



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**



GLAUBER SANTOS PEREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA, RESISTÊNCIA A ANTRACNOSE E PREDIÇÃO DO
POTENCIAL DE POPULAÇÃO SEGREGANTE DE *Phaseolus lunatus***

Rio Largo - AL

2021

GLAUBER SANTOS PEREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA, RESISTÊNCIA A ANTRACNOSE E PREDIÇÃO DO
POTENCIAL DE POPULAÇÃO SEGREGANTE DE *Phaseolus lunatus***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Gildemberg Leal Amorim Junior

Rio Largo – AL
2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

P436d Pereira, Glauber Santos

Diversidade genética, resistência a antracnose e predição de potencial de população segregante de *Phaseolus lunatus*. / Glauber Santos Pereira – 2021.

115 f.; il.

Tese (Doutorado em Proteção de plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Gildemberg Leal Amorim Junior

Inclui bibliografia

1. Feijão-fava. 2. Genética de plantas. 3. Variedades crioulas.
I. Título.

CDU: 635.653

Folha de aprovação

GLAUBER SANTOS PEREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA, RESISTÊNCIA A ANTRACNOSE E PREDIÇÃO
DO POTENCIAL DE POPULAÇÃO SEGREGANTE DE *Phaseolus lunatus***

Tese submetida ao corpo docente do
Programa de Pós-Graduação em Proteção de
Plantas do Campus de Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Alagoas e aprovada
em 25 de agosto de 2021.



Documento assinado digitalmente
Gildemberg Amorim Leal Junior
Data: 25/10/2021 07:58:55-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior – Orientador
CECA/UFAL

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Sarah Jacqueline Cavalcante da Silva – Membro interno
CECA/UFAL



Documento assinado digitalmente
Renata Silva Mann
Data: 06/11/2021 17:04:07-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Renata Silva-Mann – Membro externo
UFS



Documento assinado digitalmente
Marília Freitas de Vasconcelos Melo
Data: 28/10/2021 13:32:56-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Marília Freitas de Vasconcelos Melo – Membro externo
CECA/UFAL

À minha mãe Josanete, por dedicar parte de sua vida, na minha formação pessoal e profissional, pelo amor a mim dedicado e por me proporcionar paz na alma e felicidade na vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso pai, por ser a luz e a força maior que conduz os meus passos em todos os momentos da minha vida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao Prof^ª Dr. Gildemberg Leal Amorim Junior pela confiança, orientação, ajuda, paciência e incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas, pelos ensinamentos e contribuição para minha formação científica.

A minha mãe Josanete, ao meu pai Glaerton, a minha irmã Carla Pereira e sobrinha Emilly Letícia pelo apoio incondicional, amizade e carinho. E a minha avó Maria Pureza por todos os momentos de felicidade e pela inestimável ajuda.

Aos colegas do curso, pela amizade e companheirismo.

Aos membros da banca Examinadora pela disponibilidade e contribuições.

Aos funcionários do CECA/UFAL, pela amizade e profissionalismo.

Aos colegas do programa pela receptividade, acolhimento e grande auxílio durante o desenvolvimento dos trabalhos.

A todas as pessoas que não foram citadas, mas que fizeram parte da minha vida e história, parte do meu presente e que, de alguma forma, contribuíram para o meu futuro.

RESUMO GERAL

A espécie *Phaseolus lunatus* conhecida como feijão fava, feijão-lima ou simplesmente fava é uma leguminosa tropical que possui uma grande diversidade genética e alto potencial de produção por adaptar-se a diversas condições ambientais. A fava está presente na alimentação de diferentes populações por ser uma importante fonte de proteína vegetal. O Brasil é uma área territorial de zona de convergência entre centros de domesticação apresentando elevada diversidade para muitas espécies. Desta forma, é importante conhecer a diversidade presente em sementes comercializadas no Nordeste brasileiro e o quanto elas podem auxiliar no entendimento e melhoria dos germoplasmas quanto à resistência a *Colletotrichum truncatum*. O objetivo do trabalho foi avaliar a diversidade da resistência à antracnose em variedades e verificar a segregação da resistência em cruzamentos contrastantes para a resistência. As variedades foram caracterizadas por parâmetros morfoagronômicos e genéticos a fim de verificar a diversidade e determinar a estrutura genética de 29 genótipos de feijão-fava oriundos de atravessadores ou produtores de Alagoas e Pernambuco. A segregação de caracteres morfoagronômicos e a resistência de duas variedades feijão-fava foram avaliadas em uma progênie (F₂) obtidas de um cruzamento contrastante para resistência a antracnose. No estudo dos 29 genótipos observou-se a diferenciação pela procedência de origem e tipo de sementes. Com o uso dos marcadores moleculares evidenciou-se a presença de três subpopulações sem relação a origem, tipo de semente ou pool genético. Os caracteres relacionados com a produção de nódulos e resistência a *C. truncatum* apresentaram diferença estatística com formação de grupos distintos. No ensaio de cruzamento, a segregação na F₂ evidenciou a a dominância nos caracteres de resistência a antracnose, porte da planta, floração e maturação da semente. Os resultados servirão de base para futuros programas de melhoramento genético da espécie, tendo em vista que é uma etapa fundamental para obtenção de genótipos que atendam a demanda dos produtores.

Palavras-chave: feijão-fava, cruzamento, resistência, interação gênica complementar, variedades crioulas.

ABSTRACT

Phaseolus lunatus, known as Lima bean, Sieva bean or butter bean is a tropical legume with great genetic diversity and high production potential as it adapts to different environmental conditions. Due to its high nutritional value, the bean is present in the diet of different populations as it is an important source of vegetable protein. In Brazil, as it is a convergence zone between domestication centers, there is high diversity. Despite this, little is known about the diversity present in seeds commercialized in Northeastern Brazil and how much they can help understand and improve germplasm in terms of resistance to *Colletotrichum truncatum*. The objective of this work was to evaluate the diversity of resistance to anthracnose in varieties and verify the segregation of resistance in contrasting crosses. The varieties were characterized by morphoagronomic and genetic parameters to verify the diversity and determine the genetic structure of 29 fava bean genotypes from cross-breeders and/or producers in Alagoas and Pernambuco. The segregation of morphoagronomic characters and the resistance of two fava bean varieties were evaluated in one progeny (F₂) obtained from a contrasting cross for anthracnose resistance. In the study of the 29 genotypes, differentiation was observed according to the state of origin and type of seeds. Molecular markers evidenced the presence of three subpopulations unrelated to the provenance, type of seed, or gene pool. The characters related to the production of nodules and resistance to *C. truncatum* showed statistical differences with the formation of distinct groups. In the crossbreeding trial, the segregation in F₂ evidenced the dominance in the anthracnose resistance characters, plant size, flowering, and seed maturation. The results will serve as a basis for future genetic improvement programs for the species in the world, but mainly in Brazil, considering that it is a fundamental step for obtaining genotypes that meet the farmer's demand.

Keywords: lima beans, crossing, resistance, complementary gene interaction, landraces.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Aspectos Econômicos do Gênero <i>Phaseolus</i>	11
2.2 <i>Phaseolus lunatus</i> L.....	12
2.3 Doenças em Feijão-Fava.....	14
2.4 Antracnose – Agente Causal e Sintomatologia.....	14
2.5 Marcadores Moleculares e sua Aplicação na Detecção de Genótipos Tolerantes a Fitopatógenos	17
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
4 DIVERSIDADE GENÉTICA, ESTRUTURA POPULACIONAL E TOLERÂNCIA A <i>Colletotrichum truncatum</i> EM VARIEDADES DE FEIJÃO-FAVA (<i>Phaseolus lunatus</i>).....	26
4.1 Introdução	28
4.2 Material e Métodos	29
4.2.1 Área de estudo e coleta de sementes.....	29
4.2.2 Isolados de <i>C. truncatum</i>	29
4.2.3 Extração de DNA de <i>P. lunatus</i>	30
4.2.4 Amplificação da região ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>).....	30
4.2.5 Análise filogenética	31
4.2.6 Amplificação de <i>primers</i> polimórficos	32
4.2.7 Diversidade e estrutura genética pelos marcadores moleculares.....	32
4.2.8 Caracterização morfoagronômica das variedades.....	33
4.2.9 Variabilidade genética determinada a partir dos dados morfoagronômicos.....	35
4.2.10. Avaliação <i>in vitro</i> da resposta de resistência a <i>C. truncatum</i>	36
4.2.11 Nodulação espontânea dos genótipos	37
4.3 Resultados.....	39
4.3.1 Obtenção das variedades.....	39
4.3.2 Análise filogenética	41
4.3.3 Diversidade e estrutura genética baseada nos marcadores moleculares	43

4.3.4. Análise de Diversidade Baseada em Parâmetros Quanti-Qualitativos	46
4.3.5 Ensaio <i>in vitro</i> de resistência a <i>Colletotrichum truncatum</i>	54
4.3.6 Nodulação	58
4.4 Conclusão.....	68
4.5 Referências Bibliográficas	69

7. PREDIÇÃO DO POTENCIAL DE RESISTÊNCIA A *Colletotrichum truncatum* EM SEGREGANTES DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus*)..... 77

7.1 Introdução	79
7.2 Material e Métodos	82
7.2.1 Material genético	82
7.2.2 Isolado de <i>C. truncatum</i>	83
7.2.3 Realização das hibridações	83
7.2.4 Obtenção das gerações F ₁ e F ₂	85
7.2.7 Caracterização morfoagronômica	85
7.2.9 Análise estatística	88
7.2.5 Preparo da suspensão de conídios de <i>c. truncatum</i> para a análise de patogenicidade..	89
7.2.6 Inoculação <i>in vivo</i> de <i>P. lunatus</i> com <i>C. truncatum</i>	90
7.3 Resultados.....	90
7.3.2 Avaliação de resistência a antracnose.....	91
7.3.3 Avaliação da F ₂ para parâmetros qualitativos e quantitativos	94
7.3.4 Avaliação da F ₂ para parâmetros dos grãos	102
7.3.5 A análise de dissimilaridade euclidiana com dados morfagronômicos, morfologia de sementes e resistência.	104
7.4. Discussão	107
7.5 Conclusão.....	110
7.6 Referências Bibliográficas	111

1 INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), pertencente à família Fabaceae, é a segunda espécie de maior importância do gênero *Phaseolus*, sendo cultivada em muitos países tropicais. Possui elevada diversidade, adaptabilidade, rusticidade e requer pouca umidade quando comparada ao feijão comum (*P. vulgaris*). A espécie possui maior tolerância ao calor, o que permite que a colheita seja realizada em períodos de estiagem. É considerada uma importante fonte de proteína para populações rurais da América do Sul e África, e no México está entre as principais culturas tradicionais do país. No Brasil, possui grande relevância, sendo alternativa alimentar e de renda para a população que vive da agricultura familiar ou de subsistência.

A cultura do feijão-fava apresenta limitantes que reduzem a produtividade, atribuída ao fato de parte da produção ser oriunda de pequenos produtores que o plantam em consórcios com outras culturas, sem a adoção de tecnologia que vise o aumento da produtividade. Além disso, a ocorrência de doenças também tem sido apontada como um dos fatores de redução da produtividade e da qualidade da fava produzida. Entre essas doenças, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore, tem se destacado entre as doenças fúngicas frequentemente encontradas em plantios de feijão-fava no Brasil. No geral, o método eficiente de controle do patógeno é a utilização de plantas resistentes devido ao menor custo benefício, não ser competitivo e não poluente. No entanto, para o patossistema *Colletotrichum*-Fava ainda não existe cultivar resistente disponível para a comercialização.

A primeira etapa básica em qualquer programa de obtenção e utilização de cultivares resistentes é identificar fontes de resistência, ou seja, identificar germoplasma que possua os genes de resistência de interesse. O conhecimento da diversidade entre os indivíduos possibilita o gerenciamento da variabilidade genética disponível, por meio da escolha dos genitores a serem utilizados nos cruzamentos, podendo-se assim maximizar a heterose. Desta forma, avaliar a reação do germoplasma de feijão-fava à antracnose é importante para auxiliar no desenvolvimento de cultivares com maior resistência a essa doença, uma vez que, os investimentos em pesquisa e desenvolvimento para essas leguminosas é fator fundamental para o crescimento da cadeia produtiva.

A pesquisa continuada é imprescindível para a produtividade, manejo, conhecimento da cultura e desenvolvimento de novas cultivares adaptadas para cada

região do país. Avanços na sustentabilidade e competitividade são alcançados com inovações e adaptações que passam pelas sementes, plantio, manejo, colheita, armazenagem e distribuição.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

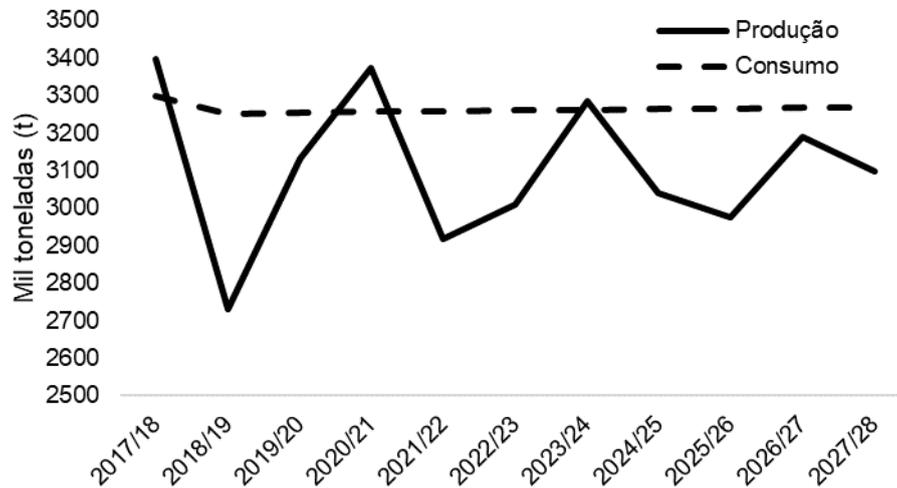
2.1 Aspectos Econômicos do Gênero *Phaseolus*

O gênero *Phaseolus* constitui um dos mais importantes gêneros da família Fabaceae com cerca de 75 espécies, das quais cinco se destacam pela importância econômica: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* e *P. polyanthus* (Broughton et al., 2003). Entre essas espécies, o feijão comum (*P. vulgaris*) se destaca como a principal fonte de alimento para diversas populações, principalmente da África e América Latina (ACOSTA-GALLEGOS et al., 2007).

Os maiores produtores mundiais de feijão, em ordem, são Myanmar, Índia, Brasil, Estados Unidos, México e Tanzânia, responsáveis por 56,99% do total produzido no mundo, ou 15,3 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2019). O consumo reduzido nos países mais desenvolvidos e o fato dos grandes produtores mundiais serem também os maiores consumidores gera poucos excedentes exportáveis, limita o conhecimento do mercado e, conseqüentemente, o comércio internacional do produto (CONAB, 2021). Fato este que, setenta por cento dos brasileiros consomem feijão diariamente, atingindo um consumo médio por pessoa de 17 (dezesete) quilos por ano deste grão que é o símbolo da culinária brasileira (BRASIL, 2018).

O feijão (*P. vulgaris*) representa a principal fonte de proteína vegetal. Com mudanças de hábitos de consumo, acredita-se que uma parcela crescente da população que estará buscando alimentos mais saudáveis, estará valorizando o consumo de alimentos como o feijão (BRASIL, 2018). As projeções apontam que a partir de 2024, a demanda para consumo de feijão excederá a quantidade produzida necessitando de outras fontes alimentares que contenham níveis nutricionais semelhantes (Figura 1).

Figura 1. Projeções de produção e consumo de feijões



Fonte: CGEA/DCEE/SPA/MAPA e SIRE/Embrapa com dados da CONAB.

A confirmação das projeções de produção criará a necessidade de importação de feijão nos próximos anos (CONAB, 2018). Nesse contexto, o feijão-fava aliada ao feijão comum pode ser considerados uma alternativa capaz de suprir e equiparar produção e consumo devido a sua versatilidade e adaptabilidade. O *P. lunatus* é a segunda cultura do género *Phaseolus* mais cultivada do mundo.

2.2 *Phaseolus lunatus* L.

O feijão-fava (*P. lunatus* L.), uma das cinco espécies cultivadas do género *Phaseolus*, é uma leguminosa tropical caracterizada por elevada diversidade genética e elevado potencial de produção, que se adaptam às mais diferentes condições ambientais, mas desenvolvem-se melhor nos trópicos úmidos e quentes (MAQUET et al., 1999), sendo amplamente distribuída pelas Américas (GUTIÉRREZ-SALGADO et al., 1995). Seu processo de domesticação aconteceu entre 8.000 e 10.000 anos atrás (ANDUEZA-NOH et al., 2016), e inúmeras pesquisas arqueológicas apontam como centro de origem para a forma cultivada da espécie a região central da Mesoamérica, e mais precisamente a Guatemala (CHACÓN-SÁNCHEZ & MARTÍNEZ-CASTILLO, 2017).

A cultura adapta-se melhor em solo areno-argiloso, fértil e bem drenado, tendo bom rendimento com pH entre 5,6 e 6,8, mas tolera as mais diversas condições ambientais, sendo considerado mais tolerante à seca que o *P. vulgaris*, feijão-comum (VIEIRA, 1992).

Phaseolus lunatus é uma espécie pluriannual, predominantemente autógama, com aproximadamente 10% de taxa de cruzamento natural (HARDY et al., 1997). Possuem cromossomos pequenos, variando de 1,7 a 3,5 μm , todos do tipo metacêntrico (MOSCONE et al., 1999) totalizando 11 cromossomos (MERCADO-RUARO & DELGADO-SALINAS, 1998). O hábito de crescimento pode ser indeterminado trepador, com o desenvolvimento da gema terminal em uma guia, ou determinado anão com desenvolvimento completo da gema terminal em uma inflorescência (BEYRA; ARTILES, 2004). As variedades de hábito de crescimento determinado têm pouca variação quanto ao tipo de planta e ciclo biológico (SANTOS et al., 2002).

As folhas são trifoliadas e mais escuras que as encontradas em outras espécies do mesmo gênero, mesmo depois do amadurecimento da vagem (SANTOS et al., 2002). As vagens são compridas, achatadas, recurvadas, coriáceas, pontiagudas, às vezes, deiscentes, apresentando, em média, de duas a quatro sementes. As sementes exibem grande variação de coloração e tamanho sendo fatores determinantes para explicação da origem e diversidade genética dessa espécie (VARGAS et al., 2003).

A inflorescência apresenta-se em forma de racemo e, algumas vezes de diferentes tamanhos, mas geralmente, maiores que as folhas e com muitas flores que podem ser brancas, branco-amareladas, róseas, púrpuras ou violetas ou com tonalidades intermediárias entre essas duas últimas, sendo menores que 10 mm. As brácteas podem ser oblongo-ovaladas e seu comprimento pode variar de 1 a 2 mm (BEYRA E ARTILES, 2004). Uma característica marcante que a distingue o feijão-fava de outros feijões, são as linhas que se irradiam do hilo para a região dorsal das sementes, mas em algumas variedades essas linhas podem não ser tão facilmente observadas (VIEIRA, 1992).

A fava apresenta propriedades nutricionais importantes por ser fonte de proteínas e fibras, além de conter ferro, manganês, ácido fólico e vitaminas A, B e C (DE MORAES et al., 2017). As folhas, as vagens verdes e os grãos verdes ou secos do feijão-fava podem ser utilizados para alimentação humana com elevado potencial para o fornecimento de proteína vegetal (VIEIRA, 1992). Além disso, pode ser utilizado também como adubo verde (PEGADO et al., 2008), adaptando-se às mais diversas condições ambientais, desenvolvendo-se melhor nos trópicos úmidos e quentes (VIEIRA, 1992). Geralmente consumidos os grãos secos ou verdes como fonte de proteína para complementar a alimentação. Nos países ocidentais, as sementes secas podem ser cozidas e consumidas (KAHLON et al., 2005) As vagens e grãos verdes são consumidas em saladas e sopas.

No Brasil, são cultivados em regime de sequeiro, com pouco uso de tecnologias, por

agricultores familiares, resultando em baixos índices de produtividade, e grande oscilação na produção. A sensibilidade do feijão-fava ao déficit hídrico no solo e as incertezas climáticas, principalmente as relacionadas às variações pluviométricas entre anos e locais de cultivo determinam esses baixos índices de rendimento e oscilação da produção anual desta cultura (OLIVEIRA et al. 2014).

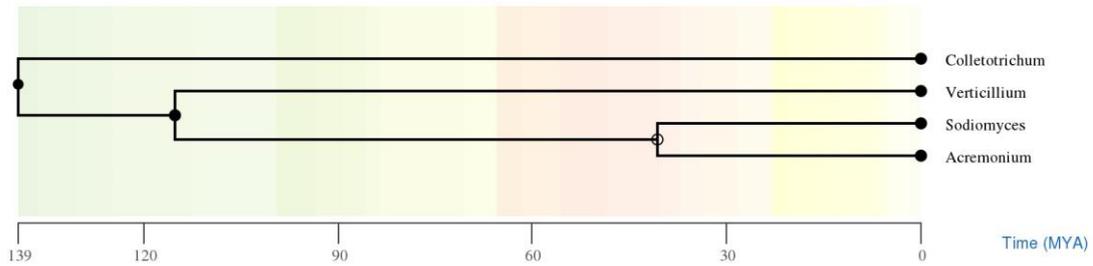
2.3 Doenças em Feijão-Fava

Existe descritos na literatura, uma considerável diversidade de organismos que afetam o feijão-fava a citar: vírus (ABARSHI et al., 2017), micoplasmas (IPGRI, 2001), bactérias (CAFATI et al., 1980) e fungos (DAVIDSON et al., 2002). Em zonas temperadas, o míldio causado pelo fungo *Phytophthora phaseoli* Thaxt é a mais importante doença fúngica (EVANS et al., 2002). A perda causada por tal patógeno chega a 40% que convertido em moeda internacional pode atingir 3 milhões de dólares (DAVIDSON et al., 2008). A ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi*) também causa danos à fava que comparado com outras espécies de feijões promove maior número de lesões (BONDE et al., 2008) evidenciando capacidade de infectar diversas leguminosas (SLAMINKO et al., 2008). No Brasil, a antracnose é a mais presente das doenças em feijão-fava. Originada por um complexo *Colletotrichum*, tem afetado os plantios da cultura (CAVALCANTE et al., 2012).

2.4 Antracnose – Agente Causal e Sintomatologia

A antracnose, está entre as doenças de maior importância para muitas plantas cultivadas (JAYAWARDENA et al., 2016; DIAO et al., 2017) principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, predominando em condições de alta umidade (BLACK et al., 1991). Estima-se que o gênero *Colletotrichum* (Sordariomycetes, Ascomycota) surgiu na terra a 139 milhões de anos atrás (Figura 2), encontrando condições ambientais favoráveis para seu estabelecimento. Enquanto o processo de formação de novas espécies do gênero se deu a 54 milhões de anos atrás compreendendo o período cenozóico (KUMAR et al., 2017). Atualmente, um amplo estudo realizado com base em uma abordagem polifásica determinou que existem 248 espécies atualmente aceitas as quais estão distribuídas em 14 espécies complexo e 13 espécies únicas. (JAYAWARDENA, et 2021).

Figura 2. Escala evolutiva no gênero *Colletotrichum*.



Fonte: <http://www.timetree.org/>

As espécies de *Colletotrichum* podem naturalmente ser categorizadas como necrotróficos, hemibiotróficos, latentes ou quiescentes e endofíticos. O ciclo de vida hemibiotrófico é o mais comum (AUYONG et al., 2012; BARIMANI et al., 2013). Tais patógenos usam estratégia de infecção hemibiotrófica que acontece em múltiplos estágios. Primeiro acontece à formação de uma cúpula apressora usando uma combinação de força mecânica e degradação enzimática para penetrar na célula, em seguida acontece à formação de hifas biotróficas bulbosas envoltas por uma membrana plasmática hospedeira intacta dentro da célula epidérmica, e, finalmente, o fungo muda para necrotrofia e diferencia hifas finas e crescimento rápido que matam e destroem os tecidos do hospedeiro (O'CONNELL et al., 2012). A característica da ação parasítica corresponde à lesão foliar ou podridão de frutos e/ou caule gerando grandes perdas econômicas em culturas, hortaliças e árvores frutíferas em todo o mundo (LIANG et al., 2018).

O patógeno é disseminado a longas distâncias por sementes infectadas e, dentro da cultura, por respingos de água de chuva ou irrigação por aspersão. A infecção e o desenvolvimento de sintomas desta doença podem ocorrer em todos os órgãos aéreos da planta, desde o início de seu desenvolvimento, podendo causar tombamento de pré e pós-emergência (BLACK et al., 1991). Em folhas e ramos, os sintomas são evidenciados pela presença de pequenas lesões necróticas de contornos circulares a alongados.

Nos frutos, os sintomas são caracterizados por lesões necróticas deprimidas, geralmente de forma circular. No centro dessas lesões, em condições ambientais favoráveis, surge uma massa mucilaginosa rosada contendo os conídios (KUROZAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005). Quando a doença ocorre no campo, os frutos infectados não caem e as lesões permanecem firmes, a não ser que haja invasão de organismos secundários que acelerem a sua deterioração (LOPES; ÁVILA, 2003).

Em feijão-fava, *Colletotrichum* spp. é considerado o patógeno de maior influência no Brasil (CARVALHO et al. 2015). Os sintomas da antracnose no feijão-fava começam com manchas avermelhadas ao longo das veias no lado adaxial das folhas e nos ramos jovens e pecíolos. Nas vagens, as lesões são deprimidas, grandes e avermelhadas, com desenvolvimento de acérvulos. Lesões avermelhadas e necróticas também podem ser vistas no hipocótilo, pecíolo e superfície foliar, resultando em folhas enrugadas (BALLHORN et al. 2010; CARVALHO et al. 2015). Até recentemente, a antracnose do feijão-fava tem sido atribuída exclusivamente ao *Colletotrichum truncatum* em todo o mundo, incluindo o Brasil (CAVALCANTE et al. 2012).

O *C. truncatum*, que tem conídios curvos, foi descrito pela primeira vez em associação com a antracnose do feijão-fava nos Estados Unidos (ANDRUS E MOORE, 1935). A espécie faz parte do Complexo *Colletotrichum truncatum*, que além de *C. truncatum* tem outras 4 espécies (*C. curcumae*, *C. jasminigenum*, *C. acidiae* e *C. fusiforme*). No Brasil, um complexo de espécies de *Colletotrichum* foi relatado causando antracnose (SOUZA et al., 2018). *C. dematium* f. sp. *truncata* foi relatada em associação com a antracnose do feijão-fava em Minas Gerais (PAULA JÚNIOR et al. 1995). No nordeste do Brasil, três espécies diferentes causam antracnose em feijão-fava: *C. sichuanensis* (CAVALCANTE et al. 2018), *C. plurivorum* e *C. lobatum*. *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. fructicola*, *C. lobatum*, *C. musicola*, *C. plurivorum*, *C. truncatum*. O *C. truncatum* é a mais prevalente e virulenta (CAVALCANTE et al., 2019).

O fato de várias espécies de *Colletotrichum* serem patogênicas a um mesmo hospedeiro é algo comum, assim como é comum uma mesma espécie causar sintomas em vários hospedeiros. Por exemplo, tanto *C. fructicola* como *C. siamense* são relatados causando doença em pimenta, café, pitaya, entre outras frutas e hortaliças (SHARMAN; SHENOY, 2014; PRIHASTUTI et al., 2009; PHOULIVONG et al., 2010). Devido às diferenças existentes entre as espécies de *Colletotrichum*, há grande dificuldade no desenvolvimento de medidas de controle da antracnose quando esta é causada por mais de uma espécie. Estudos de resistência genética de acessos de *Capsicum* spp. à antracnose, observou-se o comportamento patogênico diferenciado de isolados de *C. acutatum*, *C. capsici* e *C. gloeosporioides*, o que poderia estar relacionado com o fato da resistência ser independente para estas espécies (GNIFFKE, 2003). Desta forma, a ocorrência dessas espécies simultaneamente pode dificultar a seleção de cultivares de fava resistente à doença.

Também foi demonstrado haver diferenças na sensibilidade entre algumas espécies do gênero *Colletotrichum* para vários fungicidas sistêmicos e protetores (PERES et al., 2004,

CHUNG et al., 2006; GREER et al., 2011), fato que pode prejudicar a eficiência do controle químico. Desta maneira, por se tratar de um patossistema de grande complexidade, o sucesso no controle da antracnose é um desafio e depende da seleção de genótipos superiores tolerantes a antracnose.

2.5 Marcadores Moleculares e sua Aplicação na Detecção de Genótipos Tolerantes a Fitopatógenos

Os marcadores morfológicos têm sido utilizados para a identificação de genótipos desde o século XIX. Mapas de ligação genética para as culturas do milho (*Zea mays* L.) (COE & NEUFFER, 1993) e do trigo (*Triticum aestivum* L.) (HART *et al.*, 1993), entre outros, têm sido desenvolvidos com a utilização desta tecnologia. Atualmente, a caracterização morfológica ou agrônômica de genótipos candidatos à seleção, bem como os estudos de diversidade genética e estimação dos valores genéticos dos indivíduos são fundamentais para selecionar aqueles portadores de alelos favoráveis (FARIAS NETO et al., 2013).

Informações morfológicas analisadas por métodos estatísticos aprimorados são uma das formas de aumentar a eficiência da seleção fenotípica. No entanto, o processo de seleção em plantas permanece demorado e oneroso, principalmente se as características avaliadas são expressas em estádios tardios do desenvolvimento da planta (RESENDE et al. 2012). Embora estudos baseados em dados morfológicos e/ou fisiológicos tenham contribuído consideravelmente na elucidação de genótipos tolerantes, a utilização de ferramentas biotecnológicas, como os marcadores moleculares, foi proposta como forma de minimizar estes entraves.

Define-se como marcador molecular qualquer fenótipo molecular proveniente de um segmento específico de DNA, que pode ser expresso ou não em um caracter (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). O princípio da utilização desses marcadores baseou-se no pressuposto de que diferenças genéticas denotam, na maioria das vezes, diferenças fenotípicas facilmente observadas ou não (FALEIRO, 2007). Entre as vantagens dos marcadores, pode-se citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos e a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente e em qualquer estágio do ciclo de vida (FALEIRO, 2007; GÓES-NETO, 2007).

