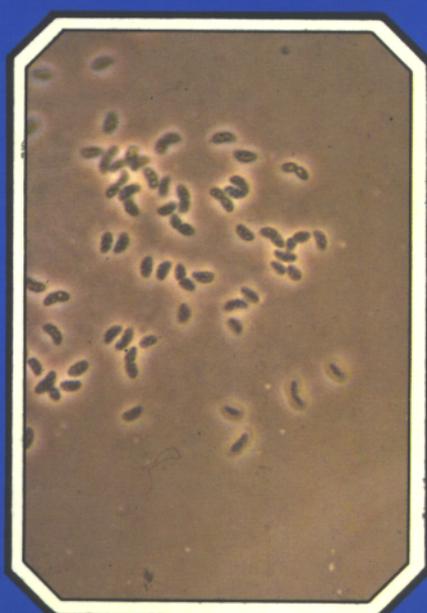
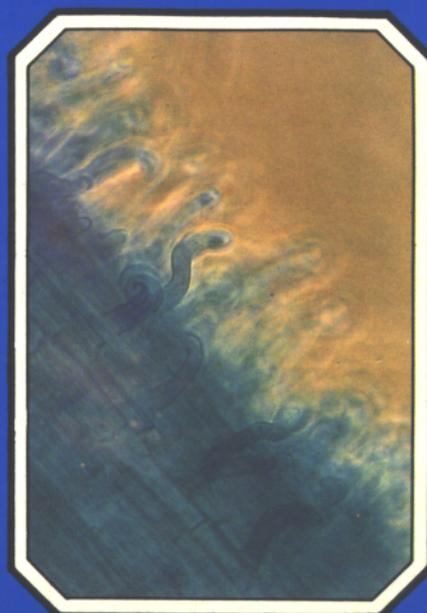
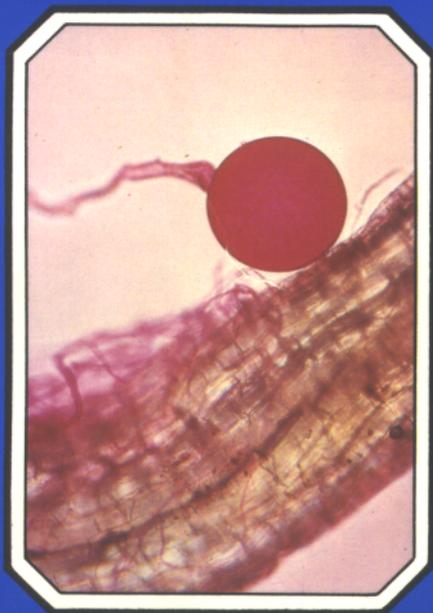


MANUAL DE MÉTODOS EMPREGADOS EM ESTUDOS DE MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA



CAPÍTULO 15

TÉCNICAS DE MELHORAMENTO DA PLANTA HOSPEDEIRA PARA INCREMENTAR A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO: O CASO DO FEIJOEIRO

Pedro A. Arraes Pereira¹

15.1. Introdução

Embora, na maioria das leguminosas, a deficiência de nitrogênio possa ser tão limitante à produtividade, como as doenças, nos programas de melhoramento, geralmente, a resistência a doenças tem sido prioritária em relação a fatores que aumentam a eficiência da fixação de N_2 (Pereira et al., 1993).

O método mais simples de melhoramento para aumentar a capacidade de fixação do feijoeiro é identificar "landraces" (mistura de linhas puras que são cultivadas, há longo tempo, pelos agricultores) com alta capacidade de fixação de N_2 adaptadas para a região. Muitas vezes, estas landraces possuem defeitos, como baixa resistência a algumas doenças e baixo potencial produtivo. Assim, cabe ao melhorista transferir, usando métodos apropriados de melhoramento, essas outras características das cultivares locais com alta capacidade de fixação de N_2 . Por outro lado, se as cultivares de feijão recomendadas não apresentarem alta capacidade de fixação de N_2 , o melhorista deve traçar uma estratégia para conseguir incorporar o alto potencial de fixação de N_2 nas cultivares locais.

