

WALMA NOGUEIRA RAMOS GUIMARÃES

Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L., Fabaceae) da Coleção de Germoplasma do Departamento de Agronomia da UFRPE

Recife - PE

2005

WALMA NOGUEIRA RAMOS GUIMARÃES

Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L., Fabaceae) da Coleção de Germoplasma do Departamento de Agronomia da UFRPE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – “Melhoramento Genético de Plantas”, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas.

Orientadora: Dra. Luiza Suely Semen Martins

Co-orientador: Dr. Edson Ferreira da Silva

Recife - PE
2005

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

Guimarães, Walma Nogueira Ramos
Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava
(*Phaseolus lunatus* L., Fabaceae) da Coleção de Germoplasma do
Departamento de Agronomia da UFRPE/ Walma Nogueira Ramos Guimarães
– 2005.

74f. : il.

Orientadora: Dra. Luiza Suely Semen Martins
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universi-
dade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de
Agronomia.

Inclui referência e anexo.

1. Feijão-fava
2. *Phaseolus lunatus* L.
3. Coleção de Germoplasma
4. Melhoramento genético vegetal
5. Caracterização morfológica
6. Caracterização molecular
7. Variabilidade genética
8. RAPD
- I. Martins, Luiza Suely Semen
- II. Título

Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava
(*Phaseolus lunatus* L., Fabaceae) da Coleção de Germoplasma do
Departamento de Agronomia da UFRPE

Walma Nogueira Ramos Guimarães

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em:
____/____/____

Orientadora: _____

Dra. Luiza Suely Semem Martins
Departamento de Biologia/UFRPE

Examinadores: _____

Dr. Edson Ferreira da Silva
Departamento de Biologia/UFRPE

Dr. Francisco José de Oliveira
Departamento de Agronomia/UFRPE

Dra. Rosimar dos Santos Musser
Departamento de Agronomia/UFRPE

Recife - PE
Agosto-2005

Meta a gente busca;
Caminho a gente acha;
Desafio a gente enfrenta;

Vida a gente inventa;
Saudade a gente mata;
E sonho...a gente realiza!

À MARINA e WALTER, meus amados pais, pela dedicação, amor, paciência, estímulo e que nos momentos mais difíceis sempre estiveram ao meu lado levantando minha auto-estima, ANDRÉ, marido, por compreender que muitas vezes para alcançarmos nossos objetivos a ausência se faz presente, e aos meus queridos irmãos VIVIANY e WALTER JR. pelo companheirismo, estímulo, união e pelas dicas no computador.

OFEREÇO

Às minhas duas vidas, LUÍS FELIPE, 7 anos e LUCAS, 1 ano, meus filhos, fonte da minha inspiração, que souberam entender, com carinho, os momentos ausentes. Minha sobrinha BRUNA, 1 ano e 9 meses, a quem amo, admiro, meu xodó. Amo vocês.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e a oportunidade de desfrutar este momento tão especial e enriquecedor na minha vida profissional.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Prof. Dr. Francisco José de Oliveira, coordenador, pela paciência, sugestões e doação das sementes para execução deste trabalho.

Meu reconhecimento à querida orientadora, Profa. Dra. Luiza Suely Semen Martins, por sua competência e além de orientar neste trabalho, abriu oportunidade de desenvolvê-lo no Laboratório de Genética Molecular da UFRPE, o Genoma, um dos mais conceituados do Nordeste, me recebendo carinhosamente e ainda, agradeço por sua compreensão, paciência, carinho e amizade desfrutada por todo esse período.

Aos professores do Curso de Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas, Prof. Dr. Gerson Quirino Bastos, Profa. Dra. Luciane Vilela Rezende, Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva, Prof. Dr. Clodoaldo da Anunciação Filho, Profa. Dra. Valdevez Pontes Matos, Profa. Dra. Terezinha Câmara pelos conhecimentos, experiências transmitidas e momentos de descontração, bem como aos professores que se empenharam para realização deste curso.

À Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon, por ter me orientado desde a graduação e ter contribuído com suas sinceras palavras, amizade e carinho abrindo novamente oportunidade no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da UFPE para concluir parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva e a Profa. Dra. Rosimar dos Santos Musser por suas sugestões e contribuições para melhoria do trabalho.

À Profa. Dra. Vivian Loges pela alegria e carinho, bem como sua equipe do Laboratório de Floricultura, principalmente à Ana Cecília Ribeiro de Castro por sua preocupação, carinho e amizade.

Aos meus colegas de turma, Andreza Santos da Costa, Luiz José Tavares de Oliveira e José Severino de Lira Júnior, por compartilhar momentos alegres e tensos em sala de aula sabendo reconhecer que este processo foi mais uma etapa rumo ao grande objetivo de nos tornarmos mestres.

A Andreza Santos da Costa pela grande amizade desfrutada, pois amigos dão força, estão sempre ao nosso lado, nas conquistas e nas derrotas, nas horas boas e difíceis porque amizade não se explica, ela simplesmente acontece. E você amiga, fez tudo isso.

Aos meus queridos sogros, Carminha e Zacarias Guimarães e a Maria, pela amizade, carinho e apoio com meus filhos.

Aos Colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da UFPE: a querida amiga bióloga Kyria Bortoletti pela convivência, companhia aos congressos de genética, momentos divertidos, por sua amizade, a amiga Kleyena Arantes, Claudete Marques, Mario Correia, Cássia Gusmão, Adriano Barbosa e Jaílson Jitaí.

Aos Colegas do Laboratório de Genética e Bioquímica Profa. Tânia Falcão: Gabriela de Moraes Guerra Ferraz pela convivência, experiência de laboratório, conselhos e amizade, a Carla de Oliveira Pinheiro, Denise dos Santos Silva, Eline Waked, Marcelo de Ataíde, Ebenézer Bernardes, Fabiana Cavalcante, Isabel Martins, Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho e Profa. Dra. Roseane Cavalcante.

À graduanda em Agronomia, Gheysa Coelho da Silva, pelo carinho, acompanhamento e apoio nas anotações dos dados em campo.

Ao pessoal de apoio administrativo do Departamento de Agronomia: Elizama Maria Ferreira de Araújo Bandeira e Valéria Holanda de Melo.

Ao funcionário de campo Sr. Severino Prazeres dos Santos, pelo apoio em manter o experimento limpo.

À CAPES, pela bolsa que viabilizou os meus estudos durante esse período.

RESUMO

Os acessos de feijão-fava que compõe a Coleção de Germoplasma do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) oriundos dos Estados do Ceará, Paraíba e Pernambuco, foram caracterizados quanto às características morfológicas e moleculares (RAPD-*Random Amplified Polimorphiysm of DNA*). Na análise foram utilizados vinte e oito características morfológicas e setenta e seis locos RAPD (polimórficos e monomórficos). Na primeira etapa foi realizada a análise molecular de vinte e dois acessos para avaliar a variabilidade genética entre eles. Quatorze destes acessos foram caracterizados morfológica e molecularmente. A análise de agrupamento mostrou a formação de dois grupos principais e quatro subgrupos, constatou-se elevada variabilidade genética entre os vinte e dois acessos. Os genótipos mais próximos geneticamente foram FA-01 e FA-02, provenientes do Ceará, com grau de similaridade de 85,4% e os mais distantes foram FA-07 e FA-20, provenientes do Ceará e Pernambuco, respectivamente, com grau de similaridade de 35,9%. Quanto à caracterização morfológica dos quatorze acessos, observou-se que o genótipo FA-13 se destacou dos demais por apresentar maiores valores no peso das sementes, no número de sementes por vagem, no comprimento e largura da vagem, enquanto o genótipo FA-16 apresentou menores valores de peso de cem sementes, sementes muito pequenas, menor número de vagem por planta, menor comprimento de vagem e menor produção de semente por planta.

Palavras-chave: Feijão-fava, coleção germoplasma, caracterização morfológica, RAPD.

ABSTRACT

Twenty-two lima-beans accessions, which compound the Germoplasm Collection of the Agronomy Department of Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), coming from the States of Ceará, Paraíba and Pernambuco, Brazil, were characterized by their morphological and molecular characteristics (RAPD – *Random Amplified Polimorphiysm of DNA*). In morphological analysis twenty-four characteristics and in the molecular one were used, seventy-six locis RAPD (polymorphic and morphologic). At the first phase was carried out molecular analyses of twenty-two accessions to assess the genetic variability among them, and then, fourteen of these were morphologically and molecularly characterized. The analysis of sample showed the formation of two main groups and four subgroups. We noticed high genetic variability among the twenty-two accessions. The genetically closer genotypes were FA-01 and FA-02, coming from Ceará, with 85.4% similarity, and the less similar were FA-07 and FA-20, coming from Ceará and Pernambuco, respectively, with 35.9% similarity. Related to the morphological characterization of the fourteen accessions, noticed the genotype FA-13 stood out from the others by presenting higher values of seed weight, number of seeds per pod, length and width of pod, while the FA-16 presented lower values of weight of one hundred seeds, seeds very small, lower number of pod per plant, lower length of pod and lower production.

Key-words: Lima-beans, germoplasm colection, morphological characterization, RAPD.

SUMÁRIO

Departamento de Biologia/UFRPE.....	iv
INTRODUÇÃO.....	xlviii
Caracterização Molecular.....	li
Análise dos dados obtidos.....	liii
Caracterização Morfológica.....	liii
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	lv
Primers.....	lv
Sequências.....	lv
Monomórficas.....	lv
Total.....	lv
Totais locos.....	lvi
CONCLUSÕES.....	lxv

1. Introdução

O gênero *Phaseolus*, pertencente à família Fabaceae, é composto por, aproximadamente, 50 espécies. Das 40 espécies encontradas nas Américas, somente quatro são cultivadas: *Phaseolus vulgaris* L. (feijão-comum), *Phaseolus lunatus* L. (feijão-fava), *Phaseolus acutifolius* A. Gray (feijão-tapiri) e *Phaseolus coccineus* L. (feijão-ayocote), sendo as duas primeiras mais importantes economicamente (Lopez et al., 1985; Ramalho et al., 1993). A espécie *P. lunatus* L., também conhecida como feijão-lima ou feijão-fava, é cultivada na América do Norte, na América do Sul, na Europa, no leste e oeste da África e no sudeste da Ásia (CIAT, 1980; Rachie et al., 1980; Baudoin, 1988). Fornes Manera (1983) supõe que o feijão-fava tem como centro de origem o continente asiático.

Os Estados Unidos são considerados os maiores produtores de fava do mundo, onde o consumo se dá, principalmente, como grão verde, na forma de conserva (enlatados ou congelados e empacotados), superando o consumo na forma de grãos secos (Vieira, 1992). Nesse país, foram plantados, em 1995, cerca de 21 mil hectares de fava para processamento (Kee et al., 1997).

No Brasil, o cultivo do feijão-fava ainda tem pouca relevância, no entanto, é cultivado em todos os Estados (Vieira, 1983). Em 2003, foram produzidas, no

Brasil, 12.939 toneladas de grãos secos de fava, numa área plantada de 35.781ha, sendo a Região Nordeste a maior produtora com 12.368 ha, tendo os Estados da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe, Maranhão e Pernambuco em ordem decrescente como maiores produtores. A região Sudeste é a segunda mais produtora, tendo o Estado de Minas Gerais como único a produzir fava (IBGE, 2003).

Em muitas áreas nas regiões produtoras, o feijão-fava é uma planta hortícola, sendo semeada em horta doméstica ou junto com milho, o qual serve de suporte para a planta que apresenta hábito de crescimento vigoroso e trepador. Apesar de existirem cultivares que podem ser colhidas com 90 dias após o plantio, e que apresentam maturação uniforme, a maioria das variedades são tardias, mostrando maturação desuniforme e necessitando de mais de uma colheita (Rachie et al., 1980).

Trata-se de uma das principais leguminosas cultivadas na região tropical e apresenta potencial para fornecer proteína vegetal à população, diminuindo a dependência, quase exclusiva, dos feijões do grupo carioca (Vieira, 1992). Embora sua utilização seja relativamente menor, o feijão-fava parece ter uma capacidade de adaptação mais ampla que o feijão-comum (*P. vulgaris*). Acredita-se que as principais razões para o cultivo relativamente limitado sejam devido à tradição do consumo de feijão-comum, o paladar da fava e o seu tempo de cocção mais longo (Lymman, 1983).

A cultura do feijão-fava tem merecido pouca atenção por parte dos órgãos de pesquisa e extensão, o que tem resultado em limitado conhecimento sobre as características agrônômicas da cultura. O estudo morfológico das variedades é importante por facilitar o registro de caracteres de identificação, facilitando o acesso a esse material em busca de plantas com boa resposta em termos de produtividade e adaptação a diferentes condições ambientais (Santos et al., 2002).

Tradicionalmente, a diversidade genética em feijão tem sido avaliada por meio de marcadores morfológicos, tais como hábito de crescimento, tipo de semente, resistência a doenças e pragas (Singh et al., 1991). Entretanto, esses marcadores são afetados pela interação gênica de dominância, e

consequentemente, efeito ambiental, pleiotropia e epistasia, tornando menos estáveis suas caracterizações (Emygdio et al., 2003).

Vários autores (Nienhuis et al., 1995; Vasconcelos et al., 1996; Johns et al., 1997; Cattan-Toupance et al., 1998; Vera et al., 1999; Beebe et al., 2000; Eichenberg et al., 2000) demonstraram que marcadores RAPD são capazes de separar genótipos de feijão de acordo com o centro de domesticação. Esses marcadores têm demonstrado eficácia na avaliação da variabilidade genética dentro e entre populações de plantas e na elucidação de parentescos entre acessos dentro da mesma espécie.

Nos programas de melhoramento, a informação da diversidade genética dentro de uma espécie é essencial. É, particularmente, útil na caracterização individual dos acessos e cultivares e como guia na escolha de genitores para a realização dos cruzamentos (Loarce et al., 1996).

Bai et al. (1998) verificaram a eficiência de marcadores RAPD em detectar grau de parentesco entre genótipos de feijão, mediante análise de um esquema de cruzamentos e comparação com o coeficiente de parentesco. Utilizando marcadores RAPD, Beebe et al. (1995) constataram que feijões com sementes pretas e vermelhas, intimamente aparentados, da América Central, formam dois grupos distintos. Da mesma forma, marcadores moleculares foram eficientes na distinção de cultivares locais de feijão oriundas de um mesmo local (Puebla/México) e na distinção entre estas e as populações selvagens de feijão (González et al., 1998).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), em função da crescente necessidade de um maior empenho na resolução de problemas no melhoramento genético de plantas cultivadas, um melhor conhecimento da organização genômica e cromossômica e a caracterização de germoplasmas dessas plantas, de forma a associar marcadores genéticos às características fenotípicas, são importantes para o melhoramento genético vegetal.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de vinte e dois acessos de feijão-fava (*P. lunatus* L.) coletados nos Estados do Ceará, Paraíba e Pernambuco, que compõe a Coleção de Germoplasma do

Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, através de marcadores RAPD, bem como caracterizar quatorze desses genótipos por meio de marcadores morfológicos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 O gênero *Phaseolus*

A família Fabaceae, uma das maiores entre as dicotiledôneas, com 643 gêneros, reúne 18.000 espécies distribuídas por todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (Broughton et al., 2003).

De acordo com Melchior (1964), o gênero *Phaseolus* pertence à ordem *Rosales*, família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae*. Entretanto, Cronquist (1988) classificou-o como pertencente à subclasse *Rosidae*, ordem *Fabales* e família *Fabaceae*. As espécies do gênero *Phaseolus* são amplamente distribuídas no mundo todo e, além de cultivadas nos trópicos, também se desenvolvem em zonas temperadas dos hemisférios Norte e Sul. O número exato de espécies ainda é desconhecido (Silva e Costa, 2003). Revisões do gênero indicam que esse número pode variar de 31 a 52 espécies, todas originárias do continente americano, sendo somente cinco cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray e *P. polyanthus* Greeman (Debouck, 1991,1999).

Quanto a classificação em relação à morfologia floral, Marechal et al. (1978) reconheceram, inicialmente, três secções para o gênero: *Phaseolus*, *Alepidocalyx*

e *Minkeliersia* ; posteriormente, Delgado Salinas em 1985, citado por Debouck (1999), sugeriu quatro secções: *Chiapasana*, *Phaseolus*, com o maior número de espécies, inclusive as cultivadas, *Minkeliersia* e *Xanthotricha*. Estes agrupamentos foram, posteriormente, confirmados através de estudos baseados em polimorfismo de DNA cloroplasto e nas seqüências de DNA (Silva e Costa, 2003).

Quanto ao material biológico, Debouck (1991) classifica as espécies de *Phaseolus* em cultivadas e formas silvestres. Os ancestrais silvestres de espécies cultivadas e algumas espécies silvestres verdadeiras, são completamente distintos e estão preservados em relação ao processo de domesticação nas Américas. Segundo Brücher (1988), as formas silvestres foram descritas pela primeira vez nos Andes por Burkart em 1941, 1943 e 1952 e na Guatemala por Macbryde em 1947. Brücher (1988) ressalta ainda que os autores divergem quanto à taxonomia dessas formas: Baudet (1977) propôs que todas as formas silvestres ou espontâneas de feijão-comum deveriam ser consideradas “variedades botânicas”. Delgado Salinas (1985) classificou as formas mesoamericanas como *P. vulgaris* var *mexicanus* A. Delgado, enquanto Burkart e Brücher em 1953 consideraram as formas sul-americanas como uma subespécie de feijão-comum, *P. vulgaris* subsp. *aborigeneus* Burkart. Burkart, segundo Brücher (1988), identificou *P. vulgaris* subsp. *aborigeneus* como uma forma ancestral do feijão-comum que apresenta várias características morfológicas distintas do feijão comum cultivado como, por exemplo, diferenças na forma da folha, inflorescência, tamanho das bractéolas, forma do fruto, tamanho e cor do tegumento da semente. As duas espécies são também distintas em certos fatores fisiológicos e quimiotaxonômicos de importância agrônômica. As espécies cultivadas tem evoluído de formas silvestres e, durante esse processo, algumas mudanças marcantes, principalmente morfológicas, têm afetado as partes vegetativas e reprodutivas da planta.