Os marcadores moleculares são fundamentais na elucidação de pesquisas em genética de populações, evolução molecular e seleção assistida por marcadores. A maioria dos marcadores moleculares utilizam a técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para

amostragem da região do DNA alvo pela síntese exponencial de fragmento de DNA simulando o mecanismo celular de duplicação (ASUAR, 2007),

Os diferentes marcadores têm poder discriminatório específico, vantagens e limitações. Também podem ser considerados mais ou menos apropriados dependendo do tipo de estudo a ser desenvolvido e das questões a serem respondidas. De maneira geral, as características desejáveis para marcadores utilizados na identificação de isolados, em estudos filogenéticos e de populações são a estabilidade, reprodutibilidade, e apresentar dados armazenáveis para comparação e transferência entre laboratórios. Apesar das variadas contribuições das técnicas moleculares atuais, um método único, padronizado entre laboratórios ainda não existe. Tal fato impede a reunião e comparação de dados, limitando correlações (BOITÉ, 2014). Assim, busca-se, através de um marcador comum, reunir dados de diferentes regiões, gerados por laboratórios distintos, e cobrir assim maior parte da diversidade do gênero *Phaseolus* em nível regional e mundial. Uma vez estabelecido, um sistema molecular de identificação e tipagem integrado pode contribuir: i) para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico direto a partir de polimorfismos específicos; ii) para estudos de correlação entre genótipos com fenômenos evolutivos; iii) para avaliar a estrutura da população em relação à diversidade e recombinação genética pela presença de heterozigotos e de alelos parentais na população estudada; e iv) promover a revisão taxonômica do gênero através de uma abordagem baseada em sequências de DNA.

2.5.1 Marcadores ITS- *Internal Transcribed Spacer*

A região ITS é uma região variável flanqueada por uma região altamente conservada que é o rDNA, o gene que codifica a síntese das unidades de RNA que compõem os ribossomos. A região tem sido utilizada para a sistemática de uma grande diversidade de organismos, sendo utilizada preferencialmente a região do cistron gênico, que é o espaçador interno transcrito (ITS - *Internal Transcribed Spacer*). A região apresenta algumas vantagens para os estudos de diversidade e filogenia. Primeiramente o tamanho, a região ITS1, a região codificante da unidade 5.8S e a região ITS4 estão localizados entre as regiões codificantes da sub-unidade menor e sub-unidade com um tamanho de aproximadamente 500 a 1 kb, possibilitando a chance de obtenção de dados de uso filogenético. Segundo, a presença universal em todos os organismos vivos, à exceção dos vírus, o que permite a comparação e estudo filogenético da diversidade de organismos de todos os reinos conhecidos, o que não é possível com qualquer outro método de estudo. Terceiro, a presença em grande quantidade de

cópias do gene que codifica para o RNA ribossomal, sendo este a maior parte do RNA produzido pela célula, contendo no cistron muitas repetições em sequência, que evoluem geralmente em conjunto. Quarta vantagem, a pressão seletiva de conservação de sequências, exceto aquelas que são transcritas, mas não codificadas, como é o caso das regiões ITS permite estabelecer diferenças específicas e sub-específicas flanqueadas por sequências conservadas onde iniciadores (*primers*) podem ser desenhados para amplificação dentro do gênero e categorias taxonômicas mais elevadas. A última vantagem é a quantidade de informações já geradas dispostas em bancos de dados, que permitem análise filogenética entre os vários organismos (LI & GRAUR, 1991; MATIOLI, 2001).

Estudos filogenéticos em variados níveis taxonômicos de *Phaseolus lunatus* têm sido realizados e demonstraram que a região intergênica do primeiro espaçador transcrito interno (ITS-1) é importante para se encontrar associações de taxon as quais evoluíram há menos de 50 milhões de anos. A região intergênica do segundo espaçador transcrito interno (ITS-2) apresenta-se mais conservada, sendo adequada ao estudo de taxa mais distantes evolutivamente (SERRANO-SERRANO et al., 2010). Os “*primers*” utilizados no estudo se baseiam nessas sequências, sendo o “*primer*” ITS1 a sequência conservada da extremidade 3’ terminal e o “*primer*” ITS4 a sequência 5’ terminal (GOEL et al., 2002).

2.5.2 Marcadores *Long Terminal Repeat* e *Universal Rice Primers*

Retrotransposons se movimentam através de um intermediário de RNA que é codificado para DNA por uma transcriptase reversa, produzida por eles mesmos, antes da sua nova inserção. Esta ainda se subdivide em retrotransposons com LTRs (Ty1-copia e Gypsy-Ty3), que são semelhantes ao retrovírus, e os retrotransposons sem LTRs (LINEs e SINEs) do inglês *Long Interspersed Elements* e *Short Interspersed Elements*, respectivamente. *Long Terminal Repeat* são retrotransposons com elementos estruturalmente similares aos retrovírus e possuem longas repetições nucleotídicas nas extremidades 5’ e 3’ da molécula de DNA. De uma maneira geral, estas repetições terminais flanqueiam uma região central que contém três módulos abertos de leitura conhecidos por ORFs, do inglês *Open Reading Frames*. A sequência das ORFs pode variar entre os elementos deste grupo. A primeira ORF refere-se ao gene *gag* que produz uma poliproteína que é processada em três proteínas maduras: a matriz, o capsídeo e o nucleocapsídeo. A outra ORF constitui-se do gene *pol* que codifica as enzimas necessárias à transposição do elemento: protease (Pr), transcriptase reversa (TR), RNaseH e integrase (Int). A última ORF está presente em algumas famílias desta classe, podendo ou não

produzir uma proteína funcional: ela corresponde ao gene *env*, que codifica a proteína do envelope viral nos retrovírus (GRIFFITHS et al. 2008).

Universal Rice Primer – PCR (URP – PCR) é uma técnica de amplificação que foi desenvolvida com base na sequência repetitiva pKRD, isolada de uma biblioteca construída com amostras de DNA genômico de arroz *Weddy*, ou arroz vermelho. Esta técnica permite a amplificação de regiões inespecíficas do DNA de procariotos e eucariotos através do uso de diferentes *primers* que possuem 20 nucleotídeos. Cada *primer* pode gerar perfis de amplificação característicos possibilitando o estudo de diversidade em níveis inter e intraespecíficos (KANG et al., 2002). Utilizando os primers URP é possível produzir fragmentos que são característicos de espécies ou de linhagens e que podem ser estudados para desenvolver uma reação de amplificação com primers específicos (AGGARWAL et al., 2011; KANG et al., 2002).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARSHI, M. M.; ABUBAKAR, A. L.; GARBA, A.; MADA, S. B.; IBRAHIM, A. B.; MARUTHI, M. N. Molecular detection and characterisation of *Horsegram Yellow Mosaic Virus* (HgYMV) infecting Lima bean (*Phaseolus lunatus*) in India. **Nigerian Journal of Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 41-48, 2017.
- ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; KELLY, J. D.; GEPTS, P. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. **Crop Science**, v. 47, n. Supplement_3, p. S-44-S-59, 2007.
- AGGARWAL, R.; GUPTA, S.; BANERJEE, S.; SINGH, V. B. Development of a SCAR marker for detection of *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch of wheat. **Canadian journal of microbiology**, v. 57, n. 11, p. 934-942, 2011.
- ANDUEZA-NOH, R. H.; CAMACHO-PÉREZ, L.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; MAY-PAT, F. Distribución geográfica de los parientes silvestres del acervo genético mesoamericano del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) en México. **Polibotánica**, n. 41, p. 101-113, 2016.
- ANDRUS, C. F.; MOORE, W. D. *Colletotrichum truncatum* (Schw.), n. comb., on garden and lima beans. **Phytopathology**, v. 25, p. 121-125, 1935.
- ASUAR, L. E. **Guía práctica sobre la técnica de PCR**. Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología, 574p, 2007.
- AUYONG, A. S. M.; FORD, R.; TAYLOR, P. W. J. Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum* associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 372-382, 2012.
- BARIMANI, M.; PETHYBRIDGE, S. J.; VAGHEFI, N.; HAY, F. S.; TAYLOR, P. W. J. A new anthracnose disease of pyrethrum caused by *Colletotrichum tanacetii* sp. nov. **Plant Pathology**, v. 62, n. 6, p. 1248-1257, 2013.
- BLACK, L.L.; GREEN, S.K.; HARTMAN, G.L.; POULOS, J.M. **Pepper diseases: a field guide**. Tainan: AVRDC, p. 98, 1991.
- BOITÉ, M. C. **Desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares para estudos taxonômicos, genéticos e epidemiológicos em *Leishmania* (Viannia)**. Tese (Doutorado), Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro – RJ, 2014. 118 p.
- BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; BERNER, D.K.; FREDERICK, R.D.; MOORE, W.F.; LITTLE, S. Comparative susceptibilities of legume species to infection by *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, v.92, n.1, p.30-36, 2008.
- BRASIL, Federativa; BRASÍLIA, D. F. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano nacional de desenvolvimento da cadeia do feijão e pulses**, 2018.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 projeções de longo prazo / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Política Agrícola. – Brasília: MAPA/ACE, p.112, 2018.
- BROUGHTON, W. J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.
- CAFATI, C. R.; SAETTLER, A. W. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* in seed of resistant and susceptible *Phaseolus* genotypes. **Phytopathology**, v. 70, n. 7, p. 638-640, 1980.
- CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum*–current status and future directions. **Studies in mycology**, v. 73, p. 181-213, 2012.
- CAVALCANTE, G. R.; BARGUIL, B. M.; VIEIRA, W. A.; LIMA, W. G.; MICHEREFF, S. J.; DOYLE, V. P.; CÂMARA, M. P. Diversity, Prevalence, and Virulence of *Colletotrichum* Species Associated with Lima Bean in Brazil. **Plant disease**, p. PDIS-11-18-2002-RE, 2019.
- CAVALCANTE, G. R. D. S.; CARVALHO, E. M. S.; GOMES, R. L. F.; SANTOS, A. R. B.; SANTOS, C. M. P. M. Lima Bean subsample reaction to anthracnose. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 4, p. 329-333, 2012.
- CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Testing domestication scenarios of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Mesoamerica: insights from genome-wide genetic markers. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1551, 2017.
- CHEN, Y.; HUANG, X. J.; LIU, K. Y.; CHEN, H.; CHEN, Y. H.; ZHANG, X. H.; WANG, Y.; WANG, F. R. I.; HAN, W.; WANG, J. Z.; YAN, CH, X. U. L. P. Association between C-reactive protein levels in the first 1–3 days post-transplant and allogeneic immune reactions. **Biomarkers in medicine**, v. 11, n. 2, p. 117-124, 2017.
- CHUNG, W. H.; ISHII, H.; NISHIMURA, K.; FUKAYA, M.; YANO, K.; KAJITANI, Y. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. **Plant Disease**, v. 90, n. 4, p. 506-512, 2006.
- COE, E. H.; NEUFFER, M. G. Gene loci and linkage map of corn (maize) (*Zea mays* L.) (2n = 20). O'BRIEN, S.J. **Genetic Maps**. New York: Cold Spring Harbor, p. 157-156, 1993.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 8°. **Levantamento da safra brasileira de grãos 2017/2018**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 13 ago. 2019.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Perspectivas para a agropecuária**. Vol. 5, safra 2017/2018, Produtos de Verão. Brasília: 2017. Disponível em: https://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_06_09_30_08_perspectivas_da_agropecuaria_bx.pdf. Acesso em: 13 ago. 2019.
- DANTAS, A. C. M.; NODARI, R. O. **Marcadores Genéticos**. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2006.
- DAVIDSON, C.R.; CARROLL, R.B.; EVANS, T.A.; MULROONEY, R.P.; KIM, S.H. First Report of *Phytophthora capsici* Infecting lima bean (*Phaseolus lunatus*) in the midatlantic region. **Plant Disease**, v.86, n.9, p.1049, 2002.

- DAVIDSON, C.R.; EVANS, T.A.; MULROONEY, R.P.; GREGORY, N.F.; CARROLL, R.B.; O'NEILL, N.R. Lima bean downy mildew epiphytotics caused by new physiological races of *Phytophthora phaseoli*. **Plant Disease**, v.92, n.5, p. 670-674, 2008.
- DE ALMEIDA LOPES, A. C.; DE ARAÚJO, A. S. F.; GOMES, R. L. F. (Ed.). **Phaseolus lunatus: diversity, growth and production**. Nova Publishers, 2015.
- DIAO, Y. Z.; ZHANG, C.; LIU, F.; WANG, W. Z.; LIU, L.; CAI, L.; LIU, X. L. Colletotrichum species causing anthracnose disease of chili in China. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 38, p. 20, 2017.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.
- FAOSTAT. **Crops**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 13 ago. 2019.
- FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. **Fungal Databases**, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved August 17, 2019, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/>
- FARIAS NETO, J. T.; CLEMENT, C. R.; RESENDE, M. D. V. Estimativas de parâmetros genéticos e ganho de seleção para produção de frutos em progênies de polinização aberta de pupunheira no Estado do Pará, Brasil. **Bragantia**, v. 72, n. 2, p. 122-126, 2013.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 1996.
- GNIFFKE, P. Host resistance to pepper anthracnose. **Progress Report. Shanhua, Taiwan: AVRDC–The World Vegetable Center**, 2003.
- GOEL, S.; RAINA, S. N.; OGIHARA, Y. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA in the Phaseolus–Vigna complex. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 22, n. 1, p. 1-19, 2002.
- GÓES-NETO, A. Amostragem de fungos para estudos de filogenia molecular e código de barras de DNA. In: LC, Maia; E, Malosso; AM, Yano-Melo (orgs). **Micologia: avanços no conhecimento. Livros de Resumos do V Congresso Brasileiro de Micologia**. Ed. Universitária da UFPE, Recife, p. 197-201, 2007.
- GREER, L. A.; HARPER, J. D.; SAVOCCHIA, S.; SAMUELIAN, S. K.; STEEL, C. C. Ripe rot of south-eastern Australian wine grapes is caused by two species of Colletotrichum: *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* with differences in infection and fungicide sensitivity. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 17, n. 2, p. 123-128, 2011.
- HART, G.E.; GALE, M. D.; McINTOSH, R.A. Linkage maps of *Triticum aestivum* (hexaploid wheat, 2n = 42, genomes A, B, and D) and *T. Tauschii* (2n = 14, genome D). In: O'BRIEN, S.J. **Genetic Maps**, New York: Cold Spring Harbor, 1993. p. 204-206.
- HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; LUMBSCH, H. T. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HYDE, K. D.; NILSSON, R. H.; ALIAS, S. A.; ARIYAWANSA, H. A.; BLAIR, J. E.; CAI, L.; GORCZAK, M. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 21-125, 2014.

IPGRI, ECP; GR, AVRDC. Descritores para *Phaseolus lunatus* (Feijão-espadinho). **International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy**, v. 6, 2001.

JAYAWARDENA, R. S.; HYDE, K. D.; DE FARIAS, A. R. G.; BHUNJUN, C. S.; FERDINANDEZ, H. S.; MANAMGODA, D. S.; THINES, M. What is a species in fungal plant pathogens? **Fungal Diversity**, p. 1-28, 2021.

KAHLON, T. S.; SMITH, G. E.; SHAO, Qiming. *In vitro* binding of bile acids by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), black gram (*Vigna mungo*), bengal gram (*Cicer arietinum*) and moth bean (*Phaseolus aconitifolius*). **Food chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 241-246, 2005.

KANG, H. W.; PARK, D. S.; GO, S. J.; EUN, M. Y. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. **Molecules and cells**, v. 13, n. 2, p. 281-287, 2002.

KUMAR, S.; STECHER, G.; SULESKI, M.; HEDGES, S. B. TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. **Molecular biology and evolution**, v. 34, n. 7, p. 1812-1819, 2017.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agrônômica Ceres, cap. 65, p. 592-593, 2005.

JAYAWARDENA, R. S.; HYDE, K. D.; DAMM, U.; CAI, L.; LIU, M.; LI, X. H.; YAN, J. Y. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. **Mycosphere**, v. 7, p. 1192–1260. 2016.

LI, W.H.; GRAUR, D. **Fundamentals of Molecular Evolution**. Sinauer Associates, Sunderland, MA, U.S.A. LI, W.H.; GRAUR, D. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, U.S.A, 1991.

LIANG, X.; WANG, B.; DONG, Q.; LI, L.; ROLLINS, J. A.; ZHANG, R.; SUN, G. Pathogenic adaptations of *Colletotrichum* fungi revealed by genome wide gene family evolutionary analyses. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0196303, 2018.

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do pimentão: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 96, 2003.

MAQUET, A.; VEKEMANS, X.; BAUDOIN, J. P. Phylogenetic study on wild allies of Lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin. **Plant Systematics and Evolution**, v. 218, n. 1-2, p. 43-54, 1999.

MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto, S.P., Ed. Holos. 202 p. 2001.

MERCADO-RUARO, P.; DELGADO-SALINAS, A. Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). **American Journal of Botany**, v. 85, n. 1, p. 1-9, 1998.

- O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M. F.; ALTMÜLLER, J. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060, 2012.
- PERES, N. A. R.; SOUZA, N. L.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease**, v. 88, n. 2, p. 125-130, 2004.
- PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H.; ABDELSALAM, K.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, v. 44, n. 1, p. 33-43, 2010.
- PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 89-109, 2009.
- RESENDE, M. D. V.; SILVA, F. F.; LOPES, P. S.; AZEVEDO, C.F. **Seleção Genômica Ampla (GWS) via Modelos Mistos (REML/BLUP), Inferência Bayesiana (MCMC), Regressão Aleatória Multivariada e Estatística Espacial**. Viçosa: universidade Federal de Viçosa/ Departamento de Estatística, 291p, 2012.
- SALGADO, A. G.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Evidence for two gene pools of the Lima bean, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 42, n. 1, p. 15-28, 1995.
- SERRANO-SERRANO, M. L.; HERNÁNDEZ-TORRES, J.; CASTILLO-VILLAMIZAR, G.; DEBOUCK, D. G.; SÁNCHEZ, M. I. C. Gene pools in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Americas: evidence for an Andean origin and past migrations. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 1, p. 76-87, 2010.
- SHARMA, G.; SHENOY, B. D. *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. **Archives of Phytopathology and Plant protection**, v. 47, n. 10, p. 1179-1194, 2014.
- SLAMINKO, T.L.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D.; BONDE, M.R. New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. **Plant Disease**, v.92, n.5, p.767-771, 2008.
- SOUSA, E. S.; SILVA, J. R. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; DE MELO, M. P.; FEIJÓ, F. M.; DA SILVA MATOS, K.; BESERRA, J. E. A. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical plant pathology**, v. 43, n. 1, p. 78-84, 2018.
- SOUSA OLIVEIRA, A. E.; SIMEÃO, M.; MOUSINHO, F. E. P.; GOMES, R. L. F. Desenvolvimento do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) sob déficit hídrico cultivado em ambiente protegido. **HOLOS**, v. 1, p. 143-151, 2014.
- TAYLOR, D. L.; HOLLINGSWORTH, T. N.; MCFARLAND, J. W.; LENNON, N. J.; NUSBAUM, C.; RUESS, R. W. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. **Ecological Monographs**, v. 84, n. 1, p. 3-20, 2014.

4 DIVERSIDADE GENÉTICA, ESTRUTURA POPULACIONAL E TOLERÂNCIA A *Colletotrichum truncatum* EM VARIEDADES DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus*)

RESUMO

O conhecimento das relações entre cultivares é fundamental para os programas que visem materiais resistentes a fitopatógenos, pois auxilia na seleção de genitores. Vários fitopatógenos representam fatores limitantes à produção de *Phaseolus lunatus* comprometendo a produtividade e a qualidade das vagens e grãos. Uma das doenças mais importantes é a antracnose, que é causada por um complexo de espécies do gênero *Colletotrichum*. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar geneticamente 29 genótipos coletados de Alagoas e Pernambuco por caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares buscando a associação com tolerância a antracnose e nodulação. No total foram avaliados 51 caracteres sendo 19 qualitativos e 32 multicategóricos utilizados para análise de parâmetros genéticos. A abordagem filogenética foi realizada com auxílio de sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e de regiões URP e LTR (*Universal Repeat Primers* e *Long Terminal Repeat*) por primers polimórficos utilizados para caracterização da estrutura genética populacional. A fim de verificar associação, ensaios de patogenicidade foram aplicados para avaliar a tolerância ao fitopatógeno e quantificação de nódulos na rizosfera para cada genótipo. Os caracteres que mais contribuíram para a formação dos grupos foram caracteres ligados à semente, corroborando com os *pools* genéticos de variedades selvagens e domesticadas observadas filogeneticamente. Em relação à estrutura genética houve formação de três subpopulações evidenciando a presença de três grupos genéticos. Tanto os caracteres relacionados com a produção de nódulos quanto à resistência a *C. truncatum* apresentaram diferença estatística com formação de grupos indicando variabilidades entre as variedades.

Palavras-chave: *Phaseolus*. antracnose. Genética molecular.

ABSTRACT

Knowledge of the relationships between cultivars is essential for programs that target materials resistant to this pathogen, as it helps selecting parents. Several pathogens represent limiting factors for the production of *Phaseolus lunatus*, compromising the productivity and quality of the pods. One of the most important diseases is anthracnose, caused by a complex of species of the genus *Colletotrichum*. In this context, the objective of this work was to genetically characterize 29 genotypes from crossbreeders and/or producers from Alagoas and Pernambuco through morphoagronomic parameters, genomic region, and molecular markers seeking association with resistance to anthracnose and nodulation. In total, 51 characters were evaluated, 19 of which were qualitative and 32 were multi categorical, used for analysis of genetic parameters. The phylogenetic approach was characterized using sequencing of the ITS region (*Internal Transcribed Spacer*) in addition to polymorphic primers used for population genetic structure. To verify association, pathogenicity assays were applied for resistance to the pathogen and quantification of nodules in the rhizosphere for each genotype. The characters that most contributed to the formation of groups were parameters linked to the seed, corroborating the genetic pools of wild and domesticated varieties observed phylogenetically. Regarding the genetic structure, three subpopulations formed from the group of genes, evidencing the presence of the three gene pools. Both the characters related to nodule production and resistance to *C. truncatum* showed a statistical difference with the formation of distinct groups, concluding that there is a differential regulatory response when associated with resistance concerning to characters related to nodule production.

Keywords: lima beans. anthracnose. Molecular genetics.

4.1 Introdução

Cerca de 27 mil espécies de plantas apresentam potencial alimentar no mundo (RAPAPORT; DRAUSAL, 2001) das quais 20 leguminosas são utilizadas na nutrição humana (COSTA et al., 2006; LIN et al., 2008) dentre elas, o feijão. Além do alto teor de proteínas e micronutrientes, os feijões são amplamente consumidos no mundo, como grãos frescos ou secos, cozidos de acordo com as receitas tradicionais locais e representam os 50% das leguminosas mais consumidas como fonte de alimento humano (CÂMARA et al., 2013). Estimativas apontam que a produção de alimentos precisa aumentar em 70% em 2050 para alimentar a população global (FAO, 2020). A elevação na produção precisa vir acompanhada de alimentos com níveis nutricionais adequados (SÁ et al., 2020) a fim de reduzir os elevados níveis de subnutrição.

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus*), uma das cinco espécies cultivadas do gênero *Phaseolus* (BITOCCHI et al., 2017), embora seja uma cultura menor, tem sido uma importante fonte proteica (EZEAGU; IBEGBU, 2010) principalmente na África e nas Américas (MARTÍNEZ-CASTILLO et al., 2004). Embora a fava apresente adaptabilidade favorável nos trópicos semiáridos (IBEABUCHI et al., 2019), fatores como a falta de cultivares recomendadas para as regiões produtoras (GUIMARÃES et al., 2007; LEMOS et al., 2004), o ataque de predadores (FRANÇA et al., 2018) e a incidência de fitopatógenos (GORNY et al., 2016; SOUZA et al., 2017) limitam o rendimento da cultura e provoca oscilação da produção anual.

No Nordeste do Brasil, foi reportado que várias espécies de *Colletotrichum* ocasionam antracnose em feijão-fava (SOUSA et al., 2018). A espécie mais prevalente é a *Colletotrichum truncatum*. O fungo saprófito e necrotrófico que também é encontrado em culturas importantes como soja (YANG & HARTMAN, 2015), amendoim (YU et al., 2019), pimenta (MISHRA et al., 2017), brassica (HE et al., 2016) e pêssego (GRABKE et al., 2014). Até o momento não há relatos de qualquer variedade de fava totalmente resistente à antracnose. A resistência do hospedeiro, um manejo importante de um programa de manejo sustentável e bem-sucedido, não está disponível para a fava.

A resistência a *C. truncatum* foi identificada em soja (YANG e HARTMAN, 2015) e pimenta (MISHRA et al., 2017). Algumas variedades de *P. lunatus* apresentam resistência moderada (CARMO et al., 2015). No entanto, pouco se sabe da caracterização genética da resistência na espécie. O conhecimento da diversidade e estrutura genética é importante para a

manutenção e utilização dos recursos e o desenvolvimento de coleções principais (CHEN et al., 2012) no intuito de selecionar características desejáveis (NAEGELE et al., 2014). Estudos que tratam de diferenciação e estruturação genética no centro de diversidade da feijão-fava tem sido reportado (CAMACHO-PÉREZ et al., 2018; PENHA et al., 2017), no entanto há uma escassez de estudos que relacionem tais valores com a resistência e produção de nódulos de bactérias fixadoras.

O objetivo do presente estudo foi a avaliação de variedades de feijão-fava comercializadas em Alagoas quanto às características quali-quantitativas, diversidade e estrutura genética no intuito de fornecer uma base inicial para o entendimento da diversidade genética de fava para melhoramento e conservação, e a relação da resistência a fitopatógenos do complexo *Colletotrichum* e a produção de nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Área de estudo e coleta de sementes

A coleta de sementes de feijão-fava, *P. lunatus*, foi realizada em feira-livres de municípios pertencentes ao estado de Alagoas. A escolha dos municípios foi realizada de acordo com a produção de feijão-fava no estado (IBGE, 2013, 2014), priorizando os municípios com maiores produções.

4.2.2 Isolados de *C. truncatum*

Os isolados ICT12 e ICT16 obtidos de folhas sintomáticas de *P. lunatus* foram selecionados para o estudo por contrastarem na virulência (LIMA, 2013). Os isolados foram revigorados em meio sólido BDA (batata, dextrose e ágar a 2%) e mantidos em incubadora a 27 °C. A pureza dos cultivos foi verificada aos sete dias de crescimento no meio BDA observando as características morfológicas dos conídios em cultura monospórica. As inoculações em folhas de *P. lunatus* foram realizadas com a suspensão de conídios. As suspensões de conídios foram obtidas a partir da desagregação das estruturas dos patógenos do meio de cultivo com a raspagem na placa utilizando a alça de Drigalski e 2 mL de água destilada autoclavada. A germinação dos conídios foi avaliada em lâmina escavada, depois de

24 horas foi verificada, a partir da observação da formação de tubos germinativos e apressórios em três replicatas.

4.2.3 Extração de DNA de *P. lunatus*

O DNA foi extraído de folhas jovens retiradas do ápice da planta. A extração do DNA das 29 variedades de fava seguiu o protocolo a base de um tensoativo quaternário de amônio, o brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB, DOYLE; DOYLE, 1990). A extração foi realizada com 150 mg do tecido foliar. O tecido foliar foi desestruturado por maceração em almofariz com uso de pistilo e posteriormente foi adicionado 750 µL de tampão de extração (100 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 0,02 mM de EDTA; CTAB 2% e beta-mercaptoetanol, 0,2%). A suspensão de tecidos e o tampão de extração foram incubados a 65°C por 60 min em banho-maria, com agitação ocasional manual e suave. A desproteinização foi realizada com solvente orgânico adicionando nas amostras 2/3 do volume de uma solução contendo clorofórmio e álcool isoamílico (CIA, 24:1). As misturas das fases foi realizada por repetitiva inversão manual do tubo durante 5 min. As fases foram separadas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min. A fase superior foi coletada, transferida para um tubo novo e foi adicionado 550 µL de isopropanol (gelado). A solução foi mantida em temperatura ambiente por 60 min. Em seguida, foi centrifugado novamente, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente, o DNA precipitado no fundo do tubo (*pellet*) foi lavado uma vez com etanol 70% por 10 min e depois seco em temperatura ambiente. O DNA das amostras foi ressuspenso em 50 µL de TE (RNase 10mg/mL). A qualidade do DNA extraído foi verificada após eletroforese em gel de agarose a 0,8% por 60 min a 60 V. O DNA foi visualizado por coração com Sybr Safe® (Invitrogen, Eugene, Oregon, Estados Unidos) e revelação sob luz ultravioleta em transiluminador (LPIX, Loccus Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). O registro da eletroforese foi feito por fotografia digital.

4.2.4 Amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

A amplificação da região gênica alvo do DNA molde foi realizada pela reação enzimática da DNA polimerase (PCR, Polymerase Chain Reaction) com auxílio de delimitadores específicos para a região ITS. A amplificação da região ITS foi conduzida com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3') e ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para obtenção de fragmentos com tamanho variando de 600 a 700 pb (WHITE et al., 1990). As reações foram realizadas sob as seguintes condições térmicas: 95° C por 2 min, 95° C por 30 s, 55° C por 30 s, 72° C por 30 s e 72° C por 5 min, durante 35 ciclos em termociclador (2720 Thermal Cycler). Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR. A presença do fragmento amplificado esperado foi verificada após eletroforese em gel de agarose 1,5% durante 120 min a 90 V. As amostras foram tratadas com Sybr Safe®. Os fragmentos amplificados presentes no gel foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador (LPIX, Loccus biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). Os dados foram registrados no formato fotografia digitais. O referencial para estimar o tamanho dos fragmentos foi o padrão de peso molecular *ladder* 1kb (Ludwing Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil). As sequências de DNA amplificadas foram enviadas para quantificação, purificação e sequenciamento comercial (Myleus Biotecnologia, Belo Horizonte –MG), o método de sequenciamento utilizado foi o Sanger (SANGER; COULSON, 1975).

4.2.5 Análise filogenética

A sequência de nucleotídeos consenso foi definida a partir dos fragmentos de DNA sequenciados nos sentidos 5' e 3' de cada fragmento de DNA amplificado de cada genótipo de *P. lunatus*. A identidade das sequências parciais obtidas para a região ITS de cada genótipo de *P. lunatus* foi inicialmente analisada com a ferramenta BLASTn e no banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Os arranjos dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. As sequências consenso foram obtidas com auxílio do software Staden Package (STADEN; BEAL; BONFIELD, 2000).

Alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas consenso foram preparados para os conjuntos de dados utilizando-se o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) e ajustados manualmente no pacote MEGA10 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (KUMAR et al., 2018). A análise de Inferência Bayesiana (BI) para os conjuntos de dados foi realizada empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), no web portal CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para os dados de cada região genômica usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). A cadeia MCMC foi conduzida iniciando as árvores aleatoriamente até

10.000.000 de gerações, para cada conjunto de dados. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise, como uma fase de burn-in. Os valores de probabilidade posterior (RANNALA, YANG, 1996) foram determinados a partir de uma árvore consenso majority-rule gerada com as 7.500 árvores remanescentes.

4.2.6 Amplificação de *primers* polimórficos

As reações de amplificações de regiões inespecíficas do genoma de *P. lunatus* com os oligonucleotídeos CLIRAP1, SSR, URP2R, URP6R, URP17R, URP13R e CLIRAP4 seguiram os mesmos parâmetros das reações conduzidos com os iniciadores específicos ITS 1 e 4. As condições para amplificação consistiram de seis ciclos iniciais de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C e 2 min a 72 °C. Outros 24 ciclos foram adicionados a esses seis ciclos iniciais, sendo que a cada seis ciclos, 30 s foram adicionados ao tempo de extensão. A extensão final foi de 10 min a 72 °C. Para os iniciadores URPs, as condições foram 1 ciclo de 94 °C por 2 min; seguido por 30 ciclos de 94 °C por 40 s, 55-63 °C (dependendo do primer, Tabela 1) por 1 min e 72 °C por 1 min; completado por uma extensão final a 72 °C por 5 min. A reações foram repetidas duas vezes para cada iniciador.

Tabela 1 – Primers utilizados com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento - T_m e proporção de guanina/citosina.

Primer	Sequência 5'-3'	Denominação	T _m °C	%GC
CLIRAP1	CGTACGGAACACGCTACAGA	LTR ¹	67	55
SSR	GAGAGAGAGAGAGAGAG AC	LTR ¹	60	53
URP2R	CCCAGCAACTGATCGCACAC	URP ²	65	60
URP6R	GCAAGCTGGTGGGAGGTAC	URP ²	65	63
URP17R	AATGTGGGCAAGCTGGTGGT	URP ²	74	55
URP13R	TACATCGCAAGTGACACACC	URP ²	48	50
CLIRAP4	CTTTTGACGAGGCCATGC	LTR ¹	50	48

¹ long terminal repeat; ² universal rice primers Fonte: dados da pesquisa, 2021.

4.2.7 Diversidade e estrutura genética pelos marcadores moleculares

Os fragmentos gerados pelos marcadores moleculares foram utilizados para a obtenção de uma matriz binária: presença (1) e ausência (0). A estimativa do número de fragmentos polimórficos necessários para obter associações estáveis entre variedades foi

adquirida a partir das estimativas de correlação de valores da matriz de similaridade com outras matrizes geradas com diferentes números de fragmentos utilizando o programa GENES (CRUZ, 2006).

A porcentagem de *locus* polimórficos (P%), o número de alelos observados, o número de alelos efetivos, a diversidade gênica (H_e), Nei (1973), e o índice de Shannon (I) foram estimados empregando parâmetros para dados diplóides dominantes. Considerando a natureza dominante dos *locus*, as análises pressupõem que os *locus* estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os cálculos das estimativas das frequências alélicas. A análise foi executada com auxílio do programa GenAlex (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

A estrutura populacional foi determinada com a informação relativa à contribuição de alelos para composição do genótipo determinado com auxílio do programa Structure 2.3.1, (PRITCHARD et al., 2000), acessível no website Structure Harvester (EARL, 2012). As informações foram utilizadas para a determinação das metapopulações de acordo com a metodologia de Evanno et al. (2005), que se baseia na taxa de mudança na probabilidade de log de dados entre valores K sucessivos. Os indivíduos são alocados em uma possível população baseado na estrutura populacional determinada a partir das frequências alélicas. Na modelagem foram considerados variações de subpopulações (K) de 1 a 10, com 10 réplicas cada. No modelo foi assumido mistura entre as populações e frequências alélicas correlacionadas (ANDUEZA-NOH et al., 2015; RUIZ-GIL et al., 2016). Os testes foram realizados por meio da cadeia de Markov - Monte Carlo, com períodos de *burn-in* de 100.000 e 100.000 réplicas.

4.2.8 Caracterização morfoagronômica das variedades

A caracterização morfoagronômica foi realizada, a partir dos caracteres qualitativos e quantitativos dos descritores de *Phaseolus lunatus* do *Bioversity International* (IPGRI, 2001). A avaliação foi dividida em quatro etapas considerando o desenvolvimento da planta para caracterização das diferentes estruturas: plântula (15 dias após a semeadura), fase vegetativa (aos 40 dias após a semeadura), estruturas reprodutivas (no momento de floração e maturação das vagens) e sementes (pós-colheita). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado –DIC, com três repetições. O substrato para cultivo foi à terra coletada da camada de 30 cm superficial ao solo. O substrato no vaso foi adicionado calcário (4 g/L) e foi feita uma adubação com nitrogênio, fósforo e potássio (10:10:10, 2 g/L). O estabelecimento do cultivo foi realizado com semeadura de 3 sementes por vaso com capacidade de 20 L. As

plantas foram desbastadas aos 15 dias após germinação, deixando apenas uma planta por vaso. As plantas foram tutoradas e quando iniciaram o período de florescimento foram adubadas quinzenalmente com nitrogênio. O controle de insetos como pulgões e ácaros foi realizado sempre que necessário, utilizando óleo de neem (Natuneem, Natural Rural Indústria e Comércio de Produtos Orgânicos e Biológicos Ltda., Araraquara, SP), seguindo as recomendações do fabricante. Os 32 caracteres qualitativos avaliados foram: cor do cotilédone (CC); cor do hipocótilo (CH); pigmentação do caule principal (PCP); marcas transparentes ao longo das nervuras das folhas primárias mais desenvolvidas (MTFP); cor da nervura das folhas primárias mais desenvolvidas (CNFP); antocianina nas folhas (AF); cor da folha: intensidade da cor verde (CFICV); padrão de crescimento (PCE); ramificação: tipo determinado e indeterminado (RTDI); orientação dos ramos: tipo determinado (ORTD); forma do folíolo (FF); cor das asas (CA); cor da quilha (CQ); cor do estandarte (CE); abertura das asas (AA); posição do cacho (PC); forma do ápice da vagem (FAV); posição das vagens em relação aos cachos (PVRC); orientação das vagens em relação aos cachos (OVRC); deiscência da vagem (DV); curvatura da vagem (CDV); cor das vagens (CV); persistência da folha (PF); cor de fundo da semente (CFS); cor padrão da semente (CPS); segunda cor padrão da semente (SCPS); padrão do tegumento da semente (PTS); forma da semente (FS); germinação das sementes nas vagens (GSV); separação de testa (ST); textura de testa (TT); cor do cotilédone em sementes maduras (CCSM). Para os caracteres de cor, foi utilizada a tabela de padrão de cor de Munsell (*Munsell Color Chart for Plant Tissues*, 1952).

Os 19 caracteres quantitativos avaliados foram: comprimento desde a base do hipocótilo até à primeira folha completamente expandida (CHPF); espessura do caule (EC); comprimento da folha primária (CFP); largura da folha primária (LFP); relação folíolo (RF); altura da planta (AP); tamanho do botão floral (TBF); duração da floração (DF); número de nós no caule principal antes do primeiro cacho (NNCP); número de nós por cacho (NNP); comprimento do cacho (CDC); largura vagem (LV); comprimento vagem (CV); número de lóculos por vagem (NLV); número de sementes por vagem (NSV); dias de maturação em 50% das vagens (MAT); comprimento semente (CS); largura semente (LS); peso de 100 sementes (PS). O comprimento e largura dos caracteres foram mensurados em milímetros com paquímetro digital, a altura da planta em cm com régua comum e o peso em gramas com balança analítica de precisão.

4.2.9 Variabilidade genética determinada a partir dos dados morfoagronômicos

A variabilidade genética entre as variedades foi determinada pela análise de variância dos dados morfoagronômicos quantitativos. Foi realizado o teste de agrupamento de médias, segundo Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade. As análises foram processadas mediante o programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2010). Em seguida, a análise dos parâmetros quantitativos foi realizada utilizando o teste F para verificar as significâncias estatísticas dos quadrados médios das variedades, relativos aos 19 caracteres quantitativos, determinando os coeficientes de variação experimental entre os pares de caracteres. A significância dos coeficientes de correlação foi avaliada pela estatística “t” a 1 e 5% de probabilidade (CRUZ, 2016). As diferenças entre as variedades foram verificadas através do teste de comparação de médias a 5% de probabilidade.

As estimativas de parâmetros genético foram determinadas baseadas em esperanças matemáticas do quadrado médio - E (QM) das análises de variâncias (ANAVAS) e das esperanças matemáticas do produto médio E (PM) das análises de covariâncias (ANCOVAS) utilizadas para as variedades. As estimativas foram baseadas em VENCOVSKY (1978) e CRUZ (2006). Os parâmetros genético-estatísticos estimados foram os seguintes: variância fenotípica - $\sigma^2 F$, variância ambiental - $\sigma^2 A$, variância genética - $\sigma^2 G$, herdabilidade - h^2 (%), coeficiente de variação genético - CV g (%), coeficiente de variação ambiental - CV e (%), razão coeficiente de variação genético/ambiental - $b(CV\ g / CV\ e)$.

Parâmetros CVg e CVe indicam, respectivamente, a magnitude das variações causadas pelos desvios da média devidos aos efeitos de ambiente e aquelas devido aos efeitos genéticos (no caso genética aditiva). Os coeficientes foram calculados por meio das seguintes fórmulas:

$$CV_G(\%) = \frac{\sqrt{\sigma_P^2}}{M} \times 100$$

onde: $\sigma_P^2 = \frac{(QM_{PROG} - QM_{RES})}{r}$ = variância genética aditiva, e M = média experimental.

$$CV_E(\%) = \left(\frac{\sqrt{QM_{RES}}}{M} \right) \times 100$$

onde: QM_{RES} = quadrado médio residual = σ_E^2 e M = média experimental.

O valor b é um parâmetro que mostra se uma população apresenta potencial para o melhoramento genético.

$$b = \frac{CV_G (\%)}{CV_E (\%)}$$

onde: valores semelhantes ou maiores que as unidades sugerem populações com condições favoráveis para o melhoramento genético.

A herdabilidade permite conhecer a variabilidade genética expressa para seleção e também para estimar o progresso esperado a cada ciclo de seleção.

$$h_r^2 \% = \frac{\sigma_P^2}{\left((\sigma_P^2) + \frac{\sigma_E^2}{r} \right)} \times 100$$

onde: σ_P^2 = variância genética aditiva entre genótipos, σ_E^2 = variância ambiental (residual), r = repetições e σ_A^2 = variância aditiva.

Na aplicação da técnica de agrupamento dos genótipos, foi adotada a distância generalizada de Mahalanobis (D^2), como medida de dissimilaridade, levando em consideração o grau de dependência entre as variáveis estudadas.

O agrupamento foi realizado com base na divergência genotípica calculada por meio da distância euclidiana média como medida de dissimilaridade. A determinação dos grupos foi realizada pelo método de agrupamento de Tocher (RAO, 1952), o qual se baseia na formação de grupos cujas distâncias dentro dos grupos sejam menores que as distâncias entre grupos.

4.2.10. Avaliação *in vitro* da resposta de resistência a *C. truncatum*

A inoculação *in vitro* dos dois isolados de *C. truncatum* foi realizada em folhas destacadas das etnovarietades de *P. lunatus*. As folhas trifolioladas foram retiradas das plantas aos 30 dias após germinação, com aproximadamente a mesma idade fisiológica. Após serem destacadas foram acondicionadas em placas de Petri (90 x 15 mm) esterilizadas, contendo uma fina camada de algodão e um disco de papel de filtro umedecido com 10 mL de água destilada esterilizada (MENDES; BERGAMIN FILHO, 1986). A suspensão de conídios foi preparada através de cultivos do fungo em meio sólido BDA (Batata, dextrose e agar, a 2%), com sete dias quando as colônias apresentavam crescimento completo, ocupando todo o diâmetro da placa de Petri. As placas foram adicionadas 20 mL de água destilada esterilizada (ADE), as estruturas reprodutivas do patógeno foram desagregadas do meio de cultivo através da raspagem das placas com alça de Drigalski.

A suspensão de esporos foi filtrada em dupla camada de gaze para separação dos fragmentos de hifas. A concentração de esporos da suspensão foi determinada por contagem direta em câmara de Neubauer (Henneberg-Sander GmbH, Alemanha, Giessen-Lützellinden). A concentração de esporos foi ajustada por diluição para 10^5 esporos mL^{-1} (ALFENAS; FERREIRA, 2007). Antes da inoculação, a taxa de esporulação era verificada previamente e uma alíquota da suspensão de esporos era colocada em placa BDA no intuito de observar germinação monospórica.

As faces superiores e inferiores das folhas, em cada tratamento, foram pulverizadas com aproximadamente 3,0 mL das suspensões de conídios (10^5 esporos mL^{-1}), nas testemunhas foi utilizada água destilada esterilizada. As placas foram vedadas com filme plástico transparente para manter a umidade elevada e colocadas em incubadora do tipo BOD com temperatura ajustada para $28^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, mantidas nessas condições até avaliação. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento e três repetições para as testemunhas.

A avaliação foi feita através de escala de notas para *P. lunatus* (CARVALHO, 2009). A severidade foi avaliada aos 3 e 5 dias após a inoculação com base no nível de infecção, através de escala de notas, sendo: 0 = ausência de sintoma; 1 = traços a 10% da área foliar infectada; 2 = de 11 a 25% da área foliar infectada; 3 = de 26 a 50% da área foliar infectada, sem queda de folíolo; 4 = de 51 a 75% da área foliar infectada, sem ou com queda de um dos folíolos; 5 = de 76 a 100% da área foliar infectada, sem ou com queda de dois ou três folíolos. No ensaio *in vivo*, as avaliações iniciaram após aparecimento dos primeiros sintomas e prosseguiram com a mesma diferença de dias da avaliação *in vitro* (2 dias). A partir das médias estimadas na escala de notas, as variedades foram agrupadas em cinco classes de acordo com a resposta ao patógeno: Imune (IM) - 0; altamente resistente (AR) - 0,1 a 1,4; moderadamente resistente (MR) - 1,5 a 2,4; moderadamente suscetível (MS) - 2,5 a 3,0; e altamente suscetível (AS) - acima de 3,0 (BELMINO, 2004; CAVALCANTE, 2011).

4.2.11 Nodulação espontânea dos genótipos

A capacidade de nodulação dos genótipos foi baseada na nodulação espontânea com bactérias rizobiais presentes naturalmente no solo. O solo utilizado foi o coletado da camada superficial (30 cm). O solo foi peneirado, transferido para sacos com capacidade de 2,8 L e as plântulas foram transferidas para os sacos. A avaliação da nodulação foi realizada aos 45 dias após plantio, as raízes foram retiradas, lavadas e os nódulos presentes no sistema radicular

foram destacados, contados, medidos e pesados para determinação da massa fresca. A massa seca dos nódulos foi determinada por pesagem dos nódulos desidratados. A desidratação foi realizada com os nódulos acondicionados em sacos de papel e a 65° C por 48 h em estufa com ventilação forçada. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições. Os dados avaliados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas por Scott-knott ($P < 0,05\%$), utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

semente variando entre 12,73 a 13,00 mm e largura 17,23 a 20,70 mm e peso entre 43,44 a 114,30 g.

Tabela 2. Variedades de *Phaseolus lunatus* L. utilizadas na pesquisa oriundas de Alagoas e de Pernambuco.

Variedades atravessadores AL	Cidade	Código	Classificação de Baudet (1977)
Fava	Flexeiras	1 FFJ	Big Lima
Fava de moita	Igaci	2 MIC	Batata
Fava coquinho	Igaci	3 CIS	Batata
Fava olho de peixe	Igreja Nova	4 OPINJ	Batata
Fava coquinho	Igaci	5 CIM	Batata
Fava	Igreja Nova	6 FINJ	Sieva
Fava 1	Olho D'água Grande	7 F1ODGA	Batata
Fava 2	Olho D'água Grande	8 F2ODGA	Sieva
Fava roxinha	Palmeira dos Índios	9 RPIA	Batata
Fava branca pequena	Palmeira dos Índios	10 BPIA	Batata
Fava de moita	Palmeira dos Índios	11 MPIA	Batata
Fava pelo siná	Palmeira dos Índios	12 PSPIA	Big Lima
Fava 1	Quebrangulo	13 F1QPJ	Sieva
Fava 2	Quebrangulo	14 F2QPJ	Sieva
Fava	Quebrangulo	15 FQS	Batata
Fava branca pequena	União dos Palmares	16 BUPA	Batata
Variedades PE	Cidade	Código	
Fava branca grande	União dos Palmares	17 BUPJ	Sieva
Fava rainha do sol	União dos Palmares	18 RSUPJ	Big Lima
Fava raio de sol	União dos Palmares	19 RSUPJA	Big Lima
Fava lavandeira	União dos Palmares	20 LUPJ	Sieva
Fava coquinho	Ibateguara	21 CISI	Batata
Fava vinaque	Ibateguara	22 VISI	Batata
Fava	Colônia Leopoldina	23 FCLJ	Batata
Fava	Novo Lino	24 FNLL	Batata
Fava eucalipto	Joaquim Gomes	25 EJGA	Batata
Fava	Joaquim Gomes	26 FJGA	Batata
Variedades PE	Cidade	Código	
Fava orelha-de-velho	Ibateguara	27OVIC	Big Lima
Fava coquinho	Ibateguara	28CIC	Batata
Fava	Joaquim Gomes	29FJGM	Batata

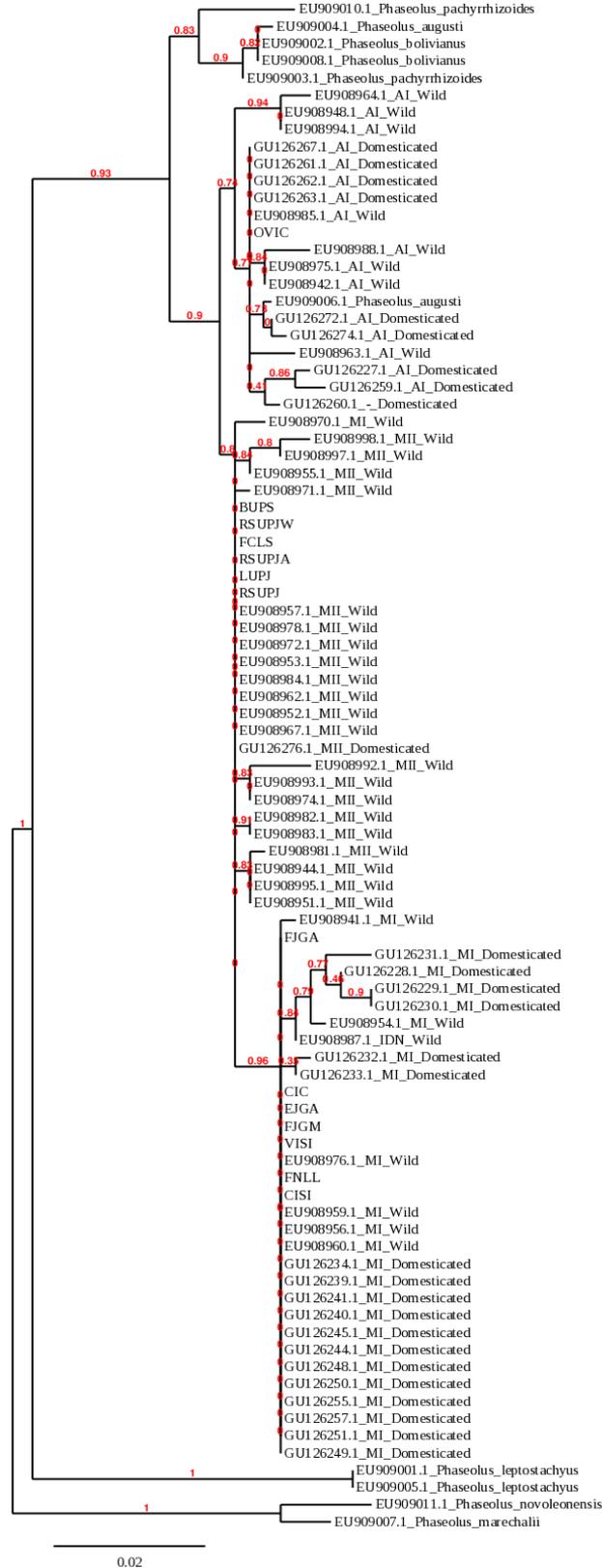
Fonte: dados da pesquisa, 2021.

4.3.2 Análise filogenética

A região ITS, incluindo os espaçadores e a subunidade 5.8S, de 10 variedades variou entre 602 e 654 pb. A análise comparativa com as demais sequências depositadas em banco de dados públicos (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) revelou similaridade com indivíduos de *P. lunatus* variando entre 80,50% a 100,00%. As análises filogenéticas incluíram os fragmentos ITS obtidas de 10 variedades das 29 coletadas (CISI, EJGA, FJGA, FJGM, FNLL, LUPJ, OVIC, RSUPJ, RSUPJA e VISI) conjuntamente com os acessos depositados por Serrano-Serrano et al. (2010) e por Motta-Aldana et al. (2010) no NCBI.

Na análise filogenética, 9 variedades foram agrupadas com acesso de *P. lunatus* do *pool* genético mesoamericano (MI e MII). A exceção foi a variedade OVIC, que apresentou relação filogénica com acessos do grupo andino (Figura 1). As variedades BUPS, RSUPJW, FCLS, RSUPJA, LUPJ, RSUPJ foram similares ao grupo mesoamericano MII selvagem com consistência de 80% para todos os sítios informativos. As variedades CIC, EJGA, FJGM, VISI, FNLL e CISI apresentaram similaridade com o grupo mesoamericano MI selvagem com alto suporte de clado (96%) tendo como ponto de enraizamento da árvore (*outgroup*) duas espécies com semelhança genética (*P. novoleonensis* e *P. marechalii*).

Figura 1. Árvore de inferência bayesiana baseada em sequência de DNA da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) de variedades de *Phaseolus lunalis* L. comparadas com acessos do Genbank.

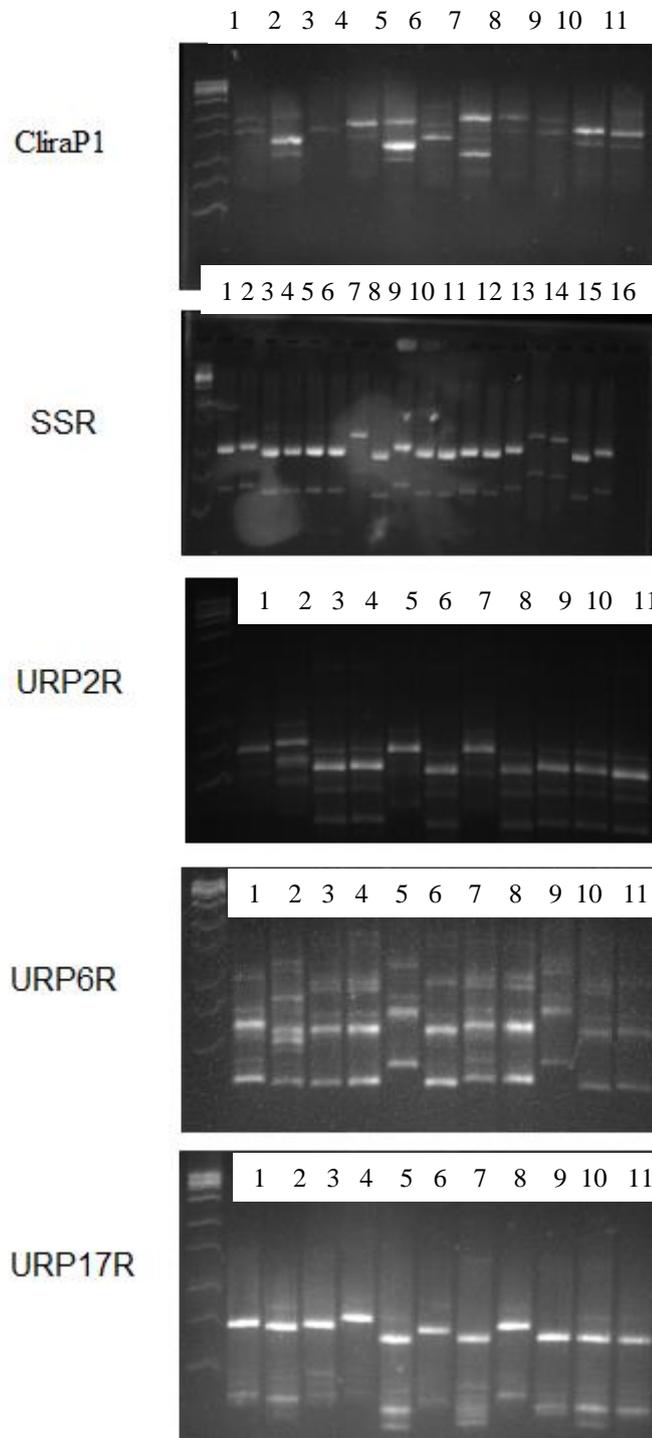


Fonte: dados da pesquisa, 2021.

4.3.3 Diversidade e estrutura genética baseada nos marcadores moleculares

As marcas genéticas derivadas de 5 marcadores (CliraP1, SSR, URP2R, URP6R e URP16R) foram utilizadas para determinação da diversidade e estrutura genética das variedades. Os perfis de amplificação gerados por 5 marcadores foram polimórficos (Figura 2) e dois marcadores (URP13R e CLIRAP4) não amplificaram nas condições testadas. O número de fragmentos gerados pelos iniciadores somou um total de 23 bandas. O número de fragmentos gerados variou entre 4 e 6 bandas, com média de 4,4 bandas por marcador, por oligonucleotídeos.

Figura 2. Padrão polimórficos de amplificação dos marcadores CliraP1, SSR, URP2R, URP6R, e URP17 R para algumas variedades do estudo.



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

As variedades foram analisadas em dois contextos para avaliação da diversidade e estrutura genética. O primeiro contexto considerou como população o padrão de peso das sementes em Batata, Sieva e Big Lima; e a segunda contextualização considerou como populações a procedência das variedades, Alagoas e Pernambuco (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética em variedades de *Phaseolus lunatus* L.

Critério de análise	Grupo	n	Na	Ne	I	He	Ho	%P
Classificação quanto ao tamanho das sementes	Batata	14	2,000 (0,000)	1,546 (0,069)	0,487 (0,040)	0,322 (0,032)	0,334 (0,033)	100,00
	Sieva	10	1,739 (0,144)	1,466 (0,079)	0,414 (0,051)	0,273 (0,039)	0,287 (0,041)	86,96
	Big Lima	5	1,478 (0,187)	1,489 (0,072)	0,425 (0,056)	0,288 (0,039)	0,320 (0,043)	73,91
Procedências	Alagoas	15	1,913 (0,087)	1,513 (0,084)	0,439 (0,051)	0,291 (0,040)	0,299 (0,041)	95,65
	Pernambuco	14	2,000 (0,000)	1,499 (0,077)	0,450 (0,043)	0,294 (0,035)	0,305 (0,037)	100,00

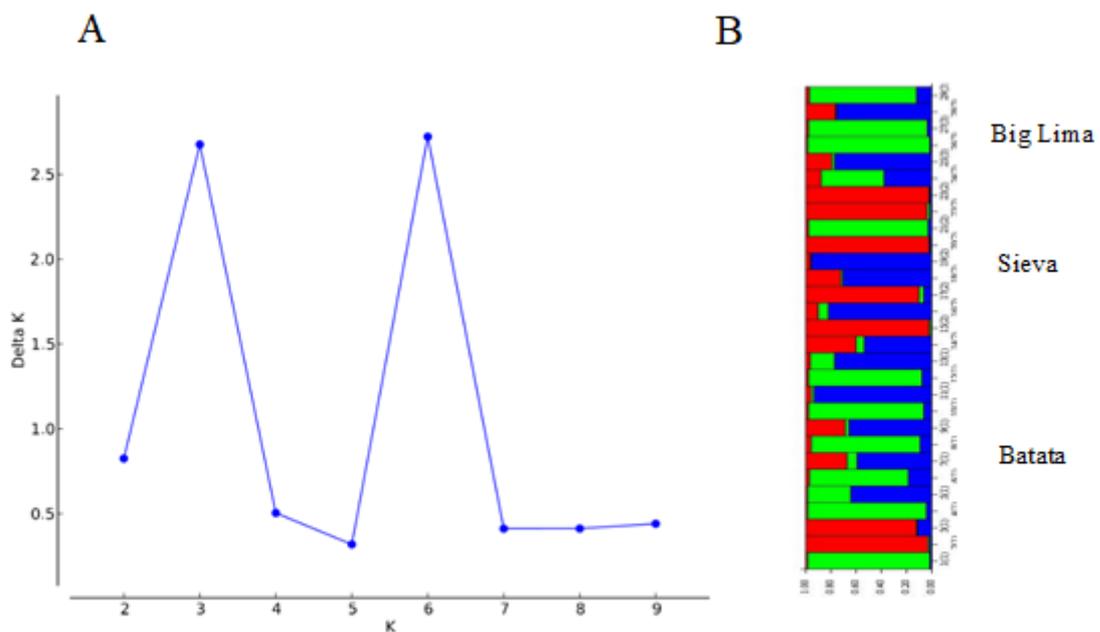
n - número de variedades amostradas; Na - número médio de alelos por loco; Ne - número efetivo de alelos; I - índice de Shannon; He - heterozigiosidade esperada; Ho - heterozigiosidade observada e %P porcentagem de locos polimórficos. Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Na análise da diversidade genética o grupo Batata apresentou o maior número de alelos amostrado (Na) e o grupo Big Lima apresentou o menor número de alelos amostrados. O número de alelos amostrados e efetivos (Ne) diferencia as populações Batata e Sieva, sendo assim provavelmente ocorreram processos de domesticação diferentes em cada grupo. Os valores de alelos efetivos para as três populações são similares. As variedades do grupo Batata apresentaram maior valor para índice de diversidade de Shanon (I), heterose observada (Ho) e esperada (He) e a porcentagem de locos polimórficos (P%). Na avaliação considerando as procedências dos cultivos das variedades não houve diferenças nos parâmetros de diversidade e estrutura das populações.

