



ISSN 0104-866X

Agosto, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 196

Estado atual da arte quanto à seleção e o melhoramento de genótipos para a otimização da FBN

*Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara
Maurisrael Moura da Rocha
Gustavo Ribeiro Xavier
Norma Gouvêa Rumjanek*

Embrapa Meio-Norte
Teresina, PI
2009



Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires,
Caixa Postal: 01
CEP 64006-220 Teresina, PI.
Fone: (86) 3089-9100
Fax: (86) 3089-9130
Home page: www.cpamn.embrapa.br
Email: sac@pamn.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Flávio Flavaro Blanco*,
Secretária Executiva: *Luísa Maria Resende Gonçalves*
Membros: *Paulo Sarmanho da Costa Lima, Fábio Mendonça Diniz, Cristina
Arzabe, Eugênio Celso Emérito Araújo, Danielle Maria Machado Ribeiro
Azevêdo, Carlos Antônio Ferreira de Sousa, José Almeida Pereira e Maria
Teresa do Rêgo Lopes*

Supervisor editorial: *Lígia Maria Rolim Bandeira*

Revisor de texto: *Lígia Maria Rolim Bandeira*
Normalização bibliográfica: *Orlane da Silva Maia*
Editoração eletrônica: *Jorimá Marques Ferreira*

1ª edição

1ª impressão (2009): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio-Norte

Estado atual da arte quanto à seleção e o melhoramento de genótipos
para a otimização da FBN / Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara ... [et
al.] - Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2009.
34 p. ; 21 cm. - (Documentos / Embrapa Meio-Norte, ISSN 0104-866X ;
196).

1. Leguminosa com grão. 2. Nodulação. 3. Melhoramento genético
vegetal. I. Alcantara, Rosa Maria Cardoso Mota de. II. Embrapa Meio-Norte. III.
Série.

CDD 633.3 (21. ed.)

© Embrapa, 2009



Autores

Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara

Engenheira agrônoma, M.Sc. em Agronomia,
pesquisadora da Embrapa Meio-Norte e doutoranda
do Curso de Agronomia, Ciência do Solo - UFRRJ,
Teresina, PI

rmaria@cpamn.embrapa.br

Maurisrael de Moura Rocha

Engenheiro agrônomo, D.Sc. em Genética e
Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa
Meio-Norte, Teresina, PI

mmrocha@cpamn.embrapa.br

Gustavo Ribeiro Xavier

Engenheiro agrônomo, D.Sc. em Ecologia Microbiana
Molecular, pesquisador da Embrapa Agrobiologia,
Seropédica, RJ

gustavo@cnpab.embrapa.br

Norma Gouvêa Rumjanek

Bioquímica farmacêutica, Ph.D. em Clínica
Farmacêutica, pesquisadora da Embrapa
Agrobiologia, Seropédica, RJ

norma@cnpab.embrapa.br



Apresentação

A fixação biológica do nitrogênio é um processo que contribui para o aumento da produtividade das culturas, reduzindo o custo de produção e a dependência dos sistemas de produção aos insumos externos, além da contribuição para a melhoria da qualidade ambiental. Esses benefícios podem ser consideravelmente alargados, uma vez que a quantidade de nitrogênio fixada pode ser aumentada em cerca de 300 %. Esse aumento pode ser conseguido por meio do incremento da eficiência das bactérias fixadoras de nitrogênio ou pela eficiência das próprias plantas. O primeiro caminho tem sido o mais estudado, enquanto o segundo vem sendo negligenciado, uma vez que os programas de melhoramento genético enfatizam a produtividade de grãos, podendo até promover uma seleção negativa, relativamente à capacidade de fixação biológica de nitrogênio. Porém, com as modernas técnicas de biologia molecular, abrem-se novas perspectivas para o desenvolvimento de plantas com maior capacidade de fixação biológica de nitrogênio.

Esta publicação discorre sobre as pesquisas já desenvolvidas e as perspectivas de avanço do conhecimento quanto à seleção e o melhoramento de genótipos para a otimização da fixação biológica do nitrogênio.

Hoston Tomás Santos do Nascimento
Chefe-Geral da Embrapa Meio-Norte



Sumário

Estado atual da arte quanto à seleção e o melhoramento de genótipos para a otimização da FBN	9
Introdução	9
Mecanismos que regulam o processo da FBN no macrossimbionte	11
Genes que regulam a FBN no macrossimbionte	15
Interface entre os programas de melhoramento genético vegetal e a FBN	17
Avanços no melhoramento genético em relação à FBN	25
Considerações finais	25
Referências	28



Estado atual da arte quanto à seleção e o melhoramento de genótipos para a otimização da FBN¹

*Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara
Maurisrael de Moura Rocha
Gustavo Ribeiro Xavier
Norma Gouvêa Rumjanek*

Introdução

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos mais importantes processos que ocorre na natureza. A incorporação de nitrogênio, via FBN, aos diferentes ecossistemas do planeta é bastante elevada, representando uma importante economia de energia fóssil.

Nas leguminosas a FBN é bastante variável, dependendo da espécie. No entanto, há um grande potencial para aumento da contribuição na fixação de nitrogênio entre essas espécies. Herridge e Danso (1995) consideram que o incremento dessa contribuição poderia ocorrer por meio do aumento da área de produção de leguminosas; da melhoria do manejo da cultura, que favorecesse os determinantes de produtividade; pela modificação genética de espécies que promovesse alta dependência da cultura à fixação biológica de N e alta produtividade.

¹Trabalho de revisão apresentado pela primeira autora, no exame de qualificação do Curso de Doutorado em Agronomia Ciência do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



Provorov e Tikhonovich (2003) argumentam que embora exista uma grande variação na intensidade simbiótica da fixação de N nas leguminosas, a quantidade potencial de nitrogênio fixado (determinado em condições ótimas para fixação de N) é muitas vezes maior do que as quantidades, geralmente, fixadas em condições de campo.

Em razão da variabilidade encontrada nas leguminosas quanto à eficiência do processo de FBN, tem sido enfatizada a importância do melhoramento genético da planta para otimizar o fornecimento de N via fixação biológica. Vance (1998) cita que a quantidade de N fixado pela simbiose leguminosa-rizóbio poderia ser aumentada em 300 % em virtude do melhoramento genético e do manejo das culturas.

Nos estudos da FBN muita atenção tem sido dada à seleção do microssimbionte, sendo a seleção de estirpes o principal recurso para a otimização da fixação do nitrogênio. Por outro lado, a seleção de cultivares para essa finalidade não tem sido muito utilizada.