O conceito de “pool gênico”, ou complexo gênico, é importante ser compreendido, pois oferece a possibilidade de estruturar a diversidade genética de forma a estimular a sua utilização. Para Morales (1995), este complexo é constituído pela informação genética encontrada em um dado momento, pelo relacionamento entre as populações das diferentes espécies de um determinado

gênero e pode ser primário, secundário e terciário. Debouck (1999) relata que a diversidade entre as espécies de *Phaseolus* em relação ao feijão-comum está organizada em *pools* gênicos primário, secundário, terciário ou quaternário. O *pool* primário compreende populações cultivadas e silvestres, sendo essas últimas os ancestrais mais próximos do feijão e distribuem-se desde o norte do México até o noroeste da Argentina (Toro et al, 1990; Singh, 2001).

De acordo com Ramalho et al. (1993), Zimmermann et al. (1996) e Santos et al. (2004) as principais características das quatro espécies (Figura 1-A) cultivadas nas Américas são:

P. vulgaris, feijão-comum, é a espécie mais utilizada, ocupando 90% da área cultivada com o gênero *Phaseolus*, sendo adaptada a áreas de temperaturas amenas e quentes, solos profundos e bem drenados. Apresenta germinação epígea, ou seja, os cotilédones emergem acima da superfície do solo e bractéolas maiores em relação a *P. lunatus* e *P. acutifolius*. As vagens são geralmente comprimidas, delgadas e graúdas e podem ter de quatro a dez sementes por vagem. É uma espécie anual e quanto ao hábito de crescimento, ocorre o tipo determinado e indeterminado (especialmente os trepadores). O peso de 100 sementes em média, é de 19,31g e quanto ao tamanho de grãos, é classificada como "médio".

P. coccineus, feijão-ayocote (Figura 1-B), é mais utilizada como ornamental e está mais adaptada a clima frio ou tropical de altitude mais elevada, sendo muito mais comum nas zonas montanhosas do México. Única espécie cujo sistema de reprodução é por alogamia e com germinação hipógea, ou seja, os cotilédones permanecendo sob a superfície do solo. Apresenta folhas maiores como também as bractéolas, o estigma sobressai da quilha e situa-se relativamente longe do ovário, em comparação com as anteras, facilitando, eventualmente a polinização cruzada, em contraste nas outras três espécies o estigma esta situado perto do ovário, com as anteras circundando-o totalmente, o que facilita a autopolinização, além do tamanho da flor ser bem maior. As inflorescências são sempre em ráculos longos, com flores aparecendo em posições opostas e alternadas com pedicelos mais longos. Nas demais espécies os racimos florais são menos longos,

com menos flores e nem sempre opostas. As vagens são comprimidas e geralmente bastante grandes, podendo ter até nove sementes por vagem. A espécie é perene podendo ter hábito de crescimento determinado ou indeterminado.

P. acutifolius, feijão-tepari, tem sementes pequenas, brancas, amarelas ou pardas. É cultivada desde o oeste do Texas até o Arizona, nos Estados Unidos, e daí até o Estado de Jalisco, no México. Apresenta germinação epígea e o primeiro par de folhas não é trifoliolado, possuindo base truncada, relativamente pequena, e pecíolo muito curto com tendência a ter folhas menores. A forma das bractéolas são pequenas e pontiagudas, as vagens são pequenas, comprimidas e com número de sementes que pode chegar a sete (comumente cinco). A espécie é anual com hábito de crescimento indeterminado.

P. lunatus, feijão-fava, é bastante cultivada, tem ampla adaptabilidade, embora se comporte melhor em climas quentes e úmidos. Yuyama (1993), em trabalhos desenvolvidos na Amazônia, encontrou diversos genótipos dessa espécie cultivados pelas diferentes tribos indígenas, constatando uma alta variabilidade quanto ao tamanho dos grãos (1 a 4 cm de comprimento) e hábito de crescimento, variando do ereto, trepadeiro ou rasteiro. Apresenta germinação epígea, as vagens podem ser facilmente distinguidas das outras espécies, pois são bastante comprimidas, com forma geralmente oblonga e recurvada.

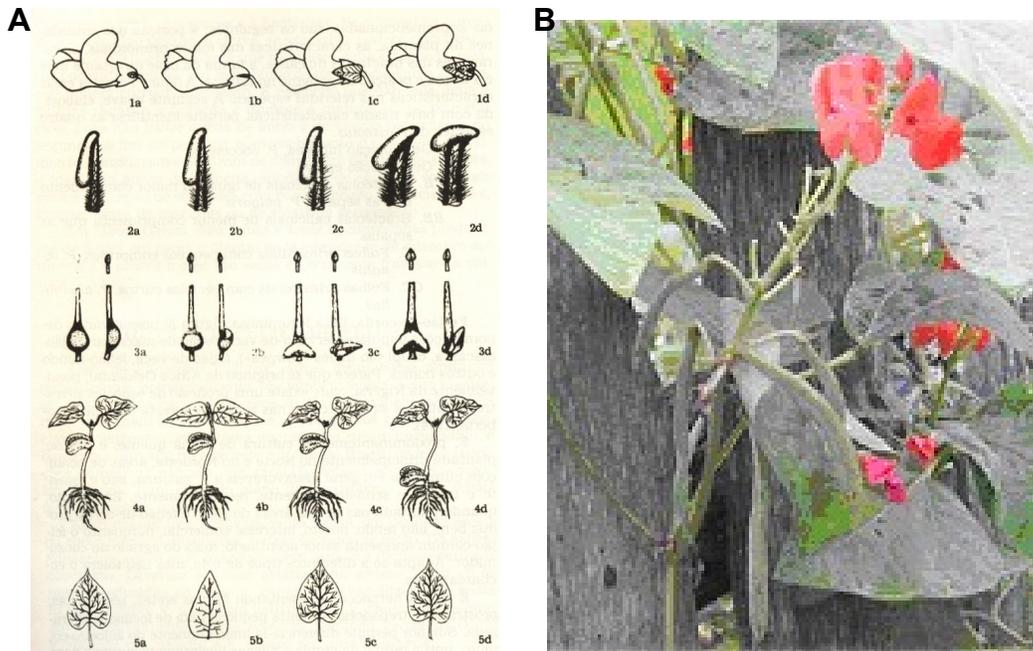


Figura 1. A- Diferenças morfológicas entre as espécies do gênero *Phaseolus*: *P. vulgaris* (1a; 2a; 3a; 4a; 5a), *P. coccineus* (1b; 2b; 3b; 4b; 5b), *P. acutifolius* (1c; 2c; 3c; 4c; 5c) e *P. lunatus* (1d; 2d; 3d; 4d; 5d); de cima para baixo (1) tamanho das bractéolas do cálice em relação ao tamanho das sépalas, (2) forma do estigma, (3) estame, (4) posição dos cotilédones na plântula, (5) folhas primordiais (Vieira, 1983); B- foto de *P. coccineus* (Floridata, 2005).

2.2 A espécie *Phaseolus lunatus* L.

2.2.1 Aspectos Botânicos

O feijão-fava pertence ao filo Magnoliophyta, à classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae, gênero *Phaseolus* e espécie *Phaseolus lunatus* L. (Cronquist, 1988). É uma planta autógama de dias curtos (Bueno et al, 2001).

A variabilidade do feijão-fava, no que diz respeito ao hábito de crescimento, é limitada, as variedades pertencem ao tipo indeterminado trepador (Figura 2-A), que caracteriza-se pelo desenvolvimento da gema terminal em uma guia, ou ao determinado anão (Figura 2-B), que se caracteriza pelo desenvolvimento completo da gema terminal em uma inflorescência, este com pouca variação quanto ao tipo de planta e ciclo biológico (Santos et al., 2002). As formas cultivadas são anuais ou perene



Figura 2. A- Acesso FA-25 de feijão-fava de hábito de crescimento indeterminado trepador; B- Acesso FA-19 de hábito de crescimento determinado anão.

A classificação do feijão-fava, segundo Rachie et al. (1980), citado por Vieira (1992), evoluiu da proposta original de Linnaeus, feita em 1753, que denominou de *P. lunatus* o tipo de grãos pequenos e achatados, e de *P. inamoenus*, o tipo de sementes grandes. Ainda de acordo com os autores anteriormente citados, Piper em 1926, concluiu que todos os tipos cultivados pertencem a uma única espécie e que o termo *P. lunatus* deveria ser usado para todas as formas. Em 1977, Baudet admitiu essa simplificação e propôs que a fava constituísse uma única espécie: *P. lunatus* L. A forma silvestre deveria chamar-se *P. lunatus* var. *lunatus*.

Em geral, as folhas são mais escuras (exceto após amadurecimento das vagens) que em outras espécies do gênero e apresentam-se sem pubescência (Zimmermann e Teixeira, 1996). Os folíolos são ovais, lanceolados ou acuminados. A inflorescência (Figura 3-A) é em forma de racimo e, algumas vezes, racimo de diferentes tamanhos, mas, geralmente, maiores que as folhas e com muitas flores. Estas possuem as mesmas variações de cores que as do feijão-comum, mas são menores. As bractéolas são arredondadas e menores que o cálice. As vagens (Figura 3-B) são achatadas, recurvadas, coreáceas, às vezes deiscentes, e terminam numa extremidade pontuda orientada na direção da sutura dorsal (Vieira, 1992).



Figura 3. A- Inflorescência; B- vagem de feijão-fava (*P. lunatus* L.).

Cada vagem contém de duas a quatro sementes rombóides, redondas ou em forma de rins. O tegumento da semente pode ser branco, verde, cinza, amarelo a marrom, róseo, vermelho, púrpuro, preto ou ainda, manchado e sarapintado. O peso de 100 sementes varia de 30 a 300 g (Vieira, 1992).

Característica marcante da fava, que a distingue facilmente de outros feijões, são as linhas que se irradiam do hilo para a região dorsal das sementes. Essas linhas não são facilmente observáveis em alguns tipos de feijão-fava. Os cotilédones são brancos ou verdes. As raízes desenvolvem-se mais que as do feijão-comum e tendem a ser tuberosas (Vieira, 1983).

2.2.2 Origem e Centro de Diversificação

Segundo Mackie (1943), o feijão-fava é originário da Guatemala, de onde se dispersou em três direções (Figura 4), possivelmente seguindo as rotas de comércio:

- ramificação Hopi – para o norte, atingindo os Estados Unidos;
- ramificação Caribe – para o leste, atingindo as Antilhas e, daí, para o norte da América do Sul; e
- ramificação Inca – para o sul, alcançando o Peru.

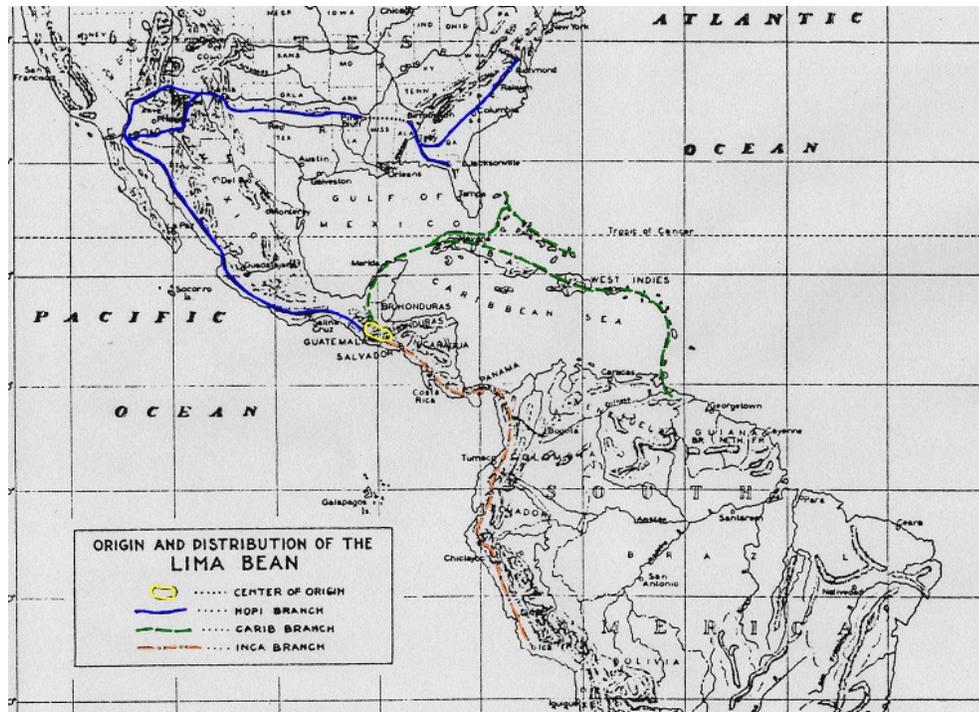


Figura 4. Linhas de dispersão do feijão-fava (*P. lunatus* L.) (Macckie, 1943).

A espécie *P. lunatus* pode ser dividida em cultigrupos, levando-se em conta as três ramificações propostas por Mackie (1943): sieva – proveniente da ramificação hopi; batata – proveniente da Caribe; lima-grande – proveniente da Inca (Baudoin, 1988).

Segundo Baudoin (1988), a hipótese de Mackie (1943) não é totalmente aceita pelas seguintes razões: as formas silvestres de feijão não se limitam à Guatemala. Sua distribuição vai do sul do México à região central da Argentina e restos de cultura foram identificados em diversos sítios arqueológicos do Novo Mundo. O cultigrupo batata, porém, só foi encontrado em escavações feitas no sudeste dos Estados Unidos. Com base nessas pressuposições, Baudoin (1988) concluiu que, no mínimo, dois cultigrupos foram independentemente domesticados em regiões diferentes.

O sieva foi domesticado na parte norte da América (México e Guatemala) e o outro, lima-grande, no Peru. Esses dois cultigrupos cruzam entre si, dando origem a progênes férteis. Eles são, entretanto, fenotipicamente distintos e, do

cruzamento entre eles, surgem, às vezes, segregantes F_2 letais, o que parece indicar um certo grau de divergência genética (Vieira, 1992).

2.2.3 Banco de Germoplasma

Bancos de Germoplasmas, mantidos por diversas Instituições de Pesquisas e Universidades do país, são de fundamental importância para programas de melhoramento genético por constituírem-se em reservatórios de recursos genéticos das espécies de interesses agrícolas (Brondani e Brondani, 2004).

Espécies cultivadas e silvestres de feijão apresentam, entre eles, grande variabilidade e, segundo Toro et al. (1990), a importância de conhecer esse germoplasma reside no fato de poder ser utilizado como fonte de resistência ou tolerância a doenças, pragas e estresses abióticos. Giacometti (1988) e Singh (2001) afirmam que a variabilidade genética só pode ser eficientemente utilizada se for devidamente avaliada e quantificada; a descrição das introduções ou acessos é uma necessidade para a manutenção e exploração do potencial das coleções.

Por volta de 1976, o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) foi designado pelo International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) para reunir, avaliar e manter uma coleção de feijão-fava (Rachie et al., 1980). No fim de 1984, existia em sua coleção 2.527 formas cultivadas de feijão-fava e 63 silvestres. Quase 70% do germoplasma de fava veio da África e da América do Norte. A contribuição da África deve-se à participação do International Institute of Tropical Agriculture (IITA), que trabalhou com essa leguminosa e cujo germoplasma foi duplicado e cedido ao CIAT (Vieira, 1992). O National Biological Institute, na Indonésia, também possui uma vasta coleção de feijão-fava. Nos Estados Unidos, Cuba, México e Filipinas encontram-se outras coleções significativas (Bettencourt et al., 1989).

No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, representada pelo seu Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão-CNPAF, localizado em Goiânia-GO, possui algumas amostras de feijão-fava. Além do CNPAF, o germoplasma de feijão-fava mantido no Centro Nacional de Recursos

Genéticos (EMBRAPA-CENARGEN) em Brasília, conta com 373 introduções (Bettencourt et al., 1989) e a Universidade Federal de Viçosa tem mais de 300 introduções (Vieira, 1992).

2.2.4 Importância econômica

O feijão-fava tem relativa importância econômica e social, por causa da sua rusticidade, que possibilita o prolongamento da colheita em período seco (Azevedo et al., 2003b). Os grãos verdes e secos, as vagens verdes e as folhas do feijão-fava podem ser consumidos pelo homem (National Academy of Sciences, 1979). Trata-se de uma das principais leguminosas cultivadas na região tropical e apresenta potencial para fornecer proteína vegetal à população, diminuindo a dependência quase exclusiva dos feijões do grupo carioca (Vieira, 1992).

Em provas de degustação efetuadas na Venezuela, Benshimol et al. (1985) verificaram que houve pouca diferença entre a aceitação do feijão-fava e a do feijão-comum, tendo sido ambos aceitos. Em Viçosa, MG, Vieira (1989) constatou melhor aceitação do feijão-comum (entre bom e muito bom), mas o feijão-fava (entre aceitável e mais que aceitável) superou o caupi, o feijão-arroz, o feijão-adzuki e o feijão-mungo-verde, quando os grãos cozidos foram servidos inteiros e/ou batidos no liquidificador. Atualmente o feijão-fava é encontrado com mais frequência na Região Nordeste, principalmente no Estado de Pernambuco, onde é servido em restaurantes como pratos principais e bares como tira-gosto. Os grãos secos contêm 62,9% de carboidratos, 25,0% de proteína e 6,1% de fibras (Bressani e Elias, 1980). O teor de proteína, porém, pode variar de 21 a 30% (McLeester et al., 1973).