Na determinação da estrutura genética de acordo com a abordagem bayesiana, pelo programa Structure, utilizando critérios que pressupõe estruturação genética molecular de populações em diferentes taxas de equilíbrio de Hardy Weinberg houve a indicação do número ótimo metapopulacional (K). O valor K ótimo foi 3 com valor de delta-K = 2,68, portanto, a existência de três grupos geneticamente distintos (Figura 2). Tal abordagem de agrupamento com cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) atribui genótipos individuais a um número predefinido de populações (K) em uma determinada amostra (x) para alcançar os

equilíbrios de Hardy-Weinberg e de ligação. O valor K ideal foi selecionado com base nos aumentos nas razões de verossimilhança entre as execuções usando a estatística delta K de Evano et al. (2005). Os pontos de inflexão não foram observados para a curva de log-verossimilhança, mas um aumento menor da verossimilhança foi encontrado ao comparar K igual a 6 com os valores K anteriores.

Figura 2. Estimativa do número de subpopulações usando valores delta-K (a) e atribuição de indivíduos mostrando agrupamento de 29 variedades de feva (b).



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

4.3.4. Análise de Diversidade Baseada em Parâmetros Quanti-Qualitativos

Os dados morfo-agronômicos quantitativos e qualitativos foram analisados separadamente. Na análise com 19 caracteres quantitativos para teste de média por Scott-Knott o coeficiente de variação (CV) para os 19 caracteres quantitativos variou de 5,04% a 19,80%. Nessas condições, o CV foi classificado de baixo a médio indicando boa precisão experimental (PIMENTEL-GOMES, 2009). Todos os caracteres quantitativos analisados apresentaram diferença estatística (Tabela 4).

O caractere com maior variação foi a altura da planta (AP). As variedades contrastantes foram FJGA (10,03) e OPINJ (20,67). A menor variação foi para o caráter relação folíolo (RF) com 26% de diferença entre o menor e maior valor. Em relação as 29

variedades avaliadas no presente estudo apresentaram o seguinte perfil: largura da vagem (LV); acima da média geral (1,53 cm), exceto para as variedades BUPJ, VISI, FNLL, EJGA, FJGM. O caracter comprimento da vagem (CV) abaixo da média geral (6,40 cm) exceto para os acessos CISI, FNLL, EJGA, CIC1. As variedades apresentaram valores do comprimento da semente (CS) e largura da semente (LS) acima da média (46% e 84%). Os tamanho e largura médios correspondem a 10,79 e 11,02 mm.

A duração da floração (DF) das variedades apresentou valores próximos à média (40 dias). O número de dias para a maturação da vagem foi em média 85 dias, sendo o F1QPS com 52 dias e o F2ODGA com 180 dias. A maturação de 24 variedades do Piauí apresentou valores muito próximos de F2ODGA que em média foi de 150 dias, em contrapartida foi o caráter que menos contribuiu para a diversidade genética (SILVA et al., 2015).

Os caracteres que apresentaram maiores diferenças foram comprimento da semente (CS), largura da semente (LS) e peso de 100 sementes (PS) dentre as relacionadas diretamente com a produção. As variedades de Pernambuco apresentaram maiores valores de peso de 100 sementes (PS). Os valores variaram de 23,68g (variedade FNLL) a 114,30g (variedade RSUPJA) sendo uma das variáveis que apresentaram considerável variação, fato este que pode também ser observado pelo teste Scott-Knott, que indicou diferença estatística significativa entre os tratamentos.

Tabela 4. Média das variáveis quantitativas: comprimento vagem (CV); comprimento semente (CS); largura semente (LS); peso de 100 sementes (PS); relação foliar (RF); comprimento desde a base do hipocótilo até à primeira folha completamente expandida (CHPF); espessura do caule (EC); altura da planta (AP); duração da floração (DF); maturação (MAT); largura vagem (LV); número de sementes por vagem (NSV); classificação Baudet (CLASSE) para genótipos de *Phaseolus lunatus* L.

Variedades	CV	CS	LS	PS	RF	CHPF	EC	AP	DF	MAT	LV	NSV	CLASSE
RSUPJA	9,30e	13,00g	20,70i	114,30g	1,44b	6,23a	2,73a	15,40a	49,67b	99,34b	1,99c	2,00a	Big Lima
RSUPJ	9,67e	12,63g	19,17h	101,78f	1,32b	5,63a	2,90a	19,23b	50,67b	101,34b	1,95c	3,00b	Big Lima
OVIC	8,60d	14,20h	20,93i	93,75f	1,88c	6,37a	7,40b	20,43b	37,33a	74,66a	1,97b	2,00a	Big Lima
FJGA	6,47c	10,80d	16,10f	74,54e	1,27b	4,50a	3,23a	10,03a	25,33a	50,66a	1,72b	3,00b	Batata
LUPJ	7,67d	12,73g	17,23g	71,24e	1,76c	5,97a	3,17a	15,77a	39,67a	79,34a	1,79b	3,33b	Sieva
FFJ	6,63c	15,17i	10,20c	62,33d	1,45b	6,53a	3,17a	12,60a	41,33a	82,66a	1,62b	2,33a	Big Lima
FINJ	6,80c	12,87g	8,67b	55,76d	1,60b	5,20a	3,47a	19,63b	49,00b	98,00b	1,51a	4,00b	Sieva
CIS	4,33a	9,83c	8,13b	52,16d	1,98c	7,47b	3,27a	18,30b	38,00a	76,00a	1,12a	1,67a	Batata
FCLJ	8,27d	8,73b	12,20d	49,51c	1,73c	7,50b	4,27b	18,57b	17,00a	74,00a	1,84b	3,00b	Batata
RPIA	5,40b	10,17c	8,23b	45,00c	0,60a	8,50b	2,97a	18,47b	35,33a	70,66a	1,21a	2,67b	Batata
F1QPS	6,00c	12,27d	8,47b	43,92c	0,68a	9,87b	4,33b	18,70b	25,67a	51,34a	1,51a	3,00b	Sieva
PSPIA	6,27c	13,83h	8,40b	43,44c	0,64a	9,17b	4,50b	14,67a	50,00b	100,00b	1,38a	3,33b	Big Lima
FQS	6,70c	8,43b	13,03e	39,75b	0,63a	7,17b	4,17b	18,97b	57,00b	114,00b	1,44a	3,00b	Batata
CIM	5,17b	10,53c	6,77a	39,69b	0,62a	6,53a	3,30a	14,77a	72,67c	145,34c	1,29a	2,33a	Batata
F2ODGA	6,80c	12,00e	8,70b	39,35b	2,00c	9,53b	3,70a	19,50b	43,33a	86,66a	1,45a	3,00b	Sieva
MIC	6,23c	11,93e	8,10b	37,61b	2,08c	7,50b	3,67a	14,70a	56,33b	112,66b	1,27a	3,00b	Batata
OPINJ	5,27b	9,53c	7,03a	37,44b	2,20c	6,03a	3,37a	20,67b	42,67a	85,34a	1,28a	3,00b	Batata
BUPJ	6,53c	9,73b	13,93e	37,43b	1,46b	2,47a	2,70a	15,87a	31,00a	62,00a	1,48a	3,00b	Batata
F2QPS	6,20c	12,63g	8,27b	36,77b	0,66a	7,63b	4,03a	20,13b	55,67b	111,34b	1,45a	1,67a	Sieva
EJGA	5,90c	8,80b	13,80e	35,96b	2,26c	5,17a	5,10b	13,83a	35,33a	70,66a	1,42a	2,00a	Batata
BUPA	6,53c	7,53a	11,70d	33,00a	1,51b	5,57a	3,03a	12,07a	23,67a	77,34a	1,33a	3,67b	Batata
FJGM	6,47c	8,27b	11,93d	32,59a	1,34b	8,17b	3,40a	12,07a	47,00b	94,00b	1,47a	3,00b	Batata
F1ODGA	5,73c	11,07d	7,57a	31,28a	1,87c	9,17b	3,03a	18,87b	90,33c	180,66c	1,47a	3,00b	Batata
CISI	5,56b	7,17a	10,30c	31,18a	1,20b	4,57a	3,00a	10,97a	34,33a	68,66a	1,62b	2,67b	Batata
CIC	5,87c	11,90e	7,53a	28,92a	1,43b	5,17a	3,23a	12,27a	38,67a	77,34a	1,78b	2,00a	Batata
VISI	6,80c	7,80a	11,30d	28,20a	1,23b	4,83a	3,53a	13,00a	35,67a	71,34a	1,47a	3,33b	Batata
MPIA	3,83a	11,17d	7,40a	27,33a	0,61a	10,00b	4,53b	16,33b	32,33a	64,66a	2,02c	3,00b	Batata
BPIA	5,07b	8,50b	6,33a	24,20a	0,75a	8,53b	4,73b	13,20a	51,67b	103,34b	1,30a	3,00b	Batata
FNLL	5,54b	9,70c	7,60a	23,68a	1,60b	5,07a	3,77a	12,50a	22,00a	44,00a	1,35a	2,67b	Batata
Média	6,40	10,79	11,02	47,31	1,37	6,76	3,71	15,91	42,37	84,74	1,53	2,78	

Médias seguidas da mesma letra na coluna constituem um grupo homogêneo, pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Todos os caracteres quantitativos avaliados apresentam diferenças significativas para a 5% de probabilidade. As diferenças evidenciam a existência de variabilidade genética entre as 29 variedades. Os valores estimados para a variância fenotípica (σ^2_F) dos caracteres quantitativos foram próximos aos obtidos para a variação genética (σ^2_G) e ambos superiores aos valores observados para a variação ambiental (σ^2_A). Indicando que houve influência ambiental sobre os caracteres durante o período de desenvolvimento para as variáveis avaliadas.

Tabela 5. Estimativa de parâmetros genéticos: variância fenotípica - σ^2_F , variância ambiental - σ^2_A , variância genética - σ^2_G , herdabilidade - h^2 (%), coeficiente de variação genético - CV_g (%), coeficiente de variação ambiental - CV_e (%), razão coeficiente de variação genético/ambiental - $b(CV_g/CV_e)$ para as variedades de *Phaseolus lunatus* L.

Parâmetros Genéticos	σ^2_F	σ^2_A	σ^2_G	h^2 (%)	CV_g (%)	CV_e (%)	B (CV_g/CV_e)
LS (mm)	18,15	0,13	18,02	99,27	97,83	38,50	6,72
CS (mm)	4,55	0,10	4,45	97,85	93,81	19,62	3,89
PS (g)	540,15	15,21	524,95	97,18	92,00	48,42	3,39
LFP (cm)	3,38	0,13	3,25	96,23	89,48	33,08	2,91
RF	0,28	0,02	0,26	95,58	82,93	37,52	2,20
EC (mm)	0,90	0,06	0,84	93,40	82,53	24,70	2,17
CV (cm)	2,01	0,19	1,81	90,33	75,69	20,72	1,76
LV (cm)	0,063	0,08	0,055	87,74	70,46	15,34	1,54
CFP (cm)	1,58	0,23	1,36	85,72	66,68	17,83	1,41
DF (day)	236,43	38,87	197,56	83,56	62,88	33,18	1,30
MAT (day)	235,34	38,83	196,50	83,50	62,78	33,10	1,30
CHPF (cm)	3,46	0,59	2,86	82,74	61,51	25,03	1,26
AP (cm)	10,47	1,91	8,56	81,75	59,89	18,38	1,22
TBF (mm)	0,57	0,17	0,40	69,46	43,12	11,12	0,87
NNCP	2,76	0,94	1,81	65,73	38,00	25,37	0,80
NLS	0,24	0,08	0,15	64,68	37,90	13,35	0,78
NSV	0,33	0,14	0,18	55,55	29,41	15,34	0,64
CDC (cm)	7,79	3,92	3,87	49,65	24,74	22,65	0,58
NNP	1,89	1,04	0,85	45,00	21,43	14,02	0,52
Média	59,36	5,64	53,72	82,22	65,09	25,18	1,93

comprimento desde a base do hipocótilo até à primeira folha completamente expandida (CHPF); espessura do caule (EC); comprimento da folha primária (CFP); largura da folha primária (LFP); relação folíolo (RF); altura da planta (AP); tamanho do botão floral (TBF); duração da floração (DF); número de nós no caule principal antes do primeiro cacho (NNCP); número de nós por cacho (NNP); comprimento do cacho (CDC); largura vagem (LV); comprimento vagem (CV); número de lóculos por vagem (NLS); número de sementes por vagem (NSV); dias de maturação em 50% das vagens (MAT); comprimento semente (CS); largura semente (LS); peso de 100 sementes (PS). Fonte: dados da pesquisa, 2021.

As estimativas dos coeficientes de variação genotípica (CV_g) foram maiores para largura da semente (97,83%) seguida por comprimento e peso da semente com valores de

93,81 e 92,00% respectivamente. Tal fato é confirmado pelas estimativas da herdabilidade com valores variando de 99,27% para largura da semente a 97,18% para peso da semente.

A estimativa de herdabilidade foi significativamente alta para todas as características, tendo valores superiores a 50% exceto número de nós por cacho e comprimento do cacho. A possibilidade de obtenção de ganhos genéticos tanto no aumento quanto na largura das vagens e razão foliar, mostrou-se bastante viável, sendo as estimativas de herdabilidade para estas variáveis da ordem de 90,33, 87,74 e 95,58%.

A relação CV_g/CV_e determina a variabilidade genética; em que valores acima de 1 possuem maior variabilidade. No estudo, 68% dos caracteres avaliados apresentaram valores acima de 1, exceto para algumas características ligadas a inflorescência (TBF, NNCP, NNP, CDC) e a vagem (NLS, NSV) que apresentaram valores menores que 1. A relação foi maior para comprimento da semente com 3,89 seguido pelo peso da semente com 3,39 e razão foliar com 2,20, observando uma maior variabilidade genética.

Largura e comprimento de sementes (LS e CS) foram os caracteres que mais contribuíram para a divergência genética (Tabela 6). Os dois caracteres somam 49,28% na contribuição para a divergência. Os caracteres associados às sementes determinaram a divergência na formação de grupos para fava, e juntamente com o peso das sementes, que contribuiu 12,55% para a formação dos grupos.

As medidas de dissimilaridade das variáveis quantitativas estimadas pela distância de Mahalanobis indicaram os pares das variedades, com a maior (RSUPJA e MPIA) e menor distância (FCLJ e BUPA) genética. As variedades FJGA e MPIA foram frequentes na formação dos pares de maior dissimilaridade destacados em 23 grupos de acessos, os quais apresentaram valores próximos para o caráter CV. A dissimilaridade entre os indivíduos FJGA e RSUPJA revelou menor distância com base nos caracteres (169,13), maior proximidade genética, o que possibilita obter um cruzamento promissor em relação aos demais pares de indivíduos com intuito de obter melhores medidas comprimento e peso de sementes (PS e CS).

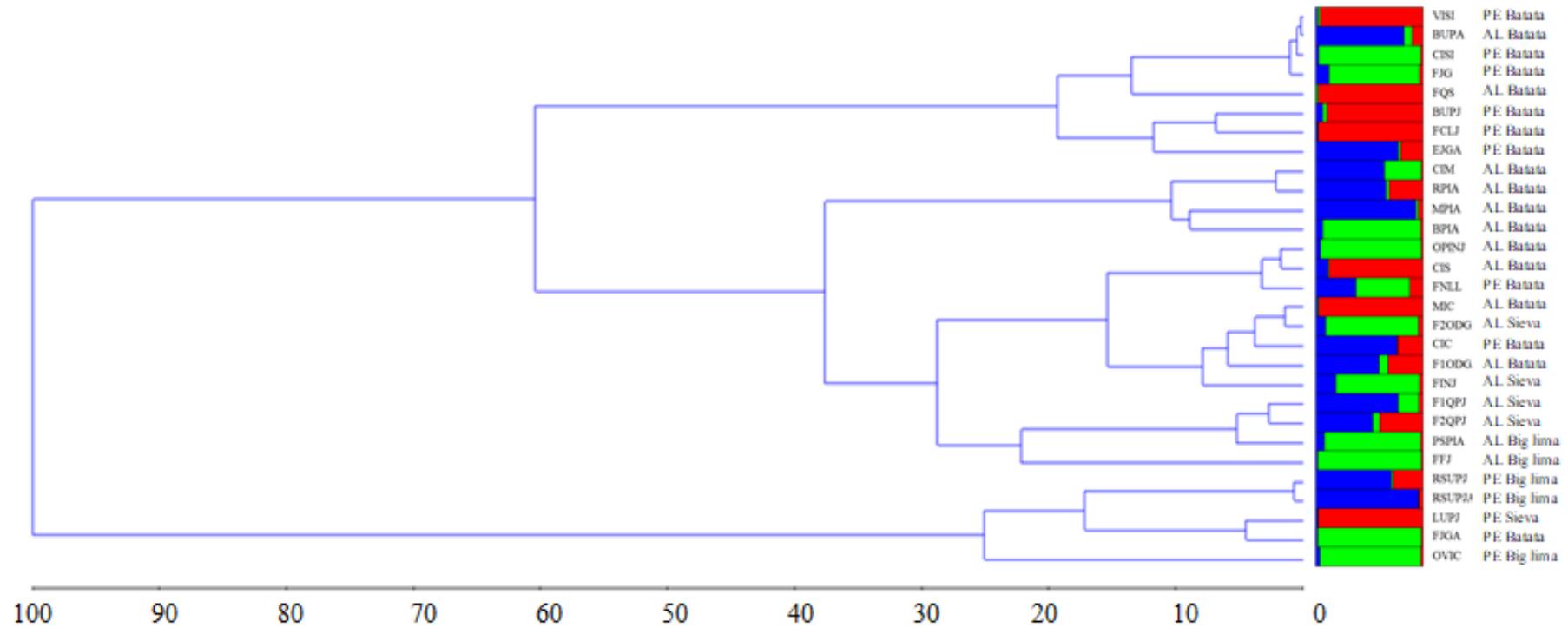
Tabela 6. Contribuição relativa dos caracteres quantitativos para a divergência genética utilizando o método de Singh para variedades de *Phaseolus lunatus* L.

Variável	S.j	S.j(%)	S.j Acumulado
LS	52.213,94	34,79	87,37
CS	21.748,38	14,49	52,58
PS	18.840,49	12,55	100,00
LFP	18.138,35	12,08	23,40
CFP	8.285,37	5,52	11,32
EC	5.017,84	3,34	5,80
MAT	4.973,08	3,31	38,09
RE	3.932,10	2,62	26,02
CHPF	3.695,87	2,46	2,46
LV	2.356,01	1,57	32,61
TBF	2.152,06	1,43	28,87
AP	2.142,61	1,42	27,44
DF	1.924,63	1,28	30,15
NSV	1.275,76	0,85	34,78
CV	1.141,57	0,76	33,37
NLS	845,90	0,56	33,93
NNCP	684,98	0,45	30,60
NNP	343,18	0,22	30,82
CDC	335,78	0,22	31,04

Comprimento desde a base do hipocótilo até à primeira folha completamente expandida (CHPF); espessura do caule (EC); comprimento da folha primária (CFP); largura da folha primária (LFP); relação folíolo (RF); altura da planta (AP); tamanho do botão floral (TBF); duração da floração (DF); número de nós no caule principal antes do primeiro cacho (NNCP); número de nós por cacho (NNP); comprimento do cacho (CDC); largura vagem (LV); comprimento vagem (CV); número de lóculos por vagem (NLS); número de sementes por vagem (NSV); dias de maturação em 50% das vagens (MAT); comprimento semente (CS); largura semente (LS); peso de 100 sementes (PS). Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Análise de Ward, baseado na distância generalizada de Mahalanobis, exibiu a formação de 2 grupos distintos (Figura 3). O grupo 1 formado por 24 genótipos. O grupo pode ser dividido em 4 subgrupos. O subgrupo A e B reúnem variedades do grupo Batata. O subgrupo C reúne variedade do grupo Batata e Sieva. O subgrupo D, mais interno, reúne variedades do grupo Big lima e Sieva cultivadas no estado de Alagoas. O grupo 2 reúne 5 genótipos caracterizados com variedades Big lima e Sieva, todas originadas do estado de Pernambuco.

Gráfico 3. Dendrograma empregando o método de Ward com base nas distâncias de Mahalanobis estimadas a partir de 19 descritores quantitativos avaliados em 29 genótipos de *Phaseolus lunatus* L.



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

O agrupamento pelo método de otimização de Tocher, utilizando como medida de dissimilaridade genética a distância generalizada de Mahalanobis, a partir de 19 caracteres quantitativos, agrupou os 29 genótipos em 6 grupos distintos influenciados pelos caracteres largura, comprimento e peso da semente.

As variedades foram menos polimórficas para os caracteres qualitativos. As variedades eram ausentes para a presença de antocianina nas folhas. A maior parte das plantas avaliadas apresentaram a cor verde para o hipocótilo (89,65%). Observa-se que todos os acessos aqui trabalhados tiveram hábito de crescimento do tipo indeterminado, que se caracteriza pelo desenvolvimento da gema terminal em uma guia trepadora, conferindo assim, um crescimento maior que as plantas de hábito determinado (FREIRE FILHO et al., 2005). O descritor que apresentou maior variação foi com relação à coloração da semente onde foram encontradas cores brancas, vermelhas e rajadas. Caracteres relacionados às sementes são de grande valia, pois a partir deles é possível identificar os tipos de cultivares e o grupo de dispersão. A cor e a forma do tegumento das sementes são um fator que pode contribuir para a boa comercialização do produto dependendo das preferências dos consumidores em diferentes regiões (GUIMARÃES et al., 2007).

A análise de otimização dos parâmetros qualitativos utilizou os valores médios para determinação dos agrupamentos gerando 11 grupos (Tabela 7). Observa-se que apenas a variedade 25 (FQS) manteve-se no mesmo grupo quando analisado as duas condições de dados. O número de grupos nos dois parâmetros (quantitativos e qualitativos) demonstra a ampla variabilidade genética entre os genótipos avaliados, visto que, o método preconiza minimizar a distância intragrupo e maximizar a distância intergrupos.

Tabela 7. Agrupamento de 29 variedades de *Phaseolus lunalus* L. pelo método de otimização de Tocher com base nas contribuições relativas das variáveis quantitativas e matriz de distâncias considerando as variáveis qualitativas

Grupos	Dados quantitativos	Dados qualitativos
1	VISI, BUPA, CISI, FJGM, BUPJ, FCLJ, EJGA, FQS	F1ODGA, F1QPS, PSPIA, BPIA, FQS, BUPJ, RPIA, MPIA, F2ODGA, F2QPS, BUPA, FNLL, CISI
2	RSUPJ, RSUPJA, LUPJ, FJGA	FCLJ, FFJ, RSUPJA, MIC, EJGA
3	MIC, F2ODGA, CIC, F1ODGA, OPINJ, FNLL, CIS, FINJ, F1QPS, F2QPS, PSPIA, RPIA	RSUPJ, CIS
4	CIM, BPIA, MPIA	OVIC, FJGM
5	FFJ	FJGA
6	OVIC	CIM
7		VISI
8		LUPJ
9		FINJ
10		CIC
11		OPINJ

Fonte: dados da pesquisa, 2021.

O grupo 3 para dados quantitativos apresentou maior número de variedades correspondendo a 31,03% do total; enquanto o grupo 1 para dados quantitativos agrupou 44,83% das variedades ocorrendo a formação de 6 grupos com apenas 1 variedade. Os grupos mais divergentes constituídos por um único indivíduo (5 e 6) indicando heterogeneidade das variedades.

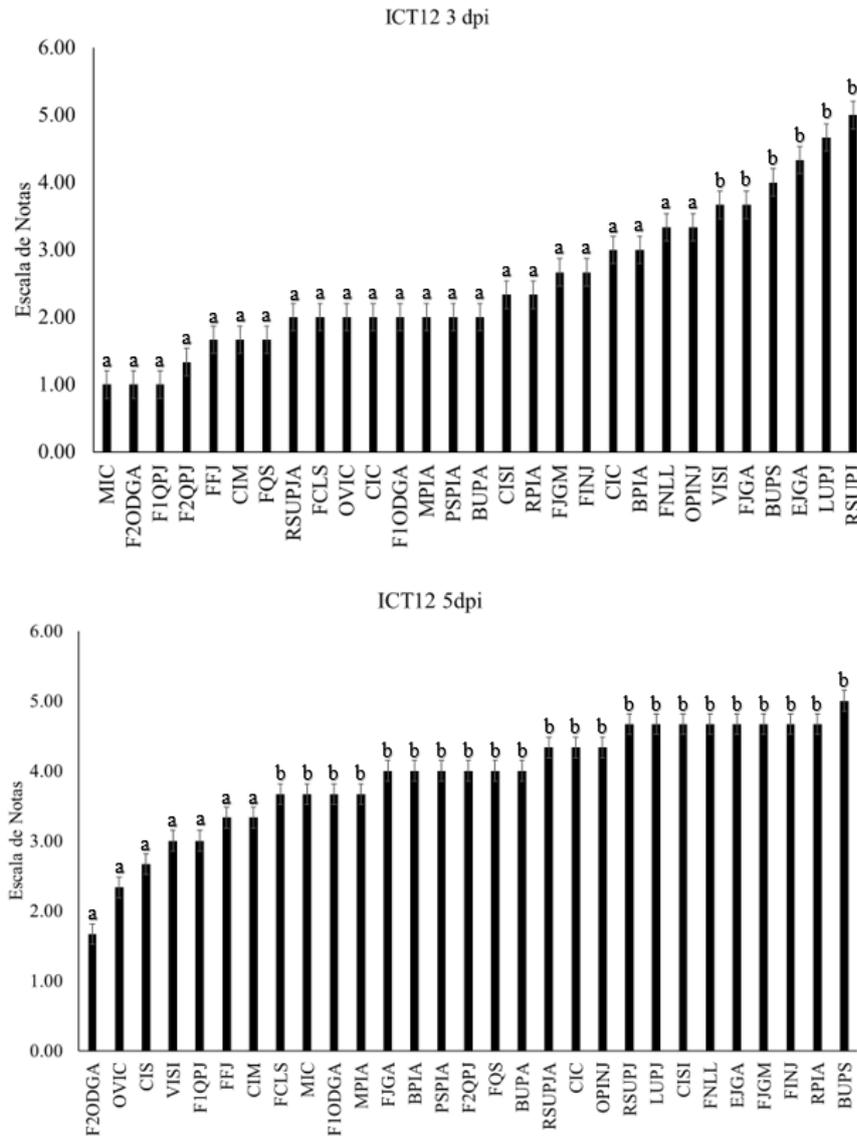
4.3.5 Ensaio *in vitro* de resistência a *Colletotrichum truncatum*

A avaliação dos sintomas das folhas destacadas com os dois isolados de *C. truncatum* apresentou diferenças significativas na diversidade da resposta ($p \leq 0,05$). Os primeiros sintomas da antracnose nas folhas foram o surgimento de manchas cloróticas na face adaxial. Muitas lesões evoluíram sem margem definida tornando-se necróticas levando a uma clorose generalizada das folhas inoculadas. As avaliações realizadas aos 3 e 5 dias após a inoculação (DAI) apontaram um aumento progressivo de níveis de

severidade da doença, com médias de notas de 1,00 a 4,66 para o isolado ICT12 (Figura 4) e 0,00 a 5,00 para o isolado ICT 16 (Figura 8).

Na análise da resposta de 29 variedades ao isolados ICT 12, aos 3 dias foi possível diferenciar 2 grupos de acordo com severidade dos sintomas avaliados. O grupo com maior manifestação dos sintomas agrupou variedades com notas atribuídas a variedades muito suscetíveis a altamente suscetível. No grupo com menor manifestação dos sintomas, agruparam as variedades com notas que caracterizavam materiais moderadamente resistentes a altamente suscetíveis. As variedades com menores notas foram F1QPS, F2ODGA, MIC. No quinto dia houve progressão da severidade da doença diferenciando as variedades em 2 grupos. O grupo com maior manifestação dos sintomas agrupou variedades com as notas atribuídas a variedades altamente suscetíveis. No grupo com menor manifestação dos sintomas, agruparam variedades com notas que caracterizavam materiais moderadamente resistentes a altamente suscetível. As variedades valores de severidade inferior a 3 foram F2ODGA, CIS e OVIC.

Figura 4. Valores médios de severidade *in vitro* das 29 variedades de fava ao isolado de *C. truncatum* ICT 12, dados obtidos através da escala de notas, aos três e cinco dias pós-inoculação (dpi). Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).



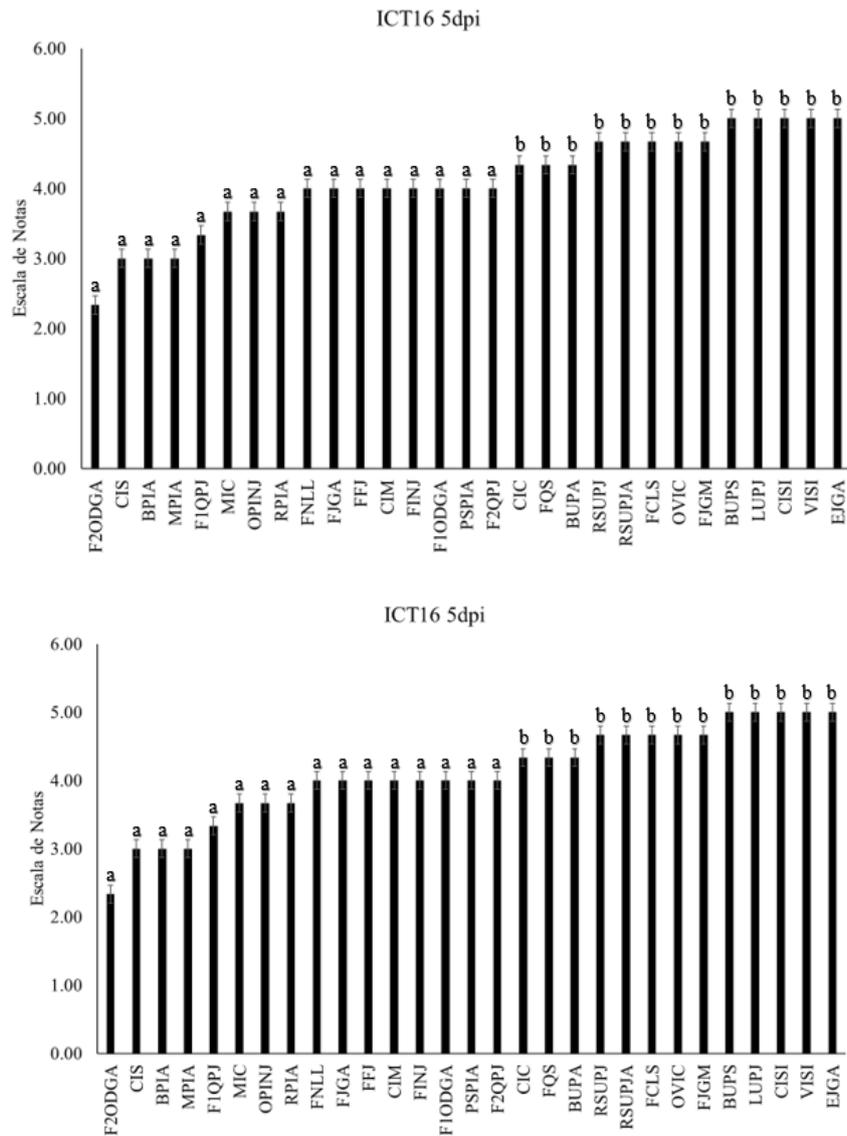
Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Na análise da resposta de 29 variedades ao isolados ICT 16, aos 3 dias foi possível diferenciar 4 grupos de acordo com severidade dos sintomas avaliados (Figura 5). O grupo mais suscetível agrupou variedades com notas atribuídas a variedades altamente suscetíveis. O segundo grupo mais suscetível reuniu as variedades com muito suscetível e moderadamente resistente. Os dois grupos com menores notas reúnem

variedades moderadamente resistentes. No grupo com notas menores, agruparam variedades com notas que caracterizavam materiais moderadamente resistentes a altamente resistentes. As variedades com menores notas foram FNLL, CIS e F2ODGA.

