

**Documentos**

**ISSN 1517-8498**

**Dezembro/2000**

**Número, 126**



**A VARIABILIDADE GENÉTICA DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas.**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Agrobiologia**

*Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

***República Federativa do Brasil***

***Presidente***

*Fernando Henrique Cardoso*

*Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

***Ministro***

*Marcus Vinicius Pratini de Moraes*

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa*

***Diretor Presidente***

*Alberto Duque Portugal*

***Diretores***

*Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha*

*Dante Daniel Giacomelli Scolari*

*José Roberto Rodrigues Peres*

***Chefias da Agrobiologia***

*Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves*

*Chefe Adj. De Pesq e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto*

*Chefe Adjunto Administrativo: Vanderlei Pinto*

*DOCUMENTO Nº 126*

*ISSN 1517-8498*

*Dezembro 2000*

**A VARIABILIDADE GENÉTICA DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*  
L): aplicações nos estudos das interações simbióticas e  
patogênicas.**

Rosângela Stralotto  
Marcelo Grandi Teixeira

*Seropédica – RJ*

*2000*

*Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à*

**Embrapa Agrobiologia**

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

e-mail: [sac@cpnpab.embrapa.br](mailto:sac@cpnpab.embrapa.br)

**Expediente:**

Revisor e/ou ad hoc: *Avílio Antonio Franco*

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: *Dorimar dos Santos Felix  
e/ou Sérgio Alexandre Lima*

Comitê de Publicações: *Sebastião Manhães Souto (Presidente)*

*Johanna Döbereiner*

*José Ivo Baldani*

*Norma Gouvêa Rumjanek*

*José Antonio Ramos Pereira*

*Paulo Augusto da Eira*

*Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)*

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G. **A Variabilidade Genética do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.L): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 59p. (Embrapa-Agrobiologia. Documentos, 126).

ISSN 1517-8498

1. Feijão. 2. Genética. 3. *Phaseolus vulgaris*. I. Teixeira, M.G., colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 641.356.5

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	4
2. A VARIABILIDADE GENÉTICA DA HOSPEDEIRA .....	5
3. COMO ESTA VARIABILIDADE PODE SER MANIPULADA?.....	12
4. A SIMBIOSE COM O RIZÓBIO .....	16
5. MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEJJOEIRO VISANDO A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO .....	25
6. AS INTERAÇÕES PATOGÊNICAS .....	31
7. ASPECTOS COMUNS ENTRE ESTAS INTERAÇÕES E SUA UTILIZAÇÃO NO MELHORAMENTO DA PLANTA .....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: .....	41

# **A VARIABILIDADE GENÉTICA DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas.**

Rosângela Stralio<sup>1</sup>

Marcelo Grandi Teixeira<sup>1</sup>

## **1. Introdução**

O feijoeiro se constitui numa importante cultura de subsistência e principal fonte de proteínas na dieta humana de populações pobres, especialmente na América Latina e alguns países africanos (CIAT, 1990). O feijão possui de 20 a 25% de proteínas ricas em aminoácidos como a lisina e treonina, exercendo assim efeito complementar na dieta, uma vez que estes são deficientes nos cereais (Evans & Bandemer, 1967). No Brasil, segundo maior produtor mundial, é cultivado em vastas áreas embora com níveis baixos de produtividade média, cerca de 732 kg/ha (IBGE, 1994), uma vez que grande parte da produção está ligada a pequenas e médias propriedades, geralmente utilizando baixo nível tecnológico. Grandes áreas irrigadas com grande utilização de insumos destacam-se nos Cerrados (Goiás e Minas Gerais) e nos Estados da Bahia (região de Barreiras, Santa Maria e Bom Jesus da Lapa) e Espírito Santo (Yokoyama et al., 1996). Estas regiões apresentam produtividades médias bem mais elevadas, 1.225 kg/ha, nos chamados plantios da terceira safra ou de “inverno”, que respondem por 11% da produção nacional total, segundo dados compilados por Yokoyama et al. (1996). A produção proveniente desta safra funciona como um importante regulador de preços de mercado, em períodos que anteriormente apresentavam baixo estoque do produto forçando a alta de preços.

Nos países onde é cultivado, o feijoeiro é parte integrante do sistema agrícola de subsistência ocupando uma grande variedade de tipos de solo.

---

<sup>1</sup> Pesquisadores – Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970 Seropédica, RJ

Enquanto alguns agricultores escolhem suas melhores áreas ainda dispendo de matéria orgânica em níveis razoáveis para o sustento da cultura, dados levantados pelo CIAT (1990) mostram que 40% das áreas plantadas com esta cultura na América Latina e 60% na África, são deficientes em nitrogênio. Considerando-se o custo dos fertilizantes nitrogenados e o seu impacto sobre o meio ambiente, estudos visando a utilização da inoculação com o rizóbio se constituem numa alternativa para o fornecimento do nitrogênio necessário à cultura, perfeitamente adequado ao sistema produtivo dominante destes países. Produtividades em torno de 1.500 a 2000kg/ha são possíveis de serem atingidas apenas com a inoculação com o rizóbio aliado à correção do pH e alumínio do solo. Este nível de produtividade encontra-se ainda bem abaixo do potencial produtivo desta leguminosa, mas acima da produtividade normalmente atingida pelos pequenos produtores. Novas linhas de pesquisa têm resultado num melhor conhecimento desta simbiose e novas abordagens do problema têm buscado melhorar esta interação visando aumentar a produtividade da cultura sob condições simbióticas e sua adequação ao clima tropical.

Neste trabalho serão apresentados inicialmente os principais avanços no conhecimento do macrosimbionte, relativos à sua diversidade, e como esta tem sido explorada nos programas de melhoramento do feijoeiro a nível mundial. A seguir, serão discutidos aspectos relativos à interação com o microsimbionte tais como os fatores da planta e da bactéria que regulam a simbiose a nível molecular e suas correlações com os principais estudos disponíveis sobre as interações patogênicas, e como estes estudos podem se complementar em programas de melhoramento genético visando a otimização da fixação biológica do nitrogênio no feijoeiro.

## **2. A variabilidade genética da hospedeira**

Há um consenso entre os estudiosos de que o feijoeiro é originário das Américas. Dentre as 40 espécies americanas de *Phaseolus* descritas, apenas *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. polyanthus*, *P. acutifolius* e *P. lunatus* foram domesticadas pelos povos pré-colombianos. Em termos de importância

econômica, o feijoeiro comum, *P. vulgaris* ( $2n=2x=22$ ) responde por 95% dos feijoeiros cultivados no mundo (Mariot, 1989), ocupando uma área aproximada de 12 milhões de hectares (Singh, 1989). Apesar disto, é uma planta geneticamente pouco estudada quando comparada à plantas como o milho, ervilha ou tomate (Nodari et al., 1992).

Dados morfológicos, arqueológicos e moleculares como tipo de proteína da semente – a faseolina - e aloenzimas sugerem que o feijoeiro cultivado evoluiu do seu parente mais próximo, o feijoeiro selvagem (Brücher, 1988). As primeiras formas silvestres de feijão foram encontradas na América do Sul por Burkart (1941) e depois na América Central por Miranda Colín (1967) e Gentry (1969). Achados arqueológicos indicam que 6.000 a.C., *P. vulgaris* já se constituía numa espécie domesticada entre os nativos do Peru, o que sugere ter sido a espécie diferenciada de formas nativas, através de seleção para o cultivo (Kaplan et al., 1973). Estudos posteriores mostraram que o feijoeiro selvagem encontra-se distribuído desde o norte do México até o noroeste da Argentina (vários autores citados por Singh et al., 1991). Há uma grande diversidade genética entre os tipos selvagens e as variedades crioulas (“landraces”) presentes entre estes dois extremos do continente americano, tanto a nível morfológico (Koenig & Gepts, 1989; Koenig et al., 1990) quanto molecular (Debouck and Tohme, 1989; Delgado Salinas et al., 1988 e Gepts and Debouck, 1991). Surgiu daí o questionamento sobre o local de domesticação do feijoeiro, chegando-se a conclusão de que a cultura teve múltiplos centros de domesticação (Miranda Colín, 1967).

Estudos de análise eletroforética das proteínas de sementes levou a identificação de diversos tipos de faseolina, que na verdade são diferentes formas da proteína apresentando migração diferenciada no gel. A faseolina é a principal proteína de reserva presente tanto nas formas silvestres como cultivadas de feijoeiro, sendo uma molécula complexa e que apresenta alta herdabilidade, o que torna altamente improvável o aparecimento freqüente de variantes durante a evolução (Gepts, 1988, citado por Toro et al., 1990). Uma vez que o modo de dispersão do feijoeiro é baseado principalmente na deiscência das vagens e não na dispersão humana ou animal, a faseolina torna-se um bom marcador geográfico. Baseado nestes

dados foi possível o estudo da origem, domesticação, evolução e dispersão do feijoeiro (Gepts et al., 1986). As hipóteses iniciais levantadas indicavam que haveria três áreas de domesticação do feijoeiro comum: uma na América Central, que levou ao desenvolvimento de cultivares de sementes pequenas (< 25g/100 sementes) com o tipo de faseolina 'S', e duas na América do Sul, das quais uma no Sul dos Andes que originou as cultivares de sementes grandes (>40g/100 sementes) possuindo padrões de faseolina 'T', 'C', 'H' e 'A', e outra no Norte dos Andes, em se desenvolveram as cultivares de sementes pequenas com a faseolina 'B' (Gepts & Bliss, 1986). Esta última foi posteriormente considerada como de menor importância, sendo provavelmente uma área de encontro dos germoplasmas de origem andina e meso-americana, uma vez que as populações selvagens destes locais (Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colômbia, Equador e Norte do Peru) possuem características intermediárias (Koenig & Gepts, 1989).

O processo de domesticação de uma planta resulta na seleção de características importantes para a sobrevivência da população nas condições em que está sendo trabalhada. Isto resulta no chamado "efeito de afunilamento" em termos de diversidade genética, ou seja, a partir de um "background" genético bastante rico, alguns grupos de genes de interesse vão sendo mantidos na população e outros eliminados. Daí a importância dos estudos envolvendo os feijoeiros selvagens, visando recuperar genes que são importantes nas condições atuais de cultivo.

De acordo com Singh et al. (1991a), as modificações mais aparentes que ocorreram no processo de domesticação do feijoeiro incluem, além da mudança no hábito de crescimento, aparecimento de características de gigantismo das folhas, vagens e sementes; supressão da deiscência explosiva das sementes; perda da dormência das sementes; aparecimento de uma grande variedade de tamanhos, formas e cores de semente e seleção para insensibilidade ao fotoperíodo. A domesticação múltipla a partir de populações ancestrais divergentes de *P. vulgaris*, a natureza de autofecundação da espécie, e a separação ecológica e geográfica ao longo de milênios, permitiu o aparecimento de associações entre as múltiplas características genéticas, levando à evolução

de grupos distintos de populações relacionadas do feijoeiro comum cultivado (Singh et al., 1991b). O “background” genético de diferenças entre os ancestrais selvagens e seus derivados cultivados é estreito e consiste em cerca de apenas 15 genes (Gepts and Debouck, citados por Toro et al., 1990).

Com base no comportamento e número de nós da haste principal, número e comprimento dos ramos laterais, entre outras características, os feijoeiros podem ser classificados como pertencentes a 4 hábitos de crescimento distintos: I, II, III e IV. Esta característica dá especificidade de adaptação aos diferentes tipos de cultivo do feijoeiro. Os de tipo I são arbustivos, de crescimento determinado, cujas gemas terminais e laterais dão origem a inflorescências, tem ciclo curto e maturação uniforme. Os feijoeiros de tipo II, III e IV são de crescimento indeterminado, cuja gema terminal é vegetativa, sendo que os de tipo II são arbustivos, possuem ramos laterais curtos e maturação das vagens relativamente uniforme, mais adaptados à colheita mecânica. Os de tipo III tem arquitetura do tipo prostrado ou semiprostradas a trepadoras, com ramos laterais numerosos e bem desenvolvidos. Não possuem maturação uniforme e não se adaptam à colheita mecânica. Por último, os feijoeiros do tipo IV apresentam crescimento indeterminado sendo trepadores ou prostrados, com poucos ramos laterais, adaptados aos cultivos consorciados, possuindo o ciclo longo e maturação das vagens não uniforme. Devido ao seu longo ciclo, estes feijoeiros trepadores são cultivados em regiões mais úmidas e são mais trabalhosos para o cultivo. Acredita-se que a domesticação tenha ocorrido a partir dos trepadores para os arbustivos e dos feijoeiros de sementes pequenas na direção das de sementes maiores (Evans, 1973, 1976 & Gentry, 1969).

Singh (1989) fez um estudo a partir de 18.300 acessos de germoplasma de *P. vulgaris* pertencentes ao banco de germoplasma do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Estas plantas foram estudadas quanto às variações em características morfológicas, ciclo, tipo de vagem e semente. A partir destes dados Singh estabeleceu padrões de distribuição destas características que levaram à descrição de 12 conjuntos (“pools”) gênicos presentes nos germoplasmas de origem andina e meso-americana. Estas características

intrínsecas de cada cultivar são em grande parte responsáveis pela adaptação da planta às diferentes condições de solo e clima, ainda muito pouco exploradas nos estudos de distribuição de outros genes ligados à interação com microrganismos.

