

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA**

**SIRANDO LIMA SEIDO**

**ESTUDOS BIOMÉTRICOS E DE QTL ASSOCIADOS À FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE  
NITROGÊNIO EM FEIJÃO-CAUPI**

**RECIFE – PE, BRASIL**

**2017**

**SIRANDO LIMA SEIDO**

**ESTUDOS BIOMÉTRICOS E DE QTL ASSOCIADOS À FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM FEIJÃO-CAUPI.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Agronomia, Área de concentração: Melhoramento genético de plantas.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Professor PhD. Carlos Antonio Fernandes Santos – orientador - Embrapa Semiárido, Petrolina – PE

Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior - coorientador- Embrapa Semiárido, Petrolina – PE

Professor PhD. Michael Paul Timko – University of Virginia, Charlottesville - USA

**RECIFE – PE, BRASIL**

**2017**

**Estudos biométricos e de QTL associados à fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi.**

**SIRANDO LIMA SEIDO**

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: \_\_/\_\_/\_\_

**ORIENTADOR:**

---

PhD. Carlos Antonio Fernandes Santos

**EXAMINADORES:**

---

Dr. José Luiz Sandes de Carvalho Filho

---

Dr.<sup>a</sup> Luiza Suely Semen Martins

---

Dr.<sup>a</sup> Ana Dolores Santiago de Freitas

---

Dr. Antônio Félix da Costa

**RECIFE – PE, BRASIL**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S458e Seido, Sirando Lima.  
Estudos biométricos e de QTL associados à fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi / Sirando Lima Seido. – 2017.  
136 f.; il.

Orientador: Carlos Antonio Fernandes Santos.  
Coorientador: Paulo Ivan Fernandes Júnior.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, Recife, BR-PE, 2017.  
Inclui anexo(s) e referências.

1. Vigna unguiculata. 2. SNP 3. FBN. I. Santos, Carlos Antonio Fernandes, orient. II. Fernandes Júnior, Paulo Ivan, coorient.  
III. Título

CDD 631.4

Aos meus pais Masahiro Seido e Ana Maria, minha irmã Cleide Seido e meu sobrinho que me apoiam em todas as conquistas. À minha namorada Milena, pelo companherismo e dedicação. E aos meus amigos que estiveram sempre disponíveis quando precisei,

## **DEDICO**

Que nossos esforços  
desafiem as impossibilidades e  
mantenha-nos felizes.

**Sirando L. Seido**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e pelos sonhos que tenho realizado;

Aos meus pais, pelo carinho e apoio em todos os momentos;

À Embrapa Semiárido, ambiente onde tive todo o suporte técnico e incentivo para o desenvolvimento desse trabalho;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, que me permitiu realizar este trabalho;

Ao PhD. Carlos Antonio Fernandes Santos, pela orientação na realização do trabalho e pelos conhecimentos transmitidos;

Ao PhD. Michael P. Timko, pela orientação na realização do trabalho durante o período de bolsa PDSE na University of Virginia;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos de doutorado;

Aos amigos do laboratório de Genética: Danillo, Robson, Washington, Soniane, Roberta, Andressa, Jamile pelo convívio e ajuda nos trabalhos;

Aos técnicos do laboratório de genética: Paloma e Carlos;

E a todos os que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho

**Muito obrigado!**

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO III: MAPA DE LIGAÇÕES GENÉTICAS E MAPEAMENTO DA EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM FEIJÃO-CAUPI

**Figura 1.** Painel A: folhas de plantas não eficientes (amareladas) para N<sub>2</sub> (esquerda) e folhas de plantas eficientes (verdes) para fixação de N<sub>2</sub> (direita); Painel B: nódulos de plantas eficientes (esquerda) e nódulos de plantas ineficientes (direita) para fixação de N<sub>2</sub>.....90

**Figura 2.** Grupos de ligação (Chr\_) 1, 2, 3, 4 e 5 construídos com marcadores SNPs e gene *cpi* em população F<sub>2</sub> do cruzamento IC-1 x BRS Maratao.....91

**Figura 3.** Grupos de ligação (Chr\_) 6, 7, 8, 9, 10 e 11 contruídos com marcadores SNPs e gene *cpi* em população F<sub>2</sub> do cruzamento IC-1 x BRS Marataoã.....92

**Figura 4.** Posicionamento do gene *cpi* no grupo 11 do mapa de ligações consenso para feijão-caupi.....93

### CAPÍTULO IV: MAPEAMENTO DE QTL ASSOCIADOS A EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM FEIJÃO-CAUPI

**Figura 1.** Grupo de ligação genética 11 do feijão-caupi com mapeamento QTL para os caracteres nitrogênio acumulado (NA), massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa fresca de nódulos (MFN) da fixação biológica de nitrogênio em população F<sub>2</sub> de IC-1 x BRS Marataoã.....112

**Figura 2.** Análise de QTL, usando o método de mapeamento de intervalo composto inclusivo (ICIM) para os caracteres nitrogênio acumulado (NA), massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa fresca de nódulos (MFN) da fixação biológica de nitrogênio em população F<sub>2</sub> de IC-1 x BRS Marataoã: Painel A – Onze grupos de ligação, e B – Grupo de ligação 11 do feijão-caupi.....113

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II: ANÁLISE GENÉTICA PARA EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM FEIJÃO-CAUPI

**Tabela 1.** Teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para número de plantas eficientes (folha verde) e ineficientes (folha amarela), nas gerações obtidas a partir dos cruzamentos IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante .....64

**Tabela 2.** Estimativas das médias e variâncias para caracteres relacionados à FBN em feijão-caupi nos parentais e gerações  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_1$  e  $RC_2$  para os cruzamentos IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante .....65

**Tabela 3.** Variâncias (Var), herdabilidades restrita/ampla ( $h^2$ ) e valores (Val) de acordo com as médias e variâncias de gerações, para dois cruzamentos IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante em feijão-caupi. Dados transformados para  $\log(x + 1)$  .....66

**Tabela 4.** Fonte de variação (FV), quadrado médio (QM) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos pela decomposição não ortogonal da soma de quadrados de parâmetros pelo método de eliminação de Gauss para eficiência da fixação de  $N_2$  em dois cruzamentos de feijão-caupi .....67

**Tabela 5.** Número mínimo de genes ou fatores baseados em diferentes estimadores (n) de Lande (1981) e Mather e Jinks (1982) para características relacionadas com a fixação de  $N_2$  em dois cruzamentos (IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante)..68

**Tabela 6.** Coeficientes de correlação simples entre pares de características relacionados à fixação de  $N_2$  para os cruzamentos IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante.....69



### **CAPÍTULO III: MAPA DE LIGAÇÕES GENÉTICAS E MAPEAMENTO DA EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM FEIJÃO-CAUPI**

**Tabela 1.** Grupos de ligação genéticas com 910 marcadores SNPs na população F<sub>2</sub> do cruzamento IC-1 x BRS Marataoã.....89

### **CAPÍTULO IV: MAPEAMENTO DE QTL ASSOCIADOS A EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM FEIJÃO-CAUPI**

**Tabela 1.** Média, amplitude e teste Shapiro-Wilk (S-W) de plantas eficientes e ineficientes para fixação biológica de nitrogênio, para os caracteres nitrogênio acumulado (NA), massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa fresca de nódulos (MFN) nas populações F<sub>2</sub> de IC-1 x BRS Marataoã (n = 174) e IC-1 x BRS Pujante (n=175) fenotipadas 40 dias após emergência das plântulas.....109

**Tabela 2.** Grupo de ligação genética, posição (cM), marcadores SNPs flanqueadores, coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), LOD score e efeito de aditividade (add) para mapeamento QTL dos caracteres nitrogênio acumulado (NA), massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa fresca de nódulos (MFN) da fixação biológica de nitrogênio em população F<sub>2</sub> de IC-1 x BRS Marataoã.....110

**Tabela 3.** Sequências dos Tetra-Primers ARMS, condições PCR e tamanho esperado dos amplicons em validação de QTL detectados na população F<sub>2</sub> de IC-1 x BRS Marataoã em indivíduos F<sub>2</sub> de IC-1 x BRS Pujante.....111

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AFLP</b>	Amplified fragment length polymorphism
<b>AMS</b>	Análise de marcador simples
<b>ARMS</b>	Amplification Refractory Mutation System
<b>cDNA</b>	DNA clone
<b>CONAB</b>	Companhia Nacional de Abastecimento
<b>CTAB</b>	Brometo de cetiltrimetilamônio
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de cobre
<b>EST</b>	Expressed Sequence Tags
<b>FBN</b>	Fixação biológica de nitrogênio
<b>FV</b>	Fonte de variação
<b>HBO<sub>3</sub></b>	Ácido bórico
<b>ICIM</b>	Mapeamento de intervalo composto inclusivo
<b>Kb</b>	Kilobyte
<b>LOD</b>	Logarithm (base 10) of odds
<b>MA</b>	Maratão
<b>Mb</b>	Mega pares de bases
<b>MFN</b>	Matéria fresca de nódulos
<b>MIC</b>	Mapeamento de intervalo composto
<b>MICI</b>	Mapeamento de intervalo composto inclusivo
<b>MIS</b>	Mapeamento de intervalo simples
<b>MMI</b>	Mapeamento de múltiplos intervalos
<b>MSPA</b>	Matéria seca da parte aérea
<b>N</b>	Nitrogênio
<b>NA</b>	Nitrogênio acumulado
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NH<sub>3</sub></b>	Amônia ou Amoníaco
<b>NH<sub>4</sub></b>	Amônio
<b>NN</b>	Número de nódulos
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction

<b>PJ</b>	Pujante
<b>QM</b>	Quadrado médio
<b>QTL</b>	Quantitative trait loci
<b>RAPD</b>	Random amplified polymorphic DNA
<b>RC</b>	Retrocruzamento
<b>RFLP</b>	Restriction Frangment length polymorphism
<b>RIL</b>	Recombinant imbreeding line
<b>SAM</b>	Seleção assistida por marcadores
<b>SNP</b>	Single nucleotide polymorphism
<b>SSD</b>	Single seeds descent
<b>SSR</b>	Single sequence repeats
<b>TA</b>	Temperatura de anelamento
<b>YM</b>	Yeast extract manitol

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xiv
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>1</b>
1.Introdução geral .....	2
2. Referencial teórico .....	4
2.1 Feijão-caupi, classificação e origem.....	4
1.2 Morfologia e biologia floral.....	5
1.3 Cultivo e importância econômica.....	6
1.4 Fixação biológica de nitrogênio .....	7
1.4.1 O grupo rizóbio .....	9
1.4.2 Genes do hospedeiro .....	10
1.5 Estimação dos parâmetros genéticos na expressão de caracteres quantitativos	11
1.6 Melhoramento para a fixação biológica de nitrogênio .....	13
1.7 Marcadores moleculares .....	16
1.7.1 Mapa de ligação.....	18
1.7.2 Mapa de ligação do feijão-caupi .....	20
1.7.3 Ligação e análise de locos quantitativos.....	22
1.7.4 QTL relacionado com a fixação de nitrogênio.....	24
1.8 Referências bibliográficas .....	27
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>41</b>
Título .....	42
Resumo:.....	42
Title.....	44
Abstract: .....	44
Introdução .....	45
Material genético e cruzamentos.....	46
Inoculação .....	47
Variáveis analisadas .....	47
Análises estatísticas.....	48
Resultados .....	49
Discussão.....	52
Referências .....	57
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>70</b>
Título .....	70

Resumo.....	71
Title.....	73
Abstract.....	73
Introdução.....	74
Material e métodos.....	76
Material vegetal.....	76
Genotipagem.....	76
Desenvolvimento do mapa de ligação.....	77
Resultados e discussão.....	78
Referências.....	84
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>92</b>
Título.....	93
Resumo.....	93
Title.....	93
Abstract.....	93
Introdução.....	94
Material e métodos.....	96
Genotipagem.....	96
Desenvolvimento do mapa de ligação.....	97
Mapeamento e Validação de QTL.....	98
Resultados.....	98
Fenotipagem.....	98
Identificação de QTL e mapa de ligação.....	99
Discussão.....	100
Referências.....	104
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>114</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>116</b>

## RESUMO

### **Estudos biométricos e de QTL associados à fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi.**

Os estudos foram realizados para obter informações sobre o controle genético de características relacionadas à fixação biológica do nitrogênio (FBN) no feijão-caupi, para orientar o desenvolvimento de cultivares mais eficientes na fixação de N<sub>2</sub>. Três linhas parentais de feijão-caupi, com diferentes níveis no desempenho simbiótico, IC-1 (ineficiente), BRS Pujante e BRS Marataoã (eficiente), foram cruzadas (IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante) para obter populações segregantes F<sub>2</sub>. A segregação foi avaliada baseada em caracteres relacionados à FBN como, matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria fresca de nódulos (MFN), número de nódulos (NN) e nitrogênio acumulado (NA). A segregação para plantas eficientes e não eficientes indicou que a fixação de N<sub>2</sub> é controlada por dois genes, com efeito epistático dominante recessivo (13:3). As herdabilidades no sentido restrito foram de 78% e 90% MSPA, 58% e 78% para NN, 58% e 86% para MFN e 71% e 85% para NA, para os cruzamentos IC-1 x BRS Pujante e IC-1 x BRS Marataoã, respectivamente. Correlações significativas e positivas foram estimadas entre MSPA x MFN e MFN x N, enquanto NN apresentou correlação negativa significativa com NA e MSPA. Os parentais IC-1 e BRS Marataoã e 90 plantas da população F<sub>2</sub>, foram genotipadas com 46,300 marcadores de polimorfismo de base única (SNP), dos quais 910 marcadores polimórficos foram utilizados para construção do mapa. Os resultados revelaram 11 grupos de ligações, com média de 82 marcadores por cromossomo e distância média de 1,26 cM entre marcadores. A análise de recombinação dos marcadores SNPs indicou que os marcadores 2\_12850 e 2\_24723, localizados no grupo de ligação 11, flanquearam o gene da FBN (*cpi*) com 6,7 cM e 5,64 cM de distância, respectivamente. O método de mapeamento de intervalo composto inclusivo (ICIM), identificou um único QTL para MSPA, NN, e NA explicando 43,4%, 48,2% e 51,24% da variação total, respectivamente. Cinco marcadores SNPs em um dos lados dos QTL foram validados na população F<sub>2</sub>, IC-1 x BRS Pujante, com a tecnologia tera-primer ARMS-PCR, com 96% de acerto. Estes resultados indicam o potencial de uso destes marcadores na seleção assistida por marcadores para o melhoramento da FBN em feijão-caupi. No geral, os resultados indicam que a FBN em feijão-caupi pode ser aumentada por métodos simples de melhoramento.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, SNP, FBN.

## ABSTRACT

### Biometric and QTL studies related with biological fixation of nitrogen in cowpea.

The studies were carried out to obtain information on the genetic control of traits related to the biological fixation of nitrogen (FBN) in cowpea, to guide the development of cultivars more efficient to N<sub>2</sub> fixation. Three parental lines of cowpea, with different levels in symbiotic performance, IC-1 (inefficient), BRS Pujante and BRS Marataoã (efficient), were crossed (IC-1 x BRS Marataoã and IC-1 x BRS Pujante) to obtain F<sub>2</sub> populations. Segregation was evaluated by FBN-related parameters, such as dry matter (MSPA), fresh nodule matter (MFN), number of nodules (NN) and accumulated nitrogen (NA). Segregation for efficient and non-efficient plants indicated that N<sub>2</sub> fixation is controlled by two genes, with epistatic dominant recessive effect (13: 3). Narrow-sense heritability values were 78% and 90% for MSPA, 58% and 78% for NN, 58% and 86% for MFN and 71% and 85% for NA in the IC-1 x BRS Pujante and IC-1 x BRS Marataoã crosses, respectively. Significant and positive correlations were estimated between MSPA x MFN and MFN x N, while NN showed significant negative correlation with NA and MSPA. The parents, IC-1 and BRS Marataoã, and 90 plants of the F<sub>2</sub> population were genotyped with 46,300 single-base polymorphism (SNP) markers, of which 910 polymorphic markers were used for map construction. The results revealed 11 linkage groups, with a mean of 82 markers per chromosome and a mean distance of 1.26 cM between markers. The recombination analysis of the SNP markers indicated 2\_12850 and 2\_24723 SNPs, located in the linkage group 11, flanking the gene of FBN (*cp1*) with 6.7 cM and 5.64 cM distance, respectively. The inclusive composite interval mapping method (ICIM) identified a single QTL for MSPA, NN, and NA, that accounted for 43.4%, 48.2% and 51.24% of the total variation, respectively. Five SNPs markers in one side of the QTL were validated in the F<sub>2</sub> population, IC-1 x BRS Pujante, with tera-primer ARMS-PCR technology, with 96% of certainty. This result indicates a potential use of these markers for assisted selection for improvement FBN in cowpea. The over all results indicated that FBN in cowpea can be improved by single breeding methods

Key words: *Vigna unguiculata*, Nitrogen fixation, SNP, QTL.

## **CAPÍTULO I**

---

### **INTRODUÇÃO GERAL**

### **REFERENCIAL TEÓRICO**



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

---

A intensificação dos sistemas de produção de alimentos e biocombustíveis tem resultado no aumento crescente nos custos com fertilizantes nitrogenados e prevê demandas futuras ainda maiores (PROCHNOW e ABDALLA, 2007). O conceito ambiental de diminuição de energias fósseis no processo de produção dos fertilizantes industriais nitrogenados, associado com a emissão de gases como  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}$ , em que os novos sistemas mais sustentáveis (biotecnologia, agricultura de precisão) visam atender objetivos econômicos e ambientais, tem resultado também no aumento de interesse na fixação biológica de Nitrogênio-FBN. A FBN reabastece o N no solo sem o uso de fertilizantes nitrogenados e tem sido objeto de estudo por representar o sistema fixador de  $\text{N}_2$  de maior importância para a agricultura (NEVES e RUMJANEK, 1996).

A habilidade da FBN é facilitada pela complexa relação simbiótica entre hospedeiro e bactérias fixadoras de  $\text{N}_2$ , que compreende 13 diferentes gêneros conhecidos genericamente como rizóbio, culminando com o estabelecimento dos nódulos radiculares (WILLEMS, 2006). Os nódulos radiculares abrigam no seu interior células infectadas com microsimbionte (bacteróides) (WAIS, KEATING e LONG, 2002). Nessa forma pleiomórfica, as bactérias convertem o  $\text{N}_2$  atmosférico em amônia ( $\text{NH}_3$ ), uma forma de N que pode então ser incorporada em componentes orgânicos, como proteínas e ácidos nucleicos nas plantas e bactérias associadas. Essa simbiose é explorada comercialmente em soja (*Glycine max* L.) há mais de cem anos, como exemplo de sucesso (ARAÚJO e HUNGRIA, 1994).

Os processos fisiológicos envolvidos na FBN são bastante complexos, com diversas interações entre a planta e a bactéria fixadora (KNIEF, DELMOTTE e VORHOLT, 2011). Essas interações ocorrem durante o estabelecimento, o desenvolvimento e o desempenho da simbiose, produzindo respostas diferentes em relação à diversidade de bactérias que nodulam o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], bem como variações em relação à eficiência simbiótica dentro dos genótipos.

Variações genéticas na FBN em germoplasmas de feijão-caupi de 40 a 90 % do N total acumulado pela cultura são encontradas na literatura (RUMJANEK et al.,

2005; ALCANTARA et al. 2014). Essa diversidade na associação rizóbio x leguminosa representa um excelente potencial para melhoramento genético para o desenvolvimento regional, com novas cultivares de feijão-caupi mais eficientes e competitivas, que podem ser posicionadas como uma importante 'commodity' para o Brasil, com importância econômica semelhante à soja.

A FBN é geralmente considerada uma característica quantitativa e com grande influência ambiental (BLISS, 1993). Características quantitativas são, muitas vezes, difíceis de medir e os marcadores moleculares têm valor potencial em seus diagnósticos (PATERSON, 1996). As regiões dentro do genoma que contêm genes associados a uma característica quantitativa particular podem ser estudadas com base em análises biométricas e mapeamento de 'quantitative trait loci' (QTL) para identificar os fatores genéticos individuais que influenciam na fixação de N<sub>2</sub>.

Avanços importantes foram alcançados pela caracterização e mapeamento de QTL na soja e outras culturas como o feijão comum (NODARI et al., 1993; NICOLÁS, HUNGRIA e ARIAS, 2006). No entanto, estudos genéticos sobre a FBN envolvendo o hospedeiro em feijão-caupi e outras leguminosas são escassos, apesar da necessidade de informação genética sobre FBN. Houve pouco progresso no desenvolvimento de marcadores ligados a QTLs úteis na seleção de características agronômicas no feijão-caupi. A identificação de QTLs para características relacionadas à FBN no feijão-caupi, identificadas nesse trabalho, assim como em outras leguminosas como o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja *Glycine max* (L.) (TSAI et al., 1998; NICOLÁS, HUNGRIA e ARIAS, 2006), facilitará o desenvolvimento de novas variedades mais eficientes.

Com base do exposto, o presente trabalho objetivou analisar o controle genético da FBN em feijão-caupi, em populações resultantes dos cruzamentos IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante com o intuito de obter informações relevantes para novas variedades de feijão-caupi mais eficientes na fixação biológica de N<sub>2</sub>.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Feijão-caupi, classificação e origem

O feijão-caupi é uma planta da ordem Fabales, subfamília Faboidea, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolina, gênero *Vigna*, secção *Catiang*, espécie [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ] e subespécie *unguiculata* (VERDCOURT, 1970; MARÉCHAL, MACHERPA, STAINER, 1978). Essa espécie é diploide, com 22 cromossomos ( $2n = 2x = 22$ ) em suas células somáticas, genoma estimado em 620 Mb e aproximadamente 26% das sequências ricas em genes (ARUMUGANATHAN e EARLE 1991; TIMKO et al., 2008).

A subespécie *unguiculata* foi dividida em quatro cultigrupos *Unguiculata*, *Sesquipedalis*, *Biflora* e *Textilis* (PADULOSI e NG, 1997). Dentro do cultigrupo *Unguiculata*, o Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) detém a maior coleção mundial e possui mais de 15 mil acessos coletados em 89 países, dentro dos quais 12 mil já foram caracterizados (MAHALAKSHMI, LAWSON e ORTIZ, 2007). No Brasil, apenas os cultigrupos *Unguiculata* e *Sesquipedalis* (conhecido como feijão-de-metro) são cultivados, com destaque para o *Unguiculata* que compreende quase a totalidade das cultivares tradicionais e melhoradas (FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO 2005).

A origem e domesticação do feijão-caupi constituem fonte de divergência entre os pesquisadores. Ng e Maréchal (1985) descrevem a África ocidental como sendo o centro de origem do feijão-caupi, precisamente das regiões semiáridas da Nigéria, sul do Níger, Burkina Faso, norte do Benim, Togo e norte de Camarões. Essa afirmação também foi defendida por Padulosi e Ng (1997), em estudos arqueológicos baseado em datação realizada com o carbono-14 no feijão-caupi.

Os estudos com marcadores moleculares tipo polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), realizados por Coulibaly et al. (2002), evidenciam que a domesticação do feijão-caupi ocorreu no nordeste da África, enquanto que Ba, Pasquet e Gepts (2004) apontaram que a espécie foi domesticada por agricultores no oeste da África, baseados em estudos com marcadores de amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD). Esses resultados apoiaram os estudos arqueológicos anteriormente citados, sustentando a hipótese que o oeste da África é o centro de

origem. Talvez o exato local de origem e domesticação do feijão-caupi ainda não tenha sido totalmente elucidado, em razão do limitado *pool* gênico do mesmo, apesar de apresentar uma ampla gama de fenótipos entre as cultivares (EHLERS e HALL, 1997).

No Brasil, há evidências que a introdução do feijão-caupi foi realizada pelos colonizadores portugueses, provavelmente no estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988). A partir de então, deu início ao processo de cultivo e melhoramento daqueles tipos melhor adaptados e mais aceitos nas diferentes regiões do país, acompanhando a colonização. Com a dispersão para as diferentes regiões de país, o feijão-caupi recebeu diferentes nomes como feijão-de-corda, feijão-de-praia, feijão-da-estrada, feijão-de-rama, feijão fradinho, feijão macaça, macassa ou macáçar, entre outros (NEVES et al., 2011).

## **1.2 Morfologia e biologia floral**

O feijão-caupi é uma planta herbácea com caule flexível, podendo assumir crescimento determinado e indeterminado. A arquitetura é bastante variável entre e dentro das cultivares, com porte classificado em ereto, semiereto, semiprostado e prostado, com o número de nós e de ramificações variáveis (FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO, 2005). A germinação do feijão-caupi é epígea, com cotilédones inseridos no primeiro nó do ramo principal. O sistema radicular é do tipo axial, relativamente superficial, com raiz principal e as secundárias apresentando nódulos quando em associação com bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>.

As flores do feijão-caupi são andrógenas, bem protegidas pelas pétalas, apresentando o fenômeno da protoginia e da cleistogamia que favorece a autogamia, com possibilidade de polinização cruzada inferior a 1%, apresentando alto grau de homozigose dentro de suas cultivares (EHLERS e HALL, 1997). Em algumas variedades silvestres, a taxa de polinização cruzada pode atingir valores mais elevados, devido às particularidades genótípicas e ao ambiente. O fruto é uma vagem de forma cilíndrica, reta ou curvada com comprimento geralmente de 18-30 cm, contendo no seu interior sementes dispostas em fileiras. A semente é constituída externamente de tegumento ou testa, hilo e caracteres relacionados ao

hilo. Quanto à forma pode se apresentar arredondada, ovalada, elíptica, reniforme, quadrangular e comprimida (FREIRE FILHO et al., 2011).

O tegumento dos grãos apresenta ampla diversidade de cores, podendo ter coloração uniforme ou apresentar estrias, manchas ou pontuações, ser opaco ou brilhoso, com presença e ausência de hilo. Essas variações no tegumento do grão determinam o surgimento de várias classes e subclasses comerciais. Segundo a classificação oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (instrução normativa nº12, de 28 de março de 2008, e a instrução normativa nº 56 de 24 de novembro de 2009), o feijão-caupi pertence ao Grupo II e considera somente quatro tipos de cores: branco, preto, misturado e classe cores (BRASIL, 2000). No entanto, para obter uma nomenclatura que atendesse ao uso oficial e popular, e que pudesse se tornar de uso fácil e corrente entre os pesquisadores que desenvolvem novas variedades, Freire Filho, Ribeiro e Santos (2000) incluíram subclasses às classes de feijão-caupi com grãos branco, preto e cores. A classe Cores, foi dividida em dez subclasses: mulato liso, mulato rugoso, canapu, sempre-verde, verde, manteiga, vinagre, azulão, corujinha e rajado.

### **1.3 Cultivo e importância econômica**

O feijão-caupi é uma das leguminosas mais importantes, cultivado como fontes alimentar e forrageira nas regiões secas dos trópicos, abrangendo parte da África, Ásia, Estados Unidos, Oriente Médio e Américas Central e do Sul (SINGH et al., 2002). O seu cultivo é realizado principalmente pelo baixo custo competitivo em relação a outras culturas. Esse baixo custo decorre da ampla adaptação aos mais variados climas, tipos de solo, ciclo rápido de desenvolvimento, tolerância a estresse hídrico, pouca exigência à fertilidade do solo e à capacidade de fixar N<sub>2</sub> atmosférico pela associação simbiótica por bactérias do grupo rizóbio (MARTINS, NEVES e RUMJANEK 1997).

A importância do feijão-caupi também se relaciona às questões nutricionais. A literatura mostra que o teor de proteína do feijão-caupi varia entre as cultivares de 22% a 25%, com potencial para seleção de 32% (SANTOS et al., 2012). A maioria dessas proteínas são representadas por globulinas (65% a 80%) e albuminas (4% a

12%) do total das proteínas encontradas na semente (NUGDALLAH e TINAY, 1997). O feijão-caupi apresenta quase todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%), minerais e vitaminas, além de grande quantidade de fibras e baixos teores de gordura, desempenhando um papel importante na nutrição humana (ANDRADE JÚNIOR et al., 2002). Também possui altos teores de ácido fólico e vitamina B, necessários durante a gestação das mulheres para prevenir defeitos na calota craniana e na coluna vertebral (OGUNMODEDE e OYENUGA, 1970).

A Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas estima que cinco milhões de toneladas de feijão-caupi são produzidos anualmente, em 10 milhões de hectares em todo mundo (FAO, 2017). Desta produção, 70% encontra-se em zonas secas da África Ocidental e Central. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão-caupi, respondendo por aproximadamente 586,2 mil toneladas (CONAB, 2016), atrás da Nigéria, com 2,1 milhões de toneladas, e Níger, com 1,6 milhões de toneladas (FAO, 2017).

No Brasil, o feijão-caupi é cultivado principalmente nas regiões semiáridas do Norte (4,4 mil hectares) e Nordeste (425,5 mil de hectares), para atender três segmentos de grande relevância de mercado para a cultura do feijão-caupi: grãos secos, feijão verde (vagem e grãos) e sementes. No entanto, essa grande área cultivada no Nordeste detém participação relativamente modesta, a qual decorre da baixa produtividade, cerca de 374 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2016). As condições edafoclimáticas nessas regiões muitas vezes não são satisfatórias para o cultivo do feijão-caupi, mas constitui uma das principais fontes de oportunidade na geração de renda da agricultura familiar (TEÓFILO et al., 2008). Nos últimos anos o cultivo do feijão-caupi está se expandindo dos ecossistemas de caatinga para as áreas de cerrados das regiões Centro Oeste e Centro Sul, como nova opção de cultura de entressafra a ser explorada numa diversidade de sistemas de produção e níveis tecnológicos (FREIRE FILHO et al., 2011). Nessas regiões, são registradas médias de produtividade de 1.430 kg.h<sup>-1</sup> (CONAB, 2016).

#### **1.4 Fixação biológica de nitrogênio**

O nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) representa cerca de 80% da atmosfera terrestre, no entanto, as plantas só podem utilizar formas reduzidas deste elemento (TAIZ e

ZAIGER, 2009). O N é um elemento vital em todos os organismos. Nas plantas, é necessário para a produção de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios da membrana, entre outras. Assim, atender às necessidades de N de uma cultura é de grande relevância nas práticas agronômicas. O N necessário para o desenvolvimento do feijão-caupi pode provir do solo, principalmente pela mineralização da matéria orgânica, dos fertilizantes nitrogenados e da fixação biológica de N<sub>2</sub>, mediante a associação de bactérias, genericamente denominadas de rizóbios (HUNGRIA et al., 1991).

Para realizar a FBN, um grande número de plantas cultivadas mantem em suas raízes uma população ativa de microrganismos diazotróficos, compreendendo principalmente bactérias (NETO, AZEVEDO e ARAUJO, 2003). Muitas destas associações sofreram especializações ao longo do processo evolutivo, resultando em relações simbióticas entre macro e microssimbionte para a FBN. Esta interação é mediada por sinais moleculares exsudados por ambos os parceiros, os quais resultam na ativação de genes envolvidos na sinalização química, formação dos nódulos e funções fisiológicas de nódulos (AYISI, NKGAPELE e DAKORA, 2000).

As interações simbióticas entre bactérias e hospedeiros são mediadas pela disponibilização de compostos orgânicos secretados pelas raízes das plantas, basicamente compostos fenólicos (flavonóides) e betaínas (GAGNON e IBRAHIM, 1998). Cerca de 30 genes indutores de flavonóides foram isolados em nove gêneros de leguminosas (KRISHNAN, KUO e PUEPPKE, 1995; COOPER, 2004). Estes compostos podem promover o movimento dos rizóbios para as raízes das plantas e atuar como substâncias químicas indutoras (MERCANTE, GOI e FRANCO, 2002). Os flavonóides são biologicamente e quimicamente o maior grupo de metabólitos secundários, com mais de 4.000 tipos, em que um subconjunto específico deles está envolvido na mediação da especificidade do hospedeiro nas leguminosas (PERRET, STAEHELIN e BROUGHTON, 2000).

Os flavonóides atuam como sinais químicos e determinam a compatibilidade do hospedeiro vegetal com a bactéria por meio de um fator transcricional do tipo LysR (PECK, FISHER e LONG, 2006), chamado proteína NodD (GAGE, 2009) ou nodulação Lipo-chitooligosacarídica (Nod) (D'HAENZE e HOLSTERS, 2002). O fator Nod é secretado pelo rizóbio em resposta aos exsudados radiculares (YANG et al.,

1994). A indução da produção de fator Nod é específica para a estrutura do flavonóide, o qual interage com a região promotora (*nod* boxes) que está localizada após a maioria dos genes (*nod*, *nol* e *noe*) envolvidos na nodulação e que, dependendo da bactéria, esses genes podem estar localizados no DNA cromossômico ou plasmidial (GAGE, 2004).

Os produtos das bactérias do grupo rizóbio (fatores Nod) variam quanto à resposta aos flavanóides e determinam a especificidade entre planta hospedeira e bactéria simbiótica. Em geral, bactérias do gênero *Rhizobium* têm a capacidade de interagir com um número limitado de plantas hospedeiras. No entanto, algumas estirpes já identificadas (*Rhizobium* NGR234) foram capazes de excretar 18 diferentes fatores Nod, o que permite nodular ampla gama de hospedeiros, ou seja, mais promíscua (PRICE et al., 1992).

Após o reconhecimento do sinal químico liberado pela planta, as bactérias invadem os pêlos radiculares e começam a se enrolar, em resposta à penetração do rizóbio na raiz. Concomitantemente, a bactéria ativa o processo mitótico na região cortical da raiz, diferencia-se em sua forma endossimbiótica fixadora de N<sub>2</sub>, denominada de bacterióide (OLDROYD e DOWNIE, 2004). Dentro desses nódulos, as bactérias são capazes de reduzir o N atmosférico à amônia pela ação da enzima nitrogenase, que será rapidamente convertida a amidas e/ou ureídos devido a sua toxicidade (BROUGHTON et al., 2006). A atividade da nitrogenase decresce no início da frutificação, devido ao transporte para o dreno mais forte da planta, que são os grãos e vagens, ocorrendo diminuição na fixação biológica de N<sub>2</sub> (LAWN e BRUN, 1974).

