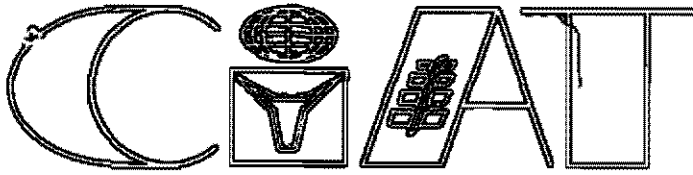


-4 FEB. 1978



Centro Internacional de Agricultura Tropical



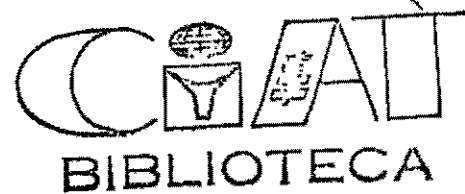
SEMINARIO
INTERNO



BIBLIOTECA

VARIACION ENTRE CULTIVARES DE Phaseolus vulgaris EN
LA FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO Y ESTRATEGIAS
PARA EL DESARROLLO DE VARIEDADES MEJORADAS CON AMPLIA FIJACION

Peter H. Graham



BIBLIOTECA

Serie SE-17-78
29 de Septiembre, 1978

44140

TITULO : VARIACION ENTRE CULTIVARES DE Phaseolus vulgaris EN LA FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO Y ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE VARIEDADES MEJORADAS CON ANPLIA FIJACION

AUTOR : PETER H. GRAHAM,
MICROBIOLOGO - PROGRAMA DE FRIJOL

INSTITUCION: C.I.A.T.

RESUMEN

La inoculación de los frijoles con Rhizobium no ha sido una alternativa viable a la fertilización nitrogenada en América Latina. Aunque la especie P. vulgaris muestra mucha variabilidad en capacidad para fijar nitrógeno simbióticamente, con algunas variedades trepadores fijando más que 40Kg. N/ha / ciclo de crecimiento, la mayoría de las variedades comerciales no responden bien a la inoculación. Esta presentación revisa el potencial para la fijación de nitrógeno en P. vulgaris y algunos de los factores que influyen en tal capacidad, y considera sistemas de mejoramiento para aumentar tazas de fijación en variedades comerciales.

INTRODUCCION

La producción de frijol en América Latina, se concentra en fincas pequeñas; frecuentemente sobre terreno pendiente y comúnmente en asociación con maíz (Aguirre & Miranda, 1973, Bazan, 1975, Londoño & Androxen, 1978). Como muestra la Tabla 1, la infertilidad del suelo, especialmente las deficiencias de N y P, es un problema común, siendo de suma importancia para los campesinos quienes tienen dificultad en obtener o comprar los fertilizantes.

criterios diferentes para la selección o para evaluar cómo mejorar variedades comerciales.

Obviamente el mejor potencial en la fijación de nitrógeno en Phaseolus vulgaris se encuentra en los frijoles volubles. Manejada bien esta capacidad al fijar nitrógeno en simbiosis, satisfacería en gran parte las necesidades de este tipo de planta para nitrógeno. En que los volubles son preferidos por los pequeños agricultores quienes frecuentemente no tienen con qué comprar fertilizantes, por los sistemas de producción del campesino debemos enfocarnos principalmente a los factores de campo capaces de limitar el potencial ya demostrado. Debemos considerar por ejemplo la calidad de los inoculantes y su suministro respectivo a los agricultores; la competencia entre cepas nativas y las inoculadas y los factores agronómicos. Hemos ya iniciado estudios sobre los efectos de densidad de la siembra (Graham y Rosas, 1978 a) asociación con maíz (Graham y Rosas 1978b) y la aplicación de fósforo (Graham y Rosas, 1978c) sobre niveles de fijación en las variedades envolventes.

Mejorando niveles de fijación en variedades arbustivas de frijol, se debe intentar a varios niveles. Parte del trabajo de mejoramiento podría ser dentro de programas existentes. En qué rendimiento es frecuentemente el gol final del mejorador, muchos viveros de leguminosas siguen siendo cultivados bajo condiciones de alta fertilización nitrogenada, suprimiendo la nodulación. No es muy sorprendente, entonces, que algunas variedades de leguminosas utilizadas en la agricultura, presenten defectos en la nodulación o en la fijación del nitrógeno. La mayoría de ellos, dan ganancias reducidas bajo condiciones normales de campo.

Ejemplos son la no-nodulación y la clorosis en la soya (Williams y Lynch, 1954; Drman et al, 1956): falta de eficiencia en la fijación de ciertos tréboles (Gibson, 1964); y dificultad en nodular Stylosanthes cv 1022 (Souto et al 1972). Tales problemas podrían ser eliminados por pruebas de rendimiento en las cuales, materiales híbridos serían crecidos bajo condiciones de fertilización nitrogenada y separadamente con la inoculación. En que varios de las fuentes de resis-

del frijol, disminuyen el suministro de carbohidratos a los nódulos y bajan niveles de fijación. Es nuestra hipótesis, aunque no ha sido probado, que esta diferencia resulto de la selección accidental de parte del agricultor por variedades, que responden mejor, a la fertilización nitrogenada.