Os doze conjuntos gênicos definidos por Singh (1989), foram agrupados em seis raças, onde cada raça constitui-se em um ou mais conjuntos gênicos, dentro dos genótipos de origem andina ou meso-americana (Singh et al., 1991b). Os membros de cada conjunto gênico possuem certas características morfológicas, agrônômicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares distintas, diferindo dos outros grupos nas frequências alélicas dos genes controlando tais características. Todas estas características foram avaliadas através de análise estatística multivariada (Singh et al., 1991a) permitindo os agrupamentos descritos a seguir. Os genótipos de origem meso-americana encontraram-se distribuídos dentro dos conjuntos gênicos de 1 a 6, os quais foram então agrupados em 3 raças distintas: Mesoamérica (conjuntos gênicos 1, 2, 3, e 4); Durango (conjunto gênico 5) e Jalisco (conjunto gênico 6). Os de origem andina distribuíram-se entre os conjuntos gênicos 7 a 12, que foram agrupados dentro das raças Nova Granada (conjuntos gênicos 7, 8 e 9), Chile (conjunto gênico 10) e Peru (conjuntos gênicos 11 e 12). Franco (1998) ressalta que os conjuntos gênicos mais trabalhados pelos melhoristas são: 1, 2 e 3 da raça Mesoamérica, que ocupam uma área cultivada superior a 6 milhões de hectares na América Latina (Singh et al., 1992); o conjunto 5 da raça Durango e o 7, da raça Nova Granada.

As principais conclusões de Singh (1989) foram As de que todos os 4 tipos de hábitos de crescimento estão representados nos genótipos de origem andina ou meso-americana, embora em proporções variáveis; em ambas regiões há uma grande variação no tamanho da semente, mas as cultivares andinas são, em média, maiores; e que para os dois centros de domesticação pode se estabelecer um paralelo entre o clima e o hábito de crescimento. Em ambos locais, os feijoeiros arbustivos são mais comuns nas altitudes mais baixas e mais quentes enquanto os tipos prostrados ou semiprostrados são mais comuns nas áreas semi-áridas ou mais secas das altitudes intermediárias ou a maiores latitudes, sendo que os de tipo trepador são comuns nas áreas úmidas e frias das altitudes

maiores. Quanto ao tamanho da semente, tanto na América do Sul como Central, as menores predominam nos climas mais quentes e o tamanho da semente aumenta com a altitude. O autor também encontrou diferenças marcantes em outras características como tamanho da folha, ramificações, tamanho dos entrenós e características das vagens, diferenças estas que foram associadas à adaptação do germoplasma às condições agroecológicas específicas.

As principais características e alguns genes de interesse estudados presentes em cada uma destas raças foram compilados por Singh et al. (1991a) e vale a pena ressaltá-los de forma resumida:

Raças Meso-americanas:

A raça Mesoamérica, tem como características principais as sementes pequenas e tipo de faseolina S, Sb ou B, distribuindo-se nas terras baixas da América Latina, sendo pertencentes a esta raça, cultivares como Mulatinho, Rio Tibagi, Carioca, Puebla 152, Rosinha, Negro Argel, Porrillo Sintético, entre outras. Nesta raça podem ser encontrados genes responsáveis por insensibilidade ao fotoperíodo, resistência ao mosaico comum do feijoeiro, tolerância à mancha angular, ao mosaico dourado do feijoeiro, às altas temperaturas, ao estresse hídrico e baixa fertilidade do solo.

Cultivares pertencentes à raça Durango são predominantemente do tipo indeterminado, prostradas de hábito de crescimento do tipo III, com sementes médias e faseolina do tipo S, ou Sb. A raça encontra-se distribuída nas zonas semi-áridas do centro e altas do norte do México e sudoeste dos Estados Unidos e é fonte de genes para maturidade precoce, tolerância à seca, alto índice de colheita, tolerância a algumas viroses e à antracnose.

As cultivares da raça Jalisco podem atingir 3 metros em seu habitat natural, sendo obviamente de hábito indeterminado tipo IV, sementes médias, e típicas de regiões úmidas do México central e Guatemala. Os genes desejáveis presentes nesta espécie são alta produtividade, resistência à antracnose, tolerância à mancha angular e baixa fertilidade do solo.

Raça Andinas ou Sul Americanas:

O germoplasma pertencente à raça Nova Granada é principalmente de hábito de crescimento I, II e III, com sementes de médias a grandes, com tipo de faseolina T, sendo a cultivar Jalo um exemplo. Esta raça encontra-se distribuída principalmente a altitudes intermediárias do norte dos Andes e nela pode ser encontrada insensibilidade ao fotoperíodo, maturidade precoce, resistência ao vírus do mosaico comum do feijoeiro, crestamento bacteriano comum, e à mancha angular.

Os feijoeiros da raça Chile são predominantemente de hábito de crescimento III, indeterminado, bastante semelhantes à raça Durango, exceto pela forma redonda ou oval das sementes da raça Chile e à sua frutificação mais esparsa. Possuem faseolina do tipo C e H. Esta raça é distribuída nas regiões relativamente mais secas das altitudes menores do Sul dos Andes.

A característica mais marcante da raça Peru é o hábito de crescimento determinado ou indeterminado do tipo IV, sementes grandes, possuindo faseolina do tipo C, H e T. Este grupo é altamente sensível ao fotoperíodo e é adaptado às temperaturas moderadamente úmidas e frias, freqüentemente requerendo 250 dias para maturação. A sua distribuição vai desde as regiões elevadas do Norte da Colômbia até a Argentina.

Há um certo paralelismo entre as raças pertencentes aos dois centros de domesticação, por exemplo, as raças Durango e Chile, e Jalisco e Peru possuem hábitos de crescimento e adaptação às condições agroecológicas semelhantes, embora as outras características estudadas como os marcadores moleculares e características ancestrais indiquem uma origem evolucionária distinta para cada uma das raças destes pares. Uma questão interessante foi levantada por Singh et al. (1991a): uma vez que houve uma evolução aparentemente independente de um fenótipo similar (hábito de crescimento, tamanho da semente), adaptado às condições ambientais semelhantes, provavelmente este constitui-se no fenótipo ideal para a melhor produtividade nestas condições, embora a confirmação desta hipótese necessite de maiores investigações.

O surgimento de técnicas moleculares para a análise genômica como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Análise de polimorfismo de

fragmentos de restrição) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – segmentos de DNA amplificados arbitrariamente) permitiu a confirmação das hipóteses acima levantadas sobre a origem e diversificação do feijoeiro (Khairallah, 1992; Becerra Velasques & Gepts, 1994; Vasconcelos et al., 1996). A divisão do germoplasma de feijoeiro em dois grupos principais distintos correspondendo aos dois centros de origem, foi também confirmada por Belele (1997) através de análises bioquímicas e RAPD em 36 cultivares, incluindo representantes de cada um dos 12 conjuntos gênicos avaliados por Singh (1989). Estas análises, baseadas em caracteres genotípicos, não permitiram confirmar a formação dos seis subgrupos descritos por Singh et al. (1991a). O uso de marcadores moleculares baseados no genoma citoplasmático, como cpDNA - DNA do cloroplasto (Llaca et al., 1994) e mt DNA -DNA de mitocôndrias (Khairallah et al., 1992) tem sido empregados nos estudos evolucionários em feijoeiro. No entanto, atualmente os estudos de diversidade, apesar de enfatizarem o uso de características genotípicas, não podem prescindir da integração destas com as características fenotípicas, pois estas representam o “pool” gênico que se expressa sob determinada pressão seletiva.

Os estudos sobre a origem do feijoeiro fornecem dados importantes sobre a diversidade desta espécie e fornecem alternativas para a baixa variabilidade presente nos feijoeiros cultivados, permitindo a sistematização dos trabalhos de melhoramento das características ligadas às interações microbianas benéficas, como as simbioses, e malélicas, como as patogênicas.

### **3. Como esta variabilidade pode ser manipulada?**

Os trabalhos de coleta e estudos de abrangência geográfica dos feijoeiros selvagens levaram a conclusão de que a capacidade adaptativa da espécie é bastante grande, devido à grande diversidade agroecológica em que são encontrados até os dias atuais. Nestes diferentes ambientes, durante décadas de pressão seletiva diversa, houve uma coevolução, em cada ambiente particular, com as diferentes pragas, doenças e outros fatores bióticos como o rizóbio e micorrizas, e abióticos como tipo e fertilidade do solo, temperatura etc (Toro et al.,

1990). A coevolução e a longa persistência torna os genótipos selvagens excelentes candidatos para a busca de características como a fonte de resistência a pragas e doenças e melhor adaptação simbiótica uma vez que se conheça também as raças ou estirpes específicas dos patógenos ou simbiontes. Esta mesma inferência pode ser feita a respeito dos fatores abióticos que limitam a produção das cultivares atuais do feijoeiro. Há grande possibilidade de se encontrar tolerância aos estresses de origem ambiental, uma vez que estes materiais tem estado constantemente e por milhares de anos sobre pressão seletiva. Há um conceito geral, errôneo, de que o feijoeiro tem origem em solos férteis dos altiplanos mexicanos, de clima ameno, por isto sendo pouco adaptados às condições tropicais. Os estudos feitos com os feijoeiros selvagens, conforme demonstrado pelas características das diferentes raças relacionadas acima e sua abrangência geográfica e edafoclimática, demonstram que isto não é totalmente verdadeiro, e que há bastante espaço para o melhoramento do feijoeiro, desde que se busque as fontes de tolerância mais acima na escala evolutiva da cultura.

Uma outra propriedade importante da cultura do feijoeiro é a manutenção da variabilidade genética adquirida, por ser uma planta essencialmente autógama, desde que esta variabilidade não ocorra na direção contrária à da seleção natural. Aparentemente o nível de polinização cruzada, embora restrito, é mais elevado entre os feijoeiros selvagens, sendo este em parte responsável pela criação de diversidade genética (Toro et al., 1990). A base de um programa de melhoramento genético é a presença de ampla variabilidade genética, uma vez que, quanto maior a variabilidade genética disponível para os cruzamentos visando o melhoramento da cultivar, maior o número de características que podem ser combinadas. Historicamente, os cruzamentos realizados nos diferentes programas de melhoramento do feijoeiro concentraram-se na utilização de germoplasma cultivado. O processo de domesticação, conforme já discutido, levou a uma pronunciada redução da diversidade genética dos descendentes cultivados do feijoeiro (Sonnante et al., 1994). Com o avanço dos estudos de diversidade dos

materiais silvestres, a busca de variabilidade tem se estendido para este tipo de germoplasma bem como para outras espécies de *Phaseolus*.

Os estudos desenvolvidos por Singh (1989) com a divisão da espécie em conjuntos gênicos descritos acima, permitem a exploração do potencial dos cruzamentos entre estes grupos, evitando os cruzamentos dentro de uma mesma raça, que, conforme já discutido, leva a um afinamento do “background” genômico. Podem surgir problemas nas combinações entre os grupos 1, 2 e 3 de sementes pequenas com os grupos 7, 8 e 9 de sementes grandes, mas há muitos trabalhos mostrando bons resultados nestes cruzamentos (Zimmermann et al. 1996).

Dentro das espécies cultivadas de *Phaseolus*, *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* var. *latifolius* e *P. lunatus* var. *lunatus*, a que mais facilmente produz híbridos interespecíficos é *P. coccineus*, desde que o feijoeiro comum seja utilizado como mãe nos cruzamentos (Zimmermann & Teixeira, 1996). Devido ao seu cultivo em áreas frescas e úmidas, talvez não seja a fonte de genes desejável para tolerância aos estresses abióticos presentes nas áreas de cultivo brasileiras, como estresse hídrico e altas temperaturas. No entanto, *P. acutifolius*, ou feijão tepari, e *P. lunatus*, possuem resistência à seca e genótipos destas espécies mostraram tolerância a altas temperaturas em simbiose (Piha & Munns, 1987). Para a obtenção de híbridos de *P. acutifolius* com *P. vulgaris*, esta deve ser utilizada como mãe nos cruzamentos e é necessário recorrer ao cultivo de embriões para obtenção de plantas viáveis. Há todo um procedimento delicado para a obtenção das linhagens a partir destes cruzamentos, sendo que estas tem apresentado mais altos níveis de resistência ao cretamento bacteriano comum e com certo grau de tolerância a altas temperaturas (Zimmermman et al., 1996). Já *P. lunatus* é a espécie filogeneticamente mais afastada de *P. vulgaris*, dificultando a obtenção de híbridos interespecíficos (Zimmermann & Teixeira, 1996). Os principais métodos de melhoramento genético do feijoeiro utilizados no Brasil são resumidamente descritos por Zimmermann et al. (1996).

Atualmente o desenvolvimento de mapas genéticos de ligação tem se constituído numa ferramenta do melhoramento genético vegetal. A construção de

um mapa de ligação para uma planta, permite a correlação entre a presença de um marcador, morfológico ou molecular, e os fatores genéticos que controlam determinadas características agronômicas bem como a ligação gênica entre diferentes características. Os marcadores morfológicos são tradicionalmente utilizados visando estudar a segregação dos genes a eles ligados, no entanto possuem limitações devido ao número reduzido de marcadores por linhagem, ao seu baixo polimorfismo e à baixa correlação com características de interesse. Além disso, estão sujeitos a efeitos ambientais e fenotípicos como epistasia e pleiotropia sendo, na sua maioria, codificados por genes dominantes ou recessivos (Ferreira & Grattapaglia, 1995). O desenvolvimento dos marcadores moleculares permitiu um grande avanço neste tipo de trabalho, pois possuem um alto nível de polimorfismo, permitem o estudo de um grande número de locos/alelo em populações segregantes, são co-dominantes, contendo maior quantidade de informação genética por loco, além da ausência de efeitos epistáticos, pleiotrópicos e, para os marcadores baseados em DNA, independem de fatores ambientais e da idade da planta. Para muitas plantas já existem mapas de ligação, utilizando marcadores moleculares, cobrindo grande parte do genoma, o que facilita tremendamente o trabalho de melhoramento destas espécies. Os principais marcadores moleculares atualmente utilizados em análise genética de plantas são: isoenzimas; RFLP; RAPD; microsátélites (amplificação específica de região contendo seqüência de DNA repetitivo) e AFLP (segmento de DNA amplificado via PCR – reação da polimerase em cadeia - após digestão do DNA com enzima de restrição).