Nestes últimos 15 anos, diversos estudos de muitos programas identificaram genótipos de feijão superiores para fixação biológica de N_2 . Progenitores superiores com maior capacidade de fixação de N_2 são encontrados, com razoável abundância, nos diferentes tipos de grão comercialmente aceitos no Brasil (Franco & Döbereiner, 1967; Pessanha et al., 1972; Westerman & Kolar, 1978; Graham & Rosas, 1979; Pereira, 1982; Attewell & Bliss, 1985; St. Clair, 1986; Pereira & Bliss, 1989; Pereira et al., 1993).

São poucos, porém, os estudos sobre herdabilidade e os efeitos da interação genótipos x ambiente conduzidos com caracteres relacionados à fixação de N_2 pelo feijoeiro em condições de campo. Um desses estudos indica que a interação entre famílias e anos para o caractere da atividade da nitrogenase, avaliado pelo método de redução de acetileno, foi significativa em condições de campo (McFerson, 1983), assim como a herdabilidade, no sentido amplo, para redução de acetileno e produtividade. Entretanto, as estimativas da herdabilidade para características relacionadas com a fixação de N_2 são de intermediárias a baixas, sugerindo métodos de melhoramento em que as unidades de seleção possam ser avaliadas em vários ambientes.

¹ Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

Finalmente, para identificação de "landraces" ou das famílias de feijão superiores para fixação biológica de N_2 , o ponto mais importante é que os ensaios de competição de cultivares devem ser conduzidos em solos com baixo teor de nitrogênio, para favorecer o processo de seleção de famílias superiores para fixação de N_2 .

15.2. Técnicas de Híbridação do Feijoeiro

A maioria dos cruzamentos   efetuada em casa de vegeta o e telados, pois as condi es de temperatura são mais favoráveis para o sucesso da hibrida o. As sementes de feijão podem ser semeadas em vasos de plástico ou de cerâmica contendo um substrato adequado para o crescimento das plantas.

As sementes devem ser inoculadas com uma estirpe efetiva de rizóbio, além das quantidades adequadas de N, P e K e dos micronutrientes Ca, Zn, Bo, Mg e Mo, particularmente importantes para o crescimento das plantas de feijão. Solos com alto teor de alumínio e baixo pH devem ser evitados. O pH do solo deve estar na faixa de 6 a 6,5.

As plantas de feijão são bastante sensíveis ao excesso e   falta de  gua. A falta de água pode causar o aborto de flores e de pequenas vagens já fertilizadas (Coyne, 1968). A alta umidade reduz a disseca o das flores, depois da emascula o, e conduz a uma alta porcentagem de pega dos cruzamentos. A rega das bancadas e do piso das casas de vegeta o, em dias de muito calor, aumenta a propor o de sucesso nos cruzamentos.

Quando são efetuados cruzamentos de feijões silvestres, ou culturas de ciclos muito diferentes, com feijão cultivado, torna-se importante o escalonamento do plantio dos progenitores machos e fêmeas, para que haja coincidência da flora o. Neste aspecto, deve-se observar que o feijoeiro comum   uma planta originária de dias curtos e baixas latitudes.

A faixa de temperatura ótima para reprodu o do feijoeiro varia entre 15  C e 27  C. Temperaturas abaixo de 15  C podem ocasionar botões florais muito reduzidos, dificultando a opera o do cruzamento; enquanto temperaturas acima de 30  C são danosas   flora o e   reprodu o.

Outro aspecto essencial para o sucesso dos cruzamentos   que as plantas estejam livres de doenças e pragas. Na casa de vegeta o, particularmente, ocorrem com mais freq ncia o ódio, podridões radiculares, ácaros, minador-da-folha e mosca-branca. Assim, a aplica o de defensivos adequados torna-se imprescindível.

O feijoeiro comum   uma espécie de autopoliniza o, na qual pode-se assumir que, em condi es de casa de vegeta o, não há ocorrência de fecunda o cruzada. A autopoliniza o do feijoeiro ocorre no final do período de forma o do botão floral, mais freqüentemente   noite. Logo após a autopoliniza o, o tubo polínico inicia o seu desenvolvimento (Williams, 1962). A abertura das flores ocorre nas primeiras horas da manhã, sendo este horário o mais apropriado para se fazer os cruzamentos. Para se fazer uma hibrida o artificial   necessário uma pinça fina, um pequeno vidro com álcool, fita adesiva transparente e etiquetas de relojoeiro.