Aunque las flores tienen poca capacidad receptiva, las vainas en desarrollo, compiten por la energía (Wardlaw 1968), limitando así la energía por la fijación (Lawn y Brun 1974; Lawrie y Wheeler, 1974). Como consecuencia, variedades tardías normalmente fijan más nitrógeno que las precoces (Hardy *et al.*, 1973; Lawn *et al.*, 1974; Hardy y Havelka (1976) han sugerido que una demora de 10 días en iniciarse esta competencia para energía, permitiría que las tasas de fijación se doblen. Hemos efectuados ensayos similares con frijol, mostrando que en estas especies, también las variedades tardías, normalmente fijan más que los precoces. En otro ensayo colaborativo efectuado en Inglaterra (Day y Graham, aún no publicado), la variedad Porillo sintético, que es conocido por ser sensible al fotoperíodo (Laing, aún no publicado) estaba creciendo bajo condiciones controladas pero con diferentes fotoperíodos. Con días largos, la floración demoró 10 días, permitiendo así no sólo mejor rendimiento sino también que la fijación se duplicó. En este ensayo, con rendimientos de más que 3000 kg/ha., el frijol adquirió todas sus necesidades nitrogenadas de la fijación.

MEJORAMIENTO DE LA PLANTA PARA AUMENTAR SU CAPACIDAD DE FIJAR NITROGENO

Cómo podemos trasladar los descubrimientos de la sección anterior hasta programas para mejorar fijación de nitrógeno en variedades comerciales de P. vulgaris. No existen muchos antecedentes. La mayoría de los estudios efectuados hasta el momento, han enfatizado la nodulación y no la fijación de nitrógeno (Nutman, 1949, 1954, 1967; Williams y Lynch, 1954; Bergersen y Nutman, 1957; Caldwell, 1966; Vest, 1970; Vest y Caldwell, 1972; Degenhardt *et al.*, 1976) Control genética de la fijación, ha sido examinada en algunos estudios (Jones y Burrows, 1963; Nicholas 1971; Hutton y Coote, 1972; Holl, 1975; Imrie, 1975; Seetin y Barnes, 1977; Abu Shakra *et al.*, 1978) pero nunca con profundidad. La mayoría de los estudios no han pasado la prueba de los materiales F₂ y normalmente el trabajo ha sido efectuado en tubo de ensayo o invernadero. No ha habido ningún esfuerzo para evaluar

En nódulos seleccionados se pudo encontrar gránulos del almidón alrededor del Phloema, pero las células infestadas, tienen poco almidón. Se estima que entre 3.2 y 17.0 mgm. de carbohidrato son consumidos por 1 mgm de nitrógeno fijado (Gibson, 1966; Minchin y Pate, 1973; Herridge y Pate, 1977; Mahon, 1977). Lo que es sorprendente en nuestros resultados es que los trepadores aparentemente reparten más de los carbohidratos totales de la planta a los nódulos que los fríjoles arbustivos. Además mantienen mejor proporción de sus carbohidratos en forma soluble. Estas observaciones no fueron posibles en los estudios citados arriba porque en la mayoría de ellos se utilizó una sola variedad y técnicas indirectas (como la sombra, defoliación, luz artificial, o injertos) para mostrar la relación entre la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno.

La Figura 3 demuestra diferencias entre cultivares en el suministro de carbohidratos a los nódulos, con el trepador P590 repartiendo a las 8 semanas casi 5% de sus carbohidratos totales a los nódulos. Este valor es más que los obtenidos con soya (Russell y Johnson, 1975), pero similar a valores publicados por arveja y la caupí (Minchin. y Pate, 1974; Herridge y Pate, 1977). Graham y Halliday(1977) examinaron dos cultivares de hábito de crecimiento diferente en dos etapas de crecimiento. Aunque ambos cultivares contuvieron más o menos iguales cantidades de carbohidratos en sus sistemas radicales, nódulos del trepador (P590) mostraron 3-100 veces el carbohidrato de la variedad arbustiva. La proporción del carbohidrato de la planta en forma soluble, también fué mejor.

Estudios recientes con plantas machos estériles de soya, (Wilson et al, 1978) confirman la importancia de la forma de carbohidrato en la fijación, mientras que Adams et al (1978) usando variedades del IBYAN de CIAT, han mostrado diferencias entre cultivares en su capacidad para movilizar reservas de carbohidratos. Claramente, esta área merece más estudios..

Diferencia en la capacidad para absorber nitrógeno combinado del suelo antes de la iniciación de la fijación, evidente en los resultados de Graham y Rosas (1977), podría también limitar la fijación de los fríjoles arbustivos. Como lo ha mostrado Small y Leonard (1969) aumentos en el contenido de nitrógeno en los tejidos

les semestrales de fijación y correlacionando tasas de fijación de nitrógeno con otras características del hospero. Graham y Rosas(1977,1978a) dan mejores detalles.

Diferencias entre cultivares en su capacidad para fijar nitrógeno, son evidentes en la Figura 1, los cultivares trepadores P590 y P717 resultaron ser claramente superiores con relación a la variedad arbústera, P635. La Tabla 2 muestra resultados similares de dos semestres de estudio (Rosas y Graham, a ser publicados). Aunque los semestres fueron algo diferentes, porque la mejor distribución de las lluvias ocurrió en el 1976B, las variedades trepadores alcanzaron las mejores tasas de fijación, mejor fijación semestral y mejor masa de los nódulos en cada semestre. En el cultivar P590 la fijación de nitrógeno, medida directamente por el contenido de nitrógeno de las semillas de lotes inoculados versus los no inoculados , superó 40Kg/ha/ciclo de crecimiento. Los valores dados aquí para la reducción de acetileno en los cultivares P590 y P498 son 2-6 veces más que los reportados antes en estas especies (Jansen y Vitosh, 1974; Franco, 1977) y son comparables con los mejores valores obtenidos con leguminosas como Vicia (Sprent y Bradford, 1977), Lupinus (Farrington et al, 1977) y soya (Hardy et al, 1973). Este se ve claramente en la Figura 2 donde he colocado las perfiles de reducción de acetileno de P590 (data de Graham y Rosas, 1977) sobre resultados obtenidos con otras leguminosas.