Nodari et al. (1992) iniciou um extenso trabalho visando estabelecer um mapa de ligação para o feijoeiro visando correlacionar marcadores moleculares, especialmente RFLP, e fatores genéticos que controlam características agronômicas de interesse. Os autores buscaram identificar combinações entre genótipos de feijoeiro e marcadores de DNA que revelassem um alto nível de polimorfismo intraespecífico, visando facilitar o trabalho posterior de melhoramento com o objetivo de introduzir características quantitativas ou recessivas. Neste trabalho, as informações sobre os centros de origem divergentes descritos por

Singh (1991a) orientaram a seleção das cultivares utilizadas, bem como informações como isoenzimas, tipo de faseolina, e também características agronômicas contrastantes, como susceptibilidade a doenças fúngicas e bacterianas e resposta a estresses abióticos como tolerância à seca e baixo nível de fósforo no solo. Este trabalho resultou no posicionamento de 15 grupos de ligação, enquanto que Vallejos et al. (1992), num trabalho independente identificou 11 grupos de ligação, o que coincide com o número haplóide de cromossomos do feijoeiro, o que sugere que alguns dos grupos identificados por Nodari et al. (1992) devam ser posteriormente reunidos. O prosseguimento destes trabalhos deverá resultar na obtenção de um mapa de ligação saturado para o feijoeiro, permitindo a localização mais precisa dos fatores que determinam caracteres quantitativos (Zimmermann et al., 1996), sendo ferramentas básicas para trabalhos de clonagem de genes e para o monitoramento da introgressão de características de interesse no melhoramento genético, através da seleção auxiliada por marcadores (“marker-assisted selection”).

#### **4. A simbiose com o rizóbio**

O feijoeiro é considerado um hospedeiro promíscuo com relação ao rizóbio, uma vez que uma grande diversidade de espécies podem formar associações mais ou menos eficientes com esta planta. A taxonomia do rizóbio de feijoeiro apresentou uma grande evolução nos últimos anos, sendo que atualmente pelo menos três espécies distintas são reconhecidas como simbiontes desta planta, *R. tropici* (Martínez et al., 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993) e *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* (Jordan, 1984). Além destas, um grande número de isolados classificados como *Sinorhizobium* sp foi recuperado de nódulos de feijoeiro em solos tropicais brasileiros (Stralio et al., 1997). Sob condições de inoculação artificial, o feijoeiro pode ser nodulado por *S. meliloti* e *S. fredii* e ainda por uma grande variedade de estirpes isoladas de leguminosas florestais (Hungria et al., 1997).

Para que ocorra a formação do nódulo é necessário que haja uma perfeita interação entre a planta e a bactéria durante uma série de etapas seqüenciais (vide Fig. 1). Esta interação é mediada por sinais moleculares exsudados por ambos parceiros, os quais resultam na ativação dos genes envolvidos na simbiose. Durante este processo a planta elabora uma estrutura complexa, o nódulo, e a bactéria continua seu crescimento até sofrer uma série de transformações morfogenéticas que resultam na diferenciação dos bacteróides, capazes de fixar o nitrogênio em amônia, no interior do nódulo. A planta então assimila a amônia formando aminoácidos e em troca fornece os carboidratos provenientes de sua atividade fotossintética para a bactéria (Dilworth & Glenn, 1984; Werner, 1992).

Inicialmente o rizóbio é atraído até as raízes da planta hospedeira, numa série de eventos iniciais chamados de estágio pré-infecção. Neste estágio inicia-se a comunicação molecular entre a planta e bactéria, onde são decifrados pela bactéria, os códigos enviados pela hospedeira. Este código é composto de diferentes substâncias exsudadas pelas raízes da hospedeira, como carboidratos, aminoácidos, além de compostos fenólicos (flavonóides) que compõem um gradiente químico na rizosfera, resultando na atração da bactéria até a superfície radicular, fenômeno conhecido como quimiotaxia. Na superfície radicular, o rizóbio se prolifera e adere às células do pêlo ou outras da epiderme radicular através de interações seletivas e específicas entre moléculas complementares, que são as glicoproteínas (lecitinas) presentes na superfície destas células e os polissacarídeos extracelulares produzidos pelas células rizobianas (Diaz et al., 1989). O processo de adesão à superfície celular desempenha um importante papel no processo de infecção. Este se desenvolve em dois estágios, o primeiro dos quais envolve proteínas e o segundo, fibrilas de polissacarídeos (Chumakov, 1996). O primeiro estágio é considerado mais importante, pois as fibrilas de celulose promovem a fixação das células bacterianas à superfície da planta mas não são indispensáveis à infecção (Smit et al., 1987). Mutações nos genes *ndvB* impedem o processo de adesão do rizóbio, inibindo a atividade da ricadesina,

uma proteína dependente de cálcio, atualmente tida como responsável principal pela habilidade de adesão bacteriana (Swart et al., 1994).

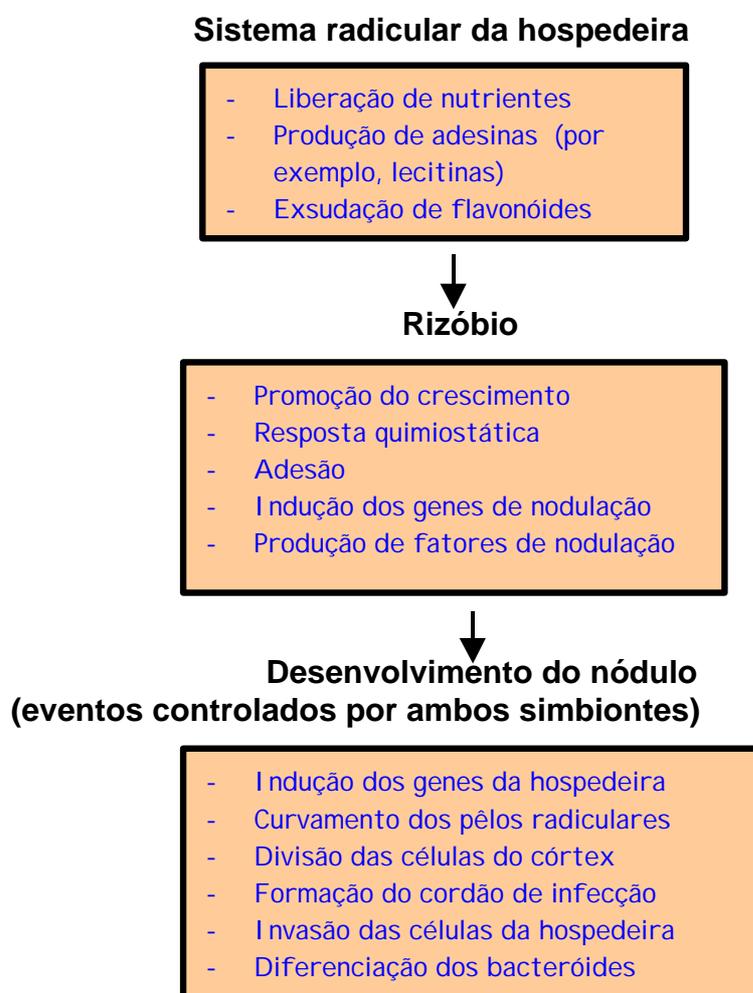


Figura 1: Eventos seqüenciais promovidos pela comunicação molecular entre a planta e a bactéria resultando na formação de nódulos fixadores de nitrogênio em feijoeiro (Göttfert, 1993).

O mecanismo de infecção das células da raiz, evento que ocorre logo após o processo de adesão, varia conforme a planta hospedeira. Pode haver penetração através dos espaços intercelulares na epiderme ou lamela média como em amendoim (*Arachis*) ou *Stylosanthes* ou através dos pêlos radiculares como é o caso do feijoeiro. Neste caso, o rizóbio induz um pronunciado

encurvamento dos pêlos em crescimento, iniciando um foco de infecção no ponto de encurvamento e o desenvolvimento de uma estrutura tubular, o cordão de infecção, que cresce através da célula do pêlo radicular e a seguir dentro do córtex radicular onde se ramifica. Associado com a infecção ocorre a indução de divisão celular nas células do córtex e a formação do primórdio nodular, cujo desenvolvimento dá origem a um novo órgão, o nódulo. As bactérias se multiplicam no cordão de infecção e posteriormente no interior das células do córtex onde ocorre a diferenciação dos bacteróides. O tipo de nódulo, sua ontogenia, morfologia, anatomia e tipo de desenvolvimento é característico de cada hospedeira, conforme revisado por Sprent (1989) e Caetano-Anollés & Gresshoff (1991). Como exemplo, *R. tropici* forma nódulos do tipo determinado em feijoeiro e indeterminado em leucena (*Leucaena leucocephala*). Todo este controle por conta da planta hospedeira indica que a planta possui a informação genética para a infecção e nodulação, ficando com a bactéria o papel colocar toda esta programação simbiótica em funcionamento.

Vários genes do rizóbio estão envolvidos nos processos de nodulação e infecção, tendo sido extensamente revisados por Dénarie et al. (1992), Göttfert (1993), Michiels & Vanderleyden (1994), Schultze et al. (1994) e Van Rhijn & Vanderleyden (1995). Em todo o processo, incluindo a nodulação e fixação de nitrogênio, conforme levantamento feito por Siqueira et al. (1991), estão envolvidos mais de 40 genes vegetais e 50 genes bacterianos, número que atualmente pode ser ainda maior. Estes podem ser divididos em duas classes principais, a primeira envolve os genes relacionados aos componentes celulares de superfície, os exopolissacarídeos (genes *exo*), lipopolissacarídeos (genes *lps*), polissacarídeos capsulares ou antígenos K e  $\beta$ -1,2-glucanas (genes *ndv*) que afetam o processo de infecção, mas cujo papel determinante na especificidade hospedeira, embora sugerido por diversos autores (Rolfe & Gresshoff, 1990; Long & Staskawicz, 1993) ainda não foi comprovado. Forsberg & Reuhs (1997), estudando os antígenos K de *R. fredii*, além de mostrarem uma distinção nos tipos produzidos por diferentes estirpes, sugerem uma correlação interessante entre a acetilação dos fatores Nod e destes antígenos, o que afetaria a interação planta-

bactéria, envolvendo diretamente a especificidade hospedeira. Alterações nestes genes (*exo*, *lps*, *ndv*) resultam em diversos distúrbios no processo de infecção, tais como a incapacidade de formar o cordão de infecção, resultando na formação de nódulos vazios, não fixadores, fenótipo definido como  $\text{Nod}^+ \text{Fix}^-$  (Arnold et al., 1994).

A segunda classe de genes abrange os genes de nodulação (*nod*, *nol*, *noe*), envolvidos nos processos de infecção e nodulação, sendo que sua inativação resulta em fenótipos tais como ausência de nodulação ( $\text{Nod}^-$ ), retardamento na nodulação, embora efetiva ( $\text{Nod}^d$ ,  $\text{Fix}^+$ ), em hospedeiras homólogas ou mudança no ciclo de hospedeiras (Dénarie et al., 1992). Uma vez que alguns destes genes de nodulação apresentam elevado grau de homologia entre diferentes espécies de rizóbio, enquanto outros são específicos, definindo a especificidade hospedeira, esta classe de genes foi dividida em “genes *nod* comuns” e “genes *nod* específicos da hospedeira” (genes *hsn*). Uma terceira categoria de genes de nodulação inclui os genes “regulatórios” (genes *nodD*) os quais, como o nome sugere, controlam a expressão dos genes de nodulação, sendo estes presentes, em uma ou mais cópias, em todas as espécies de rizóbio (Mulligan & Long, 1989).

A expressão dos genes *nod*, requer a presença de sinais exsudados pela hospedeira, os quais foram identificados como compostos fenólicos, sendo que o primeiro a ser identificado foi a luteolina, em extratos de sementes de alfafa (Peters et al., 1986). Outros indutores foram posteriormente identificados, a maioria flavonóides, induzindo a transcrição dos genes *nod* de diversas espécies de rizóbio (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995). A natureza e as quantidades de compostos exsudados dependem da planta e do seu estágio de desenvolvimento. Em muitos casos, compostos que não apresentam propriedades indutoras podem se comportar como inibidores da atividade de indutores eficientes (Firmin et al., 1986; Djordjevic et al., 1987; Györgypal et al., 1991). No caso do feijoeiro, a sinalização molecular se inicia com a exsudação, pelas sementes e raízes, de uma série de compostos que induzem os genes *nod* comuns, envolvendo o gene regulatório *nodD*. Hungria et al. (1991, 1992) identificaram 11 compostos liberados pelas sementes de feijoeiro de uma cultivar de grãos pretos, que induzem estirpes

de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli*, incluindo antocianinas (delfinidina, petunina e malvidina) e flavonóis (miricetina e canferol). Foi comprovado que a presença de alguns destes indutores nas sementes influencia a nodulação inicial do feijoeiro (Hungria & Phillips, 1993), e que, mesmo a nível de campo, cultivares cujas sementes promovem maior exsudação de compostos indutores apresentam maior massa nodular e nitrogênio acumulado na parte aérea (Araújo et al., 1996). Um grupo diferente de flavonóides é exsudado das raízes do feijoeiro, sendo estes mais ativos embora exsudados em menores quantidades (Hungria et al., 1997). Estes foram identificados como um isoflavonóide (genisteína) e flavanonas (eriodictiol e naringenina) na cultivar estudada (Hungria et al., 1991). Compostos como a chalcona isoliquiritigenina e a flavanona liquiritigenina foram recentemente também identificados como exsudatos radiculares de feijoeiro indutores dos genes *nod* (Bolanós-Vásques & Werner, 1997). Há um efeito sinérgico entre os diferentes indutores liberados pelas raízes e sementes do feijoeiro o que pode ser responsável pela maior nodulação observada na região da coroa desta planta (Hungria et al., 1992).