#### **1.4.1 O grupo rizóbio**

As bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, coletivamente chamada de rizóbio, pertencem a cinco gêneros principais, incluindo: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* (ROGEL, ORMENO-ORRILLO e ROMERO, 2011). Essas bactérias gran negativas possuem a capacidade de estabelecer relações simbióticas com mais de 18.000 espécies da família Leguminosae (Fabaceae), induzindo o desenvolvimento de um novo órgão, chamado de nódulo (COOPER, 2004). As bactérias do grupo rizóbio são organismos gram negativos, livres no solo e



capazes de converter o  $N_2$  atmosférico em  $NH_3$  apenas com a associação de vida endossimbiótica com as raízes das leguminosas (COOPER, 2004).

As bactérias do grupo rizóbio possuem tipicamente genomas multipartidos grandes e complexos, o que pode aumentar o potencial de adaptação (GONZÁLEZ et al., 2006; MACLEAN, FINAN e SADOWSKY, 2007). O tamanho do genoma do gênero varia de 5,4 a 9,2 Mb e o número de plasmídeo entre 0 a 7. Os plasmídeos, muitas vezes de 500 Kb de comprimento, também carregam genes essenciais que permitem aumentar o potencial de adaptação de uma espécie (DOWNIE e YOUNG, 2001). A maioria dos genes relevantes para a simbiose em rizóbios, muitas vezes se encontra agrupado em plasmídeos (*Psym*) ou dentro das ilhas genômicas, permitindo, assim, que ocorra a transferência horizontal e proporcione uma rápida evolução e com grande potencial de ajustamento para as diversas condições ambientais (BOUSSAU et al., 2004).

Os mecanismos genéticos regulados pelas bactérias para a FBN são melhor compreendidos devido aos estudos comparativos já realizados com outras proteobactérias associadas a planta (MACLEAN, FINAN e SADOWSKY, 2007). Um dos primeiros estudos mais completos com microorganismos diazotróficos foi realizado com a bactéria *Klebsiella pneumoniae* por Arnold et al. (1988). Nesse estudo foram obtidos grandes avanços na identificação de genes envolvidos em diferentes etapas da nodulação (*nod*, *noe*, *noI*) e na síntese do complexo enzimático da nitrogenase (*nif* e *fix*), responsável pela fixação do  $N_2$  no nódulo.

#### **1.4.2 Genes do hospedeiro**

Os estudos para a investigação de genes hospedeiros essenciais para o processo da FBN envolvem abordagens genéticas e genômicas em leguminosas com fenótipos anormais em diferentes etapas na FBN, devido à falhas nas funções fisiológicas dos nódulos (BORISOV et al., 2003). Nessas plantas, dezenas de genes envolvidos com a percepção de *Nod* fatores, formação de nódulos e no processo da FBN, denominadas de genes nodulinas, foram prospectados por tecnologias como 'Expressed Sequence Tags' (ESTs), e análise de microarrays (BRECHENMACHER et al., 2009; LIBAULT et al., 2010). Essas informações são de grande importância porque esses genes são necessários para a simbiose com bactérias fixadoras de  $N_2$ ,

por conseguinte, alguns dos genes, devem ter co-evoluido com o microssimbionte (UEDA et al., 1995).

Como resultados, mais de 40 genes simbióticos envolvidos na formação de nódulos e no processo da FBN, denominados de nodulinas, foram identificados desde então, e utilizados para identificar genes e produtos envolvidos na formação e funcionamento de nódulos (VANCE et al., 1988; LONG, 1989; BORISOV et al., 2003). 26 genes envolvidos com a percepção *Nod* em diferentes etapas de formação de nódulos foram caracterizados com base em mutantes, clonagem e estratégias de mapeamento (KOUCHI et al., 2010).

As nodulinas foram divididas em duas classes principais: as nodulinas precoces ou primárias (ENOD2, ENOD5, ENOD11, ENOD12, ENOD40, genes *dim*, *sym*) e as nodulinas de funções tardias: leghemoglobina, NOD35 e transportadores do simbiossomo (MYLONA, PAWLOWSKI e BISSELING, 1995). Os genes das nodulinas primárias são geralmente expressos durante os primeiros estágios "diálogo molecular", antes do processo de fixação. Os genes nodulina tardios codificam proteínas que desempenham papéis na transformação de bactérias em bacteróides e sua colonização dentro dos nódulos (VAN DE SANDE et al., 1996).

Muitas nodulinas tardias ainda necessitam de maiores informações sobre sua estrutura gênica, expressão espacial e até mesmo a estrutura de seu promotor. Poucos estudos com mutantes conseguiram identificar danos à simbiose quando comparados com uma planta não fixadora (*fix<sup>-</sup>*) (KNEEN et al., 1990; HASER, et al., 1992; VANCE, UHDE-STONE e ALLAN, 2003; PARK e BUTTERY, 1994; SZCZYGLOWSKI et al., 1988). Em feijão-caupi, os estudos iniciais com mutantes ineficientes foram realizados por PEMBERTON, SMITH e MILLER (1990) e PURDOM e TRESE (1995). O mutante IC-1 apresenta nódulos brancos, pequenos, reduzido número de bacteróides, senescência prematura em células infectadas e reduzido tamanho de parte aérea das plantas quando comparado com planta efetiva. A fase em que ocorre a mudança da atividade do nódulo é semelhante ao que provoca hospedeiros mutantes ineficazes (*fix<sup>-</sup>*) (SAGAN, et al., 1995).

### **1.5 Estimação dos parâmetros genéticos na expressão de caracteres quantitativos**

A genética de características agrícolas de importância pode ser estudada com base em várias ferramentas biométricas. Essas ferramentas dependem de diferentes modelos de cruzamentos, como dialelo, linhagem x testador e cruzamentos biparentais. A análise das médias e variâncias de gerações é uma ferramenta biométrica poderosa, uma vez que fornece informações adicionais sobre as interações genéticas. A análise de gerações é uma técnica que fornece a estimativa dos principais efeitos genéticos (aditivo, dominância e suas interações digênicas) envolvidos na expressão de características quantitativas (MATHER e JINKS, 1982).

Com as informações obtidas por meio de avaliações das gerações  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_1P_1$  e  $RC_2P_2$ , uma estratégia efetiva para o melhoramento pode ser formulada com base nos resultados (SHARMILA, GANESH e GUNASEKARAN 2007). As informações sobre os efeitos genéticos permitem ao melhorista saber quanto da variação de uma cultura é genética e até que ponto esta variação é hereditária (FALCONER, 1981). Isso, por sua vez, influencia a eficiência da seleção que depende principalmente da variância genética aditiva, dos fatores ambientais e da interação entre o genótipo e o meio ambiente.

A ação de genes pode ser definida como a forma como os genes se expressam e esses genes podem controlar a expressão da característica, individualmente ou em combinações (HALLAUER e MIRANDA,1988). As abordagens genéticas e biométricas são usadas para estudar a forma como os genes se expressam (MATHER e JINKS, 1982). Na genética mendeliana, a ação genética dominante refere-se à expressão de uma característica que aparece na geração  $F_1$ . Os alelos recessivos não são expressos na presença de dominância na  $F_1$  mas reaparecem na geração seguinte ( $F_2$ ) (WELSH, 1981). No entanto, a genética quantitativa divide a ação genética em variância aditiva, de dominância e epistasia (ROBINSON, COMSTOCK e HARVEY, 1949, FALCONER, 1981).

Na presença de ação genética aditiva, os caracteres heterozigotos nas gerações  $F_2$  são intermediários dos dois genitores, porque a variação aditiva está associada aos efeitos médios dos alelos (FALCONER, 1981). A parte aditiva, que se reflete na herdabilidade do sentido restrito, reflete o grau em que as progênes provavelmente se parecerão aos seus genitores. A ação genética não é aditiva

quando o modelo aditivo não explica adequadamente a variação (FALCONER, 1981). O tamanho da dominância em relação à variância aditiva indica o grau de dominância (ROBINSON, COMSTOCK e HARVEY, 1949). Portanto, os níveis de dominância em relação à média dos genitores das progênes espalham-se de parcial para sobredominância nas progênes.

### **1.6 Melhoramento para a fixação biológica de nitrogênio**

O melhoramento genético do feijão-caupi para maior eficiência na FBN é uma importante ferramenta que pode beneficiar a sustentabilidade da sua produção, porque a relação simbiótica não é apenas benéfica para as leguminosas e bactérias, mas também é capaz de promover o crescimento e a produtividade de outras plantas em consórcio ou em cultivos seguintes (YANNI e ABD EL-FATTAH, 1999). Devido a esses benefícios, a habilidade de fixar  $N_2$  tem recebido merecida importância, especialmente pelo baixo custo, redução dos danos ambientais e uma crescente demanda da qualidade nutricional do feijão-caupi (DAKORA et al., 2015).

O feijão-caupi é uma leguminosa de ciclo relativamente curto, que se adaptou bem às condições de clima e solo do Brasil, mas ainda apresenta baixa produtividade de 400 a 500 kg.ha<sup>-1</sup> (FROTA e PEREIRA, 2000; LACERDA et al., 2004). Essa baixa produtividade pode estar associada, principalmente, à insuficiência na disponibilidade de nutrientes, sobretudo N, fator mais limitante para a produção de hortaliças leguminosas (LACERDA et al., 2004). Estimativas indicam que o feijão-caupi fixa cerca de 60 a 100 kg N. ha<sup>-1</sup> (DAKORA et al., 1987; HUNGRIA, BARRADOS e VALLSGROVE, 1991; HORST e HÄRDTER 1994). Valores inferiores e mesmo negativos também foram relatados (AWONAIKE, KUMARASINGHE e DANSO, 1990; SANGINGA, LYASSE e SINGH, 2000; FREITAS et al., 2012).

Varição genética no germoplasma de feijão-caupi de 40 a 90 % do N total acumulado pela cultura é encontrada na literatura (ALCANTARA et al. 2014; RUMJANEK et al., 2005). Essa variação fornece a matéria-prima para os programas de melhoramento e, portanto, indica um potencial uso da variabilidade genética da FBN no feijão-caupi. Freire Filho et al., (1999) estimam produtividades potenciais superiores a 5.000 kg. ha<sup>-1</sup>, dependendo do genótipo, da interação rizóbio-

leguminosa e do ambiente. O melhoramento genético para maior eficiência da FBN em feijão-caupi pode ser de grande importância na obtenção de patamares de produtividade como citado acima, porque, segundo Elkan (2009), cerca de 50% da simbiose planta-leguminosa é controlada pelo hospedeiro.

A variação de cultivares com características associadas à fixação de  $N_2$  tem sido demonstrada em muitas leguminosas (NICOLÁS, ARIAS e HUNGRIA, 2002; SIKINARUM et al., 2007; PROPOROV e TIKHONOVICH, 2003). No entanto, Bliss (1991) relata que a seleção efetiva para o aumento da fixação de  $N_2$  em leguminosas depende de muitos fatores entre os quais a escolha de características que podem ser medidas de forma precisa e econômica, discriminando entre unidades de seleção superior e inferior. Características genéticas como matéria seca de plantas, número e massa de nódulos, nitrogênio acumulado, nitrogênio derivado a atmosfera e produtividade foram utilizadas com sucesso na identificação de variações na fixação de  $N_2$  nas cultivares em condições de deficiência de N (SANGINGA, LYASSE e SINGH 2000; FALL et al., 2003; XAVIER et al., 2006; FREITAS et al., 2012). No entanto, são relatados resultados divergentes quanto à avaliação de características da FBN.

A nodulação e a fixação de  $N_2$  em leguminosas são geralmente consideradas como sendo características quantitativa (BLISS, 1993), mas com forte influência ambiental, o que dificulta o melhoramento para a FBN (BLISS, 1985). O número e a massa de nódulos foram utilizados como caracteres para a seleção de cultivares mais eficientes na fixação de  $N_2$  (HAFNER et al., 1992; SHIRAIWA, SINCLAIR, HASHIKAWA, 1994; PIMRATCH et al., 2004). Segundo Hungria e Bohrer (2000), a massa de nódulos por planta é um indicador do potencial simbiótico porque, quando predominam nódulos maiores há tendência de obter uma maior massa nodular e maior eficiência do  $N_2$  fixado, bem como matéria vegetativa. No entanto, Christophe et al. (2011) relatam que a massa dos nódulos parece também ser afetada pelo estado nutricional da planta, uma vez que um efeito compensatório do aumento do tamanho do nódulo pode ser devido a um excesso de fontes de C da parte aérea ou nutrientes do solo.

Arrendell et al. (1985) selecionam plantas de amendoim (*Arachis hypogea* L.) mais eficientes para FBN avaliando o número e a massa de nódulos. No entanto,

Nutman (1967) relata que a massa e o número de nódulos são características inversamente relacionadas, ou seja, uma cultivar que apresenta número elevado de nódulos geralmente é ineficaz por apresentar muitos nódulos pequenos. Ferguson et al., (2010) relataram que a formação de nódulos é realizada com base na disponibilidade de N para a planta, como forma de balancear a necessidade de N com o custo de suportar a interação simbiótica. Essa regulação é determinada por um sistema chamado autorregulação da nodulação, em que nódulos precoces inibem o suprimento de nódulos posteriores pela transdução de sinais na parte aérea da planta (PENMETSA et al., 2003).

Coale, Meisinger e Wiehold (1985) selecionaram variedades de feijão comum superiores para fixação de  $N_2$  cultivando as plantas em solos com baixos teores de N, avaliando a produtividade e a quantidade de N das sementes como critérios de seleção. No entanto, Elisondo et al. (1999) e Hungria e Bohrer (2000) apontam para perdas na capacidade de fixação de  $N_2$  em populações melhoradas quando avaliados apenas o rendimento de sementes ou o N das sementes como critérios de seleção.

De acordo com a complexidade genética citada acima, a melhoria genética da FBN não é uma tarefa fácil. A herdabilidade para as características da fixação de  $N_2$  geralmente é baixa a moderada, pois existem efeitos ambientais e interação genótipo x ambientais (BLISS, 1993; PIMRATCH et al., 2004; SIKINARUM et al., 2007). Outra questão, como observado, os métodos que quantificam caracteres da FBN, geralmente indiretos e destrutivos, não permitem a seleção direta de plantas individuais para fixação simbiótica (BERGENSEN, 1980). Quando uma planta é identificada como eficiente, ela já foi destruída, sem possibilidade de deixar descendentes. Tais métodos, portanto, só podem ser utilizados em progênies e não em plantas individuais.

Vários métodos de melhoramento têm sido utilizados para melhorar os níveis de fixação de  $N_2$  em leguminosas avaliando os caracteres já citados. Alguns dos métodos incluem seleção recorrente (BARRON et al., 1999; ELISONDO et al., 1999), método do retrocruzamento (BLISS, 1993) e descendência de uma semente única (SSD) (PEREIRA e BRAIDOTTI, 2001). Por meio destes métodos, os melhoristas conseguiram elevar a capacidade de fixar  $N_2$  nas plantas fixadoras.

## 1.7 Marcadores moleculares

A detecção e o rastreamento das variações alélicas dentro de um genoma são realizados por várias ferramentas genéticas, chamadas de marcadores moleculares (LATEEF, 2015). A aplicação dos marcadores moleculares tem sido impulsionada principalmente pelo método de produção, custo de detecção e pelo nível de reprodutibilidade. Dependendo do método de detecção e do rendimento, os marcadores moleculares podem ser divididos em três grupos principais: marcadores baseados na hibridação, de baixo rendimento, tais como polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição (RFLPs-*Restriction Fragment Length Polymorphisms*); marcadores baseados em PCR-*Polymerase Chain Reaction*, de médio rendimento, que incluem amplificação aleatória de DNA polimórfico ('RAPD-*Random Amplified Polymorphic*'), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado ('AFLP-*Amplified Fragment Length Polymorphism*'), repetições de sequência simples ('SSR-*single Sequence Repeats*'); baseado em seqüência de marcadores: polimorfismo de nucleotídeo simples ('SNP-*Single Nucleotide Polymorphisms*') (BERNARDO, 2008). Essas ferramentas moleculares facilitaram as análises das estruturas do genoma das plantas e sua evolução, incluindo as relações entre as leguminosas, como o feijão-caupi (CHOI et al., 2004; YAN et al., 2004; GEPTS et al., 2005).

Os marcadores RFLPs foram os marcadores mais amplamente utilizados na genética molecular das plantas, devido a sua alta reprodutibilidade e codominância (TANKSLEY et al., 1989). No entanto, devido à detecção dos RFLPs ser um processo demorado, trabalhoso, caro e não passíveis de automação, esses marcadores se tornaram obsoletos. Com a descoberta da tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR), a nova geração de marcadores RAPD, AFLP e SSR passou a ser empregadas em várias plantas.

Os marcadores RAPDs são capazes de detectar simultaneamente locos polimórficos em várias regiões de um genoma (DHANASEKAR, DHUMAL e REDDY, 2009). No entanto, eles são aleatórios e o nível de sua reprodutibilidade é muito baixo, devido à ligação não específica de 'primers'. Embora os marcadores AFLPs também sejam aleatórios, apresentam um nível de reprodutibilidade e sensibilidade muito alto, ainda são populares na pesquisa com genética molecular em culturas

com pouco ou nenhuma referência, em que a sequência do genoma não está disponível (RIDOUT e DONINI, 1999; ZHANG et al., 2011). No entanto, os marcadores AFLP não encontraram aplicação generalizada, devido ao método de detecção longo e laborioso, e também não é passível de automação, com excessão dos AFLPs fluorescentes semiautomáticos.

Os marcadores SSR eliminaram alguns dos inconvenientes das tecnologias dos marcadores de DNA acima mencionados. Eles são altamente reprodutíveis, altamente polimórficos e acessíveis à automação. Apesar do custo de detecção permanecer alto, os marcadores SSR ainda são utilizados em todas as áreas de genética molecular (LIU e CORDES, 2004). As plataformas de microssatélites são pouco densas (espaçamento médio de 5 a 10 cM entre locos). Deste modo, estes marcadores podem conter mais de uma variação na sequência de DNA, que seja comum em uma população ou mesmo rara. No entanto, a chance de dois indivíduos de populações diferentes apresentarem o mesmo perfil desses marcadores é extremamente pequena (HAMILTON, 2009).

Primeiramente descobertos no genoma humano, o polimorfismo de nucleotídeos simples (SNPs) provou ser universal, bem como as formas mais abundantes de variação genética entre indivíduos da mesma espécie (GHOSH et al., 2002). Embora os SNPs sejam menos polimórficos do que os marcadores SSR, devido à sua natureza bialélica (AA, Aa, aa), eles compensam facilmente esse inconveniente por sua alta frequência, facilidade de automação e estabilidade do loco SNP comparado com o loco SSR (GUPTA e PRASAD, 2001). Devido a essas vantagens, há uma intensa aplicação de marcadores SNPs no melhoramento de plantas, principalmente para caracteres complexos de herança quantitativa (MUCHERO et al., 2009; MAMMADOV et al., 2012; ADETUMBI et al., 2016).

Esses marcadores modernos representam variações da sequência de DNA que ocorrem em um simples nucleotídeo (A, T, C ou G) na sequência do genoma, isto é, refletem mutações ocorridas no passado e que em, sua maioria, foram eventos simples (GRIFFITHS et al., 2008). Desta forma, o polimorfismo é definido como uma variação genética em um simples nucleotídeo dentro de um gene (ou sequência de DNA), e que deve estar presente em pelo menos 1% da população para ser considerado SNP (ZIEGLER, KONIG e THOMPSON, 2008). A frequência



habitual de SNP relatados para genomas de plantas é de cerca de 1 SNP a cada 100-300 pb (GUPTA e PRASAD, 2001).

Os marcadores SNPs podem ocorrer em regiões com codificação (genes) e regiões não codificantes do genoma, mas se mostraram mais comuns em regiões de íntrons (RAFALSKI, 2002a). Dependendo da sua localização no genoma e do impacto na expressão de um gene, eles são classificados em SNP não codificantes, SNPs codificantes, SNPs exônicos, SNPs de cDNA e SNPs candidatos (KAHL et al., 2004). Os SNPs em regiões não codificantes e codificantes têm sido amplamente estudados em algumas espécies de plantas, como *Arabidopsis*, milho e soja (CHING et al., 2002; JANDER et al., 2002; ZHU et al., 2003).

Os marcadores SNP têm cada vez mais aplicações úteis na melhoria das culturas, a partir da crescente disponibilidade de coleções de etiqueta de sequência expressa 'expressed sequence tags'-ESTs nos bancos de dados públicos, o que reduziu os custos para descoberta dos SNPs. Essas coleções têm sido fonte de identificação de SNPs e possuem grande variedade de aplicações, como a diversidade genética e estudos filogenéticos, mapeamento de associação, mapeamento de QTL, seleção assistida por marcadores SAM e biologia evolutiva (RAFALSKI, 2002b; OLSEN, 2004; LOPEZ et al., 2005; RAJESH e MUEHLBAUER, 2008).

O mapa genético consenso atual do feijão-caupi foi construído com marcadores EST-SNP (MUÑOZ-AMATRIAÍN et al., 2017). Assim, a identificação de marcadores ligados a características relacionadas à fixação de N<sub>2</sub>, após o mapeamento QTL, será facilitada com o uso desses marcadores SNP derivados de ESTs. No entanto, tem havido uma escassez de estudos sobre seleção assistida por marcadores para características associadas à nodulação e fixação de N<sub>2</sub> no feijão-caupi.

### **1.7.1 Mapa de ligação**

Um mapa genético é um modelo abstrato do arranjo linear de um grupo de genes e marcadores, que se baseia na recombinação homóloga entre cromátides não irmãs durante a meiose (CRISMANI, GIRARD e MERCIER, 2013). O arranjo linear é baseado nos desvios da segregação independente de Mendel e agrupados

com o uso de ferramentas da biometria, visando localizar locos genéticos associados com um fenótipo ou variável de interesse, como um indicador quantitativo da distância linear entre dois genes e estimar seus efeitos. Isso engloba o desenvolvimento de mapas de ligação genética após a genotipagem de indivíduos em populações segregantes com marcadores de DNA que abrangem o genoma desse organismo.

A análise de ligação para uma combinação de dois locos é baseada na comparação das frequências observadas e esperadas das possíveis classes genotípicas (BHERING, CRUZ e GOOD GOD, 2008). O número de possíveis classes genotípicas é função do número de alelos nos dois locos considerados e da população de referência utilizada ao qual se pode medir. A principal exigência é que os parentais possuam diferenças básicas entre os alelos que promovam a variação da característica. No entanto, os genitores não precisam ser diferentes no valor fenotípico médio da característica, uma vez que diferentes combinações alélicas podem produzir a mesma média fenotípica (LIU, 1998). Um mapa genético polimórfico permite que as duas linhagens sejam distinguidas geneticamente. Quanto mais detalhado o mapa de ligação (maior número de marcadores e da população), melhor será a resolução de mapeamento. Em média, em organismos vegetais ou animais, um segmento cromossômico de 10 cM pode conter cerca de 200 genes, com isso, uma alta densidade de marcadores genotipados aumenta a resolução do mapeamento de QTL (RESENDE, 2008). O tamanho de população de 50-250 indivíduos é usado no mapeamento. No entanto, para o mapeamento de alta resolução e uma maior probabilidade estatística para detectar a ligação, é necessária uma população maior (MOHAN et al., 1997).

Semagn, Bjornstad e Ndjiondjop (2006) descrevem alguns passos para a construção de um mapa de ligação genético. Na prática, vários esquemas de cruzamento são utilizados para gerar a população de mapeamento. Em todos estes, os genitores são cruzados para gerar uma população  $F_1$ . As linhagens recombinantes (RIL) podem ser criadas por autofecundação de cada uma das progênes  $F_1$  por várias gerações (normalmente 8). Numa concepção  $F_2$ , a população de mapeamento é gerada pela autopolização da população  $F_1$ . No retrocruzamento (RC), a população de mapeamento é gerada através do

cruzamento da progênie  $F_1$  com qualquer um dos genitores, ou ambos. No duplo haplóide, a população de mapeamento é obtida pela duplicação dos gametas da população  $F_1$  ou  $F_2$ .

O passo seguinte é decidir sobre o tipo de marcador molecular a ser utilizado para a genotipagem da população de mapeamento e fazer uma triagem (screening) nos parentais para a detecção de polimorfismo dos marcadores, seguido pela genotipagem da população de mapeamento e, finalmente, os dados são analisados quanto à ligação. Na análise de ligação, cada marcador é testado para avaliar a conformidade aos padrões de segregação mendeliana. As frequências de recombinação aos pares são calculadas entre os marcadores e testada a existência de ligação. Os grupos de ligação são estabelecidos, a distância do mapa estimada e a ordem do mapa determinada. No mapeamento de ligação, a hipótese nula a ser testada é a ausência de ligação entre dois marcadores cuja frequência de recombinação ( $r$ ) é de 50% ( $H_0: r = 0,5$ ) (LIU, 1998).

Os marcadores em populações de referência genética têm uma certa expectativa de segregação em termos de marcadores ( $F_2$ , 1: 2: 1, AA: Aa: aa, RC, 1: 1, Aa: aa, RIL, 1: 1, AA: Aa, e DH, 1: 1, AA: aa) (BOOPATHI, 2013). Embora o mapa de ligação seja construído com base nos dados do marcador, as populações de referência são simultaneamente caracterizadas por traço alvo (por exemplo, resistência a doenças, tolerância à seca) (LUCAS et al., 2011; GAUTAMI, et al., 2012; DUANGSONG, et al., 2016).

### **1.7.2 Mapa de ligação do feijão-caupi**

Em feijão-caupi os estudos de mapas de ligação genéticos associados a marcadores são recentes e escassos. Menéndez, Hall e Gepts (1997) construíram o primeiro mapa genético para o feijão-caupi a partir de um cruzamento intraespecífico. Para a construção desse mapa, foram utilizados marcadores RAPD, RFLP e AFLP para a saturação do mapa e a identificação de doenças, pragas e características morfológicas. A maioria dos marcadores gerados eram monomórficos. Ouédraogo et al. (2002) utilizando a população de mapeamento empregada por Menéndez, Hall e Gepts (1997), nesse caso em  $F_9$ , construíram um

mapa de ligação de referência mais avançado para o genoma de feijão-caupi, tanto em relação à cobertura do genoma, como em relação à densidade de marcadores.

O mapeamento de ligação no feijão-caupi progrediu com a tecnologia dos marcadores para produzir mapas genéticos informativos e cada vez mais densos (MUCHERO et al., 2009; AGBICODO et al., 2010; ADETUMBI et al., 2016). A referência foi o ensaio da Illumina 1536 Golden Gate, que foi desenvolvido e implementado para mapear 928 SNPs derivados de etiqueta de sequência expressa (EST) em caupi (MUCHERO et al., 2009). Este mapa representou uma melhoria substancial em relação ao mapa anterior de feijão-caupi, com dados mais específicos da população, utilizando 441 marcadores (AFLP, RFLP e RAPD) (OUÉDRAOGO et al., 2002). Agbicodo et al., (2010) construíram um mapa de ligação genética de caupi com 113 RILs desenvolvidas a partir do cruzamento entre Danila x TVu7778. O mapa consistiu de 282 marcadores SNP. Os marcadores foram selecionados a partir da matriz de genotipagem de 1536 SNPs, utilizando o mapa consenso do feijão-caupi (MUCHERO et al., 2009). O mapa com marcadores SNPs do feijão-caupi de 2009 continha 928 marcadores dispostos em 11 grupos de ligação (680 cM) e foi construído pela genotipagem de 632 indivíduos de seis populações de linhagem recombinante (RIL).

Em 2011 foi construído um mapa consenso para o feijão-caupi (LUCAS et al., 2011). Ambos os mapas consensos de 2009 e 2011 são baseados inteiramente em SNPs derivados de EST e todas as populações foram genotipadas para os mesmos 1536 loci. Recentemente, foi construído um mapa genético do feijão-caupi, com 125 marcadores SNPs dispostos em 12 grupos de ligação, cobrindo 378,1 cM. O mapa foi construído pela genotipagem de 98 plantas da população  $F_2$  (ADETUMBI et al., 2016).

Limitações dos mapas de ligações genéticas do feijão-caupi, como pouca densidade e existência de grandes espaços entre marcadores (OUÉDRAOGO et al., 2002, MUCHERO et al., 2009; AGBICODO et al., 2010; LUCAS et al., 2011; ADETUMBI et al., 2016), foram superadas pelo mapa consenso disponibilizado por Muñoz-Amatriaín et al. (2017), que apresenta 37.372 SNPs e cobertura total de 873,11 cM, com média de 0,26 cM entre marcadores.

### **1.7.3 Ligação e análise de locos quantitativos**

Os locos de características quantitativas (QTL) são regiões específicas do genoma associados com características quantitativas. A variação observada de QTLs é devido a segregação de vários genes polimórficos. A identificação desses genes é difícil, devido aos efeitos individuais relativamente pequenos de cada um destes genes no fenótipo. Isso porque, os genes que contribuem para fenótipos complexos geralmente estarão ligados apenas no sentido fisiológico, mas não genético (KEARSEY e POONI, 1996).

A análise de QTL baseia-se no princípio de detectar uma associação entre características (fenótipo) e as variantes (genótipos) de um marcador. Dessa forma, os marcadores genéticos que tendem a ser transmitidos juntamente com um valor específico da característica, provavelmente estarão próximos de um QTL, afetando essa característica. Com base na presença e na ausência de um marcador em um loco, a população de mapeamento é dividida em duas ou três classes para marcadores dominantes ou co-dominantes, respectivamente, e a existência de diferenças significativas entre os grupos para a característica a ser medida é determinada (TANKSLEY, 1983; COLLARD et al., 2005). Para cada classe, as médias e variâncias são calculadas para cada característica. Após a análise estatística, a existência de diferença significativa entre as médias das características dos indivíduos dentro de cada classe de marcador sugere uma relação entre o marcador e a característica. Esse marcador, em particular, é considerado como sendo ligado ao QTL (YOUNG, 1996). A produtividade, a tolerância à seca, a fixação do N<sub>2</sub> e algumas formas de resistência à doença são algumas das características de importância agrícola em plantas controladas por muitos genes. Essas características quantitativas são muitas vezes difíceis de medir (PATERSON, 1996) e os marcadores oferecem um valor potencial em seus diagnósticos.

### **1.7.3 Métodos de detecção de QTL**

Na análise QTL, muitos métodos estão envolvidos. Eles incluem análise de marcador simple (AMS), mapeamento de intervalo simples (MIS), mapeamento de intervalo composto (MIC) (TANKSLEY, 1983; LIU, 1998) e mapeamento de múltiplos

intervalos (MMI) (KAO, ZENG e TEASDALE, 1999). A análise de marcador simples (AMS) é o método mais simples para detectar QTL associado a marcadores simples. Utiliza os procedimentos estatísticos do teste 't', análise de variância (ANOVA) e análise de regressão linear. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido por regressão linear explica a variação fenotípica decorrente de QTL ligada a um marcador. No entanto, esse método apresenta limitações; a) quanto mais longe um QTL está de um marcador, menos provavelmente será detectado. Isto é devido a eventos de 'crossover' entre o marcador e o QTL. b) a magnitude do efeito de qualquer QTL detectado provavelmente será subestimada, devido à recombinação entre o marcador e o QTL. Para superar esses desafios, podem ser usados marcadores densos cobrindo todo o genoma (geralmente em intervalos inferiores a 15 cM) (TANKSLEY, 1993).

Com a aplicação dos métodos de intervalo simples e composto, mais de um marcador é analisado por vez. Ambos os métodos utilizam mapas de ligação para analisar o intervalo entre pares adjacentes de marcadores ligados ao longo do grupo de ligação ou cromossomo simultaneamente, em vez de um marcador por vez (LANDER e BOTSTEIN, 1989). O uso de marcadores ligados estabiliza a recombinação entre os marcadores e o QTL, e é considerado estatisticamente mais poderoso em comparação com a análise de ponto simple (FALCONER e MACKAY, 1996).

O MIC, por outro lado, combina o mapeamento de intervalos e a regressão linear, incluindo marcadores adicionais no modelo estatístico, além de pares adjacentes de marcadores vinculados para o mapeamento de intervalos (JANSEN e STAM, 1994). No mapeamento QTL, o método usado para detectar QTL deve ser escolhido com sabedoria. O método de mapeamento de intervalo composto é amplamente utilizado para o mapeamento de QTL em segregações de gerações derivadas de cruzamentos entre linhas endogâmicas. Ao lidar com o QTL ligado, o MIC é mais preciso e eficaz no mapeamento de QTL em comparação com a análise de mapeamento de intervalo simples.

O modelo MIM baseia-se no modelo de Cockerham para interpretação de parâmetros genéticos e o método de máxima verossimilhança para estimar parâmetros genéticos. O MIM tem a possibilidade de estimar e analisar a epistasia

entre QTL, valores genotípicos de indivíduos e herdabilidades e características quantitativas (KAO, ZENG e TEASDALE, 1999).

#### **1.7.4 QTL relacionado com a fixação de nitrogênio**

Dadas as inúmeras influências genéticas sobre a fixação de  $N_2$ , técnicas de melhoramento molecular, tais como QTL e a seleção assistida por marcador, podem potencialmente auxiliar programas de melhoramento na identificação de plantas eficientes e ineficientes na fixação de  $N_2$ . No entanto, a aplicação dessas tecnologias às características da fixação de N permanece pouco conhecida.