Os estudos de Santos et al. (2002), utilizando oito variedades de feijão-fava, concluíram que, as variedades denominadas vulgarmente “Olho-de-ovelha” e “Orelha-de-vó” apresentaram a maior e menor produtividade média de 852 e 293kg/ha de sementes, respectivamente. As variedades com vagens de maior comprimento (89,9mm) e maior peso de 100 sementes (79,5g) foi a “Orelha-de-vó”. Apresentaram maturação precoces as variedades “Amarela-cearense”, “Olho-

de-peixe” e “Orelha-de-vó”. As variedades “Boca-de-moça”, “Branquinha”, “Mororó” e “Olho-de-ovelha” apresentaram ciclo intermediário e “Raio-de-sol” apresentou ciclo tardio. O comprimento das sementes variou de 7,8 a 17,5mm; “Orelha-de-vó” e “Raio-de-sol” foram as variedades que apresentaram os maiores comprimentos. O peso de 100 sementes variou de 32,6g (“Branquinha” e “Olho-de-peixe”) a 79,5g (“Orelha-de-vó”). Neste estudo, todas as variedades apresentaram vagens compridas, de forma oblonga e recurvada, com duas alturas distintas (ventral e dorsal) e com número de sementes variando de duas a quatro.

A produtividade máxima observada foi pouco inferior a 1.098kg/ha de grãos, verificada por Vieira e Vieira (1996), para feijão-fava consorciado com milho, em Viçosa, MG. Segundo os autores, as menores produtividades observadas tiveram como causa, em parte, o reduzido número final de plantas por unidade de área, em razão do espaçamento relativamente grande empregado. Produtividades elevadas, variando de 2.017 a 4.069kg/ha de grãos em monocultivo em Manaus, AM, foram obtidos por Yuyama (1982). Já em solo de cerrado de Brasília, DF, a média trienal de produção de feijão-fava variou de 962 a 1.673kg/ha (Araújo et al., 1975). A Tabela 1 mostra os dados de área plantada e colhida por hectare, produção em toneladas e produção em reais nos Estados do Nordeste.

Tabela 1. Área plantada, área colhida, quantidade produzida e valor da produção em (t) e (R\$) de feijão-fava, em alguns Estados do Nordeste

Estados	Área plantada (ha)	Área colhida (ha)	Produção (t)	Valor 1.000 (R\$)
Paraíba	19.678	19.243	8.646	13.842
Ceará	6.580	6.580	1.203	1.493
Rio Grande Norte	2.742	2.430	774	1.004
Piauí	2.111	2.111	632	1.046
Sergipe	1.197	1.100	447	548
Maranhão	1.130	1.130	298	541
Pernambuco	869	739	231	364

Fonte: IBGE, 2003.

2.2.5 Presença de ácido cianídrico (HCN) e terpenóides

Muitas mudanças morfológicas e fisiológicas surgiram durante a evolução da fava. As modificações mais aparentes foram aumento do tamanho das sementes,

variações na forma e na cor, mudanças de formas perenes para anuais e ciclo curto, insensibilidade ao fotoperíodo e redução no teor de substâncias tóxicas das sementes, principalmente o glicosídeo cianogênico presente (Baudoin, 1988).

Diversas espécies de plantas são potencialmente tóxicas, por conterem ácido cianídrico (HCN) por hidrólise, porém, somente o feijão-fava, dentre as leguminosas, pode contê-lo em quantidade elevada (Bressani e Elias, 1980). Por isso, o sabor amargo do feijão-fava causado pelo ácido cianídrico é característica ausente em outras espécies de feijão. Em razão do HCN formar-se nas últimas etapas de maturação da planta, os grãos consumidos ainda verdes não representam perigo (Stanton, 1966).

Em estudo de caracterização e isolamento de parte da proteína faseolina, encontrada em sementes de *P. lunatus* atacadas por *Callosobruchus maculatus*, sendo estas cultivares do Ceará obtidas em comércio, Moraes et al. (2000) sugeriram que a presença do ácido cianídrico impediu o desenvolvimento da larva de *C. maculatus*, porém os níveis de HCN não são responsáveis na resistência destas sementes ao *C. maculatus*.

A toxicidade de alguns genótipos do feijão-fava é caracterizada pelo sabor amargo. Para eliminá-lo e utilizar as sementes na alimentação humana é preciso submetê-las à cocção por três a cinco vezes, com total substituição da água utilizada (Azevedo et al, 2003b).

Azevedo et al. (2003b) avaliaram sete variedades de feijão-fava (Bege-clara, Branca, Chata e Rajada, Rajada, Bege-escuro, Preta e Pintada) quanto a presença de ácido cianídrico e observaram que as variedades Branca, Bege-clara e Rajada apresentaram maior toxicidade (115-150ppm), enquanto a Chata e Rajada apresentou menos tóxica (15-25ppm). A concentração máxima de HCN permitida para o consumo humano é de 100ppm (Rachie et al., 1980).

Arimura et al. (2000) descobriram um mecanismo químico empregado por plantas para se defenderem do ataque de predadores, trata-se de um repelente natural produzido por *P. lunatus*. Constataram que, quando atacada por ácaros, as folhas passam a produzir um composto orgânico volátil que os repele. As substâncias químicas que causam esse efeito são conhecidos como terpenóides.

Apesar de indigestos para os ácaros, eles são os responsáveis pelo sabor das plantas para o paladar humano.

Para Arimura et al. (2000), os terpenóides, além de defender a planta dos predadores, sinalizam para suas semelhantes a ocorrência de um ataque, o composto ativa genes específicos de defesa nas folhas das plantas vizinhas que passam a produzir terpenóides e evitam a abordagem das pragas, ainda detecta a presença dos ácaros e atrai seus predadores naturais na cadeia alimentar. Investigaram também o comportamento da planta quando submetida a estragos que não fossem causados pelos ácaros, constatando, nesses casos, que as plantas vizinhas parecem não responder aos sinais de alerta emitidos pelas folhas da planta deteriorada. Segundo os mesmos autores a identificação do repelente natural pode ter implicações práticas no combate a algumas pragas em lavouras.

2.3 Importância da caracterização molecular e morfológica de germoplasma

A caracterização morfológica consiste em fornecer uma identidade para cada entrada ou acesso, através do conhecimento de uma série de dados que permitam estudar a variabilidade genética de cada amostra (Ramos e Queiroz, 1999). Por conseguinte, constitui etapa fundamental para o efetivo uso dos recursos genéticos conservados em bancos de germoplasma, uma vez que mais de 200 mil acessos de diversas espécies vegetais encontram-se armazenados em bancos espalhados por todo país, sem as informações mínimas necessárias que facilitam o emprego dos mesmos em programas de melhoramento (Valls, 1988).

Estudos, visando descrever os caracteres morfológicos externos de sementes de vinte genótipos de fava oriundos dos Estados do Ceará, Paraíba e Pernambuco, foram realizados por Silva et al. (2004). O estudo morfológico de sementes de cultivares de feijão-fava é de fundamental importância, uma vez que objetiva registrar o maior número possível de caracteres que identificam a planta, dando assim, subsídios aos programas de melhoramento genético e, principalmente, que se possa aproveitar com maior eficiência o germoplasma disponível (Zimmermann e Teixeira, 1996).

O modelo fenético, também conhecido como taxonomia numérica, descreve as diferenças e semelhanças entre os organismos, baseando-se em muitas características hereditárias. Para complementar a taxonomia numérica, a filogenética leva em consideração o tempo, e se refere à classificação dos organismos tomando como base suas relações evolutivas. Este método, denominado cladística, tenta reconstruir as relações de parentesco entre grupos considerados aparentados, gerando uma escala de classificação e vem sendo aperfeiçoado ao longo do tempo, contribuindo com a organização do conhecimento sobre a diversidade biológica, a partir das relações de parentesco, e sobre a evolução das características morfológicas, comportamentais, fisiológicas, citogenéticas e moleculares dos grupos (Weising *et al.*, 1995).

Marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados (Lopes, 2002), contudo, os polimorfismos visualizados, provenientes do produto das reações de RAPD, podem ser graficamente representados na forma de árvores (dendrogramas) de base fenética ou filogenética. Estas árvores são criadas a partir de uma matriz de distância baseada em dados polarizados presença (+) ou ausência (-) para cada banda/indivíduo gerada pelos diversos *primers*, bandas fracas ou dados duvidosos são excluídos na análise (Weising *et al.*, 1995).

Os recentes avanços na área de genética molecular têm permitido a avaliação genética do germoplasma existente em diferentes espécies de interesse econômico. A tecnologia de marcadores moleculares viabiliza a caracterização genética de grande número de genótipos através de procedimentos relativamente simples e rápidos (Barbosa Neto e Bered, 1998).

Martins (1999) e Martins *et al.* (2004) observaram que os iniciadores decâmeros (*primers*) utilizados possibilitaram a discriminação de quatro genótipos estudados de *Phaseolus vulgaris* resistentes e suscetíveis ao fungo *Phaeoisariopsis griseola*, apesar da grande proximidade genética existente entre eles, confirmando a utilização dos marcadores RAPD como instrumento importante para seleção de genitores mais promissores a serem utilizados em programas de melhoramento genético.

2.4. Uso de Marcadores moleculares na caracterização de germoplasma

2.4.1. Considerações gerais

Na década de 70 surgiu um campo de pesquisa chamado “biologia molecular ou genética molecular”, sendo um dos mais marcantes desenvolvimentos genéticos e que, ainda hoje, continua tendo impacto revolucionário na biologia. Tecnologias como as de marcadores de DNA ou moleculares estão sendo cada vez mais utilizados em programas de melhoramento, com o objetivo de aumentar a eficiência de seleção e caracterização de germoplasma e a maximização dos ganhos genéticos, permitindo aos melhoristas o acesso e a seleção da variabilidade a nível de DNA (Abdelnoor et al., 1995).

Os marcadores moleculares são características de DNA, com base mendeliana, que diferenciam dois ou mais indivíduos. São moléculas de DNA ou proteínas que marcam uma região ou regiões do genoma ligada(s) a alguma característica de interesse agrônômico. Características morfológicas e agrônômicas têm a desvantagem de serem influenciadas pelos fatores do ambiente e podem não representar a real similaridade ou diferença entre os indivíduos. Por outro lado, marcadores genéticos representam estritamente a variação genética, não sofrendo influência ambiental (Weising et al., 1995).

O uso de marcadores moleculares representa uma ferramenta adicional em programas de melhoramento genético em plantas oferecendo novas possibilidades no manejo de uma coleção permitindo a comparação entre indivíduos, identificando duplicatas (Engelborhs et al., 1998), além de possibilitar a classificação do germoplasma em grupos de interesse para os diferentes programas de melhoramento. Permite, também, determinar a presença ou ausência de gene(s) ligados a características específicas para fins de melhoramento, com a vantagem de se fazer as análises antes do material ir para o campo. Com isso, diminui-se o volume de material que necessitaria de cuidados como adubação, capina, irrigação, etc., havendo redução no número de gerações de melhoramento necessárias no desenvolvimento de variedades. Atualmente há inúmeros tipos de marcadores moleculares diferenciando-se quanto à habilidade

em detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

2.4.2. Marcadores baseados em PCR

A técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”, reação em cadeia de polimerase) foi descrita em meados da década de 80 por Saiki e colaboradores (Saiki et al., 1985), que permite obter *in vitro* várias cópias de um determinado segmento de DNA. A obtenção de segmentos amplificados normalmente obedece às seguintes etapas: a) extração do DNA molde, isto é, que contém a região a ser amplificada; b) escolha do segmento a ser amplificado e obtenção de *primers* específicos para o reconhecimento desse segmento; c) amplificação que dará origem a várias cópias, fazendo-se uso de um ciclador térmico e, por fim, d) leitura do produto amplificado após eletroforese e coloração.

A reação de PCR consiste em estágios controlados de temperatura no qual são repetidas de 25 a 50 ciclos. O mix da reação é composto por: 1) DNA alvo; 2) *Primers*, que são pequenos fragmentos de DNA com fita simples com normalmente 10 pares de bases de comprimento com 50% de conteúdo dos nucleotídeos guanina e citosina; 3) *Taq* polimerase, que é a enzima isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus*; 4) Deoxinucleotídeos (dATP; dCTP; dGTP; dTTP) e, 5) Tampão de reação, usualmente contendo Tris-HCl, KCl e MgCl₂ (Williams et al., 1990).

Os resultados da PCR podem ser usados em estudos de polimorfismos em nível de DNA podendo ser detectados por vários métodos. As diferenças entre indivíduos são notadas quando se visualiza diferentes tamanhos de fragmentos de DNA entre estes. A forma como esses fragmentos são obtidos varia com o tipo de metodologia empregada (Hillis et al., 1990).

2.4.3. Fragmentos de DNA amplificados ao acaso – RAPD

Desenvolvida por Williams et al. (1990), a técnica de DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso consiste na amplificação *in vitro* de regiões de DNA flanqueadas por iniciadores (*primers*) arbitrários. Os produtos de amplificação são

separados em gel de agarose e detectados com brometo de etídeo, em luz ultravioleta e, dependem da complementaridade entre as seqüências dos *primers* e do DNA em estudo, da distância entre os *primers* e das condições de reação.

Como todas as diferenças entre os seres vivos estão gravadas no DNA, um iniciador de reação terá sua seqüência complementar a uma determinada região em um indivíduo, sendo que essa mesma região pode não existir em um outro indivíduo. Por exemplo, se um determinado genótipo confere resistência à certa doença, essa informação está impressa no DNA deste indivíduo. Um outro genótipo que não apresente a resistência, não trará gravado em seu DNA essa informação. Nessa região, então, os genomas das duas plantas serão diferentes. Um iniciador que se ligue exatamente na região que codifica para resistência a doença, amplificará fragmentos no primeiro indivíduo, mas não no segundo. Desta forma, eles serão separados pelo RAPD.

De uma maneira análoga, quando se quer determinar a diversidade genética entre indivíduos de um banco de germoplasma utilizando marcadores, o que se faz é comparar o número de regiões do genoma dos acessos que são semelhantes em relação ao número total de regiões analisadas, onde cada região corresponde a um tipo de iniciador de reação utilizado. Desta maneira, pode-se determinar com rapidez e alto grau de confiabilidade, quais indivíduos dentro de uma população são iguais, podendo eliminar as cópias, e também determinar quais os mais distantes. Estas informações são de grande utilidade para o melhorista na seleção de genitores em programas de melhoramento. Em vegetais, marcadores RAPD são utilizados em estudos de identificação de variedades triplóides em banana (Bhat e Jarret, 1995), em mapeamento de QTL (Quantitative Trait Loci) em cacau (Crouzillat et al., 1996), na caracterização de variedades em uva (Ulanovsky et al., 2002) e melância (Hawkins et al., 2001), na estimativa de diversidade genética em maçã (Oraguzie Nnadozie et al., 2001) e na identificação de genes de resistência a doenças em feijão comum (Martins et al., 2004).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), a técnica de RAPD é bastante eficiente no mapeamento de polimorfismo ligados a locos de resistência a doenças, estudo de diversidade genética, como também é muito eficiente em

tempo e mão de obra, isto graças a possibilidade de se detectar polimorfismo pela visualização direta das bandas no gel, eliminando as etapas de transferência de DNA para membranas, hibridização com sondas e autoradiografia.

A técnica de RAPD não requer o desenvolvimento de uma biblioteca de sondas, um conjunto único de *primers* arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo. Utiliza uma quantidade de DNA três vezes menor que a necessária na técnica de RFLP (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição de DNA). O custo é mais baixo do que o da técnica de RFLP, em termos de custo por dado genotípico, e se forem incluídos os gastos com a biblioteca de sondas, o RAPD é ainda mais baixo.

A principal desvantagem dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação gênica por loco, apenas um alelo é detectado, no segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Exceção feita para alelos co-dominantes, resultantes de pequenas inserções ou deleções no loco RAPD.

Marcadores moleculares são potenciais ferramentas em programas de melhoramento genético de plantas melhorando a eficiência e proporcionando maiores ganhos genéticos na cultura em estudo. Atualmente há inúmeros tipos e combinações de marcadores fazendo parte na rotina dos programas de melhoramento, sendo que a utilização de um e/ou outro marcador será, de uma maneira geral, em função do tempo para obtenção de resultados, custo e facilidade de uso (Azevedo et al. 2003a).

2.5 Melhoramento genético

Nos Estados Unidos, os processos industriais e o cultivo mecânico subsidiaram a estimulação em desenvolver variedades precoces de feijão-fava de hábito de crescimento determinado e com uniformidade de maturação, altura de planta e de tamanho de grãos. Pequenos programas de melhoramento ainda existem em várias estações de pesquisa, principalmente nas quatro maiores regiões produtoras, que são Califórnia, Delaware, Maryland e Wisconsin (Baudoin, 1988). Um dos objetivos do programa de melhoramento de feijão-fava em

Wisconsin, é desenvolver cultivares de sementes grandes. Nienhuis et al. (1995) conseguiram, através de marcadores RAPD, agrupar 65 acessos de *P. lunatus*, sendo 11 cultivados por pequenos produtores e 54 oriundos de bancos de germoplasma, por tamanho de semente e por origem geográfica.