Em resposta aos flavonóides indutores liberados pela planta hospedeira, o rizóbio produz e secreta fatores solúveis, chamados de fatores Nod (fatores de nodulação). Os genes *nod* são essenciais para este processo (Van Brussel et al., 1990), conduzindo à síntese de moléculas que são responsáveis pelas alterações observadas nas raízes, tais como deformação e aumento no número de pêlos radiculares. Estes genes estão localizados em um “cluster” no plasmídeo simbiótico, na maioria das espécies de rizóbio, e são altamente conservados tanto na seqüência de DNA como na sua função, sendo designados como “nod box” (Martínez et al., 1990; Long, 1989). A estrutura química destes compostos foi identificada de modo geral como oligossacarídeos lipoquitínicos, possuindo diversos tipos de radicais associados a esta estrutura básica, dependendo da espécie ou estirpe de rizóbio (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995). Estes radicais são sintetizados e adicionados à estrutura básica destes compostos pela atuação dos genes *nod* específicos de cada espécie ou biovar. No caso de rizóbio que nodula o feijoeiro, Hungria et al. (1997) observa que há uma baixa especificidade

dos sinais moleculares sintetizados por estas espécies, uma vez que diversas estruturas de oligossacarídeos lipo-quitínicos são ativos no feijoeiro e mesmo vários destes compostos sintetizados por espécies que não nodulam esta planta, são ativos em feijoeiro. Resta saber se este tipo de resposta está presente também nas espécies de *Sinorhizobium* recentemente relatadas como simbiotes naturais do feijoeiro (Straliotto et al., 1997), ou se neste caso poderá haver uma maior especificidade, o que seria bastante interessante para o sucesso desta simbiose a nível de campo. No caso das espécies de rizóbio de feijoeiro estudadas até o momento, é provável que a especificidade hospedeira seja determinada por outros fatores que também funcionem como sinalizadores moleculares, como por exemplo, foi verificado que a síntese de uma auxina codificada por um gene localizado no plasmídeo simbiótico de *R. tropici* IIA está envolvida na resposta molecular destas estirpes (Martinez et al., 1995).

De modo geral, a síntese e a liberação de flavonóides é controlada pela planta hospedeira, no entanto, o microsimbionte é capaz de influenciar este processo, alterando o metabolismo da planta num terceiro passo desta comunicação molecular (Hungria, 1994). Neste caso, conforme verificado em *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Van Brussel et al., 1990), *B. japonicum* (Cho & Harper, 1991) e mesmo *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Dakora et al., 1993), a presença da bactéria ou de fatores Nod purificados (Spaink et al., 1991) aumentam a produção de flavonóides pelas suas respectivas hospedeiras.

Pelo lado da hospedeira, o próximo passo é investigar o sistema receptor da planta, identificando e caracterizando os receptores e outras moléculas envolvidas na resposta aos fatores Nod das bactérias. A descoberta de moléculas de sinalização que possam ser modificadas facilmente, tanto geneticamente quanto quimicamente, permitirá o estudo da percepção dos sinais gerados pelos fatores Nod, sua transdução e a ativação dos genes da hospedeira envolvidos nesta resposta (Dénarié et al., 1992).

Uma abordagem interessante é a avaliação da expressão das nodulinas vegetais no estabelecimento da simbiose. Nodulinas são produtos gênicos específicos ativados pelo processo de nodulação. Durante o desenvolvimento do

nódulo pelo menos 20 genes nódulo-específicos são expressos (ou amplificados), principalmente após o início visível do crescimento do nódulo, como a leg-hemoglobina (Govers et al., 1986; Gludemans & Bisseling, 1989). No entanto, estudos de hibridização mostram a presença precoce de nodulinas (ENOD2) em soja e ervilha. Estudos de sequenciamento de DNA mostram que esta proteína é do tipo das glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGP). A síntese deste tipo de proteína em plantas é associada às paredes celulares, e acredita-se estarem envolvidas no mecanismo de defesa, acumulando-se após injúria ou ataque de patógenos. Estas observações levaram a classificação das nodulinas em duas classes, as nodulinas precoces, expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento nodular, envolvidas nos processos de formação do cordão de infecção e na organogênese do nódulo, e as nodulinas tardias, cuja expressão gênica se inicia com o começo da fixação biológica de nitrogênio, sendo estes genes envolvidos na manutenção e funcionamento do nódulo (Sánchez et al, 1991; Schulze et al., 1994). Os sinais moleculares exsudados pelo rizóbio estão envolvidos, conforme já discutido, na organogênese da planta e na expressão das nodulinas precoces. A identificação e análise de mutações nas hospedeiras que afetem o processo simbiótico, e a expressão das nodulinas, permitirá um maior conhecimento dos genes vegetais envolvidos neste processo. Em feijoeiro, Campos et al. (1987) identificou algumas nodulinas específicas da hospedeira. Algumas dessas nodulinas podem ser úteis como marcadores fenotípicos na análise da interação planta-bactéria, em estudos envolvendo simbioses inefetivas. Skroch et al. (1993) estudou a variabilidade genética entre cultivares e entre as diferentes espécies de *Phaseolus* quanto a composição da leg-hemoglobina, uma nodulina tardia. Não foi observado polimorfismo nos genes que codificam para a leg-hemoglobina entre os diferentes acessos de feijoeiro, analisado por amplificação através de PCR, usando primers codificados a partir das regiões conservadas deste gene. No entanto foi detectado polimorfismo para este gene entre as diferentes espécies de *Phaseolus* e a técnica utilizada por estes autores pode ser útil nos trabalhos de seleção para a introgressão de outros genes

desejáveis a partir de espécies selvagens no germoplasma cultivado visando a melhoria da fixação biológica de nitrogênio.

O desenvolvimento da simbiose necessita de uma interação precisa entre a hospedeira e a bactéria. O controle recíproco pelos dois parceiros permite que ocorra o processo simbiótico de uma maneira regulada, levando a uma associação mutuamente benéfica na qual o rizóbio fixa o nitrogênio e a planta gera os fotossintatos necessários. A planta exerce controle através de autoregulação, que envolve a inibição controlada pela parte aérea da nodulação posterior na presença de nódulos em desenvolvimento (Delves et. al., 1986; Rolfe & Gresshoff, 1988), evitando a formação excessiva de nódulos (Pierce & Bauer, 1983). A natureza sistêmica desta autoregulação é evidenciada em experimentos do tipo "split root" onde o sistema radicular é dividido em dois compartimentos separados. A supressão da nodulação é observada em uma metade do sistema radicular quando a outra metade é previamente inoculada, tendo sido relatado este efeito em soja (Klossak and Bohlool, 1984; Olsson et al, 1990); alfafa (Caetano-Anolles & Bauer, 1988); trevo (Sargent et al., 1987) e feijão (George et al., 1992). Há uma grande variação na capacidade supressiva entre as diferentes estirpes que nodulam o feijoeiro, e nem sempre as estirpes mais competitivas apresentam melhor capacidade de gerar uma resposta supressiva na hospedeira. Os resultados de George et al. (1992) sugerem que realmente há o envolvimento de um evento pós-infecção na competição entre diferentes estirpes, indicando um importante controle pela hospedeira no processo. Como conclusão, sugerem que uma estirpe competitiva mas incapaz de gerar uma forte resposta supressiva na hospedeira, permite o desenvolvimento dos nódulos formados pela estirpe competidora, que poderá até suplantá-la no número total de nódulos. Rolfe & Gresshoff (1988) sugerem que a regulação da síntese de flavonas, coumarina e isoflavonas nas vizinhanças dos cordões de infecção ou por translocação a partir de outros órgãos da planta poderiam ser mecanismos pelos quais a planta evita a supernodulação. Sabe-se que outros fatores fisiológicos e ambientais também afetam a nodulação, tais como o nível de nitrato, acidez e alguns micronutrientes. A atividade inibitória destes fatores poderia ser modulada através de efeitos sobre

este sistema autoregulatório da planta. Há variabilidade entre cultivares na habilidade autoregulatória em soja, onde a cultivar Bragg tem uma maior capacidade supressiva do que as cultivares Clark ou Williams (Olsson et al., 1988). Os autores sugerem que esta característica seja uma adaptação às condições ambientais, e a presença desta diversidade mesmo em uma planta de estreita base genética como a soja, evidencia a sua importância adaptativa. O conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos nesta resposta, como utilizar esta característica na seleção de combinações simbióticas rizóbio-feijoeiro adaptadas a diferentes regiões, orientando os trabalhos de seleção de cultivares, são desafios à pesquisa.

## **5. Melhoramento genético do feijoeiro visando a fixação biológica de nitrogênio**

Dentre as leguminosas mais comumente utilizadas na agricultura, o feijoeiro é tido como uma das mais ineficientes na capacidade de fixação de nitrogênio. Este conceito geral provém da análise dos vários resultados experimentais obtidos por diferentes grupos de pesquisa na América Latina e em outras partes do mundo. Há, no entanto, uma grande variabilidade na capacidade de nodulação e eficiência na fixação biológica de nitrogênio entre os cultivares de feijoeiro (Graham & Rosas, 1977; Rosas & Bliss, 1986; Andriollo, 1990; Kipe-Nolt et al., 1993; Tsai et al., 1993 e Franco, 1993). A nível de campo, Hardarson et al. (1993) compilaram dados de diversos experimentos utilizando a técnica de diluição isotópica, conduzidos coordenadamente em diferentes países da América do Sul, tendo verificado que há grandes diferenças na capacidade de fixação de nitrogênio entre as cultivares, com valores médios variando entre 35 a 70% de nitrogênio derivado do ar. Os valores mais elevados foram observados somente em locais onde as condições ambientais foram mais favoráveis, no entanto indicam que há espaço para o melhoramento desta planta visando a fixação biológica de nitrogênio. Bliss (1985) reporta diferenças significativas entre acessos de feijoeiro, no entanto os ganhos foram bastante limitados nos cruzamentos envolvendo linhagens com

melhor capacidade fixadora. Vários parâmetros tem sido utilizados como indicadores da fixação biológica de nitrogênio, os quais são considerados como uma integração de diversas características quantitativas e possuem herdabilidade variando de baixa a moderadamente alta (Pereira et al., 1993; Nodari, 1993b). As principais características utilizadas para a seleção dos genótipos com maior eficiência simbiótica são o número de nódulos por planta e outras características associadas como a nodulação precoce e aumento na matéria seca ou tamanho dos nódulos (Herridge & Danso, 1995). Não serão discutidos aqui os métodos de melhoramento visando a fixação biológica de nitrogênio utilizados dentro dos diferentes programas, estes são compreensivamente descritos por Herridge & Danso (1995), com ênfase em feijoeiro e soja, e por Tsai et al. (1994).

A infecção com o rizóbio tem alguma similaridade com a infecção por alguns patógenos (Sharifi, 1984), sendo que, neste caso, a seleção para maior resistência aos microrganismos patogênicos é o procedimento utilizado nos programas de melhoramento. No caso do rizóbio, a seleção para maior susceptibilidade à infecção pode resultar em uma simbiose mais eficiente, dado que a planta seja capaz de sustentar esta maior nodulação, aliada a condições ambientais favoráveis à simbiose. A busca por genótipos com características de supernodulação através de mutações genéticas é uma tentativa de se obter aumentos no número e massa nodular em feijoeiro (Park & Buttery, 1989). Entretanto, estas plantas mutantes nem sempre apresentam maior acúmulo de nitrogênio pela fixação biológica devido a efeitos deletérios associados à esta mutação. A seleção de genótipos bem adaptados mas com maior capacidade de nodulação apresenta-se como uma alternativa viável (Pereira et al., 1993). Neste caso há a dificuldade de avaliação da nodulação a nível de campo, tendo sido testado por Pereira et al. (1993) um método de avaliação precoce, não destrutivo, onde as plantas são crescidas em vasos de Leonard em condições de casa de vegetação. Neste trabalho foi demonstrado que um maior número de nódulos, possivelmente resultado de uma maior susceptibilidade a nodulação, é um componente herdável da simbiose e que a seleção baseada em aumento do número de nódulos resulta em linhagens capazes de fixar mais nitrogênio

atmosférico. No entanto Herridge & Danso (1995), numa compilação dos principais resultados obtidos nos mais importantes programas de melhoramento a nível mundial visando a fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro, concluem que quando a nodulação é usada como principal critério de seleção, o progresso é limitado. Sugerem que os parâmetros mais adequados sejam a fixação de nitrogênio, medida como nitrogênio total da planta ou da semente, sob condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. Neste caso os dados de nodulação, como número e peso de nódulos, servem para confirmar a ocorrência da nodulação.