Na família das leguminosas, apenas alguns estudos genéticos para detectar variações naturais e QTL para características relacionadas à FBN foram realizados em soja (TANYA et al., 2005; NICOLÁS, HUNGRIA, ARIAS, 2006; SANTOS, NICOLÁS e HUNGRIA 2006; KAMFWA, CICHY e KELLY, 2015). A maioria desses estudos focou em análises QTL de característica da nodulação e produção de biomassa. Há também informações sobre outras leguminosas como ervilha (BOURION et al., 2010) e feijão comum (NODARI et al., 1993; TSAI et al., 1998). Esses estudos demonstraram o potencial de mapeamento de QTL para característica da FBN, mas ainda é necessária informação adicional sobre outras espécies, como o feijão-caupi.

Nodari et al. (1993) detectaram QTL de efeitos menores associados à característica da nodulação (número de nódulos) em feijão comum usando 70 plantas de uma população de mapeamento  $F_2$ . Doze QTLs contribuíram entre 9 e 18% na variação fenotípica. Souza et al. (2000) também identificaram QTL explicando entre 4 a 11% da variação do número de nódulos em uma população  $F_{8:9}$  (linhas de linhagem recombinante, RILs) de feijoeiro comum.

Nicolás, Hungria e Arias (2006) cruzaram duas cultivares brasileiras de soja e usaram 45 marcadores SSR em população  $F_2$  para identificar duas regiões genômicas associadas ao número de nódulos (NN) e ao peso seco do nódulo (PSN). Um total de 21 locos SSR foram mapeados com um LOD score de 3,0 e uma distância máxima de Haldane de 50 cM. Esses marcadores foram distribuídos em nove grupos de ligação com cobertura de 251,2 cM. A contribuição do QTL foi de 7,1 e 10%, respectivamente. O baixo nível de variação destes QTL é consistente com a

natureza quantitativa da FBN e da herança de nodulação na soja. Seis locos marcador foram localizados em três grupos de ligação molecular (GLM): GLM B2 (Satt066), GLM H / J (Satt192), GLM B1 (Satt197, Satt251 e Satt509) e outro incluindo Sat\_123 (GLM B1). O peso da parte aérea e peso de nódulos foram significativamente associados ao Satt197, enquanto que a relação peso de nódulos/número de nódulos foi associada ao marcador Satt\_123. Foram também reveladas seis interações epistáticas entre QTL não ligados para peso da parte aérea.

Tanya et al. (2005), usando uma população de linhagens recombinantes derivadas de F<sub>2</sub> (RIL), encontraram vários QTL para NN, PSN, PSPA, bem como para a atividade de redução de acetileno. Oito e sete QTL em uma população de soja RIL associada com número de nódulos (NN) e tamanho de nódulo, respectivamente, foram detectados por Hwang et al. (2014). Três e um QTL para NN e relação do peso seco de nódulo ao número de nódulos (NDW / NN), respectivamente, foram relatados por Santos et al. (2013) em soja.

Em feijão comum, Nodari et al. (1993) foram os primeiros a informar sobre a identificação de quatro QTL para NN na população RIL de um cruzamento entre BAT 93 e Jalo EEP558, com o QTL representando 50% da variação fenotípica. Esta mesma população de RIL foi utilizada para detectar QTL para NN sob fertilização de nitrogênio mineral (N) baixa e alta (TSAI et al., 1998, SOUZA et al., 2000). Recentemente, um estudo em ervilha identificou nove QTL para NN, quatro para peso de nódulos e oito para tamanho do sistema radicular de uma população RIL derivada de genitores que contrastam com características de raiz e nódulos (BOURION et al., 2010).

Estudo de populações de linhagens recombinantes (RIL) da espécie de leguminosa modelo *Lotus japonicus*, Tominaga et al. (2012) identificaram 34 QTLs associados a 10 características relevantes para fixação de N<sub>2</sub> e crescimento de plantas. A atividade de redução do acetileno, o número de nódulos por planta e o comprimento da haste mostraram fortes correlações QTL. Esse estudo detectou locos reguladores de fixação de N<sub>2</sub> no cromossomo 5, que promoveu o crescimento das plantas por meio da regulação do desenvolvimento dos nódulos, a detecção de um alelo no cromossomo 4, que influenciou o rendimento e o crescimento das



plantas por meio da regulação do N, e um QTL no cromossomo 3 que afetou o número de nódulos.

Ramaekers et al. (2013) realizaram uma análise de QTL da FBN em uma população (RIL) de feijão comum em ensaio de campo. Eles construíram 11 grupos de ligação e identificaram dois QTL que representam até 21% da variância fenotípica de N (%) no grupo de ligação 1 e 4. Em outro experimento em estufa, eles detectaram dois QTL, representando até 18% da variação do N total fixado pela planta, nos grupos de ligação 4 e 10.

Avanços importantes foram alcançados pela caracterização e mapeamento de QTL na soja e outras culturas. No entanto, estudos genéticos sobre a FBN em feijão-caupi e outras leguminosas são escassos, apesar da necessidade de informação genética sobre FBN. Houve poucos progressos no desenvolvimento de marcadores ligados a QTL úteis na seleção de características agronômicas no feijão-caupi. O progresso foi mais rápido em outras leguminosas, como o feijão comum e soja, e é possível que algumas dessas informações possam ser alavancadas, pois existe um grau significativo de sintonia entre essas leguminosas e o genoma de feijão-caupi.

## 1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADETUMBI, J. A. et al. Genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) using SNP markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 20, p. 830-834, 2016.

AGBICODO E. M. et al. Identification of markers associated with bacterial blight resistance loci in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Euphytica**, v.175, n.2, p. 215–226, 2010.

AYISI, K. K.; NKGAPELE, R. J.; DAKORA, F. D. Nodule formation and function in six varieties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) grown in a nitrogen-rich field soil in South Africa. **Symbiosis**, vol. 28, n. 1, p. 17–31, 2000.

ALCANTARA, R. M. C. M. de et al. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. **Revista Ciência Agronômica**, v.45, n.1, p. 1-9, 2014.

ANDRADE JÚNIOR, A. S. de et al. Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Teresina: Embrapa: CPAMN, (Embrapa- CPAMN. **Sistemas de Produção 2**), 2002.

ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Microrganismos de importância agrícola**. Embrapa, Brasília, DF. 1994.

ARRENDELL, S. et al. Variation for nitrogen fixation among progenies of a Virginia x Spanish cross. **Crop Science**, v. 25, p. 865-869, 1985.

ARNOLD, W. et al. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 203, n.3, 715-738, 1988.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 9, p. 229-241, 1991.

AWONAIKE, K. O.; KUMARASINGHE, K. S. e DANSO, S. K. A. Nitrogen fixation and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) as influenced by cultivar and *Bradyrhizobium* strain. **Field Crops Research**, v. 24, p. 163 – 171, 1990.

BA, F. S.; PASQUET, R. S.; GEPTS, P. Genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) as revealed by RAPD markers. **Genetics Resources and Crop Evolution**, v.51, p. 539-550, 2004.

BARRON, J. E. et al. Response to selection for seeds yield and nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crop Research**, v.62, p. 119-128, 1999.

BERGENSEN, F. J. Measurements of nitrogen fixation by direct means. In BERGENSEN, F. J. (Ed.). **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. John Wiley and Sons. New York. 701p., 1980.

BERNARDO, R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. **Crop Science**, v. 48, n. 5, p. 1649–1664, 2008.

BHERING, L. L.; CRUZ, C.D.; GOOD GOD, P. I. V. Estimativa de frequência de recombinação no mapeamento genético de famílias de irmãos completos, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.3, p. 363-369, 2008.

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

BLISS, F. A. Breeding for enhancement of dinitrogen potential of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) In. **Nitrogen Fixation and CO<sub>2</sub> Metabolism**. Eds. LUDDEN, P. W.; BURRIS, J. E. Elsevier Publishers, New York, p. 303– 310, 1985.

BLISS, F. A. Breeding plants for enhanced beneficial interactions with soil microorganisms. In **Plant Breeding in the 1990s**. Eds. STALKEN, H. T. e MURPHEY, J. p. 251-273. C.A.B. International, Wellingford, UK, 1991.

BOOPATHI, N. M. **Genetic mapping and marker assisted election**: Basics, practice and benefits. Springer, India, 2013.

BORISOV, A.Y. et al. The *Sym35* gene required for root nodule development in pea is an ortholog of *Nin* from *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 131, p.1009–1017, 2003.

BOURION, V. et al. Genetic dissection of nitrogen nutrition in pea through a QTL approach of root, nodule, and shoot variability. **Theoretical and Applied Genetics**, v.121, p.71-86, 2010.

BOUSSAU, B. et al. Computational inference of scenarios for alpha-proteobacterial genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.101, p. 9722–9727, 2004.

**BRASIL**. Decreto N° 3664 de 17 de novembro de 2000. Regulamenta a lei nº 9972, de 25 de maio de 2000, que institui a classificação de produtos vegetais, seus subprodutos e resíduos de valor econômico e dá providências. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 20 de novembro de 2000. Seção 1.

BRECHENMACHER, L. et al. Establishment of a protein reference map for soybean root hair cells. **Plant Physiology**, v.149, p. 670–682, 2009.

BROUGHTON, W. J. et al. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. Strain NGR234-legume symbioses. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n.10, p. 3654-3663, 2006.

CHING, A. D. A. et al. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. **BioMedical Central Genetics**, v.3, p.19, 2002.

CHOI, H. K. et al. Estimating genome conservation between crop and model legume species. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.101, p.15289–15294, 2004.

CHRISTOPHE, S.; et al. Plant N Fluxes and Modulation by Nitrogen, Heat and Water Stresses: A Review Based on Comparison of Legumes and Non-Legume Plants. In: ARUNSHANKER, B.V, EDS. **Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations**, p. 79-118, 2011.

COALE, F. J.; MEISINGER, J. J.; WIEHOLD, W. J. Effects of plant breeding and selection on yields and nitrogen fixation in soybean under two soil nitrogen management regimes. **Plant and Soil**, v. 86, p.357-367, 1985.

COLLARD, B. C. Y. et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v. 142, n.1, p. 169–196, 2005.

**CONAB**- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 4- Safra 2015/16 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-154, jan. 2016.

COOPER, J.; E. Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. **Advances in Botanical Research**, v.41, p.1-62, 2004.

COULIBALY, S. et al. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, p. 358-366, 2002.

CRISMANI, W.; GIRARD, C.; MERCIER, R. Tinkering with meiosis. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 2, p. 695-709, 2013.

DAKORA F. D. et al. Assessment of N fixation in groundnut (*Arachis hypogea* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and their relative N contribution to a succeeding maize crop in northern Ghana. **MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 3, p. 389–399, 1987.

DAKORA, F. D. et al. Food Grain Legumes: Their Contribution to Soil Fertility, Food Security, and Human Nutrition/Health in Africa. In: BRUIJIN, F. J. editor, **Biological Nitrogen Fixation**. v. 2, p.1063-1070, 2015.

D'HAENZE, W. e HOLSTERS, M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. **Glycobiology**, v. 12, n. 6, p.79-105, 2002.

DHANASEKAR, P.; DHUMAL, K. N.; REDDY, K. S. Identification of RAPD markers linked to plant type gene in pigeonpea. **Indian Journal of Biotechnology**, v.9, p. 58-63, 2009.

DOWNIE, J. A.; YOUNG, J. P. W.; Genome sequencing-the ABC of symbiosis. **Nature**, v. 412, p. 597-598, 2001.

DUANGSONG, U. et al. Identification of a major QTL for resistance to *Cercospora* leaf spot disease in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) revealed common genomic region with that for the resistance to angular leaf spot in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Euphytica**, v. 209, p.199-207, 2016.

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

ELISONDO, B. J. et al. Response to selection for seed yield and nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in common bean. **Field Crops Research**, v. 62, p.119-128, 1999.

ELKAN, G.H. Biological Nitrogen Fixation in Peanuts. In: PATTEE, H.E.; STALKER, H.T. **Advances in peanut science**. American Peanut Research and Education, p. 286-300, 2009.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics second edition**. Longman, England. 340p. 1981.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to Quantitative Genetics**. Longman Group Ltd., 1996.

FALL, L. et al. Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] varieties determined by ARA and RAPD techniques. **African Journal of Biotechnology**, v.2, p.48-50, 2003.

**FAO**. FAOSTAT. Crops. Cow peas, dry. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em 30 de março de 2017.

FERGUSON, B. J. et al. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n.1, p. 61–76, 2010.

FREIRE FILHO, et al. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. -Teresina: Embrapa Meio-Norte, p. 80, 2011.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília, DF: IITA: EMBRAPA, p. 26-46, 1988.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**. p. 519, 2005.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; SANTOS, A. A. Cultivares de caupi para região Meio-Norte do Brasil. In: CARDOSO, M. J. (Org.). **A cultura do feijão-caupi no Meio-Norte do Brasil**. Embrapa Meio-Norte, Teresina. (Circular Técnica, 28), p. 67-88, 2000.

FREIRE FILHO, F.R. et al. Melhoramento genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região do Nordeste. Embrapa Semi-Árido. In: QUEIROZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS S.R.R., editores, **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

FREITAS, A.D.S.; FERNANDES SILVA, A.; SAMPAIO, V. de S. B. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. **Biomass Bioenergy**. v. 45, p.109–114, 2012.

FROTA, A. B.; PEREIRA, P. R. Caracterização da produção de feijão-caupi na região Meio-Norte do Brasil. In: CARDOSO, M. J. (Org.). **A cultura do feijão-caupi no Meio Norte do Brasil**, Teresina: Embrapa Meio-Norte, (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28), p. 9-25, 2000.

GAGE, D. I. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 2, 2004.

GAGE, D.G. Nodule development in legumes. In: EMERICH, D.W.; KRISHNAN, H. B. (eds.) **Nitrogen fixation in crop production**. ASA, CSSA, SSSA, Madison, USA p. 1-24, 2009.

GAGNON, H.; IBRAHIM, R. K. Aldonic Acids: A Novel Family of *nod* Gene Inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, and *Sinorhizobium meliloti*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 10, p. 988-998, 1998.

GAUTAMI, B. et al. Quantitative trait locos analysis and construction of consensus genetic map for drought tolerance traits based on three recombinant inbred line populations in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) **Molecular Breeding**, v.30, p. 757-772, 2012.

GEPTS, P. et al. Legumes as a model plant family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1228–1235, 2005.

GHOSH, S. et al. "Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches," **Plant Science**, v. 162, n. 3, p. 329–333, 2002.

GONZÁLEZ, V, et al. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 103, p. 3834–3839, 2006.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à Genética**. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 764p., 2008.

GUPTA, P. K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphism: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**, v.80, p.524-535, 2001.

HAFNER, H. et al. Effect of nitrogen, phosphorus and molybdenum application on growth and symbiotic nitrogen fixation of groundnut in an acid soil in Niger. **Fertility Research**, v. 31, p. 69-77, 1992

HALLAUER, A. R.; MIRANDA, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**, 2nd edition. Iowa State University Press. Ames. Iowa, 1988.

HAMILTON, M. B. **Population genetics**. Wiley-blacwell, Chichester, West sussex, 2009

HASER, A. et al. A mutation in *Vicia faba* results in ineffective nodules with impaired bacteroid differentiation and reduced synthesis of late nodulins. **Journal of Experimental Botany**, v.43, p.1397–1407, 1992.

HORST, W. J.; HÄRDTER, R. Rotation of maize with cowpea improves yield and nutrient use of maize compared to maize monocropping in an alfisol in the northern Guinea Savanna of Ghana. **Plant Soil**, v. 160, p.171, 1994.

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

HUNGRIA, M.; BARRADOS, C. A.; VALLSGROVE, R. M. nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgares* L. **journal experimental botany**, v. 42, p.839-844, 1991.

HWANG, S. et al. Genetics and mapping of quantitative traits for nodule number, weight, and size in soybean *Glycine max* (L.) Merr. **Euphytica**, v.195, p.419-434, 2014.

JANDER, G. et al. Arabidopsis map-based cloning in the post genome era. **Plant Physiology**, v. 129, p. 440-450, 2002.

JANSEN, R. C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, v. 136: 85, p.1447-1455, 1994.

KAHL, G. et al. SNPs: detection techniques and their potential for genotyping and genome mapping. In: MEKSEN, K.; KAHL, G. (Eds.); **The handbook of plant genome mapping**. Wiley-VCH Verlag GmbH e Co. p. 75-107, 2004.

KAMFWA, K.; CICHY, K. A.; KELLY, J. D. Genome-wide association analysis of symbiotic nitrogen fixation in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.128, p.1999-2017, 2015.

KAO, C. H.; ZENG, Z. B.; TEASDALE, R. D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, v.152, p.1203-1216, 1999.

KEARSEY, M. J.; POONI, H. S. **The genetical analysis of quantitative traits**. Chapman and Hall. London, Weinhein, New York. p. 381, 1996.

KNIEF, C.; DELMOTTE, N.; VORHOLT, J. A. Bacterial adaptation to life in association with plants –A proteomic perspective from culture to in situ conditions. **Proteomics**, v. 11, p. 1-20, 2011.

KNEEN, B. E. et al. *Sym 13*: A gene conditioning ineffective nodulation in *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, v. 94, p. 899-905, 1990.

KOUCHI, H. et al. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. **Plant and Cell Physiology**, v.51, p.1381 – 1397, 2010.

KRISHNAN, H. B.; KUO, C. L.; PUEPPKE, S. G. Elaboration of flavonoid-induced proteins by the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* is regulated by both nodD1 and nodD2, and is dependent on the cultivar-specificity locos, noIXWBTUV. **Microbiology**, v.141, p. 2245-2251, 1995.

LACERDA, A. M. et al. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, v. 51, n. 293, p. 67- 82, 2004.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, p. 185-99, 1989.

LATEEF, D. D. DNA Marker Technologies in Plants and Applications for Crop Improvements. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 3, p. 7-18, 2015.

LAWN, R. J.; W. A. BRUN. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. Effect of photosynthetic source-sink manipulations. **Crop Science**, v.14, p. 11-16, 1974.

LIBAULT, M. et al. An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants. **The Plant Journal**, v. 63, p. 86–99, 2010.

LIU, B. H. **Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis**. CRC Press, New York, 1998.



LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, p.1-37, 2004.

LONG, S. R. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. **Cell**, v.56, p. 203–214, 1989.

LOPEZ, C. et al. Using cDNA and genomic sequences as tools to develop SNP strategies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.425-431, 2005.

LUCAS, M. R. et al. Cowpea-soybean synteny clarified through an improved genetic map. **The Plant Genetics**, v.4, p.218–225, 2011.

MACLEAN, A. M.; FINAN, T. M.; SADOWSKY, M. Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. **Plant Physiology**, v. 144, p. 615-622, 2007.

MAHALAKSHMI, V. N. G.; LAWSON, M.; ORTIZ, R. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) core collection defined by geographical, agronomical and botanical descriptors. Plant Genetic Resource: **Characterization and Utilization**, v. 5, n.3, p. 113-119, 2007.

MAMMADOV, J. et al. SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

MARÉCHAL, R.; MACHERPA, J. M.; STAINER, F. Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base des données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. **Boissiera**, v. 28, p.1- 273, 1978.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region on Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 1005-1010, 1997.

MATHER, K.; J. L. JINKS. **Biometrical genetics**, 3rd ed. Chapman and Hall, London, UK, 1982.

MENÉNDEZ, C. M.; HALL, A. E.; GEPTS, P. A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 1210–1217, 1997.

MUÑOZ-AMATRIÁIN, M. et al. Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food security. **The plant Journal**, v. 89, n.5, p.1042-1054, 2017.

MERCANTE, F. M.; GOI, S. G.; FRANCO, A. A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **Revista Universidade Rural, serie ciências da vida**, v. 22, p. 65-81, 2002.

MOHAN, M. et al. Genome mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 87-103, 1997.

MUCHERO, W. et al. A consensus genetic map of cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] and synteny based on EST-derived SNPs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, p.18159–18164, 2009.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**, v.7, p. 885-869, 1995.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. microrganismos endofíticos: interações com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 29, p.62-76, 2003.

NEVES, A. C. das et al. Cultivo do Feijão-caupi em Sistema Agrícola Familiar. Embrapa Meio-Norte, Teresina, p.1 (**Curricular Técnica 51**), 2011.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Ecologia do Rizóbio em solos tropicais. Seropédica: Embrapa CNPAB, 27 p. **Documentos 23**, 1996.

NG, N. Q.; MARÉCHAL, R. Cowpea taxonomy, origin and germplasm. In: SINGH, S. R.; RACHIE, K. O. (eds) **Cowpea Research, Production and Utilization**. p. 11-21, 1985.

NICOLÁS, M. F.; ARIAS, C. A. A.; HUNGRIA, M. Genetics of nodulation and nitrogen fixation in Brazilian soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36. n. 2. p. 109-117. 2002.

NICOLÁS, M. F.; HUNGRIA, M.; ARIAS, C. A. A. Identification of quantitative trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars. **Field Crops Research**, v. 95, p. 355-366, 2006.

NODARI, R. O. et al. Towards an integrated linkage map of common bean III. Mapping genetic factors controlling host bacteria interactions. **Genetics**, 134: 341 – 350, 1993.

NUGDALLAH, G. A.; EL TINAY, A. H. Effect of cooking on cowpea protein fractions. **Plant Food for Human Nutrition**, v. 51, n.3, p. 277-282, 1997.

NUTMAN, P. S. Varietal differences in the nodulation of subterranean clover. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.17, p.381-425, 1967.

OGUNMODEDE, B. K.; OYENUGA, V. A. Vitamin B content of cowpeas (*Vigna unguiculata* walp) II. –Pyridoxine, pantothenic acid, biotin and folic acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.21, n.2, p. 87-91, 1970.

OLDROYD G. E. D.; DOWNIE, A.L. Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. **Molecular and Cellular Biology**, v.5, p.556-576, 2004.

OLSEN, K. M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, v.56, p.517-526, 2004.

OUÉDRAOGO, J. T. et al. An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. **Genome**, v.45, p.175–188, 2002.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin, taxonomy and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B., MOHAN RAJ, D. R., DASHIELL, K., JACKAI, L. E. N. (eds.). **Advances in Cowpea Research. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Centre for Agricultural Sciences (JIRCAS)**, IITA, Ibadan, Nigeria. p. 1-12, 1997.

PARK, S. J.; BUTTERY, B. R. Inheritance of non-nodulation and ineffective nodulation mutants in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Journal of Heredity**, v. 85, p.1-3,1994.

PATERSON, A. H. DNA marker-assisted crop improvement. In: Paterson, A.H. (Ed.); **Genome mapping in plants**, pp. 71-82. San Diego, California. Academic Press, Austin, Texas,1996.

PECK, M. C.; FISHER, R. F.; LONG, S. R. Diverse Flavonoids Stimulate NodD1 Binding to *nod* Gene Promoters in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 15, p. 5417-5427, 2006.

PENMETSA, R. V. et al. Dual Genetic Pathways Controlling Nodule Number in *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, v. 131, p. 998-1008, 2003.

PEREIRA, P. A. A.; BRAIDOTTI, W. Comparação de métodos de melhoramento de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para o incremento da fixação simbiótica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 31, n.1, p. 15-21, 2001.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 64, p.180-201, 2000.

PIMRATCH, S. et al. Evolution of seven peanut genotypes for nitrogen fixation and agronomic traits. **Songklanakarin Journal Science Technology**, v. 26, n. 03, p. 295-304, 2004.

PEMBERTON, I. J.; SMITH, G. R.; MILLER JR., J. C. Inheritance of ineffective nodulation in cowpea. **Crop Science**, v. 30, p.568-571, 1990.

PRICE, N. P. J. et al. Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. **Molecular Microbiology**, v.6, p. 3575-3584, 1992.

PROCHNOW, L. I.; ABDALLA, S. R. S. A indústria de fertilizante a indústria de fertilizantes nitrogenado nitrogenados e o futuro e o futuro. **Informações Agrônomicas** nº 120 – dezembro/2007.

PROPOROV, N. A.; TIKHONOVICH, I. A. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobium symbiosis. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50. p. 89-99. 2003.

PURDOM, D.; TRESE, A. T. Morphological and Molecular Characteristics of Host-Conditioned Ineffective Root Nodules in Cowpea. **Plant Physiology**, v. 109, p. 239-244, 1995.

RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinions in Plant Biology**, v.5, p.94-100, 2002a.

RAFALSKI, A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. **Plant Science**, v. 162, p. 329-333, 2002b.

RAJESH, P. N.; MUEHLBAUER, F. J. Discovery and detection of single nucleotide polymorphism (SNP) in coding and genomic sequences in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Euphytica**, v. 162, p. 291-300, 2008.

RAMAEKERS, L. C. H. et al. Identifying quantitative trait loci for symbiotic nitrogen fixation capacity and related traits in common bean. **Molecular Breeding**, v. 3, p.163-180, 2013.

RESENDE, M. D. V. Genética de Populações e Desequilíbrio de Ligação Gênica. In: **Genômica Quantitativa e Seleção no Melhoramento de Plantas Perenes e Animais**. Embrapa, p. 15, 2008.

RIDOUT, C.; DONINI, P. Use of AFLP in cereals research. **Trends in Plant Science**, v.4, p.76-79, 1999.

ROBINSON, H. F.; COMSTOCK, R.E.; HARVEY, P.H. Estimates of heritability and the degree of dominance in corn. **Agronomy Journal**, v. 41, p. 353-359, 1949.

ROGEL, M. A.; ORMENO-ORRILLO, E.; ROMERO, E. M. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 96-104, 2011.

RUMJANEK, N. G. et al. Fixação Biológica de nitrogênio in: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; VIANA, F. M. P.; RIBEIRO, V.Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, cap. 8, p. 281-335, 2005.

SAGAN, M. et al. Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after  $\gamma$ -ray mutagenesis. **Plant Science**, v. 3, p. 63-71, 1995.

SANGINGA, N., LYASSE, O. SINGH, B. B. Phosphorus use efficiency and nitrogen balance of cowpea breeding lines in a low P soil of the derived savanna zone in West Africa. **Plant and Soil**, v. 220, p. 119–128, 2000.

SANTOS, C. A. F. et al. Genetic analysis of total seed protein content in two cowpea crosses. **Crop Science**, v. 52, p. 2501-2506, 2012.

SANTOS, M. A. et al. Mapping of QTLs associated with biological nitrogen fixation traits in soybean. **Hereditas**, v. 150, p. 17-25, 2013.

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

SEMAGN, K.; BJORNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M. N. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 25, p. 2569-2587, 2006.

SHARMILA, V.; GANESH, K. S.; GUNASEKARAN, M. Generation mean analysis for quantitative traits in sesame (*Sesamum indicum* L.) crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 80-84, 2007.

SHIRAIWA, T.; SINCLAIR, T. R.; HASHIKAWA, U. Variability in nitrogen fixation activity among soybean cultivars grown under field conditions. **Japen Journal of Crop Science**, 63:111-117, 1994.

SIKINARUM, L. et al. Heritability and correlations for nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation and related traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, n.12, p. 1956-1962, 2007.

SINGH, B. B. et al. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A. et al. (Eds). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. IITA, Ibadan, p. 22-40, 2002.

SINGH, B. et al. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. **Field Crops Research**, v. 84, p. 169–150, 2003.

SOUZA, A. A. et al. Effects of *Phaseolus vulgaris* QTL in controlling host-bacteria interaction under two levels of nitrogen fertilization. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 155–161, 2000.

SZCZYGLOWSKI, K. et al., Nodule Organogenesis and Symbiotic Mutants of the Model Legume *Lotus japonicas*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 7, p. 684–697, 1988.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. Eliane Romanato Santarém et al. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TANKSLEY, S. D. et al. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. **Nature**, v.7, p. 257-264, 1989.

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

TANKSLEY, S. D. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 3-8, 1983.

TANYA, P. et al. Identification of SSR markers associated with N<sub>2</sub>-fixation. **Korean Journal of Genetics**, v. 27, n 4, p. 351-359, 2005.

TEÓFILO, E. M et al. Potencial fisiológico de sementes de feijão-caupi produzidas em duas regiões do estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**. v. 39, n. 3, p. 443-448, 2008.

TIMKO, M. P. et al. Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. **BMC Genomics**, v. 9, p. 109, 2008.

TOMINAGA, A. T. et al. Quantitative trait locos analysis of symbiotic nitrogen fixation activity in the model legume *Lotus japonicus*. **Journal of Plant Research**, v.125, p. 395-406, 2012.

TSAI, S. M. et al. QTL mapping for nodule number and common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v. 204, p. 135 – 145, 1998.

UEDA, T. et al. Phylogeny of sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a nodC segment. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 468-472, 1995.

VAN DE SANDE, K. et al. Modification of phytohormone response by a peptide encoded by ENOD40 of legumes and a non-legume. **Science**, v. 273, p. 370-373, 1996.

VANCE, C. P. et al. Plant regulated aspects of nodulation and N fixation. **Plant Cell Environmental**, v. 11, p.413–427, 1988.

VANCE, C. P., UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a non-renewable resource. **New Phytologist**, 157, 423–447, 2003.

VERDCOURT, B. Studies in the Legminosue-Papillioideae for the Flora of Tropical East Africa. IV. **Kew Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 507-569, 1970.

WAIS, R. J.; KEATING, D. H.; LONG, S. R. Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Physiology**, v. 129, n. 1, p. 211-224, 2002.

WELSH, J. R. **Fundamentals of Plant Genetics and Breeding**. John Wiley and Sons, Inc. Canada, 1981.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v.287, p.3-14, 2006.

XAVIER, G. R. et al. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão de diferentes nacionalidades. **Revista Caatinga**, v. 19, n.1, p. 25-33, 2006.

YAN, H. H. et al. Comparative physical mapping reveals features of microsynteny between *Glycine max*, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana*. **Genome**, v. 47, p.141–155, 2004.

YANNI, Y. G.; ABD EL-FATTAH, F. K. Towards integrated biofertilization management with free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in the Nile Delta. **Symbiosis**, v. 27, p. 319-331, 1999.

YANG, W. C. et al. *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. **Plant Cell**, v. 6, p.1415–1426, 1994.

YOUNG, N. D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. **Annual review of phytopathology**, v. 34, p. 479-501, 1996.

ZHANG, Z. et al. “Genetic diversity and genetic relationship of *Jatropha curcas* between China and Southeast Asian revealed by amplified fragment length polymorphisms,” **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 15, p. 2825–2832, 2011.

ZHU, Y.L. et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. **Genetics**, v.163, p. 1123-1134, 2003.

ZIEGLER, A; KONIG, I.; THOMPSON, J. Biostatistical aspects of genome wide association studies. **Biometrical Journal**, v. 50, n.1, p. 8-28, 2008.

## CAPÍTULO II

---

### **Análise genética para eficiência da fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi**

**Artigo submetido à Revista Crop  
Science (ISSN 0011-183X)**



## **Análise genética para eficiência da fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi**

Sirando Lima Seido\*, Carlos Antonio Fernandes Santos, Paulo Ivan Fernandes Júnior, Danilo Olegário Matos da Silva, Washington Carvalho Pacheco Coelho, Michael Paul Timko.

S.L. Seido, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos- CEP: 52171-900- Recife/PE. C.A.F. Santos, and P.I. Fernandes Júnior, Embrapa Semiárido. CP 023, CEP: 56302-970, Petrolina, PE, Brazil. D.O.M. Silva and W.C.P. Coelho, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte – CEP: 44036-900, Feira de Santana-BA, Brazil. M.P. Timko, Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22904 USA. \* Autor correspondente ([siroseido@hotmail.com](mailto:siroseido@hotmail.com))

### **Resumo:**

O objetivo do presente trabalho foi estimar parâmetros genéticos da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em feijão-caupi, para orientar no desenvolvimento de cultivares eficientes na fixação de N<sub>2</sub>. As análises de médias e variâncias foram realizadas com os parentais, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e RCs, dos cruzamentos contrastantes IC-1 (ineficiente) x BRS Marataoã (eficiente) e IC-1 x BRS Pujante (eficiente). Análises de segregação para plantas eficientes e não eficientes indicam que a fixação de N<sub>2</sub> é controlada por dois genes, com efeito epistático dominante recessivo (13:3). Herdabilidades de sentido restrito foram de moderada a alta, sendo de 78% e 90% para matéria seca da parte aérea (MSPA), 58% e 78% para número de nódulos/planta (NN), 58% e 86% para matéria fresca de nódulos (MFN) e 71% e 85% para nitrogênio acumulado (NA), para IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante, respectivamente. Os efeitos gênicos aditivos apresentaram contribuição elevada para os caracteres avaliados. O número de genes para MSPA, NN, MFN e NA variou de 2 a 9 pelo método de Mather e Jinks, e de 1 a 2 pelo método de Lande, nos dois cruzamentos. Segregação transgressiva de quase 30% foi observada para maior eficiência nas duas populações F<sub>2</sub>. Correlações significativas e positivas foram

33 estimadas entre MSPA x MFN e MFN x NA, enquanto NN apresentou correlação  
34 negativa significativa com NA e MSPA. Os resultados indicam segregação digênica  
35 para fixação de N<sub>2</sub> e controle poligênico para FBN em feijão-caupi, que pode ser  
36 melhorado por métodos simples de melhoramento.

37

38 Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, fixação de nitrogênio, número de genes,  
39 herdabilidade.