No quinto dia houve progressão da severidade da doença diferenciando as variedades em 2 grupos. O grupo mais suscetível agrupou variedades com notas atribuídas a variedades altamente suscetíveis. O grupo com maiores notas de severidade reuniu as variedades altamente suscetíveis. O segundo grupo com menores notas reúne as variedades com notas associadas a variedades moderadamente resistentes e altamente suscetíveis. As variedades com valores de severidade inferior a 3 foram F2ODGA, CIS, BPIA e MPIA.

Figura 5. Valores médios de severidade *in vitro* das 29 variedades de *Phaseolus lunatus* L. ao isolado de *C. truncatum* ICT 16, dados obtidos através da escala de notas, aos três e cinco dias pós-inoculação (dpi). Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

4.3.6 Nodulação

A avaliação da capacidade das variedades em formar nódulos a partir da comunidade de rizóbios presentes naturalmente no solo indicou diferenças estatísticas para massa seca da parte aérea da planta, número de nódulos por planta, massa (fresca e

seca) dos nódulos (Tabela 8). Na produção de massa seca da parte aérea houve a formação de 4 grupos. As variedades diferenciaram-se em dois grupos para números de nódulos por planta. Metade das variedades das variedades (51,72%) apresentaram maior produção de nódulos. Três grupos foram formados de acordo com massa fresca de nódulos com base nas diferenças estatísticas. No caráter massa seca dos nódulos, apenas 3 variedades se destacaram.

As variedades com menor massa seca (70%) apresentaram menor número de nódulos. As variedades com maior massa seca da parte aérea apresentaram maior massa fresca de nódulos. As variedades com maior número de nódulos apresentaram 50% das variedades com maior massa seca, sendo esta também apresentavam maior massa fresca de nódulo. A massa seca dos nódulos variou pouco. As variedades com maior massa seca dos nódulos apresentaram maiores valores de massa seca da parte aérea.

Tabela 8- Média dos caracteres de nodulação para as variedades de *Phaseolus lunatus* L.

Variedades	NOD	MFN (g)	MSN (g)	MSPA (g)
RSUPJ	359,00b	0,90b	0,33a	7,51b
FINJ	261,00b	0,33a	0,25a	4,24a
RSUPJA	230,67b	0,63b	0,32a	6,66b
MPIA	211,00b	0,64b	0,28a	3,83a
FQS	210,67b	1,40c	0,55a	6,28b
VISI	198,00b	1,16b	0,33a	8,73b
F1ODGA	197,33b	0,78b	0,34a	4,62a
CISI	184,00b	0,80b	0,27a	7,18b
OPINJ	182,33b	0,58a	0,21a	4,27a
FCLJ	181,67b	1,01b	0,29a	7,95b
F1QPS	176,67b	1,65c	0,31a	4,52a
BPIA	176,33b	0,73b	0,23a	3,94a
RPIA	174,33b	0,76b	0,28a	4,01a
F2QPS	165,00b	0,82b	0,35a	7,20b
BUPJ	156,33b	1,75c	1,07b	7,03b
LUPJ	153,00b	0,23a	0,15a	2,09a
CIC	152,67b	1,66c	0,22a	7,21b
F2ODGA	150,33b	1,23c	0,40a	5,05a
FJGM	146,67b	2,20d	1,14b	9,33c
FJGA	131,00a	0,28a	0,13a	2,93a
CIS	116,00a	0,45a	0,19a	4,22a
FNLL	115,33a	1,64c	0,25a	8,01b
OVIC	92,33a	2,29d	0,45a	12,44d
EJGA	90,33a	2,16d	0,84b	9,85c
MIC	88,67a	0,43a	0,10a	4,60a
FFJ	79,67a	0,14a	0,11a	2,07a
PSPIA	55,00a	0,82b	0,19a	4,26a
BUPA	36,00b	0,35a	0,05a	3,85a
CIM	32,33a	0,43a	0,09a	3,09a
Média	155,30	0,97	0,34	5,76

NOD – nódulos; MSPA – massa seca parte aérea; MFN – massa fresca dos nódulos; MSN – massa seca dos nódulos. Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (valor de $p < 0,05$). Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Houve correlação positiva entre a produção de nódulos e a massa seca da parte aérea das plantas (Tabela 9). A correlação entre a massa fresca dos nódulos e a resistência ao patógeno foi positiva e significativa. No entanto, variáveis de número de nódulos e resistência não foi significativa.

Tabela 9- Correlação entre as variáveis produção de nódulos (NOD), massa seca parte aérea (MSPA), massa fresca dos nódulos (MFN), massa seca dos nódulos (MSN) e resistência aos isolados de *Colletotrichum* (RESI).

	NOD	MSPA	MFN	MSN	RESI
NOD	1				
MSPA	-0,24	1			
MFN	0,10	-0,26	1		
MSN	-0,27	-0,06	-0,47*	1	
RESI	0,08	-0,16	0,38*	-0,20	1

* - Significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste t. Fonte: dados da pesquisa, 2021.

4.4 Discussão

A cultura marginal e do tipo pulse tem como principal patrimônio genético a diversidade das variedades mantidas por agricultores familiares e comunidades tradicionais. O feijão-fava (*P. lunatus*) é cultivado nas Américas e no Brasil, predominantemente na região nordeste. As culturas marginais são tolerantes as condições de baixa tecnologia, mas necessitam de estratégias sustentáveis para incremento de produção e manutenção da segurança econômica e alimentar. A busca na diversidade genética de possíveis combinações para aumento da produção e aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos é necessária para manutenção das culturas marginais e para segurança alimentar e econômica dos povos que delas dependem.

As variedades de *P. lunatus* coletadas em feiras livres do estado de Alagoas revelam a comercialização de sementes de outros estados e sendo predominante o tipo Batata. As variedades na sua maioria pertencem ao *pool* genético mesoamericano. Os marcadores moleculares estruturam as variedades em três populações contendo representantes de cada tipo nas 3 populações caracterizadas pelo tipo de semente. O tipo Batata cultivado no estado de Alagoas apresenta uma maior diversidade genética, resistência aos isolados locais de *C. truncatum*, mas com uma menor capacidade de nodular e produzir matéria seca. A presença de materiais de outros estados pode indicar mistura nas populações haja vista que produtores tendem a utilizar grãos comprados em feiras como sementes para iniciar cultivos e tendem a plantar material misturado. Apesar de ser uma planta autógama a fertilização cruzada da espécie pode chegar a 30% (SILVA, 2020). As variedades locais de feijão-fava devem ser preservadas pela diversidade e risco de perda de diversidade locais devido à introdução de materiais genéticos de outras regiões.

No presente estudo, os marcadores *Long Terminal Repeat* e *Universal Rice Primers* foi usado pela primeira vez para avaliar a variação genética do feijão fava em amostra de grãos de Pernambuco e Alagoas. O intuito era conhecer os recursos genéticos existentes com a probabilidade de contribuir para o desenvolvimento de estratégias para uma conservação eficaz e uso sustentável de *P. lunatus*. Assim como em outros marcadores a exemplo de microsátélites (GOMES et al., 2019), *Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD* (PURWANTI et al., 2021), *Inter Simple Sequence Repeat-ISSR* (NASIR et al., 2021) para todos os grupos do presente estudo, o

polimorfismo foi elevado variando entre 73,91 e 100%. Variações na porcentagem de polimorfismo poderiam ser devido a diferenças nos genótipos, ao número de amostras examinadas, ao número de oligonucleotídeos usados e a natureza dos marcadores entre outras (NASIR et al., 2021), bem como as regiões genômicas amostradas por eles.

Os valores de 0,322 e 0,334 de heterozigosidade esperada e observada indicam que o grupo Batata e as variedades de Pernambuco possuem maior diversidade entre si analisada com a distância generalizada de Mahalanobis podendo ser precursores no cruzamento de genótipos divergentes. Os índices de diversidade considerando as variedades de Alagoas e Pernambuco apresentam valores muito próximos. Isso é reflexo da proximidade geográfica entre as duas localidades que influi no intenso cruzamento entre as variedades. Além disso, maior produção de flores, presença de néctares florais e extraflorais, presença de polinizadores e condições ambientais também contribuem para o aumento das taxas de cruzamento em feijão-fava (FELIX et al., 2014). Variedades da República Dominicana e Porto Rico apresentaram baixa semelhança genética apesar de cultivadas por agricultores com estreitos laços culturais e econômicos, bem como à facilidade de transito entre propriedades (MONTERO-ROJAS et al., 2013). As variedades são predominantemente do grupo Sieva na América Central (ESQUIVEL et al., 1990) que no presente estudo aparece com menor valor de heterozigosidade esperada e observada quando comparado ao grupo Batata e Big Lima.

A separação das subpopulações em cada valor K em *P. lunatus* corrobora para o predomínio dos *pools* genéticos mesoamericanos (MI e MII) com maior compartilhamento de alelos entre o grupo Sieva e Batata. Sendo assim, consideram-se 3 subpopulações com um grande número de híbridos, sugerindo um alto grau de introgressão entre esses três conjuntos de genes. Foram encontrados em feijão-fava no Brasil, potenciais híbridos apresentando antecedentes estimados a partir de duas subpopulações, enquanto outros acessos apresentaram antecedentes estimados das três subpopulações reflexos de introgressão ocorrida ao longo do tempo (SILVA et al., 2018).

A análise de marcadores e de estrutura populacional indica que à medida as variedades compartilham material genético, os *pools* fiquem mais homogêneos em relação a características morfométricas. Pesquisas relacionadas ao fluxo gênico no centro de origem de *Phaseolus lunatus* indicam que a maioria das populações selvagens estava sujeitas ao fluxo gênico do *pool* genético doméstico (MARTÍNEZ-CASTILLO et al., 2007). Eventos de hibridação entre populações selvagens e domesticadas também

ocorreram ao longo do tempo com feijão (BEEBE et al., 1997) alterando caracteres morfo-agronômicos. Estudos de caracterização morfoagronômica que visam a discriminação e classificação de acessos de feijão-fava quanto aos centros de domesticação têm sido de grande importância para a conservação da biodiversidade da espécie (ALMEIDA et al., 2021). Tais estudos associados a parâmetros filogenéticos contribuem significativamente para a identidade dessas variedades no Brasil. Essa condição é observada no genótipo OVIC que filogeneticamente encontra-se alocado entre os genótipos andinos domesticados; apresenta características de peso, tamanho da semente e hábito de crescimento que se assemelha aos domesticados. A variedade anterior citada juntamente com FFJ, PSPIA, RSUPJA, RSUPJ foram as que apresentaram vagens mais longas. Este caráter é importante, pois vagens grandes são desejáveis para a colheita manual (SILVA; NEVES, 2011). Assim, nos germoplasmas avaliados, encontram-se variedades com características vantajosas que poderiam ser explorados em futuros cruzamentos.

Os caracteres qualitativos analisados pelo teste Scott-Knott agruparam a maioria dos materiais que apresentou peso e tamanho das sementes abaixo da média, exceto FFJ, FJGA, OVIC, LUPS, RSUPJA, RSUPJ. As variedades apresentaram dias de floração uniformes e acima da média exceto para FJGM. A floração e formação das sementes estão entre as características mais importantes para as leguminosas pois permitem a adaptação de populações domesticadas (RAGGI et al., 2014; CHACÓN-SÁNCHEZ et al., 2018). A maturação das vagens variou entre 44 dias (FNLL) e 180 dias (F1ODGA). Na estação seca, a maturação do feijão-fava pode durar em média 120 dias (TRANI et al., 2015), sendo assim, condições genéticas ligadas a cultivar reduziu o tempo médio de maturação. Outro fator são as altas temperaturas durante a floração que reduzem ou atrasam o conjunto de vagens e pode resultar em colheita tardia (ERNEST et al., 2017), alterando o processo de maturação. As variedades com menor tempo de floração possuem potencial para seleção de variedades no curto prazo, pois a fava possui mecanismos favoráveis para reprodução vegetativa.

A utilização e eficácia dos marcadores morfo-agronômicos em feijão-fava foram eficientes para estudos de diversidade em variedades do Peru (VERA et al., 2015), Cuba (CASTIÑEIRAS et al., 2008), México (LÓPEZ-ALCOCER et al., 2016). A partir destas marcas, podem-se estimar parâmetros genéticos. Tais estimativas são importantes parâmetros significativos na seleção de diferentes genótipos de uma população (MANGGOEL et al., 2012).

A análise da herdabilidade, foram maiores para largura da semente (99,27%) e peso das sementes (97,18%). Valores elevados de herdabilidade para *P. lunatus* foi observado no caráter peso das sementes (98%) em variedades da Nigéria (AKANDE; BALOGUN, 2007) sendo indicado como caráter para seleção. Altas herdabilidades indicam o predomínio da ação gênica aditiva na expressão da característica (MANGGOEL et al. 2012; RASHWAN, 2010). Todavia, as estimativas de herdabilidade sozinhas não fornecem informações sólidas sobre o ganho esperado na próxima geração, mas devem ser consideradas em conjunto com as estimativas de parâmetros genético (SHUKLA et al., 2006).

A elevada divergência genética visualizada na análise de variância pode ser confirmada entre os genótipos pelas distâncias de Mahalanobis. Embora a grande maioria dos genótipos esteja agrupada com menos de 477 unidades de distância (por exemplo, grupo I), os grupos divergiram entre si em distâncias de cerca de 1.431 unidades ou mais. De modo geral, dentre a diversidade existente entre as variedades interessa aos melhoristas todas as possibilidades com divergência suficiente para gerar variabilidade nas populações segregantes (GRIGOLO et al., 2018). As variedades indicadas para um possível programa de melhoramento são RSUPJ, RSUPJA, LUPJ, FJGA, OVIC devido as maiores divergência nos caracteres quantitativos e qualitativos.

As variedades diferenciaram na resposta aos dois isolados de *C. truncanum*. Na avaliação *in vitro* os isolados apresentaram o mesmo grau de agressividade. A resistência ao isolado ICT 12 está distribuída nos 3 grupos caracterizados pelo tipo de semente (Big lima, Sieva e Batata) originada dos 2 estados (Alagoas e Pernambuco). A resistência está distribuída entre os grupos andinos (OVIC) e no grupo mesoamericano, caracterizados pela variedade do tipo Sieva e Batata. A resistência *in vitro* pode ter dois momentos, um que manifesta aos 3 dias, que pode ser superada ou não aos 5 dias. Os mecanismos que atribue tal resistência esta em variedades diferentes (MIC, CIS e OVIC) ou podem estar reunidas em uma única variedade (F2ODGA).

A resistência ao isolado ICT16 está restrita ao grupo Sieva e Batata. A resistência manifesta principalmente nas variedades cultivadas no estado de Alagoas. Indica que pode haver seleção regional a resistência a patógenos locais já que os patógenos foram isolados de plantas sintomáticas coletadas no estado de Alagoas no município de Murici e Messias, Alagoas. A resistência também pode ser caracterizada a uma resposta em duas fases como a que acontece com isolados ICT12. As variedades apresentam os dois componentes a exceção é variedades FNLL, que apresentam apenas

uma resposta de resistência ao início da colonização. A resistência aos dois isolados pode estar presente em umas variedades. A variedade pertence ao grupo Sieva (F2DGA). Indicando que a resistência ao *C. truncatum* pode ser multifatorial com possibilidade reunião dos componentes em um único genótipo.

A resistência somente pode ocorrer se houver o reconhecimento da proteína de avirulência do patógeno pela proteína de resistência da planta. Modelos do tipo receptor-elecitor e do tipo sentinela ou “guarda” têm sido propostos para explicar tal reconhecimento. É importante enfatizar que os genes R, apesar de possuírem enorme importância no processo de resistência, não atuam sozinhos. Vários outros genes, ativados via transdução de sinais, coordenam desde respostas rápidas e localizadas até repostas sistêmicas que em conjunto promovem a resistência. Atualmente, diversas ferramentas de biologia molecular estão disponíveis e sendo rotineiramente usadas em estudos de genética da interação planta patógeno, como é o caso do mapeamento genético (JUNGHANS et al., 2003), microarranjos de DNA (KAZAN et al., 2001) e bibliotecas de subtração (PARK et al., 2000). Plantas e patógenos vêm a milhares de anos co-evoluindo, e nessa guerra infundável, os patógenos, em função de sua diversidade e capacidade de adaptação tem se sobressaído.

Os diferentes genótipos apresentam diferentes graus de suscetibilidade à antracnose, mas também existem fontes de resistência a essa doença entre as amostras estudadas. O *C. truncatum*. é espécie a mais importante economicamente do *P. lunatus* entre os agentes etiológicos da antracnose. Além de ser a espécie mais prevalente em termos de distribuição em órgãos de plantas e áreas geográficas é considerado o mais virulento (CAVALCANTE et al., 2019).

A taxa de nodulação parece ser mais frequente nas variedades big lima e sieva (3 de 5; 4 de 5) em relação as variedades do tipo batata (10 de 19). A reduzida representatividade para os grupos big lima pode provocar uma distorção dos dados. O número de nódulos foi semelhante aos estudos com variedades das Américas em que o valor variou entre 51 e 484 (ARAUJO et al. 2017). As variedades batatas são predominantes do estado de Alagoas e apresentam menor número de nódulos por planta (7 de 16 contra 9 de 13). As variedades de Alagoas, predominantemente do grupo batata, apresentaram menor acúmulo de massa seca. No entanto, um processo de seleção natural para as variedades do tipo batata pode ter comprometido a nodulação em detrimento da redução da semente e aumento da produção. O ganho de produção para os cultivos em Alagoas pode ser obtidas com seleção de estirpes de bactérias rizobiais

adaptadas as variedades locais. A inoculação das sementes provavelmente aumentará a produção principalmente em cultivos com baixa adoção de tecnologia. Complementarmente, as diferenças na nodulação observada entre variedades podem representar diferenças entre genótipos bacterianos, bem como suas interações e condições ambientais (COSTA NETO, 2016; BALLHORN et al., 2016). Os parâmetros relativos à produção de massa seca da parte aérea não apresentou nenhuma correlação positiva com os demais parâmetros. As plantas foram cultivadas em condição de nodulação não podendo mensurar o ganho da produção da biomassa em relação à condição não inoculada.

A resistência a antracnose apresentou uma correlação positiva (0,38) com o peso fresco do nódulo. As variedades com maior peso fresco dos nódulos estão reunidas entre aquelas com menores números de nódulos. Algumas estão no grupo com maior nodulação, no entanto os valores estão no extrato inferior. O menor número de infecção pode ser uma forma um sistema de defesa mais ativa que restringe a colonização, mas que pode compensar a simbiose, permitindo a geração de nódulo maior.

4.4 Conclusão

As variedades de *P. lunatus* cultivadas no estado de alagoas apresentam uma diversidade genética associada aos pool genéticos, a resistencia a antracnose e resposta a simbiose para bactérias fixadoras de nitrogênio. Diversidade genética que deve ser preservada e explorada para aumento da produtividade e melhoria da seguranças alimentar e econômica dos povos que depende do *P. lunatus* .

4.5 Referências Bibliográficas

- AKANDE, S. R.; BALOGUN, M. O. Evaluation and heritability studies of local Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) cultivars from south-west Nigeria. **Revista Científica UDO Agrícola**, v. 7, n. 1, p. 22-28, 2007.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A. Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Ed. UFV: Viçosa, 2007. p.23-50.
- ANDUEZA-NOH, R. H.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. Domestication of small-seeded lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces in Mesoamerica: evidence from microsatellite markers. **Genetica**, v. 143, n. 6, p. 657-669, 2015.
- ARAUJO, A. S. F.; DE ALMEIDA LOPES, A. C.; Y TERAN, J. C. B. M.; PALKOVIC, A.; GEPTS, P. Nodulation ability in different genotypes of *Phaseolus lunatus* by rhizobia from California agricultural soils. **Symbiosis**, v. 73, n. 1, p. 7-14, 2017.
- ARAUJO PINHEIRO, R., PERIPOLLI BEVILAQUA, G. A., SCHIAVON, J. S., & ANTUNES, I. F. Morpho-agronomic characterization of lima bean genotypes from subtropical Brazil. 2017. **USDA-ARS**, Washington, DC, USA.
- ASANTHE, I. K.; ADDY, R.; CARSON, G. Use of linear discriminant function analysis in seed morphotype relationship study in 31 Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) accessions in Ghana. **Ghana Journal of Agricultural Science**, v. 39, n. 1, p. 87-92, 2006.
- BALLHORN D.J.; SCHÄDLER M.; ELIAS J.D.; MILLAR, J.A.; KAUTZ S. Friend or foe - light availability determines the relationship between mycorrhizal fungi, rhizobia and lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0154116, 2016.
- BAUDET, J. C. Origine et classification des espèces cultivées du genre *Phaseolus*. **Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique/Bulletin van de Koninklijke Belgische Botanische Vereniging**, p. 65-76, 1977.
- BEEBE, S.; CH, O. T.; GONZA, A. V.; CHACO, M. I.; DEBOUCK, D. G. Wild-weed-crop complexes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) in the Andes of Peru and Colombia, and their implications for conservation and breeding. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 44, n. 1, p. 73-91, 1997.
- BELMINO, C. S. **Resistência do feijão-caupi a *Colletotrichum truncatum***. Doutorado (Tese), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004, 64p.

BITOCCHI, E.; RAU, D.; BELLUCCI, E.; RODRIGUEZ, M.; MURGIA, M. L.; GIOIA, T.; PAPA, R. Beans (*Phaseolus* spp.) as a model for understanding crop evolution. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 722, 2017.

CAMACHO-PÉREZ, L.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; MIJANGOS-CORTÉS, J. O.; FERRER-ORTEGA, M. M.; BAUDOIN, J. P.; ANDUEZA-NOH, R. H. Genetic structure of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces grown in the Mayan area. **Genetic resources and crop evolution**, v. 65, n. 1, p. 229-241, 2018.

CÂMARA, C. R. S.; URREA, C. A.; SCHLEGEL, V. Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a functional food: implications on human health. **Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 90-111, 2013.

CARMO, M. D. S. D.; CARVALHO, E. M. S.; GOMES, R. L. F.; LOPES, Â. C. D. A.; CAVALCANTE, G. R. D. S. Avaliação de acessos de feijão-fava, para resistência a *Colletotrichum truncatum*, em condições de folhas destacadas e campo. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 292-297, 2015.

CARVALHO, E. M. S. **Antracnose em feijão-fava: caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum***. Doutorado (Tese), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal – SP, 2009, 53p.

CASTIÑEIRAS, L.; WALÓN, L., LEÓN, N.; SHAGARODSKY, T.; BARRIOS, O.; FERNÁNDEZ, L.; DE ARMAS, D. Manejo de la variabilidad de *Phaseolus lunatus* (frijol caballero) conservada en comunidades rurales de Cuba. **Revista del Jardín Botánico Nacional**, p. 151-160, 2008.

CAVALCANTE, G. R. S. **Reação de subamostras de feijão-fava à antracnose e seu controle com extrato de nim**. Mestrado (Dissertação), Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI, 2011, 62p.

CAVALCANTE, G. R.; BARGUIL, B. M.; VIEIRA, W. A.; LIMA, W. G.; MICHEREFF, S. J., DOYLE, V. P.; CÂMARA, M. P. Diversity, prevalence, and virulence of *Colletotrichum* species associated with lima bean in Brazil. **Plant disease**, v. 103, n. 8, p. 1961-1966, 2019.

CAVALCANTE, G. R. S.; CARVALHO, E. M. S.; GOMES, R. L. F.; SANTOS, A. R. B. SANTOS, C. M. P. M. Reação de subamostras de feijão-fava à antracnose. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, n.4, p. 329-333, 2012.

CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. The Domestication Syndrome in *Phaseolus* Crop Plants: A Review of Two Key Domestication Traits. In: **Origin and Evolution of Biodiversity**. Springer, Cham, 2018. p. 37-59.

CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Testing domestication scenarios of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Mesoamerica: insights from genome-wide genetic markers. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1551, 2017.

COSTA, G. E. A., QUEIROZ-MONICI, K. S., REIS, S. M. P. M., OLIVEIRA, A. C. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food chemistry**, v. 94, n. 3, p. 327-330, 2006.

COSTA NETO V.P. **Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em feijão-fava inoculado com rizóbios isolados de solos da microrregião do Médio Parnaíba Piauiense**. Dissertação Mestrado em Agronomia. Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brazil, p 59, 2016.

CRUZ, C.D. Programa Genes. **Estatística Experimental e Matrizes**. (1. ed.). Viçosa: Editora UFV, 2006, v.1. 285p.

CRUZ, C. D. Programa Genes-Ampliado e integrado aos aplicativos R, Matlab e Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. *Focus*, v.12, p.13-15, 1990.

EARL, D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation genetics resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

ERNEST, E. G.; WISSER, R. J.; JOHNSON, G. C. Physiological Effects of Heat Stress on Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) and Development of Heat Tolerance Screening Techniques. 2017. **USDA-ARS**, Washington, DC, USA.

ESQUIVEL, M.; CASTIÑEIRAS, L.; HAMMER, K. Origin, classification, variation and distribution of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in the light of Cuban material. **Euphytica**, v. 49, n. 2, p. 89-97, 1990.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EZEAGU, I. E.; IBEGBU, M. D. Biochemical composition and nutritional potential of ukpa: a variety of tropical lima beans (*Phaseolus lunatus*) from Nigeria-a short report. **Polish journal of food and nutrition sciences**, v. 60, n. 3, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços**

tecnológicos. Embrapa Informação Tecnológica, Teresina, PI: Embrapa Meio-Norte, 2005.

FOOD, F. A. O. Agriculture Organization of the United Nations. How to feed the world in 2050. **FAO. How to feed the world in**, v. 2050, p. 12-13, 2009.

FRANÇA, S. M.; MELO JÚNIOR, L. C.; NETO, A. V. G.; SILVA, P. R. R.; LIMA, É. F. B.; MELO, J. W. S. Natural enemies associated with *Phaseolus lunatus* L. (Fabaceae) in Northeast Brazil. **Florida Entomologist**, v. 101, n. 4, p. 688-691, 2018.

GOMES, R. L. F.; COSTA, M. F.; ALVES-PEREIRA, A.; BAJAY, M. M.; VIANA, J. P. G.; VALENTE, S. E. D. S.; PINHEIRO, J. B. A lima bean core collection based on molecular markers. **Scientia Agricola**, v. 77, 2019.

GOMES, S. O.; REIS, R. L. R.; DO CARMO, M. D. S.; DE ASSUNÇÃO FILHO, J. R.; GOMES, R. L. F.; DE ALMEIDA LOPES, Â. C. Avaliação de componentes de produtividade de grãos em sub-amostras de feijão-fava de crescimento determinado. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 7, p.312-317, 2010.

GONÇALVES, G. D. M. C.; GONÇALVES, M. D. M. C.; MEDEIROS, A. M.; DE ALMEIDA LOPES, Â. C.; GOMES, R. L. F. Dissimilaridades genética entre acessos de feijão-fava utilizando caracteres morfoagronômicos. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 4, p. 1125-1132, 2019.

GORNY, A. M.; KIKKERT, J. R.; SHIVAS, R. G.; PETHYBRIDGE, S. J. First report of *Didymella americana* on baby lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Canadian journal of plant pathology**, v. 38, n. 3, p. 389-394, 2016.

GRABKE, A.; WILLIAMSON, M.; HENDERSON, G. W.; SCHNABEL, G. First report of anthracnose on peach fruit caused by *Colletotrichum truncatum* in South Carolina. **Plant disease**, v. 98, n. 8, p. 1154-1154, 2014.

GUIMARAES, W.N.; MARTINS, L.S.; SILVA, E.F.; FERRAZ, G.M.G.; OLIVEIRA, F.J. Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Engenharia. Agrícola e Ambiental**, v.11, n.1, p.37-45, 2007.

IBEABUCHI, J. C.; OKAFOR, D. C.; AHAOTU, N. N.; ELUCHIE, C. N.; AGUNWAH, I. M.; CHUKWU, M. N.; AMANDIKWA, C. Effect of dehulling on proximate composition and functional properties of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) grown in enugu state. **Journal of Food Research**, v. 8, n. 2, p. 116-121, 2019.

JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; ODA, S.; MELLO, E. J.; GRATTAPAGLIA, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in Eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 1, p. 175-180, 2003.

KAZAN, K.; SCHENK, P. M.; WILSON, I.; MANNERS, J. M. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defence responses. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 3, p. 177-185, 2001.

LEMOS, L.B.; OLIVEIRA, R.S. DE; PALOMINO, E.C.; SILVA, T.R.B. DA. Características agronômicas e tecnológicas de genótipos de feijão do grupo comercial Carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.4, p.319-326, 2004.

LIMA, J. F. **Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum* agente causal da antracnose do feijão-fava no estado de Alagoas.** Mestrado (Dissertação), Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo –AL, 2013, 52p.

LIN, L. Z.; HARNLY, J. M.; PASTOR-CORRALES, M. S.; LUTHRIA, D. L. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food chemistry**, v. 107, n. 1, p. 399-410, 2008.