O estigma é receptivo dois dias antes e um dia depois da antese. Os botões florais mais desenvolvidos, e que normalmente apresentam estrias na base, são os que devem ser escolhidos como fêmeas. Após a escolha dos botões, deve-se segurá-los com dedo o polegar e o indicador, abrir o estandarte com a pinça e forçar as asas para baixo até que o estigma saia fora da guilha, possibilitando a inserção junto ao estigma da flor fêmea de um estigma coberto de pólen da planta macho (Figura 15.1).

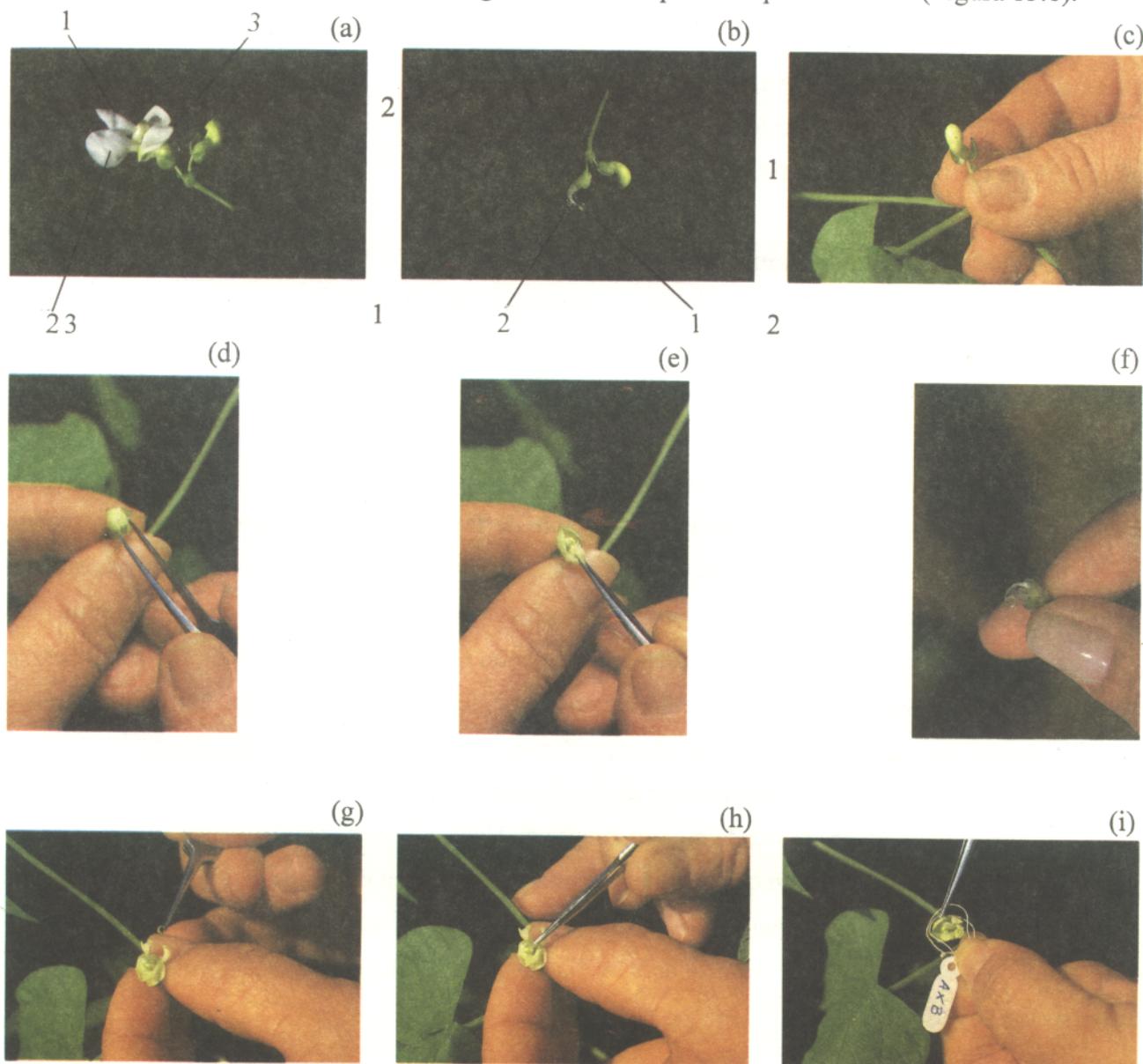


FIGURA 15.1. Estrutura floral do feijoeiro e etapas no cruzamento do feijao: (a) estrutura floral do feijoeiro: 1) guilha; 2) estandarte; e 3) asas; (b) 1) estigma; e 2) anteras; (c) botão floral no estágio ideal para fazer cruzamento; (d) abertura da flor para fazer cruzamento; (e) pressão das asas com a pinça para o aparecimento do estigma; (f) estigma coberto de grão de pólen a ser usado para a polinização; (g) e (h) polinização inserindo-se o estigma com grão de pólen junto ao estigma da flor; e (i) etiquetagem da flor.

Em seguida, para evitar dissecação, borrifa-se com um pulverizador de plantas ornamentais e coloca-se fita isolante transparente no botão floral polinizado. Para identificar o cruzamento, usam-se as etiquetas de relojoeiro, sempre com o nome da fêmea em primeiro lugar e, depois, o do macho. É importante retirar todos os outros botões florais do mesmo ráculo onde foi feito o cruzamento. Diariamente, deve-se eliminar as flores abertas e as pequenas vagens provenientes de autopolinização. Nunca se deve fazer muitos cruzamentos por planta, para evitar competição entre as vagens e propiciar maior número de sementes por vagem.

A polinização cruzada pode ser feita com ou sem emasculação (Buishand, 1956). Entretanto, a eficiência da técnica sem emasculação é muito maior.

15.2.1. Método do Retrocruzamento Modificado