Foi observada variação para senescência nodular mais tardia a nível de cultivar (Hungria & Neves, 1986; Hungria & Franco, 1988), o que pode ser explorado para prolongar o período de atividade dos nódulos. Cultivares de ciclo mais curto parecem particularmente limitadas na capacidade fixadora (Duque et al., 1985), uma vez que a degeneração da fixação biológica de nitrogênio pelos nódulos ocorre perto do florescimento. Graham & Rosas (1977) verificaram que cultivares do tipo trepador (tipo IV), de ciclo mais longo, são superiores às de tipo I na nodulação e fixação biológica de nitrogênio. Hardarson et al. (1993) mostram evidências adicionais de que as cultivares de porte indeterminado fixam mais nitrogênio do que as arbustivas. Em experimentos utilizando diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  conduzidos no Chile, estes autores verificaram também que entre as cultivares de tipo I e II, a data de maturidade da planta também tem influência na fixação biológica, sendo que as de tipo II mostraram pequeno (1992) mediram diversos parâmetros tentando associá-los ao desenvolvimento precoce dos nódulos em diferentes cultivares. Parâmetros como a velocidade de nodulação, eficiência na iniciação nodular e desenvolvimento precoce dos nódulos e plantas, mostraram diferenças entre as cultivares, no entanto são de difícil avaliação e mostram pouca utilidade em programas de melhoramento. Além disso, os autores observaram que há uma compensação entre o número de regiões apresentando infecção inicial e a porcentagem delas que se desenvolve em nódulos, ou seja, cultivares com muitos primórdios nodulares apresentam uma porcentagem menor de nódulos maduros em relação à cultivares com poucos primórdios onde a maior parte deles torna-se eficiente. Houve ainda efeito da

dosagem do inoculante, onde a velocidade de nodulação em algumas cultivares foi mais afetada pela concentração celular do inoculante do que outras, e cultivares que apresentaram inibição na nodulação em dosagens mais elevadas. Um dos programas de melhoramento visando a fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro que apresenta bons resultados é conduzido por Bliss e colaboradores na Universidade de Wisconsin. Neste trabalho vários métodos para avaliação da fixação de nitrogênio foram utilizados, incluindo nitrogênio total da planta e sementes, produção, métodos baseados em  $^{15}\text{N}$ , redução de acetileno e índices de nodulação (Attewell & Bliss, 1985; Pereira et al., 1989; St Clair et al., 1988). Deste trabalho resultaram 5 linhagens melhoradas para a fixação biológica de nitrogênio (Bliss et al., 1989). Num trabalho posterior, Bliss (1993) sugere que os programas de melhoramento levem em consideração a capacidade dos genótipos em nodular e fixar nitrogênio na presença de nitrato no solo. Segundo este autor, a tolerância ao nitrato deve ser prioritária devido à alta sensibilidade da simbiose feijoeiro-rizóbio ao efeito supressivo do nitrato presente no solo (Henson & Bliss, 1991; George & Singleton, 1992). O método de avaliação do teor de ureídeos na seiva xilemática foi avaliado em feijoeiro, e mostra variação de acordo com a dependência proporcional da planta do nitrogênio fixado ou mineral (Peoples & Herridge, 1990), podendo ser usado em programas de melhoramento para avaliar a atividade fixadora em plantas individuais ou parcelas para avaliação de linhagens de melhoramento.

Outro programa importante de melhoramento visando a fixação biológica de nitrogênio tem sido desenvolvido no CIAT, onde os parâmetros de avaliação utilizados foram novamente a redução de acetileno, nodulação, produtividade e outros caracteres agronômicos. A última etapa foi a seleção de estirpes de rizóbio, tendo resultado deste trabalho várias linhagens com características simbióticas superiores (Graham, 1981; Kipe-Nolt & Giller, 1993; Kipe-Nolt et al., 1993).

A sensibilidade desta simbiose à diversos fatores ambientais como fatores do solo, sensibilidade à temperaturas elevadas, fatores fisiológicos da hospedeira e outros ligados ao microsimbionte, tem limitado os resultados de desempenho das

cultivares superiores, provenientes destes programas, a nível de campo (Hungria et al., 1997).

Embora tenha sido encontrada grande variabilidade genética para a fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro, e linhagens superiores tenham sido selecionadas, há pouca informação sobre o controle genético da nodulação pela hospedeira e importantes limitações são observadas nos métodos de seleção. No caso de feijoeiro, foi descrito um gene envolvido no controle da nodulação, o qual determina a supernodulação na presença de nitrato numa cultivar de sementes brancas, cuja mutação foi induzida por etilmetilsulfonato (EMS) (Park & Buttery, 1989). Pedalino et al. (1992) obtiveram um mutante não nodulante de feijoeiro (NOD125), através da aplicação de EMS nas sementes visando estudar o controle genético desta característica e também obter uma planta de referência não fixadora. Esta referência é importante quando se objetiva estimar o benefício líquido da fixação de nitrogênio através do método mais indicado que é o da diluição isotópica (Rennie & Kemp, 1984; Witty & Giller, 1991). As linhagens isogênicas obtidas neste trabalho são importante fonte para estudos da fisiologia, genética e bioquímica da nodulação. Este mesmo grupo de pesquisa, utilizando a mesma metodologia, obteve duas plantas mutantes (NOD109 e NOD238) a partir de “background” genômico distinto, apresentando nodulação ineficiente (cultivares RIZ30 e RIZ36). Estas linhagens RIZ, são linhagens elite provenientes do programa de melhoramento para fixação biológica de nitrogênio do CIAT. Os resultados indicaram que a característica estudada em ambos mutantes é determinada por um único alelo recessivo (*sym2*) e estável através de diferentes gerações (Pedalino et al., 1993). A caracterização fenotípica dos mutantes indica que eles representam um boa ferramenta nos estudos do controle da nodulação e fixação de nitrogênio em feijoeiro (Pedalino & Kipe-Nolt, 1993).

Atualmente, apesar de muitos avanços, a falta de conhecimento sobre parâmetros geneticamente bem definidos para a seleção de combinações planta/bactéria com alta efetividade para a fixação de nitrogênio requer que ainda se busque a demorada seleção de combinações mais eficientes de ambos os parceiros, inicialmente em condições controladas de casa de vegetação e posteriormente

seu teste a campo. No entanto, este tipo de experimentação é básica e particularmente importante no caso do feijoeiro devido a grande diversidade genética de seus simbioses e a grande variabilidade reportada em sua efetividade simbiótica (Pacovsky et al., 1984; Rennie & Kemp, 1983a e b).

Como há pelo menos 9 pools gênicos de *P. vulgaris* e agora pelo menos 4 grupos diferentes de rizóbio nodulando o feijoeiro em condições tropicais, marcantes interações podem ser encontradas entre estes grupos e esta possibilidade começa a ser estudada em alguns experimentos exploratórios. Andriolo et al. (1994), estudou acessos silvestres de feijoeiro quanto à capacidade noduladora e fixação de nitrogênio, observando grande variabilidade entre os diferentes acessos analisados e Franco (1993), comparando feijões domesticados e silvestres de diferentes origens, verificou que estes apresentaram maior capacidade de nodulação do que os domesticados. Após caracterizar isolados de rizóbio de diferentes regiões e estudar a especificidades destes para cultivares de feijão pertencentes a diferentes conjuntos gênicos, Bernal (1993, citado por Franco, 1998) verificou que todos os isolados do Equador e Argentina pertenciam a *R. etli* e houve diferenças na nodulação inicial em cultivares de diferentes origens. Grupos contrastantes de rizóbio foram testados em simbiose com feijoeiros silvestres e domesticados, de diferentes origens, observando-se que de modo geral não houve preferência na nodulação (Kipe-Nolt et al., 1992). No entanto, os autores observaram uma tendência dos materiais de origem mesoamericana de formar nódulos mais rapidamente com a estirpe de *R. etli* CIAT 632, do que com *R. tropici* CIAT 899, sendo que o efeito oposto foi observado para os materiais de origem andina. Este autores identificaram alguns genótipos selvagens que restringem a nodulação pela estirpe CIAT 899 de *R. tropici*. Como o potencial de utilização desta característica depende da extensão desta capacidade de restrição entre as diferentes estirpes de rizóbio, foram realizados estudos mais detalhados visando avaliar este efeito contra 9 isolados de *R. tropici* e 15 de *R. etli* e a possibilidade de esta ser suplantada pela presença de estirpes eficientes (Montealegre & Kipe-Nolt, 1994). Os resultados mostraram que 8 dentre as 9 estirpes de *R. tropici* foram restringidas na nodulação dos acessos selvagens

testados (G21117 e G10002), assim como 6 dentre as 15 de *R. etli*. Estas estirpes apresentaram nodulação normal em cultivares comerciais de feijoeiro. A presença de estirpes efetivas não foi capaz de inibir o efeito de restrição destas cultivares sobre as inefetivas, e estas não afetaram a capacidade noduladora das estirpes efetivas. O sucesso deste tipo de experimento a nível de campo depende de muitos estudos pois as condições ambientais podem afetar a nodulação dos diferentes grupos de rizóbio, além disso é preciso conhecer a população de rizóbio predominante nas diferentes regiões. A herança dos genes que controlam a capacidade de restrição precisa ser determinada pois irá afetar a facilidade com que estes possam ser incorporados em cultivares comerciais.

## 6. As interações patogênicas

A teoria “gene a gene” de Flor (1955,1971), demonstra que o hospedeiro e o patógeno possuem sistemas gênicos complementares, onde os alelos de resistência do hospedeiro só podem se expressar se houver no sistema complementar do patógeno um alelo de avirulência. Por outro lado, um alelo de virulência somente se expressa quando no sistema complementar do hospedeiro houver um alelo de susceptibilidade. A falta de um dos membros deste par gênico resulta numa interação compatível (doença), o que implica que a especificidade ocorre para a resistência. A reação de hipersensibilidade (HR), a qual limita o ciclo de hospedeiras do patógeno só pode ocorrer, portanto, se o patógeno possuir qualquer um dos muitos genes *avr* (avirulência) possíveis que interajam com o gene *R* (resistência) correspondente da hospedeira. Esta interação gene a gene resulta no reconhecimento da bactéria e desencadeia as reações de defesa da planta. A hipersensibilidade é uma resposta rápida, associada aos mecanismos de defesa da planta, que resulta na morte programada das células vegetais no ponto de invasão pelo patógeno. Neste caso tem-se um exemplo de resistência vertical e virulência vertical, sendo que outras relações mais instáveis podem ser estabelecidas, resultando na resistência horizontal ou patogenicidade horizontal (Plank,1963 e 1968).

A capacidade das bactérias patogênicas de liberar no interior das células vegetais, proteínas que levam à sua morte, foi elucidada com os recentes estudos envolvendo os sistemas proteicos Hrp e Avr. Os genes Hrp estão presentes em muitas bactérias fitopatogênicas como *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Ralstonia* (Alfano & Collmer, 1997). Estes patógenos, além de possuir estes genes, tem em comum a capacidade de colonizar os espaços intercelulares, são capazes de matar as células vegetais e muitos deles são hospedeiro-específicos, induzindo a reação de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras (Dangl et al., 1996). Estudos com mutantes obtidos “via” transposons produziram um grupo de bactérias deficientes tanto na elicitação da resposta HR como em patogenicidade (e crescimento parasitário) em células de hospedeiras (Lindgren, et al., 1986). Estes mutantes foram chamados de Hrp<sup>-</sup>, caracterizados pela perda total de comportamento patogênico, são resultado de mutações em qualquer dos genes *hrp*, que codificam principalmente para um sistema de secreção proteica do tipo III (Van Gijsegem, et al., 1995). Este sistema, similar ao que acontece com bactérias patogênicas a animais, é usada pelos patógenos vegetais para transferir as proteínas ativadoras Avr para o interior das células, onde interagem com os produtos dos genes R. Há uma dependência entre a expressão destes dois genes, uma vez que os genes *avr* não expressam seu fenótipo em mutantes *hrp* ou em bactérias não patogênicas, que não possuem o sistema Hrp (Keen et al., 1990). Após estas evidências, a interação gene a gene passa a incluir o sistema Hrp, explicando as características patogênicas das bactérias citadas acima, uma vez que este sistema exige uma secreção proteica dependente de contato celular, ou seja, interação entre as células do patógeno e as da hospedeira. Além disso, os produtos *avr* e R interagem diretamente dentro das células das hospedeira, o que explicaria as enormes diferenças em patogenicidade observadas entre estirpes relacionadas. Estas diferenças seriam explicadas pela existência de um “pool” de genes que podem ser trocados ou transferidos horizontalmente entre as estirpes, cujos produtos podem ser promover ou prevenir o parasitismo durante a coevolução da hospedeira e do patógeno (Alfano & Collmer, 1997).

O estudo da variabilidade patogênica e da distribuição dos patótipos (raças fisiológicas) é básico para a busca de novas fontes de resistência, a alocação no tempo e no espaço destas fontes e a definição das estratégias para o controle de doenças (Zimmerman et al., 1996). Este aspecto é especialmente relevante no caso de *P. syringae* e *X. campestris*, as quais são divididas em mais de 40 a 140 patovares, respectivamente (Alfano & Collmer, 1997). Neste aspecto, os estudos de coevolução dos patógenos pode levar a novas perspectivas de controle das doenças.

No caso do feijoeiro, a principal doença bacteriana é o crestamento-bacteriano-comum (CBC), encontrado em praticamente todas as regiões produtoras do país (Sartorato et al., 1996). Esta doença é causada pelas bactérias *X. campestris* pv. *phaseoli* e *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. (Audy et al., 1994). A maioria dos cultivares na América Latina são susceptíveis a esta doença (Silva et al., 1989), sendo que os trabalhos de melhoramento tem obtido algum sucesso, com o lançamento de cultivares resistentes (Sartorato et al., 1996). Além desta doença, o fogo selvagem, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, é também uma doença que tem apresentado importância crescente nos últimos anos, provocando a morte das plantas na sua fase inicial de crescimento (Franco, 1998). Há também fontes de resistência para esta doença, as quais tem sido trabalhadas no Brasil (Rava, 1988).

Franco (1988), avaliou cultivares de feijão dos “pools” gênicos andino e mesoamericano, quanto à resistência ao CBC e ao fogo selvagem, e comparou os resultados como os de algumas cultivares consideradas como fonte de resistência ao CBC. Suas conclusões são de que os cultivares mesoamericanos, que apresentaram menor área de lesão à um isolado patogênico de *X. c. p.* também apresentaram-se tolerantes ao isolados 986 de *P. s. t.* Isto indica que os genes que conferem resistência à *Xanthomonas*, incorporados nos materiais selecionados e avaliados no seu trabalho, também conferem resistência ao isolado 986 de *Pseudomonas*. É provável que o conhecimento do funcionamento da interação entre os genes *avr-R-hrp* nestas interações poderia ajudar a elucidar a ligação gênica observada por Franco (1998), e facilitaria o trabalho de

melhoramento desta planta visando à resistência às duas principais bacterioses que a afetam.