LÓPEZ-ALCOCER, J. D. J.; LÉPIZ-ILDEFONSO, R.; GONZÁLEZ-EGUIARTE, D. R.; RODRÍGUEZ-MACÍAS, R.; LÓPEZ-ALCOCER, E. Variabilidad morfológica de *Phaseolus lunatus* L. silvestre de la región Occidente de México. **Revista fitotecnia mexicana**, v. 39, n. 1, p. 49-58, 2016.

MANGGOEL, W.; UGURU, M. I.; NDAM, O. N.; DASBAK, M. A. Genetic variability, correlation and path coefficient analysis of some yield components of ten cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] accessions. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 4, n. 5, p. 80-86, 2012.

MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; ZIZUMBO-VILLARREAL, D.; GEPTS, P.; COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P. Gene flow and genetic structure in the wild–weedy–domesticated complex of *Phaseolus lunatus* L. in its Mesoamerican center of domestication and diversity. **Crop science**, v. 47, n. 1, p. 58-66, 2007.

MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; ZIZUMBO-VILLARREAL, D.; PERALES-RIVERA, H.; COLUNGA-GARCÍAMARIN, P. Intraspecific diversity and morpho-phenological Variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatan Peninsula, Mexico. **Economic Botany**, v. 58, n. 3, p. 354-380, 2004.

MARTÍNEZ-NIETO, M. I.; ESTRELLES, E.; PRIETO-MOSSI, J.; ROSELLÓ, J.; SORIANO, P. Resilience capacity assessment of the traditional Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces facing climate change. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 758, 2020.

MENDES, B. M. J.; BERGAMIN FILHO, A. Adaptação da técnica da cultura de folha destacada para a quantificação dos parâmetros epidemiológicos monocíclicos da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli* var. *typica*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, p.103-114, 1986.

MISHRA, R.; NANDA, S.; ROUT, E.; CHAND, S. K.; MOHANTY, J. N.; JOSHI, R. K. Differential expression of defense-related genes in chilli pepper infected with

anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 97, p. 1-10, 2017.

MONTERO-ROJAS, M.; ORTIZ, M.; BEAVER, J. S.; SIRITUNGA, D. Genetic, morphological and cyanogen content evaluation of a new collection of Caribbean Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces. **Genetic resources and crop evolution**, v. 60, n. 8, p. 2241-2252, 2013.

NASIR, Leyila Nasir Leyila; FEYISSA, Tileye; ASFAW, Zemedu. Genetic diversity analysis of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landrace from Ethiopia as revealed by ISSR marker. **SINET: Ethiopian Journal of Science**, v. 44, n. 1, p. 81-90, 2021.

OLIVEIRA, A. E. S.; SIMEÃO, M.; MOUSINHO, F. E. P.; GOMES, R. L. F. Desenvolvimento do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) sob déficit hídrico cultivado em ambiente protegido. **HOLOS**, v. 1, p. 143-151, 2014.

OLIVEIRA-SILVA, R. N.; LOBO-BURLE, M.; GOMES-PÁDUA, J.; ALMEIDA-LOPES, A. C. D.; FERREIRA-GOMES, R. L.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Phenotypic diversity in lima bean landraces cultivated in Brazil, using the Ward-MLM strategy. **Chilean journal of agricultural research**, v. 77, n. 1, p. 35-40, 2017.

PARK, S.; HUANG, Y.; AYOUBI, P. Identification of expression profiles of sorghum genes in response to greenbug phloem-feeding using cDNA subtraction and microarray analysis. **Planta**, v. 223, n. 5, p. 932-947, 2006.

PEAKALL, R. SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update, **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–25391, 2012.

PENHA, J. S.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; PINHEIRO, J. B.; ASSUNÇÃO FILHO, J. R.; SILVESTRE, E. A.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Estimation of natural outcrossing rate and genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L. var. *lunatus*) from Brazil using SSR markers: implications for conservation and breeding. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 64, n. 6, p. 1355-1364, 2017.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15 ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 2009, 451 p.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PURWANTI, E.; AMIN, M.; ZUBAIDAH, S.; MAFTUCHAH, M.; HIDAYATI, S. N.; FAUZI, A. Diversity of *Phaseolus lunatus* L. in East Java, Indonesia based on PCR-RAPD technique. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 2, 2021.

RAGGI, L.; TISSI, C.; MAZZUCATO, A.; NEGRI, V. Molecular polymorphism related to flowering trait variation in a *Phaseolus vulgaris* L. collection. **Plant Science**, v. 215, p. 180-189, 2014.

RANATHUNGE, N. P.; MONGKOLPORN, O.; FORD, R.; TAYLOR, P. W. J. *Colletotrichum truncatum* Pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defence mechanisms. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, n. 5, p. 463-473, 2012.

RAO, R.C. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: Jonh Wiley and Sons, 1952. 390 p.

RAPAPORT, E.H.; DRAUSAL, B. S. Edible plants. In: **Levin S, editor Encyclopedia of biodiversity**, New York: Academi Press; p. 375–382, 2001.

RUIZ-GIL, P. J.; CHEPE-CRUZ, G.; ANDUEZA-NOH, R. H.; ORTIZ-GARCÍA, M. M.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Differentiation and genetic diversity of *Phaseolus lunatus* wild populations from Chiapas, Mexico, and their genetic relationships with MI and MII groups. **Botanical Sciences**, v. 94, n. 4, p. 701-712, 2016.

SÁ, A. G. A.; MORENO, Y. M. F.; CARCIOFI, B. A. M. Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 170-184, 2020.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of molecular biology**, v. 94, n. 3, p. 441-448, 1975.

SILVA, Jéssica Daniele Lustosa. **DIVERSIDADE, ESTRUTURA E EROSÃO GENÉTICA DO FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus*) NO NORDESTE DO BRASIL**. Doutorado (Tese), Universidade Federal do Piauí, Teresina –PI, 2020, 124p.

SILVA, R. N. O.; BURLE, M. L., PÁDUA, J. G., LOPES, A. C. D. A, GOMES, R. L. F., MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Phenotypic diversity in lima bean landraces cultivated in Brazil, using the Ward-MLM strategy. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 77, n. 1, p. 35-40, 2017.

SILVA, R.N.O.; LOPES, A.C.A.; GOMES, R.L.F.; PÁDUA, J.G.; BURLE, M.L. High diversity of cultivated lima beans (*Phaseolus lunatus*) in Brazil consisting of one Andean and two Mesoamerican groups with strong introgression between the gene pools. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 4, p. 1-15, 2019.

SOUSA, E. S.; MELO, M. P.; PIRES, L. L.; SILVA, B. A.; GARCÍA, M. E. M.; SOUSA, E. M. J.; BESERRA, J. E. A. First report of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot in lima bean (*Phaseolus lunatus*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 8, p. 1551-1551, 2017.

SOUSA, E. S.; SILVA, J. R. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; DE MELO, M. P.; FEIJÓ, F. M.; MATOS, K. S. BESERRA, J. E. A. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical plant pathology**, v. 43, n. 1, p. 78-84, 2018.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The staden package, 1998. In: **Bioinformatics methods and protocols**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 115-130, 2000.

TRANI, P. E.; PASSOS, F. A.; PEREIRA, J. E., & SEMIS, J. B. Calagem e adubação do feijão-vagem, feijão-Fava (ou Fava-italiana), feijão-de-lima e ervilha torta (ou ervilha-de-vagem). **Campinas: IAC**, 2015.

VENCOVSKY, R. Herança Quantitativa. In: PATERNIANI E. (ed.). **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Piracicaba: ESALQ, 1978. p.122-201.

VERA, M. F. P.; ALCÁNTARA, E. L.; ARAUJO, E. D. L. C.; SOTO, J. C. R. Variabilidad morfo-agronómica en poblaciones de pallar, *Phaseolus lunatus*, cultivado en condiciones de Costa de la Provincia de Trujillo (Perú). **REBIOL**, v. 35, n. 2, p. 29-38, 2015.

YANG, H.; HARTMAN, G. L. Methods and evaluation of soybean genotypes for resistance to *Colletotrichum truncatum*. **Plant disease**, v. 99, n. 1, p. 143-148, 2015.

YU, J.; WU, J.; GUO, Z.; ZHANG, X.; XU, M.; YU, J.; CHI, Y. First Report of Peanut anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in China. **Plant Disease**, n. ja, 2019.

7. PREDIÇÃO DO POTENCIAL DE RESISTÊNCIA A *Colletotrichum truncatum* EM SEGREGANTES DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus*)

RESUMO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) é uma cultura de subsistência, resistente a seca, e possui alto conteúdo proteico. No entanto, a cultura tem a produtividade prejudicada pela incidência de *Colletotrichum truncatum*, fungo fitopatogênico que acomete folhas, pecíolos e vagens. Uma alternativa viável e ecologicamente sustentável é uso da hibridação entre variedades no intuito de tirar proveito do vigor híbrido transitório, mover a variação desejável entre linhagens e gerar novos fenótipos resistentes. Desta forma, o conhecimento da diversidade gerada a partir dos cruzamentos é de suma importância na geração de novos genótipos principalmente quando relacionado a fitopatógenos capazes de prejudicar a produção de grãos. No estudo, objetivou-se avaliar o potencial de populações segregantes, provenientes do cruzamento entre acessos de *P. lunatus*. Flores emasculadas de RJM (♂), suscetível, receberam pólen de G65 (♀), resistente, quando foram obtidos a geração F1 que por autofecundação obteve-se a geração F2. Em seguida, avaliações de 10 caracteres morfoagronômicos e de resistência utilizando o isolado de *C. truncatum* na F2, 96 indivíduos, resultaram na segregação entre o cruzamento de parentais de *Phaseolus lunatus*. Os principais parâmetros que diferenciaram os parentais segregaram na proporção 3 para 1, sendo tipo de porte, resposta ao fotoperíodo, maturação de vagens e resistência a antracnose. Os genótipos contrastantes identificados para combinação foram 83, 12, 14 e 19 e qualquer um dos 30 acessos que não apresentaram nenhuma lesão de antracnose. A resistência a antracnose no cruzamento demonstra ser dominante. O porte indeterminado segregou como um caractere recessivo, sendo diferente do observado em outros cruzamentos contrastantes entre porte indeterminado e determinado de *P. lunatus*.

Palavras-chave: fava, cruzamentos, antracnose.

ABSTRACT

The global population is expected to reach at least 9 billion by 2050, requiring up to 70% more food this is expected to impact food production systems and the food chain. Such expansion will require technological alternatives for the demand for foods with higher protein content, such as what is found in legumes. The Lima bean (*Phaseolus lunatus*) is attacked by *Colletotrichum truncatum*, a phytopathogenic fungus that affects leaves, petioles, and pods. A viable and ecologically sustainable alternative is hybridization to take advantage of transient hybrid vigor, move desirable variation between strains and generate new resistant phenotypes. Carrying the knowledge of the diversity generated from the crossings is of paramount importance in developing such genotypes, especially when related to phytopathogens capable of reducing and/or hindering the production of grains such as Lima beans. This study aimed to evaluate the potential of segregating populations from the crossing between accessions of *P. lunatus*. Emasculated flowers of RJM (♂), susceptible, received pollen of G65 (♀), resistant, when the F1 generation was obtained, and by self-fertilization, the F2 generation was obtained. Then, evaluations of 10 morphoagronomic and resistance parameters using the isolate ICT12 (*C. truncatum*) in F2, 96 individuals, resulted in segregation between the parental cross of *Phaseolus lunatus*. The main parameters that differentiated the parents segregated in a 3 to 1 ratio, being type of size, response to photoperiod, pod maturation and resistance to anthracnose. The contrasting genotypes identified for combination were 83, 12, 14 and 19 and any of the 30 accessions that did not present any anthracnose lesion. Anthracnose resistance in the cross proves to be dominant. The indeterminate size segregated as a recessive character, being different from that observed in other contrasting crosses between indeterminate and determined size of *P. lunatus*.

Keywords: lima bean, crosses, anthracnose.

7.1 Introdução

A leguminosas são fonte alternativa de proteínas (DAS et al., 2012), minerais importantes, fibras alimentares e algumas vitaminas (REYES-MORENO et al., 1993; LUCIER et al., 2000; SHIMELIS et al., 2005). Entre as leguminosas, o feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) é rico em aminoácidos essenciais (SALAWU et al., 2019), minerais, apresenta alta solubilidade proteica (SEIDU et al., 2015) e adaptação às condições edafoclimáticas adversas (SANTOS et al., 2011; ARAUJO et al., 2015). A segurança alimentar global exige um grande foco das ciências das plantas, melhoria das culturas e produção em relação às leguminosas (CONSIDINE et al., 2017).

Em contrapartida, há uma diversidade de fatores negativos encontrados na fase de pré-produção e produção que afetam a qualidade e a cultura do feijão-fava nos trópicos em geral. Um dos fatores mais importante é a incidência de antracnose (CAVALCANTE et al., 2012). A antracnose decorre de infecção fúngica causada por diversas espécies de *Colletotrichum*, incluindo *C. truncatum* (SOUSA et al., 2018). A doença é caracterizada por manchas necróticas nas folhas, pecíolos e vagens (CARVALHO et al., 2015). Em estádios mais avançados, os sintomas são perceptíveis nas vagens com lesões deprimidas, grandes e avermelhadas com enrugamento das folhas (BALLHORN et al., 2010). Os sintomas limitam o desenvolvimento e por consequência o rendimento da cultura. Uma solução viável é o desenvolvimento de culturas mais resistentes através da seleção direcionada de fenótipos capazes de tolerar o ataque do patógeno.

Diversas leguminosas como feijão (NANAMI et al., 2017), soja (PARHE et al., 2017), amendoim (JAKKERAL et al., 2017), ervilha (LEÓN et al., 2020) foram potencialmente aperfeiçoadas para resistência a doença nos últimos anos. O melhoramento genético é um dos fatores de destaque no aperfeiçoamento das culturas (SILVA et al., 2017). A primeira etapa de um programa de melhoramento é avaliar a diversidade genética em um grupo de genitores para identificar os cruzamentos que proporcionem maior efeito heterótico, aumentando a probabilidade de obtenção de segregantes transgressivos (BHERING et al., 2017).

A hibridação é uma estratégia utilizada para reunir alelos favoráveis de diferentes genitores. A avaliação de combinações híbridas, visando identificar aquelas de maior efeito heterótico, possibilita a recuperação de genótipos superiores em suas

gerações segregantes (CRUZ et al., 2012). A escolha de variação em populações é etapa crucial e muitas metodologias são adotadas para a predição do potencial de determinada população para superar um padrão para a característica de interesse. Entre essas metodologias, pode-se citar a de JINKS & POONI (1976), que permite prever o comportamento das linhagens com base em informações das gerações iniciais, possibilitando o descarte de populações segregantes menos promissoras nas etapas iniciais do programa de melhoramento (CRUZ et al., 2012).

Caracterização morfoagronômica de acessos de *P. lunatus* identificaram variedades crioulas com características superiores para melhores ganhos em produção, crescimento determinado, elevado número de vagens por planta, elevado número de sementes por vagem, poucos dias para floração, com sementes grandes, alta produtividade por planta e com níveis de resistência aos fungos *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* (SILVA, 2011; ASSUNÇÃO FILHO, 2012; PIRES, 2014; CARMO, 2015; BRITO, 2017; MUNGUÍA, 2017). Tal ferramenta se mostra importante na caracterização de acessos, contudo, as técnicas tradicionais de fenotipagem demandam tempo, recursos financeiros e mão de obra (SOUSA et al., 2015), além disso, as técnicas tradicionais não conseguem discriminar características fenotípicas complexas, oriundas de variações genéticas sutis (MATSUDA et al., 2012).

A fenotipagem em larga escala, conhecida como fenômica, está associada a análises, principalmente com o uso de imagens, permitindo a geração de grande quantidade de dados em um período relativamente menor, quando comparado a métodos convencionais (WALTER et al., 2015; SOUSA et al., 2015). A nova era de fenotipagem de plantas empregam técnicas de espectroscopia, termografia, tomografia, fluorescência, discriminação por isótopos e imagens digitais. As tecnologias baseadas em espectroscopia de absorção e captura e análise de imagens, em ambientes controlados, vêm contribuindo extensivamente para estudos em fenômica (SANTOS; YASSITEPE, 2014).

As tecnologias baseadas em imagens podem ser usadas, para medir características bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, tais como atividade fotossintética, atividade estomática, composição química foliar e arquitetura de folhas e raízes (CLARK et al., 2011; GENTY; MEYER, 1995; LENK et al., 2007; MERLOT et al., 2002; ROMANO et al., 2011). Atualmente, a caracterização genômica buscar incorporar à fenotipagem avanços nas áreas de computação, robótica, visão computacional e análise de imagens (COBB et al., 2013; FIORANI; SCHURR, 2013;

FURBANK; TESTER, 2011). Os estudos referentes à morfologia da planta são necessários e conseguem definir com maior eficiência os genótipos promissores para trabalhos de melhoramento, as variáveis que são relevantes para o estudo da diversidade genética e os caracteres que não contribuem para a separação dos genótipos (COELHO et al. 2010).

Dentre as técnicas de análise estatística, a análise multivariada é uma importante ferramenta para classificar germoplasmas, ordenar variabilidades contidas em acessos, bem como analisar relações genéticas entre características e materiais vegetais melhorados (IQBAL et al., 2008). Na predição da divergência genética, vários métodos de análise multivariada podem ser aplicados, como a análise de componentes principais, por variáveis canônicas e os métodos aglomerativos. A escolha do método deve considerar a precisão desejada, a facilidade de análise e a forma com que os dados foram obtidos (CRUZ et al., 2012).

O estudo da capacidade combinatória de genótipos baseados em informações morfoagronômica, análise de imagem e resistência em geração F₂ permitirá a compreensão da ação gênica envolvida na herança deste caráter, contribuindo para uma maior eficiência de programas voltados ao melhoramento fisiológico do feijão-fava. Este estudo teve por objetivo caracterizar e avaliar o potencial de híbridos e de segregantes, provenientes do cruzamento entre acessos de *P. lunatus* visando à obtenção de genótipos com potencial para resistência a *C. truncatum*.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Material genético

No estudo foram utilizadas 6 variedades de *P. lunatus* para a realização dos cruzamentos. O material genético utilizado no presente trabalho compreende seis acessos e foi realizada 5 combinações. As variedades utilizadas no cruzamento como parentais e as principais características que as diferenciam estão descritas na Tabela 1. A escolha dos parentais baseou-se principalmente na resposta de resistência das variedades a *C. truncatum* em pesquisas anteriores. Os acessos utilizados neste trabalho foram G65, G22, OVIC, STL, RJM e SSJ (Tabela 1).

Tabela 1. Origem e características dos parentais de *Phaseolus lunatus*

Parentais	Resistência	Origem	Tipo de semente	Tipo de planta	
				Crescimento	Fotoperíodo
G65	Resistente	-	Batata	Indeterminado	Curto
G22	Suscetível	-	Batata	Indeterminado	Curto
OVIC	Suscetível	Pernambuco	Big lima	Semi-determinado	Curto
RJM,	Suscetível	Alagoas	Batata	Determinado	Neutro
STL	Suscetível	Alagoas	Batata	Determinado	Neutro
SSJ	Suscetível	Alagoas	Batata	Determinado	Neutro

Fonte: dados da pesquisa, 2021.

As combinações de cruzamentos realizados foram: G65 (♂) x G22 (♀), G65 (♂) x STL (♀), G65 (♂) x SSJ (♀), G65 (♂) x RJM (♀) e OVIC (♂) x G65 (♀). Os acessos são provenientes de coleções (G65 e G22), produtores alagoanos (STL, RJM, SSJ, OVIC). O parental resistente (G65, Universidade Federal do Piauí, UFPI) foi utilizado como doador de pólen, exceto no cruzamento OVIC (♂) x G65 (♀). Os genótipos suscetíveis foram G22 (Areia, Paraíba, Brasil), OVIC, STL, RJM, SSJ. Os acessos G22 e OVIC são suscetíveis aos isolados ICT12 e ICT 16 de *C. truncatum*. O acesso OVIC é o mais contrastante por representar o *pool* genético andino (Capítulo 1). As variedades

SSJ, RJM e STL apresentam suscetibilidade severa a incidência de antracnose no campo, principalmente nas vagens (SOARES, 2019).

7.2.2 Isolado de *C. truncatum*

O isolado utilizado para o teste de patogenicidade corresponde ao ICT12, selecionado pelos diferentes níveis de virulência verificados em outros estudos (LIMA, 2013). O isolado compõe a coleção de microrganismos da Clínica Fitossanitária, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. O isolado foi plantas *P. lunatus* com sintomas da doença no município de Murici, Alagoas. Na coleção o isolado recebe a denominação de ICT12. Os isolados é o mais agressivo em variedades crioulas cultivadas em Alagoas (SOARES, 2019). O isolado foi caracterizado filogeneticamente, confirmando pertencer a espécie *C. truncatum*. A análise filogenética foi realizada tendo como referência 7 regiões gênicas: Actina (ACT); β -tubulina (TUB2); Calmodulina (CAL); Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Glutamina sintetase (GS) e Espaço Interno Transcrito (ITS) e Mating-type locus - MAT1-2 (SOARES, V.F., comunicação pessoal, 2020). O isolado foi ativado em meio sólido BDA (batata-dextrose-ágar, 2%) e mantido em incubadora com demanda biológica de oxigênio (BOD) a 27 °C por 7 dias. A pureza dos cultivos foi verificada aos sete dias de crescimento no meio BDA observando as características morfológicas dos conídios.

7.2.3 Realização das hibridações

As variedades de *P. lunatus* foram plantadas em vasos (5 l) contendo solo coletado da camada de 0-30 cm do solo, aplicado calcário (4 g/L) e, após 30 dias, adubados com nitrogênio, fósforo e potássio (10: 10:10, 2 g/L). Foi cultivada uma planta por vaso sendo utilizada 4 plantas de cada variedade para a realização dos cruzamentos. Os cruzamentos foram efetuados entre os meses de abril e maio, no prazo de 22 dias. O pólen das flores foi coletado pela manhã; os botões foram emasculados e polinizados na mesma manhã (Figura 1). A fertilização foi realizada com o auxílio de uma pinça de ponta fina para auxiliar na remoção das anteras. O florestes fechados, não

polinizados, foram utilizados para realização da polinização no mesmo dia e nos dias subsequentes. As flores fertilizadas foram identificadas com fios coloridos (Figura 1).

Figura 1. Identificação da flor isolada e emasculada que recebeu grão de pólen.



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

7.2.4 Obtenção das gerações F₁ e F₂

A germinação das sementes obtidas com a fecundação artificial gerou a primeira progênie híbrida (F₁). A geração F₁ foi semeada em vasos (5 L) contendo solo coletado da camada de 0-30 cm do solo. O solo foi classificado como Latossolo Vermelho Amarelo (BARROSO et al., 2012). Inicialmente foi misturado ao substrato 4g/L de calcário por litro de solo. Posteriormente, o substrato foi adubado com nitrogênio, fósforo e potássio (10:10:10) aplicando 2 g/L de solo. As plantas foram acompanhadas até a fase final de frutificação para colheitas das vagens e armazenamento das sementes. A autofecundação das flores das plantas F₁ gerou as sementes da geração F₂. As sementes F₂ foram germinadas e cultivadas nas mesmas condições que a geração F₁. Os indivíduos da progênie F₂ foram avaliados para quanto as características morfológicas quantitativas, qualitativas da fase vegetativa e reprodutiva; e para resistência a antracnose. No total, 100 plantas da geração F₂ foram cultivadas. As observações dos estádios fenológicos tiveram início em outubro de 2020 com a semeadura e término em dezembro de 2020.

7.2.7 Caracterização morfoagronômica

A caracterização morfoagronômica foi realizada utilizando os caracteres qualitativos e quantitativos (Tabela 2) expostos pelos Descritores para *Phaseolus*

lunatus do *Bioversity International* (IPGRI, 2001). A avaliação foi dividida em quatro etapas no desenvolvimento da planta para caracterização das diferentes estruturas: plântula (15 dias após a semeadura), fase vegetativa (aos 40 dias após a semeadura), estruturas reprodutivas (no momento de floração e maturação das vagens) e sementes (pós-colheita). Na avaliação dos caracteres de cor foi utilizada a tabela de padrão de cor de Munsell (*Munsell Color Chart for Plant Tissues*, 1952). O comprimento e largura dos caracteres foram mensurados em milímetros com paquímetro digital. A altura da planta (cm) foi medida com trena e o peso (g) aferido em balança analítica de precisão.

Tabela 2 – Caracteres morfoagronômicos quantitativos e qualitativos avaliados nos cruzamentos de *Phaseolus lunatus*

Caracteres quantitativos	Caracteres qualitativos
Comprimento desde a base do hipocótilo até à primeira folha completamente expandida (CHPF)	Cor do cotilédone (CC)
Espessura do caule (EC)	Cor do hipocótilo (CH)
Comprimento da folha primária (CFP)	Pigmentação do caule principal (PCP)
Largura da folha primária (LFP)	Marcas transparentes ao longo das nervuras das folhas primárias mais desenvolvidas (MTFP)
Relação folíolo (RF)	Cor da nervura das folhas primárias mais desenvolvidas (CNFP)
Altura da planta (AP)	Antocianina nas folhas (AF)
Tamanho do botão floral (TBF)	Cor da folha: intensidade da cor verde (CFICV)
Duração da floração (DF)	Padrão de crescimento (PCE)
Comprimento do cacho (CDC)	Ramificação: tipo determinado e indeterminado (RTDI)
Largura vagem (LV)	Orientação dos ramos: tipo determinado (ORTD)
Comprimento vagem (CV)	Forma do folíolo (FF)
Número de sementes por vagem (NSV)	Cor das asas (CA)
comprimento semente (CS)	Cor da quilha (CQ)
largura semente (LS)	Cor do estandarte (CE)
Peso de 100 sementes (P100)	Abertura das asas (AA)
produção (PROD)	Posição do cacho (PC)
	Forma do ápice da vagem (FAV)
	Posição das vagens em relação aos cachos (PVRC)
	Orientação das vagens em relação aos cachos (OVRC)
	Deiscência da vagem (DV)
	Curvatura da vagem (CDV)
	Cor das vagens (CV)
	Persistência da folha (PF)
	Cor de fundo da semente (CFS)
	Cor padrão da semente (CPS)
	Segunda cor padrão da semente (SCPS)
	Padrão do tegumento da semente (PTS)
	Forma da semente (FS)
	Germinação das sementes nas vagens (GSV)
	Separação de testa (ST)
	Textura de testa (TT)
	Cor do cotilédone em sementes maduras (CCSM)

7.2.8 Análise de imagem das sementes da F₂

As características das sementes com área, brilho, circularidade, compressão, diâmetro, esfericidade, perímetro e textura foram avaliadas pelo equipamento GroundEye® S120. O processo de calibração automática realizado pelo software GroundEye consistiu na captura de imagens de sementes provenientes do cruzamento. Na primeira etapa, para calibração do software do equipamento, as sementes foram postas em uma bandeja de acrílico do equipamento e as imagens foram tomadas nas duas faces das sementes (lado do hilo e lado oposto). Por meio dessas imagens, o software do equipamento capturou um total de 453 características geométricas e morfológicas das sementes, como: área, diâmetro, afinamento, perímetro, circularidade, cor, textura, etc. A análise semiautomática extrai dados relacionados a cor, geometria e textura de um sistema bidimensional de imagem em alta resolução. O sistema fornece informações individuais de cada semente e grupos (cor, textura, forma, morfologia e uniformidade). Na análise foi avaliado o número total de sementes produzidas por cada indivíduo da progênie F₂. Foram quantificadas as características das sementes quanto às porcentagens das características de cor (brilho), geometria (área, circularidade, compressão, diâmetro, esfericidade, perímetro) e textura. O modelo de cor utilizado para análise foi o HSV-Hue, Saturation and Value (LOPES, 2003) com índice de Matiz de 191,90 a 261,20, Saturação de 0,00 a 1,00 e Brilho de 0,00 a 1,00.

7.2.9 Análise estatística

Os parâmetros agronômicos quantitativos foram avaliados a partir das médias dos valores. As médias das variáveis quantitativas foram submetidas à técnica de componentes principais. A importância de cada característica foi estimada com as correlações entre as médias obtidas e os escores dos componentes principais. Análise de componentes principais e grupos (*cluster*) foram utilizadas para verificar a contribuição das variáveis utilizadas e a similaridade entre os acessos F₂ (STATISTICA, STATSOFT, 2004). Os autovalores (valores representativos da variabilidade retida por cada novo componente) e autovetores (combinação linear dos parâmetros avaliados) foram calculados com as matrizes de correlação. A visualização gráfica da análise foi

realizada com gráfico de duas dimensões (biplots). Os procedimentos foram realizados utilizando o software PAST (HAMMER et al., 2001).

Os dados de morfometria das sementes foram submetidos a análise multivariada. As médias dos valores de brilho, área, circularidade, compressão, diâmetro, esfericidade, perímetro e textura foram padronizadas e submetidas à técnica de componentes principais. As correlações entre as médias obtidas e os escores dos componentes principais foram estimadas para verificar a importância de cada característica. Análise de componentes principais e *cluster* foram utilizadas para verificar a contribuição das variáveis utilizadas e a similaridade entre os acessos F₂ (STATISTICA, STATSOFT, 2004). Os autovalores (valores representativos da variabilidade retida por cada novo componente) e autovetores (combinação linear dos parâmetros avaliados) foram calculados com as matrizes de correlação, sendo aplicados aos gráficos de duas dimensões (biplots). Todos os procedimentos foram realizados utilizando o software PAST (HAMMER et al., 2001).

7.2.5 Preparo da suspensão de conídios de *C. truncatum* para a análise de patogenicidade

A suspensão de conídios foi preparada através de culturas do fungo em meio sólido BDA cultivado por sete dias. As colônias apresentavam crescimento completo, ocupando todo o diâmetro da placa de Petri. Às placas foram adicionadas 20 mL de água destilada esterilizada (ADE), as estruturas reprodutivas do patógeno foram desagregadas do meio através da raspagem das placas com alça de Drigalski. A suspensão de esporos foi filtrada em dupla camada de gaze para separação dos fragmentos de hifas. A concentração de esporos da suspensão foi determinada por contagem direta em câmara de Neubauer (Henneberg-Sander GmbH, Alemanha, Giessen-Lützellinden). A concentração de esporos foi ajustada por diluição para 10⁵ esporos por mL. Antes da inoculação, a taxa de germinação foi verificada previamente e uma alíquota da suspensão de esporos era colocada em placa BDA no intuito de observar germinação monospórica.