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66 **Genetic analysis for efficiency of biological nitrogen fixation in cowpea**

67

68

69 **Abstract:**

70 The objective of this work was to estimate the genetic parameters of biological  
71 nitrogen fixation (BNF) in cowpea in order to guide the development of efficient  
72 cultivars in N<sub>2</sub> fixation. The means and variances of the parents F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, and BCs, of  
73 the crosses IC-1 (inefficient) × BRS Marataoã (efficient) (cross 1), and IC-1 × BRS  
74 Pujante (efficient) (cross 2) were analyzed. Segregation analyses for efficient and  
75 non-efficient plants indicate that N<sub>2</sub> fixation is controlled by two genes with dominant-  
76 recessive epistatic effect. Narrow-sense heritability estimates were 78% and 90% for  
77 shoot dry matter (SDM); 58% and 78% for number of nodules/plant (NN); 58% and  
78 86% for nodule fresh matter (NFM), and 71% and 85% for accumulated nitrogen  
79 (AN), for cross 2 and cross 1, respectively. The additive gene effects highly  
80 contributed to the evaluated parameters. Genes number estimates for SDM, NN,  
81 NFM, AN ranged from 2 to 9 genes, by Mather and Jinks method, and from 1 to 2  
82 genes by Lande method, in both crosses. Almost 30% transgressive segregation  
83 was observed for greater efficiency in both F<sub>2</sub> populations. Significant and positive  
84 correlations were estimated between SDM x NFM and NFM x AN, while NN showed  
85 significant negative correlation with AN and SDM. Results indicate digenic  
86 segregation for N<sub>2</sub> fixation and polygenic control for BNF in cowpea, which can be  
87 improved by simple breeding methods.

88

89

90

91 **Key words:** *Vigna unguiculata* L., Nitrogen fixation, Number of genes, Heritability.

92

93

94

95

96

97

## 98 **Introdução**

99

100 O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma importante fonte de  
101 proteína vegetal, ferro e minerais, principalmente para as populações mais carentes  
102 do Nordeste brasileiro e em muitos outros países da África (Ddamulira et al., 2015;  
103 Silva et al., 2016). Como em outras plantas leguminosas, o feijão-caupi possui a  
104 capacidade de fixar N<sub>2</sub> pela associação simbiótica com bactérias do grupo rizóbio,  
105 na ausência do suprimento adequado de N no solo (Freitas et al., 2012; Sarr et al.,  
106 2015). Essa habilidade de fixar N<sub>2</sub> tem recebido merecida importância especialmente  
107 pelo baixo custo, redução dos danos ambientais e uma crescente demanda da  
108 qualidade nutricional do feijão-caupi (Dakora et al., 2015).

109 O melhoramento genético do feijão-caupi para maior eficiência na fixação  
110 biológica de nitrogênio - FBN é uma importante ferramenta que pode beneficiar a  
111 sustentabilidade da sua produção. O potencial para o melhoramento da FBN tem  
112 sido reconhecido em trabalhos avaliando diferentes genótipos associado a estirpes  
113 recomendadas (Xavier et al., 2006; Ndukwu et al., 2016). No entanto, os estudos  
114 sobre a FBN em feijão-caupi não estão, na sua maioria, associados ao  
115 melhoramento genético, diferentemente do que ocorreu com a cultura da soja no  
116 Brasil, que o melhoramento foi direcionado à obtenção de cultivares com alta  
117 produção sem adubação nitrogenada (Döbereiner, 1990).

118 O feijão-caupi, embora considerado uma cultura tropical, que se adapta bem  
119 às condições de clima e solo do Brasil, ainda apresenta baixa produtividade (400 a  
120 500 kg. ha<sup>-1</sup>). Essa baixa produtividade pode estar associada principalmente à  
121 insuficiência na disponibilidade de nutrientes, sobretudo N, fator mais limitante para  
122 a produção de hortaliças leguminosas (Lacerda et al., 2004). Pesquisa realizada por  
123 Freire Filho et al. (1999) estima produtividades potenciais superiores a 5.000 kg. ha<sup>-1</sup>  
124 <sup>1</sup>, dependendo do genótipo, da interação rizóbio-leguminosa e do ambiente. O  
125 melhoramento genético para maior eficiência da FBN em feijão-caupi pode ser de  
126 grande importância na obtenção de patamares de produtividade como o citado  
127 acima, porque segundo Elkan (2009), cerca de 50% da simbiose planta-leguminosa  
128 é controlada pelo hospedeiro.

129 Apesar da importância econômica e social da FBN, poucos estudos têm sido  
130 publicados sobre o controle genético da fixação de N<sub>2</sub> em feijão-caupi. Proporov e  
131 Tikhonovich (2003) relatam que a herdabilidade em sentido amplo e restrito para  
132 fixação de N<sub>2</sub>, em diferentes leguminosas, variaram de 0,76 a 0,90, indicando o alto  
133 potencial para o ganho genético. Nicolás et al. (2002), estudando populações  
134 derivadas de cultivares comerciais de soja, encontraram herdabilidade de sentido  
135 restrito para caracteres de nódulos de 0,39 a 0,77, com predominância do efeito  
136 aditivo. Sikinarum et al. (2007), cruzando cultivares de *Arachis hypogaea* para alta e  
137 baixa fixação de N<sub>2</sub> estimaram, na população F<sub>5</sub>, herdabilidade de moderada a alta  
138 para peso de nódulo (0,63 a 1,0), massa de parte aérea (0,84 a 0,96) e nitrogênio  
139 fixado entre (0,84 a 0,98). O conhecimento da extensão de como os atributos são  
140 herdáveis é um pré-requisito para os programas de melhoramento genético. No  
141 entanto, essas informações sobre FBN para o feijão-caupi não estão disponíveis.

142 O objetivo do presente estudo foi estimar parâmetros genéticos e  
143 correlações para variáveis da FBN em feijão-caupi, baseados em dois cruzamentos  
144 contrastantes, de forma a fornecer informações básicas para o melhoramento de  
145 genótipos mais eficientes na FBN.

146

## 147 **Material e métodos**

148

### 149 ***Material genético e cruzamentos***

150 Três linhas parentais foram utilizadas no presente estudo. IC-1 é um mutante  
151 natural que produz nódulos, mas é ineficiente para a fixação de N<sub>2</sub>, denominada  
152 Nod<sup>+</sup> Fix<sup>-</sup>. Essa linha mutante é resultante de uma mistura varietal (Iron and Clay),  
153 obtida a partir de sementes Kaufman (Ashdown, AR) (Pemberton, Smith e Miller,  
154 1990). A cultivar BRS Marataoã, desenvolvida pela Embrapa Meio-Norte, é  
155 resultante do cruzamento da cultivar Seridó com a linhagem TVx1836-013j. A BRS  
156 Pujante foi desenvolvida pela Embrapa Semiárido do cruzamento da linhagem TE  
157 90-180-26F com a cultivar Epace10. Essas duas cultivares são recomendadas para  
158 a região Nordeste do Brasil e identificadas pela capacidade de fixar N<sub>2</sub> com bactérias  
159 do grupo rizóbio (Leite et al., 2009; Marinho et al., 2014).

160 As gerações  $F_1$ ,  $F_2$  e retrocruzamentos (RCs) foram obtidas a partir dos  
161 cruzamentos, IC-1 × BRS Pujante e IC-1 × BRS Marataoã. As flores foram  
162 emasculadas antes da antese e os cruzamentos controlados realizados com pólen  
163 recém-coletado dos dois parentais. Todos os ensaios de campo foram realizados em  
164 Petrolina, Pernambuco, Brasil (09° 23 S. 40° 22 'W e 365 m acima do nível do mar).  
165 As sementes dos parentais e das gerações  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_1$  ( $F_1 \times P_1$ ) e  $RC_2$  ( $F_1 \times P_2$ )  
166 foram semeadas em vasos plásticos 3 L, contendo solo não estéril e mantidas em  
167 ambientes protegidos com sombrite 70%.

168

### 169 ***Inoculação***

170 Foi realizada uma inoculação com um mix de três estirpes de *rizóbios*  
171 recomendadas para feijão-caupi, BR 3267, BR 3262 e BR 3299, cedidas pela  
172 Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. As bactérias cresceram em meio YM líquido  
173 (Vincent, 1970), até a concentração de células equivalente a  $10^9$  células/mL. Foram  
174 realizadas duas inoculações com 1mL do inóculo na semeadura e 5 dias após a  
175 emergência das plântulas. A expressão fenotípica, quanto à eficiência e ineficiência  
176 da FBN na geração  $F_2$ , foi determinada pela presença ou ausência de folhas  
177 amareladas (aclorofiladas) aos 45 dias após o plantio.

178

### 179 ***Variáveis analisadas***

180 As plantas foram colhidas 40 dias após a semeadura e avaliadas quanto às  
181 características relacionadas com a fixação de nitrogênio: matéria seca da parte  
182 aérea (MSPA), em g/planta; número de nódulos (NN), em nódulos/planta; matéria  
183 fresca de nódulos (MFN), em g/planta e nitrogênio acumulado (NA), em  $g.kg^{-1}$ /planta.

184 A determinação do N acumulado no tecido vegetal foi realizada pelo método  
185 micro Kjeldhal de acordo com Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). A digestão da  
186 amostra a partir do tecido vegetal seco e moído (0.1 g), foi realizada na presença de  
187 5 mL de  $H_2SO_4$  (concentrado), mais uma mistura catalítica contendo sulfato de sódio  
188 ( $Na_2SO_4$ ), sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) e Selenito de sódio ( $Na_2SeO_3$ ). As amostras  
189 foram colocadas para digestão à temperatura de 350 °C durante 4 h até se observar  
190 uma solução límpida no tubo. A solução digerida foi colocada no aparelho Kjeldahl e  
191 adicionados 15 mL de NaOH a 50% (p/v) em cada tubo. A mistura foi então destilada

192 a vapor e o  $\text{NH}_4$  (amônio) liberado do processo foi recolhido num balão cônico de  
193 100 mL, contendo 10 mL de  $\text{HBO}_3$  a 2% (ácido bórico) e uma solução indicadora  
194 (verde bromocresol e vermelho de metilo). A solução de reação verde foi titulada  
195 com solução de HCl 0.01 M. No ponto final, a cor verde ficou rosa, indicando que  
196 todo o N preso como  $(\text{NH}_4)_2\text{BO}_3$  (borato de amônio) foi removido como  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
197 (cloreto de amônio). O N acumulado foi calculado utilizando a fórmula  $g / kg N =$   
198 (volume total de HCl titulado - volume gasto (mL) na titulação em branco)  $14 \times$  fator  
199 de correção da solução titulante / massa da amostra (g).  $N (g.kg^{-1}) = ((V-B).14. FC) /$   
200 M).

### 201 **Análises estatísticas**

202 Avaliações para ajustes entre as frequências observadas e as esperadas,  
203 para hipóteses sugeridas de segregação na população  $F_2$  e retrocruzamentos, foram  
204 efetuadas pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

205 Os parâmetros genéticos foram estimados com base na média e variância  
206 dos parentais e gerações ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_1$  ( $F_1 \times P_1$ ) e  $RC_2$  ( $F_1 \times P_2$ ), como descritos por  
207 Mather e Jinks (1982). O efeito relativo dos genes devido à aditividade e dominância  
208 foi estimado utilizando a análise ponderada dos quadrados mínimos das médias das  
209 gerações (Mather e Jinks, 1982). Todos os cálculos foram realizados no programa  
210 Genes (Cruz, 2006) utilizando as gerações segregantes e não segregantes  
211 disponíveis no procedimento biométrico. As correlações simples de Pearson foram  
212 calculadas no programa Genes (Cruz, 2006), usando os valores observados para  
213 cada planta.

214 Estimativa adicional para o efetivo número de genes ou fatores ( $n$ ) foi  
215 estimado utilizando a fórmula de generalização descrita por Land (1981). O efetivo  
216 número de fatores e o número atual de fatores ( $n$ ), em que  $\mu_{P_1}$  e  $\mu_{P_2}$  são a média das  
217 duas linhas parentais contrastantes e  $\sigma_s^2$  é a variância genética da população  $F_2$ . Esta  
218 estimativa assume que as linhas parentais têm alguma variação nas características  
219 e que nem todos os locos são homocigóticos. As quatro estimativas para  $\sigma_s^2$  foram  
220 obtidas com  $\sigma_s^2 = \sigma_{F_2}^2 - \sigma_{F_1}^2$ ,  $\sigma_s^2 = \sigma_{F_2}^2 - [(1/2\sigma_{F_1}^2) + (1/4\sigma_{P_1}^2) + (1/4\sigma_{P_2}^2)]$ ,  $\sigma_s^2 =$   
221  $2\sigma_{F_2}^2 - \sigma_{BC_1}^2 - \sigma_{BC_2}^2$ , e  $\sigma_s^2 = \sigma_{BC_1}^2 + \sigma_{BC_2}^2 - [\sigma_{F_1}^2 + (1/2\sigma_{P_1}^2) + (1/2\sigma_{P_2}^2)]$ . Para estimar  
222 o número mínimo de locos e os parâmetros genéticos, os dados da MSPA, NN, MFN

223 e NA foram transformados para  $\log(x + 1)$  para tornar a variância aditiva como  
224 recomendado por Lande (1981).

225

## 226 **Resultados**

### 227 *Hipótese de segregação nas gerações $F_2$ e retrocruzamentos para eficiência* 228 *da FBN*

229 Foram observadas 125 plantas de coloração normal ou eficientes para FBN  
230 e 44 amarelas ou aclorofiladas no cruzamento IC-1 x BRS Marataoã, enquanto no  
231 cruzamento IC-1 x BRS Pujante, 145 plantas foram consideradas eficientes e 23  
232 amarelas na população  $F_2$ , resultando nas hipóteses de segregação 3:1 e 13:3 nos  
233 cruzamentos, respectivamente (Tabela 1). Nos retrocruzamentos  $RC_2$  observou-se  
234 eficiência em 55 plantas e ineficiência de 20 plantas para o cruzamento IC-1 x BRS  
235 Marataoã e 56 plantas eficientes e 19 para ineficientes no cruzamento IC-1 x BRS  
236 Pujante, indicando segregação 3:1 em ambos os cruzamentos (Tabela 1). Esses  
237 resultados indicam que a segregação adequada na população  $F_2$  é de 13:3 e não de  
238 3:1, como sugerido apenas pela análise da população  $F_2$ , o que demonstra a  
239 importância do retrocruzamentos para correta interpretação dos dados.

### 240 *Análises de média e variância dos parentais e gerações $F_1$ , $F_2$ , $RC_1$ ( $F_1 \times P_1$ )* 241 *e $RC_2$ ( $F_1 \times P_2$ ) para MSPA, NN, MFN e NA*

242 Os valores médios e das variâncias da MSPA, NN, MFN e NA mostraram  
243 variabilidade genética, indicando que as linhas parentais utilizadas nos cruzamentos  
244 (IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante) contrastam nas características  
245 estudadas (Tabela 2). Diferenças significativas entre os genitores contrastantes é um  
246 importante estimador que permite evidenciar diferentes efeitos genéticos e também  
247 a direção da ação gênica (Cruz e Regazzi, 1997). As médias das gerações  $F_1$  e do  
248  $RC_1$  foram próximas ou semelhantes ao parental eficiente para essas variáveis,  
249 indicando a existência de genes maiores com efeito de dominância em direção à  
250 maior eficiência da fixação de  $N_2$ . Os valores médios das gerações  $F_2$  estão entre as  
251 médias das gerações  $F_1$  e o parental eficiente. As médias dos  $RC_2$  estão entre a  
252 população  $F_1$  e o parental ineficiente. As maiores variâncias foram observadas nas  
253 populações  $F_2$  e  $RC_1$ , devido à maior parte dos locos segregantes estarem  
254 presentes nessas populações (Mather e Jinks, 1982).



255 As variâncias foram todas positivas (Tabela 3), exceto as variâncias de  
256 dominância que apresentaram valores próximos a zero ou negativas. Dessa forma,  
257 as variações genotípicas na população  $F_2$  foram atribuídas a efeitos aditivos, em  
258 razão de valores de dominância negativa iguais ou próximos de zero. Segundo  
259 Khodambashi et al. (2012), variâncias de dominância negativa indicam a presença  
260 de alelos redutores envolvendo o fenótipo dominante. Variância negativa de  
261 dominância não são incomuns e já foram relatadas em algumas leguminosas,  
262 *Glicine max* L. (Godoi e Pinheiro, 2009) e *Vigna radiata* L. (Iqbal et al., 2015). Sob  
263 essas circunstâncias (valores de dominância negativas iguais ou próximos de zero),  
264 as herdabilidades nos sentidos restrito e amplo assumirão valores idênticos  
265 (Barakat, 1996).

266 Nessas análises, as herdabilidades de sentido amplo e restrito foram  
267 consideradas idênticas e variaram de 78% a 90% para MSPA, 58 a 78% para NN,  
268 58% a 86% na MFN e 71% a 85% para NA, para os cruzamentos IC-1 x BRS  
269 Pujante e IC-1 x BRS Marataoã, respectivamente (Tabela 3). Herdabilidade no  
270 sentido restrito de baixa a moderada para os caracteres da eficiência da fixação de  
271  $N_2$  em feijão-caupi foram reportados por Miller et al., (1986). Estimativas de  
272 herdabilidade de moderada a alta de 0,49 a 0,71 para eficiência de  $N_2$  em soja foram  
273 reportadas por Nicolás et al. (2002).

274 Plantas transgressivas, para maior eficiência na fixação de  $N_2$ , foram  
275 observadas na população  $F_2$  dos cruzamentos IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS  
276 Pujante (Tabela 3). A segregação transgressiva obtida desses cruzamentos é um  
277 indicativo da presença de genes complementares entre os genitores, com  
278 possibilidade de ganhos genéticos mediante a seleção de linhagens superiores com  
279 maior potencial para fixação de  $N_2$  na população  $F_2$  e possíveis ganhos indiretos  
280 para aumento nutricional e da produtividade do feijão-caupi.

282 Nessas análises, para ambos os cruzamentos, foi observada a importância  
283 dos efeitos gênicos aditivos, com coeficiente de determinação variando de 45% a  
284 88,4% para todos os caracteres da FBN avaliados (Tabela 4). Isso indica que o  
285 ganho com os ciclos de seleção deverá ser satisfatório, uma vez que o componente  
286 associado à expressão das características avaliadas para FBN é de natureza aditiva  
287 e de magnitude elevada. Nicolás et al. (2002) observaram variâncias aditivas em

288 cruzamentos de cultivares brasileira de soja para alta e baixa eficiência da FBN. Em  
289 contraste com o observado nesse trabalho, Hungria et al. (2004) relatam que  
290 variância de dominância foi mais importante do que a variância de aditividade para  
291 cruzamentos de alta e baixa FBN em soja, envolvendo dialelos completos.

292 O número total de genes de acordo com estimativas usando a generalização  
293 de Lande (1981) para os cruzamentos IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante  
294 foi de, aproximadamente, 1.0 gene ou fator, exceto para NA no cruzamento IC-1 x  
295 BRS Marataoã que apresentou valor aproximado de 2.0. As estimativas do número  
296 de genes, com e sem reamostragem bootstrapping, foram de 2 a 3 para MSPA, de 3 e  
297 7 para NN, de 2 e 4 para MFN e de 1 e 3 para N no cruzamento IC-1 x BRS  
298 Marataoã. No cruzamento IC-1 x BRS Pujante o número de genes para MSPA foi de  
299 2 a 4, para NN foi de 4 a 32, para MFN foi de 3 a 46 e para NA foi de 3 a 6 (Tabela  
300 5). Em conjunto, estes resultados sugerem que poucos genes ou regiões genômicas  
301 estão envolvidos no controle de caracteres da FBN em feijão-caupi, apesar no  
302 intervalo de confiança elevado para NN e MFN no cruzamento IC-1 x BRS Pujante.

303

304 Foram obtidas correlações significativas ( $p < 0.01$ ) entre os caracteres  
305 avaliados para os dois cruzamentos, exceto MFN x NN no cruzamento IC-1 x BRS  
306 Marataoã (Tabela 6). O parâmetro MSPA apresentou correlação positiva significativa  
307 com o NA (0,46 e 0,42) e MFN (0,58). O NA apresentou correlação positiva  
308 significativa com a MFN (0,28 e 0,16). Correlações entre a MSPA x NA, e com as  
309 determinações relacionadas à massa de nódulos, também foram observadas em  
310 amendoim (Borges et al., 2007). O NN mostrou correlação negativa significativa de  
311 baixa a moderada com o NA (-0,56 e -0,58) e MSPA (-0,36 e -0,26). As correlações  
312 negativas podem ter ocorrido devido à presença de nódulos pouco funcionais do  
313 parental IC-1, indicando que NN não foi um indicador válido para maior eficiência da  
314 FBN para os cruzamentos realizados. Hansen et al. (1993) observaram em feijoeiro-  
315 comum que a correlação entre a maior nodulação e o aumento na fixação de  $N_2$  não  
316 é linear.

317

318

319

## 320 **Discussão**

321 O feijão-caupi é cultivado no Semiárido brasileiro sem emprego de  
322 tecnologias, como aplicação de fertilizantes nitrogenados, que tem contribuído para  
323 a baixa produtividade na região. Estimativas de parâmetros genéticos, como  
324 apresentados no presente estudo, contribuirão para o desenvolvimento de cultivares  
325 com maior eficiência da FBN, possibilitando o aumento na produtividade da cultura,  
326 sem grandes investimentos em insumos.

327 Os resultados para segregação de plantas eficientes (verdes) e não  
328 eficientes (amarelas) indicam que a eficiência é controlada por dois genes com efeito  
329 epistático dominante recessivo para fixação de N<sub>2</sub>. Dessa forma, os genótipos de  
330 plantas eficientes (verdes) seriam A\_B\_ e A\_bb, e as plantas ineficientes (amarelas)  
331 seriam aaB\_. A epistasia ocorreria no genótipo recessivo duplo aabb, onde a  
332 combinação bb seria epistática sobre aa, ao qual condicionaria plantas eficientes  
333 (verdes). A segregação digênica encontrada nesse trabalho está em desacordo com  
334 os estudos realizados com a linha IC-1, realizados por Pemberton et al. (1990) e  
335 Purdom e Trese (1995), os quais, sugerem que as interrupções no desenvolvimento  
336 do nódulo (ineficiente fix-) são condicionadas por alelos recessivos de simples par  
337 de genes.

338 A linha mutante IC-1 apresentou NN quase três vezes maior e reduzida  
339 quantidade de MSPA, MFN e NA, comparado com os genótipos eficientes avaliados  
340 nos dois cruzamentos (Tabela 2). A maior quantidade de nódulos pode ter promovido  
341 um crescimento reduzido da parte aérea, devido ao alto custo energético estimado  
342 de 12 a 17g C por grama de N para manutenção dos nódulos (Crawford et al., 2000).  
343 A formação de nódulos é realizada com base na disponibilidade de N para equilibrar  
344 a necessidade de N com o custo de suportar a interação simbiótica (Ferguson et al.,  
345 2010). Essa regulação é determinada por um sistema chamado autorregulação da  
346 nodulação, em que nódulos precoces inibem o suprimento de nódulos posteriores  
347 pela transdução de sinais na parte aérea da planta (Penmetsa et al., 2003).  
348 Linhagens mutantes com número elevados de nódulos, acompanhadas por uma  
349 incapacidade para regular o número de nódulos, são relatadas para outras  
350 leguminosas, como *Phaseolus vulgaris* L. (Hansen, 1993), *Pisum sativa* L. (Sagan et  
351 al., 1994; Bourion et al., 2007), *Medicago truncatula* (Cabeza et al., 2014).

352           Valores transgressivos foram encontrados em plantas na população F<sub>2</sub>,  
353           indicando que linhagens 30% mais eficientes na FBN podem ser selecionadas,  
354           melhorando a produtividade e a qualidade nutricional do feijão-caupi. Segregações  
355           transgressivas também foram encontradas em algumas linhagens de soja para os  
356           caracteres da FBN (massa da parte aérea, número de nódulos, massa de nódulos e  
357           nitrogênio acumulado) (Jaiswal e Singh, 1990; Nicolás et al., 2002; Santos et al.,  
358           2006). A segregação transgressiva é sugerida com o resultado de contribuições de  
359           genes complementares de ambos os genitores, e que podem ser explorados no  
360           melhoramento de plantas quando os indivíduos superiores são selecionados  
361           (Ibrahim e Quick, 2001).

362           Os parâmetros genéticos estimados para FBN em feijão-caupi nesse  
363           trabalho podem desempenhar um importante papel no melhoramento genético para  
364           a obtenção de resultados semelhantes ao encontrado na soja, em que o cultivo no  
365           Brasil quase que independe da adubação nitrogenada mineral (Hungria et al., 2005;  
366           Fagan et al., 2007). As estimativas de herdabilidade de sentido amplo e restrito  
367           foram de moderada a alta para os dois cruzamentos, indicando a possibilidade de  
368           obtenção de linhagens superiores para FBN.

369           Trabalhando com amendoim, Arrendell et al. (1985) relataram estimativas de  
370           herdabilidade de sentido amplo de moderada a alta para o número de nódulos,  
371           massa dos nódulos, atividade da nitrogenase e massa da parte aérea. Os  
372           parâmetros utilizados como indicadores da FBN são considerados como uma  
373           integração de diversas características quantitativas e possuem herdabilidade  
374           variando de baixa a moderadamente alta (Pereira et al., 1993; Nodari, 1993). A  
375           herdabilidade no sentido amplo e restrito para a FBN é consistente com a magnitude  
376           dos componentes de variância aditiva estimados. Apesar da sua importância, não  
377           foram encontrados relatos sobre a herdabilidade da eficiência da FBN em feijão-  
378           caupi, dificultando comparações mais amplas.

379           A magnitude do efeito dos parentais e dos efeitos aditivos para os  
380           parâmetros da fixação biológica de N<sub>2</sub> evidenciam a possibilidade de obtenção de  
381           materiais homozigóticos superiores para a FBN em feijão-caupi, pela aplicação de  
382           métodos comumente empregados no melhoramento de plantas autógamas, como a  
383           seleção por 'pedigree' ou descendência de uma única vagem. Quando alelos

384 aditivos são predominantes, a seleção de indivíduos superiores é facilitada e  
385 produzirá uma descendência também superior.

386 Neste estudo, dois métodos foram utilizados para estimar o número de  
387 genes efetivos. As estimativas do número de genes para os caracteres da FBN  
388 (MSPA, NN, MFN, NA), obtidas pelo método de Mather e Jinks, variaram de 2 a 9, e  
389 de 1 a 2 genes para o método de Lande (Tabela 5). O menor número de genes  
390 baseado no método de Lande, provavelmente, ocorreu porque esse método é mais  
391 conservador na estimativa do número mínimo de genes, pois considera a diferença  
392 entre os valores médios dos genitores.

393 O método de Malter e Jinks (1982) parece fornecer informações mais  
394 precisas quanto à natureza poligênica dos caracteres da FBN estudados,  
395 principalmente matéria seca da parte aérea, em virtude da segregação transgressiva  
396 observada na população F<sub>2</sub>. Assumindo que os caracteres da FBN, principalmente  
397 número de nódulos (NN), matéria fresca de nódulos (MFN) e nitrogênio acumulado  
398 (NA) estão associados com plantas eficientes (coloração verde) e não eficientes  
399 (coloração amarela), os estimadores de genes de Lande (1981) apresentaram um  
400 cenário mais próximo da realidade biológica, pois as estimativas de um gene são  
401 próximas da hipótese de segregação pelo qui-quadrado para eficiência simbiótica.  
402 Como discutido por Santos et al. (2012) estimativas de genes por procedimentos  
403 biométricos apresentam limitações nas estimativas do presente estudo favorecem os  
404 estimadores de Lande (1981) em relação aos estimadores com base na média e  
405 variância dos parentais e gerações (Mather e Jinks, 1982).

406 Estimativas do número de genes que contribuem para a variação genética  
407 de caracteres quantitativos são fundamentais para a genética quantitativa, com o  
408 objetivo final de aplicar a seleção assistida por marcador no desenvolvimento de  
409 novas cultivares mais eficientes na fixação de N<sub>2</sub> (Zeng, 1992).

410 A eficiência para a fixação de N<sub>2</sub> foi negativamente correlacionada com o  
411 número de nódulos, possivelmente devido aos altos custos de carbono induzidos  
412 para maior formação de nódulos do parental IC-1. Desta forma, genótipos para alta  
413 fixação de N<sub>2</sub> não podem ser obtidos com o aumento no número de nódulos para os  
414 cruzamentos realizados. Plantas que produziram maior MFN demonstraram produzir  
415 maior MSPA e, conseqüentemente, fixar mais N<sub>2</sub>, confirmando observações

416 realizadas em feijão-caupi (Ankomah, 1995). Correlações positivas também para  
417 massa de nódulos e N<sub>2</sub> fixado já foram relatadas em outras espécies de leguminosas  
418 como o amendoim (Hafner et al., 1992), soja (Shiraiwa et al., 1994), e feijão-comum  
419 (Araújo et al., 2007). Para Hungria e Bohrer (2000), quando predominam nódulos  
420 maiores há tendência de ter-se maior massa nodular e maior eficiência do N<sub>2</sub> fixado,  
421 bem como a matéria vegetativa.

422 A maior massa de nódulos observada nesse trabalho sugere a existência de  
423 mecanismos específicos do hospedeiro responsáveis pelo aumento da MSPA e NA  
424 nas plantas. Trabalho realizado por Campos et al. (1987), identificou algumas  
425 nodulinas tardias específicas do hospedeiro em nódulos eficazes (Fix<sup>+</sup>) em  
426 comparação com os ineficazes (Fix<sup>-</sup>), como leghemoglobina e uricase, o que podem  
427 ter contribuído significativamente para maior eficiência na FBN no feijão-caupi. As  
428 nodulinas desempenham um papel fundamental no estabelecimento da simbiose  
429 com bactérias do grupo rizóbio e, talvez os alelos dos genes nodulinas estejam  
430 correlacionados com diferentes simbioses rizobiais na otimização das associações  
431 simbióticas. Regiões genômicas associado a nodulinas promoveu uma alta  
432 diferenciação entre subpopulações em trabalhos realizados por Muñoz- Amatriaín  
433 (2017).No entanto, mais estudos sobre a expressão desses genes são necessários  
434 para a obtenção de resultados mais rápidos e promissores na identificação No  
435 entanto, mais estudos sobre a expressão desses genes são necessários para a  
436 obtenção de resultados mais rápidos e promissores.

437 Os resultados mostram a possibilidade de desenvolvimento de genótipos de  
438 feijão-caupi mais eficientes para a FBN e indiretamente para a produtividade de  
439 grãos e nutricional (Alcantara et al., 2009). Os valores da herdabilidade, a presença  
440 de efeitos gênicos aditivos, número relativamente pequeno de genes obtidas indicam  
441 que a maior eficiência pode ser alcançada com relativa facilidade pela aplicação de  
442 métodos de melhoramento de plantas autógamas. Portanto, a FBN em feijão-caupi  
443 pode ser melhorada a exemplo da soja brasileira, que teve seu programa de  
444 melhoramento focado na capacidade da planta em fixar N<sub>2</sub>, e atualmente a  
445 recomendação é a utilização de inoculantes sem a suplementação de fertilizante  
446 nitrogenado, gerando uma economia por ciclo de aproximadamente de 320 kg. ha<sup>-1</sup>  
447 de N (Hungria et al., 2001).

448 **Agradecimentos:** Os autores agradecem ao Conselho Nacional de  
449 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro. Sirando L.  
450 Seido agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
451 (Capes) pela concessão da bolsa. Carlos A. F. S. pesquisador CNPq.

452 Os autores agradecem à Purdom e Treze, pela gentil doação das sementes do  
453 mutante ineficiente IC-1.

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472 **Referências**

473

474 Alcantara, R.M.C.M.; Araújo, A.P.; Xavier, G.R.; Rocha, M.M. and Rumjanek, N.G.  
475 2009. Relações entre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e a  
476 duração do ciclo de diferentes genótipos de cultivos de leguminosas de grãos.  
477 Documentos 197, Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI.

478 Ankomah, A.B. 1995. Comparison of methods of estimating biological nitrogen  
479 fixation using cowpea. Trop. Agric. 72:34-38. doi: 10.1016/0378-  
480 4290(87)90011-6

481 Araújo, F.F.; Carmona, F.G.; Tiritan, C.S. and Creste, J.E. 2007. Fixação biológica  
482 de N<sub>2</sub> no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na  
483 semente comparado à adubação nitrogenada. (In Portuguese, with English  
484 abstract.) Acta Sci. Agron. 29:535-540. doi: 10.4025/actasciagron.v29i4.416

485 Arrendell, S.; Wynne, J.C.; Elkan, G.H. and Isleib, T.G. 1985. Variation for nitrogen  
486 fixation among progenies of a Virginia x Spanish cross. Crop Sci. 25:865-869.  
487 doi:10.2135/cropsci1985.0011183X002500050033x

488 Barakat, M.N. 1996. Estimation of genetic parameters for *in vitro* traits in wheat  
489 immature embryo cultures involving high x low regeneration capacity  
490 genotypes. Euphytica, 87:119–125, 1996. doi:10.1007/BF00021884

491 Borges, W.L.; Silva, C.E.R.; Xavier, G.R. and Rumjanek, N.G. 2007. Nodulação e  
492 fixação biológica de nitrogênio de acessos de amendoim com estirpes nativas  
493 de rizóbios. (in Portuguese, with English abstract.) Rev. Bras. Cienc. Agr. 2:32-  
494 37.