Nos trópicos, o melhoramento dessa leguminosa não vem recebendo muita atenção. Nas zonas semi-áridas, programas foram iniciados em Madagáscar e no Peru com o cultigrupo lima-grande. Neles é dado ênfase ao desenvolvimento de variedades de grãos brancos grandes, de alta produtividade, de hábito de crescimento indeterminado e com ciclo biológico de 120 a 300 dias (Baudoin, 1988; Lioi e Galasso, 2002).

Segundo Baudoin (1988), programas de melhoramento genético do feijão-fava foram iniciados no México, Brasil, Filipinas, Zâmbia, Gana, Nigéria e Zaire. O mais importante deles foi o do IITA, na Nigéria conduzido de 1975 até 1980, quando foi desativado. Nesse programa foi demonstrado o baixo desempenho nos trópicos úmidos das variedades de hábito de crescimento determinado, originalmente desenvolvidas para as condições dos Estados Unidos. Altas produtividades foram obtidas com as variedades trepadoras dos cultigrupos sieva e batata. Ainda de acordo com Baudoin (1988), o cultigrupo lima-grande não teve desempenho satisfatório, no entanto, apresentou variedades com boa resistência ao mosaico-dourado, as quais foram utilizadas para cruzamento com variedades de alto rendimento dos outros cultigrupos.

Lyman (1983) verificou que a cor das sementes de fava não tem influência no rendimento da cultura, contrariando o que ocorre com o feijão-comum, em que as variedades do grupo preto são, geralmente, mais produtivas.

Nos programas de melhoramento genético, a informação da diversidade genética dentro de uma espécie é essencial. É particularmente útil na caracterização individual dos acessos e cultivares e como guia na escolha de genitores em programas de cruzamento (Loarce et al., 1996).

Estudos realizados com marcadores moleculares tem sido utilizados para verificar diversidade genética em *P. lunatus* L. Lioi e Galazo (2002), estudaram vinte e dois genótipos de feijão-fava oriundos de vários países divididos em: Grupo

Mesoamericano, Grupo Andino e Grupo Intermediário, mediante microssatélites (SSR- “Simple Sequence Repeats” /Seqüência Simples Repetida) e conseguiram separá-los em dois grandes grupos (Mesoamericano e Andino). Este tipo de agrupamento foi observado também por Fofana et al. (1997) e Caicedo et al. (1999), usando marcador RAPD e AFLP, respectivamente.

Há outras técnicas disponíveis, cada uma utilizando uma estratégia particular para desvendar questões de diversidade genética e evolução. Sparvoli et al. (2001) verificaram que estudos bioquímicos e de evolução da proteína lectina, presente em sementes de *P. lunatus* L., podem ser úteis na distinção dos grupos genéticos Mesoamericanos e Andinos, confirmando a hipótese de Fofana et al. (1997) e Maquet et al. (1999) sobre a origem Andina de *P. lunatus* L.

No Brasil, Oliveira et al. (2004) verificaram o comportamento do feijão-fava, cultivar “Orelha de Vó”, quando submetido a doses de fósforo (P_2O_5). Sabendo que este é um importante nutriente para as plantas e sua presença no solo promove o crescimento e eleva a produção das hortaliças, concluíram que as doses de P_2O_5 apresentaram efeitos significativos tanto na produção do feijão-fava, quanto para os teores de P disponível.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOOR, R. V.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germoplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.18, n.2, p.265-273, 1995.

ARAÚJO, M. T.; BEZERRA, V.L.N.; CRUZ, J.L. Comportamento entre cultivares de fava (*Phaseolus lunatus* L.) em solo de cerrado. **Revista de Olericultura**, Campinas, v.15, p.153-156, 1975.

ARIMURA, G.; TASHIRO, K.; KUHARA, S.; NISHIOKA, T.; OZAWA, R.; TAKABAYASHI, J. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. **Nature**, London. v.67, n.95, p.512-515, 2000.

AZEVEDO, M. de O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. de M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M.T. **Técnicas básicas em Biologia molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003a. 212p.

AZEVEDO, J. N.; FRANCO, L. J. D.; ARAUJO, R. O. C. **Composição química de sete variedades de feijão-fava**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2003b. (Comunicado Técnico, 152). 4p.

BAI, Y.; MICHALS, T. E.; PAULS, P. Determination of genetic relationships among *Phaseolus vulgaris* populations in a conical cross from RAPD marker analyses. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.4, p.395-406, 1998.

BARBOSA NETO, J. F.; BERED, F. Marcadores genéticos e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.29-40.

BAUDET. J. C. Signification taxonomique des caracteres blastogéniques dans la tribu *Papilionaceae – Phaseoleae*. **Bulletin du Botanique National de Belgique**, v.44, p.259-293. 1977.

BAUDOIN, J. P. Genetic resources, domestication and evolution of lima bean, *Phaseolus lunatus*. In: GEPTS, P. (Ed.). **Genetic resources of Phaseolus bean**. Holland: Kluwer Academic Publishers, 1988. p.393-407.

BEEBE, S. E.; OCHOA, I.; SKROACK, P.; NIENHUIS, J.; TIVANG, J. Genetic diversity among common bean breeding lines developed for Central America. **Crop Science**, Madison, v.35, p.1178-1183, 1995.

BEEBE, S.; SKROCH, W. P.; TOHMW, J.; DUQUE, M. C.; PEDRAZA, F.; NIENHUIS, J. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle America origin based on correspondence analysis of RAPD. **Crop Science**, Madison, v.40, p.264-273, 2000.

BENSHIMOL, A. L.; STEIN, R. I. de; MÁRQUEZ, C. G.; JAFFÉ, W. G. El valor bioquímico y nutricional de las semillas del haba de lima (*Phaseolus lunatus*) em comparación con las del frijol comum (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, Caracas, v.35, p.70-79, 1985.

BETTENCOURT, E.; KONOPKA, J.; DAMINIA, A. B. **Food legumes: *Arachis, Cajanus, Cicer, Lens, Lupinus, Phaseolus, Pisum, Psophocarpus, Vicia and Vigna***. London: IBPGR, 1989. 190 p.

BHAT, K. V., JARRET, R. L. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian *Musa* germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Netherlands, v.42, p.107-118, 1995.

BRESSANI, R.; ELIAS, L. G. Nutritional value of legume crops for humans and animals. In: SUMMERFIELD, R.J.; BUTING, A. H. (Ed.). **Advances in legume science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1980. p.135-155.

BRONDANI, R. V.; BRONDANI, C. Germoplasma: Base para a nova agricultura. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.35, n.207, p.70-73, 2004.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, Genève, v.252, p.55-128, 2003.

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

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, 2001. 282p.

CAICEDO, A. L.; GAITÁN, E.; DUQUE, M. C.; TORO CHICA, O.; DEBOUCK, D. G.; TOHME, J. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. **Crop Science**, Madison, v.39, p.1497-1507, 1999.

CATTAN-TOUPANCE, I.; MICHALAKIS, Y.; NEEMA, C. Genetic structure of wild bean populations in their South-Andean center of origin. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.96, p.844-851, 1998.

CIAT. **Diversidad genética de las especies cultivadas del género *Phaseolus***. Cali: [s.n], 1980. 52p.

CRONQUIST, A. **Devolution and classification of flowering plants**. New York: New York Botanical Garden, 1988. 555p.

CROUZILLAT, D.; LERCETEAU, E.; PETIARD, V.; MORERA, J.; RODRIGUEZ, H.; WALKER, D.; PHILLIPS, W.; RONNING, C.; SCHNELL, R.; OSEI, J.; FRITZ, P. *Theobroma cacao* L.: a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.93, p.205-214, 1996.

DEBOUCK, D. G. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. In: SINGH, S. P. (Ed.) **Common beans improvement in the twenty-first century**. Dordrecht: Kluwer, 1999. p.25-52.

DEBOUCK, D. G. Systematics and morphology. In: SCHOONHOVEN, A. Van; VOYSEST, O. (Ed.) **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. p. 55-118.

DELGADO-SALINAS, A. **Systematics of the genus Phaseolus (Leguminosae) in north and central America**. 1985. Tese – University of Texas, USA.

EICHENBERG, K.; GUGERLI, F.; SCHNELLER, J. J. Morphological and molecular diversity of swiss common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L. Fabaceae) and their origin. **Botanica Helvetica**, Basel, v.110, n.1, p.61-67, 2000.

EMYGDIO, B. M.; ANTUNES, I. F.; NEDEL, J. L.; CHOER, E. Diversidade genética em cultivares locais e comerciais de feijão baseada em marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.10, 2003.

ENGELBORGHIS, I., SWENNEN, R., VAN CAMPENHOUT, S. Capacidad del AFLP para detectar diferencias genéticas y variantes somaclonales en *Musa* spp. **Infomusa**, Montpellier, v.76, n.2, p.3-6, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p. FLORIDATA. *Phaseolus coccineus*. Disponível em:<http://www.floridata.com/main_fr.cfm?state=ref_master&viewsc=lists/plists.cfm?list=type> Acesso em 15 abr. 2005.

FOFANA, B.; VEKEMANS, X.; JARDIN, P. du; BAUDOIN, J. P. Genetic diversity in lima (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. **Euphytica**, Gembloux, v.95, p.157-165, 1997.

FORNES MANERA, J. **Cultivo de habas y guisantes**. Barcelona: Sintes, [s.n.]. 1983. 143p.

GIACOMETTI, D. C. Descritores para caracterização e avaliação de germoplasma. In: I ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., 1988, Jaboticabal. **Anais** ...Jaboticabal: [s.n.], p. 129-147, 1988.

GONZÁLEZ, A.; LEÓN, J. A. W.; SALINAS, A. D.; GEPTS, P. Determination of genetic diversity among wild and domesticated beans using inter simple sequence repeats (ISSRs). **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v.41, p.99-100, 1998.

HAWKINS, L. K.; DANE, F.; KUBISIAK, T. L. Molecular markers associated with morphological traits in watermelon. **HortScience**, Alexandria, v.36, p.1318-1322, 2001.

HILLIS, D. M.; LARSON, A.; DAVIS, S. K.; ZIMMER, E. Nucleic acids III: sequencing. In: HILLIS, D. M., MORITZ, C. **Molecular systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p.318-370.

IBGE. **Banco de dados agregados**: pesquisa: produção agrícola municipal. Rio de Janeiro, 2003. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=10&i=P>> Acesso em 15 abr. 2005.

JOHNS, M. A.; SKROCK, P. M.; NIENHUIS, J.; HINRICHSEN, P.; BASCUR, G.; MUNOS-SCHICK, C. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. **Crop Science**, Madison, v. 37, p.605-613, 1997.

KEE, E.; GLANCEY, J. L.; WOOTTEN, T. L. The lima bean: a vegetable crop for processing. **Hort Technology**, Alexandria, v.7, p.119-128, 1997.

LIOTI, L.; GALASSO, I. Oligonucleotide DNA fingerprinting revealing polymorphism in *Phaseolus lunatus* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Bari, v.49, p.53-58, 2002.

LOARCE, Y.; GALLEGO, R.; FERRER, E. A comparative analysis of the genetic relationship between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.88, p.107-115, 1996.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; OLIVEIRA, A. V. de; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, v.29, p.56-60, 2002.

LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F. **Frijol: investigación y producción**. Cali: CIAT, 1985. 417p.

LYMMAN, J. M. Adaptation studies on lima bean accessions in Colombia. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p.369-373, 1983.

MACKIE, W.W. Origen, dispersal, and variability of the lima bean, *Phaseolus lunatus*. **Hilgardia**, Berkeley, v.15, n.1, p.1-29, 1943.

MAQUET, A.; VEKEMANS, X. Z. ; BAUDOIN, J. P. Phylogenetic study on wild allies of lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin. **Plant Systematics and Evolution**, Gembloux, v.218, p.43-54, 1999.

MARECHAL, R.; MASCHERPA, J. M. STAINIER, F. Étude taxonomique d'un group complexe d'espèces des genres *Phaseolus et Vigna* (Papilionaceae) sur la base de donnes morphologiques et poliniques, traitees par l'analyse informatique. **Boissiera**, Geneve, v.28, p.1-273,1978.

MARTINS, L. S. S. ; FALCAO, T. M. M. ; COELHO, R. S. B. Identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à mancha angular do feijoeiro comum. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v.30, n.2, p.234-237, 2004.

MARTINS, L. S. S. **Marcadores moleculares no estudo da resistência do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) ao agente da mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris).** 1999. 117f. Tese (Doutorado em Botânica)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MCLEESTER, R. C.; HALL, T.C.; SUN, S. M.; BLISS, F. A.; Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* With those from *Vicia faba*. **Phytochemistry**, Elmsford, v.12, p.85-93, 1973.

MORAES, R. A.; SALES, M. P.; PINTO, M. S. P.; SILVA, L. B.; OLIVEIRA, A. E. A.; MACHADO, O. L. T.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolin is detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Brazilian Journal of Medical Research**, Ribeirão Preto, v.33, n.2, p.191-8, 2000.

MORALES. E. A. V. “Genepool” e “core collections” como estratégias para a conservação e uso dos recursos genéticos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1. 1995, Campinas. **Resumos...** Campinas: IAC, 1995. p.7-8.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (Washington, DC). **Tropical legumes resources for the future.** Washington: [s.n], 1979. 331p.

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SKROCH, P.; SANTOS, J. B. Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured

by RAPD markers. **Journal of the America Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.2, p.300-6, 1995.

OLIVEIRA, A. P.; ALVES, E. U.; ALVES, A. U.; DORNELAS, C. S. M.; SILVA, J. A. da; PÔRTO, M. L.; ALVES, A. V. Produção de feijão-fava em função do uso de doses de fósforo em um Neossolo Regolítico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p. 543-6, 2004.

ORAGUZIE NNADOZIE, C.; GARDINER S. E.; HEATHER, C. M.; BASSET, M. S.; BALL, R. D.; VINCENT, G. M.; ALLAN, G. W. Genetic diversity and relationships in malus sp. germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.126, p.318-328, 2001.

RACHIE, K.O.; SONG, L.; LYMAN, J. Lima bean (*Phaseolus lunatus*) and potential in the tropics. In: SUMMERFIELD, R.J.; BUNTING, A.H. (Ed.). **Advances in legume science**. Kew: Royal Botanic Garden, 1980, p.375-381.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. DOS; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Genética quantitativa em plantas autógamias: aplicações no melhoramento do feijoeiro**. Goiânia, Ed. da UFG, 1993. 271p.

RAMOS, S.R.R.; QUEIROZ, M.A. Caracterização morfológica: experiência do BAG de cucurbitáceas da Embrapa Semi-Árido, com acessos de abóbora e moranga. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.17, p.9-12, 1999. Suplemento.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH H. A. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, p.1350-1354, 1985.

SANTOS, D.; CORLETT, F. M. F.; MENDES, J. E. F.; WANDERLEY JÚNIOR, J. S. A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.10, p.1407-1412. 2002.

SANTOS, J. B.; FERREIRA, E. A.; SANTOS, E. A.; SILVA, A. A.; SILVA, F. M.; FERREIRA, L. R. Qualidade de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) após aplicação do carfentrazone-ethyl em pré-colheita. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.4, p.633-639, 2004.

SILVA, G. C.; RICARDO, R. R.; OLIVEIRA, F. J de O.; BASTOS, G. Q.; ANUNCIAÇÃO FILHO, C. J. da. Caracterização morfológica de sementes de genótipos de feijão-fava. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE, 4., 2004, Recife. **Anais...** Recife: Ed da UFRPE, 2004.

SILVA, H. T.; COSTA, A. O. **Caracterização botânica das espécies silvestres do gênero *Phaseolus* L. (Leguminosae)**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2003. 40p. (Documento/Embrapa Arroz e Feijão, 156).

SINGH, S. P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. **Crop Science**, Madison, v.41, n.6, p.1659-1675, 2001.

SINGH, S. P.; NODARI, R.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean – II: marker based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, Madison, v. 31, p.23-29, 1991.

SPARVOLI, F.; LANAVE, C.; SANTUCCI, A.; BOLLINI, R. LIOI, L. Lectin and lectin-related proteins in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds: biochemical and evolutionary studies. **Plant Molecular Biology**, Bari, v. 45, p. 587-597, 2001.

STANTON, W. R. **Leguminosas de grano africanas**. Roma: FAO, 1966. 162p.

TORO, O.; THOME, J.; DEBOUCK, D. G. **Wild bean (*Phaseolus vulgaris* L.) description and distribution**. Cali: CIAT, 1990. 106 p. (CIAT. Publication, 181).

ULANOVSKY, S.; GOGORCENA, Y.; MARTÍNEZ DE TODA, F.; YORTIZ, J. M. Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.92, p.241-254, 2002.

VALLS, J. F. M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica vegetal. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., 1988, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: [s.n.], p.106-08. 1988.

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

VERA, C. M.; PAREDES, M. C.; BECERRA, V. V. Estudio comparativo de diversidad morfológica, isoenzimática y RAPDs dentro y entre clases comerciales de frijol chileno (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agricultura Técnica**, Santiago, v.59, n.4, p.247-259, 1999.

VIEIRA, C. **Cultura do feijão**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 1983. 146p.

VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.174, p.30-37, 1992.

VIEIRA, R. F. **Comparações de feijões dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* com o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1989. 213f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

VIEIRA, R.F.; VIEIRA, C. Comportamento de feijões dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* no consórcio com milho plantado simultaneamente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.11, p.781-787, 1996.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEIER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 322p.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

YUYAMA, K. Comportamento de 10 cultivares de feijão lima (*Phaseolus lunatus* L.) introduzidas do IITA, em terra firme de Manaus-AM. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n.3, p.515-520, 1982.

YUYAMA, K. Potencialidade agrícola dos solos da várzea e a utilização de leguminosas na Amazônia Central. In: **Bases Científicas de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia**, Manaus: 1993, v.2, p.223-239.