7.2.6 Inoculação *in vivo* de *P. lunatus* com *C. truncantum*.

Os parentais e as plantas da progênie F2 foram inoculadas com 45 dias após o plantio e em dois períodos distintos. Os 95 indivíduos da progênie foram inoculados juntamente com G65 e RJM para comparação entre os parentais e os segregantes. As inoculações foram realizadas em dois momentos. A suspensão de conídios foi pulverizada em uma folha trifoliolada, completamente expandidas, de cada planta. Na mesma planta no lado oposto da folha inoculada foi feito o tratamento testemunha, na folha pulverizada água destilada esterilizada. As folhas foram cobertas com sacos plásticos (20 x 14 cm) por 48 h simulando ambiente de câmara úmida, para favorecer a colonização dos fungos. No segundo dias após a inoculação os sacos plásticos foram retirados. As plantas foram observadas diariamente para verificação do aparecimento dos primeiros sintomas. A avaliação da resposta do parentais e indivíduos da progênie foi realizada aos 7 dias após a inoculação. As folhas inoculadas foram coletadas e o registro fotográfico armazenado no formato digital (Figura 3). O registro digital das folhas inoculadas foram utilizadas para quantificar a percentagem da área afetada pela doença estimada usando o software Quant 1.0.1 (VALE et al. 2001). A severidade dos sintomas foi determinada com base na percentagem da área foliar superficial com lesões causadas pela doença em relação a área foliar total em cm². Os valores foram convertidos em escala de notas, sendo: 0 = ausência de sintoma; 1 = traços a 10% da área foliar infectada; 2 = de 11 a 25% da área foliar infectada; 3 = de 26 a 50% da área foliar infectada, sem queda de folíolo; 4 = de 51 a 75% da área foliar infectada, sem ou com queda de um dos folíolos; 5 = de 76 a 100% da área foliar infectada, sem ou com queda de dois ou três folíolos (CARVALHO, 2009). A análise do experimento foi realizada considerando as duas inoculações, cada com uma repetição, em um delineamento inteiramente casualizado.

7.3 Resultados

7.3.1 Cruzamentos

No total de cinco cruzamentos artificiais realizados foram obtidas gerações F₁ de 3 combinações de genótipos. As gerações F₁ resultaram dos cruzamentos entre G22 (♂) x G65 (♀), OVIC (♂) x G65 (♀) e G65 (♂) x RJM (♀). Os cruzamentos da variedade

G65 com as variedades SSJ e STL geraram vagens, mas devido alta suscetibilidade da receptora de pólen a antracnose, as vagens foram perdidas em decorrência de incidência natural da doença. O cruzamento G65 (♂) x G22 (♀) gerou várias vagens. As sementes híbridas (F₁) foram semeadas e por autofecundação produziram as sementes da geração F₂. No entanto, a falta de indicação na geração F₁ de características visuais que determinassem um híbrido fez com que a geração F₂ não fosse utilizada no estudo.

Os cruzamentos entre G65 (♂) x OVIC (♀) resultaram na produção de duas vagens com três sementes cada. A geração F₁ apresentou característica de crescimento e presença de estrias brancas margeando a nervura das folhas, características do doador de pólen. No entanto, após 6 meses de cultivo em vasos em área aberta, as plantas não iniciaram a fase reprodutiva não sendo possível obter por autofecundação a geração F₂.

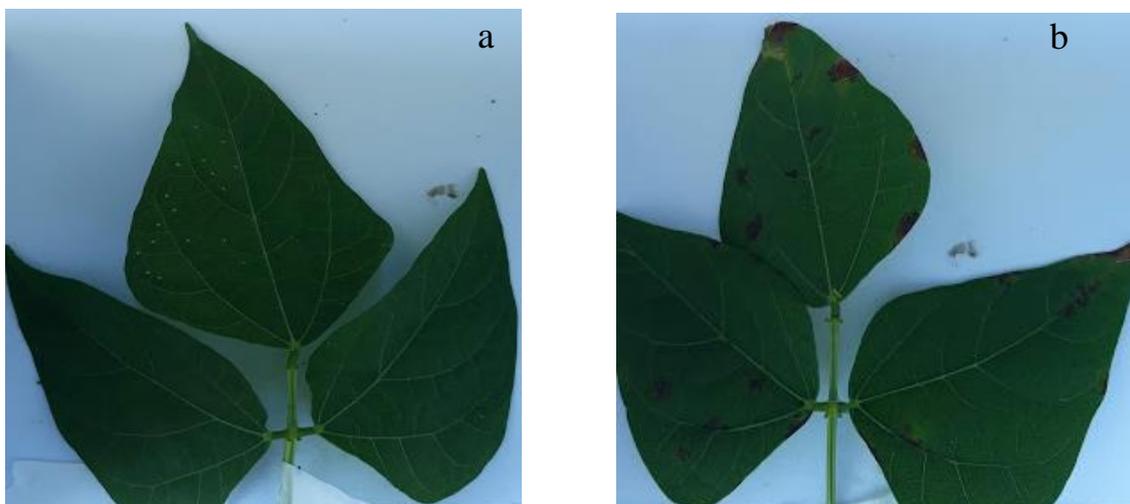
Os cruzamentos entre G65 (♂) x RJM (♀) geraram duas vagens que produziram 5 sementes no total. Outras vagens foram geradas, no entanto foram perdidas devido a incidência de antracnose. As sementes foram germinadas em vasos, mas 3 plantas morreram devido a incidência de doença não identificada no sistema radicular. As plantas da geração F₁ apresentaram um porte intermediário, atingindo uma altura média de 1 m mantendo na extremidade da guia a estrutura vegetativa. O genótipo receptor de pólen tem porte rasteiro (RJM). No total, 230 sementes foram produzidas pelas duas plantas de geração F₂(G65 x RJM). No estudo de segregação foram utilizadas 100 sementes para compor a geração F₂ oriunda das duas plantas F₁.

7.3.2 Avaliação de resistência a antracnose

A maioria dos indivíduos apresentaram reduzida área lesionadas das folhas. A manifestação da doença iniciou aos 5 dias pós inoculação do fungo e evoluiu até o dia 7 com manchas de cor avermelhada (Figura 2). Os parentais G65 e RJM apresentaram 0,29 e 10,36 mm de área lesionada. A proporção em relação a área sadia na escala de nota dos parentais G65 e RJM representa 1 e 5 respectivamente, sendo os parentais classificados como moderadamente resistente e altamente suscetível. A distribuição dos indivíduos de acordo com intervalos para valores de área lesionadas evidenciou uma classe com maior frequência. A classe reúne indivíduos com tamanho da área de lesão até 1,5 mm².

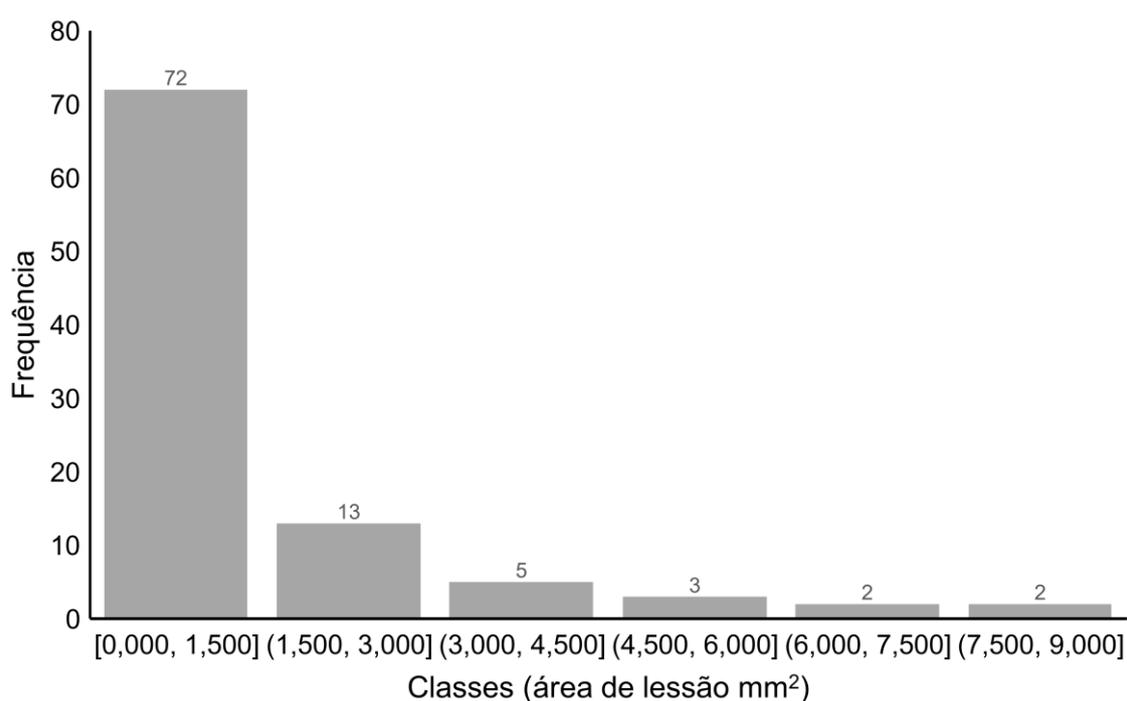
Figura 2 – Folhas sintomáticas dos segregantes de *P. lunatus* inoculado com *Colletotrichum truncatum*-ICT 12. a - ausência de sintoma; b - 51 a 75% da área foliar com sintomas, sem ou com queda de um dos folíolos.

Fonte: dados da pesquisa, 2021.



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

A distribuição de classes foi comparada a uma segregação de 3 para 1. A classe com indivíduos com menor área lesionada e maior número de indivíduos foi classificada como resistente a antracnose. A classe com menor número de indivíduos e maiores lesões foram classificadas como suscetíveis (Figura 3).

Figura 3 – Lesão provocada por inoculação de *C. truncatum*-ICT12 em segregantes F2

Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Na avaliação da segregação, considerando a predominância da resistência, indica que os desvios não foram significativos. Indicando que a frequência observada se adequa a frequência esperada (Tabela 3).

Tabela 3. Segregação da F₂ para tipo de fenótipo para tipo de reação, resistente e suscetível, para o isolado ICT12 de *C. truncatum* assumindo a diferença de um único gene (3:1 proporção) no cruzamento de *P. lunatus* L.

Cruzamento	Fenótipo		X ²	P
	Resistente	Suscetível		
G65 (♂) x RJM (♀)	72	27	2,88	0,003

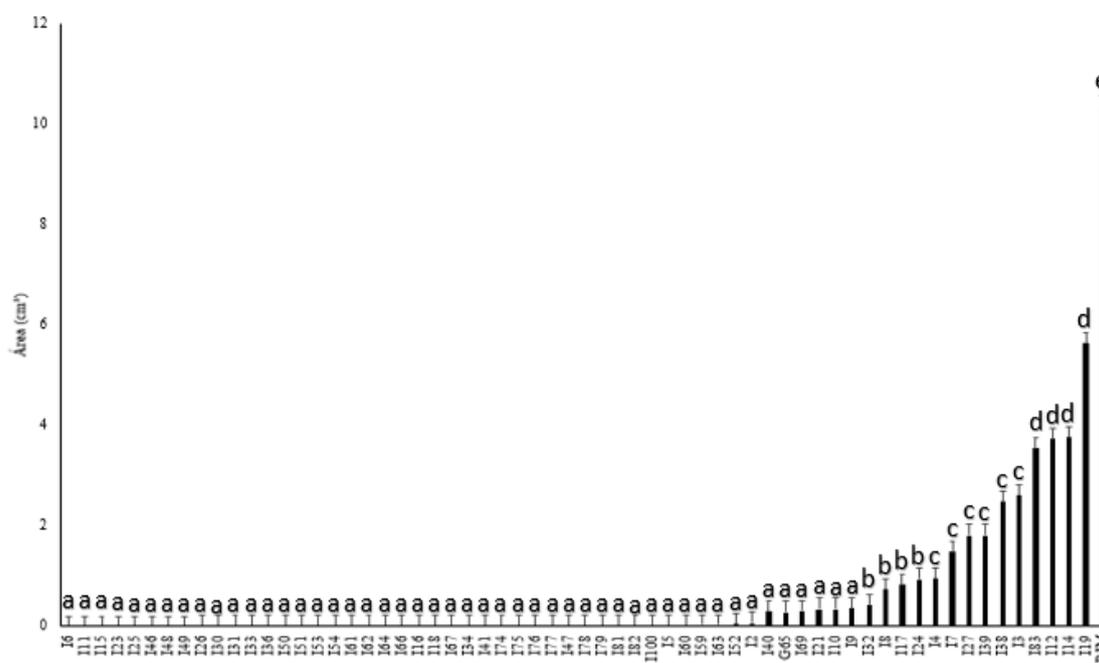
Fonte: dados da pesquisa, 2021.

A comparação de médias da área lesionada nas folhas diferenciou os dois parentais de acordo com a severidade dos sintomas e a progênie em 5 grupos (Figura 6). Na progênie foi possível observar genótipos altamente resistentes e moderadamente

suscetíveis.

Os genótipos altamente suscetíveis ao isolado ICT 12 estavam ausentes. No grupo com os indivíduos com menor área lesionada, 51 genótipos foram considerados imunes por não apresentarem nenhum sintoma infeccioso sendo 12 genótipos com porte indeterminado e 18 com o porte determinado (Figura 4).

Figura 4 – Valores médios de severidade dos 61 genótipos de *Phaseolus lunatus* ao isolado ICT 12 de *C. truncatum*, dados obtidos através da área lesionada, aos sete dias pós inoculação (dpi). Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

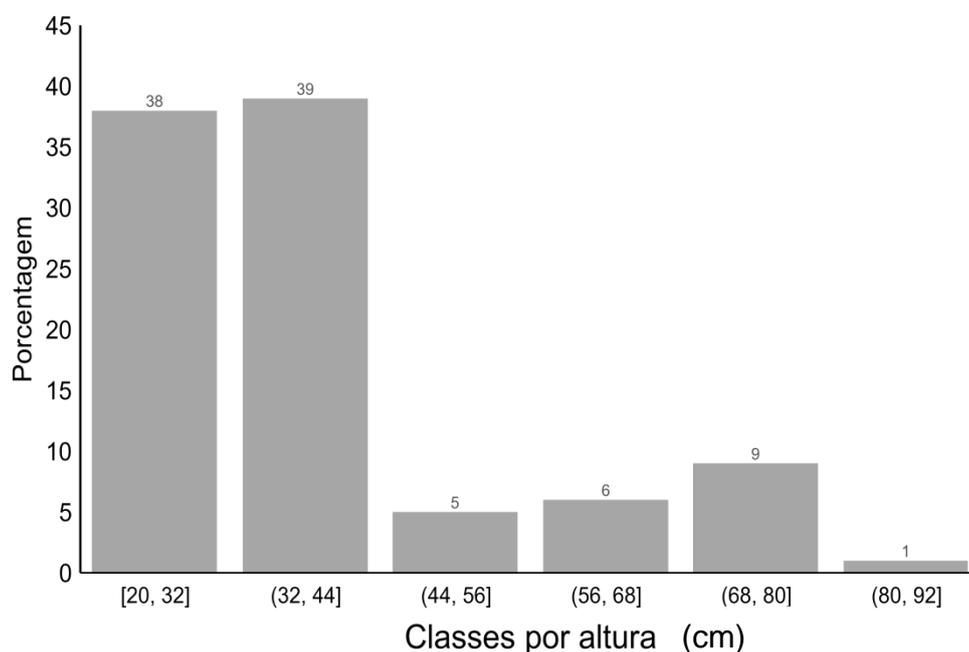
7.3.3 Avaliação da F₂ para parâmetros qualitativos e quantitativos

A progênie (61 indivíduos) foi avaliada em 10 caracteres quantitativos. Os caracteres qualitativos foram descartados porque visualmente os parentais não apresentaram diferenças. O número de indivíduos avaliados se deve ao fato de completarem o desenvolvimento sendo possível avaliar alguns parâmetros da fase reprodutiva. Outros parâmetros quantitativos associados às vagens e sementes foram desconsiderados devido à indisponibilidade de número mínimo de avaliação de acordo com o descrito pelo IPGRI.

No total foram analisados 10 caracteres associados a fase vegetativa e reprodutiva (Tabela 1): comprimento desde a base do hipocótilo até à primeira folha completamente expandida (CHPF); espessura do caule (EC); comprimento da folha primária (CFP); largura da folha primária (LFP); relação folíolo (RF); altura da planta (AP); duração da floração (DF); maturação da vagem (MAT), tamanho do botão floral (TBF); comprimento do cacho (CDC); (Tabela 6). Dos 10 caracteres morfoagronômicos avaliados 7 se ajustaram a distribuição normal, forma: primeira folha completamente expandida (CHPF); espessura do caule (EC); comprimento da folha primária (CFP); largura da folha primária (LFP); relação folíolo (RF); tamanho do botão floral (TBF); comprimento do cacho (CDC). Os caracteres altura, floração e maturidade das vagens (AP, DF e MAT) apresentaram uma distribuição com uma classe predominante. Os parentais foram utilizados como referência.

O parental G65, de crescimento indeterminado, apresentou uma altura média de 97 cm aos 60 dias. O parental RJM, de crescimento determinado, apresentou uma altura média de 35 cm, sendo a média de altura dos parentais de 66 cm. A média de altura da progênie foi de 39 cm. A distribuição dos indivíduos em classes de acordo com intervalo de altura evidencia duas classes predominantes (Figura 5). Desta forma é possível verificar um grupo de plantas com até 44 cm de altura que reúnem 78,6% dos indivíduos. As demais classes reúnem 21,4% indivíduos da progênie com altura acima 44 cm. A distribuição evidencia a predominância do porte determinado na progênie na segregação do caractere nos indivíduos da progênie F2.

Figura 5 – Frequência de distribuição das alturas (cm) dos segregantes F2.



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Na avaliação da segregação, considerando a predominância do porte determinado com uma segregação do fenótipo, indica que frequência observada se adequa a frequência esperada e os desvios não foram significativos (Tabela 4).

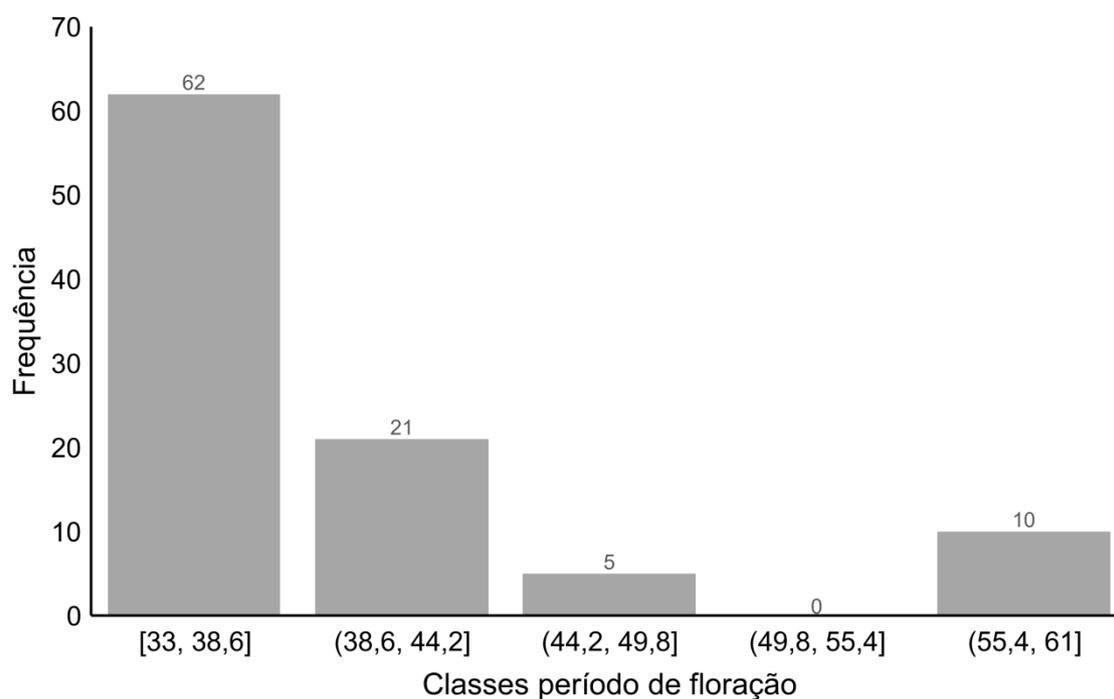
Tabela 4. Segregação da F₂ para tipo de fenótipo crescimento determinado e indeterminado no cruzamento de *P. lunatus* assumindo a diferença de um único gene (3:1 proporção) no cruzamento G65 (♂) x RJM (♀).

Cruzamento	Fenótipo		X ²	P
	Determinado	Indeterminado		
G65 (♂) x RJM (♀)	77	21	0,32	0,003

Fonte: dados da pesquisa, 2021.

O segundo caractere sem apresentar uma distribuição normal foi o número de dias para floração. A fase reprodutiva iniciou no 15º dia após a germinação das sementes, acontecendo o início da pré floração, com emissão do primeiro botão floral. A floração, aparecimento da primeira flor, iniciou entre 33 e 45 dias. No total, 60 plantas da progênie F₂ floriram neste período. O intervalo de tempo entre o início da floração e

o surgimento das primeiras vagens foi de 8 dias para 38 plantas. Outro grupo de plantas apresentou um período de 16 dias entre a floração e aparecimento das vagens. Somente duas plantas apresentaram um período mais prolongado (12 dias) entre a floração e aparecimento das vagens (indivíduos 64 e 75). As plantas da progênie F2 foram reunidos em uma classe com floração até 39 dias, representando 63% da progênie (Figura 6). Os demais indivíduos foram reunidos em 3 classes com início de floração acima dos 39 dias. As flores foram uniformes com tamanho de 5,27 mm

Figura 6 – Frequência de distribuição do período de floração dos segregantes F₂.

Fonte: dados da pesquisa, 2021.

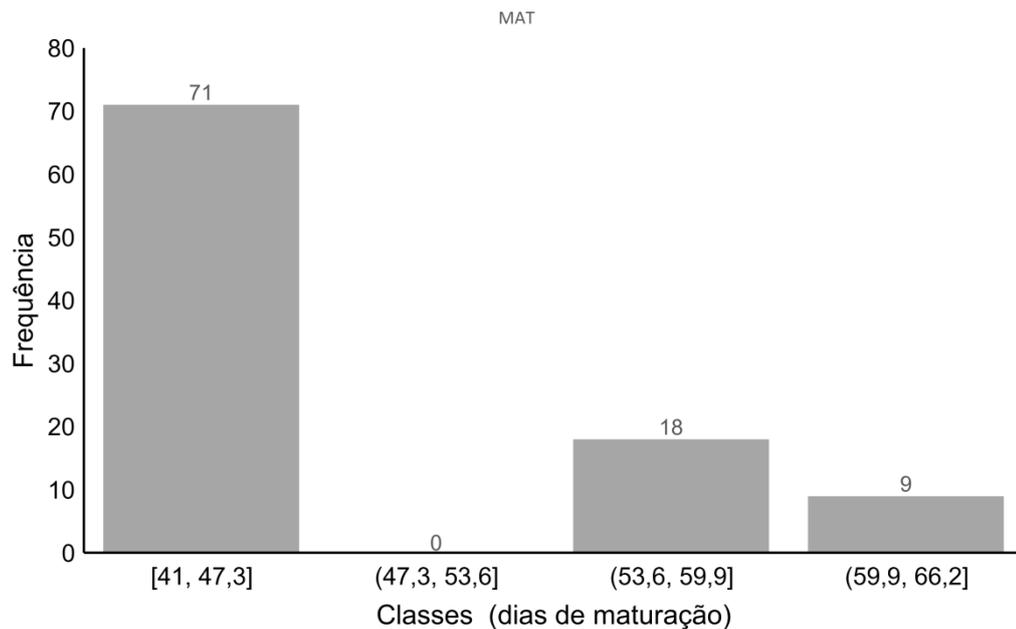
A distribuição foi comparada com uma distribuição de 3 para 1 e também de 9 para 7 considerando o caráter neutro e outro para dias curtos, que prolonga a floração quando há excesso de luz. A frequência observada não se adequou a frequência esperadas considerando uma segregação 3 para 1. O ajuste foi observado a considerar uma segregação de 9 para 7 (Tabela 6).

Tabela 6. Segregação da F₂ para tipo de fenótipo para resposta ao fotoperíodo (neutro e longo) no cruzamento de *P. lunatus* assumindo a diferença de um único gene (proporção 9:7) no cruzamento G65 (♂) x RJM (♀).

Cruzamento	Fenótipo		X ²	P
	Neutra	Dias curtos		
G65 (♂) x RJM (♀)	62	36	1,95	0,003

Fonte: dados da pesquisa, 2021.

O terceiro caractere sem apresentar uma distribuição normal dos dados foi o período de maturação das vagens. No total de 98 plantas, 56 plantas (60,82%) atingiram a fase reprodutiva com 41 dias de avaliação, apresentando vagens e sementes. Para G65 esse período foi de 72 dias enquanto para RJM, o período foi de 64 dias. No 41º dia havia formação do legume de 57 genótipos em um período de avaliação de 70 dias. O número de sementes por vagens foi uniforme com 3 sementes em média. O caracter período final de maturação de vagens apresentou classes mais distintas em relação a período de floração. A classe com maior predominância de indivíduos reuniu 72,4% dos indivíduos com maturação das vagens aos 47 dias (Figura 7). Outras duas classes representam indivíduos com maturação de vagem após 53 dias (Figura 3).

Figura 7 - Frequência de distribuição da maturação das vagens dos segregantes F₂

Fonte: dados da pesquisa, 2021.

A distribuição foi comparada com uma distribuição de 3 para 1 considerando o carácter precoce e tardia para maturação, que prolonga a floração quando a excesso de luz. Na avaliação da segregação, considerando a predominância do porte determinado com uma segregação do fenótipo, indica que os desvios não foram significativos. Indicando que a frequência observada se adequa a frequência esperada (Tabela 7).

Tabela 7. Segregação da F₂ para tipo de fenótipo para período de maturação das vagens no cruzamento de *Phaseolus lunatus* assumindo a diferença de um único gene (3:1 proporção) no cruzamento G65 (♂) x RJM (♀).

Cruzamento	Fenótipo		X ²	P
	Precoce	Tardia		
G65 (♂) x RJM (♀)	71	29	0,90	0,003

Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Quatros caracteres associados a fase vegetativa da planta apresentou maior contribuição na análise dos componentes principais (Tabela 8), foram elas: comprimento desde a base do hipocótilo até à primeira folha completamente expandida (CHPF), comprimento da folha primária (CFP), largura da folha primária (LFP) e

espessura do caule (EC). As 4 variáveis explicam 42,45% da variação dos dados para os dois componentes principais (CP1 e CP2). O autovalor para o CP1 é de 0,2297, ou seja, o primeiro componente explica 22,97% da variância total. Similarmente, o autovalor para o CP2 é de 0,1948, isto é, o segundo componente explica 19,48% da variância total.

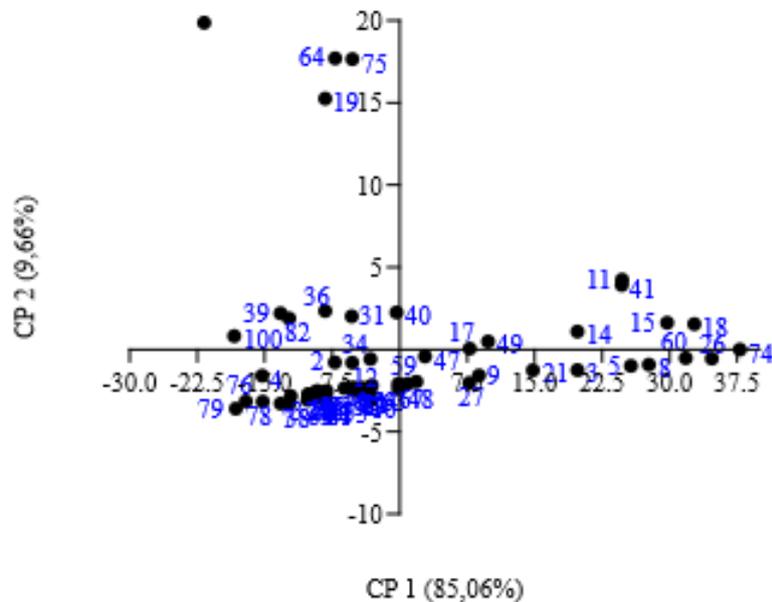
Tabela 8 - Análise dos componentes principais 1 e 2 de 10 variáveis morfométrica vegetativa e floral de segregantes de *Phaseolus lunatus*

Componente Principal	CP1	CP2
EC	0,662586	0.255999
CFP	0,213963	-0.596003
LFP	0,578113	-0.747772
CHPF	0,251042	-0.372939
RF	-0,568549	0.276555
AP	-0,125922	0.178631
DF	-0,728641	-0.439577
CDC	-0,419998	-0.039229
TBF	-0,154648	0.333729
MAT	-0,587156	-0.644447
Variância	2,297125	1.948846
Prp.Total%	22,97	19,48

comprimento desde a base do hipocótilo até à primeira folha completamente expandida (CHPF); espessura do caule (EC); comprimento da folha primária (CFP); largura da folha primária (LFP); relação folíolo (RF); altura da planta (AP); tamanho do botão floral (TBF); duração da floração (DF); comprimento do cacho (CDC); maturação da vagem (MAT). Fonte: dados da pesquisa, 2021.

A partir da análise de componentes principais com as 10 variáveis morfométricas vegetativa e reprodutiva, foi gerado um gráfico Biplot (Figura 8). No gráfico de dispersão, todos os genótipos possuem semelhança estatística entre si com exceção dos genótipos 64, 75 e 19. Os três genótipos apresentaram maturação tardia das vagens com 57 dias em média.

Figura 8 - Representação (Biplot) da análise de componentes principais, valorizando a variável comprimento desde a base do hipocótilo até à primeira folha completamente expandida (CHPF); espessura do caule (EC); comprimento da folha primária (CFP); largura da folha primária (LFP); relação folíolo (RF); altura da planta (AP); tamanho do botão floral (TBF); duração da floração (DF); comprimento do cacho (CDC); maturação da vagem (MAT).



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

7.3.4 Avaliação da F₂ para parâmetros dos grãos

A análise de classificação de grãos considerou oito variáveis: perímetro, circularidade, compressão, textura, brilho, área, diâmetro e esfericidade. Na análise dos componentes principais, quatro variáveis apresentaram maior influência, foram elas: perímetro (tamanho), circularidade (forma), compressão (achatada) e textura. As quatro variáveis explicam 67,32% da variação dos dados para os dois componentes principais (CP1 e CP2) ocorrendo uma redução percentual de 19,98% de variação explicada (Tabela 9).