495 Bourion, V.; Laguerre, G.; Depret, G.; Voisin, A.; Salon, C. and Duc, G. 2007.  
496 Genetic variability in nodulation and root growth affects nitrogen fixation and  
497 accumulation in Pea. Ann. Bot., 100:589–598. doi: 10.1093/aob/mcm147

498 Cabeza, R.A.; Lingner, A.; Liese, R.; Sulieman, S.; Senbayram, M.; Tränkner, M.;  
499 Dittert, K. and Schulze, J. 2014. The Activity of Nodules of the Supernodulating



- 500 Mutant Mtsunn Is not Limited by Photosynthesis under Optimal Growth  
501 Conditions. Int. J. Mol. Sci. 15:6031–6045 doi: 10.3390/ijms15046031
- 502 Campos, F.; Padilla, J.; Vázquez, M.; Ortega, J.L.; Enríquez, C. and Sánchez, F.  
503 1987. Expression of nodule-specific genes in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Mol.  
504 Biol. 9:521-532. doi:10.1007/BF00020530
- 505 Crawford, N.; Kahn, M.; Leustek, T. and Long. S. 2000. Nitrogen and Sulfur in:  
506 Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Rockville, Buchanan, B.;  
507 Gruissem, W. and JONES, R.L, editors, American Association of Plant  
508 Biologists. Rockville. MD. P. p. 786-849.
- 509 Cruz, C.D. 2006. Programa genes: Biometria. Editora UFV. Viçosa. Brazil.
- 510 Cruz, C.D. and Regazzi, A.J. 1997. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento  
511 genético. 2.ed. Viçosa: UFV, 390p.
- 512 Dakora, F.D.; Belane, A.K.; Mohale, K.C.; Makhubedu, T.I.; Makhura, P.; Pule-  
513 Meulenbergh, F.; Mapope, N.; Mogkelhe, S.N.; Gyogluu, C.; Phatlane, G.;  
514 Muhaba, S.; Mokobane, F. and Oteng-Frimpong, R. 2015. Food Grain  
515 Legumes: Their Contribution to Soil Fertility, Food Security, and Human  
516 Nutrition/Health in Africa. In: BRUIJIN, F. J. editor, Biological Nitrogen Fixation.  
517 2:1063-1070.
- 518 Ddamulira, G.; Santos, C.A.F.; Obuo, P.; Alanyo, M. Lwanga, C.K. Grain yield and  
519 protein content of Brazilian cowpea genotypes under diverse Ugandan  
520 environments. American Journal of Plant Science,v. 6, p. 2074-2084, 2015.
- 521 Döbereiner, J. 1990. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de  
522 nitrogênio no Brasil. (In Portuguese) Estudos Avançados, 4:144-152. Doi:  
523 10.1590/S0103-40141990000100011
- 524 Elkan, G.H. 2009. Biological Nitrogen Fixation in Peanuts. In: Pattee, H.E.; Stalker,  
525 H.T. Advances in peanut science. American Peanut Research and Education,  
526 p. 286-300.

- 527 Fagan, Evandro Binotto; et al. Fisiologia da Fixação Biológica do Nitrogênio em Soja  
528 – Revisão. Revista da FZVA. Uruguaiana, v.14, n.1, p. 89-106. 2007
- 529 Ferguson, B.J.; Indrasumunar, A.; Hayashi, S.; Lin, M.H.; Lin, Y.H.; Reid, D.E. and  
530 Gresshoff, P.M. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and  
531 autoregulation. J. Integr. Plant Biol. 52:61–76. doi: 10.1111/j.1744-  
532 7909.2010.00899.x.
- 533 Freire Filho, F.R.; Ribeiro, V.Q.; Barreto, P.D. and Santos, C.A. 1999. Melhoramento  
534 genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região do Nordeste.  
535 Embrapa Semi-Árido. In: Queiroz, M.A.; Goedert, C.O.; Ramos S.R.R, editors,  
536 Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. (on  
537 line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília-DF: Embrapa  
538 Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- 539 Freitas, A.D.S.; Silva, A.F. and Sampaio, E.V.S.B. 2012. Yield and biological nitrogen  
540 fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. Biomass  
541 Bioenergy. 45:109-114. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.05.017
- 542 Godoi, C.R.C. and Pinheiro, J.B. 2009. Genetic parameters and selection strategies  
543 of soybean genotypes resistant to stink bug complex. Genet. Mol. Biol. 32:328-  
544 336. doi: 10.1590/S1415-47572009000200020
- 545 Hafner, H.; Ndunguru, B.J.; Bationo, A. and Marschner, H. 1992. Effect of nitrogen.  
546 phosphorus and molybdenum application on growth and symbiotic nitrogen  
547 fixation of groundnut in an acid soil in Niger. Fertil. Res. 31:69-77. doi:  
548 10.1007/BF01064229
- 549 Hansen, A.P.; Yoneyama, T.; Kouchi, H. and Martin, P. 1993. Respiration and  
550 nitrogen fixation of hydroponically cultured *Phaseolus vulgaris* L. cv. OAC Rico  
551 and a supernodulating mutant. Planta. 189:538-545.
- 552 Hungria, M.; Campo, R.J. and Mendes I.C. 2001. Fixação biológica de nitrogênio na  
553 cultura da soja (in portuguese). Londrina: Embrapa Soja, Circular técnica 35.  
554 48p.

- 555 Hungria, M. and Bohrer, T. R. J. 2000. Variability of nodulation and nitrogen fixation  
556 capacity among soybean cultivars. *Biol. Fertil. Soils.* 31:45-52. Doi:  
557 10.1007/s003740050622
- 558 Hungria, M.; Franchini, J.C.; Campo, R.J. and Graham, P.H. 2005. The importance of  
559 nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: Werner, D.; Newton,  
560 W. E. editors, *Nitrogen fixation in agriculture: forestry ecology and environment.*  
561 Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- 562 Hungria, M.; Nicolás, M.F.; Campo, R.J. and Arias, C.A.A. 2004. Desempenho  
563 simbiótico de cultivares de soja e busca de marcadores moleculares  
564 relacionados à fixação biológica do nitrogênio. In: SARAIVA, O. F. editor,  
565 *Resultados de pesquisa da Embrapa Soja - 2003: microbiologia de solos.*  
566 Londrina: Embrapa Soja, documento 243, p.16-19.
- 567 Ibrahim, A.M.H. and Quick, J.S. 2001. Heritability of heat tolerance in winter and  
568 spring wheat. *Crop Science*, 41:1401-1405. doi:10.2135/cropsci2001.4151401x
- 569 Iqbal, J.; Ahsan, M.; Saleem, M. and Ali, A. 2015. Appraisal of gene action for  
570 indeterminate growth in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Front. Plant Sci.*  
571 6:665, 2015. doi:10.3389/fpls.2015.00665
- 572 Jaiswal, H.K. and Singh, R.K. 1990. Breeding for increased nitrogen fixing ability  
573 among wild and cultivated species of chickpea. *Ann. Appl. Biol.* 117:415-419.  
574 doi: 10.1111/j.1744-7348.1990.tb04228.x
- 575 Khodambashi, M.; Bitaraf, N. and Houshmand, S. 2012. Generation mean analysis  
576 for grain yield and its related traits in lentil. *J. Agr. Sci. Tech.* 14:609-616.
- 577 Lacerda, A.M.; Moreira, F.M.S.; Andrade, M.J.B. and Soares, L.L. 2004. Efeito de  
578 estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. (In  
579 Portuguese, with English abstract.) *Revista Ceres* 51:67- 82.
- 580 Lande, R. 1981. The minimum number of genes contributing to quantitative variation  
581 between and within populations. *Genetics* 99:541–553.

- 582 Leite, J.; Seido, S.L.; Passos, S.R.; Xavier, G.R.; Rumjaneck, N.G. and Martins,  
583 L.M.V. 2009. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of  
584 the lower half of the São Francisco River Valley. (In Portuguese, with English  
585 abstract.) Rev. Bras. Ciênc. solo 33:1215-1226. doi: 10.1590/S0100-  
586 06832009000500015
- 587 Malavolta, E.; Vitti, G.C. and Oliveira, S.A. 1997. Avaliação do estado nutricional das  
588 plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: Potafós. 319p.
- 589 Marinho, R.C.N.; Nóbrega, R.S.A.; Zilli, J.; Xavier, G.R.; Santos, C.A.F.; Aidar, S.T.;  
590 Martins, L.M.V. and Fernandes Junior, P. I. 2014. Field performance of new  
591 cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the  
592 Brazilian Semiarid. Pesq. agropec. bras. 49:395-402. doi: 10.1590/S0100-  
593 204X2014000500009
- 594 Mather, K. and Jinks, J. L. 1982. Biometrical genetics. 3rd ed.Chapman and Hall.  
595 London. UK.
- 596 Miller, J.C.; Jr., K.W. Zary, J.R.K.W. and Fernandez, G.C.J. 1986. Inheritance of N<sub>2</sub>  
597 fixation efficiency in cowpea. Euphytica 35:55 -560. doi:10.1007/BF00021864
- 598 Ndukwu, B.N.; Asawalam, D.O.; Umeh, M.O. and Ahukaemere, C.M. 2016.  
599 Assessment of Growth, Nodulation and Nitrogen Fixation in Different Varieties  
600 of Cowpea in A Humid Tropical Environment Using N-Difference Method. J.  
601 Multidiscip. Eng. Sci. Studies 2:717-724.
- 602 Nicolás, M.F.; Arias, C.A.A. and Hungria, M. 2002. Genetics of nodulation and  
603 nitrogen fixation in Brazilian soybean cultivars. Biol. Fertil. Soils 36:109-117.  
604 doi:10.1007/s00374-002-0511-3
- 605 Nodari, R.O.; Koinange, E.M.K.; Kelly, J.D. and Gepts, P. 1993. Towards an  
606 integrated linkage map of common bean. 1. Development of genomic DNA  
607 probes and levels of restriction fragment length polymorphism. Theoret. Appl.  
608 Genetics 84:186-192. doi:10.1007/BF00223999

- 609 Pemberton, I.J.; Smith, G.R. and Miller Jr., J. C. 1990. Inheritance of ineffective  
610 nodulation in cowpea. Crop Sci. 30:568-571.  
611 doi:10.2135/cropsci1990.0011183X003000030020x
- 612 Penmetsa, R.V.; Frugoli, J.A.; Smith, L.S.; Long, S.R and Cook, D.R. 2003. Dual  
613 Genetic Pathways Controlling Nodule Number in *Medicago truncatula*. Plant  
614 Physiol. 131:998-1008. doi: 10.1104/pp.015677
- 615 Pereira, P.A.A.; Miranda, B.D.; Attewell, J.R.; Kmiecik, K.A. and Bliss, F.A. 1993.  
616 Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris*  
617 L.). Plant Soil 148:203-209. doi:10.1007/BF00012858
- 618 Purdom, D.; Trese, A.T. 1995. Morphological and Molecular Characteristics of Host-  
619 Conditioned Ineffective Root Nodules in Cowpea. Plant Physiol. v. 109, p. 239-  
620 244. doi: 10.1104/pp.109.1.239  
621
- 622 Proporov, N.A. and Tikhonovich, I.A. 2003. Genetic resources for improving nitrogen  
623 fixation in legume-rhizobium symbiosis. Genet. Resour. Crop Evol. 50:89-99.  
624 doi: 10.1023/A:1022957429160
- 625 Sagan, M.; Huguet, T. and Duc, G. 1994. Phenotype characterization and  
626 classification of nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.). Plant Sci.  
627 100:59–70. doi.org/10.1016/0168-9452(94)90134-1
- 628 Santos, C.A.F.; Costa, D.C.C.; Silva, W.R. and Boiteux, L.S. 2012. Genetic analysis  
629 of total seed protein content in two cowpea crosses. Crop Sci. 52:2501-2506.
- 630 Santos, M.A.; Nicolás, M.F. and Hungria, M. 2006. Identificação de QTL associados  
631 à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. Pesq. Agrop.  
632 Bras. 41:67-75.
- 633 Sarr, P. S.; Fujimoto, S.; Yamakawa, T. Nodulation, Nitrogen Fixation and Growth of  
634 Rhizobia-Inoculated Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) In Relation with  
635 External Nitrogen and Light Intensity. Int. J. Plant. Biol. Res. v. 3, n.1, p.1025,  
636 2015.

- 637 Shiraiwa, T.; Sinclair, T.R. and Hashikawa, U. 1994. Variability in nitrogen fixation  
638 activity among soybean cultivars grown under field conditions. Jpn. J. Crop Sci.  
639 63:111-117. doi: 10.1626/jcs.63.111
- 640 Sikinarum, L.; Jaisil, P.; Jogloy, S.; Toomsan, B.; Kesmala, T. and Patanothai, A.  
641 2007. Heritability and correlations for nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation and related traits in  
642 peanut (*Arachis hypogaea* L.). Pak. J. Biol. Sci. 10:1956-1962.
- 643 Silva, D.O.M.; Santos, C.A.F. and Boiteux, L.S. 2016. Adaptability and stability  
644 parameters of total seed yield and protein content in cowpea (*Vigna*  
645 *unquiculata*) genotypes subjected to semi-arid conditions. Aust. J. Crop Sci.  
646 10:1164-1169. doi: 10.21475/ajcs.2016.10.08.p7828
- 647 Vincent, J.M.A. 1970. Manual for the practical study of root-nodule bacteria. London:  
648 International Biological Programmer (Handbook. 15). 164p.
- 649 Xavier, G.R.; Martins, L.M.V.; Ribeiro, J.R.A. and Rumjanek, N.G. 2006.  
650 Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes  
651 nacionalidades. Caatinga. 19:25-33.
- 652 Zeng, Z.B. 1992. Correcting the bias of WRIGHT'S estimates of the number of genes  
653 affecting a quantitative character: A further improved method. Genetics,  
654 131:987-1001.
- 655
- 656
- 657
- 658
- 659
- 660
- 661
- 662
- 663
- 664

665 **Tabela 1.** Teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para número de plantas eficientes (folha verde)  
 666 e ineficientes (folha amarela), nas gerações obtidas a partir dos cruzamentos IC-1 x  
 667 BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante

Cruzamentos	Geração	Nº de plantas			Hipótese	$\chi^2$ <sup>(1)</sup>
		Total	Verde	Amarela		
IC-1	P <sub>1</sub>	40	40	0	1:0	0 (100%)
	P <sub>2</sub>	43	0	43	0:1	0 (100%)
x	F <sub>1</sub>	54	54	0	1:0	0 (100%)
BRS MARATAOÃ	F <sub>2</sub>	169	125	44	3:1	0,09 (75,5%)
					13:3	5,88 (1,5%)
	RC <sub>1</sub>	75	75	0	1:0	0 (100%)
	RC <sub>2</sub>	75	55	20	3:1	0,11(73,8%)
IC-1	P <sub>1</sub>	40	40	0	1:0	0 (100%)
	P <sub>2</sub>	43	0	43	0:1	0 (100%)
x	F <sub>1</sub>	54	54	0	1:0	0 (100%)
BRS PUJANTE	F <sub>2</sub>	168	145	23	3:1	11,4 (0,07%)
					13:3	2,82 (9,29%)
	RC <sub>1</sub>	76	76	0	1:0	0 (100%)
	RC <sub>2</sub>	75	56	19	3:1	0,04(94,6%)

668 <sup>(1)</sup>Valores entre parênteses indicam a probabilidade associada ao valor do  $\chi^2$  tabelado, com 1 GL  
 669 (3,841).  
 670

671

672

673

674

675

676

677

678 **Tabela 2.** Estimativas das médias e variâncias para caracteres relacionados à FBN  
 679 em feijão-caupi nos parentais e gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>1</sub> e RC<sub>2</sub> para os cruzamentos IC-  
 680 1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante

Cruzamentos e gerações	n	MSPA (g/planta)		NN (planta)		MFN (g/planta)		NA (g.kg <sup>-1</sup> )	
		$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
BRS Marataoã	40	3,53	0,32	53	209	0,63	0,04	18,0	9,70
IC-1 ineficiente	43	1,15	0,15	125	863	0,38	0,01	6,37	0,96
F <sub>1</sub>	54	3,43	0,39	74,2	527	0,54	0,02	16,7	10,3
F <sub>2</sub>	169	2,86	2,98	55,3	812	0,52	0,07	16,4	44,7
RC <sub>1</sub> (F <sub>1</sub> x BRS Marataoã)	75	3,49	1,14	56,4	358	0,63	0,05	18,0	9,04
RC <sub>2</sub> (F <sub>1</sub> x IC-1)	75	2,86	2,77	73,0	741	0,60	0,03	15,4	23,9
BRS Pujante	40	3,55	0,75	74	318	0,54	0,01	16,8	9,53
IC-1 ineficiente	43	1,15	0,15	125	863	0,38	0,01	6,36	0,98
F <sub>1</sub>	54	3,39	0,77	60,8	384	0,50	0,02	15,5	13,5
F <sub>2</sub>	168	3,29	2,43	80,3	1.101	0,49	0,04	13,7	22,6
RC <sub>1</sub> (F <sub>1</sub> x BRS Pujante)	75	3,44	0,78	71	530	0,54	0,04	16,7	10,6
RC <sub>2</sub> (F <sub>1</sub> x IC-1)	76	3,34	1,18	81,8	1.023	0,47	0,03	15,1	21,1

681 MSPA = matéria seca da parte aérea; NN = número de nódulos; MFN = matéria fresca de nódulos;  
 682 NA= nitrogênio acumulado.

683

684

685

686

687

688

689



690 **Tabela 3.** Variâncias (Var), herdabilidades restrita/ampla ( $h^2$ ) e valores (Val) de  
 691 acordo com as médias e variâncias de gerações, para dois cruzamentos IC-1 x BRS  
 692 Marataoã e IC-1 x BRS Pujante em feijão-caupi. Dados transformados para  $\log(x + 1)$

Parâmetro	MSPA	NN	MFN	NA	MSPA	NN	MFN	NA
	(g/planta)	(planta)	(g/planta)	(g.kg <sup>-1</sup> )	(g/planta)	(planta)	(g/planta)	(g.kg <sup>-1</sup> )
	IC-1 x BRS Marataoã				IC-1 x BRS Pujante			
Var fenotípica	0,047	0,042	0,005	0,034	0,337	0,034	0,004	0,022
Var ambiental	0,004	0,016	0,002	0,004	0,007	0,014	0,001	0,006
Var genotípica	0,043	0,026	0,003	0,029	0,026	0,020	0,002	0,016
Var aditiva	0,040	0,033	0,004	0,046	0,046	0,012	0,001	0,021
Var dominância	0,003	-0,007	-0,001	-0,016	-0,019	0,007	0,0	-0,005
$h^{2†}$	90	78	86	85	78	58	58	71
Val máximos <sup>†</sup>	4,6	184	1,03	24,9	5,22	184	0,82	23,24
Val mínimos <sup>†</sup>	0,42	23	0,19	4,5	0,42	45	0,19	4,48
Val máximos de $F_2^†$	6,63	141	1,31	34,4	7,09	184	1,01	30,5
Val mínimos de $F_2^†$	0,37	14	0,05	4,48	0,39	20	0,04	4,5

693 MSPA = matéria seca da parte aérea; NN = número de nódulos; MFN = matéria fresca de nódulos;  
 694 NA= nitrogênio acumulado. <sup>†</sup>Dados originais, não transformados.  
 695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707 **Tabela 4.** Fonte de variação (FV), quadrado médio (QM) e coeficiente de  
 708 determinação ( $R^2$ ) obtidos pela decomposição não ortogonal da soma de quadrados  
 709 de parâmetros pelo método de eliminação de Gauss para eficiência da fixação de  $N_2$   
 710 em dois cruzamentos de feijão-caupi

	MSPA (g/planta)		NN (planta)		MFN (g/planta)		NA (g.kg <sup>-1</sup> )	
Fonte de variação	Quadrado médio	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )	Quadrado médio	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )	Quadrado médio	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )	Quadrado médio	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )
IC-1 x BRS Marataoã								
m	0,04	1,45	109	3,67	0,000	1,03	5,01	6,18
a	2,82	84,8	2629	88,4	0,029	45,2	68,2	84,1
d	0,16	4,8	0,57	0,01	0,009	14,7	1,72	2,13
aa	0,07	1,96	59	1,99	0,005	8,98	0,05	0,06
ad	0,12	3,70	155	5,24	0,009	13,9	4,21	5,2
dd	0,10	3,23	19	0,64	0,01	16	1,81	2,24
IC-1 x BRS Pujante								
m	0,15	4,06	535	26,1	0,006	32,2	0,84	1,13
a	2,86	76,7	1341	65,4	0,013	62,6	54,8	73,6
d	0,11	3,01	48,5	2,36	0,000	2,09	4,73	6,36
aa	0,00	0,20	8,92	0,45	0,000	0,61	2,07	2,78
ad	0,47	12,8	99,1	4,84	0,001	0,08	7,84	10,5
dd	0,11	3,16	15,7	0,76	0,000	2,27	4,07	5,47

711 MSPA = matéria seca da parte aérea; NN = número de nódulos; MFN = matéria fresca de nódulos;  
 712 NA= nitrogênio acumulado.

713 m = média dos parentais; a = efeito aditivo; d = efeito dominante; aa, ad, dd = interações epistáticas.

714

715

716

717

718 **Tabela 5.** Número mínimo de genes ou fatores baseados em diferentes estimadores  
 719 (n) de Lande (1981) e Mather e Jinks (1982) para características relacionadas com a  
 720 fixação de N<sub>2</sub> em dois cruzamentos (IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x BRS Pujante)

Cruzamento	Variáveis	Baseado em land (1981)					Baseado em Mather e Jinks (1982)	
		n1	n2	n3	n4	$\bar{X}$	Sem bootstrapping	Com bootstrapping
IC x BRS Marataoã	MSPA	0,50	0,49	0,28	1,95	0,85	1,7	1,7 (1,2:2,4)*
	NN	0,49	0,35	0,72	0,23	0,44	3,5	3,7 (2,4:6,6)*
	MFN	0,19	0,14	0,27	0,09	0,17	2,9	2,8 (1,9:3,8)*
	NA	1,49	1,19	0,93	1,67	1,3	1,7	1,8 (1,2:2,8)*
IC x BRS Pujante	MSPA	0,30	0,30	0,32	0,28	0,3	1,6	1,7 (1,2:4,1)*
	NN	0,90	0,71	0,58	0,91	0,75	9,0	14 (3,4:32)*
	MFN	0,16	0,16	0,11	0,27	0,18	6,4	11 (2,8:46)*
	NA	0,73	0,71	0,45	1,52	0,86	3,3	3,3 (2,1:6,0)*

721 MSPA = matéria seca da parte aérea; NN = número de nódulos; MFN = matéria fresca de nódulos;  
 722 NA= nitrogênio acumulado. \*Intervalo de confiança do bootstrapping, entre parêntese (5% de  
 723 probabilidade).  
 724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736 **Tabela 6.** Coeficientes de correlação simples entre pares de características  
 737 relacionados à fixação de N<sub>2</sub> para os cruzamentos IC-1 x BRS Marataoã e IC-1 x  
 738 BRS Pujante

Variáveis	Cruzamento IC-1 x BRS Marataoã				Cruzamento IC-1 x BRS Pujante			
	MSPA	NN	MFN	NA	MSPA	MSPA	MFN	NA
MSPA								
NN	-0,36**				-0,26**			
MFN	0,58**	-0,07 <sup>ns</sup>			0,58**	0,15**		
NA	0,46**	-0,56**	0,28**		0,42**	-0,53**	0,16**	

739 MSPA = matéria seca da parte aérea; NN = número de nódulos; MFN = matéria fresca de nódulos;  
 740 NA= nitrogênio acumulado. \*\* significativo a 1% pelo teste 't'.  
 741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

## **CAPÍTULO III**

---

### **Mapa de ligações genéticas e mapeamento da eficiência da fixação de nitrogênio em feijão-caupi**

**Artigo a ser submetido à revista  
Crop Breeding and Applied  
Biotechnology (ISSN 1518-7853)**

1 Sirando Lima Seido<sup>1</sup>, Carlos Antonio Fernandes Santos<sup>2</sup>,

2 Michael Paul Timko<sup>3</sup>

3  
4 <sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
5 Dois Irmãos- CEP: 52171-900- Recife/PE.

6 <sup>2</sup>C.A.F. Santos, Embrapa Semiárido. CP 023, 56302-970, Petrolina, PE, Brazil. M.P.

7 <sup>3</sup>M. P. Timko, Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22904  
8 USA.

9 \* Autor correspondente: S. L. Seido E-mail: (siroseido@hotmail.com)

10  
11  
12 **Mapa de ligações genéticas e mapeamento da eficiência da fixação biológica**  
13 **de nitrogênio em feijão-caupi**

14 **Resumo**

15  
16 Fixação biológica de nitrogênio é uma importante ferramenta para a sustentabilidade  
17 do feijão-caupi, podendo beneficiar tanto a relação simbiótica entre leguminosas e  
18 bactérias, bem como o crescimento e a produtividade de outras plantas em  
19 consórcio ou em cultivos seguintes. Os objetivos do presente estudo foram construir  
20 mapa genético do feijão-caupi para os 11 grupos de ligação na população F<sub>2</sub> do  
21 cruzamento IC-1 x BRS Marataoã, com base em marcadores SNPs, mapear o gene  
22 *cpi*, tendo como referência adicional a introgressão com mapa consenso da espécie,  
23 de forma a identificar marcadores para a seleção assistida para o desenvolvimento  
24 de cultivares mais eficientes para a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Foram  
25 genotipados os parentais e 89 plantas F<sub>2</sub> com 46.300 marcadores de polimorfismo  
26 de base única (SNP), dos quais 910 marcadores polimórficos foram utilizados para  
27 construção do mapa. Os resultados revelaram 11 grupos de ligação, com média de  
28 82 marcadores por cromossomo e distância média de 1,26 cM entre marcadores. A  
29 análise de recombinação dos marcadores SNPs indicou que os marcadores  
30 2\_12850 e 2\_24723, localizados no grupo de ligação 11, flanquearam o gene *cpi*  
31 com 6,7 cM e 5,64 cM de distância. A introgressão do grupo de ligação 11 com mapa  
32 de referência do feijão-caupi revelou distâncias reduzidas de zero a 0,6 cM para  
33 esses marcadores, indicando a firme associação com o gene *cpi*. O mapa construído  
34 e o mapeamento do *cpi* fornecem informações básicas que podem auxiliar no

35 melhoramento genético de plantas mais eficientes na FBN em feijão-caupi, por meio  
36 da seleção assistida por marcadores.

37

38 **Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*, SNPs, FBN.

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58           **Developmento of linkage map and mapping of the biological fixation of**  
59           **nitrogen in cowpea**

60   **Abstract**

61       Biological fixation of nitrogen is an important tool for the sustainability of cowpea,  
62       which can benefit both the symbiotic relationship between legumes and bacteria, as  
63       well as, the growth and productivity of other plants in consortium or in subsequent  
64       crops. The objectives of the present study were to construct genetic map of cowpea  
65       for the 11 linkage groups in the F<sub>2</sub> population of the IC-1 x BRS Marataoã, based on  
66       SNPs markers, to map the *cpi* gene, with additional reference to introgression with  
67       map Species consensus, in order to identify markers for assisted selection for the  
68       development of more efficient cultivars for biological nitrogen fixation (BNF). Parental  
69       and 89 F<sub>2</sub> plants were genotyped with 46,300 single nucleotide polymorphism (SNP)  
70       markers, of which 910 polymorphic markers were used to construct map. The results  
71       revealed 11 linkage groups, with a mean of 82 markers per chromosome and a mean  
72       distance of 1.26 cM between markers. The recombination analysis of the SNPs  
73       markers indicated that markers 2\_12850 and 2\_24243, located in linkage group 11,  
74       flanked the *cpi* gene with 6.7 cM and 5.64 cM distance. The introgression of linkage  
75       group 11 with cowpea reference map revealed reduced distance from zero to 0.6 cM  
76       for these markers, indicating close association with the *cpi* gene. The constructed  
77       map and the *cpi* mapping provide basic information that can help in the genetic  
78       improvement of more efficient FBN cowpea plants, through the marker assisted  
79       selection.

80   Key words: *Vigna unguiculata*, SNPs, FBN.



## 81 **Introdução**

82 O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma espécie diploide ( $2n = 2x =$   
83 22), autógama, com tamanho do genoma estimado em 620 Mb (Arumuganathan e  
84 Earle, 1991). Essa leguminosa possui a habilidade de fixar nitrogênio devido a uma  
85 relação simbiótica que mantém com bactérias do grupo rizóbio (Leite et al., 2009).  
86 Esta característica, economicamente importante para o feijão-caupi, fornece  
87 nitrogênio e a acumulação de minerais pela associação simbiótica com bactérias  
88 fixadoras de nitrogênio atmosférico, dependendo das interações do macro e  
89 microsimbionte e das condições ambientais (Mohammadi et al., 2012; Belane et al.,  
90 2014). Embora ambas as partes da associação estejam sujeitas a variação  
91 genética, poucas informações estão disponíveis no aspecto da planta hospedeira  
92 (Bladergroen e Spaink, 1998; Shamseldin, 2013).

93 As interações iniciais para a formação do nódulo têm obtido grandes avanços  
94 devido à identificação de plantas não nodulantes ( $Nod^-$ ) na presença de bactérias  
95 fixadoras de nitrogênio. A não nodulação é controlada pela planta hospedeira, pela  
96 liberação de compostos fenólicos incompatíveis com a região promotora (*nod boxes*)  
97 da bactéria, responsáveis pela indução da transcrição de genes bacterianos  
98 essenciais à nodulação, (*nod*, *nol* e *noe*) (Geurts, Fedorova e Bisseling, 2005;  
99 Madsen et al., 2010; Okazaki et al., 2016). Plantas não-nodulantes têm sido  
100 observadas em várias espécies de leguminosas e são geralmente determinadas por  
101 alelos recessivos (Nigan et al., 1982; Vest e Caldwell, 1972; Ceccatto et al., 1988;  
102 Novak, 2003).

103 A ineficiência na fixação de nitrogênio ( $Fix^-$ ), após a nodulação, tem sido relatada  
104 em várias leguminosas e demonstra que essa característica pode ser controlada por

105 alelos dominantes (Vest, 1970; Markwei e Larue, 1992) e recessivos (Pedalino et al.,  
106 1993; Park e Buttery, 1994; Sagan, Huguet e Duc, 1994.). Em feijão-caupi, os  
107 estudos iniciais com mutante ineficiente IC-1 foram realizados por Pemberton, Smith  
108 e Miller (1990) e Purdom e Trese (1995). Esse mutante IC-1 apresenta nódulos  
109 brancos, pequenos e tamanho reduzido da parte aérea, quando comparado com  
110 plantas com simbiose efetiva. O gene que confere a ineficiência foi denominado de  
111 *cpi*, não tendo sido encontrado na literatura estudos do mapeamento desse gene  
112 que possibilitem a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM).

113 Limitações dos mapas de ligações genéticas do feijão-caupi, como pouca  
114 densidade e existência de grandes espaços entre marcadores (Ouédraogo et al.,  
115 2002, Muchero et al., 2009; Agbicodo et al., 2010; Lucas et al., 2011; Adetumbi et  
116 al., 2016), foram superados pelo mapa consenso disponibilizado por Muñoz-  
117 Amatriaín et al. (2017), que apresenta 37.372 SNPs e cobertura total de 873,11 cM,  
118 com média de 0,26 cM entre marcadores. Esse mapa consenso oferece  
119 oportunidade única para introgressão de grupos de ligação genéticas de baixa  
120 densidade, mapeamento e desenvolvimento de marcadores para SAM.

121 Os objetivos do presente estudo foram construir mapa genético do feijão-caupi  
122 para os 11 grupos de ligação na população F<sub>2</sub> do cruzamento IC-1 x BRS Marataoã,  
123 com base em marcadores SNPs, mapear o gene *cpi*, tendo como referência  
124 adicional a introgressão com mapa consenso da espécie, de forma a identificar  
125 marcadores para a seleção assistida para o desenvolvimento de cultivares mais  
126 eficientes para a fixação biológica de nitrogênio (FBN).

127

## 128 **Material e métodos**

### 129 **Material vegetal**

130 Uma população da  $F_2$ , derivada do cruzamento entre plantas com ineficiência  
131 para fixação de nitrogênio ( $fix^-$ ) IC-1, e uma variedade comercial eficiente na fixação  
132 de nitrogênio ( $fix^+$ ), BRS Marataoã. Uma única planta  $F_1$  foi auto-polinizada para  
133 produzir 169 indivíduos  $F_2$ . Todas os cruzamentos e as populações obtidas  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $F_1$   
134 e  $F_2$  foram cultivados em ambiente protegido com sombrite 70% na Embrapa  
135 Semiárido, Petrolina, Brasil.

136 Todas as plantas cresceram em vasos plásticos contendo 3L de solo não estéril,  
137 sendo a colonização rizobiana das plantas garantida com inoculação de um mix de  
138 estirpes de bactérias BR 3267, BR 3262 e BR 3299 recomendadas para feijão-caupi.  
139 As bactérias foram cultivadas em meio líquido YM (Vincent, 1970). No plantio e cinco  
140 dias após a emergência, as plântulas foram inoculadas com 1 mL de inóculo,  
141 ajustado para  $10^9$  cel/mL. As estirpes de rizóbio foram cedidas pela Embrapa  
142 Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. A identificação visual das plantas  
143 eficiência para a FBN (plantas com folhas verdes) e ineficiência (plantas com folhas  
144 amarelas) na população  $F_2$  foi realizada 40 dias após a emergência.

### 145 **Genotipagem**

146 O DNA foi extraído de folhas jovens e sadias de repetições dos parentais e  
147 individuais de plantas  $F_2$  usando o protocolo CTAB modificado (Doyle e Doyle,  
148 1990). O DNA extraído foi analisado em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000  
149 UV-Vis) para estimar tanto a qualidade como a concentração do DNA. O DNA foi  
150 diluído para a concentração de 50 ng/ $\mu$ L em água estéril e armazenada a  $-20^\circ\text{C}$  para

151 a realização das análises. 90 plantas  $F_2$  do cruzamento IC-1 x BRS Marataoã foram  
152 selecionadas para genotipagem.