ZIMMERMANN, M.J. de O.; TEIXEIRA, M.G. Origem e evolução. In: _____. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, p. 57-70, 1996.

**CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
ACESSOS DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)**

Trabalho a ser enviado para
Publicação na Revista Brasileira de
Engenharia Agrícola e Ambiental -
AGRIAMBI, Paraíba – PB.
ISSN: 1415-4366.

**Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava
(*Phaseolus lunatus* L.)¹**

Walma N. R. Guimarães²; Luiza S. S. Martins³; Edson F. da Silva³; Gabriela de M. G.
Ferraz⁴; Francisco J. de Oliveira⁵.

¹Parte da dissertação de mestrado da primeira autora, apresentada à UFRPE

²**Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP. 52171-900, Recife-PE. Fone: (81) 3302-1313.**

E-mail: walmalamo@gmail.com (Foto)

³UFRPE-DB, Biologia. Fone: (81) 3302-1313. E-mail: luiza@ufrpe.br; edson@ufrpe.br

⁴UFRPE graduanda em Ciências Biológicas; E-mail: gabrielamferraz@click21.com.br

⁵UFRPE-DEPA, Fitotecnia. Fone: (81) 3302-1253. E-mail: franseol@uol.com.br

Resumo: O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade genética de vinte e dois acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L) oriundos dos Estados do Ceará, Paraíba e Pernambuco, que compõem a Coleção de Germoplasma do Departamento de Agronomia da UFRPE, por meio de marcadores RAPD, bem como caracterizar quatorze desses genótipos por meio de marcadores morfológicos. Para caracterização da variabilidade genética foram utilizadas sessenta locos polimórficos. Pela análise de agrupamento verificou-se a formação de dois grupos e quatro subgrupos e constatou-se elevada variabilidade genética entre os acessos. Os acessos mais próximos geneticamente foram FA-01 e FA-02, provenientes do Ceará, com grau de similaridade de 85,4% e os mais distantes foram FA-07 e FA-20, provenientes do Ceará e Pernambuco, respectivamente, com grau de similaridade de 35,9%. Quanto à caracterização morfológica observou-se que o genótipo FA-13 destacou-se dos demais por apresentar maiores valores no peso das sementes, no número de sementes por vagem, comprimento e largura da vagem, enquanto o genótipo FA-16 apresentou menores valores de peso de cem sementes, sementes muito pequenas, menor número de vagem por planta, menor comprimento de vagem e menor produção de semente por planta.

Palavras-chave: Diversidade genética, fava, marcadores RAPD, marcadores morfológicos

Morphological and molecular characterization of accessions of lima-beans (*Phaseolus lunatus* L.)

ABSTRACT: The objective of this work was to analyze a genetical diversity of twenty-two accessions of lima-beans (*Phaseolus lunatus* L), coming from the States of Ceará, Paraíba and Pernambuco Brazil, which make part of the Germoplasm Collection of the Agronomy Department of Federal Rural University of Pernambuco, by RAPD markers, as well as to characterize fourteen of these genotypes by means of morphological markers. To characterize the genetic variability sixty polymorphic loci were used. By the analysis of the sample, we observed the formation of two groups and four subgroups, and we noticed high genetic variability among the accessions. The genetically closer genotypes were FA-01 and

FA-02, coming from Ceará, with 85% of similarity, and the less similar were FA-07 and FA-20, coming from Ceará and Pernambuco, respectively, with 35.9% similarity. Related to the morphological characterization, we noticed the genotype FA-13 stood out from the others by presenting higher values of seed weight, number of seeds per pod, length and width of pod, while the FA-16 genotype showed lower values for weight of one hundred seeds, very small seeds, lower number of pod per plant, lower length of pod and lower production of seed per plant.

Key-words: Genetic diversity, lima-beans, RAPD markers, morphological markers

INTRODUÇÃO

A família Fabaceae, uma das maiores entre as dicotiledôneas com 643 gêneros, reúne 18.000 espécies distribuídas em todo o mundo, estando concentrada nas regiões tropicais e subtropicais (Broughton et al., 2003). A espécie *Phaseolus lunatus* L., também conhecida como feijão-fava ou feijão-lima, é cultivada na América do Norte, na América do Sul, na Europa, no leste e oeste da África e no sudeste da Ásia (Baudoin, 1988).

No Brasil, apesar de ser cultivada em todos os Estados e de apresentar capacidade de adaptação mais ampla do que o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), o cultivo do feijão-fava ainda tem pouca relevância. Acredita-se que as principais razões para o cultivo relativamente limitado sejam devido a maior tradição de consumo do feijão-comum, ao

paladar do feijão-fava e ao seu tempo de cocção mais longo. A importância econômica e social, deve-se principalmente a sua rusticidade em regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro, o que possibilita prolongar a colheita em período seco (Azevedo et al., 2003). Os grãos verdes e secos, as vagens verdes e as folhas do feijão-fava podem ser consumidas pelo homem. Trata-se de uma das principais leguminosas cultivadas na região tropical que apresenta potencial para o fornecimento de proteína vegetal à população, e diminuição da dependência, quase exclusiva, dos feijões do grupo carioca (Vieira, 1992). De acordo com Oliveira et al. (2004), o feijão-fava é hoje uma alternativa de renda e alimentação para a população da região Nordeste do Brasil, que o consome sob a forma de grãos maduros ou verdes. Ainda segundo os mesmos autores, no Estado da Paraíba, onde é cultivado em quase todas as micro-regiões, vem se destacando como um dos maiores produtores nacional.

A caracterização morfológica consiste em fornecer uma identidade para cada acesso através do conhecimento de uma série de dados que permitam estudar a variabilidade genética. Estes dados auxiliam na caracterização de germoplasma possibilitando grandes avanços na descrição da divergência genética entre acessos. A variabilidade genética só pode ser eficientemente utilizada se for devidamente avaliada e quantificada, sendo a descrição das introduções ou acessos fundamental para a manutenção e exploração do potencial das coleções. Tal caracterização pode ser feita por meio de marcadores ou descritores morfológicos e/ou moleculares (Singh, 2001).

Diversos autores (Nienhuis et al., 1995; Vera et al., 1999; Beebe et al., 2000; Eichenberg et al., 2000, dentre outros) têm utilizado marcadores RAPD no agrupamento de genótipos de feijão de acordo com o centro de domesticação sendo, portanto, eficazes na avaliação da variabilidade genética dentro e entre populações de plantas e na elucidação de parentescos entre acessos de uma espécie. O uso de marcadores moleculares representam uma ferramenta adicional em programas de melhoramento genético em plantas, pois oferece novas possibilidades no manejo de coleções, permite a comparação entre indivíduos, identificando duplicatas, além de possibilitar a classificação do germoplasma em grupos de interesse para os diferentes programas de melhoramento (Eichenberg et al., 2000).

A seleção assistida por marcadores moleculares pode permitir a identificação da presença ou ausência de gene(s) ligado(s) a características específicas para fins de melhoramento, com a vantagem de se fazer as análises antes da realização de experimentos de campo. Com isso, diminui o volume de material que necessitaria de cuidados como adubação, capina, irrigação, etc., havendo redução no número de gerações de melhoramento necessárias no desenvolvimento de variedades. Atualmente, há inúmeros tipos de marcadores moleculares os quais diferem-se quanto à habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de vinte e dois acessos de feijão-fava (*P. lunatus* L.) coletados nos Estados do Ceará, Paraíba e Pernambuco, que compõe a Coleção de Germoplasma do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco por meio de marcadores RAPD, bem como caracterizar quatorze desses genótipos por meio de marcadores morfológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

A condução do experimento de campo foi realizado na área experimental do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Município do Recife (8° 10'52'' S, 34°54'47'' W, 2 m de altitude), no ano agrícola de 2004. Foram utilizados 22 acessos coletados pelo Professor Francisco José de Oliveira, junto aos pequenos produtores dos Municípios dos Estados do Ceará (Quixeramobim), Paraíba (Campina Grande) e Pernambuco (Gravatá) que constituem a coleção de germoplasma da Área de Fitotecnia da UFRPE (Tabela 1). Todos os acessos foram avaliados quanto a variabilidade genética, por meio de marcadores RAPD, e 14 desses: FA-1, FA-3, FA-7, FA-8, FA-9, FA-11, FA-13, FA-16, FA-17, FA-18, FA-19, FA-20, FA-25 e FA-27, por terem completado o ciclo reprodutivo, também foram avaliados quanto à caracteres morfológicos.

Tabela 1. Relação das denominações e nomes populares, local de procedência e cor do tegumento dos acessos de *P. lunatus* da Coleção de Germoplasma do Departamento de Agronomia da UFRPE, utilizados na caracterização molecular e morfológica.

Denominação	Nome popular	Procedência	Cor do Tegumento
-------------	--------------	-------------	------------------

FA-1	Orelha-de-velho	Quixeramobim - CE	Rajada Branca com Preta
FA-2	-	Quixeramobim - CE	Branca
FA-3	-	Quixeramobim - CE	Branca Mancha Alaranjada
FA-4	-	Quixeramobim - CE	Creme com Marrom
FA-5	Manteiga	Quixeramobim - CE	Creme
FA-6	-	Quixeramobim - CE	Preta
FA-7	-	Quixeramobim - CE	Branca
FA-8	-	Quixeramobim - CE	Vermelha
FA-9	-	Quixeramobim - CE	Branca com Preta
FA-11	-	Quixeramobim - CE	Rajada Branca com Vermelha
FA-13	Olho-de-ovelha	Quixeramobim - CE	Branca com preta
FA-14	-	Quixeramobim - CE	Marrom com Branca
FA-15	Alva	Quixeramobim - CE	Branca
FA-16	-	Gravatá - PE	Vinho
FA-17	-	Gravatá - PE	Rajada Marrom com Roxa
FA-18	-	Gravatá - PE	Roxa com Creme
FA-19	-	Gravatá - PE	Rajada Marrom com Roxa
FA-20	-	Gravatá - PE	Rajada Marrom com Roxa
FA-21	-	Quixeramobim - CE	Rajada Branca com Marrom
FA-24	-	Campina Grande - PB	Marrom com Creme
FA-25	-	Campina Grande - PB	Preta com Creme
FA-27	-	Campina Grande - PB	Branca

Caracterização Molecular

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Seqüenciamento de DNA, Prof^a Tânia Falcão, do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

O DNA foi extraído a partir de folhas jovens dos 22 acessos, coletadas no décimo sexto dia após o plantio. O protocolo de extração de DNA seguiu metodologia proposta por Doyle & Doyle (1990) com as modificações propostas por Martins (2004). Cerca de 300mg de folhas jovens foram congeladas e maceradas em almofariz de porcelana, em presença de

nitrogênio líquido e acondicionada em microtubo de 2,0 mL. Ao material macerado adicionou-se 700 µL de tampão de extração (4,9 mL de CTAB 5%; 6,9 mL NaCl 5M; 0,9 mL EDTA 0,5 M; 2,49 mL Tris-HCl (pH 8,0) 1,0 M; 24,9 µL β-mercaptoetanol).

O DNA extraído de cada amostra foi quantificado em gel de agarose a 0,8% por comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas comparadas com as do DNA fago (40, 20, 10 e 5ng de DNA fago), para tanto, foi aplicado em cada poço do gel 5 uL da amostra e 2 uL do tampão de corrida. Em um dos poços foi aplicado 2 uL do marcador de DNA Ladder – 1 Kb, PLUS e após aplicação foi realizada uma eletroforese horizontal de imersão a 100 V, até que a linha de frente chegasse a 5 cm de corrida. O gel foi corado, em solução de brometo de etídio (10 mg/mL), e visualizado sobre luz ultravioleta. Após a quantificação o DNA foi diluído, ficando com a concentração de 25 ng/mL para realização das reações.

As reações de amplificações foram realizadas segundo protocolo estabelecido por Martins (2004). As amplificações, em um volume final de 15 µL, continham: 25 ng/mL de DNA genômico; 10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 100 mM de cada um dos dNTPs; 1,4 mM de MgCl₂; 10 pmol de *primer*; uma unidade de *Taq* DNA polimerase e água estéril para que se completasse o volume final da reação. Controles foram feitos pela substituição do DNA genômico por água estéril.

Foram empregados inicialmente 37 oligonucleotídeos decâmeros de seqüência aleatória (*primers*) da Operon Technologies e da Invitrogen™ Life Technologies a saber: OP-AA02, OP-A12, OP-A15, OP-A18, OP-A20, OP-B10, OP-B12, OP-B13, OP-B18, OP-C08, OP-C15, OP-C17, OP-D03, OP-D05, OP-D06, OP-D07, OP-D08, OP-D13, OP-E02, OP-F04, OP-T17, B-O1, B-O2, B-O5, B-O6, B-O7, B-O8, B-O9, B-10, C-O2, C-O3, C-O4, C-O5, C-O6, C-O7, C-O8 e C-O9, baseado no trabalho de Martins (1999).

As amplificações foram realizadas por meio de termociclador (Programmable Thermal Controller, Modelo PTC-100™), onde as amostras foram submetidas a ciclos de amplificações, usando-se programa composto por 40 ciclos sendo cada ciclo formado por uma etapa de desnaturação a 94°C por 15 segundos, uma etapa de anelamento a 35°C por 30 segundos, uma etapa de extensão a 72°C por 60 segundos, seguida de uma etapa de alongamento a 72°C por sete minutos, finalizando com 4°C por tempo indeterminado. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese, a uma migração de 100 V por

2 horas, em gel de agarose a 1,2%, imerso em tampão TAE 1x (Trisma-Base 90 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). Terminada a corrida os géis foram corados em solução de brometo de etídio (10 mg/mL), por dois minutos, e colocados em seguida, por quinze minutos em água destilada. Em seqüência foram fotografados com câmara digital. O marcador DNA Ladder – 1 Kb, PLUS, foi utilizado como padrão para determinação do peso molecular dos respectivos fragmentos de DNA amplificados, os quais foram visualizados sob luz ultravioleta.

Análise dos dados obtidos

Mediante a interpretação dos géis, os dados moleculares foram tabulados conforme presença (1) ou ausência (0) de cada fragmento específico de DNA amplificado, gerado por *primers* em cada genótipo, para serem usados no estudo de diversidade genética. As similaridades genéticas entre os genótipos foram estimadas usando-se o coeficiente de Jaccard (Rohlf, 1992), no programa Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System - NTSYS, versão 1.70, Exeter software, NY, USA). O dendrograma foi obtido por meio do programa NTSYS-pc, usando a opção UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average).

Caracterização Morfológica

Os acessos foram semeados em covas com espaçamento de 1,5 X 2,0 m. Em cada cova foram plantadas quatro sementes, sendo após oito dias realizado replantio de mais quatro sementes. Oito semanas após a germinação, foi realizado o desbaste deixando-se uma planta por cova. No plantio, aplicou-se nas covas, 1,5 g de (NH₄)₂SO₄ (sulfato de amônio) visando ter um bom desenvolvimento da planta. O controle de plantas invasoras foi realizado por meio de duas capinas mecânicas no período anterior ao florescimento. A irrigação foi feita com regadores manuais durante todo o ciclo da cultura e as plantas de hábito de crescimento indeterminado foram tutoradas com bambu.

Os dados referentes aos caracteres agronômicos e morfológicos de 14 acessos foram tomados em uma planta, baseados nos descritores para feijão (*P. vulgaris* L.): (1) hábito crescimento - determinado (D) ou indeterminado (I); (2) cor do caule (CC) - determinada de acordo com a presença e a intensidade de pigmentação (antociano), podendo ser: verde sem pigmentação (VSP), verde com pigmentação tênue (VPT) e verde com pigmentação intensa (VPI), (CIAT, 1976); (3) diâmetro do caule (DC) - foi feito com auxílio de um paquímetro entre o segundo e o terceiro nó; (4) pêlos do caule (PC), pode ser glabro ou sem pêlos (G) ou piloso (P); (5) número de nós até 1m de altura da planta (NUP) - por meio de contagem a partir do primeiro nó, após a cicatriz da primeira folha até 1m, utilizando fita métrica; (6) número de nós até o ramo principal (NRP) - contagem a partir do primeiro nó, após a cicatriz da primeira folha até o ramo principal; (7) forma da folha (FF) - acuminada (A), bruscamente acuminada (BA) e longamente acuminada (LA); (8) cor da folha (F) - verde clara (VC), verde normal (VN) e verde escura (VE); (9) área foliar (AF) - em cm², efetuada no início da frutificação, definido como momento em que cerca de 50% das plantas apresentavam, uma ou mais vagens, medindo-se o maior comprimento (C_{max}) e a maior largura (L_{max}) do folíolo central da folha, situada à altura do sexto nó e estimada através da fórmula $AF = 0,5012 \times C_{max} \times L_{max}$, segundo Araújo & Paiva citado por Oliveira et al. (2003); (10) borda da lâmina foliar (BLF) - lisa (L) ou serrilhada (S); (11) textura da lâmina foliar (TLF)- tenra (T), rígida (R) ou coriácea (C); (12) cor da flor - branca (B), branca-amarelada (BA), amarela-branca (AB), lilás (L) , observação feita nas primeiras horas da manhã; (13) cor da vagem (CRV) - verde uniforme (VU), verde com manchas vermelhas (VMV), verde com manchas violáceas (VMVL), amarela uniforme (AU), amarela com pequenas manchas vermelhas (AMV) e amarela com manchas roxas (AMR), (Vilhordo & Müller, 1981); (14) número de vagem por planta (NVP) - considerando-se a quantidade total de frutos produzidos e colhidos por planta; (15) comprimento da vagem (CV) - em cm, determinado considerando-se a média de todas as vagens produzidas em cada planta; (16) largura da vagem (LV) - utilizando o paquímetro, em mm; (17) espessura da vagem (EV) - utilizando o paquímetro, em mm; (18) cor do tegumento (CT) - rajada de branco e preto (RBP), branca com manchas alaranjadas (BA), branca (B), vermelha (V), branca com preto (BP), rajada branca com vermelho (RBV), vinho (VI), rajada marrom com roxo (RMR), roxo com creme (RC), preta com creme (PC); (19) tamanho da semente

(TS) - grande (G), média (M), normal (N) e muito pequeno (MP); (20) peso de sementes (PCS) - em grama, determinado, tomando-se cem sementes de cada planta; (21) forma da semente (FS) - por meio dos coeficientes J (comprimento/largura) e H (espessura/largura), descrito por Puerta Romero, citado por Vilhordo et al. (1996), elíptica/achatada (EA), elíptica semi-cheia (EC), esférica/achatada (SA); (22) número de vagem por planta (NVP) - correspondeu à quantidade total de frutos produzidos e colhidos por planta; (23) número de sementes por vagem (NSV) - tomado em dez vagens por planta; (24) produção semente por planta (P) - em gramas, tomado em balança com precisão de centésimo de grama.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos trinta e sete *primers* testados, foram selecionados dezesseis, os quais geraram produtos de amplificação mais consistentes (Tabela 2). Foram obtidos um total de 76 bandas sendo 60 polimórficas e 16 monomórficas, correspondendo assim a 78,94% de regiões de bandas polimórficas. Os *primers* que geraram maior número de bandas polimórficas foram o OP-C15, OP-E02, OP-E04, OP-A18, C-O5 e C-O6 (Figura 1). Martins (2004), utilizando a técnica de RAPD para discriminar quatro genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. resistentes e suscetíveis ao fungo *Phaeoisariopsis griseola*, observou que o *primer* OP-C15 amplificou regiões de bandas de DNA presente apenas nos genitores resistentes. Já Fofana et al. (1997), ao utilizarem a mesma técnica, observaram que dos onze *primers* utilizados, entre estes, o OP-D05 e OP-D08, também utilizado neste trabalho, foi possível distinguir dezessete acessos entre os grupos sieva e batata de feijão-fava.

