

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização morfo-agronômica e molecular, processamento
mínimo e utilização de raios X em sementes de feijão-caupi
[*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**

Roberto de Albuquerque Melo

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia**

**Piracicaba
2010**

Roberto de Albuquerque Melo
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização morfo-agronômica e molecular, processamento mínimo e
utilização de raios X em sementes de feijão-caupi
[*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**

Orientador:
Prof. Dr. **PAULO CÉSAR TAVARES DE MELO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Melo, Roberto de Albuquerque

Caracterização morfo-agronômica e molecular, processamento mínimo e utilização de raios X em sementes de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] / Roberto de Albuquerque Melo. - - Piracicaba, 2010.

102 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Caupi 2. Genótipos 3. Feijão 4. Marcador molecular 5. Pós-colheita 6. Raios X 7
Sementes - Qualidade I. Título

CDD 635.652
M528c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais Maria Auxiliadora de A. Melo e Roberto Sotero de Melo e as minhas irmãs Marcela e Carolina pela nossa família e pelo apoio incondicional...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção recebida nessa caminhada.

A São Severino dos Ramos, meu santo protetor das horas difíceis e de conquistas.

À toda minha família pela dedicação, carinho e incentivo em todos os momentos.

Ao conspícuo Prof. Dr. Paulo César Tavares de Melo pela incessante orientação, conselhos, amizade e ter me dado a oportunidade de trabalhar com ele.

Ao Coordenador Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho e a secretária da Pós-graduação em Fitotecnia Luciane Aparecida Lopes Toledo pelo constante auxílio.

Ao Prof. Dr. Angelo Pedro Jacomino pela orientação e incentivo no desenvolvimento das pesquisas com o feijão-caupi minimamente processado.

Aos Profs. Dr. Silvio Moure Cicero e a Dra. Ana D. L. C. Novembre pela orientação e estímulo nas pesquisas com o uso de raios X em sementes de feijão-caupi.

À Profa. Dra. Arlete Marchi Tavares de Melo pela amizade, apoio e incentivo no desenvolvimento da caracterização morfológica.

À Profa. Dra. Marcia Vanuza da Silva e à Doutoranda Clébia Almeida pela oportunidade de trabalharmos em parceria no desenvolvimento da caracterização molecular.

À Profa. Dra. Simone da C. Mello pelos ensinamentos, amizade e ter me orientado no Estágio Supervisionado em Docência na Disciplina de Olericultura I.

Aos Profs. Dr. João A. Scarpate Filho, Dr. Ricardo Alfredo Kluge e Dr. Keigo Minami pelos conhecimentos transmitidos e bom convívio.

Ao Doutorando Fernando H. Shirahige e ao pesquisador Dr. Felipe V. Purquerio pelo grande auxílio na condução dos experimentos e pela amizade.

Ao Doutorando Victor Augusto Forti, Helena P. Chamma, Dr. Francisco Gomes Junior e Hodair Luiz Banzatto Junior pelo grande apoio no desenvolvimento do experimento de utilização de raios X em sementes de feijão-caupi.

Aos Doutorandos Luís Carlos Cunha e Marcos José Trevisan pela grande ajuda na execução dos experimentos de minimamente processado.

Aos funcionários da horta da USP/ESALQ Gaudêncio Stênico, Gerson Alexandre de Almeida, José Nivaldo dos Santos, Horts Bremer Neto e Aparecido Donizete Serrano pelo grande apoio desde a instalação a colheita dos experimentos de campo.

Aos funcionários do IAC – Centro de Horticultura, João Carlos, Aldemir, Osvaldo e Leonardo, pelo grande apoio na implantação e condução do experimento em casa de vegetação.

Aos graduandos Bianca A. Nakata, Grazielle Ferenzini e Guilherme G. Despontim pela ajuda na implantação dos experimentos de minimamente processado.

Aos Profs. Dr. Clodoaldo da Anunciação Filho e Dr. Ademar Pereira, e ao pesquisador Dr. Antônio Félix da Costa pelas valiosas informações sobre a cultura do feijão-caupi.

Aos estimáveis Luís Jorge da G. Wanderley Júnior e Prof. Dr. Dimas Menezes pelo encorajamento de vir cursar o doutorado de Fitotecnia na USP/ESALQ.

À Pesquisadora Dra. Maria Cristina L. da Silva e a todos que compõem o grupo de pesquisa e extensão do IPA pela oportunidade de ter estagiado e trabalhado nesta instituição.

Aos Profs. Drs. do mestrado em Agronomia da UFRPE Luciane V. Resende, Gerson Q. Bastos, Luiza Suely S. Martins, Vivian Loges, Rosimar dos S. Musser, Péricles de A. Melo Filho e Edson F. da Silva pelos valiosos ensinamentos em sala de aula.

A Profa. Cristiane Latado pela paciência e estímulo nas aulas de inglês.

À minha sobrinha Nicole S. Melo por ser sempre uma fonte de luz em nossa família.

Aos meus cunhados Marco Polo Melo e Ednaldo Costa pelos momentos de descontração e amizade.

À querida Marília Gabriela Costa pelos bons momentos, confiança e carinho.

Aos estimáveis amigos José Mario Cavalcanti, Maria das Vitórias Carneiro, Rogério, Clarisse, Artur e Raia pelo acolhimento em Piracicaba e bons momentos.

Aos prezados amigos Fernando Lima, Regina, Mariana e Guilherme pelos bons momentos de descontração.

Aos Grandes amigos MSc. Paulo Lima e Dulceana Montenegro pelo grande incentivo e ensinamentos.

Ao doutorando Wellington F. da Silva e aos graduandos Frederico José R. de Moura e Helder Luís Silva pela amizade e bom convívio na pensão.

Aos amigos da Pós-graduação do Mateus Augusto Donegá, Cristiane de Carvalho, Camila Abrahão, Mariele Piovesan, Cleucione de O. Pessoa, Josina N. Kassoma, Rafael Campagnol, Luige T. C. Dall'orto, Ester Holcman, Seyde F. de Oliveira pelo grande apoio.

Aos amigos de graduação do Gepol Raquel B. Pexe, Ana Carolina L. Morotti, Ivan P. Novotny, Isadora, Gabriel, Sara, Ricardo, Taisa, Bruna A. Galoppini, Fábio K. Nakagawa, Caroline G. Blumer, Ricardo T. Matsuzaki, Natália Rocha, Lucas Nijenhuis, Breno Fonseca e Marcos Augusto Franco Júnior pela boa convivência.

À Eliana Maria Garcia e Silvia Maria Zinsly pelas correções na formatação da tese e amizade.

À Maria Celia Rodrigues, Elisabete S. São João e Paulo pelo apoio e amizade.

Aos estimáveis Roseana Amorim, Tadeu Godoy e toda equipe do Funtepe pela amizade.

Aos amigos MSc. Julio Carlos P. de Mesquita, MSc. Adriana G. Magalhães, MSc. Erlen Nascimento, Roberto P. Antunes, Rafael C. Veras pelos momentos de descontração e companheirismo.

À Capes e ao CNPq pelo financiamento da bolsa de pesquisa e taxa de bancada para o custeio dos experimentos.

À UFRPE, IPA, EMBRAPA, IAC, UFPE e a HORTIVALE pelo fornecimento de genótipos, materiais e instalações físicas para o desenvolvimento dos experimentos de pesquisa.

À Pós-graduação em Fitotecnia da USP/ESALQ pelos recursos físicos e humanos disponibilizados e pelas oportunidades oferecidas.

E a todos que contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desta tese,

muito obrigado!



“Deus se revela na harmonia de tudo que existe”

Albert Einstein
1879-1955

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
Referências.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Aspectos botânicos.....	23
2.2 Aspectos socioeconômicos.....	25
2.3 Caracterização morfo-agronômica.....	27
2.4 Caracterização molecular.....	28
2.5 Marcador RAPD.....	29
2.6 Marcador ISSR.....	30
2.7 Processamento mínimo de hortaliças.....	31
2.8 Raios x em sementes.....	33
Referências.....	34
3 Caracterização morfo-agronômica e molecular de genótipos de feijão-caupi.....	41
3.1 Introdução.....	43
3.2 Material e Métodos.....	45
3.3 Resultados e Discussão.....	51
Referências.....	58
4 Qualidade do feijão-caupi minimamente processado sob atmosfera modificada passiva.....	61
4.1 Introdução.....	62
4.2 Material e Métodos.....	64
4.3 Resultados e Discussão.....	68
Referências.....	76
5 Utilização de raios x na avaliação de danos causados por caruncho em sementes de feijão-caupi.....	79
5.1 Introdução.....	81
5.2 Material e Métodos.....	83
5.3 Resultados e Discussão.....	85
REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICES.....	93

RESUMO

Caracterização morfo-agronômica e molecular, processamento mínimo e utilização de raios X em sementes de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]

O presente estudo foi realizado com os seguintes objetivos de (a) caracterizar morfo-agronômica e molecularmente cinco genótipos de feijão-caupi; (b) avaliar a preservação da qualidade de grãos de feijão-caupi minimamente processado empacotado em três tipos de embalagens (PVC, PP e PEBD) sob temperaturas de armazenamento de 1, 5 e 10 °C, durante nove dias e, (c) identificar os danos causados por caruncho [*Callosobruchus maculatus* (Fabr.)] e sua relação com a qualidade fisiológica das sementes de feijão-caupi, por meio da análise de raios X. Na caracterização morfo-agronômica os genótipos analisados foram: IPA-206, BRS-PAJEU, BRS-POTENGI, L 281.005 e L ESP 10 e na caracterização molecular foram utilizados 26 *primers* de RAPD e 37 *primers* de ISSR. Foram construídos três dendrogramas baseados em marcadores moleculares RAPD, ISSR e RAPD+ISSR. Na caracterização morfo-agronômica, as características que apresentaram maior poder discriminante para os cinco genótipos avaliados, foram: cor das folhas; comprimento e largura do folíolo apical; vigor da planta; número de dias à floração, cor das flores; número de dias para maturação da primeira vagem, e ainda, o comprimento, a largura e o número de lóculos por vagem, como também o número de vagens por plantas; e na semente, massa de 100 sementes, comprimento, largura e espessura. A caracterização molecular demonstrou a utilidade do método, não só para avaliar o conjunto da diversidade no germoplasma, mas também para permitir aglomeração potencial dos genótipos com base nas suas afinidades entre si em características de desempenho agrônomo. No ensaio de processamento mínimo foi utilizado como matéria prima grãos de feijão-caupi, linhagem L ESP 10. Foram realizadas as seguintes análises: perda de massa fresca, composição gasosa, aroma e aparência. Os dados foram analisados através da construção de gráficos. Constatou-se que a perda de massa dos grãos foi muito reduzida. A temperatura de 1°C e o uso do filme de PVC foi mais eficientes na conservação da qualidade pós-colheita do feijão-caupi minimamente processado, propiciando melhor manutenção da cor verde, aparência, odor e menor oxidação na região próxima ao hilo. Com relação à identificação dos danos causados por caruncho por meio da análise de raios X foram utilizadas três cultivares: IPA-206, BRS-Pajeu, BRS-Potengi e duas linhagens, L 281.005 e L ESP 10. As amostras foram submetidas ao teste de raios X e ao teste de germinação, a fim de determinar a relação de causa e efeito entre os danos provocados pelo caruncho e a germinação das sementes. Para os danos classificados como severos, localizados no eixo embrionário e, ou nos cotilédones, as sementes originaram plântulas anormais ou as sementes estavam mortas. O teste de raios X se mostrou eficiente para a avaliação de danos causados por caruncho em sementes de feijão-caupi, permitindo relacionar os eventuais danos com os prejuízos causados à germinação.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* (L.) Walp; Descritores; RAPD; ISSR; Pós-colheita; Análise de imagens

ABSTRACT

Morpho-agronomic and molecular characterization, minimally processing, and use of X-ray in cowpea seeds [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]

This study was undertaken with the following objectives: (a) to characterize, morpho-agronomic and molecularly, five genotypes of cowpea beans, (b) to evaluate the preservation of grain quality of cowpea minimally processed in three types of packaging (PVC, PP and PEBD) under storage temperatures of 1, 5 and 10 ° C for nine days, and (c) to identify the damage caused by the weevil [*Callosobruchus maculatus* (Fabr.)] using the X-ray analysis and evaluate its relationship to the physiological quality of the cowpea seeds. The genotypes used in this morpho-agronomic characterization were IPA – 206, BRS-PAJEU, BRS-POTENGI, L 281.005 and L ESP 10. For the molecular characterization, it was used 26 primers of RAPD and 37 primers of ISSR. Three dendograms were constructed based on molecular markers RAPD, ISSR and RAPD+ISSR. Concerning to morpho-agronomic characterization, the characteristics which presented the highest discriminating power were: color of the leaves, length and width of the apical leaflet, plant vigor, number of the days for flowering, color of the flowers, number of the days for first ripe pod, and number of beans per individual plant. For seeds were evaluated, mass of 100 seeds, length, width and thickness. The molecular characterization showed the efficiency of the method not only to evaluate all the diversity conditions in the germoplasm but also to allow the potential agglomeration of the genotypes based on their similarities for their characteristics regarding to the agronomic behavior. To set up the trial of cowpea grains minimally processed it was used the line L ESP 10. The following traits were analysed: mass loss, gas composition, odor, and appearance. The results were evaluated by the graphs construction. The results showed that temperature at 1 °C and use of PVC were the most efficient process to preserve the postharvest quality of minimally processed cowpea beans, keeping its green color, appearance, odor, and lowest oxidation level near the hilum. As regards the damage caused to the cowpea seeds by weevil were used the cultivars IPA-206, BRS-Pajeu and BRS-Potengi, and two lines (L 281.005 and L ESP 10). The samples were exposed to X-ray and germination test to determine the cause-effect relationship between weevil damage and seed germination. Seed damage classified as severe, located in the embryonic axis or in the cotyledons, resulted in abnormal seedlings or dead seeds. The X-ray test, therefore, is efficient for evaluating weevil damage in cowpea seeds.

Keywords: *Vigna unguiculata* (L.) Walp; Descriptors; RAPD; ISSR; Postharvest; Image analysis

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi, classificado como pertencendo à família Fabaceae, teve sua evolução e domesticação na África Tropical de onde se dispersou para países de clima semelhante. A espécie tem alta tolerância ao estresse hídrico e ao calor, grande variabilidade genética e uma alta capacidade de adaptação. Além disso, é a base alimentar em mais de 65 países, incluindo o Brasil devido ao seu elevado valor nutritivo a nível proteico e energético, e fonte de fibra (SINGH, 2006; FREIRE FILHO et al., 2009).

A cultura ocupa em torno de 11 milhões de hectares, disseminadas nas regiões tropicais e subtropicais da África, da Ásia e das Américas (SINGH et al., 2002). A produção de feijão-caupi corresponde a 20% da produção nacional total de feijão (WANDER, 2007).

No Brasil, o cultivo de feijão-caupi é expressivamente cultivado nas regiões Norte e Nordeste sendo estratégico para a agricultura de base familiar. Nos últimos anos a cultura vem se expandindo na região Centro-Oeste, onde é incorporado nos arranjos produtivos como safrinha, após as culturas de soja, milho e algodão, e já em alguns locais como cultura principal (FREIRE FILHO et al., 2009).

Para enfrentar os desafios da cultura do feijão-caupi, os programas de melhoramento genético em andamento no país têm lançado mão da integração das metodologias de melhoramento clássico com as modernas técnicas biotecnológicas (LEITE; ANTHONISEN, 2009). Uma das etapas importantes nesse processo consiste na caracterização de genótipos através da descrição e registro de suas características morfológicas, citogenéticas, bioquímicas e, ou moleculares (VALOIS et al., 1996). Dessa forma, é possível identificar acessos que possuem características desejáveis para o desenvolvimento de nova cultivares.

O feijão-caupi, principalmente na região Nordeste, é consumido nas formas de grão seco ou de grão fresco. Nesse caso, o produto é comercializado nas próprias vagens imaturas em molhos ou debulhado, recebendo a designação de feijão-verde. Para a produção de feijão-verde são preferidos cultivares de grãos brancos ou do tipo sempre-verde (FREIRE FILHO, 2005).

A vida útil pós-colheita do feijão-caupi comercializado *in natura* é muito limitada deteriorando em curto prazo. Uma oportunidade de agregar valor ao produto

comercializado na forma prática de grãos debulhados seria por meio da técnica de processamento mínimo que vem sendo empregada com sucesso em diversas culturas oleráceas, como brócolis (BARTH et al., 1993); berinjela (KLUGE et al., 1999); melão (JACOMINO et al., 2002); batata (CANTOS et al., 2002) e tomate (MORETTI et al., 2002). No entanto, os estudos disponíveis na literatura sobre o processamento mínimo de feijão-caupi são escassos.

Um dos problemas no cultivo do feijão-caupi é o ataque de pragas, dentre elas, pode-se destacar o caruncho. O ataque do caruncho tem provocados grandes perdas para a produção de sementes e de grãos do feijão-caupi. Uma das técnicas para se quantificar essas perdas seria a análise das sementes e, ou dos grãos, através o uso do raios X. O teste de raios X é um método não destrutivo usado para análise das características internas das sementes, que compreendem a anatomia e os defeitos internos, além de mudanças morfológicas que ocorrem durante a maturação e a germinação (ISTA, 1991; CICERO et al., 1998). Os raios X em baixa dose não afetam a germinação, não requerem tratamento prévio das sementes para serem aplicados e apresentam as vantagens de ser um método não destrutivo, rápido e de simples execução (CARVALHO et al., 1999). Por outro lado, o caruncho é considerado a praga mais relevante do feijão-caupi durante o armazenamento, podendo causar perdas da ordem de 60% (TANZUBIL, 1991). Através da utilização da técnica do raios X pode-se dimensionar e quantificar o nível de danos dessa praga em sementes de feijão-caupi.

REFERÊNCIAS

AGUILA, J.S. del; Sasaki, F.F.; HEIFFIG, L.S.; ORTEGA, E.M.M.; JACOMINO, A.P.; KLUGE, R.A. Alteração do metabolismo respiratório em rabanetes minimamente processados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 565-568, 2007.

BLANK, A.F.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; SANTOS NETO, A.L.; ALVES, P.B.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M.C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 113-116, 2004.

BARTH, M.M.; KERBEL, E.L.; BROUSSARD, S.; SCHIMIDT, S.J. Modified atmosphere packaging protects market quality in broccoli spears under ambient temperature storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, p. 1070-1072, 1993

CANTOS, E.; TUDELA, J.A.; GIL, M.I.; ESPÍN, J.C. Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 3015-3023, 2002.

CANTWELL, M.; SUSLOW, T.V. Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables. In: KADER, A.A. (Ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. Davis: Univ. Califórnia; Division of Horticultural and Natural Resources, 2002. p. 445-463.

CARVALHO, M.L.M. de; AELST, A.C. van; ECK, J.W. van; HOEKSTRA, F.A. Pre-harvest stress cracks in maize (*Zea mays* L.) kernels as characterized by visual, X-ray and low temperature scanning electron microscopical analysis: effect on kernel quality. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 3, p. 227-236, 1999.

CICERO, S.M.; HEIJDEN, G.W.A.M. van der; BURG, W.J. van der; BINO, R.J. Evaluation of mechanical damage in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, Wallingford, v. 26, p. 603-612, 1998.

DAROS, M. Caracterização morfológica de acessos de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 43-47, 2002.

FREIRE FILHO, F.R.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V.Q.; SITTOLIN, I.M. Avanços e perspectivas para a cultura do feijão-caupi. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. da. (Ed.). **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap. 7, p. 235-250.

FREIRE FILHO, F. R. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 28-92.

ISTA. Internacional Rules for Seed Testing. *Seed Science and Technology*, Zurich, Switzerland, 1991. Paginação irregular.

JACOMINO, A.P.; ARRUDA, M.C. de; CARON, V.C.; KLUGE, R.A. Taxa respiratória de melão inteiro e minimamente processado armazenado em três temperaturas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 402, Suplemento 1, 2002.

KLUGE, R.A.; ANTONINI, A.C.C.; ROBLES, W.G.R.; TESSARIOLI NETO, J.; JACOMINO, A.P.; SCARPARE FILHO, J.A. Avaliação de cultivares de berinjela em armazenamento refrigerado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 1045-1050, 1999.

LEITE, D.L.; ANTHONISEN, D. Caracterização molecular de cultivares de cebola por marcadores de RAPD. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 420-424. 2009.

MORETTI, C.L.; ARAUJO, A.L.; MAROUELLI, W.A.; SILVA, W.L.C. 1-MCP delays tomato fruit ripening. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p.659-663, 2002.

SINGH, B.B. **Cowpea Breeding at IITA**: Highlights of advances impacts. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI; REUNIÃO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 6., 2006, Teresina. Tecnologias para o agronegócio: Anais. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2006. (Embrapa Meio-Norte, Documentos, 121) 1CD-ROM.

SINGH, B.B.; EHLERS, J.D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F.R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C.A.; TARAWALI, A.S.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAWO, M. (Ed.). **Challenges and opportunities for enchancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p. 22-40.

TANZUBIL, P.B. Control of some insect pests of cowpea (*Vigna unguiculata*) with neem (*Azadirachta indica*) in Northern Ghana. **Tropical Pest Management**, Basingstoke, v. 37, p. 216-217. 1991.

WANDER, A.L. **Produção e costumes de feijão no Brasil, 1975-2005**. Informações Econômicas, SP, v. 37, n. 7-21, 2007.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Botânicos

A espécie *V. unguiculata* (L.) Walp. (feijão-caupi, feijão-de-corda, feijão-macassar e feijão-fradinho) é de origem africana (FILGUEIRA, 2008) e foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses e espanhóis, provavelmente no Estado da Bahia, a julgar pela grande variedade de tipos de planta e usos culinários, tais como o acarajé e o abará, pratos de origem africana (ARAÚJO, 1984).

O feijão-caupi é uma Dicotyledonea, que pertence à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, secção *Catjang*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e subesp. *unguiculata* (PADULOSI; NG, 1997; FREIRE FILHO et al., 2005).

O sistema radicular é formado por uma raiz principal, pivotante, com ramificações laterais, que pode atingir mais de 2 m de profundidade – razão da notável resistência à seca (ARAÚJO, 1984; FILGUEIRA, 2008).

O caule é caracterizado pela haste principal, do qual se originam os ramos. O tipo de crescimento da haste principal, determinado, caracteriza o porte da planta. No primeiro caso, a planta produz um número limitado de nós, na haste principal, e deixa de crescer após a emissão das gemas florais. No segundo caso, a haste principal continua crescendo, emitindo novos ramos e gemas florais (ARAÚJO, 1984).

O primeiro par de folhas, acima dos cotilédones, é séssil, simples e oposto, exibindo considerável variação de forma e tamanho. As folhas secundárias são trifoliadas e surgem alternadamente. O folíolo terminal é frequentemente mais comprido e de maior área do que os folíolos assimétricos laterais. A forma do folíolo varia de linear-lanceolada a ovalada (ARAÚJO, 1984).

