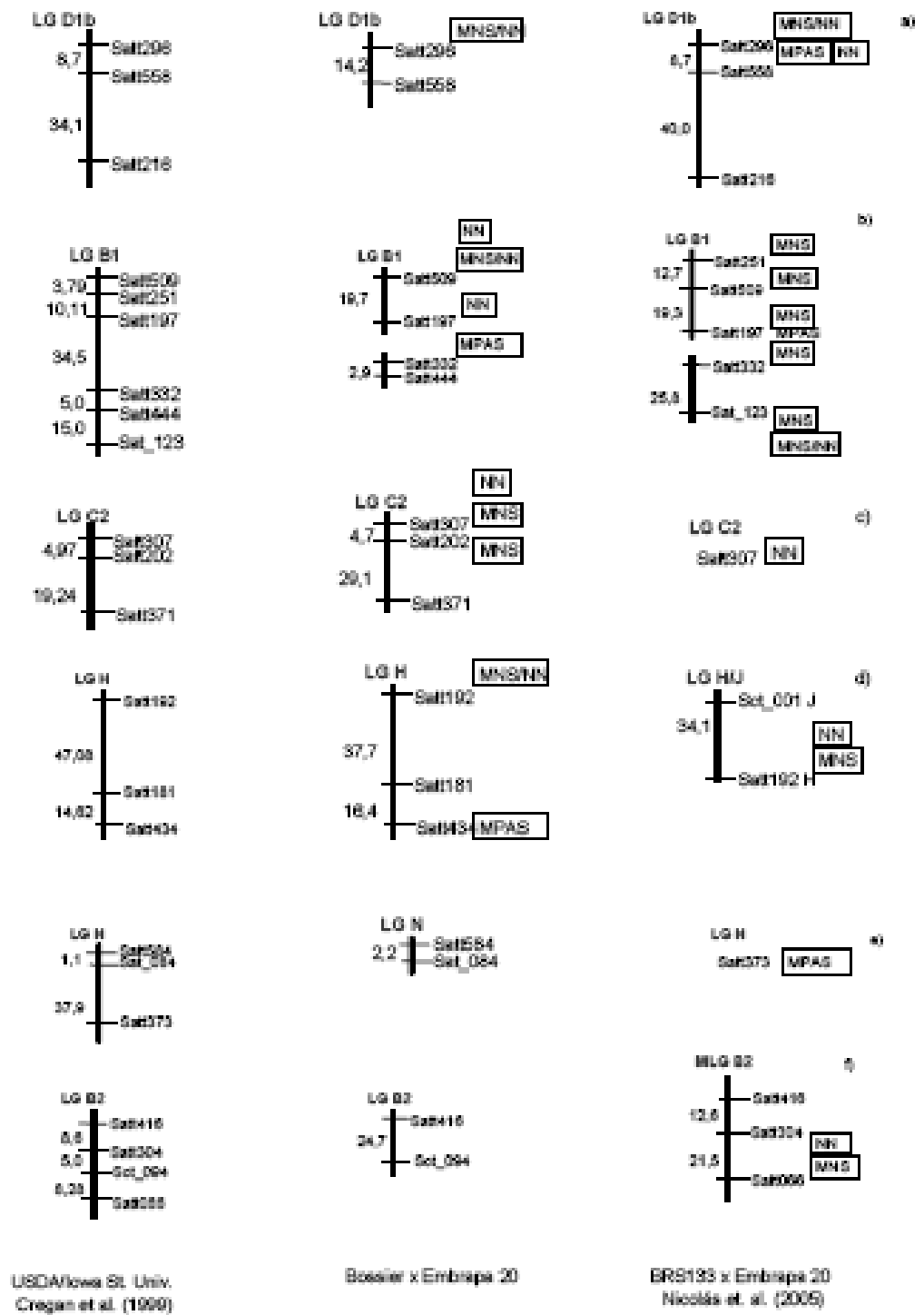


Figura 2.