O método do retrocruzamento modificado, que originalmente foi proposto para estimar o número de genes que controlam uma característica quantitativa (Wehrhahn & Allard, 1965), tem sido usado para transferir genes de "background" exótico para o feijão cultivado (McFerson, 1983; Pereira & Bliss, 1989).

O método consiste em se fazer um cruzamento entre progenitor com características agrônômicas apropriadas e um progenitor com alta capacidade de fixação de N_2 (Figura 15.2). Produzem-se cerca de dez sementes F_1 , que são usadas como plantas macho para fazer o primeiro retrocruzamento com o pai recorrente, planta fêmea. Neste caso, é necessário fazer em torno de 20 cruzamentos para obterem-se 60-100 sementes RC_1 . Essas sementes deverão ser plantadas individualmente em vasos e consideradas plantas fêmeas para o segundo retrocruzamento, quando cada planta, individualmente, é cruzada com o pai recorrente pela segunda vez. Após, as sementes RC_2 , obtidas de cada uma das plantas RC_1 , são avançadas pelo método de descendência de uma semente.

A experiência do programa de melhoramento do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP) indica que, mesmo quando se usam cruzamentos bem distantes, como feijões silvestres com feijões cultivados, com apenas um retrocruzamento e duas autofecundações, as famílias são surpreendentemente uniformes, permitindo a avaliação da capacidade de fixação biológica de N_2 em ensaios com repetição.

15.2.2. Método da Descendência Única e suas Variações

Após a publicação do artigo que descreve este método, divulgado na década de 60 (Brim, 1966), quase todos os melhoristas de soja passaram a usá-lo intensivamente.

No caso do feijoeiro comum, mais recentemente, o SSD e, também, o método de linhas derivadas de F_2 têm sido utilizados para o melhoramento de diversas características, entre elas, a capacidade de fixação de N_2 .