As inflorescências são formadas a partir de um eixo central, que consiste de um racemo modificado, com seis a oito pares de gemas florais. Os pares de gemas florais são dispostos alternadamente, em uma sucessão acropetal, em um eixo intumescido denominado almofada. As flores são perfeitas, zigomorfas e estão distribuídas aos pares, no racemo, na extremidade do pedúnculo, o qual se desenvolve a partir da axila

da folha. O cálice é pentâmero, persistente e gamossépalo, podendo variar de completamente verde a completamente roxo. A corola é pentâmera e dialipétala. A maior pétala é denominada estandarte e está localizada na parte posterior da flor. Durante a antese, o estandarte é a única pétala que se abre completamente. As outras quatro permanecem na mesma posição que ocupavam anteriormente na gema. As duas pétalas laterais denominadas asas cobrem as pétalas inferiores. O estandarte e as asas podem variar de cor, de completamente branca a completamente roxa. As duas pétalas inferiores são fundidas e formam a quilha, que é reta e de coloração branca, independente da cor das outras pétalas. O androceu apresenta-se incluso em relação à corola. É composto de dez estames, sendo um livre e nove unidos (diadelfos). A antera é basefixa, livre, com deiscência longitudinal. O gineceu apresenta o ovário multilocular. O estilete é piloso do lado interno, e o estigma é oblíquo (ROCHA et al., 2001; FREIRE FILHO et al., 2005).

A morfologia floral do feijão-caupi indica que a espécie é bastante evoluída, pois, embora sendo amplamente autopolinizada, mantém a capacidade para a polinização cruzada (LADEINDE, 1974; FREIRE FILHO et al., 2005).

As vagens variam quanto à forma, cor, tamanho e número de sementes. As sementes distribuem-se linearmente ao longo da vagem. Em média, medem de 2 a 12 mm de comprimento e pesam de 5 a 30 g por 100 sementes. O tegumento pode ser liso ou rugoso (ARAÚJO, 1984).

A cultura prospera em clima quente e suporta temperaturas elevadas no ar e no solo, sendo intolerante ao frio e à geada. A planta encontra condições ideais de desenvolvimento sob umidade muito baixa, no solo e no ar, sendo a cultura olerácea mais resistente à seca. Além disso, não tolera excesso de umidade. Por conseguinte, a cultura apresenta notável rusticidade e adaptação a ambientes quentes e secos.

No centro sul, o frio pode se tornar o fator limitante à cultura do feijão-caupi, razão pela qual a implantação dos cultivos, sem o uso de irrigação, coincide com o início da primavera (FILGUEIRA, 2008).

2.2 Aspectos socioeconômicos

O gênero *Vigna* alberga várias espécies que são de grande importância sócioeconômica em muitos países em desenvolvimento. As espécies *V. unguiculata* (L.) Walp., *V. radiata* (L.) e *V. mungo* (L.) Hepper são fundamentais na alimentação para milhões de pessoas em vários países (HOWARD et al., 2006).

A produção mundial das diferentes espécies de *Vigna*, provavelmente, alcance 20 milhões de hectares e praticamente toda essa superfície cultivada esteja em países em desenvolvimento (FERY, 2002c).

O feijão-caupi é uma das fabaceas mais adaptadas, versáteis e nutritivas entre as espécies cultivadas. A cultura ocupa em torno de 11 milhões de hectares, disseminadas nas regiões tropicais e subtropicais da África, da Ásia e das Américas (SINGH et al., 2002).

É uma das culturas mais antigas conhecidas pelo homem. Possui uma ampla adaptação e variabilidade, sendo cultivado em todo o mundo principalmente para consumo dos grãos secos. É também usado como hortaliça tendo como órgãos consumidos as folhas e vagens verdes e grãos frescos ou secos. Ademais, o feijão-caupi é usado como cobertura vegetal, adubação verde e forrageira. É conhecido internacionalmente como *cowpea*, *southernpea*, *lubia*, *niebe*, *coupe* ou *frijole*. A maior produção está na África, com a Nigéria e o Níger destacando-se como líderes de produção em escala mundial. No Brasil, Haiti, Índia, Myanmar, Sri Lanka, Austrália, Estados Unidos, Bósnia e Herzegovina a produção é também significativa (EHLERS; HALL, 1997; HOWARD et al., 2006; THOMAS JEFFERSON AGRICULTURAL INSTITUTE, 2008).

Destaca-se como uma das mais importantes fontes de proteínas para milhares de pessoas em vários países, principalmente na África, Índia e em países da América Tropical. No Brasil, o feijão-caupi tem destaque nas regiões Norte e Nordeste, sendo a principal cultura de subsistência da agricultura familiar no sertão semi-árido (SILVA, 2005; FREIRE FILHO et al., 2005). É considerada uma cultura de subsistência por causa de sua rusticidade e resistência à seca (FREIRE FILHO et al., 2005). Atualmente, está se expandindo para a região Centro-Oeste, em grandes áreas de cultivo inteiramente mecanizado (FREIRE FILHO et al., 2009).

A produção nacional do feijão, no período de 1990 a 2003, foi em média de 3,3 milhões de toneladas, sendo 22% (743 mil toneladas) de feijão-caupi e 78% (2,6 milhões de toneladas) de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). A produção total ainda apresenta grandes variações de produção entre os anos, sendo a do feijão-caupi a mais estável (FERREIRA et al., 2006). Em 2002, no Brasil, o feijão-comum e o feijão-caupi ocuparam a quarta maior área colhida, precedidos pela soja, milho e cana-de-açúcar, mas suplantando importantes culturas, como arroz, café, trigo e mandioca (BORÉM; CARNEIRO, 2006).

O feijão-caupi pode ser cultivado em monocultivo ou em consórcio com milho, mandioca, arroz, cana-de-açúcar, palma forrageira, café, cajueiro, seringueira, pimenta-do-reino (ARAÚJO, 1984), algodão (AZEVEDO et al., 2000) e outras culturas. Na Paraíba, o feijão-caupi é cultivado predominantemente sob regime de sequeiro, onde a irregularidade de chuvas e altas temperaturas têm contribuído consideravelmente para o déficit hídrico e conseqüente redução na produtividade (NASCIMENTO et al., 2004). Essa realidade pode ser estendida a todo o nordeste brasileiro.

Segundo Oliveira et al. (2004), em Areia, PB, um dos problemas associados à baixa produtividade, pode estar relacionado ao fato de que geralmente são utilizadas as mesmas cultivares tanto para a produção de grãos verdes, quanto para grãos secos.

No estado de São Paulo, o cultivo de feijão-caupi restringe-se à zona de Sorocaba onde o município da Capela do Alto é o principal produtor. Essa produção é destinada ao abastecimento de restaurantes de comida típica nordestina, capital e de outros centros (MELO, informação verbal)¹.

No Mato Grosso a produção de feijão-caupi no sistema mecanizado, possivelmente vai dobrar na safra 2010/2011, sendo plantado após a colheita da soja, a partir de janeiro. A estimativa é de que a produção varie entre 3 a 4 milhões de toneladas, 100% a mais do que foi produzido este ano, que prevê uma produção entre 1,5 a 2 milhões de toneladas. Tal incremento é uma resposta dos produtores à demanda do mercado, visto que além do Nordeste e Norte, tradicionais consumidores da espécie, os países orientais estão importando o grão do Estado. A grande procura

¹MELO, P.C.T. USP/Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Departamento de Produção Vegetal.

tem influenciado nos preços atuais. O saco de 50 kg, que no início da safra, em maio, custava oitenta reais, está sendo vendido entre R\$ 110,00 e R\$ 160,00 de acordo com a qualidade do grão (Agrolink, 2010).

Em 100 gramas de feijão-caupi *in natura* são encontrados 12,7% de umidade, 339 kcal, 1419 kj, 20,2 g de proteína, 2,4 g de lipídeos, NA de colesterol, 61,2 g de carboidrato, 23,6 g de fibra alimentar, 3,5 g de cinzas, 78 mg de cálcio, 178 mg de magnésio, 1,43 mg de manganês, 355 mg de fósforo, 5,1 mg de ferro, 10 mg de sódio, 1083 mg de potássio, 0,70 mg de cobre, 3,9 mg de zinco, NA de Retinol, 0,14 mg de tiamina, 0,03 mg de riboflavina, 0,26 mg de piridoxina, traços de niacina, traços de vitamina C (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2006).

2.3 Caracterização morfo-agronômica

Uma das fases mais importantes em programas de melhoramento genético é a seleção de genótipos com características desejadas tornando o conhecimento do germoplasma disponível, essencial (BLANK et al., 2004).

Através da caracterização morfológica, obtêm-se uma identidade para cada entrada através do conhecimento de uma série de dados que permitam estudar a variabilidade genética de cada amostra (DAROS et al., 2002). Por meio de uma caracterização morfológica de alta precisão, é possível identificar quais materiais possuem as características desejadas a serem trabalhadas em programas de melhoramento genético de plantas, ou atender a uma demanda existente do mercado.

Para promover seu uso, os acessos conservados em Bancos de Germoplasma devem ser bem caracterizados, sem lacunas quanto à efetiva documentação e informação sobre sua origem, características e potencial de uso (VILELA-MORALES; VALOIS, 2000). Um descritor confiável deverá permitir a distinção entre acessos diferentes de uma mesma cultura, deve ser praticável, útil e deve evitar redundância. Além disso, deve ser ambientalmente estável, mono ou oligogênico e de fácil manipulação pelo melhorista (CHAPMAN, 1989).

O desenvolvimento de novas cultivares é um processo de longo prazo e caro. Para mantê-lo em funcionamento as instituições de pesquisas têm buscado recursos nos regulamentos de proteção varietal vigentes, que lhes dá direitos sobre a

comercialização das cultivares protegidas (MAGALHÃES, 2006). No Brasil, a proteção de cultivares está amparada na lei de nº 9.456, de 1997, que instituiu o reconhecimento da propriedade intelectual e os direitos ao titular de materiais genéticos protegidos (BRASIL, 1997; BRASIL, 2008). A cultivar será aqui definida como um grupo de plantas com características distintas, uniformes e estáveis. Uma cultivar deve apresentar sua própria identidade, o que a distinguirá das demais. Os descritores varietais que conferem identidade à cultivar são: ciclo, cor das sementes, caracteres morfológicos, reação a doenças, produção de grãos e padrões isoenzimáticos ou de ácidos nucleicos. A estabilidade da cultivar é importante para a sua identificação, geração após geração (BORÉM, 2005).

Com a instituição da Lei de Proteção de Cultivares (BRASIL, 2008) os descritores mínimos requeridos para que uma cultivar seja protegida baseiam-se em características morfológicas de plântulas, plantas e sementes.

Os descritores morfológicos para feijão-caupi desenvolvidos por Bettencourt (2007) serviram de referência para a elaboração dos descritores oficiais dessa espécie adotados para o registro de cultivares no SNPC/MAPA (BRASIL, 2008).

A tendência atual do melhoramento genético é a utilização e a integração das metodologias de melhoramento clássico com as modernas técnicas biotecnológicas (LEITE E ANTHONISEN, 2009), podendo-se fazer a caracterização através da descrição e registro de características morfológicas, citogenéticas, bioquímicas e, ou moleculares do indivíduo (VALOIS et al., 1996).

2.4 Caracterização molecular

Os efeitos ambientais podem influenciar na expressão dos caracteres, alterando a sua eficácia. Por essa razão, marcadores moleculares podem ser aplicados para auxiliar na caracterização de acessos mantidos em bancos de germoplasma. Por produzirem informações ao nível de DNA, os marcadores moleculares revelam o polimorfismo de um gene expresso ou de um segmento específico do DNA, eliminando possíveis interferências ambientais (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Os marcadores moleculares de DNA têm sido recomendados como ferramentas mais seguras na caracterização de espécies de plantas. Segundo Acquaah et al.

(1994), para a obtenção de marcadores moleculares em culturas autógamas como o feijão devem ser utilizadas técnicas que analisam diretamente a molécula de DNA, pois o polimorfismo é mais elevado.

O marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Segundo Milach (1998), marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. A escolha de um marcador molecular depende principalmente de sua reprodutibilidade e simplicidade. Os melhores marcadores para estudos de mapeamento, caracterização molecular ou estudos filogenéticos devem ter baixo custo e serem menos laboriosos. Alternativamente, o uso de marcadores genéticos baseados na identificação de polimorfismo de DNA, poderá ser utilizado pelo melhorista para criar um padrão genético (*Fingerprinting*) próprio de cada cultivar (STAUB et al.; 1996) pois não depende da idade da planta, do ambiente, estado sanitário e clima.

A caracterização de variedades, linhagens ou híbridos por meio de marcadores de DNA tem sido de grande importância na proteção do direito intelectual do melhorista, sendo utilizada como prova legal em processos jurídicos nos países em que já vigoram as leis de proteção de cultivares. O elevado nível de resolução genética e confiabilidade obtida por meio da análise com marcadores moleculares possibilitam a discriminação entre linhagens ou variedades com base genética estreita, o que é comum entre variedades comerciais (BORÉM, 2005).

2.5 Marcador RAPD

O uso de marcadores RAPD na análise genética tem tido uma difusão muito rápida e muito útil em estudos de diversidade genética em várias espécies de feijão (VIEIRA et al., 2001)

A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), desenvolvida por Williams et al. (1990), é considerada uma metodologia de fácil aplicação em relação às outras técnicas moleculares, como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), permitindo a obtenção de polimorfismo genético a partir de pequena quantidade de

DNA e produzindo mais polimorfismo em relação aos marcadores morfo-fenológicos e isoenzimáticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), onde é usado um único *primer*, mais curto, normalmente com dez nucleotídeos, e de sequência arbitrária, para realizar a amplificação. Esta estratégia elimina a necessidade do conhecimento prévio dos fragmentos a serem amplificados. A detecção dos produtos de amplificação é feita, normalmente, em gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (MILACH, 1998; BORÉM; CAIXETA, 2006).

A técnica de RAPD utiliza primers de sequência arbitrária para a amplificação do DNA, e tendo como vantagens menor custo, número de etapas e tempo para se obter os resultados, sendo de fácil implementação nos programas de melhoramento genético de plantas (MILACH, 1998). As principais desvantagens referem-se à dominância dos marcadores, não diferenciando os locos em heterozigose dos locos em homozigose e à baixa reprodutibilidade das marcas por causa da sensibilidade da técnica às condições experimentais, principalmente, quando elas não estão bem padronizadas (FALEIRO et al., 2004).

Para diminuir os problemas de reprodutibilidade do marcador RAPD, primers específicos (15 a 30 pb) podem ser desenhados a partir do seqüenciamento de determinado marcador RAPD ligado a uma característica de interesse do geneticista, de modo a produzir marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) (PARAN; MICHELMORE, 1993; FALEIRO, 2007).

2.6 Marcador ISSR

O marcador ISSR (Inter simple sequence repeats) ou polimorfismo entre microsatélites são baseados na amplificação por PCR de segmento de DNA entre dois microsatélites (SINNETT et al., 1990; ZIETKIEWICZ et al., 1992). Neste marcador ocorre amplificação simultânea de múltiplos loci genômicos resultando em muitas bandas constantes e variantes (SINNETT et al., 1990).

As sequências internas simples repetidas (ISSR) constituem uma nova classe de marcadores que vêm sendo bastante utilizada nesses estudos (BORNET;

BRANCHARD, 2001). A ISSR-PCR é uma técnica simples, rápida, eficiente e possui alta reprodutibilidade. Os produtos amplificados variam de 200-2000 pb e são sensíveis para detecção tanto por eletroforese em gel de agarose como em gel de poliacrilamida. Essa técnica envolve sequências de microssatélites como oligonucleotídeos iniciadores em reação de PCR para gerar marcadores multialélicos (REDDY et al., 2002).

A técnica usa microssatélites de 16 a 25 pb como um oligonucleotídeo iniciador único. Esses oligonucleotídeos podem anelar em qualquer ponto ou ser ancorados com oligonucleotídeos degenerados que anelam em pontos específicos. O ancoramento dos oligonucleotídeos podem ser na região 5' ou 3', com 1 a 4 bases degeneradas da região flanqueada pelas sequências SSR. Os marcadores ISSR apresentam alta reprodutibilidade devido ao uso de sequências longas (16-25 pb) quando comparadas ao RAPD e permite o uso de altas temperaturas de anelamento mostrando alta estrigência (REDDY et al., 2002).

O método fornece resultados altamente reprodutíveis e gera abundante polimorfismo em muitos sistemas. A maioria das aplicações tem usado eletroforese no gel de agarose com detecção por brometo de etídio ou eletroforese no gel de poliacrilamida (LIU; WENDEL, 2001)

O “DNA fingerprinting” é uma importante ferramenta para caracterização de germoplasma, híbridos e estabelecimento da identidade de variedades/híbridos e fontes de genitores no melhoramento de plantas e no manejo de germoplasma. *Primers* de ISSR têm sido usados para caracterização e manutenção de germoplasma de cacau (CHARTERS; WILKINSON, 2000), para distinguir entre várias cultivares de crisântemo (Wolff et al., 1995), e também para distinguir plantas derivadas de micrósporos daquelas oriundas de tecidos somáticos em cultura de anteras em linho no estágio de plântulas (CHEN et al., 1998).

2.7 Processamento Mínimo de Hortaliças

Na busca por um estilo de vida saudável, as pessoas estão mudando seus hábitos alimentares, acrescentando, ao seu dia a dia, o consumo de hortaliças e frutas de diferentes espécies e com propriedades nutricionais complementares. Além disso, o ritmo de vida atual obriga a se destinar cada vez menos tempo às atividades de preparo

das refeições. Assim sendo, o processamento mínimo de vegetais surge como uma resposta tecnológica à essa nova necessidade de um setor da sociedade (AGUILA et al., 2007).

A técnica de processamento mínimo é empregada em diversas culturas oleráceas como brócolis (BARTH et al., 1993); repolho (CANTWELL, 1995); morango (LÓPEZ-SERRANO; RÓS-BARCELO, 1995); berinjela (KLUGE et al., 1999); cenoura (BARRY-RYAN; O'BEIRNE, 2000); melão (JACOMINO et al., 2002); batata (CANTOS et al., 2002); tomate (MORETTI et al., 2002); couve-flor (HODGES et al., 2006) e alface (DEGL'INNOCENTI et al., 2007). Essa técnica objetiva disponibilizar produtos frescos, limpos, convenientes, preparados e adequados para o consumo em menor tempo (CANTWELL; SUSLOW, 2002).

Apesar da possibilidade de processamento mínimo, o feijão-caupi minimamente processado não é encontrado em larga escala no mercado brasileiro. Isso se deve, aparentemente, à falta de cultivares com características específicas para essa finalidade, pouca durabilidade do produto e uso inadequado das técnicas de minimamente processado. Dessa forma, há um nicho de mercado, que pode ser explorado tanto por pequenos quanto por grandes produtores. E, dessa forma, pode-se atrair mais investimentos para o setor e geração de empregos.

A fisiologia dos produtos hortícolas minimamente processados é, essencialmente, a fisiologia de tecidos vegetais que sofrem injúrias. As operações de descascamento, corte e centrifugação, normalmente utilizadas durante o processamento mínimo, provocam uma série de injúrias nos tecidos. Assim, o comportamento desses produtos é semelhante ao que ocorre em tecidos de plantas submetidas às condições de estresse (BRECHT, 1995; WATADA; QI, 1999; KLUGE et al., 2006). Dessa forma, produtos minimamente processados precisam ser armazenados em embalagens adequadas e temperaturas baixas.

2.8 Raios X em sementes

O teste de raios X é um método não destrutivo usado para análise das características internas das sementes, que compreendem a anatomia e os defeitos internos, além de mudanças morfológicas que ocorrem durante a maturação e a germinação (ISTA, 1991; CICERO et al., 1998).

Quando uma semente é exposta aos raios X, a radiação absorvida pelos tecidos depende não só da espessura, densidade e composição destes tecidos, mas também do comprimento de onda da radiação (BINO et al., 1993). Nas radiografias, as áreas mais escuras são aquelas em que a radiação atravessou com mais facilidade e as mais claras, partes mais densas (SIMAK, 1991).

O teste é executado com sementes coletadas aleatoriamente da fração de semente pura para o teste de germinação. As sementes são colocadas entre uma fonte de baixa energia de raios X e o filme fotosensitivo. A emulsão fotograficamente sensível é excitada diferentemente dependendo da quantidade de reação que recebeu e, assim uma imagem latente é criada. Quando um filme é processado, uma imagem visível de vários graus de sombra e luz é formada (CARVALHO; OLIVEIRA, 2006).

As imagens podem apresentar maior ou menor grau de radiopacidade (claras) e radioluminescência (escuras) em função do nível de absorção dos raios X pelas sementes, determinado pela composição, espessura e densidade do tecido e comprimento de onda da radiação ionizante. Assim, regiões mais densas, as quais não atravessam, formam imagens claras no filme, e regiões menos densas, imagens escuras (ISTA, 1999).

Os raios X em baixa dose não afetam a germinação, não requerem tratamento prévio das sementes para serem aplicados e apresentam as vantagens de ser um método não destrutivo, rápido e de simples execução. As radiografias são facilmente conservadas, reproduzidas e examinadas a qualquer momento. Sua aplicação tem sido utilizada com sucesso, relacionando a anatomia das sementes com a germinação e morfologia das plântulas, em diversas espécies (CARVALHO et al., 1999).

O teste de raios X é útil quando realizado durante os vários processos a que as sementes são submetidas como, por exemplo, no beneficiamento, quando podem ser fisicamente alteradas e os danos não serem visíveis ao olho humano. A existência de

sementes infestadas por insetos é, também, detectada na radiografia, o que pode evitar a transferência dessas sementes de uma região para a outra (OLIVEIRA et al., 2004).

REFERÊNCIAS

ACQUAAH, G.; ISLEIB, T.G.; FERGUSON, A.E. Gene pool specificity, paucity on enzyme variation and phaseolin polymorphism in the common bean. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 11, p. 1337-1339, 1994.

AGUILERA, J.M.; CHIRIFE, J. Combined methods for the preservation of foods in Latin American and the CYTED – D project. **Journal of Food Engineering**, v. 22, p. 433-444, 1994.

ARAÚJO, J.P.P. (Ed.). **Cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L) Walp**: descrição e recomendações técnicas de cultivo. Goiânia: EMBRAPA CNPAF, 1984. 82 p. (EMBRAPA CNPAF. Circular Técnica, 18).

AZEVEDO, D.M.P.; SANTOS, J.W.; VIEIRA, D.J.; BELTRÃO, N.E.M.; NOBREGA, L.B.; PEREIRA, J.R. Efeito de população de plantas na produção, eficiência agrônômica e qualidade da fibra do algodoeiro perene consorciado com o caupi. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 4, n. 3, p. 169-179, 2000.

BARRY-RYAN, C.; O'BEIRNE, D. Effects of peeling methods on the quality of ready-to-use carrot slices. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 35, p. 243-254, 2000.

BARTH, M.M.; KERBEL, E.L.; BROUSSARD, S.; SCHIMIDT, S.J. Modified atmosphere packaging protects market quality in broccoli spears under ambient temperature storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, p. 1070-1072, 1993

BETTENCOURT, E. (Ed.). **Descritores para feijão frade ou caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. Tradução de J. Pedro e A. Alves. Roma: Bioersivity International, 2007. 25 p.

BINO, R.J.; AARTSE, J.W.; BURG, W.J. van der. Non destructive X-ray of *Arabidopsis* embryo mutants. **Seed Science Research**, Wallngford, v. 3, n. 2, p. 167-170, 1993.