Herridge, Turpin e Robertson (2001) citam que o incremento na FBN por meio do melhoramento genético e do manejo eficiente tem um alto benefício econômico. No entanto, nem sempre tem apresentado resultados bem-sucedidos. Muitas razões contribuem para tal, como a dificuldade em combinar características como a fixação de nitrogênio com outras características, tais como, resistência a doenças, qualidade das sementes e produtividade.

O desafio para melhorar a capacidade de fixação de N_2 das leguminosas, por meio do melhoramento, é complexo porque existem dois componentes a serem considerados: a planta hospedeira e o rizóbio. Muitos programas de seleção ignoram esse aspecto, mas a complexidade da interação evidencia que a seleção concomitante dos parceiros simbióticos deveria ser priorizada (RANALLI; CUBERO, 1997).

Mecanismos que regulam o processo da FBN no macrossimbionte

Nos estudos de FBN muita atenção tem sido dada ao microssimbionte, tendo-se informações que englobam desde análises fisiológicas até análises da expressão do genoma. O mesmo não tem ocorrido em relação ao macrossimbionte. Rumjanek et al., (2005) concluíram que isso se deve às dificuldades inerentes, decorrentes da complexidade do genoma da célula vegetal. E que, graças ao desenvolvimento da Genética Molecular Vegetal, tem-se observado, nos últimos anos, um avanço expressivo na compreensão dos mecanismos que regulam o processo de FBN na planta.

A capacidade de formar simbiose com bactérias nodulíferas não é comum a todas as espécies de leguminosas. Entre as espécies que nodulam, verifica-se ampla variação com relação ao potencial de fixação. Segundo Sanginga (1992), em condições idênticas, a *Leucaena leucocephala* e a *Gliricidia sepium* podem fixar de 200 a 300 kg de N, enquanto que a *Acácia albida* apenas 20 a 30 kg de N.

Existem relatos bastante antigos com relação à variabilidade à FBN, entre genótipos de uma mesma espécie. A variabilidade entre genótipos de soja quanto à fixação de N_2 foi observada no Brasil desde a década de 60 (DÖBEREINER; ARRUDA, 1967) e posteriormente alguns trabalhos foram desenvolvidos com esse enfoque (BOHRER, 1996; GALLI, 1987; VARGAS; PERES; SUHET, 1982).

Bohrer (1996) avaliou 152 cultivares de soja e observou que algumas cultivares mais novas apresentavam capacidade de FBN inferior à dos parentais. Indicando que os parâmetros de FBN não estavam recebendo a devida importância nos programas de melhoramento.

A variabilidade entre cultivares de feijoeiro na habilidade de fixar N_2 foi detectada desde os primeiros estudos conduzidos no Brasil



(DÖBEREINER; RUSCHEL, 1961; FRANCO; DÖBEREINER, 1967).

Estudos com esse enfoque foram conduzidos no exterior (GRAHAM; ROSAS, 1977; HARDARSON et al., 1993; RENNIE; KEMP, 1983; ROSAS; BLISS, 1986; WESTERMAN; KOLAR, 1978) e também no Brasil (HUNGRIA; NEVES, 1987; HUNGRIA; RUSCHEL, 1989; HUNGRIA; NEVES; VICTORIA, 1985; PEREIRA et al., 1984, 1991; RUSCHEL; SAITO; TULMAN NETO, 1979; VARGAS et al., 1994).

Em todos esses estudos foi demonstrado que existe grande variabilidade entre cultivares de feijoeiro na capacidade de fixar N_2 e na habilidade de translocar o N_2 fixado, refletindo-se em diferenças na nodulação, produção de massa vegetal e de grãos e no N total acumulado nos tecidos.

A princípio a importância do genótipo do hospedeiro foi atribuída, quase sempre, à sua capacidade fotossintética. Os autores especializados consideram que nos períodos de máxima FBN pode ocorrer um desvio de 10 % a 30 % dos fotossintatos totais da planta e, como as leguminosas são plantas de ciclo C3, caracterizadas pela fotorrespiração elevada e baixa taxa fotossintética líquida, a fotossíntese está intimamente relacionada à FBN.

O papel da fotossíntese ficou ainda mais evidente após os experimentos conduzidos por Hardy e Havelka (1975), nos quais a fertilização com CO_2 aumentava consideravelmente as taxas de FBN. A partir daí, inúmeros trabalhos foram conduzidos, em que a manipulação dos fotossintatos enviados para os nódulos afetava imediatamente a FBN (HUNGRIA; NEVES, 1986).

Foi constatado que as cultivares de feijoeiro de crescimento indeterminado apresentavam taxas mais elevadas de FBN do que os rasteiros (GRAHAM; ROSAS, 1977) e que, embora as quantidades totais de carboidratos no sistema radicular não diferissem entre cultivares, os que apresentavam maior atividade fixadora mantinham maior proporção de carboidratos nas formas solúveis, que seriam mais prontamente utilizadas pelos nódulos.



Outro ponto considerado foi a época de maturação, que tem muita importância, uma vez que as cultivares mais tardias, como as de crescimento indeterminado, apresentam um período maior de fornecimento de carboidratos para o funcionamento dos nódulos (GRAHAM; ROSAS, 1977).

A determinação de características que possam ser utilizadas em um programa de seleção e melhoramento de germoplasma de feijão-caupi para FBN, aliada à complexidade do genoma do macrossimbionte, são as dificuldades comumente encontradas, apesar da grande variabilidade de germoplasma disponível (RUMJANEK et al., 2005)

Alguns parâmetros diretamente relacionados com a FBN têm sido recomendados para programas de melhoramento, entre eles o peso de nódulos e o N total acumulado pela parte aérea. Esses parâmetros mostram correlações significativas com a quantidade de N fixado e permitem uma redução substancial no tempo, em custos e materiais dos programas de melhoramento genético vegetal (ANKOMAH et al., 1996).

No Brasil, estudos realizados por Stamford (1978) e Stamford e Neptune (1979) com diferentes cultivares de feijão-caupi associadas com estirpes pré-selecionadas ou estirpes nativas, mostraram uma ampla variabilidade de respostas quanto ao N total acumulado e ao peso de nódulos.

Em outro estudo com feijão-caupi, compreendendo a inoculação de dez cultivares de diferentes regiões geográficas (Brasil, Nigéria e EUA), com cinco estirpes de rizóbio isoladas, da Região Nordeste brasileira, Xavier (2000) também observou uma ampla variabilidade de resposta quanto ao número e ao peso de nódulos. Foram observadas respostas diferentes de nodulação, a exemplo da cultivar Galanjão-CE, que apresentou 90 % dos nódulos ocupados pela estirpe 5s13.