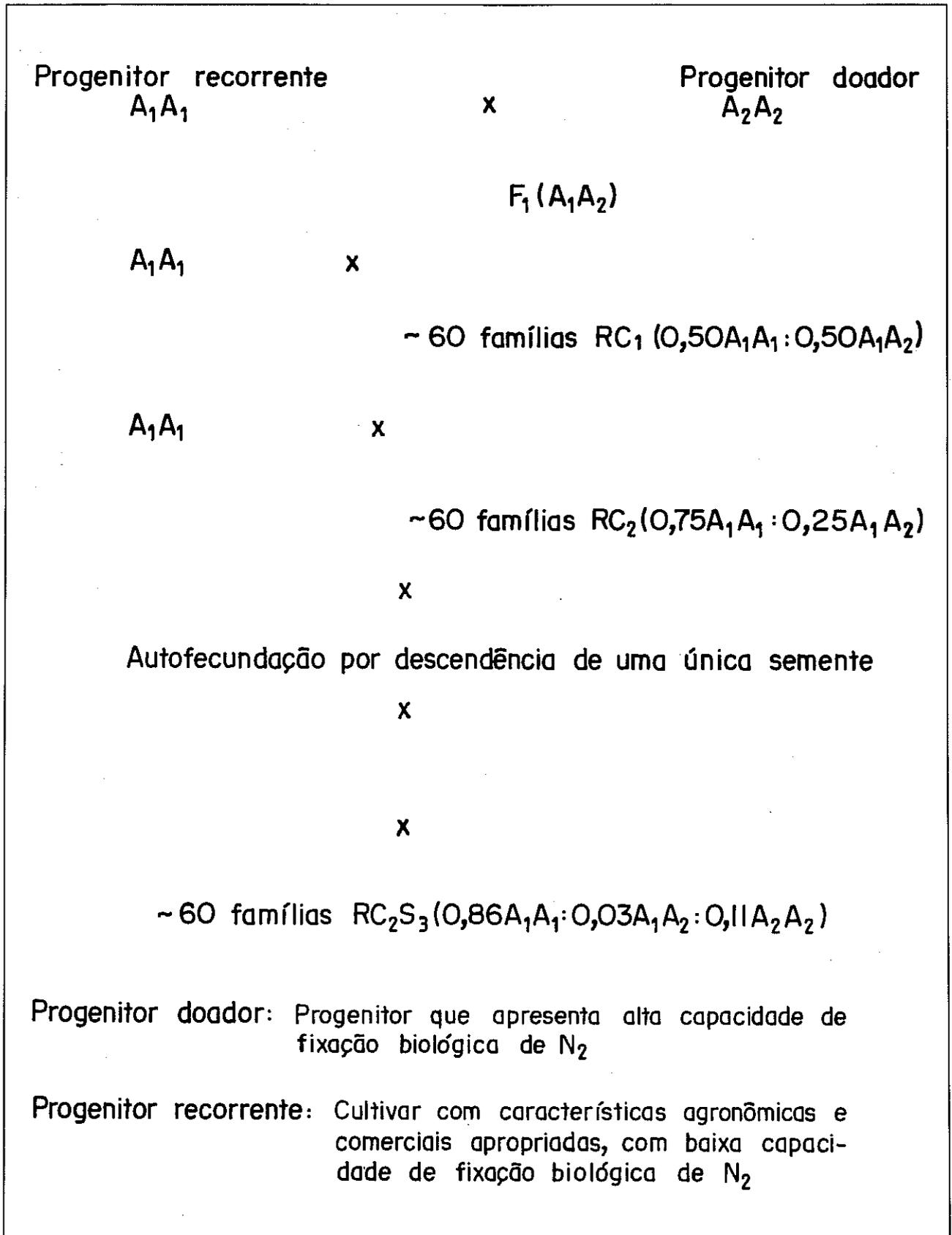


FIGURA 15.2. Método de retrocruzamento modificado.

O método consiste em fazer um cruzamento entre um progenitor com características agrônômicas desejáveis e um progenitor com alta capacidade de fixação biológica de N_2 . Produz-se em torno de 60-100 sementes F_1 que devem ser conduzidas por descendência única até a pelo menos a geração F_5 , quando as famílias F_5 podem ser avaliadas quanto à capacidade de fixação de N_2 (Figura 15.3).

Outra possibilidade é o método de famílias derivadas de F_2 . Em vez de avançarem-se as gerações F_3 , F_4 sem nenhuma seleção para fixação de N_2 , pode-se avaliar as famílias F_3 provenientes das sementes F_2 usando-se testemunhas intercalares que podem ser os pais usados no cruzamento. Colhe-se, assim, cada família em "bulk" e a partir da geração F_4 já se tem número de sementes suficientes por famílias para se avaliar a fixação em diversos ambientes (Figura 15.4).