BLANK, A.F.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; SANTOS NETO, A.L.; ALVES, P.B.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M.C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjerição e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 113-116, 2004.

BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 969p.

- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 374p.
- BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.S. A Cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. p. 13-18.
- BRASIL. Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. Lei de proteção de cultivares. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n.79, p. 8241-8246, 28 de abr. 1997. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 10 mar 2008.
- BRECHT, J.K. Physiology of lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 18-21, 1995.
- CANTOS, E.; TUDELA, J.A.; GIL, M.I.; ESPÍN, J.C. Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 3015-3023, 2002.
- CANTWELL, M. Fresh-cut product biology requirements. **Perishables Handling Newsletter**, v. 81, p. 4-6, 1995.
- CANTWELL, M.; SUSLOW, T.V. Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables. In: KADER, A.A. (Ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. Davis: Univ. Califórnia; Division of Horticultural and Natural Resources, 2002. p. 445-463.
- CARVALHO, M.L.M. de; AELST, A.C. van; ECK, J.W. van; HOEKSTRA, F.A. Pre-harvest stress cracks in maize (*Zea mays* L.) kernels as characterized by visual, X-ray and low temperature scanning electron microscopical analysis: effect on kernel quality. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 3, p. 227-236, 1999.
- CARVALHO, M.M. de; OLIVEIRA, L.M. de. Raios X na avaliação da qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, v. 16, n° 1,2,3, 2006.
- CHAPMAN, C. Principles of germplasm evaluation. In: STALKER, H.T.; CHAPMAN, C. (Ed.). **Scientific management of germplasm: characterization, evaluation and enhancement**. Rome: IPGR, 1989. p. 55-63.
- CHARTERS, Y.M.; WILKINSON, M.J. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.111, p. 47-55. 2000.
- CHEN, Y.; HAUSNER, E.; KENASCHUK, E.; PROCUNIER, D.; DRIBNENKI, P. PENNER, G. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers. **Plant Cell Reports**, New York, v.18, p. 44-48, 1998.

CICERO, S.M.; HEIJDEN, G.W.A.M. van der; BURG, W.J. van der; BINO, R.J. Evaluation of mechanical damage in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, Wallingford, v. 26, p. 603-612, 1998.

DAROS, M. Caracterização morfológica de acessos de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 43-47, 2002.

DEGL'INNOCENTI, E.; PARDOSSI, A.; TOGNONI, F.; GUIDI, L. Physiological basis of sensitivity to enzymatic browning in 'lettuce', 'escarole' and rocket salad' when stored as fresh-cut products. **Food Chemistry**, London, v. 104, p. 209-215, 2007.

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

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa. 2007, 102p.

FALEIRO, A.S.G.; SANTOS, M.C.M. Variability in cação accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, p. 227-333, 2004.

Feijão-caupi: produção vai dobrar este ano. **Agrolink**, 10 out. 2010. Disponível em: <[HTTP://www.agrolink.com.br/noticias](http://www.agrolink.com.br/noticias)>. Acesso em 10 out. 2010

FERREIRA, C.M.; SANTOS, M.L.; BRAGA, M.J.; PELOSO, M.J.D. Aspectos Econômicos. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006. p. 19-40.

FERY, R.L. New opportunities in *Vigna*. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (Ed.). **Trends in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2002. p. 424-428.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1996. 220p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores em análise genética**. 3. ed. Brasília: Brasília: EMBRAPA - CENARGEM, 1998. 220p.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**. Viçosa: UFV. 2008. 402 p.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, A.A. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 29-75.

FREIRE FILHO, F.R.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V.Q.; SITTO LIN, I.M. Avanços e perspectivas para a cultura do feijão-caupi. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. da. (Ed.). **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas**,

- institucionais e políticas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap. 7, p. 235-250. HODGES, D.M.; MUNRO, K.M.; FORNEY, C.F.; MCRAE, K.B. Glucosinolate and free sugar content in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. Freemont) during controlled-atmosphere storage. **Postharvest and Biology and Technology**, Amsterdam, v. 40, p.123-132, 2006.
- HOWARD, F.H.; THIES, J.A.; FERY, R.L. Evaluation of cowpea genotypes for use as a cover crop. **HortScience**, Alexandria, v. 41, n. 5, p. 1145-1148, 2006.
- ISTA. Internacional Rules for Seed Testing. *Seed Science and Technology*, Zurich, Switzerland, 1991. Paginação irregular.
- JACOMINO, A.P.; ARRUDA, M.C. de; CARON, V.C.; KLUGE, R.A. Taxa respiratória de melão inteiro e minimamente processado armazenado em três temperaturas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 402, Suplemento 1, 2002.
- KLUGE, R.A.; ANTONINI, A.C.C.; ROBLES, W.G.R.; TESSARIOLI NETO, J.; JACOMINO, A.P.; SCARPARE FILHO, J.A. Avaliação de cultivares de berinjela em armazenamento refrigerado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 1045-1050, 1999.
- KLUGE, R.A.; COSTA, C.A.; VITTI, M.A.D.; ONGARELLI, M, das G.; JACOMINO, A.P.; MORETTI, C.L. Armazenamento refrigerado de beterraba minimamente processada em diferentes tipos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, p. 263-270, 2006.
- LADEINDE , T.A.O. Reproductive process in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and their implications to breeding problems. **Abstract International**, Oxford, n. 10, p. 4835-4836, 1974.
- LEITE, D.L.; ANTHONISEN, D. Caracterização molecular de cultivares de cebola por marcadores de RAPD. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 420-424. 2009.
- LIU, B.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, p.205-208, 2001.
- LÓPEZ-SERRANO, M.; RÓS-BARCELO, A. Activity of peroxidase in unripe and processing strawberries. **Food Chemistry**, London, v. 52, p. 157-160, 1995.
- MAGALHÃES, A. G. **Caracterização de genótipos de alface (*Lactuca sativa* L.) em cultivo hidropônico sob diferentes valores de condutividade elétrica da solução nutritiva**. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.
- MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre. 141 p. 1998.
- MORETTI, C.L.; ARAUJO, A.L.; MAROUELLI, W.A.; SILVA, W.L.C. 1-MCP delays tomato fruit ripening. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p.659-663, 2002.

NASCIMENTO, J.T.; PEDROSA, M.B.; TAVARES SOBRINHO, J. Efeito da variação de níveis de água disponíveis no solo sobre o crescimento e produção de feijão caupi, vagens e grãos verdes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n.2, p. 174-177, 2004.

OLIVEIRA, A.P.; TAVARES SOBRINHO, J.; NASCIMENTO, J.T.; ALVES, A.U.; ALBUQUERQUE, I.C.; BRUNO, G.B. Avaliação de linhagens e cultivares de feijão-caupi, em Areia, PB. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 180-182, 2004.

OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; GUIMARÃES, R.M.; MASSETO, T.E. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetigiosa* (Martius Ex A. P. de Candolle Standeley) – (Bignoniaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 138-143, 2004.

PADULOSI, S.; NG, N.Q. Origin taxonomy and morfology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B.B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K.E.; JACKAL, L.E.N. (Ed.). **Advances in cowpea research**. Tsukuba: IITA: JIRCAS, 1997. p. 1-12.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 85, p. 985-993, 1993.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 128, p.9-17, 2002.

ROCHA, F.M.R. da; MOUSINHO, S.F.; FREIRE FILHO, F.R.; SILVA, S.M. de S.; BEZERRA, A.A. de C. Aspectos da biologia floral do caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 5, 2001, Teresina. **Avanços tecnológicos no feijão caupi**: anais. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2001. p. 27-29. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 56).

SILVA, G.S. Nematóides. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). **Feijão-caupi**: avanços tecnológicos. Brasília: EMBRAPA, 2005, cap. 13. p. 487-497.

SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. In: GORDON, A. G.; GOSLING, P.; WANG, B.S.P. **Tree and shrub seed handbook**. Zurich: ISTA, 1991. p.1-28.

SINGH, B.B.; EHLERS, J.D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F.R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C.A.; TARAWALI, A.S.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAWO, M. (Ed.). **Challenges and opportunities for enchancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p. 22-40.

SINNETT, D.; DERAGON, J.M.; SIMARD, L. R.; LABUDA, D. Alu-morphs-human DNA polymorphisms detected by polymerase chain reaction using Alu-specific primers. **Genomics**, San Diego, v. 7, p. 331-334, 1990.

STAUB, J. E.; GABERT, A.; WEHNER, T.C. Plant variety protection: A consideration of genetic relationship. **Hort Science**, Alexandria, v.31, n.7, p. 1086-1091, 1996.

THOMAS JEFFERSON AGRICULTURAL INSTITUTE. **Cowpea**: a versatile legume for hot, dry conditions. Disponível em: <<http://www.jeffersoninstitute.com>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 2. ed. Campinas: UNICAMP, NEPA, 2006. p. 50-51.

VALOIS, A.C.C.; SALOMÃO, A.N.; ALLEM, A.C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1996. 62p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 22).

VIEIRA, E.S.N.; PINHO, É.V. de R.V.; VIEIRA, M. das G.G.C.; MANN, R.S. Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares de DNA visando a certificação da pureza genética. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 43-50, 2001.

VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Londrina, v.17, p. 11-42, 2000.

WATADA, A.E.; QI, L. Quality of fresh-cut produce. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 15, p. 201-205, 1995.

WILLIAMS, J.G.; KUBELINK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WOLFF, K.; ZIETKIEWICZ, E.; HOFSTRA, H. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.91, p.439-447, 1995.

ZIETKIEWICZ, E.; LABUDA, M.; SINNETT, D.; GLORIEUX, F. H.; LABUDA, D. Linkage mapping by simultaneous screening of multiple loci using ALU oligonucleotide-directed PCR. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 89, p. 8448-84451, 1992.

3 CARACTERIZAÇÃO MORFO-AGRONÔMICA E MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI

Resumo

A tendência atual do melhoramento genético é a utilização e a integração das metodologias tradicionais com as modernas técnicas biotecnológicas. Nesse contexto, esse trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar morfo-agronômica e molecularmente cinco genótipos de feijão-caupi. O experimento de caracterização morfo-agronômica foi conduzido no IAC em condições de ambiente protegido. Os genótipos analisados na caracterização morfo-agronômica foram: IPA-206, BRS-PAJEU, BRS-POTENGI, L 281.005 e L ESP 10. O delineamento experimental foi blocos casualizados, com quatro repetições. As parcelas experimentais foram compostas por uma linha com oito plantas, espaçadas 1,00 x 1,50 m. O experimento de caracterização molecular foi realizado no IPA e na UFPE. Foram utilizados os mesmos genótipos da caracterização morfo-agronômica. Na caracterização molecular utilizou-se 26 *primers* de RAPD e 37 *primers* de ISSR. Destes, 6 *primers* de RAPD e 7 *primers* de ISSR produziram fragmentos claros e consistentes. Com os dados obtidos, foram construídos três dendrogramas, baseados em marcadores moleculares RAPD, ISSR e RAPD+ISSR. Portanto, na caracterização morfo-agronômica, as características que apresentaram maior poder discriminante para os cinco genótipos avaliados, foram: cor das folhas; comprimento e largura do folíolo apical; vigor da planta; número de dias à floração, cor das flores; número de dias a maturação da primeira vagem, e ainda, o comprimento, a largura e o número de lóculos por vagem, como também o número de vagens por plantas; e na semente, massa de 100 sementes, comprimento, largura e espessura. Como também, a caracterização molecular demonstrou a utilidade do método, não só avaliar o conjunto da diversidade no germoplasma, mas também para permitir aglomeração potencial dos genótipos com base nas suas afinidades entre si em características de desempenho agrônômico.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* (L.) Walp; RAPD; ISSR; Similaridade

Abstract

The recent genetic improvement is based on the use of the traditional technology as well as the modern biotechnology techniques. According to this trend, this work aims to characterize, morpho-agronomic and molecularly, five genotypes of cowpea beans. The experiment of morpho-agronomic characterization was carried out in IAC in a controlled environment. The genotypes used in this characterization were IPA – 206, BRS-PAJEU, BRS-POTENGI, L 281.005 and L ESP 10. The experimental design was taken using completely randomized blocks, with four replications. The experimental plots were formed by one line with 8 plants, in a space of 1.0 x 1.5m. The experiment of molecular characterization was carried out in IPA and UFPE. It was used the same genotypes of the morpho-agronomic characterization. For the molecular characterization, it was used 26 primers of RAPD and 37 primers of ISSR; 6 primers of RAPD and 7 primers of ISSR produced light and consistent fragments. It was drew three dendograms from the data collected, based on molecular markers RAPD, ISSR and RAPD+ISSR. In the morpho-agronomic characterization, the characteristics which presented the highest discriminating power were: the color of the leaves, the length and width of the leaflet apical, the vigor of the plant, the number of the days for flowering, the color of the flowers, the number of the days for the riping of the first beans and the number of the beans for each plant. In the seed, mass of 100 seeds, it was evaluated length, width and thickness. The molecular characterization showed the efficiency of the method not only to evaluate all the diversity conditions in the germoplasm but also to allow the potential agglomeration of the genotypes based on their similarities for their characteristics regarding to the agronomic behavior.

Keywords: *Vigna unguiculata* (L.); Walp; RAPD; ISSR; Similarity

3.1 Introdução

O gênero *Vigna* alberga várias espécies que são de grande importância econômica em muitos países em desenvolvimento. As espécies *Vigna unguiculata* (L.) Walp, *V. radiata* (L.) e *V. mungo* (L.) Hepper são fundamentais na alimentação para milhões de pessoas em vários países. Também são valorizados como forrageira, cobertura vegetal e adubação verde em muitas partes do mundo (HOWARD et al., 2006).

A produção mundial das diferentes espécies de *Vigna*, provavelmente, alcance 20 milhões de ha, e praticamente toda essa superfície cultivada esteja em países em desenvolvimento (FERY, 2002). Só o feijão-caupi, *V. unguiculata*, ocupa 11 milhões de ha nas regiões tropicais e subtropicais da África, da Ásia e das Américas (SINGH et al., 2002). No Brasil, a cultura é muito importante nas regiões Norte e Nordeste e, atualmente, está se expandindo para a Região Centro-Oeste (FREIRE FILHO et al., 2009), podendo ser encontrado tanto as vagens *in natura* quanto o grão verde ou seco.

Possui ampla variabilidade genética, sendo usado para várias finalidades e em diferentes sistemas de produção (FREIRE FILHO et al., 2005).

A caracterização de cultivares constitui uma das principais etapas dos trabalhos com germoplasma, que permite indicar aspectos de uso imediato dos agricultores, bem como identificar acessos que apresentem características interessantes para o melhoramento (FONSECA et al., 1994). Os caracteres estudados na caracterização podem ser morfológicos, fisiológicos, citológicos, bioquímicos ou moleculares. A maioria desses dados pode ser obtida através de descritores, os quais constituem um atributo ou caráter observado nos acessos de um banco de germoplasma e que pode ser identificável e mensurável (HOWES, 1981).

Um bom descritor deverá permitir a distinção entre os acessos diferentes de uma mesma cultura, deve ser praticável, útil e deve evitar redundância, ser ambientalmente estável, mono ou oligogênico e de fácil manipulação pelo melhorista (CHAPMAN, 1989). A caracterização morfológica é um processo que por meio da utilização de uma lista descritiva, trata de prover maiores informações sobre o genótipo avaliado, dispondo-o de forma mais efetiva para a utilização (RAMOS et al., 1999; NEITZE et al., 2009). Já o marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de

um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), ou seja, marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente (MILACH, 1998).

A escolha de um marcador molecular depende principalmente de sua reprodutibilidade e simplicidade. Os melhores marcadores para estudos de mapeamento, caracterização molecular ou estudos filogenéticos devem ter baixo custo e serem menos laboriosos. Alternativamente, o uso de marcadores genéticos baseados na identificação de polimorfismo de DNA, poderá ser utilizado pelo melhorista para criar um padrão genético (*Fingerprinting*) próprio de cada cultivar (STAUB et al.; 1996), pois não depende da idade da planta, do ambiente, estado sanitário e clima.

A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) utiliza primers de sequência arbitrária para a amplificação do DNA, e tem como vantagens menor custo, número de etapas e tempo para se obter os resultados, sendo de fácil implementação nos programas de melhoramento genético de plantas (MILACH, 1998).

O marcador ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) ou polimorfismo entre microsatélites são baseados na amplificação por PCR de segmento de DNA entre dois microsatélites (SINNETT et al., 1990; ZIETKIEWICZ et al., 1992). Neste marcador ocorre amplificação simultânea de múltiplos loci genômicos resultando em muitas bandas constantes e variantes (SINNETT et al., 1990).

A ISSR-PCR é uma técnica simples, rápida, eficiente e possui alta reprodutibilidade. Os produtos amplificados variam de 200-2000 pb e são sensíveis para detecção tanto por eletroforese em gel de agarose como em gel de poliacrilamida. Essa técnica envolve sequências de microsatélites como oligonucleotídeos iniciadores em reação de PCR para gerar marcadores multialélicos. Essa técnica combina as vantagens dos microsatélites e AFLP mais a universalidade dos marcadores RAPD. São altamente polimórficos e úteis no estudo de diversidade genética, filogenia, caracterização molecular, mapeamento e biologia evolutiva (REDDY et al., 2002).

A tendência atual do melhoramento genético é a utilização e a integração das metodologias tradicionais com as modernas técnicas biotecnológicas (LEITE;

ANTHONISEN, 2009). Nesse contexto, esse trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar morfo-agronômica e molecularmente cinco genótipos de feijão-caupi.

3.2 Material e Métodos

Caracterização Morfológica

O experimento foi conduzido entre agosto a dezembro de 2009, em condições de ambiente protegido, no Centro de Horticultura do Instituto Agronômico (IAC), em Campinas, SP, situado entre 22°54'20" S e 47°05'34" W, a 674 m de altitude.

Os genótipos de feijão-caupi avaliados foram três cultivares, IPA-206 (IPA), BRS-PAJEU, BRS-POTENGI (EMBRAPA) e duas linhagens, L 281.005 (IPA) e L ESP 10 (UFRPE/IPA), respectivamente, (Tabela 1). O delineamento experimental foi blocos casualizados, com quatro repetições. As parcelas experimentais foram compostas por uma linha com oito plantas, espaçadas 1,00 x 1,50 m, ficando uma planta por cova, após o desbaste, sendo as mesmas tutoradas por bambu. A fertilidade do solo foi corrigida de acordo com análise, seguindo-se a recomendação de adubação para o Estado de São Paulo (TRANI; RAIJ, 1996). As irrigações foram feitas através do sistema de irrigação por gotejamento uma vez ao dia.

Tabela 1 - Genótipos de feijão-caupi. IAC, Campinas, SP, 2009

Genótipos	Origem / Progenitores	Ano	Instituição	Método de Melhoramento	Classe Comercial	Subclasse Comercial	Região de Adaptação
IPA-206	CNC x149-1G	1989	IPA	Genealógico	Cores	Mulato	PE
L 281.005	CNC x11-9D X VITA3	-	IPA	Genealógico	Cores	Mulato	PE
BRS-PAJEU	TE97-304G-12	2009	Embrapa Meio-Norte	Descendência de uma única vagem	Cores	Mulato	RR,MA, PI, PE, AL, SE, MT, MS
BRS-POTENGI	MNC99-542F-5	2009	Embrapa Meio-Norte	Descendência de uma única vagem	Branco	Branco	RD, RR, AM, MA, PI, RN, PE, MT, MS
L ESP-10	Olinda 8 x Better Green e Fizer Green	-	UFRPE, IPA	Genealógico	Cores	Verde	PE

Fonte: BR-IPA (1990); MIRANDA et al. (2009), BRASIL..., (2008).

Durante a condução do experimento foram avaliados caracteres fenológicos, morfológicos e agrônômicos. As características das plantas foram analisadas de acordo com os descritores desenvolvidos por Bettencourt (2007) para feijão-caupi presentes na Tabela 2 e Figura 1, com modificações na forma de apresentação.

As características analisadas foram: hábito de crescimento, pilosidade, cor das folhas. Para essa última característica foi utilizado um colorímetro, marca Minolta, modelo CR-300, sendo realizado dez leituras por parcela, com os resultados expressos em L, a* e b*, de acordo com a metodologia utilizada por Melo *et al.*, 2009. Foi determinado o comprimento e a largura do folíolo com auxílio de uma régua graduada em centímetros. Foi avaliada a textura da folha e o vigor da planta. O vigor foi determinado através do mensuramento da largura e da altura da planta com uma trena, expressando os valores em centímetros. Na inflorescência, determinou-se o número de dias à floração e a coloração das flores, sendo essa última característica avaliada visualmente. Para o fruto, observou-se o número de dias à maturação da primeira vagem e fixação da vagem ao pedúnculo. Ainda para o fruto, foram mensurados o comprimento e a largura da vagem com uma régua graduada em centímetros, como também, foram contados o número de lóculos por vagem e o número de vagens por planta. Para a análise estatística de número de vagens por planta, os dados foram transformados para raiz de $(x + 0,5)$. Para sementes, avaliou-se a massa de 100 sementes com 12 % de umidade em uma balança analítica, expressando os valores em gramas. E para finalizar a avaliação dos descritores, foram medidos o comprimento, a largura e a espessura da semente com um paquímetro digital, marca Mitutoyo, modelo 150 mm, expressando os valores em mm.

Tabela 2 - Descritores de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] (adaptada de BETTENCOURT, 2007)

	Estrutura	Característica	Época de avaliação	Variantes	Nota
1	Fase vegetativa	Hábito de crescimento ¹	6ª semana depois da semente	Determinado	1
				Indeterminado	2
2		Pilosidade ²	6ª semana depois da semente	Glabro	3
				Pelos curtos comprimidos	5
				Pubescente a hirsuto	7
3		Cor das folhas ²	6ª semana depois da semente	Verde claro	3
				Verde intermediário	5
				Verde escuro	7
4		Comprimento do folíolo apical ² cm	6ª semana depois da semente		
5		Largura do folíolo apical ² cm	6ª semana depois da semente		
6		Textura da folha ²	6ª semana depois da semente	Coriácea	1
				Intermediária	2
				Membranosa	3
7		Vigor da planta ²	Largura e altura da planta; 3-4 semanas depois do semente	Não vigoroso	3
				Intermediário	5
				Vigoroso	7
				Muito vigoroso	9
8	Inflorescência	Número de dias à floração ¹	Nº dias desde o semente até estágio de 50% plantas/floração		
9		Cor das flores ²		Branca	1
				Violeta	2
				Lilás-cor de rosa	3
				Outra	4
10	Fruto	Nº dias à maturação da primeira vagem ¹	Nº dias desde a sementeira até ao estágio 50% com vagens maduras		
11		Fixação da vagem ao pedúnculo ²	Vagens estejam completamente desenvolvidas	Pendente	3
				Ângulo de 30-90°	5
				Ereto	7
12		Comprimento da vagem ¹ cm	10 vagens maduras mais longas de 10 plantas selecionadas ao acaso		
13		Largura da vagem ² cm	10 vagens		
14		Número de lóculos por vagem ¹	10 vagens utilizadas na medição do comprimento		
15		Número de Vagens por planta ¹	10 plantas aleatórias		
16	Semente	Massa da semente ³ g	Massa de 100 sementes (Teor de umidade 12%)		
17		Comprimento semente ² mm	Média de 10 sementes maduras		
18		Largura da semente ² mm	Média de 10 sementes maduras		
19		Espessura da semente ² mm	Média de 10 sementes maduras		

¹Caractere fenológico, ²caractere morfológico e ³caractere agrônômico.