Ndiaye, Spencer e Gueye (2000), em estudo com 16 cultivares de feijão-caupi inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* coletadas no oeste da África, quantificaram a percentagem de N derivado da atmosfera (% Ndfa) e observaram diferenças significativas de N acumulado nas diferentes partes da planta. A maior % Ndfa (74,33 % na parte aérea e 60,90 % na raiz) e maior acúmulo de N fixado (960 mg N planta⁻¹ na parte aérea e 38 mg N planta⁻¹ na raiz) foi apresentada pela cultivar Ndoute. Os autores concluíram que essa cultivar poderia ser utilizada em programas de melhoramento do feijão-caupi na África, para contribuir com a geração de cultivares eficientes em FBN.

A característica mais priorizada em programas de melhoramento é o rendimento de grãos, por conta do seu valor econômico, porém, existem indicações de que em feijão-caupi a distribuição de N nas vagens é dependente da estirpe de rizóbio formadora dos nódulos, o que indica as limitações de programas que não levem em consideração os dois parceiros simbiotes (RUMJANEK et al., 2005).



Genes que regulam a FBN no macrossimbionte

Com os avanços da genética molecular, o controle genético da FBN vem sendo estudado e já há relatos da existência de 100 genes responsáveis pelos estádios cruciais de desenvolvimento dos nódulos em ervilha (*Pisum sativum* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.), feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), grão-de-bico (*Cicer arietinum*), fava (*Vicia faba* L.) e trevo-branco doce (*Melilotus alba* Desr.) (BORISOV et al., 2000; PROVOROV; BORISOV; TIKHONOVICK, 2002).

Em relação ao feijoeiro, na década de 50 já havia registros de que os genes com maior responsabilidade pela nodulação pareciam residir na planta hospedeira (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Os genes identificados na planta referem-se, principalmente, à nodulação. Nos Estados Unidos, foi conduzido um programa para identificar genes da soja que restringissem a nodulação com os sorogrupos dominantes nos solos, possibilitando resposta à inoculação com estirpes mais eficientes, mas não tão competitivas quanto às estabelecidas no solo.

Foram relatados três genes dominantes responsáveis pela restrição da nodulação da soja, Rj_2 , Rj_2 e Rj_2 e um gene recessivo rj_1rj_1 , determinando a não-nodulação com todos os sorogrupos. No campo, os genótipos que carregam o gene recessivo rj_1rj_1 formam um nódulo a cada 1000 ou 1500 plantas e em casa de vegetação formam nódulos ocasionais com algumas estirpes. Todos esses genes são distintos em sua segregação, facilitando a construção de genótipos de soja, contendo uma ou todas as combinações possíveis (HUNGRIA et al., 2000).

No Brasil, porém, não se constatou nenhuma restrição à nodulação quando 152 cultivares foram testadas para nodulação com os sorogrupos dominantes nos solos brasileiros. Embora fossem encontradas diferenças



de até quatro vezes, no número de nódulos. Entre as cultivares, a menor nodulação em condições axênicas, correspondeu ao valor de 20 nódulos por planta (BOHRER; HUNGRIA, 1998).

Na cultura do feijão-caupi, foi selecionado um mutante *cpi-* que apresentou nodulação ineficiente (PEMBERTON; SMITH; MILLER JUNIOR, 1990). Apesar de ser necessária a realização de novos estudos visando compreender a participação do gene *cpi* no processo de formação dos nódulos, existem exemplos que sugerem o envolvimento desse gene ou genes semelhantes relacionados com o baixo rendimento da nodulação (RUMJANEK et al., 2005).

Castilleja e Roskoski (1983) avaliaram, em condições de campo, 17 genótipos de feijão-caupi e verificaram uma amplitude de 0,05 a 4,30 g de N acumulado.planta⁻¹ associada a níveis de nodulação variando de 0,04 a 1,50 g de nódulo.planta⁻¹. Possivelmente, em alguns genótipos, a baixa nodulação tenha sido resultado de uma troca ineficiente de sinais moleculares ou de maior especificidade em relação ao microssimbionte, o que pode ser uma característica promissora para a introdução de inoculantes.



Interface entre os programas de melhoramento genético vegetal e a FBN

O incremento da FBN por meio do melhoramento genético da planta não é um conceito novo. Na década de 40, na Europa, foram desenvolvidos estudos de seleção e melhoramento de trevo (*Trifolium pratense*) e trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum*) para aumentar a nodulação e a fixação de nitrogênio. Nas décadas de 60 e 70, em outros estudos, com similar objetivo, foram avaliadas as culturas da fava (*Vicia faba*), soja (*Glycine max*), alfafa (*Medicago sativa*) e ervilha (*Pisum sativum*).

Durante os anos 80 e 90, mais atenção foi dada à soja e ao feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) (BOHRER, 1996; HERRIDGE; ROSE 1994; LARUE, 1978; LIE; MULDER, 1971; NUTMAN, 1984; PHILLIPS; TORREY; BURRIS, 1971; SONG et al., 1995).

Herridge e Rose (2000) citam áreas de pesquisas consideradas na década de 70 como recomendações para estruturação dos programas de melhoramento objetivando a FBN, com foco principal nas culturas da soja (*Glycine max* L.) e alfafa (*Medicago sativa*), tais como: identificação da alocação do C e N nos diversos tecidos das plantas para definir características da fixação de N_2 ; comparação de estratégias alternativas para seleção; desenvolvimento de sistemas de controle genético com indicação da especificidade e do hospedeiro; desenvolvimento de genótipos com maior utilização da fixação de N_2 , incluindo aqueles que possam excretar compostos nitrogenados e nos quais a FBN não seja inibida pelo N do solo.

Mytton (1983) argumenta que muitos programas de melhoramento da fixação de N_2 desenvolvidos nas décadas de 70 e 80, não tiveram sucesso e que um dos entraves poderia ter sido o pouco entendimento das informações genéticas básicas quanto às expressões das características desejadas.



Como estratégia para aumento da FBN por meio do melhoramento genético, alguns estudos foram desenvolvidos visando à maximização da produtividade (biomassa e produção de grãos), considerando que grande quantidade de biomassa requer mais N. Essa abordagem, no entanto, assume que a capacidade para a fixação suficiente de N_2 aumenta com a demanda maior de culturas de maior biomassa. O que tem particular aplicação para espécies de menor produção como feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), lentilha (*Lens culinaris*), feijão-da-china (*Vigna radiata*) e grão-de-bico (*Cicer arietinum*), mas têm menor importância para plantas de desenvolvimento mais vigoroso, como fava (*Vicia faba*), ervilha (*Pisum sativa*) e soja (*Glycine max*) (ATTEWELL; BLISS, 1985; HERRIDGE; BERGERSEN, 1988; JAYAWARDANE et al., 1995; JENSEN, 1986).