Tabela 2. Relação de *primers* e classificação dos mesmos quanto ao polimorfismo de bandas para genótipos de feijão-fava (*P. lunatus* L.). Recife, 2005

Ordem	Primers	eqüências 5' - 3'	Regiões de bandas		
			S	Polimórficas	M onomórficas
1	OP-A18	AGGTGACCGT	5	0	5
2	OP-B13	TTCCCCGCT	3	0	3
3	OP-C15	GACGGATCAG	7	0	7
4	OP-C17	TTCCCCCAG	2	0	2

5	OP-D05	TGAGCGGACA	1	1	2
6	OP-D06	ACCTGAACGG	3	4	7
7	OP-D08	GTGTGCCCCA	3	0	3
8	OP-E02	GGTGCGGGAA	6	3	9
9	OP-F04	GGTGATCAGG	6	0	6
10	B-O2	AGCGTGTCTG	4	0	4
11	B-O9	GGAAGTCGCC	1	0	1
12	C-O2	AATCGGGCTG	4	2	6
13	C-O3	GAACGGACTC	2	3	5
14	C-O4	AAAGCTGCGG	3	0	3
15	C-O5	GACGGATCAG	5	0	5
16	C-O6	GGACCCAACC	5	3	8
Totais locos			60	16	76

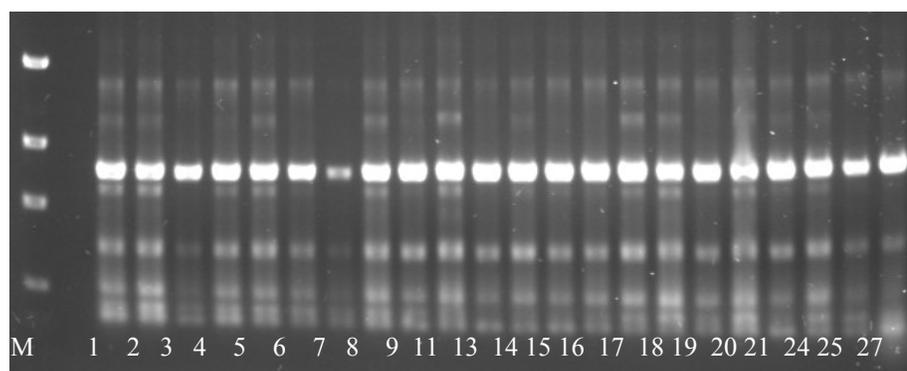


Figura 1. Análise eletroforética do produto de amplificação dos vinte e dois acessos de feijão-fava (*P.lunatus* L.) utilizando o *primer* C-O6: 1. FA-01; 2. FA-02; 3. FA-03; 4. FA-04; 5. FA-05; 6. FA-06; 7. FA-07; 8. FA-08; 9. FA-09; 10. FA-11; 11. FA-13; 12. FA-14; 13. FA-15; 14. FA-16; 15. FA-17; 16. FA-18; 17. FA-19; 18. FA-20; 19. FA-21; 20. FA-24; 21. FA-25 e 22. FA-27. M=marcador DNA Ladder – 1 Kb, PLUS.

Por meio do dendrograma construído, a partir dos vinte e dois genótipos analisados molecularmente (Figura 2), verificou-se que há dois grupos principais e quatro subgrupos. Um grupo formado pelos genótipos: FA-01, FA-02, FA-05, FA-07, FA-08, FA-11, FA-14, FA-16, FA-18 e FA-24, e outro grupo formado por: FA-03, FA-04, FA-06, FA-09, FA-13, FA-15, FA-17, FA-19, FA-20, FA-21, FA-25 e FA-27. Pelos grupos formados, não se distingue os acessos por procedência, ou seja, acessos procedentes de Pernambuco, Paraíba e Ceará compõem os dois grupos. Isto ocorre frequentemente com culturas em que predomina o cultivo de variedades crioulas, como o feijão-fava, em que ocorre intercâmbio de sementes entre os agricultores. Entretanto, outros autores, como Nienhuis et al. (1995), ao avaliarem a distância genética, através de marcadores RAPD, de 65 acessos de *P.*

lumatus, sendo 11 cultivados por pequenos produtores e 54 oriundos de bancos de germoplasma, conseguiram agrupá-los por tamanho das sementes e por origem geográfica.

Quanto à cor do tegumento, os acessos FA-17, FA-19 e FA-20 de sementes rajadas marrom com roxa, ficaram no mesmo grupo, sendo os acessos FA-19 e FA-20, pertencentes ao mesmo subgrupo. Enquanto FA-17 (rajada marrom com roxo) e FA-21 (rajada branca com marrom) diferindo na cor, estão também em um mesmo subgrupo, com grau de similaridade de 0,800 (80%).

Os dois genótipos mais próximos foram FA-01 e FA-02, provenientes do Ceará, com grau de similaridade 0,854 (85,4%) e os mais distantes foram FA-07 e FA-20, provenientes do Ceará e Pernambuco, respectivamente, com grau de similaridade 0,359 (35,9%) (Tabela 3). Os dados de similaridades ou divergências genéticas podem ser úteis em programa de melhoramento genético, já que é um dos parâmetros utilizados na escolha de genitores para realização de cruzamentos. A análise de agrupamentos de acessos de *P. lunatus*, usando marcadores moleculares para avaliação de relações filogenéticas foram efetuadas em trabalhos como o de Lioi & Galasso (2002), que através de marcadores de microssatélites, conseguiram separar os acessos de origem mesoamericanos, daqueles de origem andinas, agruparam em dois grupos principais, o grupo 1, o Mesoamericano (provenientes do Iraque, Nigéria, El Salvador, Brasil, México, Belize, Guatemala, Costa Rica, Peru, Colômbia e Argentina) e o grupo 2, o Andino (provenientes da Zâmbia, Peru e Equador). Fofana et al. (1997) e Caicedo et al. (1999), também observaram esta separação dos grupos Mesoamericano e Andino de feijão-fava (*P. lunatus* L.) utilizando marcador RAPD e AFLP, respectivamente.

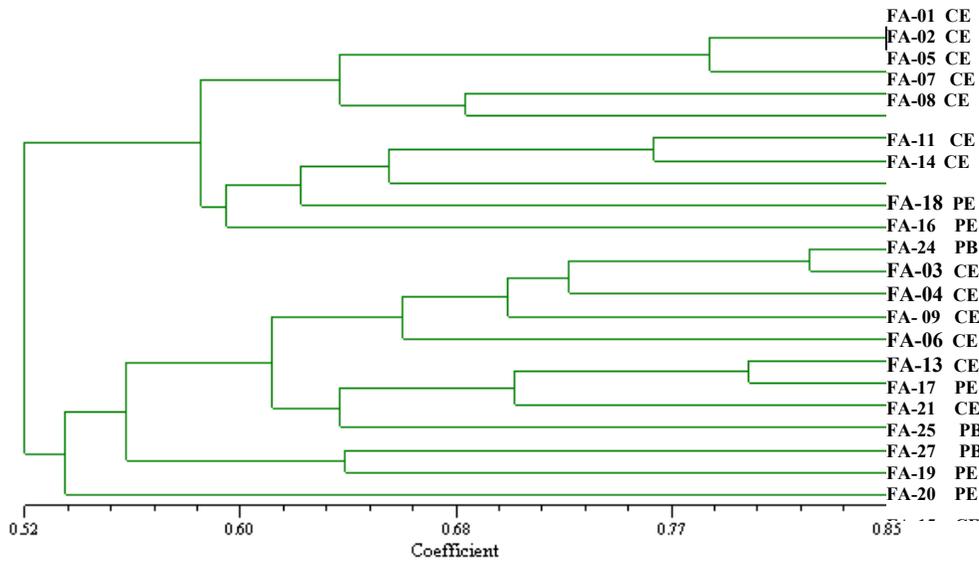


Figura 2. Análises de agrupamento dos vinte e dois genótipos de feijão-fava (*P. lunatus* L.), obtidos pelo programa NTSYS-pc usando a opção UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average).

Tabela 3. Similaridade genética entre os vinte e dois genótipos de *P. lunatus* L., feijão-fava da coleção de germoplasma do Departamento de Agronomia da UFRPE

	FA-01	FA-02	FA-03	FA-04	FA-05	FA-06	FA-07	FA-08	FA-09	FA-11	FA-13	FA-14	FA-15	FA-16	FA-17	FA-18	FA-19	FA-20	FA-21	FA-24	FA-25	FA-27	
FA-01	1.000																						
FA-02	0.854	1.000																					
FA-03	0.586	0.553	1.000																				
FA-04	0.638	0.607	0.823	1.000																			
FA-05	0.815	0.755	0.655	0.678	1.000																		
FA-06	0.523	0.469	0.732	0.695	0.661	1.000																	
FA-07	0.596	0.592	0.534	0.533	0.666	0.574	1.000																
FA-08	0.656	0.603	0.576	0.597	0.719	0.563	0.688	1.000															
FA-09	0.550	0.517	0.750	0.709	0.644	0.689	0.500	0.591	1.000														
FA-11	0.645	0.672	0.515	0.537	0.630	0.597	0.500	0.606	0.603	1.000													
FA-13	0.459	0.500	0.673	0.636	0.550	0.620	0.483	0.554	0.725	0.590	1.000												
FA-14	0.627	0.625	0.446	0.469	0.613	0.530	0.525	0.612	0.484	0.763	0.596	1.000											
FA-15	0.508	0.500	0.475	0.475	0.550	0.540	0.409	0.485	0.517	0.564	0.555	0.625	1.000										
FA-16	0.587	0.557	0.531	0.578	0.576	0.615	0.539	0.577	0.523	0.687	0.484	0.619	0.461	1.000									
FA-17	0.500	0.516	0.644	0.587	0.560	0.677	0.454	0.585	0.661	0.646	0.649	0.578	0.620	0.544	1.000								
FA-18	0.545	0.539	0.515	0.537	0.582	0.529	0.523	0.628	0.554	0.666	0.564	0.651	0.469	0.565	0.621	1.000							
FA-19	0.422	0.387	0.534	0.508	0.484	0.574	0.397	0.450	0.551	0.455	0.433	0.430	0.458	0.515	0.574	0.523	1.000						
FA-20	0.451	0.416	0.544	0.516	0.516	0.557	0.359	0.500	0.561	0.508	0.491	0.508	0.491	0.500	0.610	0.531	0.641	1.000					
FA-21	0.446	0.459	0.614	0.532	0.485	0.650	0.422	0.559	0.631	0.645	0.679	0.627	0.648	0.538	0.800	0.569	0.569	0.607	1.000				
FA-24	0.579	0.604	0.466	0.467	0.620	0.461	0.553	0.545	0.483	0.606	0.465	0.643	0.491	0.524	0.508	0.606	0.500	0.509	0.525	1.000			
FA-25	0.443	0.431	0.654	0.561	0.508	0.631	0.440	0.515	0.641	0.524	0.627	0.551	0.566	0.492	0.690	0.574	0.635	0.647	0.725	0.585	1.000		
FA-27	0.387	0.373	0.555	0.526	0.406	0.596	0.360	0.420	0.574	0.516	0.558	0.466	0.500	0.508	0.596	0.424	0.537	0.547	0.654	0.490	0.666	1.000	

As observações feitas em 14 acessos, quanto às características morfoagronômicas, estão relacionadas nas Tabelas 4 e 5. Ressalta-se que os dados obtidos foram tomados em um indivíduo de cada acesso, portanto, são representativos apenas para os caracteres de

herança monogênica como: hábito de crescimento (Sax, 1926; Bliss, 1971; Miranda, 1973; Freire Filho, 1980; Halvankar & Patil, 1994), presença ou ausência de pêlos no caule (Ospina, 1981), forma da folha (Halvankar & Patil, 1994), cor da vagem (Halvankar & Patil, 1994) e cor do tegumento (Khattak et. al, 1999). Em relação aos caracteres de herança poligênicas, ou que apresentam interações gênicas, os dados do presente trabalho podem apenas auxiliar na realização de outras pesquisas de caracterização utilizando-se o delineamento experimental adequado.

Conforme os dados apresentados na Tabela 4, treze genótipos apresentaram hábito de crescimento indeterminado caracterizado pelo desenvolvimento da gema terminal em uma guia e trepador, apenas o genótipo FA-19 apresentou hábito determinado, caracterizado pelo desenvolvimento completo da gema terminal em uma inflorescência. Esta característica é monogênica, com dominância do alelo que condiciona o crescimento indeterminado. Santos et al. (2002), estudando produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba, observaram que todos os genótipos apresentaram hábito de crescimento indeterminado e trepador. Oliveira et al. (2004), ao analisarem a produção de feijão-fava em função da nutrição mineral, constataram que no Nordeste brasileiro, os pequenos produtores utilizam, principalmente, cultivares de crescimento indeterminado, corroborando assim com os resultados observados neste trabalho.

Quanto às características das folhas, a forma da folha (FF), herança monogênica, verificada apenas nos folíolos centrais de folhas completamente desenvolvidas, nos genótipos FA-13 e FA-18 foram do tipo acuminada (A), nos genótipos FA-08, FA-16, FA-17, FA-20 e FA-25 foram do tipo levemente acuminada (LA) e nos demais genótipos apresentaram forma da folha bruscamente acuminada (BA). Em relação à cor das folhas (F), os genótipos FA-08 e FA-19 mostraram-se verde escuro (VE), os genótipos FA-01 e FA-27 verde claro (VC) e os demais genótipos apresentaram coloração verde normal (VN). As bordas da lâmina foliar (BLF) apresentaram-se lisas (L) para todos os genótipos, enquanto a textura da lâmina foliar (TLF) foi do tipo coriácea. Os genótipos exibiram área foliar (AF) variando de 28,40 cm² (FA-20) a 58,88 cm² (FA-07).

A pilosidade (PC), que varia segundo a cultivar, a parte da planta, o estágio de crescimento e, em menor grau, com as condições ambientais, como seca e luz, todos os

genótipos avaliados apresentaram-se pilosos. A cor do caule (CC), variou de verde sem pigmentação (VSP) para os genótipos FA-01, FA-09, FA-11, FA-16, FA-18, FA-19, FA-20 e FA-25, verde com pigmentação tênue (VPT) para os genótipos FA-03, FA-07, FA-08 e FA-13, e verde com pigmentação intensa (VPI) para os demais. O diâmetro do caule principal (DC) variou de 0,59 cm (FA-16) a 1,34 cm (FA-27). O número de nós no caule até 1 m (NUP) variou de 4 em FA-19 até 15 em FA-16 e FA-18, e até o ramo principal variou (NRP) de 4 (FA-11, FA-16, FA-17 e FA-27) a 7 (FA-20).

A cor da flor varia consideravelmente de acordo com o momento do dia em que se faz a observação, razão pela qual sua identificação foi efetuada sempre às primeiras horas da manhã, já que a luz solar produz rapidamente uma diminuição nos tons das cores (Puerta Romero, 1961). Observou-se quatro variações de cores das flores, a saber: branca (FA-01, FA-03, FA-17, FA-18 e FA-19), lilás (FA-13, FA-16, FA-20, FA-25 e FA-27), branca/amarelada (FA-07, FA-09 e FA-11) e amarela/branqueada (FA-08).