153 Para a genotipagem foi utilizada a matriz iSelect do feijão-caupi (WG-401-1002;  
154 Illumina, Inc). A genotipagem foi realizada em um leitor de chip iSCAN no Centro  
155 de Genômica de Saúde Pública da Faculdade de Medicina da Universidade de  
156 Virginia, Estados Unidos. Os SNPs foram identificados e filtrados em GenomeStudio  
157 2.0 (Illumina, Inc.) com base nas orientações descritas nas notas técnicas de  
158 genotipagem do Illumina  
159 ([http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_infinium\\_genotypin  
160 g\\_data\\_analysis.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_infinium_genotyping_data_analysis.pdf)) e um arquivo de agrupamento do feijão-caupi previamente  
161 desenvolvido (Muñoz-Amatriaín et al., 2017). Os dados dos genótipos foram  
162 exportados do GenomeStudio para uma filtragem adicional com base nos parentais  
163 e na segregação  $F_2$ .

164 Foram eliminados os marcadores SNPs que apresentaram diferentes  
165 classificações genotípicas entre as repetições de um dos parentais, bem como os  
166 SNPs monomórficos entre os parentais. SNPs que apresentaram falhas de reações  
167 superiores a 10% foram também eliminados da genotipagem da população  $F_2$ . Uma  
168 planta  $F_2$  foi excluída da análise devido ao grande número de falhas nas reações  
169 SNPs. O teste de qui-quadrado foi realizado para identificar e remover marcadores  
170 com distorção de segregação mendeliana na população  $F_2$  superior a  $\alpha = 0,01$ .

### 171 **Desenvolvimento do mapa de ligação**

172 Os dados dos marcadores SNPs polimórficos foram utilizados para construir o  
173 mapa de ligação utilizando o software IciMapping QTL versão 4.1  
174 (<http://www.isbreeding.net/>). Dados da eficiência (plantas cloróticas) e não eficiência

175 (plantas não cloróticas) foram convertidos em AH e B, respectivamente, para  
176 inclusão nas análises de mapeamento.

177 Os SNPs redundantes foram removidos da análise com o comando 'Binning' do  
178 programa. A ordem no mapa para cada indivíduo foi inspecionada para a formação  
179 dos grupos de ligação com o comando 'Grouping', com LOD de 5,0. O algoritmo de  
180 ordenação nnTwoOpt (o vizinho mais próximo) foi usado para calcular as distâncias  
181 nos grupos de ligação. O critério de ondulação SAD (soma de distâncias  
182 adjacentes), utilizando oito marcadores, foi aplicado usando a função 'Rippling'. Os  
183 valores obtidos para as frequências de recombinação foram convertidos em  
184 distância de mapa genético (centimorgans) usando a função de Kosambi (1943). O  
185 número e a orientação do grupo de ligação foram atribuídos com base no mapa  
186 consenso de feijão-caupi de 2017 (<http://harvest.ucr.edu/>).

187 A introgressão do grupo de ligação 11 com o mapa consenso do feijão-caupi  
188 (Muñoz-Amatriaín et al., 2017), foi utilizado para saturação da região contendo o  
189 gene *cpi*. A introgressão foi realizada no software IciMapping QTL, usando a função  
190 consensus map construction. O algoritmo de ordenação nnTwoOpt (o vizinho mais  
191 próximo) foi usado para calcular as distâncias no grupo de ligações 11. O critério de  
192 ondulação SAD (soma de distâncias adjacentes), utilizando oito marcadores, foi  
193 aplicado usando a função 'Rippling'.

194

## 195 **Resultados e discussão**

196 A indentificação visual das folhas acolorificadas nas plantas ineficientes na  
197 população F<sub>2</sub> IC-1 x BRS Marataoã, co-segregaram para nódulos brancos e  
198 pequenos, como descrito por Permberton, Smith e Miller (1990). A classificação

199 visual de plantas eficientes e ineficientes resultou na identificação de 125 plantas  
200 clorofiladas e 44 plantas aclorofiladas. Os dados obtidos foram submetidos ao teste  
201 de qui-quadrado  $\chi^2$ , indicando segregação não mendeliana de 3:1, com dominância  
202 para o alelo que confere maior eficiência da FBN (Tabela 1). A segregação  
203 monogênica recessiva para a ineficiência da FBN na linha IC-1 foi anteriormente  
204 reportada por Pembeton et al. (1990).

205

### 206 **Mapa de ligação e identificação dos marcadores SNPs ligados ao gene *cpi***

207 Para a genotipagem de 90 plantas  $F_2$ , resultante do cruzamento entre IC-1 x BRS  
208 Marataoã, foram testados 46.300 marcadores SNPs. Após a eliminação dos  
209 marcadores monomórficos, com diferentes classificações genotípicas nas repetições  
210 dos genitores ou com perdas de informações superior a 10%, foram selecionados  
211 7112 marcadores polimórficos na população. Em seguida, foram descartados os  
212 marcadores em posições repetitivas. O mapa de ligações foi construído com 910  
213 marcadores SNPs, distribuídos em 11 grupos de ligação com LOD score variando de  
214 4 a 9 (Tabela 2).

215 Os 910 marcadores SNPs polimórficos detectados nesse estudo cobriram  
216 1140,12 cM, com média de 82 marcadores para cada grupo de ligação genética e  
217 distância média de 1,26 cM entre marcadores, apresentando alta saturação,  
218 comparando com alguns mapas disponíveis para o feijão-caupi. O maior e menor  
219 comprimento foram observados para os grupos de ligação 3 e 10, respectivamente  
220 (Tabela 2). O maior intervalo sem a presença de marcador de 29,75 cM, foi  
221 observado no grupo de ligação 4 e o menor de 5,19 cM, foi observado no grupo de  
222 ligação 2 e 6 (Tabela 1).

223 O gene *cpi* foi mapeado para intervalo de região de 12,32 cM, sendo flanqueado  
224 pelos locos SNP 2\_12850, a 6,7 cM, e pelo marcador 2\_24723, a 5,64 cM, no grupo  
225 de ligação 11 construído para população F<sub>2</sub> de IC-1 xBRS Marataoã (Figura 3).

226 Em feijão-caupi os estudos de mapas de ligações genéticas com marcadores  
227 moleculares são recentes. Menéndez, Hall e Gepts (1997) construíram o primeiro  
228 mapa genético para essa espécie, associando os marcadores com pragas, doenças  
229 e características morfológicas, a partir de um cruzamento intraespecífico. Menéndez,  
230 Hall e Gepts (1997) utilizaram 133 marcadores RAPD, 19 RFLP e 25 AFLP para  
231 identificação de 12 grupos de ligação abrangendo 972 cM, com distância média de  
232 6,4 cM entre marcadores, com grupos de ligação variando de 3 a 257 cM de  
233 comprimento. Ouédraogo et al. (2002), utilizando a população de mapeamento  
234 empregada por Menéndez, Hall e Gepts (1997), RIL F<sub>9</sub>, construíram mapa de ligação  
235 com 11 grupos de ligação com 441 marcadores AFLP, RFLP e RAPD, abrangendo  
236 um total de 2.670 cM, com distância média de 6,43 cM entre os marcadores.  
237 Ouédraogo et al. (2002) também associaram várias características de resistência a  
238 viroses, doenças e as raças 1 e 3 de *Striga gesnerioides*.

239 O mapeamento de ligação no feijão-caupi progrediu com a tecnologia de  
240 polimorfismo de nucleotídeo único-SNP da Illumina GoldenGate. Essa plataforma foi  
241 desenvolvida e implementada para mapear 928 SNPs derivados de sequência  
242 expressada (EST) de feijão-caupi (Muchero et al., 2009). Esses 928 SNPs foram  
243 incorporados em mapa genético consenso, abrangendo 680 cM com 11 grupos de  
244 ligação e uma distância média entre marcador de 0,73 cM. Adicionalmente,  
245 (Muchero et al., 2009) mostraram a proximidade evolutiva entre o feijão-caupi e a

246 soja e identificaram regiões para estudos da genômica funcional com base em  
247 sintenia em leguminosas.

248 Agbicodo et al. (2010) construíram um mapa de ligação genética de feijão-caupi  
249 com 113 linhas recombinantes, com 282 marcadores SNP, selecionados da matriz  
250 de genotipagem de 1536 SNPs, utilizando o mapa consenso do feijão-caupi  
251 (Muchero et al., 2009). O mapa de Agbicodo et al. (2010) consistiu de 11 grupos de  
252 ligação, tamanho total de 633 cM e distância média entre marcadores de 2,24 cM.  
253 Adicionalmente, os citados autores associaram a resistência a bactéria  
254 *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vignicola* (Xav). Lucas et al. (2011) construíram mapa  
255 consenso para o feijão-caupi, formado com 1107 marcadores SNPs alocados nos 11  
256 grupos de ligação, cobrindo 680 cM do genoma, e distância de 0,62 cM. Os mapas  
257 consensos de 2009, 2010 e 2011 são baseados inteiramente em SNPs derivados de  
258 EST e todas as populações foram genotipadas para os mesmos 1536 locos.

259 Alguns dos mapas disponíveis para o feijão-caupi foram compostos de vários  
260 tipos de marcadores e várias populações (Menéndez, Hall e Gepts, 1997;  
261 Ouédraogo et al. 2002). Para aumentar o número de marcadores no genoma de  
262 feijão-caupi, mapas consenso foram computados, mas os mapas podem ter faltado  
263 na precisão da ordem dos marcadores (Gaur et al., 2012). Assim, o mapa de ligação  
264 desse estudo pode ser considerado de boa precisão em relação à ordem dos  
265 marcadores, uma vez que os marcadores foram distribuídos nos grupos de ligação  
266 com base em frequências de recombinação. As distâncias genéticas entre  
267 marcadores, bem como a ordem genética e a posição dos SNPs são consistentes.

268

269



## 270 **Introgressão de mapas**

271 Para a introgressão de marcadores mais próximos a região do gene *cpi*, foram  
272 utilizados 3027 marcadores SNPs do grupo de ligações 11, disponível no mapa  
273 consenso do feijão-caupi (Muñoz-Amatriaín et al., 2017). A introgressão de mapas  
274 no cromossomo 11 resultou em distância reduzida, sendo inexistente para o loco  
275 SNP 2\_12850 e de 0,56 cM para o loco SNP 2\_54459, não incluído na análise da  
276 população F<sub>2</sub> do presente estudo. O loco SNP 2\_24723, antes posicionado a 19,2  
277 cM, com a introgressão dos mapas foi posicionado a 10 cM no mapa de ligação.

278 O Mapeamento de caracteres de herança simples em feijão-caupi foi relatado por  
279 Rodrigues et al., (2012), que identificaram três marcadores AFLP ligados ao gene de  
280 resistência ao vírus do mosaico dourado, com 2 marcadores flanqueando o referido  
281 gene. Pottorff et al. (2012) mapearam locus de resistência da raça 3 de *Fusarium*  
282 *oxysporum* (Fot3-1) para uma região de 1,2 cM e identificaram o marcador SNP  
283 1\_1107 em co-segregação com Fot3-1 em feijão-caupi. Estes estudos mostram que  
284 genes candidatos podem ser identificados para traços agronômicos de herança.

285 No presente estudo foi identificada de forma pioneira, a região genômica  
286 relacionada a plantas eficientes e ineficientes na fixação de nitrogênio com base no  
287 NA, estando os marcadores 2\_12850 e 2\_24723, localizados a 6,7 cM e 5,64 cM de  
288 distância, respectivamente, flanqueando o gene *cpi*. A introgressão com o mapa  
289 consenso de feijão-caupi reduziu as distância para o gene *cpi*, possivelmente pela  
290 ampla cobertura proporcionada, reduzindo as limitações da análise conjunta de  
291 marcador dominante (*cpi*), com o marcador codominante (SNP). No cenário  
292 proporcionado pela introgressão do grupo de ligação 11, as distâncias dos SNPs  
293 flanqueando o gene *cpi* foram reduzidas para zero ou 0,6 cM, indicando tratar-se de

294 região cromossômica firmemente associada com o gene da ineficiência da fixação  
295 do nitrogênio em feijão-caupi.

296 Apesar de haver mapas genéticos disponíveis para o feijão-caupi, nenhum  
297 marcador ligado ao gene da ineficiência da FBN foi identificado, tornando este mapa  
298 de ligações o primeiro em uma população de *V. unguiculata* segregando para  
299 característica da fixação de N<sub>2</sub>. Os marcadores 2\_12850 / 2\_24723, identificados no  
300 presente estudo, despontam como forte candidato para uso em seleção assistida por  
301 marcadores moleculares, dada a sua maior proximidade com o gene *cpi*, da  
302 eficiência à fixação de nitrogênio em feijão-caupi.

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315 **Referências**

- 316 Adetumbi JA, Akinyosoye ST, Olowolafe MO, Oloyede-Kamiyo QO and Agbeleye O.  
317 A. (2016). Genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) using SNP  
318 markers. **African Journal of Biotechnology** **15**: 830-834.
- 319 Agbicodo EM, Fatokun CA, Bandyopadhyay R, Wydra K, Diopet NN, Muchero W,  
320 Ehlers JD, Roberts PA, Close TJ, Visser, RGF and Van Der Linder CG. (2010).  
321 Identification of markers associated with bacterial blight resistance loci in cowpea  
322 [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Euphytica** **175**: 215–226.
- 323 Arumuganathan K and Earle ED. (1991). Estimation of nuclear DNA content of  
324 plants by flow cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter** **9**: 221–231.
- 325 Belane AK, Pule-Meulenbergh F, Makhubedu TI and Dakora FD (2014). Nitrogen  
326 fixation and symbiosis-induced accumulation of mineral nutrients by cowpea (*Vigna*  
327 *unguiculata* L. Walp.). **Crop and Pasture Science** **65**: 250-258.
- 328 Bladergroen MR and Spaink HP. (1998) Genes and signal molecules involved in the  
329 rhizobia-leguminoseae symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology** **1**: 353-359.
- 330 Ceccatto VM, Gomes JE, Sarries GA, Moon DH and Tsai SM (1988) Effects of host  
331 plant origin on nodulin activities and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant**  
332 **and Soil** **204**: 79–87.
- 333 Doyle JJ and Doyle JL. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** **12**:  
334 13-15.
- 335 Gaur R, Azam S, Jeena G, Khan AW, Choudhary S, Jain M, Yadav G, Tyagi AK,  
336 Chattopadhyay D and Bhatia S. (2012) High- Throughput SNP Discovery and  
337 Genotyping for Constructing a Saturated Linkage Map of Chickpea (*Cicer arietinum*  
338 L.). **DNA Research** **19**: 357-373.

- 339 Geurts R, Fedorova H and Bisseling T, (2005) Nod factor signaling genes and their  
340 function in the early stages of Rhizobium infection. **Current Opinion in Plant**  
341 **Biology 8**: 346-352.
- 342 Kosambi DD, (1943) The estimation of map distances from recombination values.  
343 **Annal of Human Genetics 12**: 172-175.
- 344 Leite J, Seido SL, Passos S R, Xavier G R, Runjaneck NG and Martins LMV (2009)  
345 Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of  
346 the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo 33**: 1215-  
347 1226.
- 348 Lucas MR, Diop N, Wanamaker S, Ehlers JD, Roberts PA and Close TJ (2011).  
349 Cowpea-soybean synteny clarified through an improved genetic map. **The Plant**  
350 **Genome 4**: 218–225.
- 351 Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, Sullivan JT, Heckmann AB, Bek AS, Ronson  
352 CW, James EK and Stougaard J, (2010). The molecular network governing nodule  
353 organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. **Nature**  
354 **Communications 1**: 1-10.
- 355 Markwei CM and Larue TA, (1992). Phenotypic characterization of sym8 and sym9,  
356 two genes conditioning non-nodulation in *Pisum sativum* ‘Sparkle’. **Canadian**  
357 **Journal of Microbiology 38**: 548–554.
- 358 Menéndez CM, Hall AE and Gepts PA, (1997). Genetic linkage map of cowpea  
359 (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines.  
360 **Theoretical and Applied Genetics 95**: 1210–1217.

- 361 Mohammadi K, Sohrabi Y, Heidari G, Khalesro S and Majidi M, (2012). Effective  
362 factors on biological nitrogen fixation. **Africam Journal of Agricultural Research 7:**  
363 1782-1788.
- 364 Muchero W, Diop NN, Bhat PR, Fenton RD, Wanamaker S, Pottorff M, Hearne S,  
365 Cisse N, Fotokun C, Ehlers JD, Roberts PA and Close TJ (2009). A consensus  
366 genetic map of cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] and syntenic based on EST-  
367 derived SNPs. **Proceedings of the National Academy of Sciences 106:** 18159-  
368 18164.
- 369 Muñoz-Amatriaín M, Mirebrahim H, Xu P, Wanamaker SI, Luo M, Alhakami H, Alpert  
370 M, Atokple I, Batiemo BJ, Boukar O, Bozdog S, Cisse N, Drabo I, Ehlers JD, Farmer  
371 A, Fotokun C, Gu YQ, Guo Y, Huynh B, Jackson SA, Kusi F, Lawley, CT, Lucas MR,  
372 Ma Y, Timko MP, Wu J, You F, Barkley NA, Roberts PA, Lonardi S and Close TJ.  
373 (2017) Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food  
374 security. **The plant Journal 89:** 1042-1054, 2017.
- 375 Nigan SN, Nambiar PTC, Dwivedi SL, Gibbons RW and Dart PJ. (1982). Genetics of  
376 nonnodulation in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Studies with single and  
377 mixed *Rhizobium* strains. **Euphytica 31:** 691.
- 378 Novak K. (2003) Allelic Relationships of Pea Nodulation Mutants. **Journal of**  
379 **Heredity 94:** 191-193.
- 380 Okazaki S, Tittabutr P, Teulet A, Thouin J, Fardoux J, Chaintreuil C, Gully D, Arrighi  
381 J, Furuta N, Miwa H, Yasuda M, Nouwen N, Teumroong N and Giraud E. (2016).  
382 *Rhizobium*–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios  
383 with or without the T3SS. **The ISME Journal 10:** 64–74.

- 384 Ouédraogo JT, Gowda BS, Jean M, Close TJ, Ehlers JD, Hall AE, Gillaspie AG,  
385 Roberts PA, Ismail AM, Bruening G, Gepts P, Timko MP and Belzile FJ. (2002). An  
386 improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP,  
387 RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. **Genome 45:**  
388 175–188.
- 389 Park SJ and Buttery BR. (1994). Inheritance of nonnodulation and Ineffective  
390 nodulation mutants In common bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Journal of Heredity 85:**  
391 1-3.
- 392 Pedalino M, Kipe-Nolt J, Frusciante L and Monti L. (1993) Common Bean (*Phaseolus*  
393 *vulgaris* L.) Mutants Defective in Root Nodule Formation: II GENETIC ANALYSIS.  
394 **Journal of Experimental Botany 44:** 1015-1020.
- 395 Pemberton IJ, Smith GR and Miller Jr JC. (1990) Inheritance of ineffective nodulation  
396 in cowpea. **Crop Science 30:** 568-571.
- 397 Pottorff M, Wanamaker S, Ma YQ, Ehlers JD, Roberts PA and Close TJ.  
398 (2012) Genetic and physical mapping of candidate genes for resistance to *Fusarium*  
399 *oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* race 3 in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **PLoS**  
400 **ONE 7:** 1-12.
- 401 Purdom D and Trese AT. (1995) Morphological and Molecular Characteristics of  
402 Host-Conditioned Ineffective Root Nodules in Cowpea. **Plant Physiology 109:** 239-  
403 244.
- 404 Rodrigues MA, Santos CAF and Santana JRF. (2012) Mapping of AFLP loci linked to  
405 tolerance to cowpea golden mosaic virus. **Genetics and Molecular Research 11:**  
406 3789-3797.

407 Sagan M, Huguet T and Duc G. (1994) Phenotypic characterization and classification  
408 of nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Science 100**: 59-70.

409 Shamseldin A. (2013) The Role of Different Genes Involved in Symbiotic Nitrogen  
410 Fixation – Review Global. **Journal of Biotechnology and Biochemistry 8**: 84-94.

411 Vest G. (1970) RJ3--A gene conditioning ineffectiveness in soybean. **Crop Science**  
412 **10**: 34-35.

413 Vest G, Caldwell BE. (1972) Rj4 a gene controlling ineffective nodulation in soybean.  
414 **Crop Science 12**: 692 – 693.

415 Vincent JMA. (1970) **Manual for the practical study of root-nodule bacteria**.  
416 London: International Biological Programmer (Handbook, 15).

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440 **Tabela 1.** Grupos de ligação genéticas com 910 marcadores SNPs na população F<sub>2</sub>  
 441 do cruzamento IC-1 x BRS Marataoã

Grupo de ligação	Número de marcadores SNP	Comprimento (cM)	Distância Média (cM)	Maior espaço (cM)
1	94	136,74	1,45	11,00
2	115	124,83	1,08	5,19
3	153	162,57	1,06	5,80
4	67	124,13	1,85	29,75
5	59	76,55	1,29	16,79
6	93	69,81	0,75	5,19
7	34	67,08	1,97	19,20
8	63	104,42	1,65	7,64
9	66	81,23	1,23	20,00
10	61	62,44	1,02	6,45
11	105	130,32	1,24	8,89
Total	910	1140,12	1,26	12,35

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

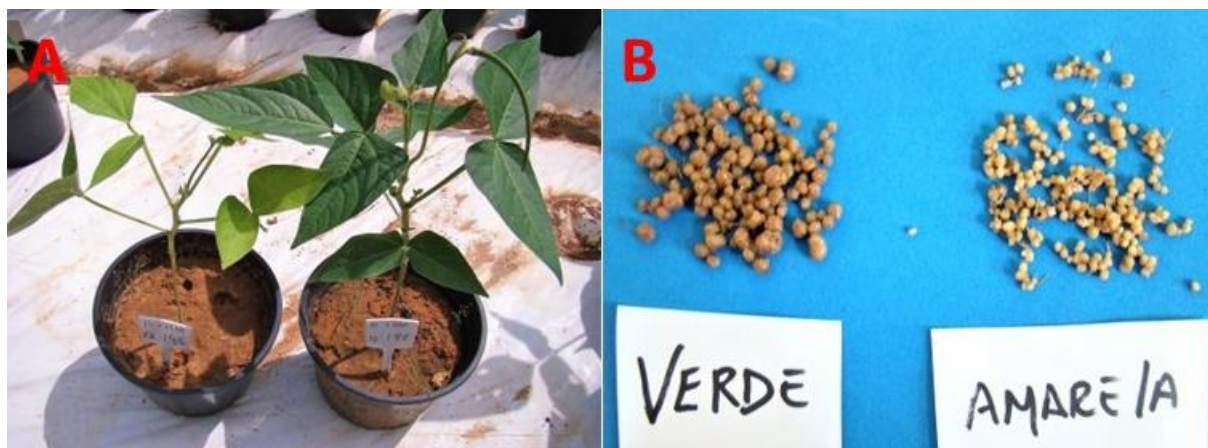
458

459

460

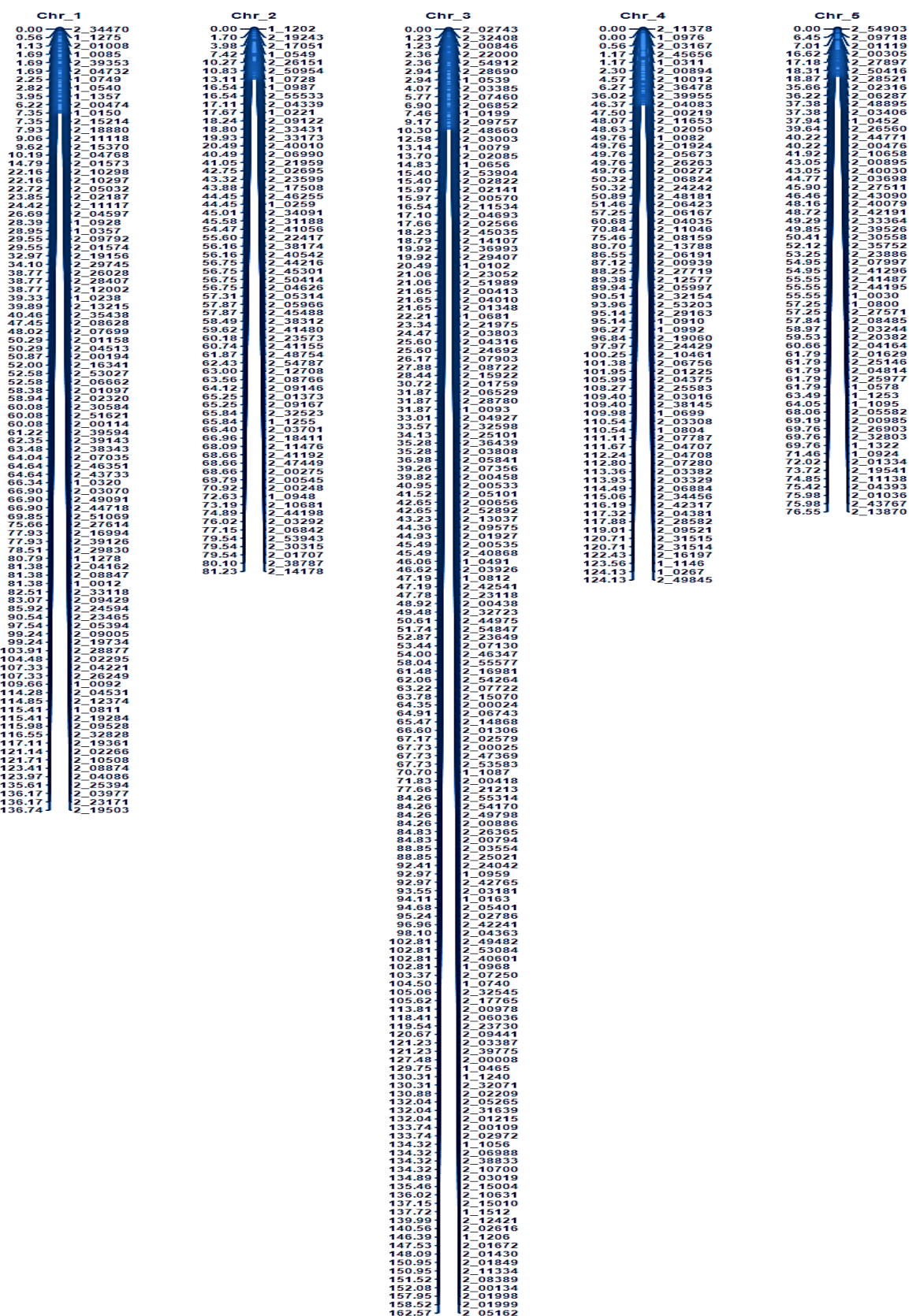
461





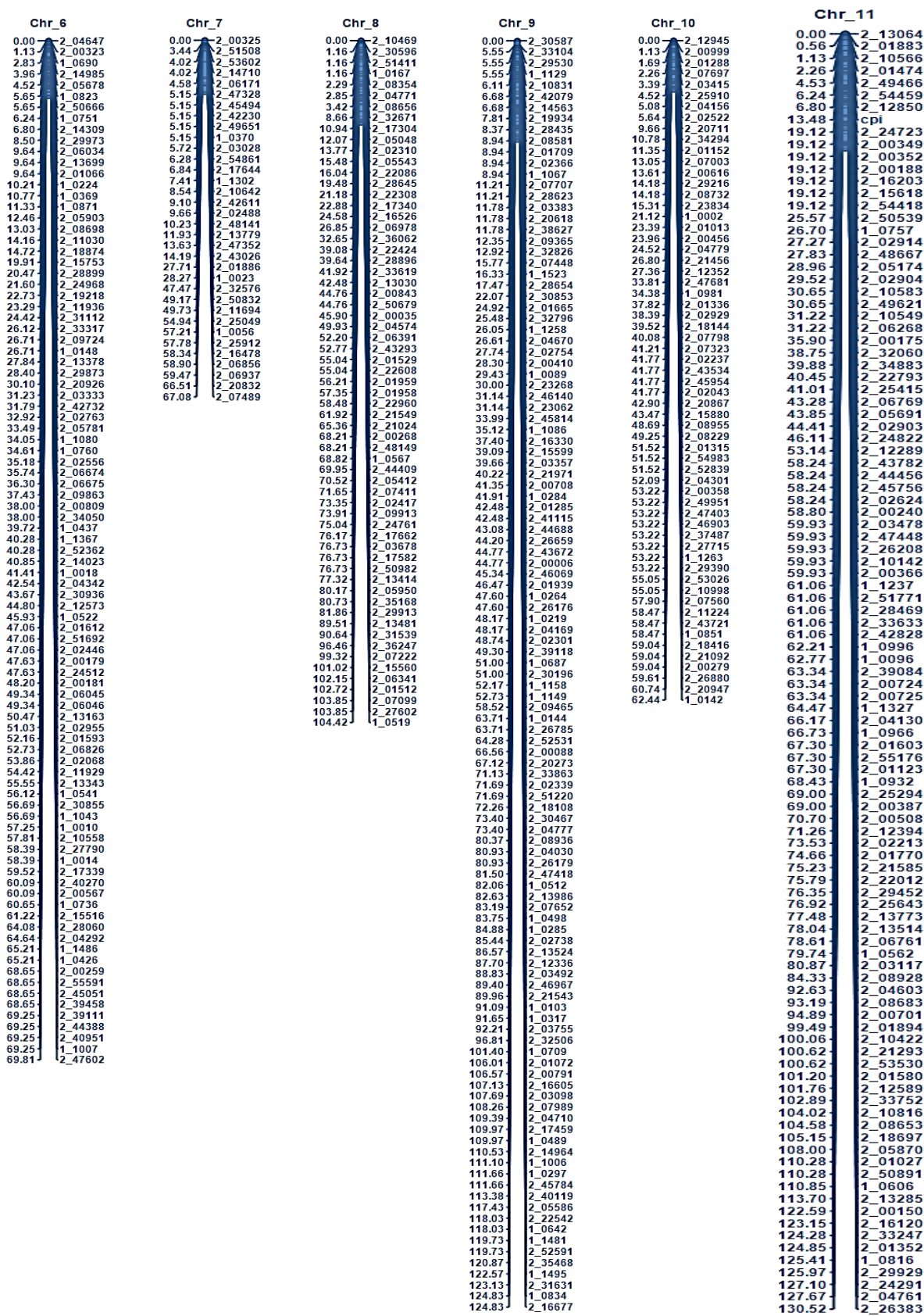
462  
463 **Figura 1.** Painel A: folhas de plantas não eficientes (amareladas) para N<sub>2</sub> (esquerda)  
464 e folhas de plantas eficientes (verdes) para fixação de N<sub>2</sub> (direita); Painel B: nódulos  
465 de plantas eficientes (esquerda) e nódulos de plantas ineficientes (direita) para  
466 fixação de N<sub>2</sub>.

467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479



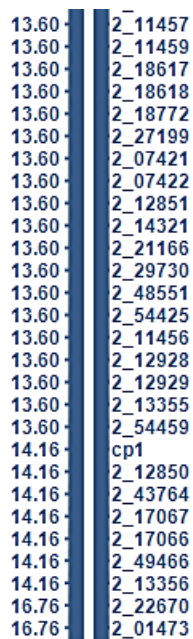
480  
481  
482

**Figura 2.** Grupos de ligação (Chr\_) 1, 2, 3, 4 e 5 contruidos com marcadores SNPs e gene *cpi* em população F<sub>2</sub> do cruzamento IC-1 x BRS Marataoã.



483  
484  
485

Figura 3. Grupos de ligação (Chr\_) 6, 7, 8, 9, 10 e 11 contruidos com marcadores SNPs e gene *cpi* em população F<sub>2</sub> do cruzamento IC-1 x BRS Marataoã.



486

487 **Figura 4.** Posicionamento do gene *cpi* no grupo 11 do mapa de ligações consenso  
488 para feijão-caupi.

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

#### **CAPÍTULO IV**

---

**Mapeamento de QTL da nodulação ineficiente associados a eficiência da fixação de nitrogênio em feijão-caupi.**

**Artigo a ser submetido à Revista  
Crop Science (ISSN 0011-183X)**



## **Mapeamento de QTL da nodulação ineficiente associados a eficiência da fixação de nitrogênio em feijão-caupi.**

Sirando Lima Seido\*, Carlos Antonio Fernandes Santos, , Michael Paul Timko.

S.L. Seido, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos- CEP: 52171-900- Recife/PE. C.A.F. Santos, and M.P. Timko, Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22904 USA.

\* Autor correspondente ([siroseido@hotmail.com](mailto:siroseido@hotmail.com))

### **Resumo**

Apesar da fixação biológica de nitrogênio (FBN) ser um processo chave e de importância econômica e social em leguminosas, os estudos com loci de variação quantitativa (QTL) para fixação de  $N_2$  são escassos. O objetivo deste trabalho foi estimar QTL associados a quatro caracteres relacionados com a FBN em população  $F_2$  resultante do cruzamento de linha ineficiente, IC-1, com duas linhas eficientes, BRS Marataoã e BRS Pujante, para apoiar o desenvolvimento de cultivares de feijão-caupi com maior eficiência para FBN. População de 89 plantas  $F_2$  de IC-1 x BRS Marataoã foi genotipada com 7212 marcadores SNPs. O método de mapeamento de intervalo composto inclusivo (ICIM) foi adotado para estimar QTLs para massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), matéria fresca de nódulos (MFN) e nitrogênio acumulado (NA). Um único QTL para MSPA, NN, e NA foi identificado com grande efeito explicando 43,4%, 48,2% e 51,24% da variação total. Cinco marcadores SNPs, em um dos lados dos QTL, foram validados na população  $F_2$ , IC-1 x BRS Pujante, com a tecnologia tetra-primer ARMS-PCR, com sucesso de 96% nas plantas genotipadas. Esses marcadores têm grande potencial para a seleção assistida para o desenvolvimento de novas cultivares eficientes para fixação de  $N_2$ , bem como oferecem oportunidade para o estudo evolutivo da FBN e a saturação da região alvo para clonagem de genes envolvidos na FBN.