Outros estudos consideraram a estratégia do aumento da tolerância simbiótica do nitrato, ou seja, a habilidade da leguminosa nodular e fixar N_2 na presença de nitrato no solo. Essa estratégia pode não resultar em maior produtividade (biomassa ou grão), visto que o principal impacto é no aumento do total de N_2 fixado. Mas, benefícios residuais da leguminosa sobre a fertilidade do solo podem ocorrer (BETTS; HERIDGE, 1987; CARROL; MCNEIL; GRESSHOFF, 1985; JACOBSEN; FEENSTRA, 1984; PARK; BUTTERY, 1988).

Outra estratégia considerada foi a otimização da nodulação por meio de características específicas como massa de nódulos e duração do processo, dependendo das circunstâncias para promíscua ou seletiva nodulação (CREGAN; KEYSER, 1986; DEVINE, 1984; KUENEMAN et al., 1984). Melhorias na efetividade das estirpes com seus hospedeiros também foram estudadas (BROCKWELL; BOTTOMLEY; THIES, 1995).

Herridge, Turpin e Robertson (2001) questionam sobre a contribuição dos programas de melhoramento que utilizaram essas estratégias em busca da melhoria da FBN e argumentam que pouco foi conseguido, principalmente em razão da dificuldade em combinar a característica da fixação de N_2 com



outras características agronômicas. Esse foi o maior problema do programa de melhoramento da soja, na Austrália, que tinha como foco a tolerância simbiótica ao nitrato.

As técnicas disponíveis para a quantificação da FBN, no passado, também dificultaram a obtenção de resultados confiáveis. O que só mudou depois do surgimento da técnica do ^{15}N (HERRIDGE; ROSE, 1994).

Bohrer (1996) considera que muitos desses programas de melhoramento, visando à fixação de N_2 , possuíam focos pouco amplos e não estavam efetivamente conectados a programas maiores que geralmente dispõem de mais recursos genéticos e maior diversidade.

Na Austrália em 1980, foi iniciado um programa de melhoramento da soja para incremento da fixação de N_2 , em paralelo com o programa geral de melhoramento da soja, cujo foco era alta produtividade, qualidade de grãos e resistência a doenças. Foram disponibilizadas cultivares locais obtidas de cruzamentos com cultivares dos Estados Unidos (EUA) e genótipos de origem coreana. No início foi observado que alguns genótipos aumentavam a nodulação e a fixação de nitrogênio na presença de nitrato no solo. Em experimentos em casa de vegetação 489 genótipos foram avaliados, dos quais 32 foram identificados como tolerantes a nitrato. Os genótipos de origem coreana apresentaram alta nodulação e fixação de N_2 (HERRIDGE; ROSE, 2000).

Segundo Herridge e Rose (2000), após uma década, o referido programa de melhoramento incluiu alguns resultados positivos tais como: a introdução de um novo germoplasma com evidências de que pelo menos os genes que expressavam altos níveis de fixação de nitrogênio estavam integrados ao pool do gene local; o germoplasma original (EUA) apresentou tolerância ao nitrato e subsequentemente foi utilizado no programa geral de melhoramento da soja na Austrália; a base de germoplasma do programa local de melhoramento foi ampliada com os genes dos genótipos coreanos que apresentaram alto teor de proteína.



No Brasil, a seleção e o melhoramento da soja foram iniciados em 1930. As variedades de soja introduzidas dos EUA e as variedades recuperadas das primeiras introduções no território brasileiro fizeram parte do Programa Brasileiro de Melhoramento da Soja. A resistência às doenças, a resistência às pragas e a tolerância aos solos de baixa fertilidade, bem como a produção das plantas com inserção de vagens para colheita mecânica, foram os objetivos principais do programa. Embora a FBN não fosse considerada explicitamente como um fator para a seleção no programa de melhoramento, a maximização da FBN foi favorecida pela condução da seleção e do melhoramento em solos com baixo teor de N, nos quais as sementes foram inoculadas com estirpes eficientes e sem aplicação de fertilizante com N (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003).

Em 1960, a recém-criada Comissão Nacional da Soja já havia enfatizado a necessidade de dar prioridade a FBN como uma parte importante do programa de melhoramento. Nessa época, resultados de pesquisa mostravam que a soja inoculada podia produzir tão bem como a soja cultivada com fertilizante nitrogenado (WEBER, 1966). Assim, a decisão foi omitir fertilizantes nitrogenados no programa de melhoramento e sempre inocular as plantas com *Rhizobium japonicum* (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003).

Por ser considerada uma leguminosa com alta eficiência de FBN, poucos são os estudos que objetivam o melhoramento do genótipo da soja para essa característica (VARGAS; HUNGRIA, 1997). Existem relatos de estudos para circunstâncias específicas, como o melhoramento para a promiscuidade da nodulação com as estirpes nativas em solos da África (PULVER; KUENEMAN; RANGA-RAO, 1985), assim como para tolerância ao nitrato (CARROL; MCNEIL; GRESSHOFF, 1985).

Burias e Planchon (1990) citam que a seleção de genótipos de soja para incremento do número de nódulos, massa de nódulos e atividade da nitrogenase correlacionados com produtividade pode ser obtida até mesmo em gerações precoces.



Quanto ao feijão-comum, em razão da variabilidade encontrada entre genótipos quanto à eficiência do processo de FBN, tem sido enfatizada a importância do melhoramento genético da planta para otimizar o fornecimento de N via fixação biológica.

Vargas e Hungria (1997) citam que algumas observações como a resistência a algumas doenças e insetos evidenciam que o processo de domesticação pode ter sido restrito a poucas plantas ou a uma parcela pequena da população de feijoeiros silvestres. Mytton (1984) considerou que, durante o processo de domesticação do feijoeiro, certas características desejáveis teriam sido selecionadas, sendo acompanhadas de um processo indireto de seleção negativa em relação à capacidade de nodulação e FBN.

Uma comprovação disso seria o fato de que em um mapa de ligação genética do feijoeiro, as regiões para expressão de nodulação abundante estavam associadas às regiões onde se expressa a suscetibilidade à *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli e, conseqüentemente, a seleção para resistência à bacteriose seria negativa para a FBN (NODARI et al., 1993).

Os principais programas para seleção de genótipos do feijoeiro foram desenvolvidos no CIAT e na Universidade de Wisconsin. No CIAT, foi utilizado o método do cruzamento e seleção recorrente, comparando-se o material genético através da redução do acetileno, nodulação, produtividade e caracteres agrônômicos gerais (CIAT, 1987; VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Desse programa resultaram linhagens elite de feijão, que foram testadas em uma primeira fase para dar seqüência aos testes dos genótipos superiores utilizados na seleção de estirpes. As diversas linhagens RIZ existentes foram obtidas desse programa (GRAHAM, 1981; KIPE-NOLT; GILLER, 1993; KIPE-NOLT; VARGAS; GILLER, 1993).