A qué podemos atribuir la mejor fijación de los fríjoles envolventes? Hemos separado tres factores:

1. Suministro de los carbohidratos a los nódulos.
2. Tiempo de la floración.
3. Diferencias en capacidad de absorber nitrógeno combinado del suelo.

La relación entre fijación de nitrógeno y suministro de carbohidratos a los nódulos, no es realmente nuevo. Estudios realizados con un rango de leguminosas dejan poca duda de que la disponibilidad de carbohidratos frecuentemente limita la fijación (Lawrie y Wheeler, 1973; Lawn y Brun 1974; Minchin y Pate, 1974; Streeter, 1974; Halliday, 1976; Hardy y Havelka, 1976; Mahon 1977).

etileno, una sustancia que se puede estimar con el cromatógrafo de gas. Este hecho es la base de la prueba de reducción de acetileno. En el campo nosotros sacamos las plantas del suelo, separamos la raíz del tallo y hojas, depositamos las raíces en un frasco con tapón de rosca; extraemos con una jeringa una determinada cantidad de aire y la reemplazamos por una cantidad definida de acetileno, esperamos hasta una hora y luego sacamos una muestra para ser debidamente analizada. En el cromatógrafo, la longitud del pico de etileno producido, nos permite estimar la fijación de nitrógeno durante el tiempo de la incubación. Usando esta técnica hemos logrado analizar hasta 200 muestreos en un sólo día, con una precisión más que 10^6 veces mejor que el análisis por Kjeldahl.

2. Probablemente todos ustedes conocen ya la clasificación de P. vulgaris según su hábito de crecimiento. Reconocemos 4 hábitos de los Tipos I (determinado y normalmente precoz) hasta los tipos IV (trepadores).
3. Todos los ensayos de campo reportados aquí fueron efectuados en Popayán. Para todos, la fertilización usada dependió de un previo análisis del suelo y aseguró que no tendríamos interacciones entre elementos mayores o menores y la fijación de nitrógeno.

PARAMETROS DE LA FIJACION DE NITROGENO EN P. VULGARIS

Hasta el momento hemos comparado más de 600 cultivares de P. vulgaris para diferencias en nodulación y en fijación de nitrógeno. Debo adicionar que hasta ahora ninguna de las variedades estudiadas, falló en nodular. Esto es muy diferente a lo que ha ocurrido con Pisum o Glycine (Williams & Lynch, 1954; Caldwell 1966; Vest, 1970; Holl & La Rue, 1976) y justifica nuestra preocupación con la fijación en vez de la nodulación de esta especie. Aunque la mayoría de estas evaluaciones, examinaron únicamente el peso seco de nódulos y la reducción de acetileno después de la floración, sesenta cultivares escogidos, han sido estudiados en detalle. Con estos materiales hemos hecho pruebas de reducción de acetileno semanalmente, estableciendo así perfi-

La incapacidad del frijol para satisfacer su requerimiento de nitrógeno por la vía de simbiosis con Rhizobium acentúa la importancia del problema. Aunque es fácil demostrar aumentos en el desarrollo y rendimiento del frijol después de la inoculación en condiciones del invernadero (Burton et al 1954, 1961 Aguilera 1974); la mayoría de las pruebas de campo no consiguen respuesta de la inoculación (Pessanha et al 1960, Fontes, 1972; López de Almeida et al 1973; Numez y Valdez, 1976) y frecuentemente resultan tasas muy bajas en la fijación (Franco & Dobereiner, 1967; Hardy et al 1968). Aunque algunos de estos resultados pueden ser atribuidos al uso de técnicas o diseños experimentales no adecuados, la mayoría de los agricultores ya no tienen confianza en la inoculación del frijol. En Brasil por ejemplo, país en el cual se inocula casi 100% de la soya sembrada, menos de 1% del frijol, recibe la inoculación (Araujo, 1974).

En esta charla revisaré trabajos efectuados en el CIAT desde 1974. Reconozco aquí, los trabajos duros de todo el equipo de microbiología, pero especialmente la contribución de JUAN CARLOS ROSAS, TULLIO ESCOBAR y SILVIO VITERY. En mi presentación, examinaré la variación entre cultivares de P. vulgaris en su capacidad para fijar nitrógeno en simbiosis; las propiedades del hospedero que influyen en las tasas de fijación de nitrógeno y las estrategias para el mejoramiento de la capacidad de fijar nitrógeno en variedades comerciales. El énfasis aquí será en la fijación de nitrógeno; personas interesadas en la genética de la nodulación, pueden leer los artículos escritos por Holl y LaRue (1976) and Caldwell y Vest (1977).

TECNICAS Y TERMINOS USADOS

Esperando concurrentes de diversas disciplinas, yo he intentado minimizar los términos usados. No obstante, tengo que explicar tres cosas:

1. La enzima nitrogenasa responsable de la fijación de nitrógeno, no es enzima específica. Reduce nitrógeno a amonía pero también reduce varias otras sustancias, incluyendo acetileno. En este caso se forma

tencia corrientemente usados en programas de mejoramiento del frijol, son de tipo IV y fijan bien líneas que responden a la fertilización y también a la inoculación, podrían resultar de este cambio en la metodología. Hasta el nivel posible dentro de las necesidades dictadas por las lluvias, sería conveniente en estos programas intentar reducir el énfasis dado a las variedades del hábito 1.