Um exemplo já bastante estudado da variabilidade disponível em feijoeiro, embora ligado a interação com insetos, é o polimorfismo da faseolina (Gepts et al., 1986) o qual também ocorre em outras proteínas da semente, como a arcelina, uma proteína semelhante às lecitinas (Osborn et al., 1986). Esta proteína não tem presença muito significativa nas populações selvagens, mas algumas de suas variantes tem propriedades inseticidas, sendo que todas as linhagens de feijoeiro selvagem que a possuem apresentam resistência aos carunchos. Há uma série múltipla de alelos codificando para esta proteína, com diferentes níveis de resistência. Um programa convencional de retrocruzamento foi desenvolvido na Universidade de Wisconsin visando transferir o alelo Arc-1 para os feijoeiros cultivados, resultando em linhagens homozigotas resistentes, heterozigotas com nível intermediário de resistência e homozigotas recessivas sensíveis, sugerindo que a quantidade da proteína presente influencia no nível de resistência (Zimmerman, et al., 1996). Aqui mais uma vez é observado o “efeito funil” da domesticação, uma vez todos os materiais cultivados analisados para resistência aos carunchos mostraram-se sensíveis, e mesmo entre os genótipos selvagens, esta característica não é de ocorrência generalizada, indicando que a presença destes genes não era essencial para a sobrevivência das populações. Este exemplo, embora relacionado a uma praga, torna claro que a elucidação dos processos patogênicos e o conhecimento dos genes envolvidos nestas interações facilitará enormemente a busca destes genes nos genótipos ancestrais, tornando o processo de melhoramento genético muito mais eficiente.

## **7. Aspectos comuns entre estas interações e sua utilização no melhoramento da planta**

A definição clássica de simbiose exige que haja vantagens para ambos os parceiros com a interação, de outra forma ela se torna uma interação patogênica. Sendo assim, uma nodulação efetiva da planta induzida pelo rizóbio é um bom

exemplo de simbiose. No entanto, alterações ambientais e/ou no genoma de um dos parceiros, pode ocasionar a degeneração desta simbiose em uma interação patogênica típica. Independentemente da manifestação final da interação rizóbio-leguminosas, há muitas características em comum com a infecção e desenvolvimento de um parasitismo. Estas características incluem: (a) adesão dos microrganismos às células da hospedeira; (b) penetração no interior das células da hospedeira, (c) resposta da hospedeira à penetração; (d) redirecionamento do metabolismo da hospedeira; (e) manifestações morfológicas da interação como o desenvolvimento dos nódulos ou sintomas de infecção (Vance, 1983).

Estudos básicos de expressão de genes ligados tanto às interações patogênicas como às simbióticas, fornecem matéria prima essencial para o desenvolvimento de marcadores genéticos ligados à expressão destes genes. O estudo destes marcadores, juntamente com o conhecimento das características divergentes quanto à origem evolucionária das cultivares, vão permitir o estudo da segregação destes genes nos diferentes genótipos e, juntamente com o estudo da diversidade dos patógenos e simbiontes, facilitarão o trabalho de melhoramento visando buscar dentro dos diferentes genótipos, as melhores combinações simbióticas para as condições agroecológicas. Alguns exemplos de interações gene a gene, citados por Dénaire et al. (1992). Um único gene dominante parece estar envolvido na resposta de cultivares de soja a isolados de *Bradyrhizobium japonicum* pertencentes ao chamado serogrupo 123 (da estirpe USDA 123). Muitos genótipos de soja mostram restrição à nodulação por este serogrupo, mas são normalmente nodulados por estirpes de outros serogrupos. Nesta bactéria o gene *nolA*, homólogo ao de proteínas regulatórias, é essencial para a nodulação dos genótipos resistentes. O mesmo foi observado na nodulação de ervilhas de origem europeia por estirpes de *R. leguminosarum* as quais não nodulam cultivares provenientes do Afeganistão. A presença de um único gene, *nodX* na estirpe TOM supera a restrição e resulta numa nodulação eficiente destas linhagens. O gene está localizado abaixo dos genes *nodABCIJ* e provavelmente está envolvido em alguma modificação dos fatores Nod, os quais passam a ser reconhecidos pelas cultivares do Afeganistão. Mutantes *nodH* de *R. meliloti*

induzem o fenótipo Nod<sup>-</sup> em alfafa, no entanto a presença de um único gene dominante foi capaz de suprimir esta resposta em genótipos selecionados. Provavelmente este gene promove uma interação diferente com os fatores Nod exsudados pelos mutantes *nodH*.

A resistência à doenças em plantas envolve a ativação de mecanismos de defesa em resposta ao ataque de um patógeno, conforme destacado acima. Em contraste às diversas fitoalexinas do tipo flavonóides induzidas por patógenos vegetais, os indutores dos genes nod são constitutivamente encontrados em sementes, plântulas e raízes, mesmo sem a exposição ao rizóbio, embora sinais extracelulares secretados pelas células de rizóbio possam estimular a liberação e a atividade destes indutores (Van Brussel et al., 1990; Hollingsworth et al., 1990). Uma série de sistemas enzimáticos são ativados no caso de interações patogênicas, tais como aqueles envolvidos na síntese de fitoalexinas antibióticas e aqueles que levam à deposição de materiais semelhantes às ligninas, acúmulo de glicoproteínas ricas em hidroxilprolinas (HRGP) e inibidores de proteinase assim como aumento da atividade de enzimas hidrolíticas. A nodulação geralmente não causa um tipo de resposta como a morte celular e a reação de hipersensibilidade. Esta reação está presente em diversas combinações incompatíveis planta-patógeno, e encontra-se bastante estudada porque é um exemplo claro do papel dinâmico da hospedeira nos estágios iniciais do ataque pelo patógeno. Uma série de reações fisiológicas ocorrem quando há a indução da resposta de hipersensibilidade, tais como perda da permeabilidade das membranas celulares, aumento da respiração, acúmulo e oxidação de compostos fenólicos, e produção de fitoalexinas. O resultado final é a morte e colapso das células infectadas e algumas células vizinhas, o que paralisa a invasão pelo patógeno, impedindo a disseminação da doença por outros tecidos da planta. Este tipo de reação ocorre quando as células são invadidas por estirpes avirulentas de um mesmo patógeno, como ocorre na interação tabaco-*Pseudomonas solanacearum*, significando que a planta reconhece a presença de patógenos avirulentos, nos quais os genes especializados cuja expressão permitiria o desenvolvimento do processo infectivo não estão presentes.

Levanta-se a questão do por quê o rizóbio é tão diferente de outras bactérias do solo, sendo capaz de iniciar com sucesso uma interação tão complexa sem induzir a resposta antagônica da hospedeira. Possivelmente porque a bactéria adquiriu genes que regulam os sistemas de reconhecimento e defesa da hospedeira. Para a pesquisa da interação com o rizóbio é interessante o estudo do sistema de defesa da planta uma vez que: (a) os flavonóides (flavonas e isoflavonas) e coumarinas afetam a expressão dos genes de nodulação; (b) a preincubação do rizóbio com flavonas aumenta a infectividade de alguns isolados e (c) os níveis de compostos detectados a partir da via de fenilpropanóides após a infecção com o rizóbio são influenciados pelos genes que determinam a especificidade hospedeira da bactéria (Rolfe & Gresshoff, 1988). Acredita-se que o rizóbio comporte-se como um parasita nos estágios iniciais do processo de infecção. Tanto os patógenos quanto o rizóbio enviam sinais de sua presença tais como os fatores Nod ou AvrD, que são pequenos produtos enzimáticos de estrutura variada, formados a partir de complexas vias biossintéticas, ou proteínas como Hrp, semelhante à fatores de virulência presentes em patógenos animais. Foi identificada similaridade entre Nod C e duas outras proteínas, DG42 e FB15, ambas envolvidas na sinalização molecular em outros organismos (Göttfert, 1993). DG42 é detectada durante a embriogênese de *Xenopus laevis*, e FB15 é essencial na formação das estruturas reprodutivas de *Stigmatella aurantica* (Göttfert, 1993). Embora de função desconhecida, a ocorrência destas proteínas em distintos estágios de desenvolvimento durante a morfogênese destes organismos sugerem a sua participação na sinalização molecular. As plantas evoluíram de forma a elaborar esta troca de sinais de forma a evitar a invasão de seus tecidos. Como o rizóbio e outros patógenos conseguem entrar nas células e evitar este mecanismo de defesa são questões a serem elucidadas talvez pelo estudo dos mecanismo de transdução de sinais no interior das células da hospedeira (Long & Staskawicz, 1993).

A produção de fitoalexinas durante a infecção das células vegetais não é apenas induzida por patógenos, alguns microsimbiontes também tem que enfrentar esta barreira molecular, como foi observado na simbiose

soja/*Bradyrhizobium*, onde a presença de gliceolina foi detectada nos nódulos infectados por um mutante fix<sup>-</sup> (Werner et al., 1985; Parniske et al., 1990). Não apenas nos nódulos já formados como também nos primeiros estágios de infecção já são detectados aumentos nos níveis de gliceolina, o que está correlacionado com a aumento da expressão de genes envolvidos na síntese destes compostos (Parniske et al., 1988; Sengupta-Gopalan et al., 1990). Deste modo, para uma simbiose eficiente é necessário que o microsimbionte seja capaz de tolerar a presença da fitoalexina da hospedeira. Para *Bradyrhizobium* foi demonstrado que o microsimbionte pode se adaptar a presença de fitoalexinas (Parniske, et al., 1991). Para *Rhizobium leguminosarum*, simbiote de *Vicia faba*, Geörge & Werner (1991), estudaram a tolerância a wyerona, uma fitoalexina produzida por espécies de *Vicia* e *Lens*. Neste estudo, a presença da fitoalexina inibiu o crescimento tanto de *R. leguminosarum* como de *B. japonicum* “in vitro”, numa fase inicial, e o crescimento posterior da bactéria foi correlacionada à capacidade do rizóbio em degradar a wyerona. Aparentemente a capacidade de tolerar as fitoalexinas produzidas pelas plantas hospedeiras é um fator importante na simbiose rizóbio-leguminosas.

Djordjevic et al. (1987) citam um exemplo de reação semelhante à reação de hipersensibilidade induzida por um mutante da estirpe NGR 234. Este mutante é Nod<sup>-</sup> em siratro e *Desmodium*, mas é capaz de induzir nódulos mal desenvolvidos ou incompletos em outras plantas, além de produzir um excesso de exopolissacarídeos. Esta estirpe forma, nos hospedeiros não compatíveis, o cordão de infecção, mas o crescimento das células bacterianas é paralisado no ponto inicial de penetração e as reações de acúmulo de material eletro-denso verificado no local se assemelham à reação de hipersensibilidade induzida por estirpes avirulentas de *Pseudomonas*. Uma interpretação interessante sugerida pelos autores, é a de que as estirpes de *Rhizobium* se tornam virulentas adquirindo genes de virulência dominantes que, uma vez mutados, levam a expressão dos determinantes de virulência. Aqui vale ressaltar que os exopolissacarídeos estão envolvidos no contato célula-célula entre hospedeira e microrganismo, o que poderia influenciar a expressão do sistema Hrp, ou

semelhante, presente na interação rizóbio-leguminosa, o qual depende deste contato.

Foi possível identificar a segregação de genes de interesse para resistência a doenças e para intensidade de nodulação pelo rizóbio (Nodari et al., 1993a). Um segmento genômico no grupo de ligação denominado D7, contendo o loco *Phs* (faseolina) e outros marcadores foi associado com os parâmetros quantitativos de número de nódulos de rizóbio e resistência ao crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Nodari et al., 1993b). Isto sugere que estas regiões genômicas contenham locos para múltiplas características quantitativas (QTLs) que afetam diferentes parâmetros; alternativamente um fator com efeito pleiotrópico pode estar localizado nesta região genômica, o que os autores não puderam confirmar. No entanto, há indícios de que isto esteja ocorrendo pois a presença dos alelos parentais da cultivar BAT93 nesta região estão consistentemente associados baixa nodulação e resistência ao crestamento bacteriano. Isto sugere que um mecanismo molecular e bioquímico comum possa estar envolvido na interação planta-bactéria entre o feijoeiro e estas duas bactérias. Segundo os autores este mecanismo potencial pode ser mediado pelos flavonóides. Conforme relatado acima, estes compostos estão envolvidos na sinalização molecular planta-*Rhizobium*. Embora não se disponha de uma informação específica de flavonóides ou compostos fenólicos envolvidos nas resposta da planta a infecção por *Xanthomonas*, como os que ativam os genes *vir* de *Agrobacterium* (Winnans et al., 1992), é possível que um flavonóide comum ative os genes de ambas bactérias. Por outro lado, os flavonóides podem estar tendo um efeito deletério nas bactérias, uma vez que foi relatada a inibição de *X. c.* pv. *phaseoli* por fitoalexinas semelhantes a flavonóides e um composto relacionado foi deletério a *Bradyrhizobium japonicum* e *Sinorhizobium fredii* (Wyman & Van Etten, 1982 e Parniske et al., 1991, citados por Nodari et al., 1993b).