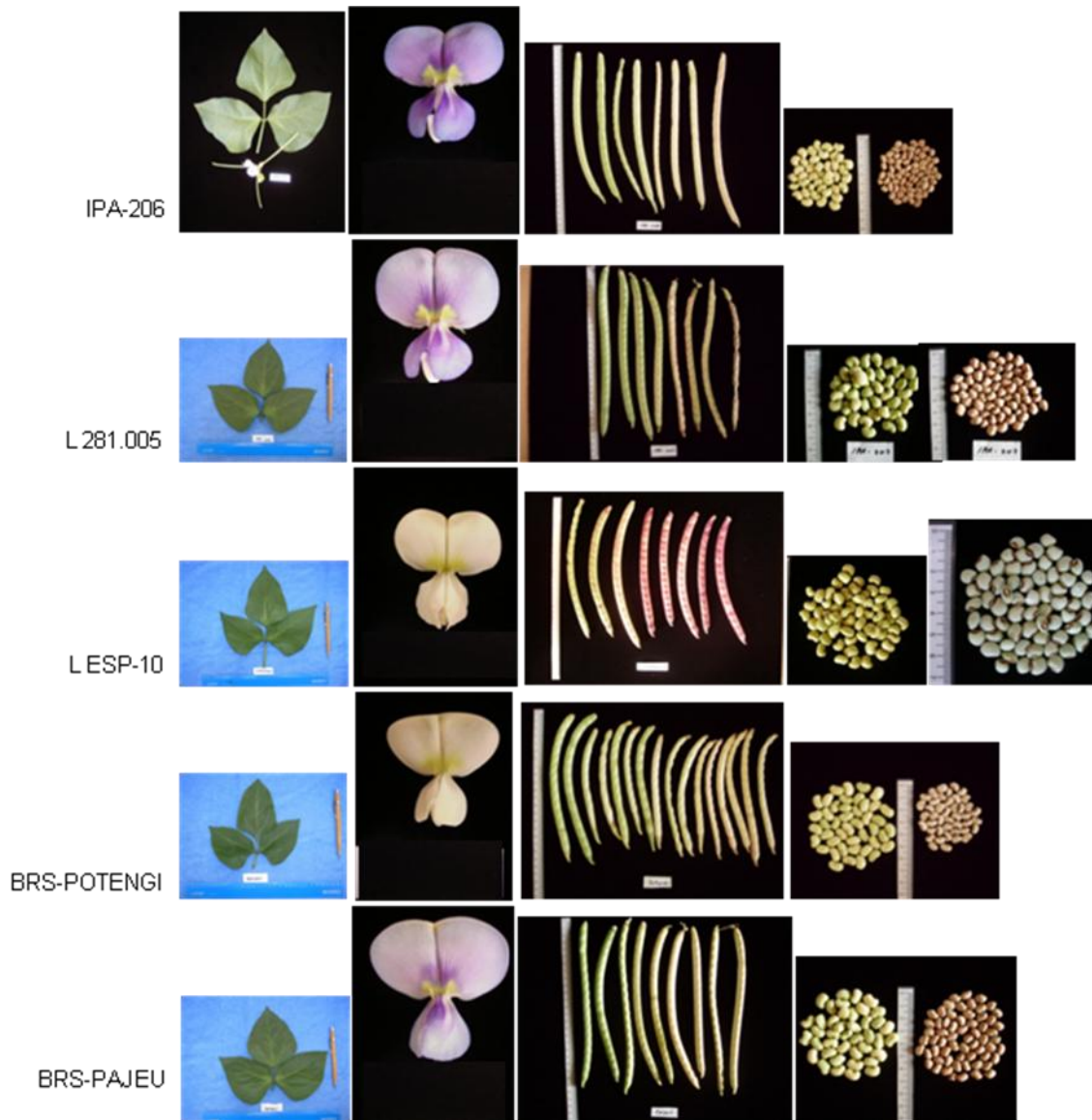


Figura 1 - Fotos de estruturas do feijão-caupi

Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância univariada ao nível de médias de parcelas e multivariada, e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa *R Statistic 2.11.1*.

Caracterização Molecular

Extratação de DNA

O DNA genômico foi isolado de tecido fresco de folhas dos genótipos de feijão-caupi (200 mg cada) seguindo o procedimento descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). A qualidade e quantidade de DNA foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. O DNA de cada amostra foi corado com SyBr Gold (1X, Molecular Probe) e fotografados sob luz UV com em um fotodocumentador digital L-Pix Imagem (Loccus Biotecnologia). A concentração final de DNA de cada amostra foi ajustada para 20 ng/uL.

PCR-RAPD

Para as reações de RAPD foram empregados inicialmente 26 oligonucleotídeos decâmeros de sequência aleatória (*primers*) da Operon Technologies. Destes, 6 *primers* produziram fragmentos claros e consistentes (Tabela 5). As amplificações do DNA foram realizadas em termociclador MJ Research, Inc. PTC 100 (Watetown, USA), com volume final de 25 uL de solução contendo 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 100 miM de cada dNTP, 0,2 miM de primer, 1,0 U de Taq polimerase, 20 ng DNA, utilizando-se o programa de amplificação: 94°C por 4 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 37°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos com extensão final de 5 minutos a 72°C.

PCR-ISSR

Os ensaios de ISSR foram baseados no método descrito por Zietkiewicz et al. (1994), utilizando *primers* ancorados, tendo as reações sido otimizadas para a obtenção de produtos de amplificação de melhor qualidade. Foram empregados inicialmente 37

primers de ISSR publicados pela University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canadá, para a geração de polimorfismo.

Dentre estes, 7 *primers* geraram fragmentos claros e consistentes (Tabela 6). As amplificações do DNA foram realizadas em termociclador MJ Research, Inc. PTC 100 (Watetown, USA), com volume final de 25 µL para cada reação, contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM de MgCl₂, 100 µM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (DNTPs), 0,2 µM do *primer*, uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 15 ng de DNA. Nas reações de PCR as amostras foram submetidas inicialmente a 94°C por 5 minutos, e, a seguir, a 30-35 ciclos de amplificação. Cada ciclo submeteu as amostras a 94°C por 30 segundos, com temperatura de anelamento variando de 50-55 ° C (dependendo do *primer* utilizado) por 45 segundos e por fim 72 ° C por 2 minutos. Após os ciclos as amostras foram mantidas a 72 ° C por 5 minutos para extensão final.

Os produtos da reação tanto de RAPD quanto de ISSR foram separados em eletroforese em gel de agarose 1,2% em Tampão TBE (Tris-Borato 0,09 M e EDTA 0,002 M), e corados com SyBr Gold (1X, Molecular Probe) e fotografados sob luz UV com em um fotodocumentador digital L-Pix Imagem (Loccus Biotecnologia).

Análise dos dados

Mediante a interpretação dos géis, os dados moleculares foram tabulados conforme presença (1) ou ausência (0) de cada fragmento específico de DNA amplificado, gerado por *primers* de RAPD e ISSR em cada genótipo, para serem usados no estudo de diversidade genética. As similaridades genéticas entre os genótipos foram estimadas usando-se o coeficiente de Jaccard, no programa Free Tree (version 0.9.1.50; Page 2001). Os dendrogramas foram obtidos por meio do programa TreeView (version 1.6.5; Page 2001), usando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average).

3.3 Resultados e Discussão

Caracterização Morfológica

No desenvolvimento da fase vegetativa da cultura do feijão-caupi todos os genótipos possuem hábito de crescimento indeterminado. Em geral, feijão-caupi de hábito indeterminado é cultivado principalmente por agricultores familiares, uma vez que a planta cobre rapidamente toda a parte superficial do solo. Como também, os cinco genótipos apresentam pelos curtos comprimidos. Portanto, para o conjunto de genótipos analisados, os descritores, hábito de crescimento e pilosidade, não tiveram poder discriminante.

Analisando-se os valores de notas para coloração das folhas, constata-se que o genótipo BRS-Potengi possui a cor verde um pouco mais escura, uma vez que recebeu o menor valor de L^* . Os demais genótipos apresentaram coloração verde muito próximo, e por isso não diferiram entre si. (Tabela 3).

Para tamanho do folíolo apical, o genótipo que apresentou maior comprimento e largura do folíolo foi a linhagem L ESP-10, com 15,68 e 11,28 cm, respectivamente. Já quem apresentou o menor folíolo foi a cultivar BRS-Potengi, com 12,70 e 8,39 cm para comprimento e largura do folíolo apical, respectivamente (Tabela 3). Ainda analisando os folíolos, todos os genótipos apresentaram textura da folha intermediária, ou seja, os folíolos não possuem textura coriácea nem membranosa.

Na avaliação do vigor da planta, mensurou-se a altura e a largura dos genótipos, com aproximadamente quatro semanas após o semeio. Observando-se a Tabela 3, constata-se que a cultivar mais alta, no dia da avaliação foi IPA-206, com 36,78 cm de altura. Entretanto, ao se averiguar a largura da planta, a linhagem que apresentou maior valor foi L ESP-10, com 43,72 cm. Dessa forma, pode-se inferir que para esse grupo de cinco genótipos, as plantas mais vigorosas são IPA-206 e L ESP-10 (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de notas para coloração da folha (L), a(-) e b(+), comprimento do folíolo apical (CFA), largura do folíolo apical (LFA), altura (AP) e largura da planta (LP) dos genótipos de feijão-caupi. IAC. Campinas, SP, 2009

Genótipo	(L*) ¹	(a*) ²	(b*) ³	CFA	LFA	AP	LP
IPA-206	42,73a	-7,25a	12,15a	14,04b	8,21b	36,78a	39,97a
L 281.005	42,14a	-6,57a	10,73a	14,30b	9,88ab	34,54a	40,63a
L ESP-10	42,28a	-6,34a	10,90a	15,68a	11,28a	32,60a	43,72a
Potengi	41,20b	-6,49a	10,49a	12,70c	8,39b	29,16a	31,36b
Pajeu	42,92a	-7,06a	11,41a	14,37b	9,06b	33,42a	39,84a
C.V. (%)	1,30	8,86	8,70	5,89	12,98	14,26	11,02

Médias na coluna seguidas de mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5%. (L*)¹ = luminosidade, variando do branco, nota 100, ao preto, nota 0; (a*)² = variando do verde, nota com valor negativo, ao vermelho, nota com valor positivo; (b*)³ = variando do azul, nota com valor negativo, ao amarelo, nota com valor positivo.

Para inflorescência, contou-se o número de dias à floração e também se observou a coloração das flores. Para número de dias para abertura das flores, houve a formação de três grupos: 58 dias para IPA-206 e L 281.005; 65 dias para L ESP-10 e BRS-Potengi e por último, 61 dias para BRS-Pajeu. Essas informações são importantes uma vez que se deve levar em consideração a diferença de dias para a abertura das flores quando se deseja efetuar cruzamentos entre genótipos (MELO et al., 2009). Já para coloração das flores, os genótipos IPA-206, L 281.005 e BRS-Pajeu possuem flores de cor violeta e L ESP-10 e BRS-Potengi possuem flores de cor branca.

No tocante a descrição do fruto, ao se contar o número de dias à maturação da primeira vagem, constatou-se que houve a mesma formação dos grupos para número de dias à floração. Ficando IPA-206 e L 281.005 com 73 dias, BRS-PAJEU com 76 dias, L ESP-10 e BRS-Potengi com 80 dias à maturação da primeira vagem. Para fixação da vagem ao pedúnculo, há três variantes, sendo elas: pendente, ângulo de 30-90° e ereto. Para os cinco genótipos descritos morfo-agronomicamente, todos apresentaram fixação da vagem ao pedúnculo na angulação de 30-90°.

Analisando as vagens, todos os genótipos apresentaram diferentes valores para comprimento e largura e número de lóculos por vagem, sendo esses, importantes descritores para os genótipos avaliados (Tabela 4). A linhagem L 281.005 apresentou

vagem mais alongada, com 24,42 cm, e maior número de lóculos por vagem do que os demais genótipos. No entanto, para largura da vagem, quem apresentou maior média foi a linhagem L ESP-10, com 1,27 cm.

Um descritor preciso, conforme sugerido por Bettencourt (2007) é o número de vagens por planta. Para essa característica, houve uma grande variação entre os genótipos. O genótipo que produziu o maior número de vagens foi L ESP-10 e L 281.005 apresentou menor produção nas condições de ambiente protegido (Tabela 4). No entanto, para massa de 100 sementes com 12 % de umidade, a cultivar BRS-Pajeu apresentou maior média com 20,59 g, e a menor média ficou para BRS-Potengi, com 15,91. Com tudo, quando se avalia massa de vagens verdes produzido por planta, o genótipo que apresentou maior produção foi a linhagem L ESP-10 com 852,38g, seguido do IPA-206 (733,86 g) e L-281.005 (659,93 g) (Tabela 4).

Para análise do tamanho da semente, mediram-se o comprimento, a largura e a espessura. No comprimento da semente, quem apresentou maior média foi a cultivar BRS-Potengi, com 12,78 mm, como também apresentou maior massa para 100 sementes. Porém para largura e espessura da semente, que as maiores médias foram apresentadas pela linhagem L ESP-10, com 8,82 e 7,41 mm, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores do comprimento (CV), largura (LV) e número de lóculos por vagem (NLV), número de vagens verde por planta (NV), massa de 100 sementes com 12% de umidade (M100S) e de vagem (MV) verde por planta, comprimento (CS), largura (LS) e espessura da semente (ES) dos genótipos de feijão-caupi. IAC. Campinas, SP, 2009

Genótipo	CV	LV	NLV	NV ¹	MV	M100S	CS	LS	ES
	cm				g		mm		
IPA-206	23,82a	1,07b	16,70b	69,90b	733,86ab	20,00ab	12,45a	8,08b	6,51c
L 281.005	24,42a	1,25a	18,92a	53,93c	659,93ab	19,50ab	12,00a	8,63a	7,11ab
L ESP-10	22,70b	1,27a	17,32b	88,59a	852,38a	17,69bc	12,39a	8,82a	7,41a
Potengi	16,31c	0,89c	12,75c	62,40bc	298,69c	15,91c	10,68b	7,33c	6,48c
Pajeu	22,40b	1,08b	16,97b	61,90bc	595,32b	20,59a	12,78a	8,25b	6,96b
C.V. (%)	2,96	4,52	4,76	6,95	23,80	7,74	4,45	2,30	3,52

Médias na coluna seguidas de mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5%.

¹Dados transformados por $\sqrt{x + 1}$.

Caracterização Molecular

A variabilidade genética de genótipos de feijão-caupi foi avaliada por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD e ISSR. Dos 26 *primers* utilizados para nas análises de RAPD, seis apresentaram padrão de fragmentos consistentes, gerando 44,7% de polimorfismo. Os *primers* que geraram maior número de bandas polimórficas foram OPD18, OPA11, OPM06, OPC07, OPW06 e OPT13 (Tabela 5).

Para as análises de ISSR, foram utilizados um total de 37 *primers*, dos quais sete geraram padrão consistente apresentando 66,6% de polimorfismo. Esse polimorfismo foi gerado pelo conjunto de primers: UBC (808, 834, 858, 862, 881, 888 e 891) (Tabela 6). A reprodutibilidade das amplificações foi acessada utilizando os *primers* UBC 808, 888, 858 e OPD18, OPA11, OPM06, com diferentes amostras de DNA isoladas independentemente de cada genótipo e amplificadas em reações independentes. Sob condições de otimização, os perfis de amplificação foram consistentes entre todos os experimentos de PCR (dados não mostrados).

O coeficiente de similaridade dos genótipos de feijão-caupi baseado em 47 marcadores RAPD e 42 marcadores ISSR variou de 0,555 a 0,772. Os genótipos L281-005 e BRS-Pajeu mostraram maior índice de similaridade (0,772), enquanto os genótipos BRS-Pajeu e BRS-Potengi mostraram menor índice de similaridade (0,555). A variabilidade apresentada entre os genótipos com maior distância genética pode ser explorada em programas de melhoramento do feijoeiro. Três dendrogramas baseados em marcadores moleculares RAPD, ISSR e RAPD+ISSR (Figura 2) foram construídos.

O padrão de agrupamento dos cinco genótipos apresentou uma pequena variação quando se observa o dendrograma ISSR em relação à combinação RAPD+ISSR, enquanto que o agrupamento gerado pelos marcadores RAPD e RAPD+ISSR apresentaram praticamente o mesmo resultado. A distribuição dos genótipos baseada nos dados moleculares confirmou o agrupamento gerado com base nos dados morfológicos (hábito de crescimento, pilosidade e cor das folhas).

A caracterização morfológica consiste em fornecer uma identidade para cada acesso através do conhecimento de uma série de dados que permitam estudar a variabilidade genética. Estes dados auxiliam na caracterização de germoplasma possibilitando grandes avanços na descrição da divergência genética entre acessos. A

variabilidade genética só pode ser eficientemente utilizada se for devidamente avaliada e quantificada, sendo a descrição das introduções ou acessos fundamental para a manutenção e exploração do potencial das coleções. Tal caracterização pode ser feita por meio de marcadores ou descritores morfológicos e, ou moleculares (SINGH, 2001).

Os marcadores moleculares estão espalhados no genoma e sua associação com diversos caracteres agronômicos é influenciada pelo cultivo sob pressão de seleção induzida pela domesticação. A exploração e avaliação de diversidade entre estes genótipos seriam de grande importância para a conservação *in situ* e programas de melhoramento do feijão (MUTHUSAMY et al., 2008). A distribuição dos grupos com base no desempenho agronômico e apoiados por análises de RAPD e ISSR são um bom indício para o aperfeiçoamento do melhoramento envolvendo genótipos contrastantes que permitirá a identificação de marcas para essas características com marcadores moleculares.

De um modo geral, a velocidade, eficiência e confiabilidade da metodologia de RAPD e ISSR são considerações importantes para o desenvolvimento de estratégias para a gestão eficaz das coleções de germoplasma em termos de identificação de duplicatas, a estimativa da diversidade genética e controle da erosão (LAVANYA et al., 2008). Os marcadores RAPD e ISSR tem sido utilizados para a identificação de cultivares de outras leguminosas, incluindo *Medicago polymorpha* (PAREDES et al. 2002), *Vigna radiata* (LAVANYA et al., 2008), *Vigna umbellata* (MUTHUSAMY et al, 2008).

Portanto, a caracterização molecular demonstrou a utilidade do método, não só para avaliar o conjunto da diversidade no germoplasma, mas também para permitir aglomeração potencial dos genótipos com base nas suas afinidades entre si para características de desempenho agronômico. De forma análoga, na caracterização morfo-agronômica, as características que apresentaram maior poder discriminante para os cinco genótipos avaliados, foram: cor das folhas; comprimento e largura do folíolo apical; vigor da planta; número de dias à floração, cor das flores; número de dias a maturação da primeira vagem, e ainda, o comprimento, a largura e o número de lóculos por vagem, como também o número de vagens por plantas; e na semente, massa de 100 sementes, comprimento, largura e espessura.

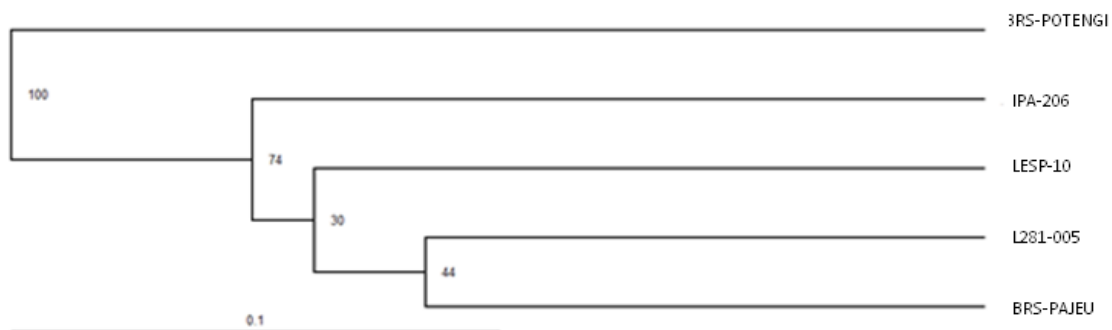
Tabela 5 - Lista dos *primers* ISSR selecionados para a amplificação do DNA dos genótipos de feijão-caupi com suas respectivas sequências de bases e tamanho dos fragmentos amplificados. IPA e UFPE, Recife, PE, 2009

<i>Primers</i> RAPD	Sequencia (5' → 3')	Tamanho dos fragmentos (pares de base)
OPD18	GAGAGCCAAC	600-1018
OPA11	CAATCGCCGT	700-1500
OPM6	CTGGCAACT	500-2000
OPC07		
OPW06		
OPT13		

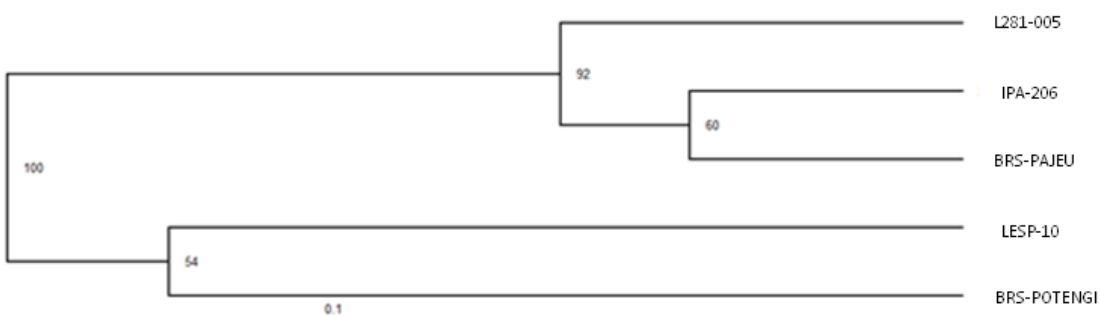
Tabela 6 - Lista dos *primers* ISSR selecionados para a amplificação do DNA dos genótipos de feijão-caupi com suas respectivas sequências de bases e tamanho dos fragmentos amplificados. IPA e UFPE, Recife, PE, 2009

<i>Primers</i> ISSR	Sequencia (5' → 3')	Tamanho dos fragmentos (pares de base)
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	500-2000
UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	500-1400
UBC858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT	600-1000
UBC862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	600-2000
UBC881	GGG TGG GGT GGG GTG	400-1400
UBC888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	400-1200
UBC891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	500-2000

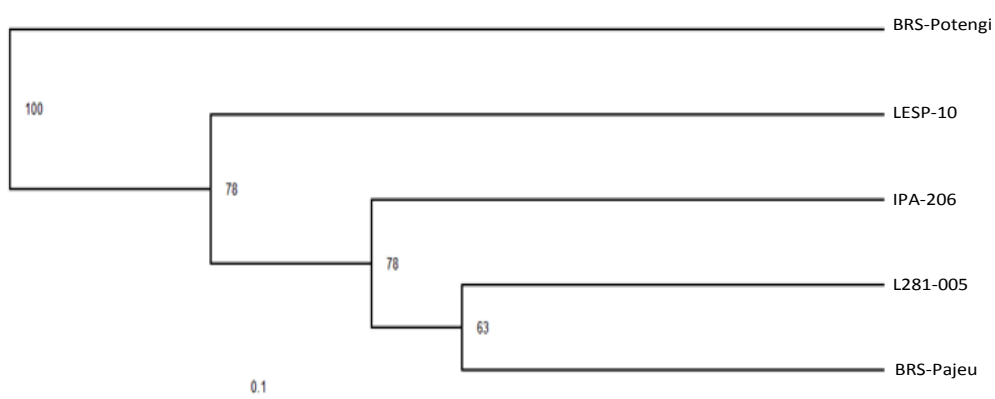
* Y = (C ou T), R = (A ou G), B= (C, G ou T), D=(A, G ou T), H= (A, C ou T), V= (A, C ou G).