15.3. Critérios de Seleção

A escolha do critério de seleção é uma das mais importantes decisões em um programa de melhoramento visando aumentar a fixação biológica de N_2 . A necessidade de se avaliar um grande número de plantas requer que o critério de seleção possua qualidades essenciais, como precisão, eficiência e reprodutividade em relação ao "ranking" das unidades de seleção.

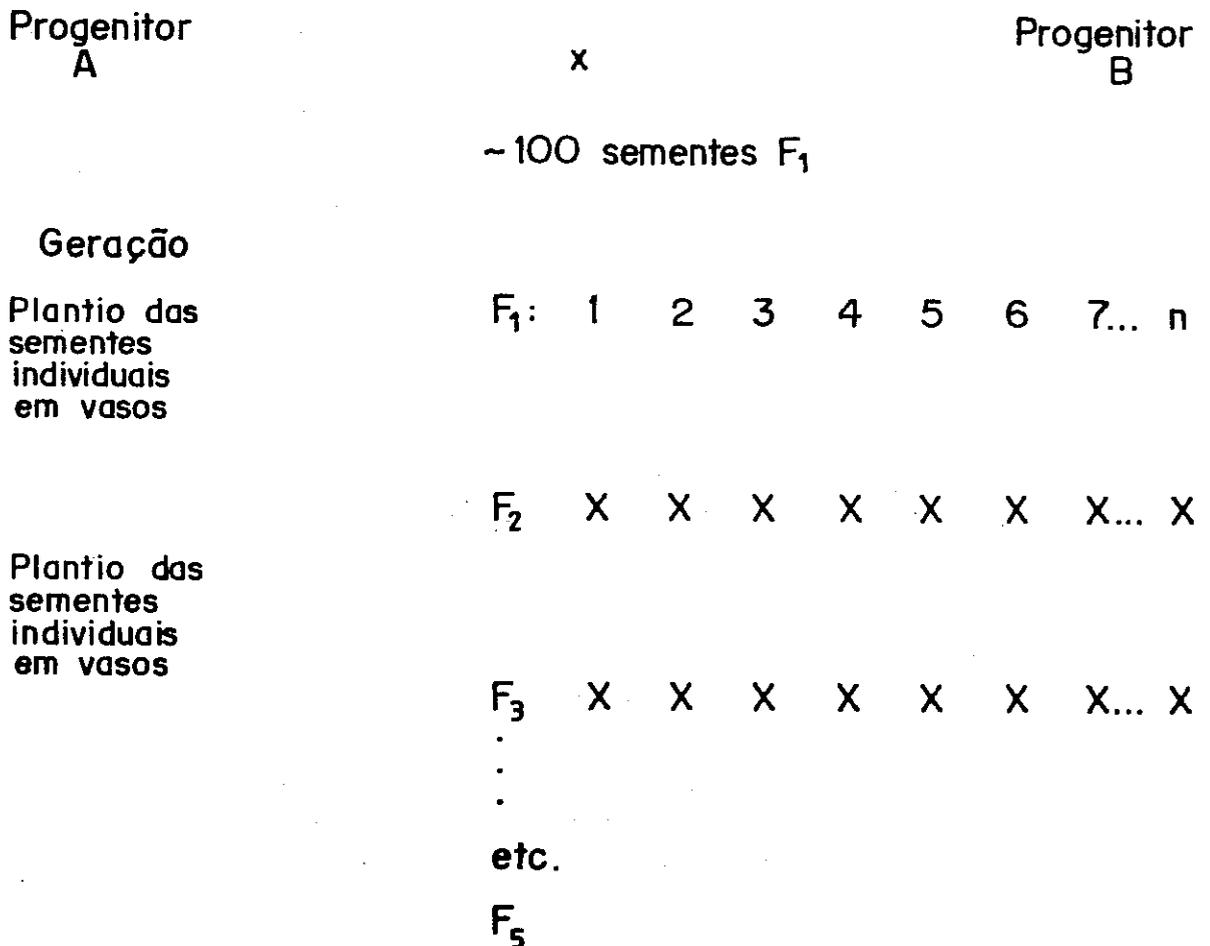


FIGURA 15.3. Método de descendência de uma semente.