O feijoeiro, conforme já discutido anteriormente, é uma planta promíscua, que nodula com uma diversidade muito grande de espécies de rizóbio, o que torna muito difícil um trabalho similar ao desenvolvido em certas combinações planta-

patógeno, que é o estabelecimento das chamadas séries diferenciais, que no caso, utilizaria diferentes cultivares de feijoeiro inoculadas com as diversas espécies de rizóbio que nodulam esta planta. Este nível de especificidade ainda não foi atingido nesta simbiose, no entanto atualmente tem-se buscado trabalhar no sentido inverso, induzindo mutações na planta de modo a que ela se torne Nod<sup>+</sup>, e através do estudo destes mutantes identificar os genes envolvidos no reconhecimento do rizóbio. Deste modo poderiam ser identificadas interações gene a gene, as quais poderiam ser então manipuladas de modo a restringir a nodulação a um grupo eficiente de bactérias a ser introduzido no solo. A identificação destes genes e sua possível manipulação parecem ser o caminho mais viável na otimização da fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro a nível de campo. A restrição à nodulação, estudada em genótipos selvagens (Montealegre & Kipe-Nolt, 1994) é caminho promissor a ser percorrido, uma vez que determinados grupos de rizóbio nodulam com os genótipos que apresentam esta característica. Estes estudos são complementares, e várias linhas de trabalho podem contribuir na busca desta maior especificidade, uma delas é a busca de maior variabilidade nos genótipos primitivos de feijoeiro ou nas espécies mais proximamente relacionadas, e através destes estudos estabelecer algum tipo de especificidade com os grupos conhecidos de rizóbio. A caracterização do rizóbio presente nos solos tropicais é essencial, pois dela vai depender o sucesso do par simbiótico a ser introduzido, pois é necessário que não ocorram no solo estirpes ineficientes que também sejam capazes de nodular a planta selecionada.

O desenvolvimento dos estudos das interações entre microrganismos e plantas, deverão elucidar a base química e genética que determina o ciclo de hospedeiras e o reconhecimento entre plantas e os microrganismos que a invadem. Djordjevic et al., em uma revisão publicada em 1987, levantava questionamentos ainda sem resposta, mas em cuja direção a pesquisa trabalhado, tais como: Qual é a base de uma infecção rizobiana de sucesso: a supressão ativa dos sistemas de defesa da planta, mecanismos de evitar estes sistemas mascarando determinantes específicos que poderiam elicitam as respostas de

defesa da planta, ou uma combinação destes dois mecanismos? Estas respostas ainda dependem de uma abordagem multidisciplinar.

Uma rápida visão sobre o desenvolvimento recente da biologia molecular, elucidando processos complexos das interações planta-patógeno-simbionte, leva a muitas especulações e cada vez mais demonstra que a compreensão destes processos a nível genético permitirá uma queima de etapas muito importante, beneficiando os procedimentos de melhoramento vegetal visando a maximização da FBN em feijoeiro.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANDRIOLO, J.; PEREIRA, P.A.A.; HENSON, R.A. Variabilidade entre linhas de formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* quanto à características relacionadas com a fixação biológica de N<sub>2</sub>. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 831-837, 1994.

ALFANO, J.R.; COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, p. 5655-5662, 1997.

ARAÚJO, F.F. de; MUNHOZ, R.E.V.; HUNGRIA, A. Início da nodulação em sete cultivares de feijoeiro inoculadas com duas estirpes de *Rhizobium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, p.435-443. 1996.

ARNOLD, W.; BECKER, A.; KELLER, M.; ROXLAU, A.; PÜHLER, A. The role of *Rhizobium meliloti* surface polysaccharides in the infection of *Medicago sativa* nodules. **Endocytobiosis and Cell Research**, Tuebingen, v.10, p. 17-28, 1994.

ATTEWELL, J.; BLISS, F.A. Host plant characteristics of common bean line selected using indirect measures of N<sub>2</sub> fixation. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J.; NEWTON, W.E., (Eds.). **Nitrogen Fixation Research Progress**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p.3-9.

AUDY, P.; LAROCHE, A.; SAINDON, G. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 84, p. 1185-1192, 1994.

BECERRA VELÁSQUEZ, V.L.; GEPTS, P. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centers of origin. **Genome**, Ottawa, v.3, p.256-263, 1994.

BELELE, C.L. **Análise bioquímica e molecular da diversidade genética entre cultivares mesoamericanos e andinos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Uberlândia: UFU, 1997. 66p. Tese de Mestrado.

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

BLISS, F.A. Breeding for enhanced nitrogen fixation potential of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: LUDDEN, P.W.; HARRIS, J.E., (Ed.). **Nitrogen fixation and CO<sub>2</sub> metabolism**. New York: Martinus, 1985. p. 303-310.

BLISS, F.A.; PEREIRA, P.A.A.; ARAÚJO, R.S.; HENSON, R.A.; KINIECK, K.A.; McFERSON, J.R.; TEIXEIRA, M.G.; SILVA, C.C. da. Registration of five high nitrogen fixing common bean germplasm lines. **Crop Science**, Madison, v.29, p.240-241, 1989.

BOLÁNOS-VÁSQUEZ, M.C.; WERNER, D. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on nod gene-inducing flavonoids in root exsudates of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.10, n.3, p.339-346, 1997.

BRÜCHER, H. The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in South America. In: GEPTS, P., (Ed.). **Genetic Resources of Phaseolus beans**. Dordrecht: Kluwer, 1988. p.185-214.

BURKART, A. In: Reunion Argentina de Agronomia, 1941, Buenos Aires... **Resolucionis Y trabajos**. Buenos Aires: Acme Agency, p. 52, 1941.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; BAUER, W.D. Feedback regulation of nodule formation in alfalfa. **Planta**, Berlin, v.175, p.546-557, 1988.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Plant genetic control of nodulation. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.45, p.345-382, 1991.

CAMPOS, F.; PADILLA, J.; VÁZQUEZ, M.; ORTEGA, J.L.; ENRÍQUEZ, C.; SÁNCHEZ, F. Expression of nodule-specific genes in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 9, p. 521-532, 1987.

CHO, M.J.; HARPER, J.E. Effect of inoculation and nitrogen on isoflavonoid concentration in wild type and nodulation-mutant soybean roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.95, p.435-442, 1991.

CHUMAKOV, M.I. Involvement of superficial polysaccharides and proteins of *Rhizobiaceae* in attachment to plant surface. **Microbiology**, New York, v. 65, p. 631-643, 1996.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Research constraints provisionally identified by CIAT. In: **WORKSHOP ON ADVANCED Phaseolus BEAN RESEARCH NETWORK**, 1990. 30p. (impresso).

DAKORA, F.D.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Common bean root exsudates contain elevated levels of daidzein and coumesterol in response to *Rhizobium* inoculation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.6, p.665-668, 1993.

DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A.; RICHBERG, M.H. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. **Plant Cell**, Rockville, v.8, p.1793-1807, 1996.

DEBOUCK, D.G.; TOHME, J. Implications for bean breeders of studies on the origins of common beans, *Phaseolus vulgaris* L. In: BEEBE, S., (Ed.). **Current topics in breeding common bean**. Cali: CIAT, p.3-42.

DÉNARIÉ, J.; DEBELLÉ, F.; ROSENBERG, C. Signaling and host range variation in nodulation. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.46, p.497-531, 1992.

DJORDJEVIC, M.A.; GABRIEL, D.W.; ROLFE, B.G. Rhizobium – The refined parasite of legumes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 145-168, 1987.

DIAZ, C.L.; MELCHER, L.S.; HOOYKAAS, P.J.J.; LUGTENBERG, B.J.J.; KIJNE, J.W. Root lectin as a determinant host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Nature**, London, p.338:579, 1989.

DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L.; BODDEY, R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N<sub>2</sub> fixation using 15N. **Plant Soil**, Hague, v.88, p.333-343, 1985.

EVANS, A.M. Beans. In: SIMMONDS, N.W., (Ed.). **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976. p.168-172.

EVANS, A.M. Exploitation of the variability in plant architecture in *Phaseolus vulgaris*. In: Potentials of field beans and other food legumes in Latin America. Series, Seminar 2E. CIAT, Cali, Colombia. p. 279-286, 1973.

EVANS, R.J.; BANDEMER, S.L. Nutritive value of legume seed protein. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.15, p.439-443, 1967.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa Cenargem, 1996. 220p. (Embrapa Cenargem. Documentos, 20).

FIRMIN, J.L.; WILSON, K.E.; ROSSEN, L.; JOHNSTON, A.W.B. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. **Nature**, London, v.324, p.90-92, 1986.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.19, p.125-188, 1971.

FLOR, H.H. Host parasite interaction in flax rust, its genetics and other implications. **Phytopathology**, St. Paul-MN, v.19, p.680-685, 1955.

FORSBERG, L.S.; REUHS, B.L. Structural characterization of the K antigens from *Rhizobium fredii* USDA257: Evidence for a common structural motif, with strain-specific variation, in the capsular polysachrides of *Rhizobium* spp. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, p. 5366-5371, 1997.

FRANCO, M.C. **Capacidade de nodulação de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestres e domesticados**. Viçosa, MG: UFV, 1993. 60p. Tese de Mestrado.

FRANCO, M.C. **Análise da divergência genética em cultivares de feijão** (*Phaseolus vulgaris* L.): **resistência a bacterioses, nodulação e capacidade combinatória**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 91p. Tese de Doutorado.

GENTRY, H. S. Origin of the common bean (*P. vulgaris* L.). **Economic Botany**, New York, v.23, p.55-69, 1969.

GEORGE, M.L.; ROBERT, F.M.; BOHLOOL, B.B. Nodulation suppression by *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli in bean split-root systems. **Symbiosis**, Rehovot, v.12, p.95-105, 1992.

GEORGE, T.; SINGLETON, P.W. Nitrogen assimilation traits and dinitrogen fixation in soybean and common bean. **Agronomy Journal**. Madison, v.84, p.1020-1028, 1992.

GEPTS, P.; BLISS, F.A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. **Economic Botany**, New York, v.40, p.469-478, 1986.

GEPTS, P.; OSBORN, T.C.; RASHKA, K.; BLISS, F.A.. Eletrophoretic analysis of phaseolin variability in wild forms and landraces of the common bean, *Phaseolus vulgaris*: evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, New York, v.40, p.451-468, 1986.

GEPTS, P.A.; DEBOUCK, D. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: A. Van Schoonhoven na O.Voysest, eds., Common beans: research for crop improvement. C.A.B. Int., Wallingford, U.K. and CIAT, Cali, Colombia. 1991.

GLOUDEMANS, T. 7 BISSELING, T. Plant gene expression in early stages of the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Science**, Calcutta, v.65, p.1-14, 1989.

GÖTTFERT, M. Regulation and function of rhizobial nodulation genes. **FEMS Microbiological Reviews**, Washington, v.104, p.39-64, 1993.

GOVERS, F.; MOERMAN, M.; DOWNIE, J.A.; HOYKAAS, P.; FRANSEN, H.J.; LOUWERSE, J.; Van KAMMEN, A.; BISSELING, T. *Rhizobium* nod genes are involved in inducing and early nodulin gene. **Nature**, London, v.323, p.564-566, 1986.

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

GYÖRGYPAL, Z.; KONDOROSI, E.; KONDOROSI, A. Diverse signal sensitivity of NodD protein homologs from narrow and broad host range rhizobia. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul- MN, v.4, p.356-364, 1991.

HARDARSON, G.; BLISS, F.A.; CIGALES-RIVERO, M.R.; HENSON, R.A.; KIPE-NOLT, J.A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PEÑA-CABIALES, 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, p.59-70, 1993.

HENSON, R.A.; BLISS, F.A. Effects of N fertilizer application timing on common bean production. **Fertilizer Research**, The Netherlands, v. 29, p. 133-138, 1991.

HERRIDGE, D.F.; DANSO, S.K.A. Enhancing crop legume N<sub>2</sub> fixation through selection and breeding. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.51-82, 1995.

HOLLINGSWORTH, R.I.; PHILLIP-HOLLINGSWORTH, S.; DAZZO, F.B. Isolation, characterization and structural elucidation of a "nod signal" excreted by *Rhizobium trifolii* ANU843 which induces root hair branching and nodule-like primordia in axenic white clover seedlings. In: **8<sup>th</sup> International Congress of Nitrogen Fixation**, Knoxville, TN, p.16, 1990.

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

HUNGRIA, M. & FRANCO, A.A. Nodule senescence in *Phaseolus vulgaris* L. **Tropical Agriculture**, London, v.65, p.341-346, 1988.

HUNGRIA, M.; JOHNSTON, A.W.B.; PHILLIPS, D.A. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on nodD-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v.5, p.199-203, 1992.

HUNGRIA, M.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Anthocyanidins and flavonols, major nod gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.751-758. 1991a.

HUNGRIA, M.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. *Rhizobium* nod gene inducers exsuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.759-764. 1991b.

HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Ontogenia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, p.715-730, 1986.

HUNGRIA, M. & PHILLIPS, D.A. Effects of a seed color mutation on rhizobial nod-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.6, p.418-422, 1993.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. & ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: **Biologia dos solos dos Cerrados**. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, D.F. p.188-294, 1997.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, v. 7 , 1995.

JORDAN, D.C. Family III. Rhizobiaceae. In: **N.R. Krieg & J.G. Holt, eds., Bergey's manual of systematic bacteriology**. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, v.1, p.234-242, 1984.

KAIRALLAH, M.M.; SEARS, B.B.; ADAMS, M.W. Mitochondrial restriction fragment length polymorphisms in wild *Phaseolus vulgaris* L. In: **insighs on the domestication of the common bean**. , New York, v.84, p.915-922, 1992.

KAPLAN, L.; LYNCH, T.F.; SMITH, C.E. Early cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) from an intermontane peruvian valley. **Science**, Washington, v.179, p.76-77, 1973.