Tabela 4. Características morfoagronômicas de quatorze acessos de feijão-fava da Coleção de Germoplasma do Departamento de Agronomia da UFRPE

Acessos	Hábito de	Características das folhas	Características do caule	Cor da
---------	-----------	----------------------------	--------------------------	--------

	Crescimento	Folha					AF (cm ²)	Caulo					flor
		FF	F	BLF	TLF	CC		PC	DC (cm)	NUP	NRP		
FA-01	I	BA	VC	L	C	43,55	VSP	P	0,74	14	5	B	
FA-03	I	BA	VN	L	C	41,68	VPT	P	0,80	14	6	B	
FA-07	I	BA	VN	L	C	58,88	VPT	P	0,92	13	5	BA	
FA-08	I	LA	VE	L	C	33,92	VPT	P	0,97	12	5	AB	
FA-09	I	BA	VN	L	C	32,93	VSP	P	0,95	12	5	BA	
FA-11	I	BA	VN	L	C	34,43	VSP	P	0,67	13	4	BA	
FA-13	I	A	VN	L	C	35,68	VPT	P	1,01	12	6	L	
FA-16	I	LA	VN	L	C	52,79	VSP	P	0,59	15	4	L	
FA-17	I	LA	VN	L	C	38,64	VPI	P	1,02	10	4	B	
FA-18	I	A	VN	L	C	31,28	VSP	P	0,87	15	6	B	
FA-19	D	BA	VE	L	C	36,36	VSP	P	0,80	04	5	B	
FA-20	I	LA	VN	L	C	28,40	VSP	P	0,85	13	7	L	
FA-25	I	LA	VN	L	C	49,80	VSP	P	0,87	12	5	L	
FA-27	I	BA	VC	L	C	45,00	VPI	P	1,34	13	4	L	

Hábito de crescimento: I (Indeterminado) e D (Determinado); Características das folhas: FF- Forma Folha (BA- Bruscamente Acuminada; LA- Longamente Acuminada; A- Acuminada); F- Cor Folha (VC- Verde Claro; VN- Verde Normal; VE- Verde Escuro); BLF- Bordas da Lâmina Foliar (L-Lisa); TLF- Textura da Lâmina Foliar (C-Coriácea); AF - Área Foliar; Características do caule: CC- Cor Caule (VPT- Verde com Pigmentação Tênu; VSP- Verde Sem Pigmentação; VPI- Verde com Pigmentação Intensa); PC- Pêlos Caule (P-Piloso); DC- Diâmetro Caule; NUP- Número de nós até 1 metro da Planta; NRP- Número de nós até o Ramo Principal; Cor da Flor (B- Branca; BA- Branca/Amarela; AB- Amarela/Branca; L- Lilás).

A cor do tegumento (CT) foi considerada neste trabalho devido à importância dos diferentes tipos, tanto na aceitação no mercado como na identificação botânica. A ampla variabilidade de cores do tegumento das sementes (Figura 3) apresentada pelos diversos acessos de feijão-fava é uma característica fundamental na identificação de cultivares. Os quatorze acessos avaliados apresentaram os tegumentos com as seguintes tonalidades (Tabela 5): rajada branca com preta-RBP (FA-01); branca com manchas alaranjadas-BA (FA-03); branca-B (FA-07 e FA-27); vermelha-V (FA-08); branca com preta-BP (FA-09 e FA-13); rajada branca com vermelha-RBV (FA-11); vinho-VI (FA-16); rajada marrom com roxa-RMR (FA-17, FA-19 e FA-20); roxa com creme-RC (FA-18) e preta com creme-PC (FA-25). A cor do tegumento das sementes é um fator que pode contribuir para uma boa comercialização ou não do produto, e isto dependerá das preferências dos consumidores nas diferentes regiões. Vera et al. (1999), conseguiram distinguir as classes comerciais de feijões chilenos de acordo com a cor dos grãos.





Figura 3. Diferentes formas, tamanhos e cores do tegumento dos quatorze acessos de feijão-fava, usados na caracterização morfoagronômica.

Quanto ao peso de cem sementes (PCS), os genótipos estudados apresentaram variação de 15,0 g (FA-16) a 88,89 g (FA-13). Azevedo et al. (2003) estudando oito variedades de feijão-fava, encontraram valores médios entre 47,39 g a 90,05 g/cem sementes. As sementes foram classificadas quanto ao tamanho (TS), em grande (maior que 60 g), normal (40 a 59,9 g) e média (menor que 40 g). Nos genótipos estudados predominaram sementes média a grande. O tamanho das sementes do feijão-fava pode ser uma característica importante do ponto de vista de desenvolvimento fisiológico da cultura, já que Dobert & Blevins (1993) verificaram que plantas desenvolvidas a partir de sementes maiores produziram mais nódulos e matéria seca de parte aérea do que as oriundas de sementes menores, sugerindo maior fixação de nitrogênio atmosférico. Quanto ao coeficiente J (comprimento/largura), onde as sementes podem ser esféricas (1,16 a 1,42 mm), elíptica (1,43 a 1,65 mm), oblonga ou reniforme curta (1,66 a 1,85 mm), oblonga ou reniforme média (1,86 a 2,00 mm) e oblonga ou reniforme longa (maior que 2,00 mm) (Vilhordo et al.,1996), o genótipo FA-20 apresentou sementes esféricas e os demais apresentaram sementes elípticas. Através da relação espessura/largura (H), todos os acessos avaliados apresentaram sementes achatadas (menor que 0,69 mm). Em relação ao comprimento e largura dos grãos, respectivamente, os maiores valores foram de 16,9 mm e 11,7 mm (FA-13), 16,4 mm e 10,3 mm (FA-11), 16,2 mm e 11,0 mm (FA-17), já para espessura de grãos, a maior foi para o genótipo FA-13 com 6,1 mm.

O número de vagens por planta (NVP) variou de 14,4 (FA-16) a 436,3 (FA-18). Esta variabilidade apresentada é uma característica genética importante na identificação de genótipos potencialmente produtivos. Na cor da vagem (CRV), um tipo de herança

monogênica, o verde uniforme predominou em todos os genótipos, e o número de sementes por vagem (NSV) variou, em sua maioria, de duas a quatro. Santos et al. (2002), estudando produtividade e morfologia de sementes de variedades de feijão-fava, também encontraram a mesma variação para o número de sementes por vagem. Os genótipos FA-11 (89,5 mm), FA-13 (85,3 mm) e FA-17 (84,6 mm) apresentaram os maiores comprimentos de vagem (CV), destacando-se dos demais. Em relação à largura da vagem (LV) e espessura da vagem (EV), a variação foi de 21,4 mm (FA-13) a 7,9 mm (FA-18), respectivamente. Quanto à produção de sementes por planta (P), os genótipos FA-17, FA-11, FA-18 e FA-20 foram os mais produtivos, com 556, 795, 830 e 1500g de sementes por planta, respectivamente.

Observou-se que o genótipo FA-13, proveniente do Ceará, destacou-se dos demais por apresentar maiores valores para: peso de cem sementes (88,89 g), número de semente por vagem (2-6), comprimento de vagem (85,3 mm) e largura de vagem (21,4 mm). Entretanto, o genótipo FA-16, proveniente de Pernambuco, apresentou menores valores de peso de cem sementes, com sementes muito pequenas, menor número de vagem por planta, menor comprimento de vagem, e a menor produção de sementes por planta (Tabela 5).

Tabela 5. Características morfoagronômicas de vagens e grãos de quatorze acessos de feijão-fava da Coleção de Germoplasma do Departamento de Agronomia da UFRPE

Características das vagens

Características dos grãos

Acessos	CRV	NVP	NSV	CV	LV	EV	P	C	L	E	J	H	FS	PCS	TS	CT
				(mm)	(mm)	(mm)	(g)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)				
FA-01	VU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	RBP
FA-03	VU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	BA
FA-07	VU	-	2-3	74,8	14,2	1,4	-	15	9,4	4,9	1,59	0,52	EA	-	G	B
FA-08	VU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	V
FA-09	VU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	BP
FA-11	VU	77,0	2-4	89,5	19,3	6,4	795	16,4	10,3	5,8	1,59	0,56	EA	85,34	G	RBV
FA-13	VU	18,7	2-6	85,3	21,4	7,3	165	16,9	11,7	6,1	1,44	0,52	EA	88,89	G	BP
FA-16	VU	14,4	2-4	48,6	13,9	6,2	56	11,3	7,4	5,2	1,53	0,70	EC	15,00	MP	VI
FA-17	VU	155,6	2-4	84,6	16,5	4,4	556	16,2	11,0	5,0	1,47	0,45	EA	34,85	M	RMR
FA-18	VU	436,3	1-3	55,1	13,5	7,9	830	12,4	8,0	5,0	1,55	0,62	EA	34,29	M	RC
FA-19	VU	42,2	1-3	60,4	15,3	5,7	244	11,9	8,0	4,3	1,49	0,54	EA	37,31	M	RMR
FA-20	VU	317,2	2-4	61,7	13,8	5,9	1500	11,3	8,0	4,7	1,41	0,59	SA	35,56	M	RMR
FA-25	VU	42,2	2-4	65,8	15,5	5,9	198	12,9	8,9	5,0	1,45	0,56	EA	54,19	N	PC
FA-27	VU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	B

Características das vagens: CRV- Cor Vagem (VU- Verde Uniforme); NVP- Número de Vagem por Planta; NSV- Número de Semente por Vagem; CV- Comprimento Vagem; LV- Largura Vagem; EV- Espessura Vagem; P- Produtividade; Características dos grãos: C- Comprimento; L- Largura; E- Espessura ; J- Coeficiente Comprimento/Largura; H- Coeficiente Espessura/Largura; FS- forma da semente (EA- Elíptica/Achatada; EC- Elíptica Semi-Cheia; SA- Esférica/Achatada); PCS- Peso de Cem Sementes; TS- Tamanho da Semente (G- Grande; M- Média; N- Normal; MP- Muito Pequena); CT- Cor do Tegumento (RBP- Rajada de Branca e Preta; BA- Branca com manchas Alaranjadas; B- Branca; V- Vermelha; BP- Branca com Preta; RBV- Rajada Branca com Vermelha; VI- Vinho; RMR- Rajada Marrom com Roxa; RC- Roxa com creme; PC- Preta com creme).

A distribuição dos acessos analisados no dendrograma, por um lado confirmam algumas expectativas, isto é, não foi capaz de separar acessos por área de coleta, mostrando assim que os produtores dessas regiões, por estarem próximas geograficamente, trocam sementes entre si. Entretanto, a avaliação de germoplasma tem sido muito otimizado pela junção de marcadores moleculares com descritores morfológicos, possibilitando avaliar a distância genética com base em características importantes para o melhoramento, como a escolha de linhas de parentais contrastantes.

Embora a similaridade genética entre os 22 acessos tenha sido calculada com base em dados moleculares, que, muitas vezes, não correspondem a regiões expressas do DNA, os resultados apresentados devem ser bastante consistentes, em decorrência de não haver interferência do ambiente, o que é comum em dados fenotípicos, e dos marcadores RAPD geralmente, proporcionarem uma ampla cobertura do genoma. Os resultados gerados apresentam grande utilidade ao melhoramento de feijão-fava, pois permitem maior

compreensão sobre a genética da cultura e fornecem subsídios para programas de seleção de indivíduos.

Considerando-se o feijão-fava, como uma importante fonte de proteína e de renda para a população menos favorecida da Região Nordeste, e que ainda tem pouca relevância no Brasil, apesar de ser cultivada em maior ou menor extensão em todos os Estados, justificam-se as pesquisas no sentido de selecionar indivíduos em programas de melhoramento, possibilitando cruzamentos de materiais bem divergentes, objetivando a maximização da distância genética com a finalidade de recombinar genes, ou complexos gênicos, reunindo-os em novas combinações favoráveis.

Devido à escassez de informações sobre a caracterização morfológica de feijão-fava, algumas características, como produção por exemplo, podem vir a disponibilizar no futuro próximo, materiais potencialmente promissores e que interfiram diretamente no aumento da produção, bem como, estimular àqueles que quiserem investir na cultura.

CONCLUSÕES

1. Marcadores moleculares RAPD são eficientes para caracterizar acessos de feijão-fava, podendo ser utilizados para caracterização de plantas matrizes, análise de variabilidade genética entre genitores em Programas de Melhoramento Genético;
2. As análises morfoagronômicas são eficientes por demonstrarem a variabilidade dos acessos de feijão-fava estudados, principalmente, pelas características da flor, frutos e sementes;
3. O estudo da diversidade genética em feijão-fava geram informações que podem otimizar a manutenção e o manejo da Coleção de Germoplasma do Departamento de Agronomia da UFRPE, facilitando o acesso dos melhoristas a novos conjuntos gênicos;
4. Os estudos da diversidade genética associados a características morfoagronômicas de feijão-fava da Coleção de Germoplasma da UFRPE, sinalizaram com acessos promissores para utilização em plantas comerciais.

LITERATURA CITADA

Azevedo, J.N.; Franco, L.J.D.; Araújo, R.O.C. Composição química de sete variedades de feijão-fava. Comunicado técnico, Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2003. 4p.

Baudoin, J.P. Genetic resources, domestication and evolution of lima bean, *Phaseolus lunatus*. In: Gepts, P. (ed.). Genetic resources of Phaseolus bean. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, Califórnia, 1988, p.393-407.

Beebe, S.E.; Skroch, P.W.; Tohme, J.; Duque, M.C.; Pedraza, F.; Nienhuis, J. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle America origin based on correspondence analysis of RAPD. Crop Science, Madison, v.40, p.264-273, 2000.

Bliss, F.A. Inheritance of growth habit and time of flowering in beans. Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, n.6, p.715-7, 1971.

Broughton, W.J.; Hernández, G.; Blair, M.; Beebe, S.; Gepts, P.; Vanderleyden, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. Plant and Soil, Dordrecht, v. 252, p.55-128, 2003.

Caicedo, A.; Gaitán, E.; Duque, M.C.; Toro Chica, O.; Debouck, D.G.; Tohme, J. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. Crop Science, Madison, v.39, p.1497-1507, 1999.

CIAT. Condiciones del campo para realizar las evaluaciones del germoplasma de frijol. Cali: [s.n], 1976, 11p.

Dobert, R.C; Blevins, D.G. Effect of seed size and plant growth on nodulation and nodule development in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). Plant and Soil, Dordrecht, v.148, p.11-19, 1993.

Doyle, J.J.T.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, Ithaca, v.12, p.13-18, 1990.

Eichenberg, K.; Gugerli, F.; Schneller, J.J. Morphological and molecular diversity of swiss common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L. Fabaceae) and their origin. Botanica Helvetica, Basel, v. 110, n. 1, p.61-67, 2000.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 1998. 220p.

Fofana, B.; Vekemans, X.; Jardin, du P.; Baudoin, J.P. Genetic diversity in lima (*Phaseolus*

- lunatus* L.) as revealed by rapd markers. Euphytica, Wageningen, v.95, p.157-165, 1997.
- Freire Filho, F.R. Herança no número de dias para a floração e do hábito de crescimento em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Viçosa: UFV. 1980. 38p. Dissertação Mestrado.
- Halvankar, G.B.; Patil, V.P. Inheritance and linkage studies in soybean. Indian Journal of Genetic and Plant Breeding. Índia, v.54, n.3, p.216-224, 1994.
- Khattak, G.S.S.; Haq, M.A.; Ashraf, M. Inheritance and joint segregation pattern of testa colour and plant growth habit in mungbean (*Vigna radiate* (L.) Wilczek). Tropical Agricultural Research and Extension, Weslaco, v.2, n.1, p.1-3, 1999.
- Lioi, L.; Galasso, I. Oligonucleotide DNA fingerprinting revealing polymorphism in *Phaseolus lunatus* L. Genetic Resources and Crop Evolution. Bari, v.49, p.53-58, 2002.
- Martins, L.S.S. Identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à mancha angular do feijoeiro comum. Summa Phytopatologica, Jaboticabal, v.30, n.2, p.234-237, 2004.
- Martins, L.S.S. Marcadores moleculares no estudo da resistência do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) ao agente da mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris). Recife: UFRPE, 1999. 117p. Tese Doutorado.
- Miranda, C.S. Mejoramiento genético del frijol. In: Brauer, O. Fitogenética aplicada. Chapingo: Limusa, p.412-440. 1973.
- Nienhuis, J. Tivang, J.; Skrock, P.; Santos, J. B. Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. Journal of the America Society for Horticultural Science, Alexandria, v.120, n. 2, p.300-306, 1995.
- Oliveira, A.P. de; Alves, E.U.; Alves, A.U.; Dornelas, C.S.M.; Silva, J.A. da; Porto, M.L.; Alves, A.V. Produção de feijão-fava em função do uso de doses de fósforo em um Neossolo Regolítico. Horticultura Brasileira, Brasília, v.22, n.3, p.543-546, 2004.
- Oliveira, F.J.; Anunciação Filho, C.J. da; Bastos, G.Q.; Reis, O.V. dos; Teófilo, E.M. Caracteres agronômicos aplicados na seleção de cultivares de caupi. Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v.34, n.1, p.44-50, 2003.
- Ospina, O.H.F. Morfologia de la planta de frijol comum (*Phaseolus vulgaris* L.). 2 ed. Cali: [s.n], 1981. 50p.

Puerta Romero, J. Variedades de judias cultivadas en España. Madrid. 1961. 798p. Monografia.

Rohlf, F.J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 1.7. New York: Exeter Software, 1992. 236p.

Santos, D.; Corlett, F.M.F.; Mendes, J.E.M.F.; Wanderley Junior, J.S.A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.37, n.10, p.1407-1412, 2002.

Sax, K. Quantitative inheritance in *Phaseolus*. Journal of Agricultural Research. Nova Zelândia, v.33, n.4, p.349-354, 1926.

Singh, S.P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. Crop Science, Madison, v.41, n.6, p.1659-1675, 2001.