A relação de dependência direta ocorreu entre as variáveis Perímetro (0,77) e circularidade (0,51) para o componente principal (CP), considerando os valores dos coeficientes maior que 50. A variável área da semente apresentou relação de dependência inversa com perímetro (0,77) e circularidade (0,51). As relações que

ocorrem com as variáveis mais relevantes para a formação do processo observado no CP1 estão relacionadas com as características de forma da semente, fator importante na determinação de grupos.

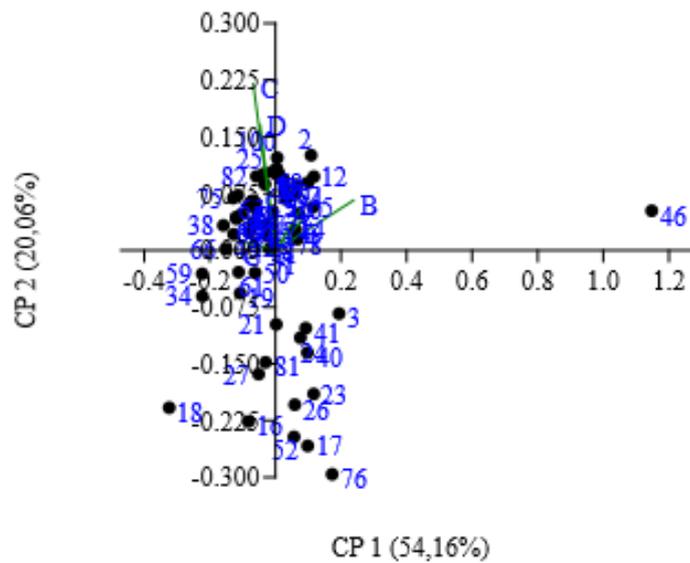
Tabela 9 - Análise dos componentes principais 1 e 2 de 8 variáveis das sementes do cruzamento de *Phaseolus lunatus*.

Componente Principal	CP1	CP2
Perímetro	0.766561	-0.055529
Circularidade	0.514284	-0.835498
Compressão	0.482968	-0.843959
Textura	0.115392	0.013679
Brilho	0.004200	-0.348791
Área	-0.964940	-0.222346
Diâmetro	-0.875485	-0.341104
Esfericidade	-0.834192	-0.439419
Variância	3.492153	1.894127
Prp. Total%	43,65	23,67

Fonte: dados da pesquisa, 2021.

A partir da análise de componentes principais com as 8 variáveis morfométricas da semente, foi gerado um gráfico Biplot (Figura 9). A representação gráfica possibilita observar as posições relativas dos acessos com base em todas variáveis morfométricas das sementes. No gráfico de dispersão, todos os genótipos estão próximos entre si com exceção dos genótipos 18, 46 e 76. O genótipo 46 apresentou valor superior aos demais para área (1,76 cm²), diâmetro (1,17cm), e esfericidade (1,14). Os genótipos 18 e 76 apresentaram valores de 0,51 e 0,71 cm² para área, 0,76 e 0,85 cm para diâmetro e 0,74 e 0,81 para esfericidade.

Figura 9 - Representação (Biplot) da análise de componentes principais, valorizando as variáveis Área, Circularidade, Compressão, Diâmetro, Esfericidade e Perímetro.



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

7.3.5 A análise de dissimilaridade euclidiana com dados morfogronômicos, morfologia de sementes e resistência.

Na análise dos dados relativos aos parâmetros da fase vegetativas, reprodutiva, morfometria de sementes e resistência a antracnose apresentaram correlações moderadas ($r=0,50$ a $0,70$), fortes ($r=0,70$ e $0,90$) e muito fortes ($r>0,90$) tanto negativas quanto positivas (Tabela 10). As demais correlações foram consideradas significativas ao nível de 5% de probabilidade. As correlações de Pearson entre as variáveis analisadas de feijão-fava foram significativas para espessura do caule e altura da planta ($0,87$), espessura do caule e razão foliar ($0,89$), altura da planta e razão foliar ($0,94$), comprimento da folha principal e largura da folha principal ($0,98$), maturação e brilho ($0,83$), diâmetro e textura ($0,58$). Destaca-se que a razão foliar e a altura da planta possui correlação muito forte indicando a tendência de aumento do incremento foliar à medida que a planta ganha altura. Não houve nenhuma correlação significativa com a resposta de resistência ao *C. truncatum*.

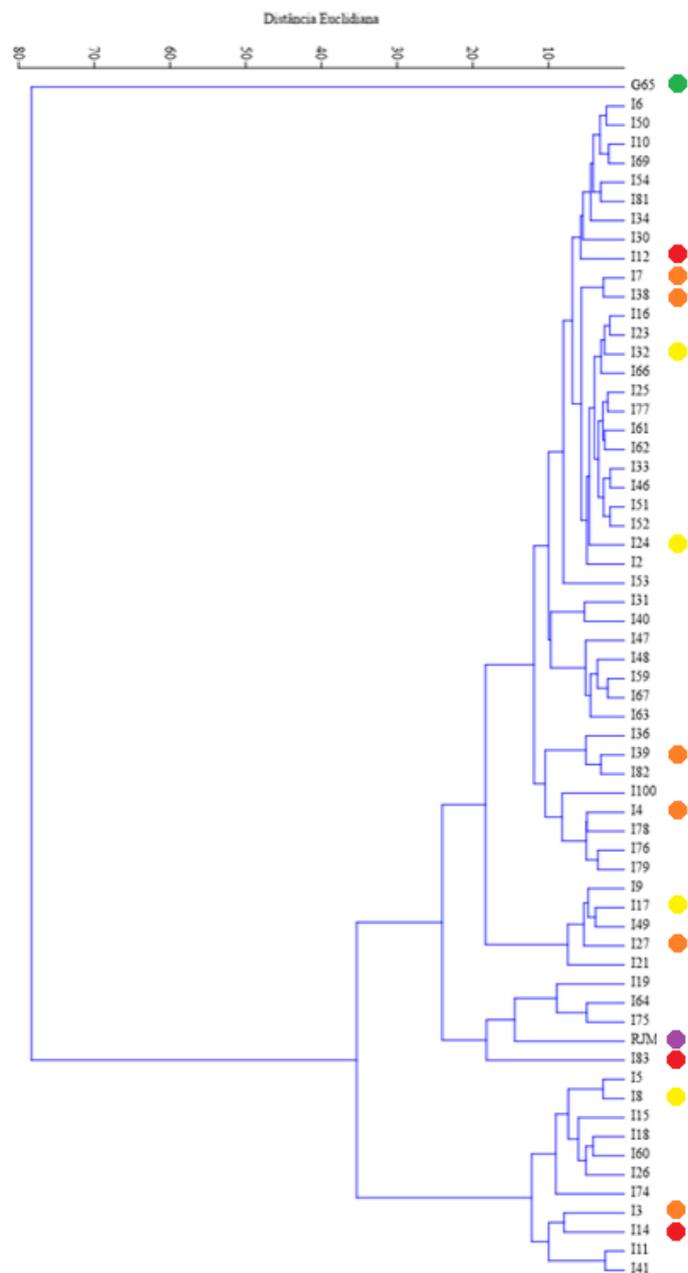
Tabela 10 – Matriz de correlação linear simples das variáveis analisadas em geração F₂ de *Phaseolus lunatus*

	CHPF	EC	CFP	LFP	RF	AP	TBF	DF	CDC	MAT	BRI	AR	CIR	COM	DIA	ESF	PER	TEX
EC	0,05																	
CFP	0,17	-0,29																
LFP	0,15	-0,26	0,98*															
RF	0,00	0,89*	-0,18	-0,16														
AP	0,07	0,87*	-0,08	-0,06	0,94*													
TBF	-0,06	-0,80	0,38	0,33	-0,47	-0,43												
DF	-0,02	-0,09	0,03	0,05	0,00	-0,12	0,08											
CDC	0,04	0,05	-0,02	-0,04	0,03	0,00	-0,08	-0,05										
MAT	0,11	0,27	-0,10	-0,07	0,35	0,33	-0,09	0,03	0,15									
BRI	0,11	0,07	-0,01	0,02	0,16	0,15	0,06	0,08	0,28	0,83*								
AR	-0,04	0,22	-0,10	-0,11	0,18	0,19	-0,16	-0,12	-0,30	-0,14	-0,66							
CIR	-0,06	0,08	-0,24	-0,25	0,10	0,07	-0,04	-0,09	0,09	0,12	0,15	-0,14						
COM	-0,03	0,00	-0,12	-0,14	0,03	0,07	0,11	0,05	0,05	-0,08	-0,23	0,27	-0,18					
DIA	0,02	-0,03	0,20	0,18	-0,10	0,00	0,01	-0,20	-0,50	-0,20	-0,29	0,32	-0,43	-0,06				
ESF	-0,06	0,11	-0,20	-0,22	0,05	-0,01	-0,16	0,24	0,03	-0,06	-0,25	0,34	0,01	0,23	-0,04			
PER	-0,09	0,21	0,01	0,05	0,02	0,02	-0,35	0,13	0,00	-0,14	-0,33	0,31	-0,07	0,09	-0,03	0,21		
TEX	-0,06	-0,11	0,12	0,13	-0,15	-0,12	0,03	0,00	-0,29	-0,13	-0,07	0,04	-0,18	-0,18	0,58*	0,08	-0,20	
RES	-0,26	0,06	0,01	0,03	-0,01	0,05	-0,11	-0,02	0,06	0,12	0,04	0,09	0,00	0,25	-0,09	0,14	0,13	-0,08

comprimento desde a base do hipocótilo até à primeira folha completamente expandida (CHPF); espessura do caule (EC); comprimento da folha primária (CFP); largura da folha primária (LFP); relação folíolo (RF); altura da planta (AP); tamanho do botão floral (TBF); duração da floração (DF); comprimento do cacho (CDC); maturação da vagem (MAT); área (AR); circularidade (CIR); compressão (COM); diâmetro (DIA); esfericidade (ESF); Perímetro (PER); textura (TEX); RES (resistência). * Significativo a 5% de probabilidade. Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Na análise de dispersão com os dados quantitativos dos 61 acessos empregando distâncias euclidianas reuniu a maioria dos indivíduos (80,33%) em um único grupo (Figura 10).

Figura 10 – Análise de cluster a partir dos dados morfoagronômicos, morfometria de sementes e resistência obtido pelo método de agrupamento da ligação média entre grupos-UPGMA. As marcações circulares em frente a identificação do genótipo nas cores amarela, laranja, vermelha e roxa indicam indivíduos suscetíveis dos grupos 2, 3, 4 e 5; respectivamente. Genótipos resistentes, marcação verde (parental) e os genótipos sem identificação.



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

O primeiro grupo foi formado por 49 genótipos e o segundo grupo contou com 12 genótipos. O fator determinante para a separação dos grupos foram a altura com contribuição de 99,74% para a CP1 e frutificação com contribuição de 81,20% para CP2.

O grupo 1 apresentou menores médias altura da planta (34,52 cm), comprimento desde a base do hipocótilo até à primeira folha completamente expandida (5,22 cm), relação folíolo (1,47) e comprimento do cacho (6,84 cm). Os valores destas variáveis para o segundo grupo foram de 1,61, 67,25 cm, 7,35 cm e 5,4 cm respectivamente. Os genótipos mais distantes foram o 41 e G65 apresentam porte mais diferentes nas variáveis comprimento da base até o hipocótilo (5,5 e 8,5 cm), largura da folha primária (2,4 e 5 cm) e comprimento do cacho (6,5 e 9 cm). O genótipo que apresentou alturas mais divergentes foram o 74 (78 cm) e o 83 (20 cm). Os genótipos com frutificação mais tardia foram 19, 64, 75 e 83 (crescimento determinado) com média de 58,75 dias.

7.4. Discussão

A pesquisa com cruzamentos entre variedades é fundamental para identificar o padrão de segregação das características de interesse para o melhoramento genético. Normalmente as variedades crioulas de *P. lunatus* têm boa adaptação local e alta variabilidade genética para a maioria das características agrônomicas (SANTOS et al., 2002, BERTOLDO et. al, 2014, CARMO, 2015, SILVA, 2015). No entanto, as variedades têm algumas características indesejáveis como suscetibilidade a pragas e doenças, crescimento indeterminado, longo ciclo de vida e alto conteúdo de ácido cianídrico. Nesse contexto, foi observado a segregação das características morfoagronômicas e sua herança de *P. lunatus*. Cruzamentos intraespecíficos em *P. lunatus* não são comuns de serem realizados, mesmo se tratando de uma espécie de fecundação mista, com predominância de autogamia (PENHA et al., 2017).

Entre os cruzamentos realizados, o cruzamento entre as variedades G65 (♂) x RJM (♂) foi o único com obtenção de geração F₂ para avaliação da segregação de caracteres. A progênie F₂ do cruzamento apresentou uma reduzida segregação das características observadas. Houve segregação para resistência a antracnose, altura, reposta a fotoperíodo e maturação de vagens. O crescimento determinado foi predominante com 74,22% dos indivíduos. No agrupamento observam-se dois grupos que se diferenciam pela resistência, altura e diferença nos ciclos de floração e maturação de vagens.

As plantas de *P. lunatus* da progênie F₂ diferenciam-se quanto à reposta a *C. truncatum*. Os parentais contrastaram na resistência. O parental suscetível apresenta porte

determinado. Os indivíduos da progênie com crescimento determinado não apresentaram a suscetibilidade do parental doador de óvulo. Observa-se uma dominância da característica de resistência, segregando fenotipicamente na proporção 3 para 1 não resistente. A resistência a antracnose no feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) apresenta 14 locos de resistência à antracnose, *Colletotrichum lindemuthianum* (Co-1, Co-2, Co-3, Co-4, Co-5, Co-6, Co-8, Co-11, Co-12, Co-13, Co-14, Co-15, Co-16 e Co-17). Os resultados da fenotipagem das populações geradas das variedades Rosinha G2 e BRS Cometa evidencia um novo loco, cuja frequência de genótipos resistentes e suscetíveis se ajusta à proporção esperada de 3:1 (MORAES, 2018). Indicando a possibilidade da resistência conferida pelo cultivar BRS Cometa ser monogênica dominante.

O crescimento indeterminado em *P. lunatus* manifestado na variedade G65 é considerado recessivo. A segregação da característica nos indivíduos da progênie F2 indica o caráter recessivo. No entanto, o caráter crescimento indeterminado em *P. lunatus* é considerado dominante (ERICKSON, 1992). Alguns cruzamentos têm mostrado maior frequência de porte determinado na progênie, mas não ao ponto de tornar-se o caráter dominante (ERICKSON, 1992). Os cruzamentos entre variedades de porte indeterminado com variedades com crescimento determinado (P-10 e Bridegeton) segregou as características em proporções de 3 plantas de crescimento indeterminado para 1 de crescimento determinado. No caso não foi observado o padrão recessivo para o crescimento indeterminado.

O padrão de crescimento intermediário ligado a morfometria da folha influenciou de forma significativa contribuindo para a variabilidade dos genótipos neste e em outras pesquisas com *P. lunatus*. No México, foi descrita ampla variação morfológica, assim como grande variabilidade para largura da folha primária e do folíolo central e comprimento/tamanho da vagem, da folha primária e do folíolo central (LÓPEZ-ALCOCER et al., 2016). No Brasil também se observa o mesmo comportamento de variabilidade na forma e área da folha (GUIMARÃES, et al., 2007) representativos para característica de herança monogênica (HALVANKAR; PATIL, 1994).

Acompanhar os estádios fenológicos, é fundamental porque as plantas passam por feno fases que determinam etapas significativas de desenvolvimento, e se bem caracterizadas podem auxiliar na estimativa de cultivo, época de maturação e programas de melhoramento genético (PEZZOPANE et al., 2003). A resposta de floração em *P. lunatus* foi caracterizada como dia neutro e dia qualitativamente curto (SALISBURY, 1963). Foi relatado que a ligação de acoplamento ocorre entre os genes que controlam o hábito da planta de caráter determinado e o florescimento precoce, com um valor de cruzamento estimado de 8,4%

(COYNE; SCHUSTER, 1974). No entanto, os caracteres porte da planta e florescimento não apresentaram correlação significativa. Os caracteres apresentaram segregação monogênica sendo o porte determinado; e floração e maturação precoce com caracteres dominantes.

A distribuição dos acessos analisados no dendrograma não foi capaz de separá-los por resistência, mas a avaliação de germoplasma tem sido muito otimizada com a avaliação dos descritores morfológicos e resistência a patógenos, possibilitando avaliar características importantes para o melhoramento, como a escolha de linhas de parentais contrastantes. Os genótipos 16 e 18 ficaram próximos no gráfico de dispersão, divergindo dos demais, por apresentarem floração e frutificação precoce com valores variando de 33 a 36 dias para floração e 41 dias para frutificação. Enquanto, o indivíduo 47 apresentou o comprimento do cacho superior à média de 6,95 cm.

Quantificar a divergência é importante para obter segregantes e populações transgressivas com grande variabilidade genética (CRUZ; CARNEIRO, 2003). Isso ajuda o melhorista a selecionar combinações que são mais promissoras e favoráveis. Os resultados gerados apresentam grande utilidade ao melhoramento de *P. lunatus* pois permitem maior compreensão sobre a variabilidade genética da cultura. Sugere-se uma combinação benéfica que pode ser feita entre os indivíduos 7 e 15 devido ao alto nível de dissimilaridade. Levando em consideração apenas a resposta de resistência a *C. truncatum*, a combinação poderá ser feita entre os indivíduos 12, 14, 19 e 83 (notas 2 de resistência) e qualquer um dos 30 indivíduos que não apresentaram nenhuma lesão de antracnose.

7.5 Conclusão

A resistência de *P. lunatus* ao isolado ICT12 de *C. truncatum* apresentou ser um carácter dominante na segregação do cruzamento entre as variedades G65 (♂) e RJM (♀).

7.6 Referências Bibliográficas

ARAUJO, A. S. F.; LOPES, Â. C. A.; GOMES, R. L. F.; JUNIOR, J. E. A. B.; ANTUNES, J. E. L., LYRA; M. D. C. C. P. D.; FIGUEIREDO, M. D. V. B. Diversity of native rhizobia-nodulating *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Legume Research-An International Journal**, v. 38, n. 5, p. 653-657, 2015.

ASSUNÇÃO-FILHO, J. R. **Caracterização de populações da variedade crioula Boca de moça de feijão-fava utilizando caracteres agromorfológicos e marcadores moleculares**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 88p., 2012.

BALLHORN, D. J., PIETROWSKI, A., & LIEBEREI, R. Direct trade-off between cyanogenesis and resistance to a fungal pathogen in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Journal of Ecology**, v. 98, n. 1, p. 226-236, 2010.

BARROSO, G. S. P.; DOS SANTOS, T. M. C.; MONTALDO, Y. C.; DA SILVA, J. M.; DA SILVA, P. J. Respiração microbiana do solo cultivado com milho sobre dois sistemas de adubação no Município de Rio Largo, Alagoas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 2, p. 42, 2012.

BEYRA, A.; ARTILES, G. R. Revisión taxonómica de los géneros *Phaseolus* y *Vigna* (Leguminosae-Papilionoideae) en Cuba. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**. 61:135-154, 2004.

BHERING, L.L., PEIXOTO, L.A., CRUZ, C.D. Seleção de genitores. In: Silva, F.L., Borém, A., Sediyaama, T., Ludke, W. (Eds). **Melhoramento da Soja**. UFV, Viçosa, 2017.

BRAGA, C. S. **Caracterização morfoagronômica, fenológica e viabilidade polínica de genótipos de feijão**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade estadual do Mato Grosso, Alta Floresta, p. 67, 2020.

BRITO, M. V. **Caracterização morfoagronômica e seleção de acessos de feijão-fava resistentes ao *Colletotrichum truncatum***. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 65p., 2017.

CARMO, M. D. S.; CARVALHO, E. M. S.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; CAVALCANTE, G. R. S. Avaliação de acessos de feijão-fava, para resistência a *Colletotrichum truncatum*, em condições de folhas destacadas e campo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 292-297, 2015.

CARVALHO, E. M. S. **Antracnose em feijão-fava: caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum***. Doutorado (Tese), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal – SP, 2009, 53p.

CAVALCANTE, G. R. D. S.; CARVALHO, E. M. S.; GOMES, R. L. F.; SANTOS, A. R. B.; SANTOS, C. M. P. M. Reação de subamostras de feijão-fava à antracnose. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 4, p. 329-333, 2012.

CLARK, R. T.; MACCOURDY, R. B.; JUNG, J. K.; SHAFF, J. E.; MCCOUCH, S. R.; ANESHANSLEY, D. J.; KOCHIAN, L. V. Three-dimensional root phenotyping with a novel imaging and software platform. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 156, n. 2, p. 455-465, Jun. 2011.

COBB, J. N.; DECLERCK, G.; GREENBERG, A.; CLARK, R.; MCCOUCH, S. Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype-phenotype relationships and its relevance to crop improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 126, n. 4, p. 867-87, May, 2013.

COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L. Inheritance and linkage relations of reaction to *Xanthomonas phaseoli* (EF Smith) Dowson (common blight), stage of plant development and plant habit in *Phaseolus vulgaris* L. **Euphytica**, v. 23, n. 2, p. 195-204, 1974.

COELHO, C. M. M.; ZILIO, M.; SOUZA, A. C.; GUIDOLIN, A. F.; MIQUELLUT, D. J. Características morfoagronômicas de cultivares crioulas de feijão comum em dois anos de cultivo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n. 1, p.1177-1186, 2010.

CONSIDINE, M. J.; SIDDIQUE, K. H.M.; FOYER, C. H. Nature's pulse power: legumes, food security and climate change. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 8, p. 1815-1818, 2017.

CRUZ, C. D. Programa Genes-Ampliado e integrado aos aplicativos R, Matlab e Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento**. UFV, Viçosa, 2012.

DAS, L.; BHAUMIK. E.; RAYCHAUDHURI. U.; CHAKRABORTY R. Role of nutraceuticals in human health. **Journal of food science and technology**. v. 49, n. 2, p. 173-183, 2012.

DE ALMEIDA LOPES, A. C.; DE ARAÚJO, A. S. F.; GOMES, R. L. F. (Ed.). **Phaseolus lunatus: diversity, growth and production**. Nova Publishers, 2015.

ERICKSON, H. T. Inheritance of growth habit and qualitative flowering response in lima beans (*Phaseolus lunatus* L.). **HortScience**, v. 27, n. 2, p. 156-158, 1992.

FIORANI, F.; SCHURR, U. Future scenarios for plant phenotyping. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 267-91, Feb. 2013.

FURBANK, R. T.; TESTER, M. Phenomics: technologies to relieve the phenotyping bottleneck. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 12, p. 635-644, Dec. 2011.

GENTY, B.; MEYER, S. Quantitative mapping of leaf photosynthesis using chlorophyll fluorescence imaging. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 22, n. 2, p.

277-284, 1995.

HALVANKAR, G. B.; PATIL, V. P. Inheritance and linkage studies in soybean. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, New Delhi, v.54, n.3, p.216-224, 1994.

HAMMER, O.; HARPER, D. A.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

IQBAL, Z.; ARSHAD, M.; ASHRAF, M.; MAHMOOD, T.; WAHEED, A. Evaluation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] germplasm for some important morphological traits using multivariate analysis. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, n.6, p.2323-2328, 2008.

JAKKERAL, S. A.; NADAF, H. I.; GOWDA, M. V. C.; BHAT, R. S.; MOTAGI, B.; MUKRI, G.; GANAGSHET, P. Genetic and molecular studies on components of rust resistance in recombinant inbred lines and back-cross populations of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 8, n. 4, p. 1097-1107, 2017.

JINKS, J. L.; POONI, H. S. Predicting the properties of recombinant inbred lines derived by single seed descent. **Heredity**, v. 36, n. 2, p. 253-266, 1976, 36.

LENK, S., CHAERLE, L.; PFÜNDEL, E. E.; LANGSDORF, G.; HAGENBEEK, D.; LICHTENTHALER, H. K.; STRAETEN, D. van der; BUSCHMANN, C. Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 807-814, Nov. 2007.

LEÓN, D. P.; CHECA, O. E.; OBANDO, P. A. Inheritance of resistance of two pea lines to powdery mildew. **Agronomy Journal**, v. 112, n. 4, p. 2466-2471, 2020.

LIMA, J. F. **Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum* agente causal da antracnose do feijão-fava no estado de Alagoas**. Mestrado (Dissertação), Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo –AL, 2013, 52p.

LOPES, J. M. B. **Computação gráfica: cor e luz**. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa 2003. 45 p.

LUCIER, Gary et al. Factors affecting dry bean consumption in the United States. **Small**, v. 19, p. 2-5, 2000.

MATSUDA, O.; TANAKA, A.; FUJITA, T.; IBA, K. Hyperspectral imaging techniques for rapid identification of Arabidopsis mutants with altered leaf pigment status. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 6, p. 1154-1170, 2012.

MERLOT, S.; MUSTILLI, A. C.; GENTY, B.; NORTH, H.; LEFEBVRE, V.; SOTTA, B.; VAVASSEUR, A.; GIRAUDAT, J. Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. **Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 601-609, Jun. 2002.

MORAIS, S. R. P. Herança e mapeamento da resistência à antracnose na cultivar de feijão carioca BRS Cometa. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 69p., 2018.

MUNGUÍA, M. E. G. **Seleção de acessos de feijão-fava resistentes a *Macrophomina phaseolina***. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 63p., 2017.

NANAMI, D. S. Y.; VIDIGAL, M. C. G.; DE LIMA CASTRO, S. A.; FRIAS, A. A. T.; VIDIGAL FILHO, P. S.; ELIAS, H. T. Characterization of genetic resistance in Andean common bean cultivar Amendoim Cavalo to *Colletotrichum lindemuthianum*. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 43-43, 2017.

PARHE, S. D.; CHIMOTE, V. P.; KUTE, N. S.; DESHMUKH, M. P. Inheritance of Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) Resistance in Pyramided Generations in Soybean (*Glycine max* (L.) Merril). **Trends in Biosciences**, v. 10, n. 41, p. 8674-8679, 2017.

PEZZOPANE, J.R.M.; PEDRO-LÚNIOR, M.J.; THOMAZIELLO, A.; CAMARGO, M.B.P. Escala de avaliação de estágios fenológicos do cafeeiro arábica. **Bragantia**. 62:499-505, 2003.

PIRES, C. J. **Divergência genética em introduções de *Phaseolus lunatus* L. do Banco de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 66p., 2014.

REYES-MORENO, C.; PAREDES-LÓPEZ, O.; GONZALEZ, E. Hard-to-cook phenomenon in common beans—A review. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 33, n. 3, p. 227-286, 1993.

ROMANO, G.; ZIA, S.; SPREER, W.; SANCHEZ, C.; CAIRNS, J.; ARAUS, J. L.; MÜLLER, J. Use of thermography for high throughput phenotyping of tropical maize adaptation in water stress. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 79, n. 1, p. 67-74, Oct. 2011.

SALAWU, S. O.; FOLORUNSO, O. M.; AKINDAHUNSI, A. A.; BOLIGON, A. A. Antioxidant indices and amino acid composition of phenolic containing Lima beans (*Phaseolus lunatus*) after simulated human gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Studies**, v. 8, n. 1, 2019.

SALISBURY, F. B. **The flowering process**. Elsevier, 1963.

SANTOS, J. O.; ANTUNES, J. E. L.; ARAÚJO, A. S. F.; LYRA, M. C. C. P.; GOMES, R. L. F., LOPES, A. C. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Genetic diversity among native isolates of rhizobia from *Phaseolus lunatus*. **Annals of microbiology**, v. 61, n. 3, p. 437-444, 2011.

SANTOS, T. T.; YASSITEPE, J. E. de C. T. Fenotipagem de plantas em larga escala: um novo campo de aplicação para a visão computacional na agricultura. In: MASSRUHÁ, S. M. F. S.; LEITE, M. A. de A.; LUCHIARI JUNIOR, A.; ROMANI, L. A. S. (ed.). **Tecnologias da informação e comunicação e suas relações com a agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, v. 1. p. 85-100, 2014.

SEIDU, K. T.; OSUNDAHUNSI, O. F.; OLALEYE, M. T.; OLUWALANA, I. B. Amino acid composition, mineral contents and protein solubility of some lima bean (*Phaseolus*

lunatus L. Walp) seeds coat. **Food Research International**, v. 73, p. 130-134, 2015.

SHIMELIS, E. A.; RAKSHIT, S. K. Antinutritional factors and in vitro protein digestibility of improved haricot bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 56, n. 6, p. 377-387, 2005.

SILVA, F.C.S., SEDIYAMA, T., OLIVEIRA, R.C.T., BORÉM, A., SILVA, F.L., BEZERRA, A.R.G., SILVA, A.F. Importância econômica e evolução do melhoramento. In: Silva, F.L., Borém, A., Sedyama, T., Ludke, W. (Eds). **Melhoramento da Soja**. UFV, Viçosa, 2017.

SILVA, V. **Caracterização morfoagronômica e citogenética e raças locais e feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 62p., 2011.

SOARES, V. F. **Avaliação da resistência à antracnose em etnovariedades de *Phaseolus lunatus* L.** Mestrado (Dissertação), Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo – AL, 2019, 131p.

SOUSA, C. A. F.; DA CUNHA, B. A. D. B.; MARTINS, P. K.; CORREA, H. B.; MOLINARI, A. K. K.; JÚNIOR, M. T. S. Nova abordagem para a fenotipagem de plantas: conceitos, ferramentas e perspectivas. **Revista Brasileira de Geografia e Física**, v. 8, n. 4, p. 660-672, 2015.

SOUSA, E. S.; SILVA, J. R. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; DE MELO, M. P.; FEIJÓ, F. M.; MATOS, K. S. BESERRA, J. E. A.. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical plant pathology**, v. 43, n. 1, p. 78-84, 2018.

STATSOFT, I. N. C. **STATISTICA (data analysis software system)**, version 7, 2004.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.; LIBERATO, J.R.; ZAMBOLIM, L. Quant – a software to quantify plant disease severity. **Proceedings of the 8th International Workshop on Plant Disease Epidemiology**. Ouro Preto, 1: 160, 2001.

WALTER, A.; LIEBISCH, F.; HUND, A. Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis. **Plant Methods**, v. 11, p. 14, 2015.