Programas específicamente dirigidos hasta el aumento en niveles de fijación en variedades de frijol arbustivos son también necesarios. En el único estudio de este tipo efectuado hasta el momento Seetin y Barnes (1977) mostraron que niveles de fijación en alfalfa fueron heredables pero no dieron ningún dato sobre herencia ni un número de genes involucrados. No obstante, es probable que la fijación de nitrógeno demostrará herencia métrica (poligénico) controlada por características como fueron discutidas antes.

Estamos iniciando dos programas de selección recurrente para mejorar la fijación en frijoles. Los padres a ser usados han sido identificados por su capacidad de rendir; por indicaciones de habilidad para fijar nitrógeno, por su floración tardía y adaptación. En el estudio de campo las plantas híbridas serán inoculadas y crecerán bajo condiciones deficientes en nitrógeno. La selección en el F_3 será en rendimiento final, con pruebas posiblemente destructivas de nodulación y reducción de acetileno al tiempo de la floración. En el estudio de ambiente controlado, las plantas F_1 crecerán en medios artificiales deficientes en nitrógeno y los materiales para ser cruzados, serán escogidos en base a su crecimiento y a su fijación de nitrógeno, medido por un método en vivo y no destructivo. El último sistema tiene la ventaja de permitir 3 ciclos de cruzamiento por año.

Existen todavía muchas preguntas para ser contestadas. Qué impacto tendrá la población nativa del suelo sobre la selección de variedades con amplia fijación? Seetin y Barnes (1977) utilizaron la situación competitiva de campo, pero la tendencia ha sido utilizar una sola cepa. Puede uno seleccionar materiales, proporcionando más carbohidrato a nódulos? Resultados con pepinos (McCreigh et al, 1978) sugirieron que sí es factible. Pueden ser desarrolladas variedades

eficientes en el uso de fósforo y nitrógeno, etc.? El área de mejoramiento para aumentar tazas de fijación en leguminosas de grano está únicamente iniciándose. Ofrece talvez la única solución real, al problema de fertilización nitrogenada en América Latina y no puede ser ignorada.

TABLA 1

FRECUENCIA DE LA DEFICIENCIA DE N ó P EN SUELOS
DE AMERICA LATINA

Area	Ensayos	Respuesta a :		Autores
		N	P	
América Central	110	83	73	Fassbender et al (1968)
Brasil	232	67	103	Malavolta (1972)
Venezuela	12	6	5	Barrios (1970)
Colombia	5	3	4	CIAT (1972-76)

TABLA 2

PARAMETROS DE LA FIJACION DE NITROGENO EN CULTIVARES DE *P. VULGARIS*

Cultivar	Hábito	Peso seco, nódulos (mg)	Tasa máxima de fijación ¹	Fijación total ²	SNA ³	CHO en los nódulos (mg)
P635	I	8.8	0.74	1.5	291	8.13
P417	II	23.1	7.47	6.1	323	8.35
P589	III	46.9	8.49	5.4	218	9.30
P717	IV	99.1	17.44	22.2	250	24.42
P536	I	73.4	10.0	18.2	383	5.94
P643	II	75.4	12.9	26.0	447	7.77
P498	III	118.4	32.2	34.5	431	7.33
P590	IV	545.6	37.7	78.5	355	29.20

1. $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ producido planta⁻¹ h⁻¹.
2. mol C₂H₄ producido por ciclo de crecimiento.
3. $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ producido g⁻¹ peso seco nódulo h⁻¹.