Como parte do programa para seleção de genótipos do feijoeiro do CIAT, também foram obtidas linhagens BC2S3 de variedades africanas. Essas linhagens foram avaliadas quanto à nodulação inicial, número de nódulos e senescência tardia e foram obtidos resultados satisfatórios quanto aos fatores agrônômicos e à nodulação. O método de melhoramento utilizado foi o IBLM (Inbred Backcross Line Method), que utiliza cultivares adaptadas ou linhagens de melhoramento com parentais recorrentes em combinações (CIAT, 1987; HUNGRIA et al., 2000).

Nos programas desenvolvidos na Universidade de Wisconsin, com dois ciclos de seleção recorrente para incremento no número de nódulos, foi constatado que a herdabilidade era de 0,30 e, pelo IBML, cinco linhagens melhoradas foram liberadas para FBN (BOHRER, 1996).

Em testes de campo realizados no Brasil, uma dessas cinco linhagens (WBR22 - 34) fixou duas vezes mais do que a cultivar padrão brasileira, Rio Tibagi, e 20 % mais do que a Negro Argel, que em estudos anteriores havia sido identificada como cultivar de alta capacidade de fixação (HERRIDGE; DANSO, 1995).

No entanto, em outros experimentos de campo, essas linhagens não foram bem-sucedidas. Observou-se que embora as características associadas com a FBN tenham melhorado, fatores não genéticos parecem ter influenciado o resultado final (TSAI; CONCEIÇÃO; MOON, 1995).

Vargas et al. (1994) citam que muitas vezes a maior capacidade fixadora de determinados genótipos de feijão não tem sido considerada, como no caso da cultivar Carioca, que não foi empregada em nenhum programa de melhoramento para FBN no Brasil, apesar de, em diversos experimentos, destacar-se como a melhor planta hospedeira, inclusive na região dos Cerrados, onde a inoculação dessa cultivar permitiu ganhos de 489 ha⁻¹ de grãos/ha, em relação ao controle não inoculado.



O direcionamento atual aos programas de melhoramento do feijoeiro para aumento da fixação de N_2 tem priorizado o melhoramento de plantas com capacidade para nodular e fixar nitrogênio na presença de nitrato e com nodulação precoce (HERRIDGE; DANSO, 1995).

Com relação ao feijão-caupi, o International Institute of Tropical Agriculture (IITA) tem o mandato global do melhoramento e coordena 65 programas nacionais de melhoramento genético dessa leguminosa. No Brasil, desde 1991, o Programa de Pesquisa de Feijão-caupi foi desincorporado do Programa Nacional de Pesquisa de Feijão e passou para a coordenação da Embrapa Meio-Norte, em Teresina-PI (WETZEL et al., 2005).

Singh (2006) considera que a estratégia geral do IITA é o desenvolvimento de linhas de melhoramento em que seja priorizada a maturidade, o tipo da planta e o tipo de semente com combinada resistência a pragas e doenças.

Os programas de melhoramento para o feijão-caupi costumam, tradicionalmente, focar o caráter precocidade, resistência a pragas e doenças, armazenamento, produtividade e características do grão, tais como, cor do tegumento e peso (EHLERS; HALL, 1997). Esses programas praticamente não visam à melhoria da contribuição da FBN para o crescimento do vegetal e a produção de grãos.

No Programa de Melhoramento de Feijão-caupi do Brasil, os objetivos estão relacionados ao aumento da produtividade e melhoria da qualidade visual, culinária e nutricional dos grãos; aumento da adaptabilidade, estabilidade e tolerância a estresses hídricos; desenvolvimento de cultivares mais adequadas à agricultura familiar; incorporação de resistência múltipla a doenças e aumento da resistência a insetos; desenvolvimento de cultivares com grãos de cor verde persistente à secagem para enlatamento e congelamento e desenvolvimento de cultivares com características para processamento industrial (FREIRE FILHO et al., 2005).



No início, o melhoramento genético do feijão-caupi foi voltado principalmente para o aumento da produtividade, posteriormente para a resistência às doenças, principalmente as viroses e atualmente, além dessas duas características, está sendo dada grande ênfase à qualidade de grãos e à arquitetura da planta. Os melhoristas do feijão-caupi consideram que os principais desafios atuais sejam melhorar a cultura com vistas ao cultivo mecanizado e a superação dos níveis de produtividade (FREIRE FILHO et al., 2005).

Apesar do grande avanço, constata-se que até o momento, o referido programa apresenta uma lacuna com relação à FBN. Ou seja, as cultivares estão sendo selecionadas e lançadas sem que seja considerado o potencial para a fixação biológica do nitrogênio.

No Senegal, o principal programa de melhoramento do feijão-caupi tem como enfoque a maturação precoce das cultivares com altas produtividades, resistência a doenças severas (Cowpea aphidborne e Mosaic vírus), a pragas (Cowpea aphid) e a ervas daninhas (NDIAYE; SPENCER; GUEYE, 2000). Os melhoristas já constataram a necessidade de incluir nos programas de melhoramento, os genótipos com potencial para alta fixação de N₂.

Avanços no melhoramento genético em relação à FBN

Significativas variações nas características relacionadas à fixação de N_2 têm sido encontradas na maioria das leguminosas (GRAHAM; VANCE, 2000). O melhoramento genético na nodulação tem sido alcançado tanto por seleção indireta, quando as plantas desenvolvem-se em condições de limitação de N (ELIZONDO BARRON et al., 1999; PAZDERNIK; GRAHAM; ORF, 1997), quanto por seleção direta para massa de nódulos, redução de acetileno e conteúdo de ureído no xilema (BOHRER, 1996; HERRIDGE et al., 1994).

Graham e Vance (2000) citam que o melhoramento para otimizar a fixação de N_2 não deve ser feito isolado, considerando que outros problemas deverão ser resolvidos para que a FBN seja bem-sucedida. Um exemplo é o melhoramento da nodulação do feijão-comum seguido do biocontrole do apodrecimento de raízes em solos arenosos irrigados. Em contraste, seleção para características, tais como, raízes adventícias ou superficiais, muito importantes em solos ácidos e com baixo teor de P podem limitar a nodulação e a fixação (JAYAWARDANE et al., 1995; JENSEN, 1986; LYNCH; BEEBE, 1995).