A



B



C

Figura 2 - Dendrogramas gerado pelo método UPGMA mostrando as relações entre cinco genótipos de feijão-caupi utilizando RAPD, ISSR e combinação de dados de RAPD e ISSR. A)ISSR; B)RAPD; C)RAPD+ISSR

REFERÊNCIAS

BETTENCOURT, E. (Ed.). **Descritores para feijão frade ou caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. Tradução de J. Pedro e A. Alves. Roma: Bioersivity International, 2007. 25 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviços – Cultivares – Sementes e Mudas. **Cultivares Registradas** – RNC. Espécies: 24 – Feijão-caupi/Feijão-fradinho/Feijão-miúdo/Feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: ago. 2008.

BR - IPA-206: nova cultivar de feijão macassar (*Vigna unguiculata* L. Walp) tipo moita para Pernambuco. Recife: IPA, 1990. 1p. (IPA. Divulga, 35).

CHAPMAN, C. Principles of germplasm evaluation. In: STALKER, H.T.; CHAPMAN, C. (Ed.). **Scientific management of germplasm**: characterization, evaluation and enhancement. Rome: IBPGR, 1989. p. 55-63. (IBPGR. Training courses: Lecture series, 2).

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1998. 220p.

FERY, R.L. New opportunities in *Vigna*. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (Ed.). **Trends in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2002. p. 424-428.

FONSECA, N.; SILVA, S. de O.; SAMPAIO, J.M.M. Caracterização e avaliação de cultivares de manga na região do recôncavo baiano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, p. 29-54, 1994.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, A.A. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. Cap. 1, p. 29-92.

FREIRE FILHO, F.R.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V.Q.; SITTOLIN, I.M. Avanços e perspectivas para a cultura do feijão-caupi. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. da. (Ed.). **Agricultura Tropical**: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap. 7, p. 235-250.

HOWARD, F.H.; THIES, J.A.; FERY, R.L. Evaluation of cowpea genotypes for use as a cover crop. **HortScience**, Alexandria, v. 41, n. 5, p. 1145-1148, 2006.

HOWES, C. Guidelines for developing descriptors lists. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Maccaresse, v. 45, p. 26-32, 1981.

- LAVANYA, G.R.; SRIVASTAVA, J.; RANADE, S.A. Molecular assessment of genetic diversity in mung bean germplasm. **Journal of Genetics**, Sadashivanagar, v. 87, n. 1, p. 65-74, 2008.
- LEITE, D.L.; ANTHONISEN, D. Caracterização molecular de cultivares de cebola por marcadores de RAPD. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 420-424, 2009.
- MELO, R.A.; MENEZES, D.; RESENDE, L.V.; WANDERLEY JÚNIOR, L.J.G.; MELO, P.C.T.; SANTOS, V.F. Caracterização morfológica de genótipos de coentro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 371-376, 2009.
- MILACH, S.C.K. Disponibilidade de técnicas moleculares para la caracterização varietal. In: PAGLIANO, D. (Coord.). **Calidad genética y sanitaria: Um instrumento para la competitividad de la cadena agroindustrial**. Montevideo: IICA-PROCISUR, 1999. p. 39-46.
- MIRANDA, P.; COSTA, A.F. da.; RAPOSO, J.A.A. de A.; PIMENTEL, M. de L.; MAFRA, R.C.; TAVARES, J.A.; MARANHÃO, E.H. de A.; MARANHÃO, E.A. de A. **Feijão macassar "IPA-206" (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. In: Cultivares Recomendadas pelo IPA para a Zona da Mata de Pernambuco. Recife: IPA, 2009. p. 33-34.
- MUTHUSAMY, S.; KANAGARAJAN, S.; PONNUSAMY, S. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.11, n.3, p. 1-10, 2008.
- NEITZE, R.S.; BARBIERI, R.L.; HEIDEN, G.; BUTTOW, M.V.; OLIVEIRA, C.S.; CORREA, L.B.; SCHWENGBER, J.E.; CARVALHO, F.I.F. Caracterização morfológica e dissimilaridade genética entre variedades crioulas de melão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 534-538, 2009.
- PAGE R.D.M. 2001 TreeView (Windows 32) version 1.6.5. Distributed by author. <<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>>
- PAREDES, M.; BECERRA, V.; ROJO C.; DEL POJO, A.; OVALLE, C.; ARONSON, J. Ecotypic differentiation in *Medicago polymorpha* L. along an environmental gradient in central Chile. RAPDs studies shows little genetic divergence. **Euphytica**, Dordrecht, v. 123, p. 431-439, 2002.
- RAMOS, S.R.R.; QUEIRÓZ, M.A.; CASALI, V.W.D.; CRUZ, C.D. 1999. Recursos genéticos de *Cucurbita moschata*: caracterização morfológica de populações locais coletadas no Nordeste brasileiro. In: QUEIROZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em <http://www.cpsa.embrapa.br/catalogo/livro/abobora.pdf>. Acessado em 10 de abril de 2008.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 128, p. 9-17, 2002.

SINGH, B.B.; EHLERS, J.D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F.R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C.A.; TARAWALI, A.S.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAWO, M. (Ed.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p. 22-40.

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

SINNETT, D. DERAGON, J.M., SIMARD, L.R., LABUDA, D. Alu-morphs-human DNA polymorphisms detected by polymerase chain reaction using Alu-specific primers. **Genomics**, San Diego, v. 7, p. 331-334, 1990.

STAUB, J.E.; GABERT, A. WEHNER, T.C. Plant variety protection: A consideration of genetic relationship. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n.7, p. 1086-1091, 1996.

TRANI, P.E.; RAIJ, B. Hortaliças. In: RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1996. p. 157-186. (Boletim Técnico 100).

ZIETKIEWICZ, E.; LABUDA, M.; SINNETT, D., GLORIEUX, F. H., LABUDA, D. Linkage mapping by simultaneous screening of multiple loci using ALU oligonucleotide-directed PCR. **Proceedings of the National Academic Science**, New York, v. 89, p. 8448-84451, 1992.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymorphism chain reaction amplification. **Genomics**, Amsterdam, v.20, p.176-183, 1994.

4 QUALIDADE DO FEIJÃO-CAUPI MINIMAMENTE PROCESSADO SOB ATMOSFERA MODIFICADA PASSIVA

Resumo

No Brasil, o consumo de feijão-caupi é expressivo e muito popular em toda a região nordeste. A literatura existente pertinente à pós-colheita do feijão-caupi é escassa, sendo importante se desenvolver tecnologias que possam estender a vida de prateleira do produto. O objetivo desse trabalho foi avaliar a preservação da qualidade de grãos de feijão-caupi minimamente processado empacotado em três tipos de embalagens (PVC, PP e PEBD) sob temperaturas de armazenamento de 1, 5 e 10 °C, durante nove dias. Foi utilizada como matéria prima grãos de feijão-caupi, linhagem L ESP 10. As vagens foram resfriadas por 24 h, em seguida sanitizadas com solução de hipoclorito de sódio, na concentração de 100 ppm, por 15 minutos. Foram realizadas as seguintes análises: perda de massa fresca, composição gasosa, aroma e aparência. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo. Os fatores estudados foram três temperaturas de armazenamento (1, 5 e 10°C), três filmes para embalagem (PVC, PEBD e PP) e quatro tempos de armazenamento (0, 3, 6 e 9 dias). Foram utilizados três repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por uma bandeja, com 130 g de feijão-caupi. Os dados foram analisados através da construção de gráficos. Constatou-se que a perda de massa dos grãos foi muito reduzida. A composição gasosa no interior das embalagens revestidas por filmes plásticos, PVC e PP, ocorreu de forma diferente entre as três temperaturas de armazenamento. A temperatura de 1°C e o uso do filme de PVC foi mais eficientes na conservação da qualidade pós-colheita do feijão-caupi minimamente processado, propiciando melhor manutenção da cor verde, aparência, aroma e menor oxidação na região próxima ao hilo.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* (L.) Walp; Armazenamento refrigerado; Taxa respiratória

Abstract

In Brazil, cowpea is a very popular dish all over the northeast part of the country. Literature concerning its postharvest procedures is rare, though. This work aims to point out the importance of the development of some techniques in order to extend the valid of the production after its packing, evaluating PVC, PP and PEBD packages as well as the storage temperature for preserving the quality of the minimally processed beans for 9 days. It was used cowpea grains, line L ESP 10. In the laboratory, the beans were cooled for 24 hours and afterwards they were sanitized in sodium hypochlorite solution, at concentration of 100 ppm for 15 minutes. It was analysed mass loss, gas composition, odor and appearance. The experiment was completely randomized, arranged in a triple factorial design. It was studied three different storage temperatures (1, 5, 10°C), three different kinds of packing films (PVC, PP and PEBD) and four different periods of storage (0, 3, 6 and 9 days). It was used three replications for treatment. It was placed 130g of cowpea beans replication in each tray. The results were evaluated by drawing graphs. It was showed very little mass loss in grains, gas formation inside the packings using films formed in different ways according to the three different storage temperatures. The results showed that temperature at 1°C and use of PVC was the most efficient process to preserve the postharvest quality of the minimally processed cowpea beans, keeping its green color, appearance and odor. Also, it presented the lowest oxidation level near the hilum.

Keywords: *Vigna unguiculata* (L.) Walp ; Cold storage; Respiration rate

4.1 Introdução

A produção mundial das diferentes espécies de *Vigna*, provavelmente, alcance 20 milhões de hectares, e praticamente toda essa superfície cultivada está em países em desenvolvimento (FERY, 2002). O feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp, destaca-se como uma das mais importantes fontes de proteínas para milhares de pessoas, em vários países, principalmente na África, na Índia e na América Tropical (FREIRE FILHO et al., 2005).

No Brasil, o consumo de feijão-caupi ou feijão-de-corda é expressivo e muito popular em toda a região nordeste, sendo uma cultura típica de agricultura familiar (SILVA, 2005). É consumido na sua maioria já debulhado *in natura*, ou seja, em fase de maturação verde. Os grãos verdes, que assim são chamados por não terem atingido a maturidade fisiológica, apresentam um alto percentual de água e, conseqüentemente,

uma alta perecibilidade, necessitando do emprego de métodos de conservação (LIMA et al., 2000).

É escassa a literatura existente pertinente à pós-colheita do feijão-caupi, sendo importante o desenvolvimento de tecnologias que possam estender a vida de prateleira e agregar valor ao produto.

Pouco se conhece a cerca do comportamento fisiológico do feijão-caupi depois do produto embalado. Segundo Taiz e Zeiger (2004) o feijão-caupi é não-climatérico. Nos frutos não-climatéricos, a respiração diminui durante o amadurecimento, e as transformações bioquímicas que tornam o fruto maduro ocorrem de forma mais lenta. O amadurecimento só ocorre se o fruto estiver aderido à planta, diferentemente do que ocorre nos frutos climatéricos, que amadurecem mesmo após a colheita (WILLS et al., 1998).

A técnica de processamento mínimo é empregada em diversas culturas oleráceas como brócolis (BARTH et al., 1993); repolho (CANTWELL, 1995); morango (LÓPEZ-SERRANO; RÓS-BARCELO, 1995); berinjela (KLUGE et al., 1999); cenoura (BARRY-RYAN; O'BEIRNE, 2000); melão (JACOMINO et al., 2002); batata (CANTOS et al., 2002); tomate (MORETTI et al., 2002); couve-flor (HODGES et al., 2006); alface (DEGL'INNOCENTI et al., 2007) e quiabo (FINGER et al., 2008). De modo geral, essas hortaliças são descascadas ou cortadas, se necessário, lavadas e submetidas a processos de sanitização (NGUYEN; CARLIN, 1994). Portanto, essa técnica tem por objetivo disponibilizar produtos frescos, limpos e convenientemente, preparados e adequados para o consumo em menor tempo (CANTWELL; SUSLOW, 2002).

A fisiologia dos produtos hortícolas minimamente processados é, essencialmente, a fisiologia de tecidos vegetais que sofre injúrias. De fato, as operações de descascamento, corte e centrifugação, normalmente utilizadas durante o processamento mínimo, provocam uma série de injúrias nos tecidos. Assim, o comportamento desses produtos é semelhante ao que ocorre em tecidos de plantas submetidas às condições de estresse (BRECHT, 1995; WATADA; QI, 1999; KLUGE; et al., 2006).

A refrigeração tem sido o método de conservação mais utilizado para a manutenção e o aumento da vida útil de frutas e hortaliças, por reduzir o metabolismo e

a perda de peso (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Do mesmo modo, o conhecimento sobre a influência da temperatura sobre a taxa respiratória de cada produto é indispensável, pois a embalagem que é projetada para acomodá-lo a uma determinada temperatura de armazenamento, geralmente, não é adequada para outras temperaturas. Isso ocorre devido aos diferentes efeitos das embalagens na permeabilidade e na taxa respiratória (SARANTÓPOULOS et al., 2003).

Conhecendo-se as características respiratórias e condições ótimas do produto, pode-se selecionar um filme plástico com permeabilidade que permita a entrada de O₂ e a saída de CO₂ na embalagem, de acordo com as necessidades do produto minimamente processado (ZAGORY; KADER, 1988). O emprego de atmosfera modificada, utilizando-se filmes poliméricos, tem contribuído para estender a vida útil e manter a qualidade de frutas e hortaliças (KADER, 1995).

Apesar da possibilidade de processamento mínimo, o feijão-caupi minimamente processado não é encontrado em larga escala no mercado brasileiro. Isso se deve, aparentemente, à falta de cultivares com características específicas para essa finalidade, pouca durabilidade do produto e uso inadequado das técnicas de processamento mínimo. Tais informações são extremamente relevantes para as empresas que vislumbram a possibilidade de explorar esse segmento de mercado no país e eventualmente exportá-lo.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a preservação da qualidade de grãos de feijão-caupi minimamente processado empacotado em três tipos de embalagens (PVC, PP e PEBD) sob temperaturas de armazenamento de 1, 5 e 10 °C, durante nove dias.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pós-colheita de Produtos Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal (LPV) da USP/ESALQ, em Piracicaba, SP, Brasil. Foi utilizada como matéria prima grãos de feijão-caupi, linhagem L ESP 10 (UFRPE/IPA), provenientes do cultivo na horta do LPV, no ponto de colheita comercial em estágio de maturação verde.

Após a colheita as vagens foram acondicionadas em caixas plásticas, e em seguida transportadas para o laboratório, onde foram selecionadas quanto à

uniformidade de maturação em função da formação da vagem, coloração, tamanho e ausência de injúrias. As vagens foram lavadas em água corrente, com o objetivo de retirar as impurezas, sendo, em seguida, armazenadas a 1, 5 e 10 °C por 24 h objetivando a estabilização da temperatura interna da vagem e reduzir a atividade metabólica para o processamento mínimo. Passado o período de resfriamento, as vagens foram imersas em solução de hipoclorito de sódio, em concentração de 100 ppm, por 15 minutos. Em seguida drenou-se a solução, e procedeu-se a debulha manual das vagens (Figura 1).

As etapas de processamento mínimo ocorreram dentro de uma sala refrigerada ($18\pm 1^\circ\text{C}$) sobre mesa de fórmica devidamente higienizada. Os operadores utilizaram roupas protetoras (botas, aventais, luvas, máscaras e toucas) como parte das condições mínimas de assepsia (Figura 1) (VITTI et al., 2004).

Após a debulha acondicionou-se 130 g de grãos nas bandejas rígidas de poliestireno expandido com dimensões de 15 x 15 x 2 cm para largura, comprimento e altura, respectivamente (Figura 2), as quais foram revestidas com os seguintes tipos de filmes: 1) PVC: Policloreto de vinila com 17 μm de espessura, 2) PEBD: Polietileno de baixa densidade com 0,06 μm de espessura e 3) PP: Polipropileno a 0,06 μm de espessura, (Figura 3). Estes filmes foram estudados sob atmosfera modificada passiva e com aplicação de vácuo parcial. O vácuo parcial foi realizado para a embalagem com o filme PEBD utilizando-se a seladora a vácuo, marca Selovac, modelo 200B. A embalagem com o filme PP foi selada no mesmo equipamento. O fechamento da embalagem com PVC foi realizado por aquecimento na parte inferior da bandeja, em uma seladora, marca Everest. O feijão minimamente processado foi armazenado a 1, 5 e 10 °C, durante nove dias, sendo as características analisadas a cada três dias a partir do dia do processamento.



Figura 1 - Debulha manual das vagens de feijão-caupi com os alunos utilizando roupas protetoras



Figura 2 - Pesagem do feijão-caupi debulhado



Figura 3 - Feijão-caupi acondicionado em bandejas de poliestireno expandido e embalados com os filmes PVC, PP e PEBD

As características analisadas foram:

Perda de massa fresca: calculada pela diferença entre massa inicial (dia 0) e a final (3, 6 e 9 dias) das embalagens pesadas em balança semi-analítica, marca Toledo, modelo III, com os resultados expressos em porcentagem;

Composição gasosa: para o monitoramento da composição gasosa foi fixado em cada embalagem um septo de silicone através do qual foram coletadas amostras de gás do interior das embalagens, PP e PVC, utilizando-se um analisador de gases marca Mapy, modelo 4.0, o qual retira aproximadamente 2 mL de gás por amostra. As leituras foram realizadas diariamente e os resultados foram expressos em % O₂ e % CO₂;

Aroma e Aparência: foi determinado através de uma escala hedônica de notas, adaptado de Peryan e Girardot (1952), levando-se em consideração o aroma e a aparência do produto após a abertura da embalagem de acordo com o estado de conservação onde as notas variam de 5 a 1. A nota 3 foi considerada como limite para comercialização.

Para as avaliações foram utilizados 16 julgadores, onde as notas significam para

o **Aroma:**

Nota 5 (excelente) - aroma típico de feijão-verde,

Nota 4 (bom) - aroma moderado,

Nota 3 (regular) - aroma fraco ou sem aroma,

Nota 2 (ruim) - aroma levemente alcoólico,

Nota 1 (péssimo) - aroma alcoólico ou putrefato;

e para **Aparência:**

Nota 5 (excelente) - grãos com coloração verde intenso, turgidos e excelente aparência,

Nota 4 (bom) - grãos com coloração verde intenso, túrgidos, mas com início de oxidação na região próxima ao hilo,

Nota 3 (regular) - grãos verde, com oxidação um pouco mais forte do que a inicial na região próxima ao hilo,

Nota 2 (ruim) - grãos verdes com oxidação em estágio mais avançado,

Nota 1 (péssimo) - grãos oxidados, com início de germinação, surgimento de fungos ou apodrecimento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3x4. Os fatores estudados foram três temperaturas de armazenamento (1, 5 e 10°C), três filmes para embalagem (PVC, PEBD e PP) e quatro tempos de armazenamento (0, 3, 6 e 9 dias). Foram utilizados três repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por uma bandeja, com 130 g. Os dados foram analisados através da construção de gráficos.

4.3 Resultados e discussão

A perda de massa foi muito pequena nas três embalagens utilizadas, PVC, PP e PEBD para as três temperaturas de armazenamento, variando de 0 a 1,3 % no último dia de avaliação (dados não apresentados). Finger et al. (2008), quando avaliaram quiabo, com ou sem o uso de filme polimérico, constataram que as embalagens recobertas por filme de PVC tiveram uma menor perda de massa quando comparados com os tratamentos sem PVC. De acordo Bower et al. (1998), possivelmente isso ocorreu também devido ao emprego de temperaturas mais baixas, proporcionando uma

redução da atividade metabólica e troca gasosa com o meio, diminuindo a respiração e aumentando a conservação pós-colheita. Para Pesis et al., 2000 e Mota et al., 2010, o uso de filme nas embalagens pode agir passivamente no controle da perda de massa da matéria fresca, pois a barreira física imposta pelo filme condiciona níveis elevados de umidade dentro da embalagem, havendo redução do gradiente de pressão de vapor de água entre os frutos e a atmosfera interna da embalagem, reduzindo então, a perda de massa da matéria fresca.

A composição gasosa no interior das embalagens revestidas por filmes plásticos, PVC e PP, ocorreu de forma diferente entre as três temperaturas de armazenamento, 1, 5 e 10°C, respectivamente (Figura 1). No entanto, ficaram diferentes da recomendação proposta por Cantwell (1992), que é de 2 a 8 % de O₂ e 5 a 15 % de CO₂ para uma melhor conservação de frutas e hortaliças minimamente processadas.

Nas embalagens revestidas com o filme de PVC, nas três temperaturas de armazenamento, a concentração de O₂ e CO₂ se manteve praticamente semelhantes à composição do ar atmosférico. O filme PVC é considerado material de baixa barreira, por apresentar taxa de permeabilidade a gases mais elevada, quando comparada a outros polímeros (SARANTÓPOULOS et al., 2003). No entanto, na avaliação das características sensoriais, a embalagem que conservou o feijão-caupi por mais tempo foi com o filme de PVC. Este tipo de polímero não mantém condensamento ao contrário dos filmes PEBD e PP (Figura 4). Pode-se inferir que o feijão-caupi debulhado por ser um grão fresco, possui atividade respiratória bastante elevada, sendo indicada uma embalagem que possibilite mais trocas gasosas, como o PVC.



Figura 4 – Feijão-caupi conservado a 1°C, com três dias de armazenamento, embalado com os filmes PVC, PP e PEBD, respectivamente

A temperatura de 1°C e o uso do filme de PVC foram mais eficientes na conservação da qualidade pós-colheita do feijão-caupi minimamente processado, com melhor manutenção da cor verde, aparência e aroma por mais tempo e menor tendência de oxidação na região próxima ao hilo. O escurecimento enzimático é um dos fatores limitantes que afetam a vida de prateleira de frutas e hortaliças minimamente processadas (BRECHT, 1995). Possivelmente, a manutenção da cor ocorreu devido à baixa temperatura de armazenamento, que contribui também para o não escurecimento próximo à região do hilo, sendo ocasionada pela oxidação.

No armazenamento feito a 1°C, para a embalagem PP, observa-se que a composição gasosa no interior da embalagem tende a se aproximar ao que foi proposto por Cantwell (1992), (Figura 5A). Porém, ao analisarem-se as características sensoriais, constata-se que essa composição gasosa atingida no interior da embalagem não foi benéfica à conservação do aroma, com presença de odor alcoólico já no terceiro dia de armazenamento.