**Palavra-Chave:** QTL, Fixação de nitrogênio, SAM

1 **QTL mapping related to efficiency of biological fixation of nitrogen**  
2 **in cowpea.**

3 **Abstract**  
4

5 Although biological fixation of nitrogen (BNF) is a key process of economic and social  
6 important in legumes, studies with quantitative variation loci (QTL) for N<sub>2</sub> fixation are  
7 scarce. The objective of this work was to estimate QTL associated with four FBN-  
8 related traits in F<sub>2</sub> population resulting from the inefficient line, IC-1, with two efficient  
9 cultivars, BRS Marataoã and BRS Pujante, to support the development of cowpea  
10 cultivars with greater FBN efficiency. Population of 89 F<sub>2</sub> plants of IC-1 x BRS  
11 Marataoã was genotyped with 7212 SNP markers. The ICIM method was used to  
12 estimate QTLs for shoot dry mass (MSPA), number of nodules (NN), fresh mass of  
13 nodules (MFN) and accumulated nitrogen (NA). A single QTL for MSPA, NN, and NA  
14 was identified explaining 43.4%, 48.2% and 51.24% of the total variation, located in a  
15 chromosome region of 11.1 cM in the linkage group 11 of cowpea. Five SNPs  
16 markers, in one side of the QTL, were validated in the F<sub>2</sub> population IC-1 x BRS  
17 Pujante, with tetra-primer ARMS-PCR technology, with 96% of certainty in the  
18 genotyped plants. These markers have great potential for assisted selection for the  
19 development of novel efficient cultivars for N<sub>2</sub> fixation, as well as provide opportunity  
20 for the evolutionary study of FBN and saturation of the target region for cloning of  
21 genes involved in BNF.

22

23 **Key words:** QTL, Nitrogen fixation, SAM.  
24  
25  
26  
27  
28  
29

## 30 **Introdução**

31

32 O feijão-caupi é uma das principais culturas com distribuição nas regiões  
33 tropicais e subtropicais do mundo (Badiane et al., 2012). Essa cultura exerce um  
34 importante papel na agricultura sustentável, devido à capacidade de produzir em  
35 ambientes desfavoráveis, ampla adaptabilidade, e capacidade de fixar nitrogênio  
36 atmosférico, pela associação de bactérias fixadoras de nitrogênio, coletivamente  
37 chamadas de rizóbio (Timko, Ehlers e Roberts, 2007; Diouf, 2011). Essa simbiose  
38 envolve processos bastante complexos, mediada por sinais moleculares exsudados  
39 pelo macro e microssimbionte, que levam à formação de nódulos, um novo órgão,  
40 onde ocorre a fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Ayisi, Nkgapele e Dakora,  
41 2000).

42 A fixação de  $N_2$  no feijão-caupi e em outras leguminosas, talvez tenha grande  
43 contribuição no melhoramento dessas plantas, nos últimos anos, devido à  
44 disponibilidade de populações superiores mais produtivas (Freire Filho et al., 2011).  
45 Essa relação pode ser fundamentada porque para sustentar uma maior produção de  
46 grãos, que é resultante de uma gama de metabólitos, um aumento correspondente  
47 no fornecimento de carbono e nitrogênio é essencial (Taiz e Zaiger, 2009). Embora  
48 uma maior capacidade fotossintética possa ter proporcionado mais carbono  
49 (Richards, 2000), há hipótese que a capacidade de fixar  $N_2$  também tenha sido  
50 aprimorada durante o melhoramento dessas plantas.

51 As interações iniciais da organogênese do nódulo tem tido grandes avanços  
52 na identificação dos *nod* fatores, pela clonagem de genes mutantes (GEURTS,  
53 Fedorova e Bisseling, 2005; Madsen et al., 2010; Okazaki et al., 2016). No entanto,  
54 pouco se sabe sobre a interação entre o micro e macrossimbionte para o  
55 estabelecimento funcional da fixação de nitrogênio. A utilização de plantas mutantes  
56 deficientes na fixação de nitrogênio não é um processo prático. No entanto, em  
57 vários fenótipos com mutação foram realizadas caracterização morfológica,  
58 molecular e mapeamento de alguns genes da nodulação (Pemberton, Smith e Miller,  
59 1990; Purdom e Trese, 1995; Marsh e Schultze, 2001).

60 Atualmente, mais de 200 fenótipos anormais em diferentes etapas na FBN  
61 foram relatados na literatura. Esses fenótipos incluem plantas não-nodulantes (*nod<sup>-</sup>*),



62 com baixa nodulação ( $nod^{\pm}$ ), hipernodulantes ( $nod^{++}$ ), bem como aqueles que não  
63 fixam nitrogênio ( $fix^{-}$ ) devido a falhas nas funções fisiológicas dos nódulos (Borisov  
64 et al., 2000). Como resultado, mais de 40 genes simbióticos foram identificados  
65 desde então, e utilizados para identificar genes e produtos envolvidos na formação e  
66 funcionamento de nódulos (Vance et al., 1988; Long, 1989; Borisov et al., 2000). A  
67 caracterização desses mutantes ( $fix^{-}$ ) promoveu informações relevantes sobre o  
68 mecanismo que controlam nas plantas hospederias, e a atividade da fixação de  
69 nitrogênio em leguminosas (Duc e Messenger, 1989; Haser et al., 1992; Park e  
70 Buttery, 1994; Peterson e Barnes, 1981; Smith e Knight, 1984). Um dos primeiros  
71 trabalhos foi realizado por Kneen et al., (1990) que mapearam o gene identificado  
72 por *Sym 13*, em plantas mutantes de *Pisum sativum* com nódulos ineficazes ( $fix^{-}$ ). O  
73 gene *Sym 13* foi localizado no cromossoma 2 e ligado a genes para chiquimato  
74 desidrogenase e esterase-2 (enzimas da biossíntese de aminoácidos). No entanto,  
75 há poucos relatos sobre o mapeamento de características relacionadas à FBN em  
76 feijão-caupi.

77 Várias tentativas foram feitas para melhorar a característica de fixação de  $N_2$   
78 em leguminosas com o feijão comum (Graham, 1981; Bliss, 1989). Como resultado,  
79 alguns genótipos foram lançados com sucesso (Bliss et al., 1993). No entanto, uma  
80 das principais restrições para a melhoria da FBN é que as características são de  
81 herança quantitativa, e com grande influência pelo meio ambiente (Bliss, 1985).

82 Estudos foram realizados para identificar QTL em leguminosas de importância  
83 econômica como a soja e ervilha, com foco em características relacionados à FBN.  
84 Hwang et al. (2014) relataram oito QTL em uma população de linhagens  
85 recombinantes (RIL) de soja, associado ao número de nódulos e sete QTL para o  
86 tamanho do nódulo. Santos et al. (2013), também trabalhando com soja, detectaram  
87 três QTL para número de nódulos e um QTL para a relação peso seco de nódulo e  
88 número de nódulos. Tanya et al. (2005) relataram vários QTLs, explicando até 10%  
89 da variação fenotípica para o número de nódulos e peso seco. Em uma população  
90 RIL de soja, Bourion et al. (2010) relataram nove QTL para número de nódulos e  
91 quatro QTL para peso seco de nódulo em uma população RIL de ervilhas.

92 O objetivo deste trabalho foi identificar QTL utilizando marcadores SNPs,  
93 relacionados à FBN, em população  $F_2$  resultante do cruzamento de uma linha

94 ineficiente IC-1, com duas linhas eficientes na fixação de nitrogênio BRS Marataoã e  
95 BRS Pujante para apoiar o desenvolvimento de cultivares de feijão-caupi com maior  
96 eficiência para FBN.

## 97 **Material e métodos**

### 98 **Material vegetal**

99 A população  $F_2$  ( $F_2^{MA}$ ,  $n = 174$ ) foi derivada do cruzamento entre a linha  
100 ineficiente na fixação de nitrogênio ( $fix^-$ ), IC-1, e variedade comercial eficiente na  
101 fixação de nitrogênio ( $fix^+$ ), BRS Marataoã. Uma única planta  $F_1$  foi auto-polinizada  
102 para produzir 175 indivíduos  $F_2$  que foram avaliadas para a eficiência e ineficiência  
103 sob ambiente protegido com sombrite 70% na Embrapa Semiárido, Petrolina, Brasil.

104 Todas as plantas cresceram em vasos plásticos de 3L de solo, sendo a  
105 colonização rizobiana garantida com inóculo de mix de estirpes de bactérias BR  
106 3267, BR 3262 e BR 3299 recomendadas para feijão-caupi. No plantio e cinco dias  
107 após a emergência, as plântulas foram inoculadas com 1 mL de inóculo ajustado  
108 para  $10^9$  cel/mL. As estirpes de rizóbio foram cedidas pela Embrapa Agrobiologia,  
109 Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

110 A identificação fenotípica para a ineficiência da FBN foi realizada pela  
111 presença de folhas verde ou aclorofiladas e a cor dos nódulos marrom ou branco. A  
112 população  $F_2$  foi avaliada individualmente aos 40 dias após a emergência, após a  
113 identificação fenotípica para a eficiência (folhas verdes) e a ineficiência (folhas  
114 aclorofiladas) e a cor dos nódulos eficiente (marrom) e ineficiente (branco). As  
115 plantas foram avaliadas para quatro características: massa seca da parte aérea  
116 (MSPA), número de nódulos (NN), massa fresca de nódulos (MFN) e nitrogênio  
117 acumulado (NA). A MSPA, em g/planta, foi determinada após secagem em estufa a  
118  $65\text{ }^\circ\text{C}$  até atingir peso constante. O N total do tecido vegetal foi determinado pelo  
119 método micro Kjeldhal, de acordo com Malavolta, Vitti, Oliveira (1997).

### 120 **Genotipagem**

121 O DNA foi extraído de folhas jovens e sadias de repetições dos parentais e  
122 individuais de plantas  $F_2$  usando o protocolo CTAB modificado (Doyle e Doyle,  
123 1990). O DNA extraído foi analisado em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000  
124 UV-Vis) para estimar tanto a qualidade como a concentração do DNA. O DNA foi  
125 diluído para a concentração de  $50\text{ ng}/\mu\text{L}$  em água estéril e armazenada a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para

126 a realização das análises. Noventa plantas  $F_2$  do cruzamento IC-1 x BRS Marataoã  
127 foram selecionadas para genotipagem, incluindo 10 indivíduos extremos da  
128 distribuição fenotípica e 70 selecionados aleatoriamente do restante da população.

129 A matriz de consórcio iSelect do feijão-caupi (Muñoz-Amatriaín et al., 2017)  
130 foi utilizada para a genotipagem dos indivíduos  $F_2$  do IC-1 x BRS Marataoã e três  
131 repetições de cada parental, IC-1 e BRS Marataoã. A genotipagem foi realizada pelo  
132 Centro de Genômica de Saúde Pública da Faculdade de Medicina da Universidade  
133 de Virginia, Estados Unidos. Os SNPs foram identificados e filtrados em  
134 GenomeStudio 2.0 (Illumina, Inc.) com base nas orientações descritas nas notas  
135 técnicas de genotipagem do Illumina  
136 ([http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_infinium\\_genotyping\\_data\\_analysis.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_infinium_genotyping_data_analysis.pdf)). Os dados dos genótipos foram exportados do GenomeStudio  
137 para uma filtragem adicional com base nos parentais e na segregação  $F_2$ .

139 Foram eliminados os marcadores SNPs que apresentaram diferentes  
140 classificações genotípicas entre as repetições de um dos parentais, bem como os  
141 SNPs monomórficos entre os parentais. SNPs que apresentaram falhas de reações  
142 superiores a 10% foram também eliminados da genotipagem da população  $F_2$ . Uma  
143 planta  $F_2$  foi excluída da análise devido ao grande número de falhas nas reações  
144 SNPs. O teste de qui-quadrado foi realizado para identificar e remover marcadores  
145 com distorção de segregação mendeliana de 1:2:1 na população  $F_2$  superior a  
146  $\alpha = 0,01$ .

#### 147 ***Desenvolvimento do mapa de ligação***

148 O mapa de ligações genéticas foi desenvolvido usando o software  
149 IciMapping QTL versão 4.1 (<http://www.isbreeding.net/>). As distâncias entre os loci  
150 foram calculadas usando a função de mapeamento (Kosambi) e agrupamento LOD  
151 Score (logaritmo da razão de verossimilhança) de 3,0 a 9,0. A ordem no mapa para  
152 cada indivíduo foi inspecionada e os chamados SNP duvidosos foram excluídos para  
153 reduzir o erro da genotipagem e a influência da parentalidade incompleta. O número  
154 e a orientação do grupo de ligação foram atribuídos com base no mapa consenso de  
155 feijão-caupi de 2016 (Muñoz-Amatriaín et al., 2017).

## 156 **Mapeamento e Validação de QTL**

157 As análises de QTL foram realizadas no software IciMapping QTL versão  
158 4.1. O mapeamento de intervalo composto inclusivo (MICI) foi utilizado para a  
159 análise de QTL dos caracteres MSPA, NN, MFN e NA. O método de mapeamento de  
160 intervalo composto inclusivo (ICIM), foi aplicado com os seguintes parâmetros:  
161 fenótipo ausente = deleção, Step = 2 cM, PIN = 0.001. Limiar LOD score de 4,5 foi  
162 atribuído com base em testes de permutação (n = 1.000, P = 0,01).

163 Após a detecção dos QTL co-localizados para as características, excluindo  
164 peso de nódulos, a população  $F_2^{PJ}$ , de IC-1 x BRS Pujante foi usada para validação.  
165 Cinco marcadores tetra-primer ARMS-PCR (Ye et al., 2001), baseado nos SNPs  
166 fortemente ligados ao QTL, foram desenvolvidos e todos os indivíduos  $F_2^{PJ}$  foram  
167 genotipados. O aplicativo Tetra-primer (ARMS-PCR)  
168 ([http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public\\_html/primer1.html](http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html)) foi empregado para  
169 desenho dos primers. A reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) foi realizada  
170 para 20 µl contendo 1x *Taq* buffer, 200 µM dNTP, 50 ng de DNA genômico,  
171 concentrações apropriadas de primer e  $MgCl_2$  (Tabela 3), 1 unidade de *Taq*  
172 polimerase. A PCR consistiu de 2 min de desnaturação (95 °C) seguido por 35  
173 ciclos de 1 min: desnaturação por 1 min. a 95 °C, anelamento de 55 a 60 °C,  
174 extensão de 1 min. a 72 °C, seguido por uma extensão final de 2 min. a 72 °C. Os  
175 amplicons foram visualizados em gel de agarose corados com brometo de etídio.

## 176 **Resultados**

### 177 **Fenotipagem**

178 Na população IC-1 x BRS Marataoã as cores das folhas e dos nódulos em  
179 plantas eficientes e não eficientes co-segregaram, sendo observados 128 indivíduos  
180 eficientes ( $fix^+$ ) e 46 não eficientes ( $fix^-$ ) para FBN, indicando distribuição de 3:1 ( $\chi^2 =$   
181 0.10). Na população IC-1 x BRS Pujante foi observada co-segregação, com  
182 proporções diferentes, sendo 149  $fix^+$  e 26  $fix^-$  para FBN 13:3 ( $\chi^2 = 1.74$ ), apesar de  
183 ambas as populações terem um parental em comum.

184 As médias dos caracteres NA e MSPA foram o dobro nos indivíduos  $Fix^+$ ,  
185 ocorrendo o inverso para NN em plantas  $fix^-$  e  $fix^+$  NN, enquanto para MFN os  
186 valores médios foram aproximados para plantas eficientes e não eficientes nas duas

187 populações avaliadas (Tabela 1). O NN, eficientes ou não para FBN, foi 1.5x  
188 superior na população tendo como parental o BRS Pujante, sugerindo que esse  
189 parental pode ter maior habilidade para produção de número de nódulos do que o  
190 parental BRS Marataoã (Tabela 1). Para os demais caracteres não foram observadas  
191 diferenças acentuadas entre as duas populações (Tabela 1). A amplitude para  
192 valores extremos foi semelhante nas duas populações para os caracteres  
193 analisados, exceto para NN que apresentou valores de até 184 na população IC-1 x  
194 BRS Pujante (Tabela 1). O Teste de Shapiro-Wilk apresentou pequenos valores,  
195 indicando normalidade para os dados das variáveis analisadas (Tabela 1).

196

### 197 ***Identificação de QTL e mapa de ligação***

198

199 O mapa de ligações genéticas para análises de QTLs foi construído com  
200 7212 SNPs, após filtragens para distorção e segregação e classificação dúbia entre  
201 os parentais. Os SNPs foram distribuídos em 11 grupos de ligação, abrangendo  
202 1.140,12 cM e média de intervalo de 1,2 cM (Capítulo III).

203 QTL para NA, MSPA e NN foram mapeados em região genômica de 6,6 cM,  
204 com posição de 6,8 a 13,4 cM no grupo de ligações 11, enquanto outra de 2,1 cM,  
205 na posição de 2,3 a 4,5 cM nesse mesmo grupo de ligação, foi identificado para  
206 apenas NA (Tabela 2, Fig. 1). Nos demais grupos de ligação não foram identificados  
207 QTLs, considerando o LOD score de 4,1 (Figura 2). Para o caráter MFN não foram  
208 detectados QTL nos grupos de ligação de feijão-caupi, incluindo o grupo 11 (Tabela  
209 2, Fig. 2).

210 Os QTL mapeados em conjunto para MSPA, NA e MFN estão localizados  
211 nos intervalos entre os loci dos SNPs 2\_12850/2\_24723, enquanto QTL adicional  
212 para NA está localizado no intervalo 2\_01474/2\_49466, no grupo de ligação 11 (Fig.  
213 1). Os efeitos aditivos estimados para os alelos foram de -6,3 e -1,10 g/kg para NA, -  
214 1,22 g/planta para MSPA e 3,0 para NN por planta, explicando 16,14 a 35% da  
215 variação fenotípica para NA, 49,3% da variância fenotípica para MSPA e 48% para  
216 NN. (Tabela 2).

217 O QTL para ineficiência da FBN foi validado pela genotipagem  $F_2^{PJ}$ . A  
218 validação com cinco marcadores tetra-primer ARMS-PCR, com posição de 13,24 cM

219 no grupo de ligações 11 de feijão-caupi (Tabela 3 e Fig. 1) em indivíduos da  
220 população  $F_2$  de IC-1 x BRS Pujante confirmou, em 96% das classificações para  $fix^+$   
221 e  $fix^-$ , as estimativas de QTL detectados na população  $F_2$  de IC-1 x BRS Marataoã.  
222 Esses resultados indicam o potencial dos QTL detectados no presente estudo para a  
223 seleção assistida por marcadores para desenvolvimento de cultivares eficientes e  
224 estudos evolutivos para FBN em feijão caupi.

## 225 **Discussão**

226

227 O estudo com linhas pouco eficientes na fixação de  $N_2$  é um ideotipo  
228 morfológico de grande relevância para os estudos da FBN no feijão-caupi  
229 (Pemberton, Smith e Miller, 1990; Purdom e Trese, 1995). O contraste de genótipos  
230 eficientes x não eficientes permite identificar a herança e as bases genéticas de  
231 características relacionadas à FBN, como observado na cultura da soja (Nicolás,  
232 Hungria e Arias, 2006) e ervilha (Kneen et al., 1990). No entanto, a falta de  
233 informações tem sido um fator limitante para a compreensão do controle genético da  
234 associação simbiótica em feijão-caupi e outras leguminosas de importância  
235 econômica. No presente estudo, uma linhagem ineficiente e uma cultivar eficiente na  
236 FBN foram cruzadas para obter uma população segregante  $F_2$  e realizar, de forma  
237 pioneira, análises para detecção de QTLs relacionadas a quatro caracteres da FBN  
238 em feijão-caupi.

239 A importância da FBN na produção mundial de alimentos, principalmente  
240 leguminosas de maior destaque econômico, tem sido enfatizada por várias décadas  
241 (Döbereiner, 1990). Essa associação simbiótica não é apenas benéfica para as  
242 leguminosas e bactérias, mas também é capaz de promover o crescimento e a  
243 produtividade de outras plantas em consórcio ou em cultivos seguintes (Yanni e Abd  
244 El-Fattah, 1999). Devido a esses benefícios, a habilidade de fixar  $N_2$  tem sido objeto  
245 de estudos envolvendo interações genótipo-hospedeiro (RUMJANEK et al., 2005;  
246 Alcantara et al. 2014). Essa associação tem recebido merecida importância,  
247 especialmente pelo baixo custo, redução dos danos ambientais e uma crescente  
248 demanda da qualidade nutricional do feijão-caupi (Dakora et al., 2015). Rumjanek et

249 al. (2005) estimaram que a contribuição da FBN para o feijão-caupi está na ordem  
250 de US\$ 13 milhões, somente para a região Nordeste do Brasil.

251 Dada a grande importância econômica e social, o entendimento dos  
252 mecanismos moleculares envolvidos na interação entre leguminosas e rizóbio ainda  
253 é deficiente (Kouchi et al., 2010). Para estabelecer um procedimento de avaliação da  
254 FBN por programas de melhoramento, técnicas simples, rápidas e não destrutivas  
255 baseadas em campo, como a seleção assistida molecular, devem ser  
256 implementadas, visando o desenvolvimento de cultivares com maior eficiência para  
257 FBN em feijão-caupi.

258 O método de mapeamento de QTL, usando o método de mapeamento de  
259 intervalo composto inclusivo (ICIM), leva em consideração as correlações entre as  
260 características avaliadas. Esta análise conjunta melhora o poder estatístico dos  
261 testes, a precisão da estimação dos parâmetros e permite a inferência das causas  
262 genéticas (ligação genética ou pleiotropia) da ocorrência de QTLs coincidentes  
263 (Jiang e Zeng, 1995). Das quatro características avaliadas para fixação de N<sub>2</sub> nesse  
264 estudo, três apresentaram associação significativa com um único QTL, e  
265 flanqueadas pelos marcadores SNPs 2\_12850, 2\_24723, 2\_01474 e 2\_49466. A  
266 MSPA, NN e o NA parecem ser governados por uma região genômica que segrega  
267 em bloco. No caso de QTL ligados, uma seleção baseada em marcadores  
268 moleculares poderia promover aumentos da MSPA, NN e NA, apesar da correlação  
269 negativa observada entre NN e MSPA, e NN e NA, relatada em muitos trabalhos  
270 (Hansen et al. 1993).

271 Embora houvesse muitas diferenças entre as linhas parentais no  
272 mapeamento das populações e no tipo de marcadores, nossos resultados não  
273 encontram QTLs como identificado em outros trabalhos. Em feijão comum, alguns  
274 estudos com QTL relacionados à FBN, foram publicados (Nodari et al., 1993; Tsai et  
275 al., 1998; Souza et al., 2000; Ramaekers et al. 2013; Kamfwa, Cichy e Kelly, 2015).  
276 A maioria desses estudos identificou (QTL) com foco em apenas a características  
277 relacionadas à FBN.

278 Nodari et al. (1993) foram os primeiros a relatar a identificação de quatro QTL  
279 para NN na população RIL de um cruzamento entre BAT-93 e JaloEEP558 de feijão  
280 comum, sendo o QTL responsável por 50% da variação fenotípica. Esta mesma

281 população de RIL foi utilizada para detectar QTL para NN, aplicando doses baixas e  
282 alta de nitrogênio químico (Tsai et al., 1998; Souza et al., 2000).

283 Para o total de N fixado na FBN, dois estudos identificaram QTL associadas à  
284 FBN em feijão comum (Ramaekers et al., 2013; Kamfwa, Cichy e Kelly, 2015).  
285 Ramaekers et al. (2013) realizaram análise QTL de características relacionadas à  
286 FBN em uma população (RIL) derivada de um cruzamento contrastante e avaliada  
287 em campo e casa de vegetação. Eles identificaram dois QTL em plantas cultivadas  
288 em casa de vegetação, representando até 18% da variação do QTL para N total da  
289 planta, nos grupos de ligação 1 e 4, enquanto que no ensaio de campo, apenas um  
290 QTL para porcentagem de nitrogênio derivado da atmosfera (% Ndfa) foi identificada  
291 no grupo de ligação 4. Kamfwa, Cichy e Kelly (2015) estudaram características da  
292 nodulação como MSN e NN em diferentes genótipos de feijoeiro andino. Eles  
293 relataram dois QTL, ambos estavam localizados no cromossomo 9, com uma  
294 explicação de até 12% da variabilidade para NN.

295 Em soja, Nicolás, Hungria e Arias (2006) cruzaram duas cultivares brasileiras  
296 de soja e usaram a população F<sub>2</sub> e 45 SSR para identificar duas regiões genômicas  
297 associadas ao número de nódulos (NN) e à massa de nódulos (MN). Um total de 21  
298 locos SSR foram mapeados e cada QTL contribuiu com 7,1 e 10%, respectivamente.  
299 Seis locos de marcadores localizados em três grupo de ligação MLG B2 (Satt066),  
300 MLG H/J (Satt192), MLG B1 (Satt197, Satt251 e Satt509) e outro no grupo MLG B1  
301 (Sat\_123). A MSPA e o MSN foram significativamente associadas ao loco Satt197,  
302 enquanto que o MSN e MSN/NN foram associadas ao loco Satt\_123.

303 Como citado acima, avanços importantes foram alcançados pela  
304 caracterização e mapeamento de QTL na soja e feijão comum. No entanto, estudos  
305 genéticos sobre a FBN em feijão-caupi e outras leguminosas são escassos. Houve  
306 poucos progressos no desenvolvimento de marcadores ligados a QTL úteis na  
307 seleção de características agronômicas no caupi. O progresso foi mais rápido em  
308 outras leguminosas relacionadas (como feijão comum e soja) e é possível que  
309 algumas dessas informações possam ser alavancadas, pois existe um grau  
310 significativo de sintonia entre essas leguminosas e o genoma do feijão-caupi.

311 O QTL identificado no presente estudo tem potencial para a seleção assistida  
312 por marcadores para elevar a FBN no feijão-caupi. A avaliação molecular das 175



313 plantas F<sub>2</sub> de IC-1 x BRS Pujante com tetra-primer ARMS-PCR de SNPs, detectados  
314 como QTL da FBN em IC-1 x BRS Marataoã, classificou 96% das plantas  
315 identificadas para eficiência e ineficiência, indicando o potencial da aplicação dos  
316 tetra-primer para diagnóstico em trabalhos para melhoramento da FBN em feijão-  
317 caupi. Análises de informações do genoma com o presente mapeamento QTL  
318 podem fornecer evidências sobre a função desses genes no processo FBN.

319

320

321

322 **Agradecimentos:** Os autores agradecem ao Conselho Nacional de  
323 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro. Sirando L.  
324 Seido agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
325 (Capes) pela concessão da bolsa. Carlos A. F. S. pesquisador CNPq.

326 Os autores agradecem à Purdom e Treze, pela gentil doação das sementes do  
327 mutante ineficiente IC-1.

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341 **Referências**

342 .

343 Alcantara, R. M. C. M. de et al. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares  
344 brasileiras de feijão-caupi. **Revista Ciência Agronômica**, v.45, n.1, p. 1-9,  
345 2014. doi: 10.1590/s1806-66902014000100001.

346

347 Ayisi, K. K.; Nkgapele, R. J.; Dakora, F. D. Nodule formation and function in six  
348 varieties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) grown in a nitrogen-rich field  
349 soil in South Africa. **Symbiosis**, v. 28, n. 1, p. 17–31, 2000. doi:  
350 10.5897/AJB11.674

351

352 Badiane, F.A. et. al. Genetic relationship of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties  
353 from Senegal based on SSR markers. **Genetics and Molecular Biology  
354 Research**, v. 11, n.1, p. 292-304, 2012. doi: 10.4238/2012

355

356 Bliss, F. A. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. **Plant  
357 and Soil**, v. 152, p. 71-79, 1993. doi: 10.1007/BF00016334

358

359 Bliss, F. A. Breeding for enhancement of dinitrogen potential of common bean  
360 (*Phaseolus vulgaris* L.) In. **Nitrogen Fixation and CO<sub>2</sub> Metabolism**. Eds.  
361 LUDDEN, P. W.; BURRIS, J. E. Elsevier Publishers, New York, p. 303– 310,  
362 1985.

363

364 Bliss F A. et al. Registration of five high nitrogen fixing common bean germplasm  
365 lines. **Crop Science**, v.29, p. 240–241, 1989. doi:  
366 10.2135/cropsci1991.0011183X003100030076x

367

368 Borisov, A.Y. et al. Pea (*Pisum sativum* L.) Mendelian genetics controlling  
369 development of nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. **Czech  
370 Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 36, p. 106–110, 2000.

371

372 Bourion, V. et al. Genetic dissection of nitrogen nutrition in pea through a QTL  
373 approach of root, nodule, and shoot variability. **Theoretical and Applied  
374 Genetics**, v.121, p.71-86, 2010. doi: 10.1007/s00122-010-1292-y

375

376 Dakora, F. D. et al. Food Grain Legumes: Their Contribution to Soil Fertility, Food  
377 Security, and Human Nutrition/Health in Africa. In: BRUIJIN, F. J. editor,  
378 **Biological Nitrogen Fixation**. v. 2, p.1063-1070, 2015.