Vera, C.M.; Paredes, M.C.; Becerra, V.V. Estudio comparativo de diversidad morfológica, isoenzimática y RAPDs dentro y entre clases comerciales de frijol chileno (*Phaseolus vulgaris* L.). Agricultura Técnica, Santiago, v.59, n.4, p.247-259, 1999.

Vieira, C. Leguminosas de grãos: importância econômica na agricultura e na alimentação humana. Informe Agropecuário, Belo Horizonte. v.16, n.174, p.5-11, 1992.

Vilhordo, B.W.; Araújo, R.S.; Rava, C.A.; Stone, L.F.; Zimmerman, M.J. de O. Morfologia. IN: Araújo, R.S.; Rava, C.A.; Stone, L.F.; Zimmerman, M.J. de O. Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: Potafos, 1996. p.71-99.

Vilhordo, B.W.; Müller, L. Correlação entre caracterização botânica e classificação comercial em cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Boletim Técnico, 8, Porto Alegre, 1981. 62p.

ANEXOS

Instruções aos Autores

Línguas e áreas de estudo

Os artigos submetidos à Revista AGRIAMBI podem ser elaborados em Português, Inglês ou Espanhol, e devem ser produto de pesquisa nas áreas de Manejo de Solo e Água, Engenharia de Irrigação e Drenagem, Meteorologia e Climatologia Agrícola, Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas, Gestão e Controle Ambiental (esta área contempla apenas artigos que descrevam pesquisas sobre a gestão e controle ambiental no contexto da agropecuária), Construções Rurais e Ambiente, Automação e Instrumentação, Máquinas Agrícolas, e Energia na Agricultura.

Composição seqüencial do artigo

a) Título: no máximo com 15 palavras, em que apenas a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula.

b) Nome(s) do(s) autor(es): por extenso apenas o primeiro nome e o último sobrenome e separados por vírgula, e somente a primeira letra do nome e dos sobrenomes deve ser maiúscula. Colocar referência de nota no final do último sobrenome de cada autor para fornecer, logo abaixo, endereço institucional, incluindo telefone, fax e e-mail. Os autores pertencentes a uma mesma instituição devem ser referenciados por uma única nota. Colocar em negrito o nome e endereço do autor correspondente, ou seja, aquele que encaminhou o artigo. No final do nome do autor respectivo à fotografia enviada, deverá constar: (Foto).

c) Resumo: no máximo com 15 linhas.

d) Palavras-chave: no mínimo três e no máximo cinco, não constantes no Título.

e) Título em inglês: no máximo com 15 palavras, ressaltando-se que só a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula.

f) Abstract: no máximo com 15 linhas, devendo ser tradução fiel do Resumo.

g) Key words: no mínimo três e no máximo cinco.

h) Introdução: destacar a relevância do artigo, inclusive através de revisão de literatura.

i) Material e Métodos.

j) Resultados e Discussão.

k) Conclusões: devem ser escritas de forma sucinta, isto é, sem comentários nem explicações adicionais, baseando-se nos objetivos da pesquisa.

l) Agradecimentos (facultativo)

m) Literatura Citada.

Quando o artigo for escrito em Inglês ou em Espanhol, o título, resumo e palavras-chave deverão, também, constar, respectivamente, em Português e em Inglês, mas com a seqüência alterada, vindo primeiro no idioma principal. Outros tipos de contribuição (Revisão de Literatura e Nota Prévia) para a revista poderão ter a seqüência adaptada ao assunto.

Edição do texto

- a) Processador: Word for Windows
- b) Texto: fonte Times New Roman, tamanho 12. Não deverão existir no texto palavras em negrito.
- c) Espaçamento: duplo entre o título, nome(s) do(s) autor(es), resumo e abstract; simples entre item e subitem; e no texto, espaço 1,5.
- d) Parágrafo: 0,5 cm.
- e) Página: Papel A4, orientação retrato, margens superior e inferior de 2,54 cm, e esquerda e direita de 3,00 cm, no máximo de 20 páginas não numeradas.
- f) Todos os itens em letras maiúsculas, em negrito e centralizados, exceto Resumo, Abstract, Palavras-chave e Key words, que deverão ser alinhados à esquerda e apenas as primeiras letras maiúsculas. Os subitens deverão ser alinhados à esquerda, em negrito e somente a primeira letra maiúscula.
- g) As grandezas devem ser expressas no SI (Sistema Internacional) e a terminologia científica deve seguir as convenções internacionais de cada área em questão.
 - h) Tabelas e Figuras (gráficos, mapas, imagens, fotografias, desenhos)
 - As tabelas e figuras devem apresentar larguras de 9 ou 18 cm, com texto em fonte Times New Roman, tamanho 9, e ser inseridas logo abaixo do parágrafo onde foram citadas pela primeira vez. Exemplo de citações no texto: Figura 1; Tabela 1. Tabelas e figuras que possuem praticamente o mesmo título deverão ser agrupadas em uma única tabela ou figura criando-se, no entanto, um indicador de diferenciação.
 - As tabelas não devem ter tracejado vertical e o mínimo de tracejado horizontal. Exemplo do título, o qual deve ficar acima: Tabela 1. Estações do INMET selecionadas (sem ponto no final).
 - As figuras não devem ter bordadura e suas curvas (no caso de gráficos) deverão ter espessura de 0,5 pt, e ser diferenciadas através de marcadores de legenda diversos e nunca através de cores distintas. Na existência de figuras coloridas, a exemplo de imagens, haverá um custo adicional para o(s) autor(es). Exemplo do título, o qual deve ficar abaixo: Figura 1. Perda acumulada de solo em função do tempo de aplicação da chuva simulada (sem ponto no final). Para não se tornar redundante, as figuras não devem ter dados constantes em tabelas. Fotografias ou outros tipos de figura deverão ser escaneadas com 300 dpi e inseridas no texto. O(s) autor(es) deverá(ão) primar pela qualidade de resolução das figuras, tendo em vista uma boa reprodução gráfica.

Exemplos de citações no texto

- a) Quando a citação possuir apenas um autor: ... Folegatti (1997) ou ... (Folegatti, 1997).
- b) Quando possuir dois autores: ... Frizzone & Saad (1997), ou ... (Frizzone & Saad, 1997).
- c) Quando possuir mais de dois autores: Botrel et al. (1997), ou (Botrel et al., 1997).

Literatura citada

As referências citadas no texto deverão ser dispostas em ordem alfabética pelo último sobrenome do primeiro autor e conter os nomes de todos os autores, separados por ponto e vírgula. Citações de publicações no prelo ou de comunicação pessoal não são aceitas na elaboração dos artigos devendo, ainda, as citações serem, preferencialmente, de publicações em periódicos dos últimos dez anos, as quais deverão ser apresentadas conforme os exemplos a seguir:

a) Livros

Nããs, I. de A. Princípios de conforto térmico na produção animal. 1.ed. São Paulo: Ícone Editora Ltda, 1989. 183p.

b) Capítulo de livros

Almeida, F. de A.C.; Matos, V.P.; Castro, J.R. de; Dutra, A.S. Avaliação da qualidade e conservação de sementes a nível de produtor. In: Hara, T.; Almeida, F. de A.C., Cavalcanti Mata, M.E.R.M. (eds.). Armazenamento de grãos e sementes nas propriedades rurais. Campina Grande: UFPB/SBEA, 1997. cap.3, p.133-188.

c) Revistas

Pereira, G.M.; Soares, A.A.; Alves, A.R.; Ramos, M.M.; Martinez, M.A. Modelo computacional para simulação das perdas de água por evaporação na irrigação por aspersão. Engenharia Agrícola, Jaboticabal, v.16, n.3, p.11-26, 1997.

d) Dissertações e teses

Dantas Neto, J. Modelos de decisão para otimização do padrão de cultivo em áreas irrigadas, baseados nas funções de resposta da cultura à água. Botucatu: UNESP, 1994. 125p. Tese Doutorado.

e) Trabalhos apresentados em congressos (Anais, Resumos, Proceedings, Disquetes, CD ROMS) Weiss, A; Santos, S.; Back, N.; Forcellini, F. Diagnóstico da mecanização agrícola existente nas microbacias da região do Tijuca da Madre. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 25, e Congresso Latino-Americano de Ingeniería Agrícola, 2, 1996, Bauru. Resumos ... Bauru: SBEA, 1996. p. 130.

No caso de disquetes ou CD Rom, o título da publicação continuará sendo Anais, Resumos ou Proceedings, mas o número de páginas será substituído pelas palavras Disquetes ou CD Rom.

f) WWW (World Wide Web) e FTP (File Transfer Protocol)

Burka, L.P. A hypertext history of multi-user dimensions; MUD history.
<http://www.ccs.neu.edu/home/lpb/mud-history-html>. 10 Nov. 1997.

Outras informações sobre a normatização de artigos

- 1) O título do artigo submetido e os títulos das bibliografias listadas, devem ter apenas a 1ª letra da 1ª palavra maiúscula, com exceção de nomes próprios. O título de eventos deverá ter apenas a 1ª letra de cada palavra maiúscula.
- 2) O nome de cada autor deve ser por extenso apenas o primeiro nome e o último sobrenome, sendo apenas a 1ª letra maiúscula.
- 3) Não colocar ponto no final de palavras-chave, key words e títulos de tabelas e figuras.
- 4) No Abstract, a casa decimal dos números deve ser indicada por ponto em vez de vírgula.
- 5) A Introdução deve ter, preferencialmente, no máximo 2 páginas. Não devem existir na Introdução equações, tabelas, figuras, e texto teórico sobre um determinado assunto.
- 6) Evitar parágrafos muito longos, devendo, preferencialmente, ter no máximo 60 palavras.
- 7) Não deverá existir itálico no texto, em equações, tabelas e figuras, exceto nos nomes científicos das culturas.
- 8) Não deverá existir negrito no texto, em equações, figuras e tabelas, exceto no título do artigo e nos seus itens e sub-itens.
- 9) Em figuras agrupadas, se o título dos eixos x e y forem iguais, deixar só um título centralizado.
- 10) Todas as letras de uma sigla devem ser maiúsculas; já o nome por extenso de uma instituição deve ter maiúscula apenas a 1ª letra de cada nome.
- 11) Nos exemplos seguintes o formato correto é o que se encontra no lado direito da igualdade: 10 horas = 10 h; 32 minutos = 32 min; 5 l (litros) = 5 L; 45 ml = 45 mL; l/s = L s⁻¹; 27°C = 27 °C; 0,14 m³/min/m = 0,14 m³ min⁻¹ m⁻¹; 100 g de peso/ave = 100 g de peso por ave. A % é a única unidade que deve está junta ao número (45%). Quando no texto existirem valores numéricos seguidos, colocar a unidade somente no último valor (Exs.: 20 e 40 m; 56, 82,5 e 90,2%). Quando for pertinente, deixar os valores numéricos com no máximo duas casas decimais.
- 12) O artigo deve ter, preferencialmente, no máximo 25 citações bibliográficas, sendo a maioria em revistas/periódicos e recentes (últimos 5 anos). Seguir rigorosamente os exemplos, apresentados nestas normas, dos formatos das citações bibliográficas no texto e da listagem.

Procedimentos para encaminhamento dos artigos

O autor correspondente deverá cadastrar o artigo através desta página e enviar pelo correio a seguinte documentação:

- a) Carta de encaminhamento declarando que o artigo não foi submetido para

publicação em outro periódico e indicando a área de estudo em que o mesmo se enquadra, contemplada por esta Revista. Nesta carta deverão constar o endereço completo, telefone e email do autor correspondente para contato. Caso o autor correspondente deseje que a Secretaria da Revista lhe envie declaração sobre o recebimento do artigo e/ou fatura referente ao pagamento da taxa de submissão, deverá solicitá-la na carta de encaminhamento, indicando a forma de envio (fax ou endereço).

b) Arquivo em disquete ou CD Rom e quatro cópias impressas do artigo, devendo não constar em três delas o(s) nome(s) do(s) autor(es). Tanto na cópia impressa onde consta(m) o(s) nome(s) do(s) autor(es) como na cópia em arquivo, o nome e endereço do autor correspondente deverão estar em negrito e, também, no final do nome do autor respectivo à fotografia enviada deverá constar: (Foto).

c) Comprovante de cadastro do artigo na página da Revista.

d) Comprovante de depósito (Banco do Brasil, agência 1591-1, C/C 1192-4) ou cheque nominal à ATECEL/RBEAA, referente à taxa de submissão no valor de R\$80,00 (caso o artigo após diagramado tenha um número de páginas superior a seis, será cobrada a taxa de R\$30,00 por página excedente).

e) Fotografia 3x4 do autor principal ou correspondente, preferencialmente em arquivo eletrônico, cujo nome deve ser FOTO NOME DO AUTOR. Fotografia em papel deverá ter o nome do autor atrás.

Outros esclarecimentos sobre o encaminhamento

a) Endereço para encaminhamento Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental Av. Aprígio Veloso 882, Bodocongó, Bloco CM, 1o andar Caixa Postal 10078, CEP 58109-970, Campina Grande, PB

b) Caso o comprovante de pagamento da taxa de submissão não tenha sido enviado junto com o artigo, o mesmo só será protocolado e encaminhado para análise após a Secretaria da Revista ter recebido o referido comprovante, podendo ser enviado através do fax (83) 310 1185 ou pelo email agriambi@agriambi.com.br.

c) O pagamento da taxa de submissão não garante a aceitação do artigo para publicação na Revista e, em caso de sua não aceitação, a referida taxa não será devolvida.

d) O autor correspondente será informado por email sobre o número de protocolo do artigo; daí, então, ele poderá fazer um acompanhamento do processo de análise do artigo através desta página ([Artigos em Análise](#)). Para qualquer informação sobre o andamento do artigo solicitada à Secretaria da AGRIAMBI, o autor deverá fornecer o número de seu protocolo.

Procedimentos para análise de artigos

a) Numa primeira etapa, todos os artigos serão submetidos a pré-seleção e aqueles que não se enquadrarem na política de publicação da Revista ou, ainda, não tragam contribuição científica relevante, serão recusados pela Equipe Editorial, com o auxílio de parecer de um Consultor. Os artigos pré-selecionados poderão, por recomendação

do Consultor, ser devolvidos ao(s) autor(es) para reformulação, antes de serem encaminhados para uma análise mais aprofundada por parte de três Consultores e revisão de idiomas.

b) Com o auxílio dos pareceres e sugestões de Consultores sobre a primeira versão do artigo, a Equipe Editorial poderá recusá-lo ou solicitar ao(s) autor(es) uma segunda versão que, novamente será avaliada, tanto pelos Consultores como pela Equipe Editorial. Em sua segunda versão, o artigo poderá ser recusado, aprovado e/ou devolvido ao(s) autor(es) para uma terceira versão.

c) Salienta-se que, independente dos pareceres dos Consultores, cabe à Equipe Editorial, em qualquer etapa de análise (pré-seleção e seleção - 1a, 2a e 3a versões), a decisão final sobre a aprovação do artigo e o direito de sugerir ou solicitar modificações no texto, julgadas necessárias.

d) A princípio, as sugestões dos Consultores e da Equipe Editorial ao texto dos artigos deverão ser incorporadas pelo(s) autor(es); entretanto, o(s) mesmo(s) tem(êm) o direito de não acatá-las mediante justificativa expressa, que será analisada pelo(s) Consultor(es) e pela Equipe Editorial.

e) No caso de aprovação o artigo é encaminhado para uma nova revisão de idiomas e, antes de sua diagramação, se necessário, serão solicitadas ao autor correspondente informações complementares. Posteriormente, o artigo lhe é enviado na forma de documento pdf, para revisão final, o qual comunicará à Equipe Editorial sobre eventuais correções e alterações. Após a incorporação, pela equipe de editoração, das correções solicitadas, o documento é enviado à gráfica para serviços de fotolito, impressão e encadernação; neste ínterim, os arquivos em formato pdf são disponibilizados no site www.agrambi.com.br.

f) Após publicação, quaisquer erros encontrados por parte de autores ou leitores, quando comunicados à Equipe Editorial, serão corrigidos através de errata no próximo número da Revista.

g) O(s) autor(es) poderá(ao) fazer um acompanhamento do processo de análise do artigo através da página da Revista, verificando sua situação atual, isto é, se se encontra na fase de pré-seleção, com o Consultor ou com o(s) autor(es) ou, ainda, na fase de seleção (versões 1, 2 ou 3), com os consultores, autor(es), Equipe Editorial, ou em diagramação.

h) Sugere-se ao(s) autor(es) que, antes de submeter(em) seu(s) artigo(s), faça(m) uma pré-avaliação dos mesmos, observando os itens constantes nos formulários de pareceres dos Consultores sobre pré-seleção e seleção de artigos, disponibilizados na referida página (www.agriambi.com.br).

Assinaturas

A assinatura anual da Revista custa no Brasil R\$ 70,00 e no exterior US\$ 80.00, dando direito ao assinante receber os números impressos do ano em questão, mas não dispensando o pagamento da taxa de submissão de artigos. O custo individual de um número da Revista é de R\$ 25,00, para o Brasil, e de US\$ 35.00, para o exterior. O pagamento poderá ser efetuado através de cheque nominal a ATECEL/RBEAA ou em depósito na conta: Banco do Brasil, agência 1591-1, C/C 1192-4.

Informações Adicionais

a) Os assuntos, dados e conceitos emitidos nesta Revista, são de exclusiva responsabilidade dos autores. A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de utilização por parte da Revista. A reprodução dos artigos publicados é permitida, desde que seja citada a fonte.

b) Os prazos máximos de devolução de artigos corrigidos por parte do(s) autor(es) são de trinta dias para a 1ª versão e de vinte dias para as 2ª e 3ª versões, a contar da data da correspondência encaminhada ao(s) autor(es) pelo Editor.