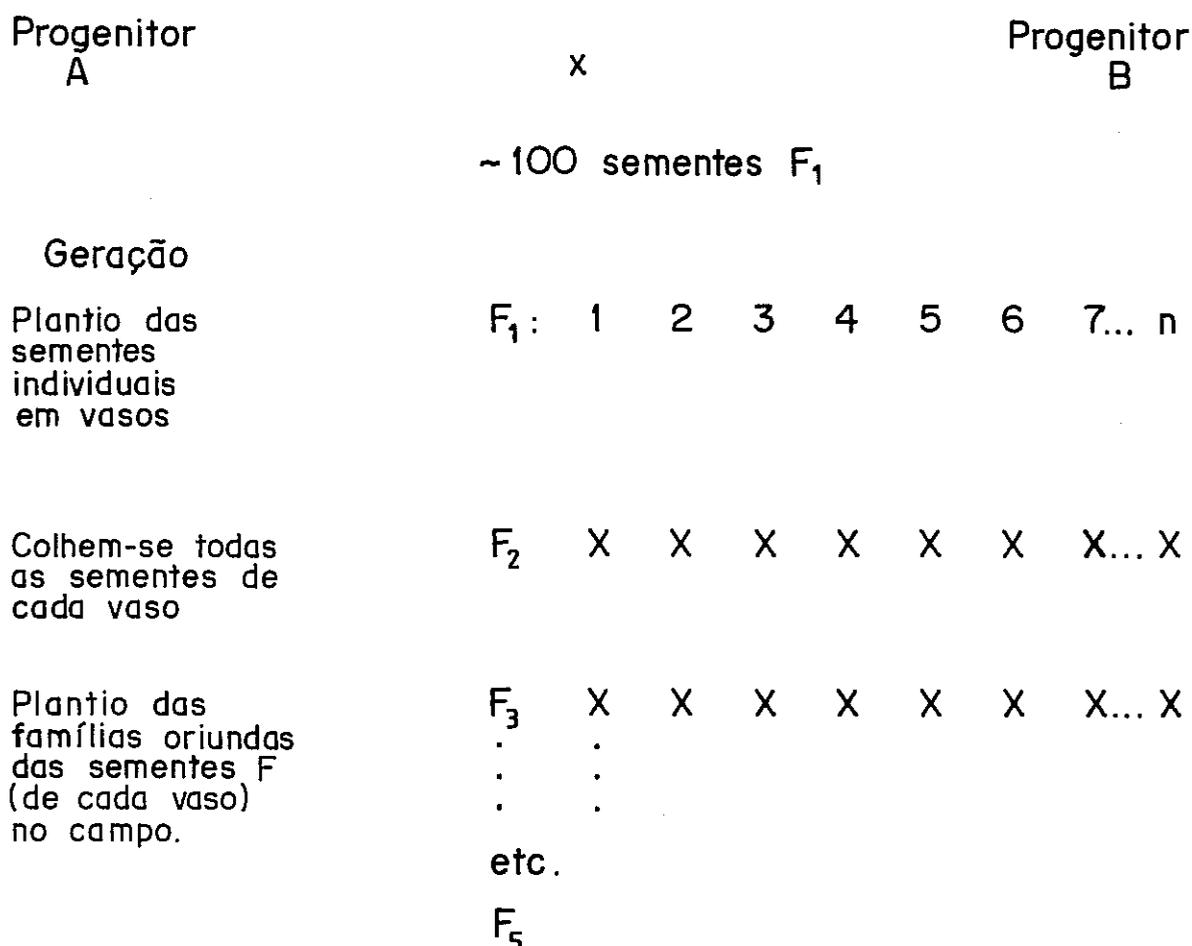


FIGURA 15.4. Método de famílias derivadas de F_1 .

Para avaliar a fixação de N_2 , podem-se dividir os critérios de seleção em dois grandes grupos: métodos diretos e métodos indiretos.