Jensen e Castellanos (1994) observaram a possibilidade de alcançar diferentes alvos no melhoramento para incremento da FBN. Um exemplo foi o estudo desenvolvido por Pazdernik, Graham e Orf (1997), no qual foi verificado que a cultivar de soja Chippewa acumulava 30 g N planta⁻¹ em um solo com baixo teor de N, sendo 52 % nos grãos, enquanto que outra cultivar (Parker) acumulava 17g N planta⁻¹, mas 80 % do N concentrava-se na semente.

Vários métodos de melhoramento genético têm sido utilizados nos programas que objetivam a otimização da FBN, inclusive retrocruzamentos e seleção recorrente fenotípica. A FBN é uma característica quantitativa que pode estar relacionada a um grande número de genes, portanto a estratégia de seleção deve empregar critérios apropriados na determinação das características relacionadas à fixação de nitrogênio (RANALLI; CUBERO, 1997).



Mutschler e Bliss (1980) consideraram a seleção recorrente um método efetivo para acumulação de genes favoráveis dos parentais com alto potencial de fixação de N_2 . Um grande número de plantas selecionadas pode ser necessário para promover a recombinação de características desejáveis do hospedeiro, tais como, tolerância a nitrato, alta produtividade, alta massa nodular e número de nódulos.

Outros autores consideraram que o cruzamento interespecífico pode ser outro método apropriado para o aumento da fixação de nitrogênio em leguminosas. Um cruzamento entre *Cicer arietinum* e seu relativo silvestre *Cicer reticulatum* revelaram transgressiva segregação na F2 para melhoramento da nodulação, conteúdo de N e produtividade (JAISWAL; SINGH, 1990).

Um fator limitante à atividade de nodulação é o nitrato do solo. Com o objetivo de obter linhagens com boa nodulação na presença de nitrato, tem sido usado mutagênese com ervilha, soja e feijão-comum. Em feijoeiro foram obtidos genótipos mutantes supernodulantes, que nodulam abundantemente, mesmo na presença de nitrato. Essa característica é controlada por um único gene recessivo e está relacionada a um fator associado a parte aérea (PARK; BUTTERY, 1988).

Na mesma linha de pesquisa foram obtidos mutantes de soja, cuja nodulação e FBN não são inibidas pela presença de nitrato. Carrol, McNeil e Gresshoff (1985) selecionaram mutantes da cultivar Bragg e passaram a denominá-los de nts (nitrate tolerant symbiont). Semelhante aos do feijão-comum, os genes recessivos são controlados pela parte aérea.

Alguns progressos nos programas de melhoramento para incremento já estão consolidados, tais como: cultivares de soja que nodulam promiscuamente com rizóbios nativos, na África (DASHIELL et al. 1990); linhagens de gerações avançadas de soja que nodulam eficientemente na presença de nitrato (PEOPLES; HERRIDGE, 1990); e germoplasmas de feijão-comum com potencial para alta fixação de N_2 (BLISS, 1993).

Considerações finais

Por causa da variabilidade encontrada nas leguminosas quanto à eficiência do processo de FBN, tem sido enfatizada a importância do melhoramento genético da planta para otimizar o fornecimento de N via fixação biológica. Nos estudos da FBN, muita atenção tem sido dada à seleção do microssimbionte, sendo a seleção de estirpes o principal recurso para a otimização da fixação do nitrogênio. Por outro lado, a seleção de cultivares para essa finalidade tem sido pouco utilizada.

Diferentemente do macrossimbionte, o microssimbionte tem sido estudado por meio de análises fisiológicas e análises da expressão do genoma. Conclui-se que esse fato seja em razão das dificuldades inerentes, decorrentes da complexidade do genoma da célula vegetal. Verifica-se que em virtude do desenvolvimento da Genética Molecular Vegetal, tem sido observado, nos últimos anos, um avanço expressivo na compreensão dos mecanismos que regulam o processo de FBN na planta.

O desafio para melhorar a capacidade de fixação de N_2 das leguminosas, por meio do melhoramento, é complexo porque existem dois componentes a ser considerados: a planta hospedeira e o rizóbio. Muitos programas de seleção ignoram esse aspecto, mas a complexidade da interação evidencia que só com a seleção concomitante dos parceiros simbióticos poderá ser obtida a otimização da FBN.

Referências

ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 1-9, 2003.

ANKOMAH, A. B.; ZAPATA, F.; HARDARSON, G.; DANSO, S. K. A. Yield, nodulation, and N₂ fixation by cowpea cultivars at different phosphorus levels. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 22, n. 1-2, p. 10-15, 1996.

ATTEWELL, J.; BLISS, F. A. Host plant characteristics of common bean line selected using indirect measures of N₂ fixation. In: EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P. J.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation research progress**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 3-9. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture). Proceedings of the 6th International Symposium on Nitrogen Fixation, Corvallis, OR, Aug. 1985 .

BETTS, J. H.; HERRIDGE, D. F. Isolation of soybean lines capable of nodulation and nitrogen fixation under high levels of nitrate supply. **Crop Science**, Madison, v. 27, n. 6, p. 1156-1161, 1987.

BLISS, F. A. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, n. 1, p. 71-79, Mar. 1993.

BOHRER, T. R. J. **Avaliação de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) para a fixação biológica do nitrogênio**. 1996. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BOHRER, T. R. J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, n. 6, p. 937-952, jun. 1998.

BORISOV, A. Y.; JACOBI, L. M.; LEBSKY, V. K.; MORZHINA, E. V.; TSYGANOV, V. E.; VOROSHILOVA, V. A.; TIKHONOVICH, I. A. Pea (*Pisum sativum* L.) genetic system controlling development of nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. In: PROVOROV, N. A.; TIKHONOVICH, I. A.; VERONESI, F. (Ed.). **New approaches and techniques in breeding sustainable fodder crops and amenity grasses**. Saint Petersburg: VIR Publishers, 2000. p. 231-236.

BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J.; THIES, J. E. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n. 1-2, p. 143-180, 1995.

BURIAS, N.; PLANCHON, C. Increasing soybean productivity through selection for nitrogen fixation. **Agronomy Journal**, Madison, v. 82, n. 6, p. 1031-1034, 1990.

CARROLL, B. J.; MCNEIL, D. L.; GRESSHOFF, P. M. Isolation and properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. **Proceedings of the National Academic Sciences of United States of America**, Chicago, v. 82, n. 12, p. 4162-4166, 1985.



CASTILLEJA G., G.; ROSKOSKI, J. P. $N_2(C_2H_4)$ fixing activity in 17 varieties of field-grown cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Turrialba**, San José, v. 33, n. 1, p. 67-71, ene./mar. 1983.

CIAT. **Annual report of the bean program**. Cali, 1987. 48 p.

CREGAN, P. B.; KEYSER, H. H. Host restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 123 in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 26, n. 5, p. 911-916, 1986.