379

380 Diouf, D. Recent advances in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] “omics” research  
381 for genetic improvement. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 2803-  
382 2810, 2011. doi: 10.5897/AJBx10.015

383

384 Döbereiner, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no  
385 Brasil. **Estudos Avançados**, v.4, p.144-152, 1990. doi: 10.1590/s0103-  
386 40141990000100011

387

- 388 Doyle, J. J.; Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-  
389 15, 1990.
- 390
- 391 Duc, G.; Messenger, A. Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of  
392 mutants for nodulation and nitrogen fixation. **Plant Science**, v.60, p. 207–213,  
393 1989. doi: 10.1016/0168-9452(89)90168-4
- 394
- 395 Freire Filho, F. R et al. **Produção, melhoramento genético e potencialidades do**  
396 **feijão-caupi no brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84p.
- 397
- 398 Geurts, R.; Fedorova, H.; Bisseling, T. Nod factor signaling genes and their function  
399 in the early stages of Rhizobium infection. **Current Opinion in plant biology**,  
400 v.8, n,4, p. 346-352, 2005. doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.013
- 401
- 402 Graham, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic fixation in *Phaseolus*  
403 *vulgaris* L.: A review. **Field Crops Research**, v. 4, p. 93-112, 1981. doi:  
404 10.1016/0378-4290(81)90060-5
- 405
- 406 Hansen, A.P. et al. Respiration and nitrogen fixation of hydroponically cultured  
407 *Phaseolus vulgaris* L. cv. OAC Rico and a supernodulating mutant. **Planta**, v.  
408 189, p.538-545, 1993. doi: 10.1007/bf00198217
- 409
- 410 Haser, A. et al. A mutation in *Vicia faba* results in ineffective nodules with impaired  
411 bacteroid differentiation and reduced synthesis of late nodulins. **Journal of**  
412 **Experimental Botany**, v.43, p.1397–1407, 1992. doi: 10.1093/jxb/43.11.1397
- 413
- 414 Hwang, S. et al. Genetics and mapping of quantitative traits for nodule number,  
415 weight, and size in soybean *Glycine max* (L.) Merr. **Euphytica**, v.195, p.419-  
416 434, 2014. doi: 10.1007/s10681-013-1005-0
- 417
- 418 Kamfwa, K.; Cichy, K. A.; Kelly, J. D. Genome-wide association analysis of symbiotic  
419 nitrogen fixation in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.128,  
420 p.1999-2017, 2015. doi: 10.3835/plantgenome2014.09.0059
- 421
- 422 Kneen, B. E. et al. *Sym* 13: A gene conditioning ineffective nodulation in *Pisum*  
423 *sativum*. **Plant Physiology**, v. 94, p. 899-905, 1990. doi: 10.1104/pp.94.3.899
- 424
- 425 Kouchi, H. et al. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic  
426 symbioses underground. **Plant and Cell Physiology**, v.51, p.1381 – 1397,  
427 2010. doi: 10.1093/pcp/pcq107
- 428
- 429 Jiang, C.; ZENG, Z. B. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait  
430 loci. **Genetics**, v. 140, p.1111–1127, 1995. doi: 10.1186/1471-2156-9-82
- 431
- 432 Long, S. R. *Rhizobium* genetics. **Annual Review Genetics**, v. 23, p.483-506, 1989.
- 433

- 434 Madsen, L. H. et al. The molecular network governing nodule organogenesis and  
435 infection in the model legume *Lotus japonicus*. **Nature Communications**,  
436 p. 1-10, 2010. doi: 10.1038/ncomms1009  
437
- 438 Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, S.A. **Avaliação do estado nutricional das**  
439 **plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafós. P.319, 1997. doi:  
440 10.1038/ncomms1009  
441
- 442 Marsh, J. F.; Schultze, M. Analysis of *arbuscular mycorrhizas* using symbiosis-  
443 defective plant mutants. **New Phytologist**, v. 150, n. 3, p. 525-532, 2001. doi:  
444 10.1046/j.1469-8137.2001.00140.x  
445
- 446 Muñoz-Amatriaín, M. et al., Genome resources for climate-resilient cowpea, an  
447 essential crop for food security. **The plant Journal**, v. 89, n.5, p.1042-1054,  
448 2017. doi: 10.1111/tpj.13404  
449
- 450 Nicolás, M. F.; Hungria, M.; Arias, C. A. A. Identification of quantitative trait loci  
451 controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean  
452 cultivars. **Field Crops Research**, v. 95, p. 355-366, 2006. doi:  
453 10.1016/j.fcr.2005.04.012  
454
- 455 Nodari, R. O. et al. Towards an integrated linkage map of common bean III. Mapping  
456 genetic factors controlling host bacteria interactions. **Genetics**, v. 134, p. 341  
457 – 350, 1993.  
458
- 459 Okazaki, S et al. *Rhizobium*–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two  
460 possible scenarios with or without the T3SS. **The ISME Journal**, v.10, p. 64–  
461 74, 2016. doi: 10.1038/ismej.2015.103  
462
- 463 Park, S. J.; Buttery, B. R. Inheritance of non-nodulation and ineffective nodulation  
464 mutants in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Journal of Heredity**, v. 85,  
465 p.1-3,1994. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111383  
466
- 467 Pemberton, I. J.; Smith, G. R.; Miller JR., J. C. Inheritance of ineffective nodulation in  
468 cowpea. **Crop Science**. v. 30, p.568-571, 1990. doi:  
469 10.2135/cropsci1990.0011183X003000030020x  
470
- 471 Peterson, M. A.; Barnes, D. K.; Inheritance of ineffective nodulation and non-  
472 nodulation traits in alfalfa. **Crop Science**, v. 21, p.611–616, 1981.  
473 doi:10.2135/cropsci1981.0011183X002100040033x  
474
- 475 Purdom, D.; Trese, A. T. Morphological and Molecular Characteristics of Host-  
476 Conditioned Ineffective Root Nodules in Cowpea. **Plant Physiology**, v. 109, p.  
477 239-244, 1995. doi: 10.1104/pp.109.1.239  
478

- 479 Ramaekers, L, C. H. et al. Identifying quantitative trait loci for symbiotic nitrogen  
480 fixation capacity and related traits in common bean. **Molecular Breeding**, v. 3,  
481 p.163-180, 2013. doi: 10.1007/s11032-012-9780-1  
482
- 483 Richards, R. A. Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain  
484 crops. **Journal Experimental of Botanic**, v. 51, p.447-458, 2000. doi:  
485 org/10.1093/ jexbot/51.suppl\_1.447  
486
- 487 Rumjanek, N. G. et al. Fixação Biológica de nitrogênio in: FREIRE FILHO, F. R.;  
488 LIMA, J. A. A.; VIANA, F. M. P.; RIBEIRO, V.Q. **Feijão-caupi: avanços**  
489 **tecnológicos. Teresina: Embrapa Meio-Norte**, cap. 8, p. 281-335, 2005.  
490
- 491 Santos, M. A. et al. Mapping of QTLs associated with biological nitrogen fixation traits  
492 in soybean. **Hereditas**, v. 150, p. 17-25, 2013. doi: 10.1111/j.1601-  
493 5223.2013.02275.x.  
494
- 495 Smith, G. R.; KNIGHT, W. E. Inheritance of ineffective nodulation in crimson clover.  
496 **Crop Science**, v. 24, p. 601–604, 1984. doi:10.2135/cropsci1984.0011183X00  
497 2400030040x  
498
- 499 Souza, A. A. et al. Effects of *Phaseolus vulgaris* QTL in controlling host-bacteria  
500 interaction under two levels of nitrogen fertilization. **Genetics and Molecular**  
501 **Biology**, v. 23, p. 155–161, 2000. doi: org/10.1590/S1415-  
502 47572000000100029  
503
- 504 Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. Eliane Romanato Santarém et al. 4. ed.  
505 Porto Alegre: Artmed, 2009.  
506
- 507 Tanya, P. et al. Identification of SSR markers associated with N<sub>2</sub>-fixation. **Korean**  
508 **Journal of Genetics**, v. 27, n 4, p. 351-359, 2005. doi: 10.1007/s00122-010-  
509 1442-2  
510
- 511 Timko, M.P., Ehlers, J.D.; Roberts, P.A. Cowpea In: **Pulses, Sugar and Tuber**  
512 **Crops, Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants**. KOLE, C. ed.  
513 v. 3. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p.49-67, 2007.  
514
- 515 Tsai, S. M. et al. QTL mapping for nodule number and common bacterial blight in  
516 *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v. 204, p. 135 – 145, 1998.  
517
- 518 Vance, C. et al. Plant regulation aspects of nodulation and N<sub>2</sub> fixation. **Plant Cell**  
519 **Environment**, v.11, p.413-427, july 1988. doi: 10.1111/j.1365-  
520 3040.1988.tb01365.x  
521
- 522 Yanni, Y. G.; Abd El-Fattah, F. K. Towards integrated biofertilization management with  
523 free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in  
524 the Nile Delta. **Symbiosis**, v. 27, p. 319-331, 1999.  
525

526 YE, S. et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms.  
527 **Nucleic Acids Research**, v. 29, n.17, p. 2-8, 2001.  
528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555 **Tabela 1.** Média, amplitude e teste Shapiro-Wilk (S-W) de plantas eficientes e  
 556 ineficientes para fixação biológica de nitrogênio para os caracteres nitrogênio  
 557 acumulado (NA), massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e  
 558 massa fresca de nódulos (MFN) nas populações F<sub>2</sub> de IC-1 x BRS Marataoã (n =  
 559 174) e IC-1 x BRS Pujante (n=175) fenotipadas 40 dias após emergência das  
 560 plântulas

População	Caráter	Média			Amplitude	S-W
		Plantas eficientes	Plantas ineficientes	Total		
IC-1 x BRS Marataoã	NA (g/kg)	19,01	8,87	16,3	2,52 - 35,56	0,048
	MSPA (g)	3,60	0,83	2,83	0,32 - 6,63	0,000
	NN	43,99	86,30	55,18	14 - 141	0,000
	MFN (g)	0,62	0,28	0,53	0,04 - 1,49 4,20 -	0,011
IC-1 x BRS Pujante	NA (g/kg)	15,03	7,02	13,84	30,52	0,000
	MSPA (g)	3,69	1,00	3,29	0,26 - 7,55	0,001
	NN	71,87	125,69	79,86	11 - 184	0,003
	MFN (g)	0,54	0,38	0,52	0,01 - 1,26	0,362

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575 **Tabela 2.** Grupo de ligações genéticas, posição (cM), marcadores SNPs  
 576 flangeadores, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), LOD score e efeito de aditividade  
 577 (add) para mapeamento QTL caracteres nitrogênio acumulado (NA), massa seca da  
 578 parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa fresca de nódulos (MFN) da  
 579 fixação biológica de nitrogênio em população  $F_2$  de IC-1 x BRS Marataoã.

Caráter	Grupo de ligação	de Posição (cM)	Marcadores flangearam (Esquerda/direita)	$R^2$ % <sup>a</sup>	LOD Mínimo	Add <sup>b</sup>
NA (g/kg)	11	2,3 – 4,53	2_01474/2_49466	35,10	9,3	-6,3
NA (g/kg)	11	6,8 – 13,4	2_12850/2_24723	16,14	4,5	-1,10
MSPA (g)	11	6,8 – 13,4	2_12850/2_24723	43,44	10,4	-1,22
NN	11	6,8 – 13,4	2_12850/2_24723	48,2	15,6	3,0
MFN (g)	-	-	-	-	-	-

580 <sup>a</sup> Variância fenotípica explicada por cada QTL

581 <sup>b</sup> Efeito aditivo da substituição de um alelo do BRS Marataoã por um alelo IC-1

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598



599 **Tabela 3.** Sequências dos Tetra-Primers ARMS, condições PCR e tamanho  
 600 esperado dos amplicons em validação de QTL detectados na população F<sub>2</sub> de IC-1 x  
 601 BRS Marataoã em indivíduos F<sub>2</sub> de IC-1 x BRS Pujante

602  
 603

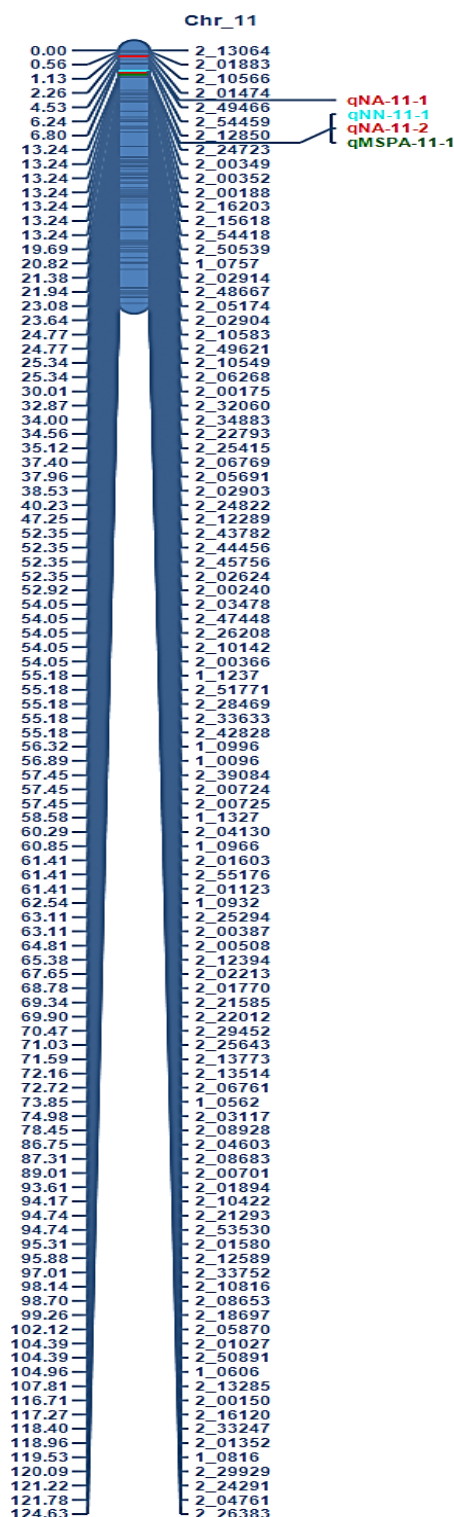
Marcador	Primer <sup>1</sup>	Concentração	T <sub>m</sub> (°C)	Anelamento (°C)	Mg <sup>2+</sup> (mM)	Amplicon (bp)	
							Sequencia (5'-3')
2_00349	FI	AACTAGATGATGTATAATCCTCTTTCTGCG	0,25	63	55	2	202
	RI	AGCAGTGCCTAAATTATGTTGACAACGT	0,25	65			
	FE	GTGTTCTTTCAGGTTTTCTTTCACCAT	1,50	64			
2_00352	RE	GGTTATGGTAGAGAGGGATGAACTTTTG	1,00	64	55	3	206
	FI	TGGCAAAGTTCTTGGAAACATTTCC	0,25	68			
	RI	AGTAATACTGTGGCACCCCCACAATA	0,10	68			
2_15618	FO	TTTTGCTTCTGCATTGCAAACTCAGTT	1,00	68	60	2,5	234
	R	AAAATATCCAACCCAGCCATGACAGAC	2,00	68			
	FI	TTTAAGATGTGGTGTGATGACTGGTA	0,25	61			
2_16203	RI	GTCCAATCTATATGTAATAATCAATCCC	0,25	61	55	3	236
	FO	GTATTGTTTGGAAACGGAGATGTATTTA	1,00	61			
	R	TTTTTCTACTTTGAACCCGTTCTAAACT	1,50	61			
2_24723	FI	TTTGATGTTATTATGATGAGATCTGCAA	0,25	62	55	2	246
	RI	ATGCCAAAAAATAGAAATAGACCAAC	0,25	62			
	FO	TTATAATGATTATACGAGCTTGTCTTGG	1,50	62			
2_24723	R	AATTACGATGTCGGAATAGTAGAGTTCC	2,00	62	55	2	223
	FI	ATGATCCTCCAGCTGAGAATTCTTGCAT	0,10	68			
	RI	TTGTAGCATGATTGAAATCAATGGAGCAG	0,10	68			
2_24723	FO	TTCATCACAGGCTACGGAGCTACAATTG	1,00	68	55	2	412
	R	AGTTGTCAGATGCATGGGAATGTAGAA	1,00	68			

604 <sup>1</sup>FI=Forward Interno, RI=Reverse Interno, FE= Forward Externo, RE=Reverse Externo

605  
 606

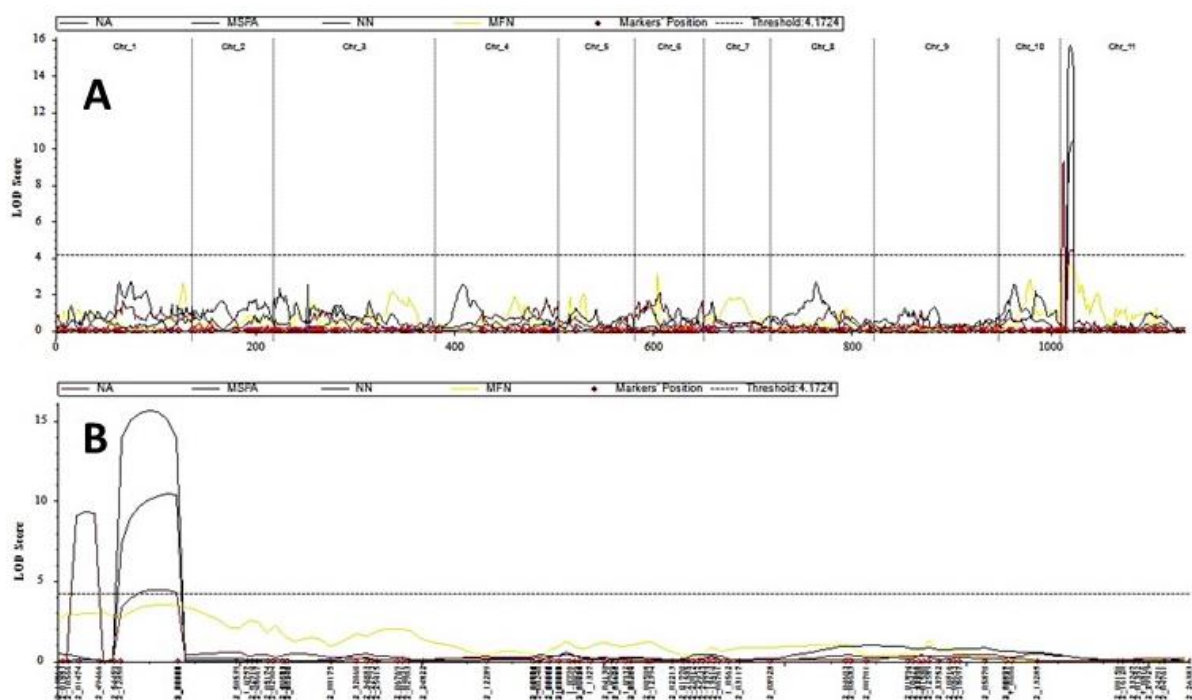
607  
 608

609



610  
611

612 **Figura 1.** Grupo de ligações genéticas 11 do feijão-caupi com mapeamento QTL  
613 para os caracteres nitrogênio acumulado (NA), massa seca da parte aérea (MSPA),  
614 número de nódulos (NN) e massa fresca de nódulos (MFN) da fixação biológica de  
615 nitrogênio em população F<sub>2</sub> de IC-1 x BRS Marataoã.



616  
617

**Figura 2.** Análise de QTL, usando o método de mapeamento de intervalo composto inclusivo (ICIM), para caracteres nitrogênio acumulado (NA), massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa fresca de nódulos (MFN) da fixação biológica de nitrogênio em população F<sub>2</sub> de IC-1 x BRS Marataoã: Painel A – Onze grupos de ligação, e B – Grupo de ligações 11 de feijão-caupi.

623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O feijão-caupi é uma cultura beneficiada com a fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada pela simbiose com bactérias nodulíferas, denominadas rizóbios. No entanto, a ausência de estudos da herança da FBN, juntamente com sua dependência ambiental, dificulta o progresso significativo no melhoramento de plantas mais eficientes na fixação de nitrogênio para o feijão-caupi. As pesquisas relatadas nesta tese foram conduzidas para investigar a variação no potencial da FBN e entender melhor a base genética da FBN no feijão-caupi.

No capítulo I “Referencial teórico”, ficou evidenciado que a FBN é um processo de sumo importância para a sustentabilidade das leguminosas, principalmente do feijão-caupi. Devido a capacidade de realizar a fixação de nitrogênio atmosférico, essa cultura possui importância como alimento básico em muitos países situados em zonas tropicais e subtropicais do mundo, com excelente perspectiva no mercado internacional. No entanto, mesmo com importância econômica e social da cultura, pouco se sabe sobre os mecanismos relacionados a FBN dessa planta. Diante dessa desafio, tentamos explorar a variação genética de características relacionada a FBN, através de dois cruzamentos contrastantes IC-1 x BRS Marataoã e IC-1x BRS Pujante em busca de resultados que permitissem o melhoramento para características relacionadas a fixação de nitrogênio da cultura.

No capítulo II, determinamos os parâmetros genéticos para orientar no desenvolvimento de cultivares eficientes na fixação de  $N_2$  no feijão-caupi. Dos cruzamentos das linhas contrastantes, foram obtidos as gerações  $F_1$ ,  $F_2$  e RCs para a determinação dos parâmetros genéticos. Os resultados mostram a possibilidade de desenvolvimentos de genótipos de feijão-caupi mais eficientes para a FBN com base na segregação transgressiva na população  $F_2$ . Os valores da herdabilidade, a presença de efeitos gênicos aditivos, número relativamente pequeno de genes e as correlações obtidas, indicam que a maior eficiência pode ser alcançada com relativa facilidade pela aplicação de métodos de melhoramento de plantas autógamas.

No capítulo III, realizamos a confecção do mapa genético para o feijão-caupi, com a genotipagem do 90 plantas  $F_2$  resultante do cruzamento IC-1 x BRS Marataoã. Nesse mapa, indentificamos marcadores ligados ao gene *cpi*, tornando

este mapa de ligações o primeiro em uma população de *V. unguiculata* segregando para característica da fixação de N<sub>2</sub>. Os marcadores identificados no presente estudo, desponta como forte candidato para uso em seleção assistida por marcadores moleculares, dada a sua maior proximidade com o gene *cpi*, da ineficiência da fixação de nitrogênio em feijão-caupi.

No capítulo IV, estimamos QTL associados a quatro caracteres relacionados com a FBN na população F<sub>2</sub>. Os SNPs detectados como QTL da FBN no cruzamento IC-1 x BRS Marataoã, foram aplicados pela método tetra-primer ARMS-PCR. Esses SNPs classificaram 96% das plantas identificadas para eficiência e ineficiência, com grande potencial de utilização em programas de seleção assistida visando melhoramento da FBN no feijão-caupi.

Análises de informações do genoma com o presente mapeamento de QTL podem fornecer evidências sobre a função desses genes no processo da FBN. Com a identificação dos genes situados dentro de regiões cromossômicas responsáveis pela expressão de caracteres complexos como a FBN, é possível a elaboração de estudos com o objetivo de avaliar a resposta dos QTLs em diferentes ambientes. Isso pode, eventualmente, resultar no desenvolvimento de cultivares melhoradas, tanto a partir de técnicas tradicionais de melhoramento quanto através da utilização de ferramentas que possibilitem a transformação genética de plantas.

Ganhos na produtividade como resultado apenas de melhoras do ambiente podem ser limitados, principalmente em regiões onde a agricultura é praticada com uso de tecnologias avançadas. No futuro, esses ganhos dependerão, principalmente, das melhorias genéticas. Assim, melhoristas precisam desenvolver e aplicar novas metodologias, visando obter maior eficiência e rapidez no desenvolvimento de cultivares potencialmente mais produtivas. Diante disso, espera-se que esse trabalho possa cumprir seus objetivos, vindo a tornar-se um guia de orientação a ser utilizados no melhoramento para aumentar a fixação de nitrogênio no feijão-caupi.

## **ANEXOS**

---



American Society of Agronomy   Crop Science Society of America   Soil Science Society of America   CSA News Contact


[My Account](#) | [Log In](#) | [Join](#) | [Renew](#)
[Advanced Search](#)
[Home](#)

## Crop Science Author Instructions

[Crop Science - Home](#)

Jump to:	General editorial links:
Scope	<a href="#">ASA-CSSA-SSSA Editorial Policies</a>
Manuscript Submission	<a href="#">ASA-CSSA-SSSA Style Manual</a>
Article Requirements	<a href="#">Policy for Appeal of Manuscript Review</a>
Publication Fees	

### Scope

*Crop Science* is the normal channel for publication of papers in plant genetics; breeding; cytology; metabolism; physiology; ecology; turfgrass; weed science; crop quality, production, and utilization; genomics, molecular genetics and biotechnology; and plant genetic resources.

Articles reporting experimentation or research in field crops or reviews or interpretation of such research will be accepted for review as papers. For research involving controlled environments, see <https://www.crops.org/files/publications/ces-guide.pdf> for guidelines. Letters to the editor are welcomed and are published subject to review and approval of the editor. When letters concern previous articles, the authors will be invited to reply; letter and reply are published together.

### Manuscript Submission

All manuscripts should be submitted through the online submission tool (<http://mc.manuscriptcentral.com/crop>). Detailed instructions can be found at this site, along with instructions related to logging on to the *Crop Science* Manuscript Central system. Submissions to *Crop Science* must not be previously published in or simultaneously submitted to any other scientific or technical journal. For the policy regarding publishing in nontechnical outlets, see the [Publications Handbook](#) and [Style Manual](#).

**Creating the manuscript file.** Submit the main text document in a common word processing file. LaTeX or other typeset formats are not accepted. Manuscript Central will convert your original files into PDF format; please check this PDF "proof" before submitting. Check any Greek characters and figures carefully. If you have a character conversion, fix your word processing file by embedding fonts (in Word, go to Tools/Options/Save tab, and check "Embed TrueType Fonts"). If there is an error in the PDF you cannot fix, mention it in the cover letter so the editors and eventually Headquarters will be aware of the problem.

**Peer review and revisions.** All manuscripts submitted undergo single blind peer review. Papers are assigned to a technical editor, who will assign an associate editor to solicit at least two reviews. After evaluating the completed reviews, the associate editor will recommend a decision to the technical editor. Authors will be prompted to provide a list of potential reviewers. These reviewers must not have a conflict of interest involving the authors or paper, and the editorial board has the right to not use any reviewers suggested by authors. See the [Editors and Reviewers information page](#) and the [Policy for Appeal of Manuscript Review](#) for additional information on review policy. All revisions to the manuscript during the review process will be made by the author only, and revisions will be given the same manuscript number, with an R number on the end (e.g., CROP-2006-04-0017-ORA.R1). Each revision has the opportunity for another round of review—the manuscript status "awaiting reviewer selection" is automatic and does not indicate a resubmission. Authors have four weeks to review and return their manuscript following reviewer and associate editor comments. Manuscripts may be released if revisions are not received, and the paper will have to be submitted as a new manuscript. The average time from submission to final decision (including revisions) is about 60 days.

### Language Editing

Particularly if English is not your first language, before submitting your manuscript you may wish to have it edited for language. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. If you would like information about one such service please contact the editorial office. Authors are liable for all costs associated with such services. A list of paid resources can be found at <https://dl.sciencesocieties.org/publications/language-help>.

### Article Requirements

Full papers must be either reports of original research, critical reviews, or interpretive articles. The journal also publishes book reviews and letters to the editor. Papers related to crop science software are accepted as original research or letters to the editor (see [guidelines](#)). Authors should follow the [ASA-CSSA-SSSA style](#) when formatting manuscripts for submission.

### Manuscript Types

*Original Research* (one to multiple pages) present novel findings that advance current knowledge on a specific research topic.

*Review and Interpretation* and *Scientific Perspectives* present interpretation of data that has largely been previously published. *Review and Interpretation* papers are longer, more comprehensive papers, and *Scientific Perspectives* are generally shorter and present a broader, more personal perspective on a single specific topic.

*Opinion and Policy* papers are topical papers on issues related to crop science.

*Letters to the Editor* are published subject to review and approval of the Editor, and provide a forum to discuss specific topics. Letters should be 300 words or less in length.

[Google Translate](#)



### Journal Links

[Author Information](#)  
[Editor/Reviewer Information](#)  
[Editorial Board](#)  
[Email Alerts](#)  
[Permissions](#)  
[Journal Usage Statistics](#)  
[Browse All Journals](#)  
[Manuscript Invoice Payment](#)

### Research Highlights

[Resistance to soybean cyst nematode critical to manage yield losses | Read More](#)

[Bioactive compounds in Brazilian Capsicum species germplasm | Read More](#)

[Developing climate-resilient wheat varieties | Read More](#)

[Wheat regional trials define agro-ecologic production zones | Read More](#)

### More Highlights

[Follow @crop\\_science](#)





Please submit the manuscript file in Word format containing the title, abstract, text, references, and tables. Please submit figures in separate files.

The submission should contain the following elements:

- Title
- Authors
- Affiliations
- Abstract
- Abbreviations list
- Text
- References list
- Figure captions
- Tables
- Figures (figures may be submitted separately as high-resolution image files in the following acceptable formats: EPS, TIF, PDF, or JPEG)
- Interpretive summary
- Cover submission (optional)

**Paper structure.** On the first page, give the title, a byline with the names of all authors, an author–paper documentation, a list of all nonstandard abbreviations used in the paper (standard abbreviations available in the style manual, <https://dl.sciencesocieties.org/publications/style>), and any other necessary footnotes. An abstract is required and is normally the second manuscript page. After the title page and abstract, the usual order of sections is an untitled introduction (which includes the literature review), Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions (optional), Acknowledgments (optional), and References, followed by any figure captions and the tables. Results and Discussion may be combined and conclusions can be given at the close of the Discussion section. Start each section (including figure captions and tables) on a new page and number all pages.

**Title and byline.** A title gives the reader a clear idea of what the article is about; it should be brief and informative. Use common names for crops and avoid abbreviations. The usual limit for titles is 10 to 12 words (not counting “and,” “of,” and similar conjunctions and prepositions). Titles in a numbered series of articles may be longer. Below the title, list the names of all authors. Place an asterisk after the name of the corresponding author (i.e., the person from whom reprints are to be requested).

**Affiliations.** The author–paper documentation is a single paragraph. The first sentence lists the authors (without professional titles) and their complete, current addresses. If a paper has only one author, or if all authors are from the same department and institution, omit the names (i.e., give the address only). The second sentence lists institutional sponsors, with the institutional article number of similar contribution acknowledgment. Add such an acknowledgment if an author has moved and using the current address leaves no other mention of the involvement of the former institution. Other information such as granting, funding, or dissertation status may follow here or in a separate acknowledgment section at the end of the paper. End the author–paper documentation paragraph with these two statements: “Received \_\_\_\_\_.” “Corresponding author (e-mail).” The date received will be filled in by an editor.

**Abstract.** Abstracts are a single self-contained paragraph of no more than 1500 characters – including word spaces – for papers or 750 characters for Notes. Abstracts should contain the rationale, objectives, methods, results, and their meaning or scope of application. Be specific. Identify the crops or organisms involved, the soil type, chemicals, and other details that are pertinent to the results. Do not cite references.

**Abbreviations.** Prepare a list in alphabetical order of abbreviations used in your article. Do not include SI units, chemical abbreviations, or most common abbreviations such as those listed in the style manual.

**Conflict of interest.** Authors should include a statement just before the References section that explains any conflicts of interest. If there are none, authors should explicitly state there are no conflicts of interest.

**References.** The author–year notation system is required; do not use numbered notation. In the list, arrange references alphabetically by author. All single-author entries precede multiple-author entries for the same first author. Use chronological order only within entries with identical authorship (alphabetizing by title for same-author, same-year entries). Add a lowercase letter a, b, c, etc. to the year to identify same-year entries for text citation. Do this also for any multiple-author entries that would otherwise result in identical citations in the text.

Reference examples:

Lewis, J.M., L. Siler, E. Souza, P.K.W. Ng, Y. Dong, G. Brown-Guedira, G.-L. Jiang, and R.W. Ward. 2010. Registration of ‘Ambassador’ wheat. *J. Plant Reg.* 4:195–204.

USDA-ARS National Genetic Resources Program. 1993. Germplasm Resources Information Network (GRIN) database. *Festuca arundinacea* Schreb. POACEAE ‘Maximize’. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, MD. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1444051> (accessed 1 Jan. 2015).

**Figures.** Submit figures in high-resolution, individual files (one figure per file). All panels of one figure need to be in the same single file and on the same page if possible. Check your figures in the PDF proof generated by Manuscript Central, as the figures in the PDF may be used for publication. TIFF or EPS files are best for resolution (don’t insert these files into a word processing document because this will reduce resolution). Width of figures should approximate desired print size, i.e., 3 ¼ inches for a one column figure, 7 inches for a two column figure. Photographs and drawings for graphs and charts should be prepared with good contrast of dark and light. Give careful attention to the width of lines and size and clarity of type and symbols. Variables (e.g., *r*, *x*, *y*) should be italicized.

A figure caption should be brief, but sufficiently detailed to tell its own story. Specify the crop or soil involved, the major variables presented, and the place and year. Identify curves or symbols in a legend within the figure itself, not in the caption. Define abbreviations in the caption. Define symbols used in the caption or in the legend. Be sure to indicate the scale for micrographs, either in the illustration or the caption.

**Tables.** Prepare tables with the tables feature in your word processor; do not use tabs, spaces, or graphics boxes. Each datum needs to be contained in an individual cell. Number tables consecutively. Table heads should be brief but complete and self-contained. Define all variables and spell out all abbreviations. Tables should be placed at the end of the main text document.



**Tables.** Prepare tables with the tables feature in your word processor; do not use tabs, spaces, or graphics boxes. Each datum needs to be contained in an individual cell. Number tables consecutively. Table heads should be brief but complete and self-contained. Define all variables and spell out all abbreviations. Tables should be placed at the end of the main text document.

**Interpretive summary.** Interpretive summaries are used to assist in assigning editors and reviewers, and for article promotion if a manuscript is accepted. Goal and general guidelines:

The goal is to draw the reader into the journal, and hopefully to your research. Summaries should be written in language that can be understood by an undergraduate student. Make the summary clear, concise, and interesting. Emphasize your one or two main findings and why they are important, rather than your methods. Avoid the use of acronyms, unless they are very common, e.g., DNA.

The summary should contain the following:

1. Manuscript number and full article title.
2. A five- to seven-word shortened title for use with the summary, in which you sum up your results in a single phrase containing a strong verb.
3. One or two sentences that explain the larger context for your work and why it is important. Try not to be too broad: For example, "In order to feed 9 billion people by 2050, agriculture must increase productivity by 70%..." or "Soil water infiltration is an important process whose behavior depends on external factors and soil properties."
4. One or two sentences that explain the problem or knowledge gap that your study addresses.
5. The sentence immediately following the problem statement should begin with a reference to your paper, followed by a brief explanation of what you did, and your one or two most important results.

2017-5-30

ScholarOne Manuscripts

Crop Science

Home

Author

Review

## Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to  
Crop Science

Manuscript ID  
CROP-2017-05-0329-ORA

Title  
Genetic analysis for efficiency of biological nitrogen fixation in cowpea

Authors  
seido, sirando  
Santos, Carlos  
Fernandes Júnior, Paulo  
Silva, Danilo  
Coeelho, Washington  
Timiko, Michael

Date Submitted  
30-May-2017

Author Dashboard



The image shows the header of a journal website. It features the logo for CBAB (Crop Breeding and Applied Biotechnology) with a green background and a DNA double helix. Below the logo is a navigation menu with links for HOME, CBAB On-Line, NEWS, and CONTACT US. The ISSN number 1984-7033 is also visible.

10 years - CBAB      CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY      ISSN: 1984-7033

Instructions for authors

The complete manuscript should comply with the following sequence: **Title, Abstract, Key words, Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, Acknowledgements, References, Tables and Figures.** The manuscript must be typed in Word for Windows, in times new roman 12 font, double spacing, format A4, with 20 mm margins and consecutive top right numbering. The double spaced text must not exceed 18 pages, including separately placed Tables and Figures (one a page) in the end of text. All the equations, models and simbols should be made in Microsoft Equation. The **Title** should be clear, concise, and express the gist of the article. It should not surpass 15 words, be typed in bold, justified, with initial upper case letters. The **Authors'** complete names, and their institutional addresses should be entered later in the proof reading. The **Abstract** should not contain more than 150 words. A maximum of 5 **Key words**, different from the title, are allowed. The **Introduction** should include a brief literature review on subject and aims of the study. **Material and Methods** must enable other researchers to repeat the experience. Preferentially, **Results and Discussion** should be presented together for easiness of reading. **Acknowledgements** should be succinct, and limited to effective co-workers and financing agencies. Be carefull about the **References**. Never cite summaries of events and theses, or any other unpublished literature. These measures will help shape a manuscript that will be a credit both to your article and to the journal. **References** cited in the text by the last name of the author and the year (for instance, Liu 1998, Pereira and Amaral Júnior 2001, William et al. 1990) are to be alphabetically listed in the item **References**, according to the following examples:

**Article in journals**  
Pereira MG and Amaral Júnior AT (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 1: 3-10.

**Book**  
Hallauer AR, Carena MJ and Miranda Filho JB (2010) **Quantitative genetics in maize breeding**. Springer, New York, 664p.

**Book chapter**  
Morais PPP and Borem A (2017) GM cultivars. In Silva FL, Borem A, Sediayama T and Ludke WH (eds) **Soybean breeding**. Springer, New York, p. 174-189.

**Congress**  
Frey KJ (1992) Plant breeding perspectives for the 1990s. In Stalker HT and Murphy JP (eds) **Proceedings of the symposium on plant breeding in the 1990s**. CAB, Wallingford, p. 1-13.

Seido,S.L. Estudos biométricos e de QTL associados à fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi

Níveis de alguns componentes do solo utilizado para o plantio em vaso do feijão-caupi.

N%	C %	Relação C/N	C. E	pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	Cu	Fe	Mn	Zn
			mS cm <sup>2</sup>		mg dm <sup>-3</sup>	cmolc dm <sup>-3</sup>							%	mg dm <sup>3</sup>				
0.05161	0.534	10.35	0.35	5.4	2.3	0.07	0.01	1.8	1.1	0.05	1.6	3	4.5	65.6	0.67	81.8	65.3	8.28