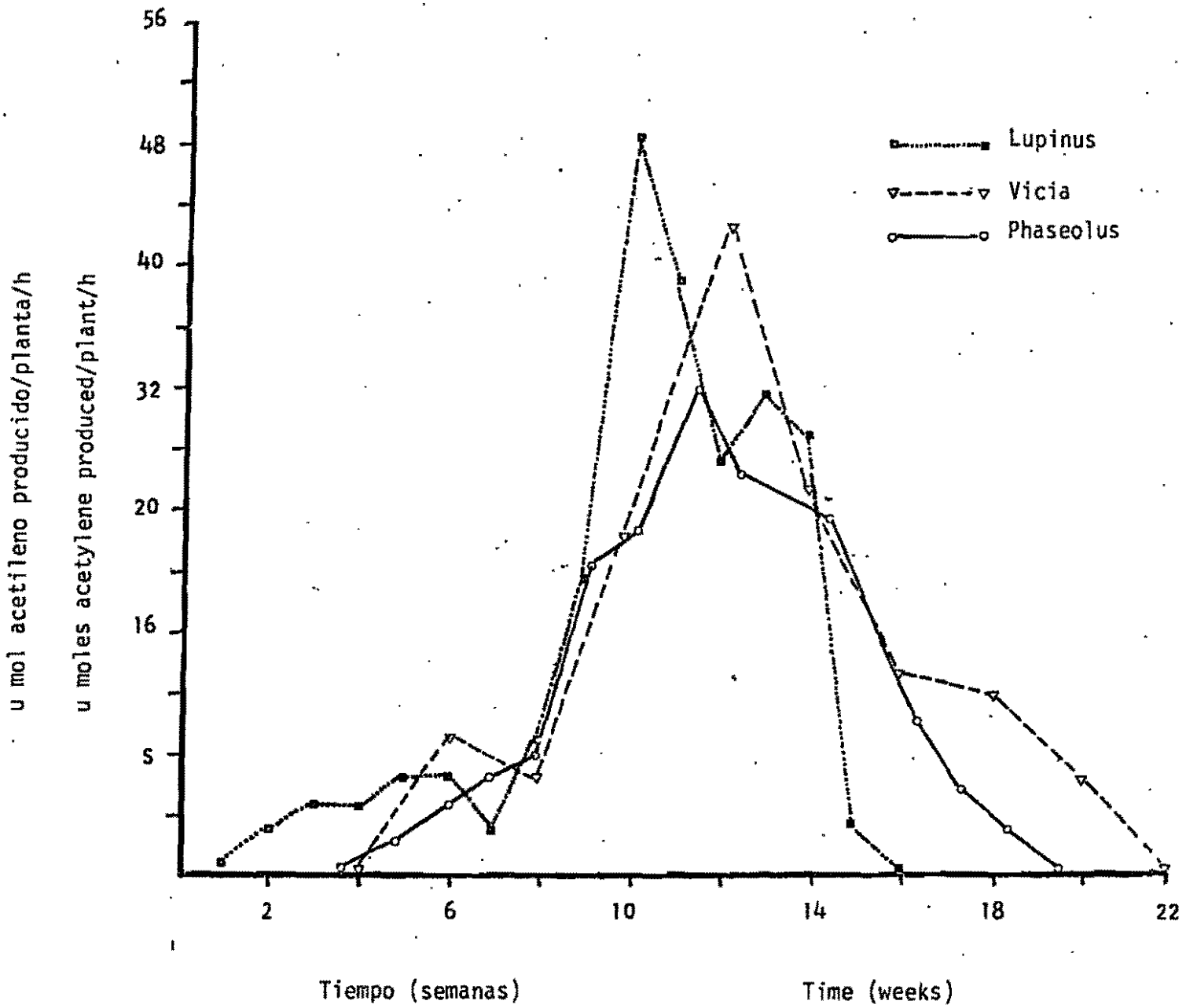


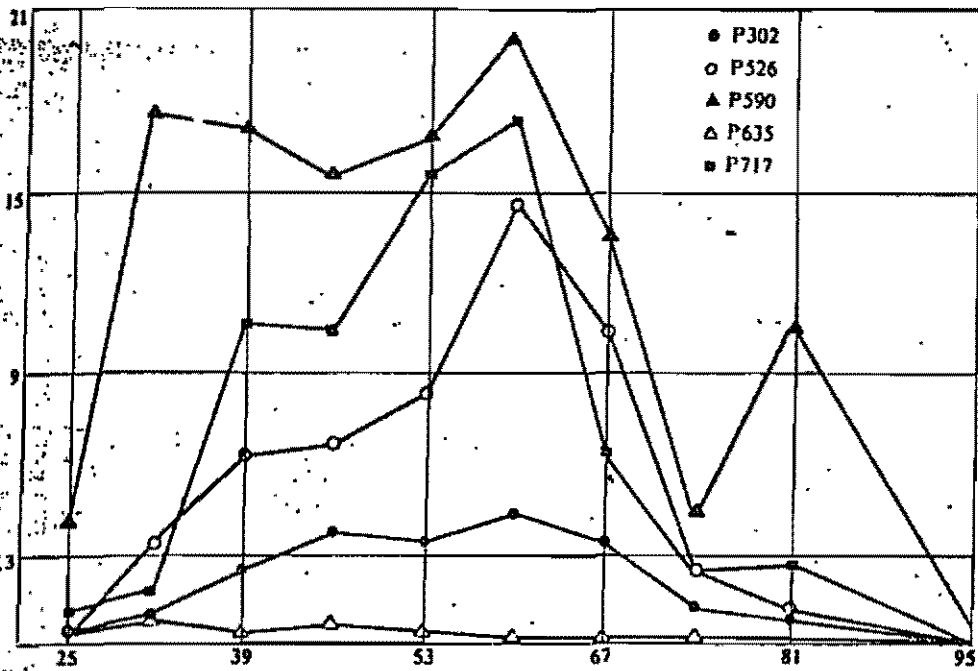
FIGURA 2 : SIMILITUD ENTRE PERFILES SEMESTRALES DE REDUCCION DE ACETILENO EN TRES ESPECIES DE LEGUMINOSAS

FIGURA 1

PERFILES DE N_2 (C_2H_2) REDUCCION EN CULTIVARES DE
P. VULGARIS DE HABITOS DE CRECIMIENTO DIFERENTE.

C_2H_4 producido ($\mu\text{mol/pl./h.}$)