DASHIELL, K. E.; SINGH, S. R.; NAKAYAMA, O.; OGUNDIPE, H. O.; AKEM, C. M. **Soybean research at IITA**. Ibadan: IITA, 1990. (GLIP Research Monograph, 1).

DEVINE, T. E. Genetics and breeding of nitrogen fixation. In: ALEXANDER, M. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Plenum, 1984. p. 127-154.

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N. B. Interrelações entre variedades e nutrição na nodulação e simbiose da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 2, p. 475-487, 1967.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. **Fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico em feijão (*Phaseolus vulgaris*)**. I. Influência do solo e da variedade. Rio de Janeiro: IEEA, 1961. 16 p. (Comunicado Técnico, 10).

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 53, n. 1-3, p. 187-204, 1997.

ELIZONDO BARRON, J.; PASINI, R. J.; DAVIS, D. W.; STUTHMAN, D. D.; GRAHAM, P. H. Response to selection for seed yield and nitrogen (N_2) fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 62, n. 2-3, p. 119-128, 1999.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium* - feijão e influência de diferentes nutrientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 2, p. 467-474, 1967.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. dos. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. p. 28-92.

GALLI, L. V. **Avaliação de genótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* para eficiência simbiótica**. 1987. 137 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GRAHAM, P. H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 93-112, 1981.



GRAHAM, P. H.; ROSAS, J. C. Growth and development of indeterminate bush and climbig cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with Rhizobium. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 88, p. 503-508, 1977..

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 93-106, Mar. 2000.

HARDARSON, G.; BLISS, F. A.; CIGALES-RIVERO, M. R.; HENSON, R. A.; KIPE-NOLT, J. A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PEÑA-CABRIALES, J. J.; PEREIRA, P.A. A.; SANABRIA, C. A.; TSAI, S. M. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, n. 1, p. 59-70, 1993.

HARDY, R. W. F.; HAVELKA, U. D. Nitrogen fixation research: a key to world food? **Science**, Washington, v. 188, n. 4188, p. 633-643, May 1975.

HERRIDGE, D. F.; BERGERSEN, F. J. Symbiotic nitrogen fixation. In: WILSON, J. R. (Ed.). **Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems**. Wallingford: CAB, 1988. p. 46-65. Proceedings of the Symposium on Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems held in Brisbane, Australia, 11-17th May 1987.

HERRIDGE, D. F.; DANSO, S. K. A. Enhancing crop legume N₂ fixation through selection and breeding. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n. 1-2, p. 51-82, July 1995.

HERRIDGE, D. F.; ROSE, I. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2-3, p. 229-248, Mar. 2000.

HERRIDGE, D. F.; ROSE, I. A. Heritability and repeatability of enhanced N₂ fixation in early and late inbreeding generations of soybean. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 2, p. 360-367, 1994.

HERRIDGE, D. F.; RUPELA, O. P.; SERRAJ, R.; BECK, D. P. Screening techniques and improved biological nitrogen fixation in cool season food legumes. **Euphytica**, Dordrecht, v. 73, n. 1-2, p. 95-108, 1994.

HERRIDGE, D. F.; TURPIN, J. E.; ROBERTSON, M. J. Improving nitrogen fixation of crop legumes through breeding and agronomic management : analysis with simulation modelling. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 41, n. 3, p. 391-401, 2001.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. de O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGIAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11-12, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Cultivar and Rhizobium strain effect on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 103, n. 1, p. 111-121, 1987.



HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Efeito da manipulação de fotossintatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, n. 1, p. 9-24, 1986.

HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; VICTORIA, R. L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. II. Absorção e translocação do N mineral e do N₂ fixado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 202-209, set./dez. 1985.

HUNGRIA, M.; RUSCHEL, A. P. Acetylene reduction, hydrogen evolution and nodule respiration in *Phaseolus vulgaris*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 7, n. 4, p. 351-358, 1989.

JACOBSEN, E.; FEENSTRA, W. J. A new pea mutant with efficient nodulation in the presence of nitrate. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 337-344, 1984.

JAISWAL, H. K.; SINGH, R.K. Breeding for increased nitrogen fixing ability among wild and cultivated species of chickpea. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 117, n. 2, p. 415-419, 1990.

JAYAWARDANE, N. S.; BARRS, H. D.; MUIRHEAD, W. A.; BLACKWELL, J.; MURRAY, E.; KIRCHHOF, G. Lime-slotting technique to ameliorate subsoil acidity in a clay soil. II. Effects on medic root growth, water extraction and yield. **Australian Journal of Soil Science**, Collingwood, v. 33, n. 3, p. 443-459, 1995.

JENSEN, E. S. Symbiotic N₂ fixation in pea and field bean estimated by ¹⁵N fertilizer dilution in field experiments with barley as a reference crop. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 3-13, Feb. 1986.

JENSEN, E. S.; CASTELLANOS, J. Z. The role of grain legumes in nitrogen cycling of low input sustainable agro-ecosystems. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 15., 1994, Acapulco, Mexico. **Transactions...** Acapulco: International Society of Soil Science: Mexican Society of Soil Science, 1994. v. 5a, p. 32-45.

KIPE-NOLT, J. A.; GILLER, K. E. A field evaluation using the ¹⁵N isotope dilution method of lines of *Phaseolus vulgaris* L. bred for increased nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, n. 1, p. 107-114, Mar. 1993.

KIPE-NOLT, J. A.; VARGAS, H.; GILLER, K. E. Nitrogen fixation in breeding lines of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, n. 1, p. 103-106, Mar. 1993.

KUENEMAN, E. A.; ROOT, W. R.; DASHIELL, K. E.; HOHENBERG, J. Breeding soybeans for the tropics capable of nodulating effectively with indigenous *Rhizobium* spp. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 82, n. 3, p. 387-396, Oct. 1984.

LaRUE, T. A. **Selecting and breeding legumes for enhanced nitrogen fixation**. Ithaca: Boyce Thompson Institute, 1978. 23 p. Recommendations for Research and Proceedings of a Workshop.



LIE, T. A.; MULDER, E. G. (Ed.) Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. **Plant and Soil**, Dordrecht, Spec. vol., 590 p., 1971.

LYNCH, J. P.; BEEBE, S. E. Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 6, p. 1165-1171, 1995.

MUTSCHLER, M. A.; BLISS, F. A. Genic male sterility in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 105, n. 2, p. 202-205, Mar. 1980.

MYTTON, L. R. Developing a breeding strategy to exploit quantitative variation in symbiotic nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 82, n. 3, p. 329-335, 1984.

MYTTON, L. R. Host plant selection and breeding for improved symbiotic efficiency. In: JONES, D. G.; DAVIES, D. R. (Ed.). **Temperate legumes: physiology genetics and nodulation**. Boston : Pitman Advanced Pub. Program, 1983. p. 373-393.