KEEN, N.T.; TAMAKI, S.; KOBAYASHI, D.; GERHOLD, D.; STAYTON, M.; SHEN, H.; GOLD, S.; LORANG, J.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; DAHLBECK, D.; STASKAWICZ, B. Bacteria expressing avirulence gene D produce a specific elicitor of the soybean hypersensitive reaction. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul - MN, v. 3, p. 112-121, 1990.

KIPE-NOLT, J.A.; GILLER, K.E. A field evaluation using the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution method of lines of *Phaseolus vulgaris* L. bred for increased nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.107-114, 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, p.103-106, 1993.

KIPE-NOLT, J.A.; MONTEALEGRE, C.; TOHME, J. Restriction of nodulation by the broad host range *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 in wild accessions of *Phaseolus vulgaris* L. **New Phytologist**, Oxford, v.120, p.489-494, 1992.

KOENIG, R.L. & GEPTS, P. Alloenzyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v.78, p.809-817, 1989.

KOENIG, R.L.; SINGH, S.P. & GEPTS, P. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botanic**, New York, v.44, p.50-60, 1990.

KOSSLAK, R.M. & BOHLOOL, B.B. Suppression of nodule development of one side of a split-root system of soybeans caused by prior inoculation of the other side. **Plant Physiology**, Bethesda, v.75, p.125-130.

LINDGREN, P.B.; PEET, R.C.; PANOPOULOS, N.J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 168, p. 512-522, 1986.

LLACA, V.; DELGADO SALINAS, A.; GEPTS, P. Chloroplast DNA as an evolutionary marker in the *Phaseolus vulgaris* complex. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 88, p. 646-652, 1994.

- LONG, S.R. *Rhizobium* genetics. Annual Review of Genetics, v. 23, p.483, 1989.
- LONG, S. & STASKAWICZ, B.J. Prokaryotic plant parasites. **Cell**, Cambridge, v.73, p.921-935, 1993.
- MARIOT, E.J. Ecofisiologia do feijoeiro. In: O feijão no Paraná. **Fundação Instituto Agrônômico do Paraná**, Londrina, Paraná, 303p. IAPAR, Circular, 63. p. 25-41, 1989.
- MARTÍNEZ, E.; LAEREMANS, T.; POUPOT, R.; ROGEL, M.A.; LOPEZ, L.; GARCIA, F.; VANDERLEYDEN, J.; PROMÉ, J.C.; LARA, F. Nod metabolites and other compounds excreted by *Rhizobium* spp. In: **TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E., Eds. Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: kluwer Academic Publishers, p.281-286, 1995.
- MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PALACIOS, R. The *Rhizobium* genome. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.9, p.59, 1990.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H. & PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.
- MICHIELS, J. & VANDERLEYDEN, J. Molecular basis of the establishment and functioning of a N<sub>2</sub> fixing root nodule. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.10, p.612-630, 1994.
- MIRANDA COLÍN, S. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (Frijol comum). **Agrociencia**, Chapingo, v.1, p.99-109, 1967.

MONTEALEGRE, C.; KIPE-NOLT, J. Ability of selected accessions of *Phaseolus vulgaris* L. to restrict nodulation by particular rhizobia. **Archives Microbiology**, New York, v.162, p.352-356, 1994.

MULLIGAN, J.T.; LONG, S.R. A family of activator gene regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Genetics**, Maryland, v.122, p.7-18, 1989.

NODARI, R.O.; KOINANGE, E.M.K., KELLY, J.D. & GEPTS, P. Towards na integrated linkage map of common bean. 1. Development of genomic DNA probes and levels of restriction fragment length polymorphism. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v.84, p.186-192, 1992.

NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.L. & GEPTS, P. Towards na integrated linkage map of common bean. 2. Development of an RFLP-based linkage map. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v.85, p.513-520, 1993a.

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

OLSSON, J.E.; NAKAO, P.; BOHLOOL, B.B. & GRESSHOFF, P.M. Lack of systemic suppression of nodulation in split root systems of supernodulation soybean (*Glycine max* L. Merr.) mutants. **Plant Physiology**, Bethesda, , v.90, p.1347-1352.,1989.

PACOVSKY, R.S.; BAYNE, H.G. & BETHLENFALVAY, G.J. Symbiotic interactions between strains of *Rhizobium phaseoli* and cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. **Crop Science**, Madison, v.24, p.101-105, 1984.

PARK, S.J.; BUTTERY, B.R. Inheritance of nitrate-tolerant supernodulation in EMS-induced mutants in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal Heredity**, Washington, v.80, p.486-488, 1989.

PARNISKE, M.; PAUSCH, G.; WERNER, D. Changes in flavonoid pattern of root hairs of *Glycinie max* in response to symbiotic infection with *Bradyrhizobium japonicum*. In: **BOTHE, H.; de BRUIJN, F.J.; NEWTON, W.E., eds., Nitrogen fixation: Hundred years after, Stuttgart, New York: Gustav Fischer**, p. 466, 1988.

PARNISKE, M.; AHLBORN, B.;L WERNER, D. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 3432-3439, 1991.

PARNISKE, M.; ZIMMERMANN, C.; CREGAN, P.B.; WERNER, D. Hypersensitive reaction of nodule cells in the *Glycine* sp X *Bradyrhizobium japonicum*-symbiosis occurs at the genotype-specific level. **Botanica Acta**, Brasília, v. 103, p. 143-148, 1990.

PEDALINO, M.; KIPE-NOLT, J. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) mutants defective in root nodule formation. I Physiological characterization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.44, p. 1007-1014, 1993.

PEDALINO, M.; KIPE-NOLT,J.; FRUSCIANTE, L.; MONTI, L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) mutants defective in root nodule formaton. II Genetic analysis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.44, p. 1015-1020, 1993.

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

PEREIRA, P.A.A.; BURRIS, R.H.; BLISS, F.A.  $^{15}\text{N}$ -determined dinitrogen fixation potential of genetically diverse bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, Hague, v.120, p.171-179, 1989.

PEREIRA, P.A.A.; MIRANDA, B.D.; ATTEWELL, J.R.; KMIECIK, K. A.; BLISS, F.A.. Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, Hague, v.148, p.203-209, 1993.

PETERS, N.K.; FROST, J.W.; LONG, S.R.A. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Science**, Washington, v.233, p.977-980, 1986.

PIERCE, M. & BAUER, W.D. A rapid regulatory response governing nodulation in soybean. **Plant Physiology**, Bethesda, v.73, p.286-290, 1983.

PLANK, J.E. Van der. Plant diseases: epidemics and control. **Academic Press**, New York, 349p, 1963.

PLANK, J.E. Van der. Disease resistance in plants. **Academic Press**, New York, 206 p., 1968.

RAVA, C.A. Fogo selvagem. In: Zimmermann, M.J.de O.; Rocha, M.; Yamada. Eds. **Cultura do Feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, 1988p., 589.

RENNIE, R.J.; KEMP, G.A.  $\text{N}_2$  fixation in field beans quantified by  $^{15}\text{N}$  isotope dilution. I. Effect of strains of *Rhizobium phaseoli*. **Agronomy Journal**, Madison, v.75, p.640-644, 1983a.

RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. N<sub>2</sub> fixation in field beans quantified by <sup>15</sup>N isotope dilution. II. Effect of cultivars of beans. **Agronomy Journal**, Madison, v.75, p.645-649, 1983b.

ROLFE, B.G.; GRESSHOFF, P.M. Genetic analysis of legume nodule initiation. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.39, p.297-319, 1988.

SÁNCHEZ, F.; PADILLA, J.E.; PÉREZ, H.; LARA, M. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.42, p. 507-528, 1991.

SARGENT, L.; HUANG, S.Z.; ROLFE, B.G.; DJORDJEVIC, M.A. Split-root assays using *Trifolium subterraneum* show that *Rhizobium* infection induces a systemic response that can inhibit nodulation of another invasive *Rhizobium* strain. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.1611-1619, 1987.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; RIOS, G.P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: R.S. Araújo; C.A Rava; L.F. Stone & M.J. Zimmermann, Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (POTAFOS)**, Piracicaba, p. 669-689, 1996.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, E.; RATET, P.; BUIRÉ, M.; KONDOROSI, A. Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. **International Review Cytology**, New York, p.156:1-75,1994.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.374-377, 1993.

SENGUPTA-COPALAN, C.; ESTABROOK, E.; GAMBLIEL, H.; NIRUNSUKSIRI, W.; RICHTER, H. Regulation of host gene expression during nodule development in soybeans. In: **GRESSHOFF, P.; ROTH, L.E.; STACEY, G.; NEWTON, W.E.**, eds, **Nitrogen fixation: achievements and objectives. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation, Knoxville, Tennessee, USA.** New York, p. 701-708, 1990.

SHARIFI, E. Parasitic origins of nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbioses. A review of the evidence. **BioSystems**, Limerick, v.16, p.269-289, 1984.

SILVA, L.O.; SINGH, S.P.; PASTOR-CORRALES, M.A. Inheritance of resistance to bacterial blight in common bean. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 78, p.619-624. 1989.

SINGH, S.P. Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, New York, v.43, p.39-57, 1989.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, FABACEAE). **Economic Botany**, New York, v.45, p.379-396, 1991a.

SINGH, S.P.; GUTIÉRREZ, J.A.; MOLINA, A.; URREA, C.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated *Phaseolus vulgaris*. II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, Madison, v.31, p.23-29, 1991b.

SKROCH, P.W.; DOBERT, R.C.; TRIPLETT, E.W.; NIENHUIS, J. Polymorphism of the leghemoglobin gene in *Phaseolus* demonstrated by polymerase chain reaction amplification. **Euphytica**, Holanda, v.69, p. 177-183, 1993.

SMIT, G.; KIJNE, J.W.; LUGTENBERG, B.J.J. Both cellulose fibrils and  $\text{Ca}^{+2}$ -dependent adhesin are involved in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, p. 4294-4301, 1987.

SONNANTE, G.; STOCKTON, T.; NODARI, R.O. Evolution of genetic diversity during the domestication of common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical Applied Genetics**, New York, v.89, p.629-635, 1994.

SPAINK, H.P.; SHEELEY, D.M.; Van BRUSSEL, A.A.N.; GLUSHKA, J.; YORK, W.S.; TAK, T.; GEIGER, O.; KENNEDY, E.P.; REINHOLD, V.N.; LUGTENBERG, B.J.J. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. **Nature**, London, v.354, p.125-130, 1991.

SPRENT, J.I. Which is *Rhizobium*, um novo gênero nodulando eficientemente o feijoeiro em condições de estresse térmico. In: **XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 11-15 de novembro de 1997, Rio de Janeiro, Brasil. Sociedade Brasileira de Microbiologia**, 1997.

SWART, S.; LUGTENBERG, B.J.J.; SMIT, G.; KIJNE, J.W. Rhicadhesin-mediated attachment and virulence of an *Agrobacterium tumefaciens* chvB mutant can be restored by growth in a highly osmotic medium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 3816-3819, 1994.

TSAI, S.M.; CONCEIÇÃO, A.S.; MOON, D.H. Estratégias para o melhoramento da leguminosa hospedeira para fixação biológica do  $\text{N}_2$ . In: **HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, REUNIÃO DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM E BRADYRHIZOBIUM**, Londrina: IAPAR, v.6, p.7-11, 1994.

TORO, O., JOSEPH, T.; DEBOUCK, D.G. Wild bean (*Phaseolus vulgaris* L.): description and distribution. **International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) and Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)**, Cali, Colômbia. 106p, 1990.

VALLEJOS, C.E.; SAKIYAMA, N.S.; CHASE, C.D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, New York, v.131, p.733-740, 1992.

VAN BRUSSEL, A.A.N.; RECOURT, K.; PEES, E.; SPAINK, H.P.; TAK, T.; WIJFFELMAN, C.A.; KIJNE, J.W.; LUGTENBERG, B.J.J. A biovar-specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of *Vicia sativa* subsp. nigra. **Journal Bacteriology**, Washington, v.172, p.5394-5401, 1990.

VANCE, C.P. *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease? **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.37, p.399-424, 1983.

VAN GIJSEGEM, F.; GENIN, S.; BOUCHER, C. Evolutionary conservation of pathogenicity determinants among plant and animal pathogenic bacteria. **Trends Microbiology**, Oxford, v. 1, p.175-180, 1993.

VAN RHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J. The *Rhizobium*-plant symbiosis. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, p.124-142, 1995.

VASCONCELOS, M.J.V.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; VIEIRA, C. Genetic diversity of the bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA based molecular markers. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.19, p.447-451, 1996.

WERNER, D. Physiology of nitrogen fixing legume nodules: compartments and functions. In: G. Stacey, R.H. Burris & H.J. Evans, eds., **Biological Nitrogen Fixation**. New York, p. 399-431, 1992.

WITTY, J.F.; GILLER, K.E. Evaluation of errors in the measurement of biological nitrogen fixation using <sup>15</sup>N fertilizer. In IAEA/FAO, Stable Isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies. **International Atomic Energy Agency**, Vienna, p. 59-72, 1991.

YOKOYAMA, L.P.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura. In: R.S. Araújo; C.A Rava; L.F. Stone & M.J. Zimmermann, Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (POTAFOS)**, Piracicaba, 786p. 1996.

ZIMMERMANN, M.J.; CARNEIRO, J.E.; DEL PELOSO, M.J.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; SATORATO, A.; PEREIRA, P.A.A. Melhoramento genético e cultivares. In: R.S. Araújo; C.A Rava; L.F. Stone & M.J. Zimmermann, Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (POTAFOS)**, Piracicaba, 786p. 1996.

ZIMMERMANN, M.J.; TEIXEIRA, M.G. Origem e evolução. In: R.S. Araújo; C.A Rava; L.F. Stone & M.J. Zimmermann, Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (POTAFOS)**, Piracicaba, 786p. 1996.