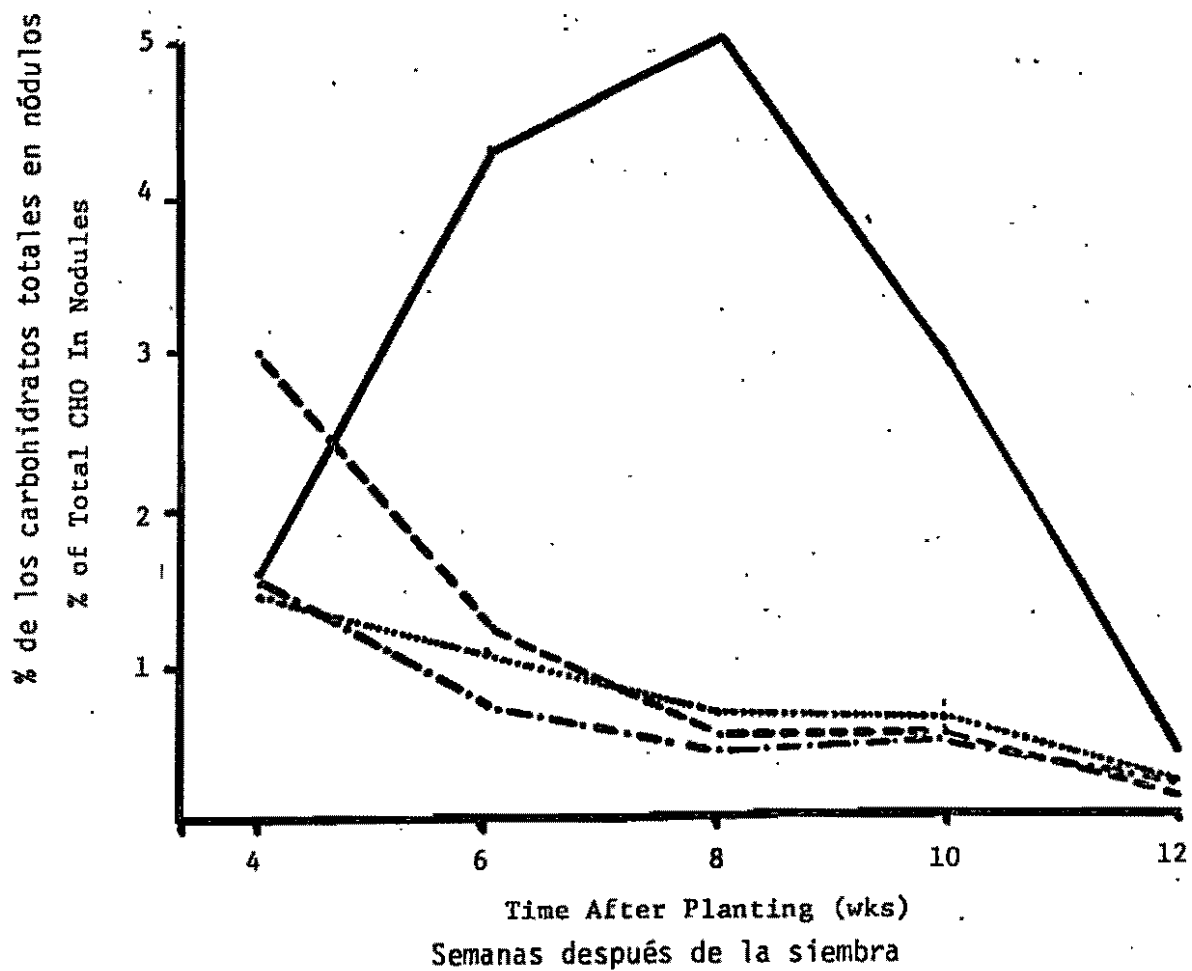
Ethylene produced ($\mu\text{mol/plant/hr}$)



Days after planting

Días después de la siembra

FIGURA 3 : PORCENTAJE DE LOS CARBOHIDRATOS TOTALES DE LA PLANTA RECUBIERTA EN LOS NODULOS DE PLANTAS DE CUATRO HABITOS DE CRECIMIENTO VARIOS TIEMPOS DESPUES DE LA SIEMBRA - (P - 590. —)



BIBLIOGRAFIA

- Abu-Shakra, S. S., Phillips, D. A. and Huffaker, R. C., 1978. Nitrogen fixation and delayed leaf senescence in soybeans. *Science* 199:973-975.
- Adams, M. W., Wiermsa, J. V., and Salazar, J., 1978. Differences in starch accumulation among dry bean cultivars. *Crop Science* 18,155-157.
- Aguilera, R. C., 1974. Evaluacion del efecto simbiotico de 14 cepas de Rhizobium phaseoli en 3 variedades mejoradas de frijol negro en Guatemala.
Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala, 38 pp.
- Aguirre, J. A. and Miranda, H., 1973. Bean production systems. In: D. Wall Ed., Potentials of field beans and other food legumes in Latin America. CIAT seminar series 2E, p. 161-187.
- Araujo, S. C., 1974. Producao de inoculantes para feijao. In; I Reuniao nacional sobre nodulacao e fixacao em Phaseolus vulgaris L. Vicosa, p. 44-48.
- Bazan, R., 1975. Nitrogen fertilization and management of grain legumes in Central America. In; E. Bornemisza and A. Alvarado, Eds. Soil Management in Tropical America. North Carolina State University, p. 228-245.
- Bergersen, F. J. and Nutman, P. S., 1957. Symbiotic effectiveness in nodulated red clover. IV. The influence of the host factors i_1 and i_e upon nodule structure and cytology. *Heredity* 11:175-184.
- Burton, J. C., Allen, O. N., and Berger, K. C., 1954. Response of bean (Phaseolus vulgaris L.) to inoculation with mixtures of effective and ineffective rhizobia. *Proceedings of the Soil Science Society of America* 18:156-159.
- , 1961. Effects of certain mineral nutrients on growth and nitrogen fixation of inoculated bean plants (Phaseolus vulgaris L.). *Agricultural Food Chemistry* 9,187-190.
- Caldwell, B. E., 1966. Inheritance of a strain specific ineffective nodulation in soybeans. *Crop Science* 6:427-428.
- Caldwell, B. E. and Vest, G., 1977. Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: The macrosymbiont. In: R. W. F. Hardy and W. S. Silver, Eds. A treatise on dinitrogen fixation. Vol. 3, 557-576. Wiley Interscience, New York.

- Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1975. Annual Report of the Bean Production Program, pp. 58.
- , 1976a. Annual Report of the Bean Production Program, pp. 83.
- , 1976b. Descriptive list of the Phaseolus spp. germplasm 1. Promising materials, pp. 54.
- , 1977. Annual Report of the Bean Production Program, in press.
- Dart, P. J., Day, J. M. and Harris, D., 1972. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. Technical Report FAO/IAEA 149:85-100.
- Degenhardt, T. L., LaRue, T. A., and Paul, E. A., 1976. Investigation of a non-nodulating cultivar of Pisum sativum. Canadian Journal of Botany 54:1633-1636.
- Erdman, L. W., Johnson, H. W., and Clark, F., 1956. A bacterial induced chlorosis in the Lee soybean. Plant Disease Reporter 40, 646.
- Farrington, P., Greenwood, E. A. N., Titmanis, Z. V., Tráinick, M. J., and Smith, D. W., 1977. Fixation, accumulation and distribution of nitrogen in a crop of Lupinus angustifolius cv. Unicrop. Australian Journal of Agricultural Research 28:238-248.
- Fassbender, H. W., 1967. La fertilisacion del frijol (Phaseolus sp.). Turrialba 17, 46-52.
- Fassbender, H. W., Muller, L., and Balerdi, F., 1968. Estudio del fosforo en suelos de America Central. II. Formasy su relacion con las plantas. Turrialba 18, 333-347.
- Fontes, L. A. N., 1972. Nota sobre efitos da aplicacao de adubo nitrogenado e fostatado, calcario e inoculante na cultura do feijao. Revista ceres 19:211-216.
- Franco, A. A., 1977. Nutritional restraints for tropical grain legume symbiosis. In: J. M. Vincent, Ed., Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture. University of Hawaii, College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publication 145, p. 237-252.
- Franco, A. A., and Dobereiner, J., 1967. Especificidad de hospedeira na symbiose con Rhizobium, feijao e influencia de diferentes nutrientes. Pesquisa agropecuaria Brasileira 2:467-474.
- , 1964. Genetic control of strain specific ineffective nodulation in Trifolium subterraneum L. Australian Journal of Agricultural Research 15:37-49.

- , 1966. The carbohydrate requirements for symbiotic nitrogen fixation: A "whole plant" growth analysis approach. Australian Journal of Biological Science 19:499-515.
- Graham, P. H., 1978. Some problems and potentials of field beans (Phaseolus vulgaris L.) in Latin America. Field Crops Research, in press.
- Graham, P. H., and Halliday, J., 1977. Inoculation and nitrogen fixation in the genus Phaseolus. In: J. M. Vincent, Ed., Exploiting the legume Rhizobium symbiosis in tropical agriculture. University of Hawaii, College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publication 145, 313-334.
- ✓Graham, P. H. and Rosas, J. C., 1977. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of Phaseolus vulgaris L. inoculated with Rhizobium. Journal of Agricultural Science, Cambridge 88:503-508.
- , 1978a. Nodule development and nitrogen fixation in cultivars of Phaseolus vulgaris L. as influenced by planting density. Journal of Agricultural Science, Cambridge 90, 19-29.
- , 1978b. Plant and nodule development and nitrogen fixation in climbing cultivars of Phaseolus vulgaris L. grown in monoculture, or associated with Zea mays L. Journal of Agricultural Science, Cambridge 90:311-317.
- , 1978c. Phosphorous fertilization and symbiotic nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris L. Submitted to Agronomy Journal.
- Halliday, J., 1976. An interpretation of seasonal and short term fluctuations in nitrogen fixation. Ph.D. Thesis, University of Western Australia.
- Hardy, R. W. F. and Havalka, U. D., 1976. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes, with emphasis on soybeans. In: P. S. Nutman, Ed., Symbiotic nitrogen fixation in higher plants. Cambridge University Press 421-439.
- Hardy, R. W. F., Burns, R. C. and Holsten, R. D., 1973. Application of the acetylene ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biology and Biochemistry 5:47-81.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. D., and Burns, R. C., 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: Laboratory and field evaluation. Plant Physiology 43:1185-1205.

- Herridge, D. F. and Pate, J. S., 1977. Utilization of net photosynthate for nitrogen fixation and protein production in an annual legume. *Plant Physiology* 60:759-764.
- Holl, F. B., 1975. Host plant control of the inheritance of dinitrogen fixation in the Pisum-Rhizobium symbiosis. *Euphytica* 24, 767-770.
- Holl, F. B. and LaRue, T. A., 1976. Genetics of legume plant hosts. In: A. Newton and E. Nyman, Eds., Proceedings of the first international symposium on nitrogen fixation. Washington State University Press, p. 391-399.
- Hutton, E. M. and Coote, J. N., 1972. Genetic variation in nodulating ability in greenleaf Desmodium. *Journal of Australian Institute of Agricultural Science* 38:68-69.
- Imrie, C., 1975. The use of agar tube culture for early selection for nodulation of Desmodium intortum. *Euphytica* 24:625-631.
- Janssen, K. A. and Vitosh, M. L., 1974. Effect of lime, sulphur and molybdenum on nitrogen fixation and yield in dary red kidney beans. *Agronomy Journal* 66:736-740.
- Jones, D. G. and Burrows, A. C., 1968. Breeding for increased nodule tissue in white clover (Trifolium repens L.). *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 71:73-79.
- Lawn, R. J. and Brun, W. A., 1974. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans I. Effect of photosynthetic source sink manipulation. *Crop Science* 14:11-16.
- Lawn, R. J., Fischer, K. S. and Brun, W. A., 1974. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. II. Interrelationship between carbon and nitrogen assimilation. *Crop Science* 14, 17-22.
- Lawrie, A. C. and Wheeler, C. T., 1973. The supply of photosynthetic assimilates to nodules of Pisum sativum L. in relation to the fixation of nitrogen. *New Phytologist* 72, 1341-1348.
- Lawrie, A. C. and Wheeler, C. T., 1974. The effects of flowering and fruit formation on the supply of photosynthetic assimilates to the nodules of Pisum sativum L. in relation to the fixation of nitrogen. *New Phytologist* 73, 1119-1127.
- Londoño, N. R. de and Andersen, P. P., 1978. Barreras a los incrementos de productividad de frijol a nivel de finca en Colombia. CIAT Technical Publication Series, in press.