Para aparência, pode-se observar que o feijão-caupi embalado com o filme de PVC e armazenado a 1°C chegou ao final do experimento com nota 4, em bom estágio de conservação, ao contrário das embalagens com PP e PEBD que receberam nota 3 (regular) (Figura 6A). No entanto, o aroma da embalagem PP aos três dias de armazenamento já liberava início de odor alcoólico, com nota 2. Por sua vez, a embalagem PEBD, aos nove dias de armazenamento, apesar de estar com aparência

regular, também exalava odor alcoólico. Portanto, as embalagens PP e PEBD, armazenadas a 1°C, não foram adequadas para a manutenção das propriedades sensoriais do feijão-caupi aos nove dias.

No tocante ao armazenamento realizado a 5°C, a embalagem que mais se destacou foi com o PVC, uma vez que aos três, seis e nove dias o feijão-caupi minimamente processado recebeu as notas cinco (excelente), quatro (bom) e três (regular), para aroma, respectivamente (Figura 7B). No que concerne à aparência recebeu nota três (Figura 6B), a qual representa o limite para comercialização do produto. Essas notas comprovam que a embalagem com PVC foi adequada para a conservação das características sensoriais, aparência e aroma, nessa temperatura de armazenamento. As embalagens, PP e PEBD, nessas mesmas condições de refrigeração não foram adequadas para a manutenção da qualidade do feijão-caupi, uma vez que o produto não estava mais em condições para o consumo aos nove dias de armazenamento (Figura 7B).

A embalagem com PP a 5°C, aos dois dias de armazenamento estava com 0,16 % de O₂ e 12,60 % de CO₂. Ao se analisar o gráfico para aparência, observa-se que a embalagem recebeu nota 4, bom (Figura 6B); já para a característica aroma, o produto não estava em condições satisfatórias, uma vez que recebeu nota 2 (Figura 7B). Isso evidencia que essa embalagem propiciou condições de anaerobiose, mesmo a uma temperatura mais reduzida (5°C), devido à presença de odor alcoólico após a abertura do filme. Isso pode ser confirmado no gráfico para composição gasosa a 5°C com dois dias de armazenamento (Figura 5).

Pode-se constatar, ao analisar os gráficos para composição gasosa, a 10 e 5°C, respectivamente, para as embalagens com PP, que houve semelhança na queda da concentração de O₂ e aumento de CO₂ (Figuras 5B e 5C). Apesar do filme PP ser mais barreira que o filme PVC, não foi possível atingir concentrações gasosas desejáveis para manter as qualidades sensoriais do feijão-caupi a 10°C. Mesmo as embalagens com o filme PP aos três dias de armazenamento estando com aparência regular (Figura 5C), no entanto, as mesmas exalavam aroma levemente alcoólico, não estando o produto apto para o consumo (Figura 5C). Possivelmente, isso ocorreu devido ao processo de anaerobiose, após a queda do O₂ dentro da embalagem já no primeiro dia

de armazenamento com 0,31 % atrelado a elevação do CO₂, com 17,83 % no segundo dia de armazenamento (Figura 5C).

O mesmo comportamento descrito anteriormente para a embalagem com PP ocorreu para a embalagem de PEBD, com vácuo, podendo-se inferir, que o feijão-caupi não suporta baixas concentrações de O₂ na manutenção de suas qualidades, discordando do que foi sugerido por Cantwell (1992). Em compensação, as embalagens com PVC acondicionaram o produto adequadamente até o sexto dia de armazenamento, com nota 3 (regular), para aparência e aroma (Figuras 6C, 7C), respectivamente. E aos nove dias de armazenamento, a 10°C, o feijão-caupi, já não estava mais em condições de ser comercializado. Temperaturas de armazenamento mais elevadas contribuem no aumento do metabolismo dos produtos minimamente processados, com elevação da taxa respiratória, havendo uma concentração de CO₂ e diminuição do O₂ (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Isso contribui para a deterioração mais rápida do produto armazenado. De acordo com Paull (1999), 90% dos produtos deveriam ser armazenados à temperatura de 4°C ou menor para propiciar máxima conservação pós-colheita. Para o repolho minimamente processado, a temperatura indicada para a conservação varia de 0 a 5°C (CANTWELL; SUSLOW, 2002).

Portanto, de acordo com os dados obtidos mediante a análise para perda de massa, composição gasosa, aroma e aparência, a embalagem mais adequada à manutenção das qualidades sensoriais do feijão-caupi minimamente processado foram aquelas onde se utilizou filme de PVC na temperatura de armazenamento a 1°C.

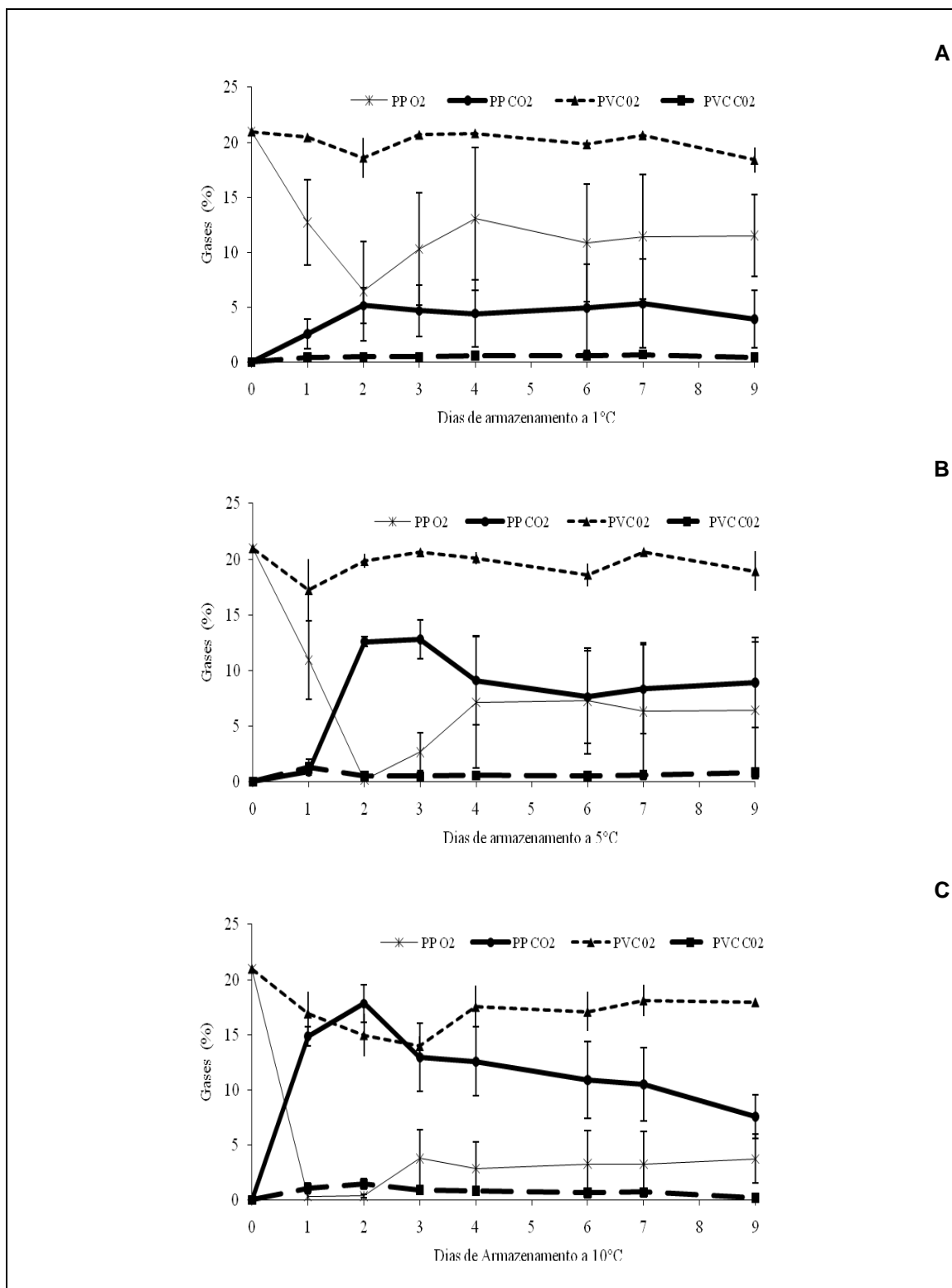


Figura 5 - Evolução da composição gasosa no espaço livre das embalagens contendo feijão-caupi minimamente processado a 1°C (A), 5°C (B) e 10°C (C), sendo: PP: Polipropileno a 0,06 μ m e PVC: Policloreto de vinila com 17 μ m. Barras verticais representam o desvio padrão da média. Piracicaba, SP, USP/ESALQ

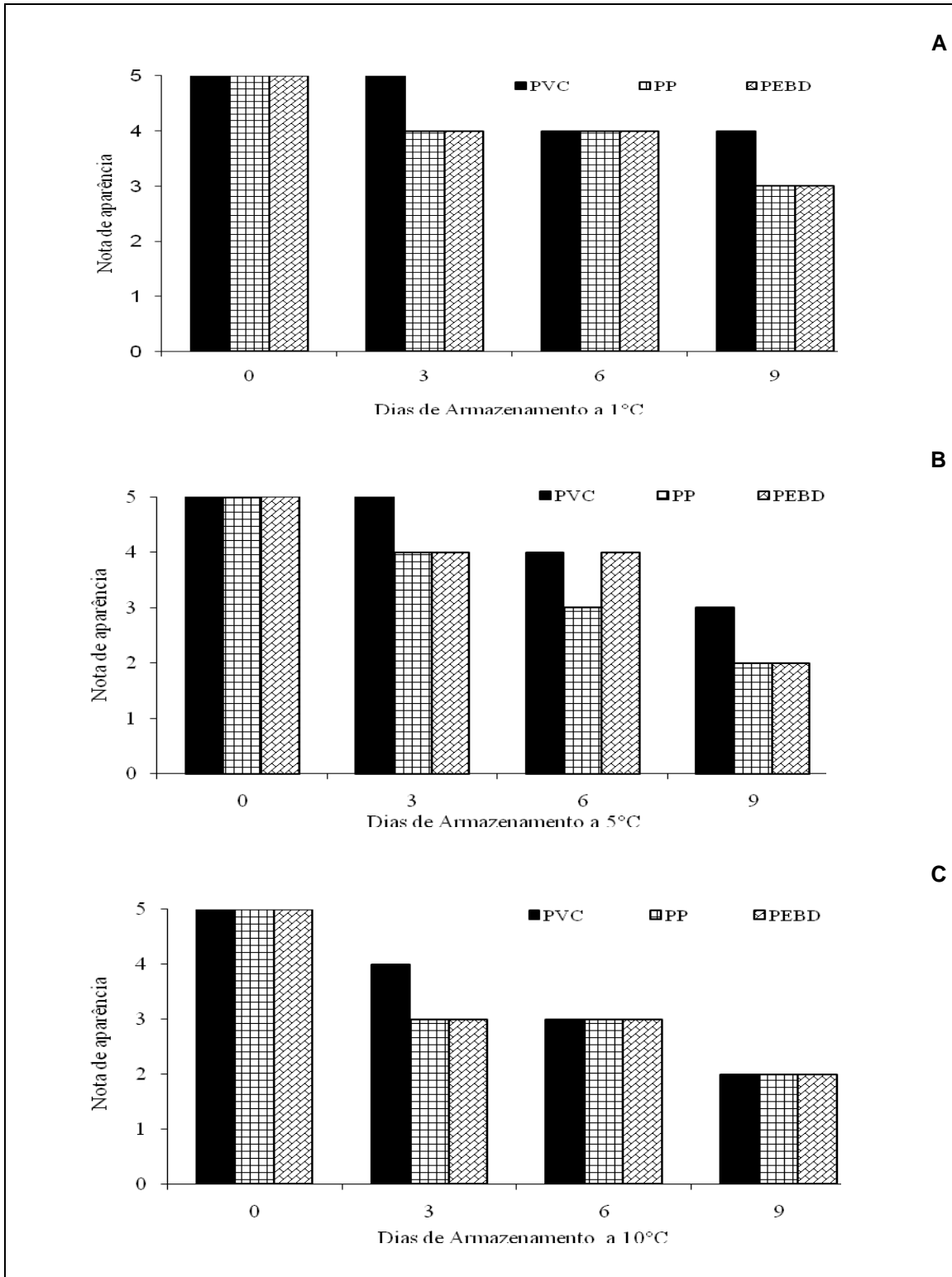


Figura 6 - Gráficos para escala de notas para aparência de feijão-caupi minimamente processado. Piracicaba, SP, USP/ESALQ

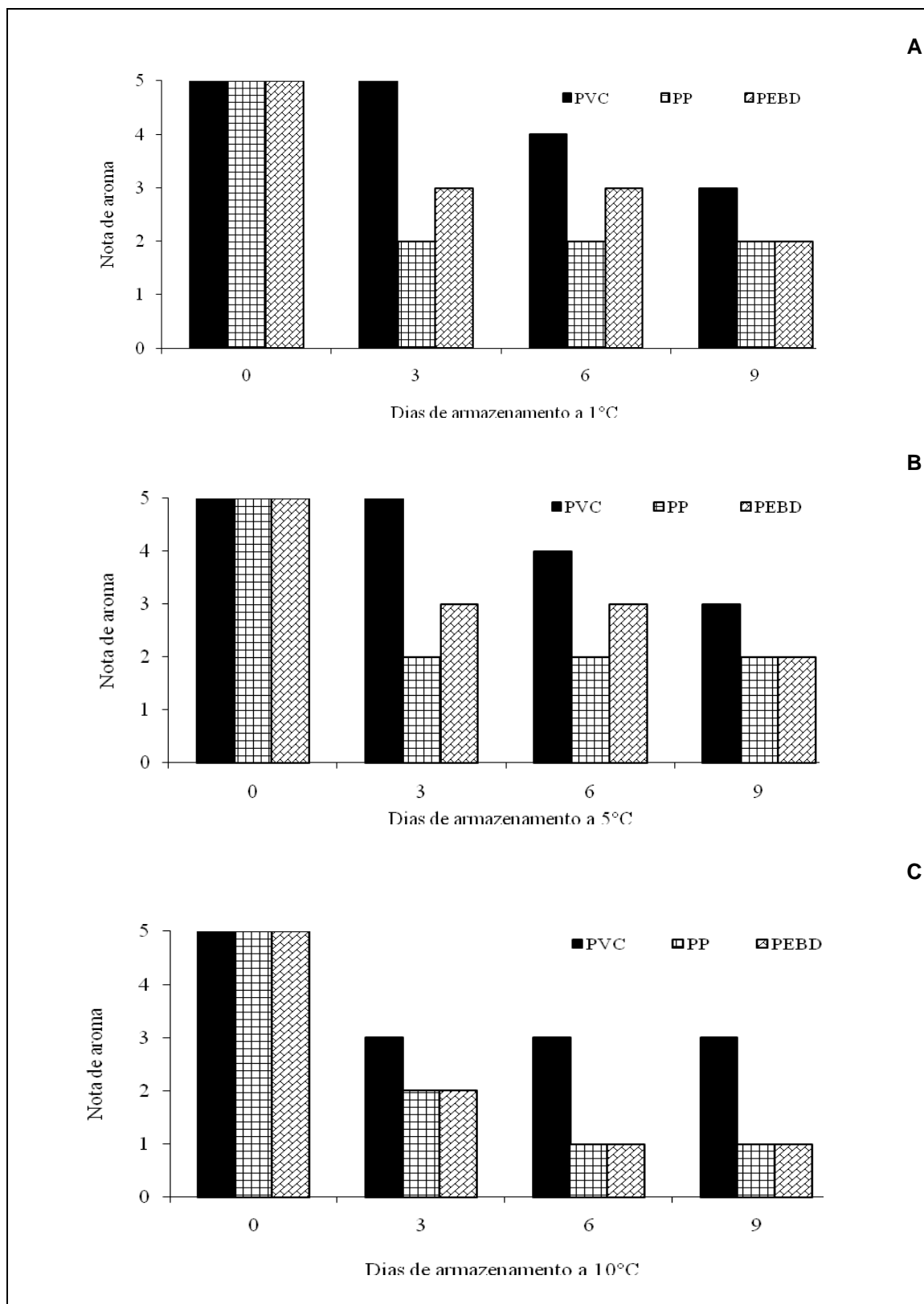


Figura 7 - Gráficos para escala de notas para aroma de feijão-caupi minimamente processado. Piracicaba, SP, USP/ESALQ

REFERÊNCIAS

BARRY-RYAN, C.; O'BEIRNE, D. Effects of peeling methods on the quality of ready-to-use carrot slices. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 35, p. 243-254, 2000.

BARTH, M.M.; KERBEL, E.L.; BROUSSARD, S.; SCHIMIDT, S.J. Modified atmosphere packaging protects market quality in broccoli spears under ambient temperature storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, p. 1070-1072, 1993.

BOWER, J.H.; JOBLING, J.J.; PATTERSON, B.D.; RYAN, D.J. A method for measuring the respiration rate and respiratory quotient of detached plant tissues. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 13, p. 263-270, 1998.

BRECHT, J.K. Physiology of lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v. 30, p. 18-22, 1995.

BRECHT, J.K.; SALTVEIT, M.E.; TALCOTT, S.E.; MORETTI, C.L. Alterações metabólicas. In: MORETTI, C.L. (Ed.). **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**. Brasília: SEBRAE, 2007. Cap. 2, p. 41-77.

CANTOS, E.; TUDELA, J.A.; GIL, M.I.; ESPÍN, J.C. Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 3015-3023, 2002.

CANTWELL, M. Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables. In: KADER, A.A. (Ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. Davis: University of Califórnia / Dir. Agric. Nat. Res., 1992. p. 227-281.

CANTWELL, M. Fresh-cut product biology requirements. **Perishables Handling Newsletter**, v. 81, p. 4-6, 1995.

CANTWELL, M.; SUSLOW, T.V. Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables. In: KADER, A.A. (Ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. Davis: Univ. Califórnia; Division of Horticultural and Natural Resources, 2002. p. 445-463.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

DEGL'INNOCENTI, E.; PARDOSSI, A.; TOGNONI, F.; GUIDI, L. Physiological basis of sensitivity to enzymatic browning in 'lettuce', 'escarole' and rocket salad' when stored as fresh-cut products. **Food Chemistry**, London, v. 104, p. 209-215, 2007.

FERY, R.L. New opportunities in *Vigna*. In: JANICK J; WHIPKEY A. (Ed.). **Trends in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2002. p. 424-428.

FINGER, F.L.; DELLA-JUSTINA, M.E.; CASALI, V.W.D.; PUIATTI, M. Temperature and modified atmosphere affect the quality of okra. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 360-364, 2008.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, A.A. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. Cap. 1, p. 29-75.

HODGES, D.M.; MUNRO, K.M.; FORNEY, C.F.; MCRAE, K.B. Glucosinolate and free sugar content in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. Freemont) during controlled-atmosphere storage. **Postharvest and Biology and Technology**, Amsterdam, v. 40, p.123-132, 2006.

JACOMINO, A.P.; ARRUDA, M.C. de; CARON, V.C.; KLUGE, R.A. Taxa respiratória de melão inteiro e minimamente processado armazenado em três temperaturas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 402, Suplemento 1, 2002.

KADER, A.A. Regulation of fruit physiology by controlled/modified atmospheres. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 398, p. 56-70, 1995.

KLUGE, R.A.; ANTONINI, A.C.C.; ROBLES, W.G.R.; TESSARIOLI NETO, J.; JACOMINO, A.P.; SCARPARE FILHO, J.A. Avaliação de cultivares de berinjela em armazenamento refrigerado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 1045-1050, 1999.

KLUGE, R.A.; COSTA, C.A.; VITTI, M.A.D.; ONGARELLI, M., das G.; JACOMINO, A.P.; MORETTI, C.L. Armazenamento refrigerado de beterraba minimamente processada em diferentes tipos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, p. 263-270, 2006.

LIMA, N.L.; EMANUELLE, C.; SILVA, C.L. da; DINIZ, M. do C.; OLIVEIRA, M.R.T. de; GADELHA, T.S. Estudo sobre a conservação de quatro variedades de feijão macassar verde (*Vigna unguiculata* L. Walp.): submetidos a temperaturas de refrigeração e congelamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 2, p. 57-69, 2000.

LÓPEZ-SERRANO, M.; RÓS-BARCELO, A. Activity of peroxidase in unripe and processing strawberries. **Food Chemistry**, v. 52, p. 157-160, 1995.

MATTOS, L.M.; MORETTI, C.L.; CHITARRA, A.B.; PRADO, M.E.T. Qualidade de alface crespa minimamente processada armazenada sob refrigeração em dois sistemas de embalagem. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 504-508, 2007.

MORETTI, C.L.; ARAUJO, A.L.; MAROUELLI, W.A.; SILVA, W.L.C. 1-MCP delays tomato fruit ripening. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p.659-663, 2002.

MOTA, W.F. da; FINGER, F.L.; CECON, P.R.; SILVA, D.J.H. da; CORRÊA, P.C.; FIRME, L.P.; MIZOBUTSI, G.P. Conservação e qualidade pós-colheita de quiabo sob

diferentes temperaturas e formas de armazenamento. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 12-18, 2010.

NGUYEN, C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, p. 371-401, 1994.

PAULL, R.E. Effect of temperature and relative humidity on fresh commodity quality. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 15, p. 263-277, 1999.

PERYAN, D.R.; GIRARDDOT, N.F. Advanteced taste method. **Journal of Food Engeneiring**, Davis, v. 24, p. 58-61, 1952.

PESIS, E.; AHARONI, D.; AHARON, Z.; BEM-ARIE, R.; AHARONI, N.; FUCHS, Y. Modified atmosphere and modified humidity packaging alleviates chilling injury symptoms in mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 19, p. 93-101, 2000.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.; TELES, C.S.; COPPELMANS, A.S. Efeitos da embalagem e da temperatura de estocagem na qualidade de couve minimamente processada. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, p. 185-190, 2003.

SILVA, G.S. Nematóides. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. cap. 13, p. 487-497.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

VITTI, M.C.D.; KLUGE, R.A.; GALLO, C.R.; SCHIAVINATO, M.A.; MORETTI, C.L.; JACOMINO, A.P. Aspectos fisiológicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 1027-1032, 2004.

WATADA, A.E.; QI, L. Quality of fresh-cut produce. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 15, p. 201-205, 1995.

WILLS, R.; McGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. **Introducción a la fisiologia y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales**. Zaragoza: Acribia, 1998. 240p.

ZAGORY, D.; KADER, A.A. Modified atmosphere packaging of fresh produce. **Food Technology**, Chicago, v. 42, p. 70-77, 1988.

5 UTILIZAÇÃO DE RAIOS X NA AVALIAÇÃO DE DANOS CAUSADOS POR CARUNCHO EM SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI

Resumo

No Brasil, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], tem destaque na Região Nordeste, sendo uma cultura típica da agricultura familiar. A importância dos danos causados por pragas de armazenamento em sementes da referida espécie, em relação à sua qualidade, tem sido evidenciada em vários trabalhos. Através de imagens de raios X é possível visualizar as estruturas internas da semente, identificando possíveis alterações e danificações. Dessa forma, esse trabalho teve o objetivo de identificar os danos causados por caruncho [*Callosobruchus maculatus* (Fabr.)] e sua relação com a qualidade fisiológica das sementes de feijão-caupi, por intermédio da análise de raios X. Foram utilizadas três cultivares: IPA-206, BRS-Pajeú, BRS-Potengi e duas linhagens, L 281.005 e L ESP 10. As amostras foram submetidas ao teste de raios X e ao teste de germinação, a fim de determinar a relação de causa e efeito entre os danos provocados pelo caruncho e a germinação das sementes. Nas avaliações das imagens de raios X foi considerada a severidade e a localização dos danos na semente. Para os danos classificados como severos, localizados no eixo embrionário e, ou nos cotilédones, as sementes originaram plântulas anormais ou as sementes estavam mortas. Portanto, o teste de raios X é eficiente para a avaliação de danos causados por caruncho em sementes de feijão-caupi, permitindo relacionar os eventuais danos com os prejuízos causados à germinação.