NDIAYE, M. A. F.; SPENCER, M. M.; GUEYE, M. Genetic variability in dinitrogen fixation between cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] cultivars determined using the nitrogen-15 isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 32, n. 4, p. 318-320, 2000.

NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R. L.; GEPTS, P. Toward an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, Maryland, v. 134, n. 1, p. 341-350, May 1993.

NUTMAN, P. S. Improving nitrogen fixation in legumes by plant breeding: the relevance of host selection experiments in red clover (*Trifolium pratense* L.) and subterranean clover (*T. subterraneum* L.). **Plant Soil**, Dordrecht, v. 82, n. 3, p. 285-301, 1984.

PARK, S. J.; BUTTERY, B. R. Nodulation mutants of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induced by ethyl-methane sulphonate. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 68, n. 1, p. 199-202, Jan. 1988.

PAZDERNIK, D. L.; GRAHAM, P. H.; ORF, J. H. Variation in the pattern of nitrogen accumulation and distribution in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 5, p. 1482-1486, Sept./Oct. 1997.

PEMBERTON, I. J.; SMITH, G. R.; MILLER JUNIOR, J. C. Inheritance of ineffective nodulation in cowpea. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 3, p. 568-571, May/June 1990.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F. Nitrogen fixation by legumes in tropical and subtropical agriculture. **Advances in Agronomy**, New York, v. 44, p. 155-223, 1990.

PEREIRA, J. C.; VIDOR, C.; LOVATO, P. E.; PENTEADO, A. de F. Simbiose entre feijão e estirpes de *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Phaseoli*, sensíveis e resistentes a antibióticos e fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 7, p. 1097-1105, jul. 1991.



PEREIRA, P. A. A.; ARAUJO, R. S.; ROCHA, R. E. M. da; STEINMETZ, S.
Capacidade de genótipos de feijoeiro de fixar N₂ atmosférico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 19, n. 7, p. 811-815, jul. 1984.

PHILLIPS, D. A.; TORREY, J. G.; BURRIS, R. H. Extending symbiotic nitrogen fixation to increase man's food supply. **Science**, Washington, DC, v. 174, n. 4005, p. 169-170, Oct. 1971.

PROVOROV, N. A.; BORISOV, A. Y.; TIKHONOVICH, I. A. Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 214, n. 2, p. 215-232, 2002.

PROVOROV, N. A.; TIKHONOVICH, I. A. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 50, n. 1, p. 89-99, Feb. 2003.

PULVER, E. L.; KUENEMAN, E. A.; RANGA-RAO, V. Identification of promiscuous nodulating soybean efficient in N₂ fixation. **Crop Science**, Madison, v. 25, n. 4, p. 660-663, 1985.

RANALLI, P.; CUBERO, J. I. Bases for genetic improvement of grain legumes. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 53, n. 1-3, p. 69-82, 1997.

RENNIE, R. J.; KEMP, G. A. N₂-fixation in field beans quantified by ¹⁵N isotope dilution. II. Effect of cultivars of beans. **Agronomy Journal**, Madison, v. 75, n. 4, p. 645-649, 1983.

ROSAS, J. C.; BLISS, F. A. Host plant traits associated with estimates of nodulation and nitrogen fixation in common bean. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 2, p. 287-289, 1986.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. p. 281-335.

RUSCHEL, A. P.; SAITO, S. M.; TULMAN NETO, A. Eficiência da inoculação de *Rhizobium* em *Phaseolus vulgaris* L. I. Efeito de fontes de nitrogênio e cultivares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 3, n. 1, p. 13-17, 1979.

SANGINGA, N. Nitrogen fixation by trees and its contribution to the nitrogen status of soils or associated. In: WOLF, J. N. (Ed.). **Interactions between plants and microorganisms**. Stockholm: Fondation Internationale pour la Science, 1992. p. 14-32.

SINGH, B. B. Cowpea breeding at IITA: highlights of advances and impacts In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 1.; REUNIÃO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 6., 2006, Teresina. **Tecnologias para o agronegócio: anais**. Teresina: Embrapa Meio-

Norte, 2006. 1 CD-ROM. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 121).

SONG, L.; CARROLL, B. J.; GRESSHOFF, P. M.; HERRIDGE, D. F. Field assessment of supernodulating genotypes of soybean for yield, N₂ fixation and benefit to subsequent crops. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 4-5, p. 563-569, 1995.

STAMFORD, N. P. **Efeito de estirpes de *Rhizobium* sp., do nitrogênio, fósforo e enxofre, na avaliação da fixação do N₂, crescimento e absorção de nutrientes em cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** 1978. 151 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

STAMFORD, N. P.; NEPTUNE, A. M. L. Especificidade hospedeira e competição entre estirpes de *Rhizobium* em inoculação cruzada com quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Caderno Ômega**, Recife, v. 3, n. 1/2, p. 25-34, 1979.

TSAI, S. M.; CONCEIÇÃO, A. S.; MOON, D. H. Estratégias para o melhoramento da leguminosa hospedeira para fixação biológica do N₂. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. de S. (Ed.). **Microbiologia do solo: desafio para o século XXI**. Londrina : IAPAR: EMBRAPA-CNPSO, 1995. p. 7-11. Anais do III Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo e IV Reunião de Laboratório para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, Londrina, PR, 6 - 10 de junho de 1994.

VANCE, C. P. Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. In: SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. (Ed.). **The rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. p. 509-530.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. 524 p.

VARGAS, M. A. T.; PERES, J. R. R.; SUHET, A. R. Adução nitrogenada, inoculação e épocas de calagem para a soja em um solo sob cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 17, n. 8, p. 1127-1132, 1982.

VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; MENDES, I. de C.; PERES, J. R. R. **Fixação biológica de nitrogênio em solos de cerrados**. [Planaltina] : EMBRAPA-CPAC; [Brasília, DF] : EMBRAPA-SPI, 1994. 83 p.

WEBER, C. R. Nodulating and nonnodulating soybean isolines: I. Agronomic and chemical attributes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 58, n. 1, p. 43-46, 1966.

WESTERMANN, D. T.; KOLAR, J. J. Symbiotic N₂ (C₂H₂) fixation by bean. **Crop Science**, Madison, v. 18, n. 6, p. 986-990, 1978.

WETZEL, M. M. V. S.; FREIRE, M. S.; FAIAD, M. G. R.; FREIRE, A. de B. Recursos genéticos: coleção ativa e de base. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 157-190.

XAVIER, G. R. **Estudo da ocupação nodular de rizóbio em genótipos de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) agrupados pela técnica de RAPD**. 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.