- Lopes de Almeida, D.; Pessanha, G. G. and Penteado, A., 1973. Efeito da calagem e da adubacao tostada e nitrogenda no nodulacao e producao do feijoeiro (Phaseolus vulgaris),
Pesquisa Agropecuaria Brasileira 8:127-130.
- Mahon, J. D., 1977. Respiration and the energy requirement for nitrogen fixation in nodulated pea roots.
Plant Physiology 60:817-821.
- Malavolta, E., 1972. Nutricao e adubacao. In: Anais do I simposio brasileiro de feijao 1:211-242.
- McCreight, J. D., Lower, R. L. and Moll, R. H., 1978. Heritability of reducing sugar concentration in pickling cucumber fruit and its implication on methods of selection.
Journal of the American Society of Horticultural Science 103:271-274.
- Minchin, F. R. and Pate, J. S., 1973. The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules.
Journal of Experimental Botany 24, 259-271.
- Minchin, F. R. and Pate, J. S., 1974. Diurnal functioning of the legume root nodule.
Journal of Experimental Botany 25:295-308.
- Nicholas, D. B., 1971. Genotypic variation in growth and nodulation in Glycine wightii.
Journal of the Australian Institute of Agricultural Science 37:69-70.
- Nunez, R. and Valdes, M., 1976. Respuesta de dos variedades de frijol a tres inoculantes de Rhizobium en el valle de Mexico. In: Avances en la ensenanza y la investigacion, Colegio de Postgraduados, Chapingo-Mexico, 1975-1976, p. 136-137.
- Nutman, P. S., 1949. Nuclear and cytoplasmic inheritance of resistance to infection by nodule bacteria in red clover.
Heredity 3:263-291.
- , 1954. Symbiotic effectiveness in nodulated red clover. I. Variation in host and in bacteria.
Heredity 8:35-46.
- , 1967. Varietal differences in the nodulation of subterranean clover.
Australian Journal of Agricultural Research 18, 381-425.
- Pessanha, C. G., Franco, A. A., Dobereiner, J., Groszmann, A., e de Souza Britto, D. D. P., 1970. Correlagao negativa da nodulacao com o producao de feijao (Phaseolus vulgaris L.) em solos onde o N nao e fator limitante.
V. Reuniao Latinamericano de Rhizobium, Rio de Janiero p. 36-45.

- Russell, W.J. & Johnson, D.R. 1975. Translocation patterns in soybeans exposed to $^{14}\text{CO}_2$ at four different time periods of the day
Crop Science 15, 75 - 77.
- Seetin, M.W. & Barnes, D.K. 1977. Variation among alfalfa genotypes for rate of acetylene reduction
Crop. Science 17, 783 - 787.
- Small, J.G. & Leonard, D.A. 1969. Translocation of ^{14}C labelled photosynthate in nodulated legumes.
American Journal of Botany 56, 187 - 191.
- Souto S.M., Coser, A.C., & Dobereiner J. 1970. Especificidade de uma variedade native de alfalfa de nordeste (*Stylosanthes gracilis* H.B.K.) na simbiose com *Rhizobium* sp.
Proc. Vth Latin American Rhizobium Conference, Rio de Janeiro pp 78-91.
- Sprent, J.I. & Bradford, A.M. 1977. Nitrogen fixation in field beans (*Vicia faba*) as affected by population density, shading and its relation with soil moisture.
Journal of Agricultural Science (Cambridge) 88, 303 - 310.
- Streeter, J.G. 1974. Growth of two soybean shoots on a single root.
Journal of Experimental Botany 24, 189 - 198.
- Vest, G., 1970. Rj_3 , a gene controlling ineffective nodulation in soybean.
Crop Science 10, 34 - 35.
- Vest, G. & Caldwell, B.E., 1972. Rj_4 - a gene conditioning ineffective nodulation in soybean.
Crop Science 12, 692 - 693.
- Wardlaw, I.F., 1968. The control and pattern of movement of carbohydrates in plants.
Botanical Reviews 34, 79 - 125.

Williams, L.F. & Lynch, D.L. (1954) Inheritance of a non-nodulating character in the soybean.

Agronomy Journal 46, 28 - 29.

Wilson, R.F., Burton, J.W., Buck, J.A. & Brim, C.A. 1978. Studies on genetic male sterile soybeans 1. Distribution of plant carbohydrate and nitrogen during development.

Plant Physiology 61 , 838 - 841 .