Palavras-chave: [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]; [*Callosobruchus maculatus* (Fabr.)]; Análise de imagens; Danos internos

Abstract

In Brazil, the cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], is important in the Northeast Region, where it is typically grown on family farms. The importance of the damage caused to the seed quality of this species by stored pests has been described in various studies. Using X-ray, it is possible to see the internal seed structures and identify possible changes and damage. The objective of this study was to identify the damage caused by the weevil [*Callosobruchus maculatus* (Fabr.)] by analyzing X-ray and evaluate its relationship to the physiological quality of the cowpea seed. Three cultivars were used (IPA-206, BRS-Pajeu and BRS-Potengi) and two lines (L 281.005 and L ESP 10). The samples were exposed to X-ray and germination test to determine the cause-effect relationship between weevil damage and seed germination. X-ray images were evaluated to determine damage severity and location in the seed. Seed damage classified as severe, located in the embryonic axis or in the cotyledons, resulted in abnormal seedlings or dead seeds. The X-ray test, therefore, is efficient for evaluating weevil damage in cowpea seeds and the damage caused to be associated with any resulting adverse germination effects.

Keywords: [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]; *Callosobruchus maculatus*; Image analysis; Internal damage

5.1 Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma das leguminosas mais adaptadas, versáteis e nutritivas entre as espécies cultivadas. A cultura ocupa uma área de 11 milhões de hectares, sendo cultivada nas regiões tropicais e subtropicais da África, da Ásia e das Américas (SINGH et al., 2002). No Brasil, o feijão-caupi é cultivado na Região Nordeste, sendo uma cultura típica da agricultura familiar (FREIRE FILHO et al., 2005) e é a principal cultura de subsistência do Sertão Semi-árido (SILVA, 2005).

A importância dos danos causados por caruncho, *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleóptera: Bruchidae), em relação à qualidade de sementes de feijão-caupi, tem sido evidenciada por vários pesquisadores (TANZUBIL, 1991; QUINTINELA et al., 1991; GALLO et al., 2002; ALMEIDA et al., 2005; SILVA et al., 2005; PEREIRA et al., 2008). Os danos causados são decorrentes da colonização do interior dos grãos pelas larvas do inseto, resultando em perda de massa, desvalorização comercial, redução do valor nutritivo, do grau de higiene do produto pela presença de excrementos, ovos e insetos e redução da germinação das sementes (GALLO et al., 2002; ALMEIDA et al., 2005).

O caruncho é considerado a praga mais relevante do feijão-caupi durante o armazenamento, podendo causar perdas da ordem de 60% (TANZUBIL, 1991). O besouro tem aproximadamente 3 mm de comprimento, apresentando, nos élitros, manchas amarronzadas que, em repouso, formam um “X”. Vive cerca de 5 a 8 dias. As fêmeas põem em média 80 ovos na superfície dos grãos (QUINTINELA et al., 1991). Ao eclodirem, as larvas penetram nos grãos, alimentando-se do conteúdo interno. Dentro dos grãos, transformam-se em pupas e, após a emergência, os insetos adultos rompem os tecidos e reiniciam o ciclo biológico (SILVA et al., 2005).

O teste de raios X, de baixa energia, para determinar a qualidade física das sementes, é recomendado pela ISTA (1996). Esta técnica foi inicialmente introduzida na Suécia, na década de 1950, para a avaliação da qualidade de sementes de espécies florestais (SIMAK; GUSTAFSSON, 1953). Segundo Bino et al. (1993), quando os raios X passam através de uma semente, a radiação é absorvida em vários graus dependendo da espessura, densidade e composição da semente e do comprimento de

onda da radiação, criando assim uma imagem permanente no filme radiográfico. É um método rápido e não destrutivo, utilizado com a finalidade básica de detectar semente bem formada e mal formada, com danos mecânicos ou por ataque de insetos (ISTA, 1996).

Por meio da imagem de raios X é possível visualizar as estruturas internas da semente, identificando possíveis alterações, particularmente com referência ao eixo embrionário (ISTA, 1995). De acordo com Cicero e Banzatto Junior (2003), a utilização da técnica de análise de imagens de raios X para avaliar a qualidade de semente é promissora; constitui um método preciso, onde as estruturas internas da semente podem ser examinadas em imagens ampliadas e capazes de indicar, com detalhes, a área danificada, sua localização e a extensão dos danos. Por se tratar de um método não destrutivo, a semente em análise pode ser submetida aos testes fisiológicos e, desse modo, permitir o estabelecimento de relações de causa e efeito.

A técnica de análise de imagens obtidas através de raios X tem sido utilizada para avaliar o potencial fisiológico de sementes de melão (KAMRA, 1966; OBANDO-FLOR et al., 2001), *Pinus sylvestris* L. (SIMAK, 1991), tomate (LIU et al., 1993), canafístula (OLIVEIRA et al., 2003) e embaúba (PUPIM et al., 2008). Essa técnica também detecta danos causados por umidade em semente de soja (PINTO et al., 2007), danos mecânicos em sementes de soja (OBANDO-FLOR, 2003) e de milho (CICERO et al., 1998) e, ainda, danos causados por percevejo em sementes de feijão (FORTI et al., 2008).

Os danos físicos causados por insetos, assim como os de outras origens, podem ser identificados por meio de radiografias, em curto período de tempo, com expectativa de resultados promissores (SIMAK, 1980).

Esse trabalho teve por objetivo identificar os danos causados por caruncho e sua relação com a qualidade fisiológica em sementes de feijão-caupi por intermédio da técnica de análise de raios X.

5.2 Material e métodos

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Análise de Imagens e de Análise de Sementes, do Departamento de Produção Vegetal, da Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, em Piracicaba, SP, no período de março a junho de 2009.

Foram utilizadas sementes de feijão-caupi de três cultivares: IPA-206 (IPA), BRS-Pajeu e BRS-Potengi (EMBRAPA) e duas linhagens, L ESP 10 (UFRPE) e L 281.005 (IPA). As sementes foram adquiridas junto às instituições detentoras dos genótipos e essas tinham ficado armazenadas em câmara seca e fria há um ano. Para detecção dos danos internos, as sementes foram submetidas ao teste de raios X. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes escolhidas aleatoriamente, para cada uma das três cultivares e das duas linhagens, respectivamente, totalizando duzentas sementes radiografadas por genótipo. As sementes foram colocadas em alvéolos individualizados de uma placa acrílica com cem alvéolos, fixadas com fita adesiva transparente e identificadas de acordo com a posição ocupada na placa. Para a obtenção da radiografia, a placa de acrílico com as sementes foi colocada diretamente sobre um filme radiográfico (Kodak MIN-R EV 2000), tamanho de 18 x 24 cm, a uma distância de 57 cm da fonte emissora de raios X (FAXITRON X-Ray, modelo MX-20), utilizando-se intensidade de 25 kV e 40 segundos de exposição (ATHAYDE SOBRINHO et al., 2002).

Os filmes foram revelados em processadora (Hope X-Ray, modelo 319 Micromax). Em seguida, as imagens das radiografias foram captadas em scanner (Umax, modelo Power Look 1100) e transferidas para o computador. As análises das imagens possibilitaram a ampliação e a avaliação de cada semente radiografada.

Após a radiografia, foi instalado o teste de germinação, segundo as Regras para Análise de Sementes-RAS (BRASIL, 2009). Na instalação do teste de germinação, as sementes (em grupos de 10) foram distribuídas equidistantemente no terço superior do substrato, papel toalha "Germitest". As folhas de papel foram umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa das mesmas. Os rolos foram colocados em germinador e mantidos a 25° C. Após cinco dias, decorridos da

instalação do teste, as plântulas (normais e anormais) e as sementes mortas foram fotografadas com câmera digital (Nikon, modelo D1) acoplada ao computador. Posteriormente, as imagens obtidas de plântulas (normais e anormais) e de sementes mortas foram comparadas paralelamente às imagens de raios X, sendo examinadas simultaneamente. Dessa forma, relacionaram-se os danos causados pelo caruncho com as alterações na germinação das sementes.

A classificação dos danos foi efetuada pelos critérios descritos por Cicero et al., (1998), com adaptações (Tabela 1). Neste caso, para cada semente foram atribuídas duas notas, a primeira referente aos danos presentes no eixo embrionário e a segunda referente aos danos nos cotilédones. Quando não havia presença de dano no eixo embrionário e nem nos cotilédones, ou seja, dano não observado, atribuiu-se nota 1.1 para a imagem obtida da semente por meio de raios X. Danos não severos são aqueles que ocorrem tanto no eixo embrionário quanto nos cotilédones, mas que não interferem na formação de uma plântula normal; dessa forma, atribuíam-se nota 2.2 para os casos em que o dano foi classificado como não severo tanto para o eixo embrionário quanto para os cotilédones. Por outro lado, o dano foi classificado como severo quando ocorria no eixo embrionário ou nos cotilédones numa extensão maior, causando interferência na germinação das sementes, impedindo a formação de uma plântula normal; danos presentes nos cotilédones, próximos à região do eixo embrionário, geralmente, também foram considerados como severos, pois esses afetam a translocação de nutrientes para o eixo embrionário durante o processo de germinação. Assim, para esta última situação, atribuíam-se nota 3.3, significando danos severos no eixo embrionário e nos cotilédones.

Tabela 1 - Critérios utilizados para caracterizar as notas para os danos causados pelo caruncho no eixo embrionário e nos cotilédones da semente de feijão-caupi, por meio de imagens de raios X. Piracicaba, SP, USP/ ESALQ, 2009

Nível do dano	Eixo Embrionário	Cotilédones
Não observado	1	1
Não severo	2	2
Severo	3	3

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (três cultivares e duas linhagens) e quatro repetições de 50 sementes cada. Utilizou-se o teste F para análise da variância e o teste de Tukey, em nível de probabilidade de 5% de erro, para a comparação das médias.

5.3 Resultados e discussão

O exame simultâneo das imagens internas da semente (radiografias), das plântulas e das sementes mortas após o teste de germinação, permitiu proceder a um diagnóstico para cada caso, podendo-se, dessa forma, estabelecer relações de causa e efeito, a exemplo do que foi realizado para feijão comum por Mondo et al. (2009).

Na Tabela 2, encontram-se os valores médios, em porcentagem, referentes à intensidade de danos na região do eixo embrionário e, ou cotilédones causados por carunchos, nas três cultivares e duas linhagens analisadas, detectados pelo teste de raios X.

Tabela 2 - Valores médios (%) de sementes com diferentes notas atribuídas aos danos causados pelo caruncho, no eixo embrionário e nos cotilédones, nos cinco lotes avaliados por meio de raios X. Piracicaba, SP, USP/ESALQ, 2009

Local do dano	Genótipos	Nota		
		1 ¹	2 ²	3 ³
Eixo embrionário	L ESP 10	100 a ⁴	0 b	0 b
	IPA-206	63,5 b	10,5 a	26 a
	L 281.005	95 a	0,5 b	4,5 b
	BRS-Pajeú	98,5 a	0 b	1,5 b
	BRS-Potengi	94,5 a	1 b	4,5 b
CV (%)		4,82	39,81	40,48
Cotilédones	L ESP 10	100 a	0 c	0 c
	IPA-206	21,5 d	29,5 a	49 a
	L 281.005	84 c	9,5 b	6,5 b
	BRS-Pajeú	95,5 b	3 bc	1,5 c
	BRS-Potengi	88,8 bc	4,5 bc	7 b
CV (%)		5,71	46,20	13,38

¹Dano não observado; ²dano não severo; ³dano severo. ⁴Na coluna, para cada local de dano, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

As sementes da cultivar IPA-206 apresentaram maior ocorrência de danos classificados como severos (nota 3.3), no eixo embrionário e nos cotilédones, diferindo

dos demais genótipos. Entretanto, a ocorrência de dano não severo foi menor para as cultivares BRS-Pajeu e BRS-Potengi e as linhagens L ESP 10 e L 281.005, podendo-se destacar que esses quatro genótipos apresentaram maiores médias de sementes sem danos, tanto no eixo embrionário quanto nos cotilédones.

As porcentagens de plântulas normais, anormais e de sementes mortas, observadas na primeira contagem do teste de germinação, em sementes que apresentaram danos por caruncho, avaliadas pelo teste de raios X, estão contidas na Tabela 3. Com os resultados obtidos, pode-se verificar que as sementes que não apresentaram danos no eixo embrionário nem nos cotilédones (Figura 1A) deram origem, na maioria dos casos, a plântulas normais (Figura 1B) após a avaliação da germinação no dia indicado pelas RAS para a primeira contagem, como pode ser observado para as cultivares BRS-Pajeu e BRS-Potengi e nas linhagens L ESP 10 e L 281.005 (Tabela 3). Contudo, algumas sementes em que não foram observados danos (nota 1.1) geraram plântulas anormais; esse tipo de problema segundo Burg et al. (1994) pode ocorrer devido à infecção por microrganismos, deterioração fisiológica e, ou, à morte de tecidos.

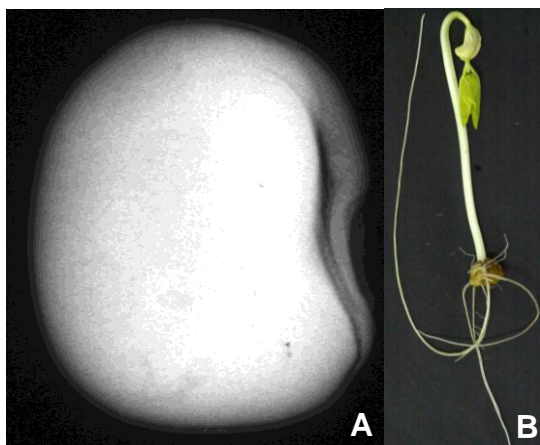


Figura 1 - Imagem de semente da linhagem L ESP 10 obtida por meio do teste de raios X, sem dano por caruncho (A), nota 1.1, originando uma plântula normal (B)

Tabela 3 - Valores (%) de plântulas normais (PN), de plântulas anormais (PA) e de sementes mortas (SM) obtidos no teste de germinação e respectivas notas atribuídas às imagens de raios X, para danos por caruncho. Piracicaba, SP, USP/ESALQ, 2009

Nota*	L ESP 10			IPA-206			L 281.005			BRS-Pajeu			BRS-Potengi		
	PN	PA	SM	PN	PA	SM	PN	PA	SM	PN	PA	SM	PN	PA	SM
1.1	95,5	4,5	0	8,0	11,5	1,0	71,5	11,5	1,0	94	1,5	0	78,0	8,0	2,5
1.2	0	0	0	12,0	10,5	0,5	8,5	0	0,5	3	0	0	2,5	1,0	0
1.3	0	0	0	5,5	12,5	2,0	1,5	0,5	0	0	0	0	2,5	0	0
2.1	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.2	0	0	0	1,5	2,5	0	0,5	0	0	0	0	0	0,5	0	0
2.3	0	0	0	2,0	4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0
3.1	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.2	0	0	0	0	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0
3.3	0	0	0	0,5	18,5	4,0	2,0	2,0	0,5	0,5	0,5	0,5	2,0	1,5	0,5
T	95,5	4,5	0	30,5	62	7,5	84	14	2,0	97,5	2,0	0,5	86	11	3

*1. Danos não observados, 2. Danos não severos, 3. Danos severos. O primeiro algarismo da nota refere-se ao eixo embrionário e o segundo aos cotilédones.

Para os danos classificados como severos, tanto nos cotilédones como no eixo embrionário, para as sementes dos cinco genótipos, houve relação direta entre os danos e as quantidades de plântulas anormais e de sementes mortas quando considerada a primeira contagem do teste de germinação. A quantidade de sementes mortas para os cinco genótipos foi baixa, com porcentagem mais elevada (7,5%) para IPA-206.

As sementes com danos por caruncho são representadas nas Figuras 2A, 3A, 4A e 5A. Na Figura 2A, observa-se uma semente apresentando dano severo apenas nos cotilédones (nota 1.3), resultando em uma plântula anormal (Figura 2B). Segundo Cicero et al. (1998), os danos presentes nos cotilédones que causam restrições na translocação de nutrientes para o eixo embrionário, ou os que ocorrem diretamente sobre o eixo embrionário, afetam negativamente a germinação das sementes.

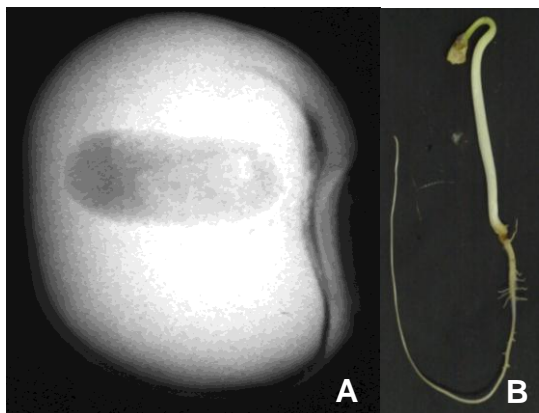


Figura 2 - Imagem de semente da cultivar IPA-206 obtida por meio do teste de raios X, com dano por caruncho (C), nota 1.3, originando uma plântula anormal (D). Piracicaba, USP/ESALQ, 2009

Na Figura 3A observa-se uma semente que tem dano não severo no eixo embrionário e dano severo na região cotiledonar, classificada com a nota 2.3 e que originou uma plântula anormal (Figura 3B).

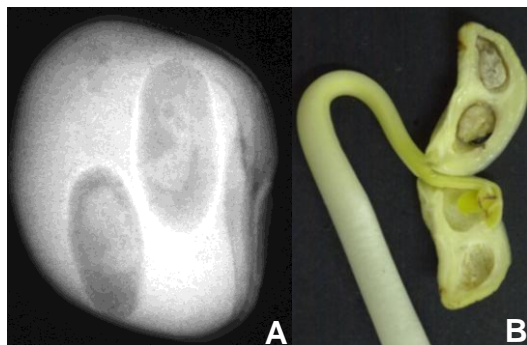


Figura 3 - Imagem de semente da cultivar IPA-206 obtida por meio do teste de raios X, com dano por caruncho (A), nota 2.3, originando uma plântula anormal (B)

A Figura 4A mostra uma semente com nota 3.2, pois apresenta dano severo no eixo embrionário e não severo na região dos cotilédones, resultando em plântula anormal (Figura 4B).

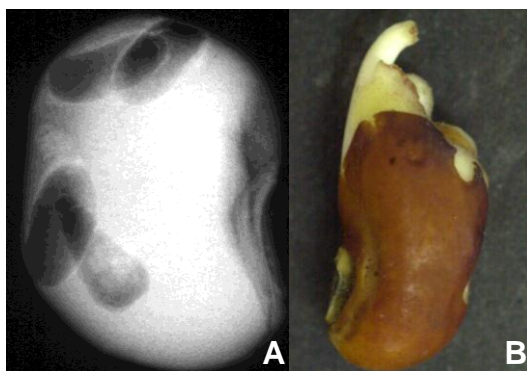


Figura 4 - Imagem de semente da cultivar BRS-Pajeu obtida por meio do teste de raios X, com dano por caruncho (A), nota 3.2, originando uma plântula anormal (B)

A Figura 5A, tem uma semente com dano severo nos cotilédones e no eixo embrionário com nota 3.3, que no final do teste de germinação originou uma semente morta (Figura 5B).

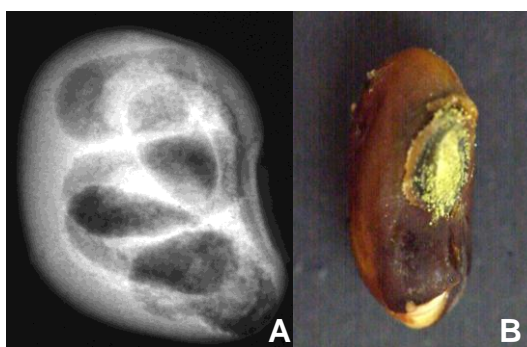


Figura 5 - Imagem de semente da cultivar IPA-206 obtida por meio do teste de raios X, com dano severo por caruncho (A), nota 3.3, originando semente morta (B)

Com base nas sementes analisadas das três cultivares e das duas linhagens, evidenciou-se que quando ocorrem danos severos no eixo embrionário e nos

cotilédones, as sementes morrem ou originam plântulas anormais. Esse mesmo resultado foi detectado para sementes de feijão comum (FORTI et al., 2008) e de soja (PINTO et al., 2009), em que foi verificado que danos provocados por percevejos, classificados como severos, ou seja, ocorrentes no eixo embrionário e, ou nos cotilédones, originaram plântulas anormais ou sementes mortas.

Pelos resultados obtidos, verifica-se que o teste de raios X é eficiente para a avaliação de danos causados por caruncho em sementes de feijão-caupi permitindo relacionar os eventuais danos com os prejuízos causados à germinação.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.A.C.; ALMEIDA, A.S.; SANTOS, N.R.; GOMES, J.P.; ARAÚJO, M.E.R. Efeito de extratos alcoólicos de plantas sobre o caruncho do feijão vigna (*Callosobruchus maculatus*). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, p. 585-590, out/dez. 2005.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; OBANO FLOR, E.P.; CICERO, S.M.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. Avaliação comparativa através de imagem de raios X entre os métodos de congelamento e restrição hídrica como inibidores da germinação de sementes de caupi em testes de sanidade de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002., Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. Resumo p. 24.
- BINO, R.J.; AARTSE, J.W.; BURG, W.J. van der. Nondestructive X-ray of *Arabidopsis* embryo mutants. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, p. 167-170, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395 p.
- BURG, W.J. van der; AARTESE, J.W.; ZWOL, R.A. van; JALINK, H.; BINO, R.J. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 119, p. 258-263, 1994.
- CICERO, S.M.; HEIJDEN, G.W.A.M. van der; BURG, W.J. van der; BINO, R.J. Evaluation of mechanical damage in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 26, p. 603-612, 1998.
- CICERO, S.M.; BANZATTO JUNIOR, H.L. Avaliação do relacionamento entre danos mecânicos e vigor, em sementes de milho, por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, p. 29-36, 2003.

FORTI, V.A.; CICERO, S.M.; PINTO, T.L.F. Análise de imagens na avaliação de danos mecânicos e causados por percevejo em sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, p. 121-130, 2008.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, A.A. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO FR; LIMA JAA; RIBEIRO VQ (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. Cap. 1, p. 29-75.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

ISTA. Internacional Seed Testing Association. International rules for testing seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 13, p 300-520. 1995.

ISTA. International Rules for Seed Testing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 24, 336 p. 1996.

KAMRA, S.K. Determination of germinability of melon with X-ray contrast method. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 31, p. 719-729, 1966.