15.3.1. Métodos Diretos

São os métodos em que se usa a técnica do isótopo de nitrogênio (^{15}N). Pela sua complexidade e alto custo, este método tem aplicação limitada em programas de melhoramento, em que o número de genótipos avaliados é muito grande. Entretanto, ele pode ser útil para discriminar progenitores para os cruzamentos e linhagens superiores, geradas após diversos ciclos de seleção.

15.3.2. Métodos Indiretos

São os métodos que têm maior aplicabilidade em programas de melhoramento genético. O peso da parte aérea seca e o nitrogênio total no estágio R_7 de desenvolvimento do feijoeiro e a produtividade são os critérios que têm sido usados mais extensivamente na avaliação da capacidade de fixação de N_2 em populações segregantes. Outro critério bastante eficiente é o nitrogênio total nos

grãos, que combina o teor de N com a produtividade de grãos. Os métodos que envolvem o acúmulo de peso seco e o conteúdo de nitrogênio do feijoeiro aumentam bastante a precisão com o uso de plantas não nodulantes de feijão como testemunhas na avaliação das populações segregantes. Estas plantas não nodulantes, além de possibilitarem o conhecimento do status de nitrogênio do solo, propiciam uma estimativa bastante precisa da quantidade de nitrogênio fixada pelas populações segregantes.

As características relacionadas com a nodulação, assim como o método de redução de acetileno, também têm aplicação limitada em programas de melhoramento genético, pois são bastante trabalhosos, devido ao problema de amostragem do sistema radicular no campo. Conseqüentemente, apresentam baixa reprodutibilidade, o que dificulta a seleção dos genótipos promissores.

15.4. Referências Bibliográficas

- ATTEWELL, J.; BLISS, F.A. Host plant characteristics of common bean lines selected using indirect measures of N₂ fixation. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.S.; NEWTON, W.E. ed. **Nitrogen fixation research progress**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p.3-9.
- BRIM, C.A. A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Sci.**, v.6, p.220, 1966.
- BUIHAND, T.S. The crossing of beans (*Phaseolus* spp.). **Euphytica**, v.5, p.41-50, 1956.
- COYNE, D.P. Species hybridization in *Phaseolus*. **J. Hered.**, v.55, p.5-6, 1964.
- FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium* - feijão e influência de diferentes nutrientes. **Pesq. agropec. bras.**, v.2, p.467-474, 1967.
- GRAHAM, P.H.; ROSAS, J.C. Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agron. J.**, v.71, p.925-927, 1979.
- MCFERSON J.R. **Genetic and breeding studies of dinitrogen fixation in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Madison: University of Wisconsin, 1983. 146p. (Tese de Doutorado).
- PEREIRA, P.A.A. Fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro. **Inf. Agropec.**, v.8, p.41-48, 1982.
- PEREIRA, P.A.A.; BLISS, F.A. Selection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) for N₂ fixation at different levels of available P under field and environment-controlled conditions. **Pl. Soil**, v.115, p.72-82, 1989.
- PEREIRA, P.A.A.; MIRANDA, B.D.; ATTEWELL, J.R.; KMIĘCIK, K.A.; BLISS, F.A. Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pl. Soil**, v.148, p.203-209, 1993.

- PESSANHA, G.G.; FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J.; GROSZMAN, A.; BRITTO, D.P. Correlação negativa da nodulação com a produção de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos onde o nitrogênio é fator limitante. **Pesq. agropec. bras.**, v.7, p.49-56, 1972.
- ST. CLAIR, D.A. **Segregation, selection and population improvement for ¹⁵N-determined dinitrogen fixation ability in common bean**. Madison: University of Wisconsin, 1986. 90p.(Tese de Doutorado).
- WESTERMAN, D.T.; KOLAR, J.J. Symbiotic N₂ (C₂H₂) fixation by bean. **Crop Sci.**, v.18, p.986-990, 1978.
- WEHRHAHN, C.; ALLARD, R.W. The detection and measurement of the effect of individual genes involved in the inheritance of a quantitative character in wheat. **Genetic**, v.51, p.109-119, 1965.
- WILLIAMS, D.D.F. **Influence of soil moisture level on flower abscission, on ovule abortion and seed development in the snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Madison: University of Wisconsin, 1962. (Tese de Doutorado).