LIU, Y.; BURG, W.J. van der; AARTSE, J.W.; ZWOL, R.A. van; JALINK, H.; BINO, R.J. X-ray studies on changes in embryo and endosperm morphology during priming and inhibition of tomato seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, p.171-178, 1993.

MONDO, V.H.V.; GOMES JUNIOR, F.G.; PUPIM, T.L.; CICERO, S.M. Avaliação de danos mecânicos em sementes de feijão por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, p. 27-35, 2009.

OBANDO-FLOR, E.P. **Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagens**. 2003. 72 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

OBANDO-FLOR, E.P.; CARVALHO, M.L.; COSTA, P.S.C. Utilização dos raios X na avaliação da qualidade fisiológica em sementes de melão (*Cucumis melo*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. **Anais...** Curitiba: ABRATES. 2001.

OLIVEIRA, L.M. de; CARVALHO, M.L.M. de; DAVIDE, A.C. Utilização do teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de canafístula (*Peltophorum dubim* (Spengel) Taubert. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, p. 116-120, 2003.

PEREIRA, A.C.R.L.; OLIVEIRA, J.V. de; GONDIM JUNIOR, M.G.C.; CÂMARA, C.A.G. da. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 717-724, 2008.

PINTO, T.L.F.; CICERO, S.M.; FORTI, V.A. Avaliação de danos por umidade, em semente de soja, utilizando a técnica da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, p. 31-38, 2007.

PINTO, T.L.F.; CICERO, S.M.C.; FRANÇA NETO, J.B.; FORTI, V.A. An assessment of mechanical and stink bugs damage in soybean seed using X-ray analysis test. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 37, p.110-120, 2009.

PUPIM, T.L.; NOVENBRE, A.D. da L.C.; CARVALHO, M.L.M. de; CICERO, S.M. Adequação do teste de raios X para avaliação da qualidade de sementes de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, p. 28-32, 2008.

QUINTINELA, E.D.; NEVES, B.P. das; QUINDERÉ, M.A.W.; ROBERTS, D.W. **Principales plagas del caupi em el Brasil**. Goiânia: Embrapa-CNPAF, 1991. 37 p.

SILVA, G.S. Nematóides. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. cap. 13, p. 487-497.

SILVA, P.H.S. da; CARNEIRO, J. da S.; QUINDERÉ, M.A.W. Pragas. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. cap. 10, p. 367-402.

SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. In: GORDON, A.G.; GOSLING, P.; WANG, B.S.P. (Ed.). **Tree and shrub seed handbook**. Zurich: ISTA. 1991. p.1-28.

SIMAK, M. X-Radiography in research and testing of forest tree seeds. **Report SUAS**. Umea-Sweden: Department of Silviculture, n. 3, p. 1-34, 1980.

SIMAK, M.; GUSTAFSSON, A. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. **Hereditas**, Landskroma, v. 39, p. 458-468, 1953.

SINGH, B.B.; EHLERS, J.D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F.R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C.A.; TARAWALI, A.S.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAWO, M. (Ed.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p. 22-40.

TANZUBIL, P.B. Control of some insect pests of cowpea (*Vigna unguiculata*) with neem (*Azadirachta indica*) in Northern Ghana. **Tropical Pest Management**, Basingstoke, v. 37, p. 216-217. 1991.

APÊNDICES



**SCIENCE AND
HORTICULTURE
FOR PEOPLE**

CERTIFICATE

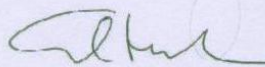
This is to certify that the contribution

“Quality of Minimally Processed Cowpea”

*Melo, R. A.; Jacomino, A. P.; Melo, P. C. T.; Trevisan,
M. J.; Cunha Junior, L. C.; Donega, M. A. | 502.277*

was presented as Poster Presentation at the 28th
International Horticultural Congress Lisbon, August
22 -27, 2010

Lisboa, August 27, 2010



*António Monteiro
Congress Co-President*



*Víctor Galán Saúco
Congress Co-President*

28th International Horticultural Congress
Lisbon Congress Center | August 22-27, 2010

Authors Melo, R. A.¹, Jacomino, A. P.¹, Melo, P. C. T.¹, Trevisan, M. J.¹, Cunha Júnior, L. C.¹, Donegá, M. A.¹

1 - Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP/ESALQ, Avenida Pádua Dias, N° 11, Caixa Postal 9, 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brazil

Keywords *Vigna unguiculata* (L) Walp, cold storage, respiration rate

Title Quality of minimally processed cowpea

Abstract : In Brazil, cowpea is marketed as dried seeds, in fresh pods and unripe shelled grains. However, today minimally processed green shelled grains are unavailable in the market. The aim of this study was to determine the best packing and storage temperature for minimal processing green shelled cowpea grains. Esperança cultivar was chosen to perform this study because it combines green cotyledons and green testa that are traits desired for minimal processing. The fresh pods were sanitized in a sodium hypochlorite solution at concentration of 100 ppm for 10 minutes. Afterward, the grains were shelled by hand from the pods. Then, 120 g grains were placed in polystyrene trays and covered with 3 different types of films (PVC, PEBD, PP). These films were trialed at modified atmosphere. However, only for PEBD partial vacuum was applied. Grains were stored at 1, 5 and 10° C for 9 days. Were evaluated gas composition inside the packages, mass loss, grain appearance, number of days for mold growth and odor after package opening. Treatments were arranged in a factorial design with 3 temperatures (1, 5 and 10° C) and 4 storage periods (0 days, 3 days, 6 days, and 9 days). The data were submitted to ANOVA considering the means of the plots and were compared by Tukey test at 5% of probability. Results revealed that there was no loss of grain mass. Additionally, was found that over the days the grains were getting yellowed and darkened around the hilum. It was also found that condensation did not occur in trays covered with PVC film. In contrast, in trays covered with PEBD and PP films occurred condensation. As regards appearance, the grains that were stored at 1° C and were placed in trays covered with PVC film kept its qualities for longer period.



IHC
Lisboa 2010

**SCIENCE AND
HORTICULTURE
FOR PEOPLE**

CERTIFICATE

This is to certify that the contribution

“Using X-Ray to Evaluate Damage Caused by
Storage Insects in Cowpea Seeds”

*Melo, R. A.; Forti, V. A.; Cicero, S. M.; Novembre, A. D.
L. C.; Melo, P. C. T. | Sm12.205*

was presented as Poster Presentation at the 28th
International Horticultural Congress Lisbon, August
22 -27, 2010

Lisboa, August 27, 2010

*António Monteiro
Congress Co-President*

*Victor Galán Saúco
Congress Co-President*

28th International Horticultural Congress
Lisbon Congress Center | August 22-27, 2010

Category Seed Technology

Authors Melo, R. A.¹, Forti, V. A.¹, Cicero, S. M.¹, Novembre, A. D. L. C.¹, Melo, P. C. T.¹
1 - Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" -
USP/ESALQ, Avenida Pádua Dias, N° 11, Caixa Postal 9, 13418-900, Piracicaba,
São Paulo, Brazil

Keywords *Vigna unguiculata* (L) Walp, radiography, image analysis

Title Using X-ray to evaluate damage caused by storage insects in cowpea seeds

Abstract : In Brazil, cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] is prominent in the Northeast Region, it is a typical culture of family farming. The damage caused by weevil in seeds of cowpea has been studied by several researchers. Through X-ray images, the internal structures of the seed can be visualized, identifying possible alterations and damage. Thus, this work aims to identify the damage caused by weevil (*Callosobruchus maculatus*) and its relationship concerning the physiological quality in seeds of cowpea through X-ray analysis. Five cultivars were used: IPA-206, IPA-207, Pajeú, Potingi and Esperança. The samples were subjected to X-ray and of the first count of germination tests in order to determine the cause and the effect damage caused by weevil and seed germination. The X-ray test has been evaluated considering the severity and location of damage. For severe damage, located in the embryonic axis and/or in the cotyledons, it resulted abnormal seedlings and dead seeds. Therefore, the X-ray test is effective in assessing the damage caused by the cowpea seeds weevil to relate the damage to losses to germination.

MELO RA; FORTI VA; CICERO SM; NOVEMBRE ADLC; MELO PCT. 2010. Use of X-ray to evaluate damage caused by weevils in cowpea seeds. *Horticultura Brasileira* 28: 472-476.

Use of X-ray to evaluate damage caused by weevils in cowpea seeds

Roberto de A Melo; Victor Augusto Forti; Silvio M Cicero; Ana DLC Novembre; Paulo César T de Melo
USP-ESALQ; Crop Science Department, C. Postal 09, 13418-900 Piracicaba-SP: ramelo@esalq.usp.br; vaforti@esalq.usp.br; smcicero@esalq.usp.br; adlcno@esalq.usp.br; pctmelo@esalq.usp.br

ABSTRACT

In Brazil, the cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], is important in the Northeast Region, where it is typically grown on family farms. The importance of the damage caused to the seed quality of this species by stored pests has been described in various studies. Using X-ray, it is possible to see the internal seed structures and identify possible changes and damage. The objective of this study was to identify the damage caused by the weevil [*Callosobruchus maculatus* (Fabr.)] by analyzing X-ray and evaluate its relationship to the physiological quality of the cowpea seed. Three cultivars were used (IPA-206, BRS-Paju and BRS-Potengi) and two lines (L 281.005 and L ESP 10). The samples were exposed to X-ray and germination test to determine the cause-effect relationship between weevil damage and seed germination. X-ray images were evaluated to determine damage severity and location in the seed. Seed damage classified as severe, located in the embryonic axis or in the cotyledons, resulted in abnormal seedlings or dead seeds. The X-ray test, therefore, is efficient for evaluating weevil damage in cowpea seeds and the damage caused to be associated with any resulting adverse germination effects.

Keywords: *Vigna unguiculata*, *Callosobruchus maculatus*, image analysis, internal damage.

RESUMO

Utilização de raios X na avaliação de danos causados por caruncho em sementes de feijão-caupi

No Brasil, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], tem destaque na Região Nordeste, sendo uma cultura típica da agricultura familiar. A importância dos danos causados por pragas de armazenamento em sementes da referida espécie, em relação à sua qualidade, tem sido evidenciada em vários trabalhos. Através de imagens de raios X é possível visualizar as estruturas internas da semente, identificando possíveis alterações e danificações. Dessa forma, esse trabalho teve o objetivo de identificar os danos causados por caruncho (*Callosobruchus maculatus*) e sua relação com a qualidade fisiológica das sementes de feijão-caupi, por intermédio da análise de raios X. Foram utilizadas três cultivares (IPA-206, BRS-Paju e BRS-Potengi) e duas linhagens (L 281.005 e L ESP 10). As amostras foram submetidas ao teste de raios X e ao teste de germinação, a fim de determinar a relação de causa e efeito entre os danos provocados pelo caruncho e a germinação das sementes. Nas avaliações das imagens de raios X foi considerada a severidade e a localização dos danos na semente. Para os danos classificados como severos, localizados no eixo embrionário e, ou nos cotilédones, as sementes originaram plântulas anormais ou as sementes estavam mortas. Portanto, o teste de raios X é eficiente para a avaliação de danos causados por caruncho em sementes de feijão-caupi, permitindo relacionar os eventuais danos com os prejuízos causados à germinação.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, *Callosobruchus maculatus*, análise de imagens, danos internos.

(Recebido para publicação em 18 de novembro de 2009; aceito em 15 de outubro de 2010)
(Received on November 18, 2009; accepted on October 15, 2010)

The cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] is one of the most adapted, versatile and nutritious legumes among the cultivated species. It is grown on 11 million hectares in tropical and subtropical regions of Africa, Asia and the Americas (Singh *et al.*, 2002). In Brazil, the cowpea is grown in the Northeast Region and is a typical crop of family agriculture (Freire Filho *et al.*, 2005), being the principal subsistence crop in the semi-arid region (Silva, 2005).

The importance of the damage caused by the weevil, *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera:

Bruchidae), to the quality of cowpea seeds has been described by various researchers (Tanzubil, 1991; Quintinela *et al.*, 1991; Gallo *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2008). This damage is a consequence of the colonization of the interior of the seeds by the larvae, and causes weight loss, commercial devaluation, a reduction in nutritive value and product hygiene by the presence of feces, eggs and insects, and also reduced seed germination (Gallo *et al.*, 2002).

This weevil species is considered the most important pest of cowpea during storage and can cause losses

of up to 60% (Tanzubil, 1991). The adult beetle is about 3 mm long, with brownish marks on the elytra, which form a "X" at rest and it survives for around 5 to 8 days. The female lays an average of 80 eggs on the seed surfaces (Quintinela *et al.*, 1991) and emerging larvae penetrate the seeds, feeding on the internal contents. Inside the seeds, the larvae turn into pupae and, after emergence, the adults break through the tissues and start the biological cycle once more (Silva *et al.*, 2005).

The low energy X-ray test for determining the physical quality of seeds is recommended by ISTA (1996).

Part of thesis of the first author submitted to USP/ESALQ.

This technique was first introduced into Sweden in the 1950s, to evaluate the seed quality of forest species (Simak & Gustafsson, 1953). According to Bino *et al.* (1993), when the X-ray passes through a seed, the radiation is absorbed to various degrees, depending on seed thickness, density, composition and the radiation wave length, thus creating a permanent image on radiographic film. It is a quick, non-destructive method for detecting well-formed and badly-formed seeds with mechanical damage and insect attack (ISTA, 1996) producing a permanent image on the radiographic film.

With this X-ray image, it is possible to observe the internal seed structures, identifying possible changes, especially in the embryonic axis (ISTA, 1995). According to Cicero & Banzatto Junior (2003), the use of X-ray image analysis to evaluate seed quality is promising; it constitutes a precise method where the internal seed structures can be examined from enlarged images to show details of the damaged area, its location and extent. Since this method is non-destructive, the seed can be submitted to physiological tests and a cause and effect relationship can be established.

The technique of image analysis with X-ray has been used to evaluate the physiological potential of *Cucumis melo* seeds (Kamra, 1966; Obando-Flor, 2003), *Pinus sylvestris* L. (Simak, 1991), *Solanum lycopersicum* (Liu *et al.*, 1993), *Peltophorum dubium* (Oliveira *et al.*, 2003) and *Cecropia pachystachya* (Pupim *et al.*, 2008). This technique also detects damage from humidity (Pinto *et al.*, 2007) and mechanical damage to soybean seeds (Obando-Flor, 2003) and corn (Cicero *et al.*, 1998) and also damage by stinkbugs in common bean seeds (Forti *et al.*, 2008).

Both the physical damage caused by insects, and also other types of damage, can be quickly identified by X-ray with promising results (Simak, 1980).

The objective of this study was to identify the damage caused by weevils and its relationship with the physiological quality of cowpea seeds, by the X-ray analysis technique.

MATERIAL AND METHODS

The research was done at the Seed Analysis Laboratory of the Crop Science Department, of São Paulo University in Piracicaba, São Paulo State, on the March-June period of 2009.

The seeds from three cowpea cultivars were used (IPA-206 (IPA), BRS-Pajeu and BRS-Potengi (Embrapa)) and two lines (L ESP 10 (UFRPE/IPA) and L 281.005 (IPA)). The seeds were obtained from the institutions who owned the genotypes and they had been kept in cold and dry storage for a year.

To detect internal damage, the seeds were exposed to X-ray, using four replications of 50 randomly chosen seeds for each of the three cultivars and two lines, respectively, totaling 200 X-rayed seeds per genotype. The seeds were placed in individual wells in a 100-well acrylic plate, kept in place with a transparent adhesive tape and identified according to their position on the plate. The X-ray was obtained by placing the acrylic plate with the seeds directly on an X-ray film (Kodak MIN-R EV 2000), measuring 18 x 24 cm, at a distance of 57 cm from the X-ray emission source (FAXITRON X-Ray, model MX-20), using an intensity of 25 kV and a 40-second exposure.

The films were developed in a processor (Hope X-Ray, model 319 Micromax) and then the X-ray images were scanned (Umax, model Power Look 1100) and transferred to a computer. Image analyses permitted the enlargement and evaluation of each X-rayed seed.

The germination test was done after the X-ray procedure, according to the Rules for Seed Analysis (RSA) (Brasil, 2009). For the germination test, the seeds (in groups of 10) were distributed equidistantly on the upper third of the substrate over a paper towel "Germitest". The paper sheets were moistened with a quantity of water equivalent to 2.5 times their weight. The paper rolls were then placed in a germinator and kept at 25°C. Five days after starting the test, the seedlings (normal and abnormal) and the dead seeds were photographed with a digital camera (Nikon, model D1) attached to a computer. Later, the images of the obtained seedlings (normal and abnormal) and dead seeds

were compared, side-by-side, with the X-ray images so that any weevil damage could be associated with any changes in seed germination.

Damage was classified according to criteria described by Cicero *et al.*, (1998) with some modifications. Each seed was given two rankings, the first referring to damage to the embryonic axis and the second, to any cotyledon damage. When there was no damage to the embryonic axis or to the cotyledons, that is, no damage was observed, a ranking of 1.1 was given to the X-ray image of the seed. Light damage is that observed in both the embryonic axis and the cotyledons, but which does not affect normal seedling formation; thus, a 2.2 was given to cases where the damage was classified as not being severe, either for the embryonic axis or for the cotyledons. On the other hand, damage was classified as severe when it was greater on the embryonic axis or cotyledons and interfered with seed germination, stopping normal seedling formation; damage to the cotyledons, next to the embryonic axis region, was also generally considered as severe, since it affects nutrient translocation to the embryonic axis during germination. Therefore, this last situation was given a ranking of 3.3, signifying severe damage to the embryonic axis and cotyledons.

The experimental design was completely random, with 5 treatments (three cultivars and two lines) and 4 replications of 50 seeds each. Analysis of variance was done using the F test and the Tukey test to compare means at a 5% probability level.

RESULTS AND DISCUSSION

The simultaneous examination of the internal seed images (X-ray), seedlings and dead seeds after the germination test permitted a diagnosis for each case, resulting in the establishment of a cause and an effect, as was done in common beans by Mondo *et al.* (2009).

Table 1 shows mean values in percentages for damage intensity detected by X-ray, caused by weevils to the embryonic axis region and, or the cotyledons, in the three cultivars and two lines analyzed.

Table 1. Mean values (%) for seeds with different damage rankings given for weevil damage to the embryonic axis and cotyledons in the 5 lots evaluated by X-ray (valores médios (%) de sementes com diferentes notas atribuídas aos danos causados pelo caruncho, no eixo embrionário e nos cotilédones, nos cinco lotes avaliados por meio de raios X). Piracicaba, USP/ESALQ, 2009

Damage site	Genotypes	Damage ranking ¹		
		1	2	3
Embryonic axis	L ESP 10	100.0 a ²	0.0 b	0.0 b
	IPA-206	63.5 b	10.5 a	26.0 a
	L 281.005	95.0 a	0.5 b	4.5 b
	BRS-Pajeu	98.5 a	0.0 b	1.5 b
	BRS-Potengi	94.5 a	1.0 b	4.5 b
CV (%)		4.82	39.81	40.48
Cotyledons	L ESP 10	100.0 a	0.0 c	0.0 c
	IPA-206	21.5 d	29.5 a	49.0 a
	L 281.005	84.0 c	9.5 b	6.5 b
	BRS-Pajeu	95.5 b	3.0 bc	1.5 c
	BRS-Potengi	88.8 bc	4.5 bc	7.0 b
CV (%)		5.71	46.20	13.38

¹Damage rankings 1= Undamaged; 2= Light damage; 3= Severe damage; ²In the column, for each site of damage, means followed by the same letter do not differ among themselves based on the Tukey test, at the 5% probability level (valores de dano 1= não observado; 2= dano não severo; 3= dano severo. ³Na coluna, para cada valor de dano, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade).

Table 2. Values (%) for normal seedlings (NS), abnormal seedlings (AS) and dead seeds (DS), obtained in the germination test and respective rankings given to X-ray images for weevil damage (valores (%) de plântulas normais (NS), de plântulas anormais (AS) e de sementes mortas (DS) obtidos no teste de germinação e respectivas notas atribuídas às imagens de raios X, para danos por caruncho). Piracicaba, USP/ESALQ, 2009

Genotypes		Damage ranking*								
		1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3
L ESP 10	NS	95.5	0	0	0	0	0	0	0	0
	AS	4.5	0	0	0	0	0	0	0	0
	DS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IPA-206	NS	8.0	12.0	5.5	0.5	1.5	2.0	0.5	0	0.5
	AS	11.5	10.5	12.5	0	2.5	4.0	0	2.5	18.5
	DS	1.0	0.5	2.0	0	0	0	0	0	4.0
L 281.005	NS	71.5	8.5	1.5	0	0.5	0	0	0	2.0
	AS	11.5	0	0.5	0	0	0	0	0	2.0
	DS	1.0	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5
BRS-Pajeu	NS	94.0	3.0	0	0	0	0	0	0	0.5
	AS	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0.5
	DS	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5
BRS-Potengi	NS	78.0	2.5	2.5	0	0.5	0	0	0.5	2.0
	AS	8.0	1.0	0	0	0	0.5	0	0	1.5
	DS	2.5	0	0	0	0	0	0	0	0.5

* 1= undamaged, 2= light damage, 3= severe damage. The first algorithm of the ranking refers to the embryonic axis and the second algorithm to the cotyledons (1= danos não observados, 2= danos não severos, 3= danos severos. O primeiro algoritmo da nota refere-se ao eixo embrionário e o segundo aos cotilédones).

Seeds of cultivar IPA-206 showed more damage to the embryonic axis and cotyledons, which was ranked as severe (3.3), compared to the other genotypes. However, the occurrence of light damage was less for the BRS-Pajeu and BRS-Potengi cultivars and the L ESP 10 and L 281.005 lines, with these four genotypes showing higher mean number of seeds with no damage either to the embryonic axis or to the cotyledons.

The percentages of normal and abnormal seedlings and dead seeds observed in the germination test, for seeds which have weevil damage and were evaluated by X-ray, are shown in Table 2. The results demonstrate that those seeds which suffered no damage to the embryonic axis or cotyledons (Figure 1A) mostly produced normal seedlings (Figure 1B) after the evaluation of germination on the day stipulated by the RSA for the first count. This can be seen for the cultivars BRS-Pajeu and BRS-Potengi and the lines L ESP 10 and L 281.005 (Table 2). However, some seeds where no damage was observed (ranking 1.1) produced abnormal seedlings; according to Burg *et al.* (1994), this type of problem may be due to infection by microorganisms, physiological deterioration and, or tissue death.

For damage ranked as severe, both to the cotyledons and embryonic axis, for seeds from the five genotypes, there was a direct relationship between damage and the number of abnormal seedlings and dead seeds, considering the first count of the germination test. The number of dead seeds in the five genotypes was low, with the highest percentage (7.5%) for IPA-206.

Seeds with weevil damage are shown in Figures 1C, 2A, 2C and 2E. Figure 1C, shows a seed with severe damage only to the cotyledons (ranking 1.3), resulting in an abnormal seedling (Figure 1D). According to Cicero *et al.* (1998), damages to cotyledons, which restrict nutrient translocation to the embryonic axis, or which directly affect the embryonic axis, adversely affect seed germination.

Figure 2A shows a seed with light damage to the embryonic axis and

Use of X-ray to evaluate damage caused by weevils in cowpea seeds

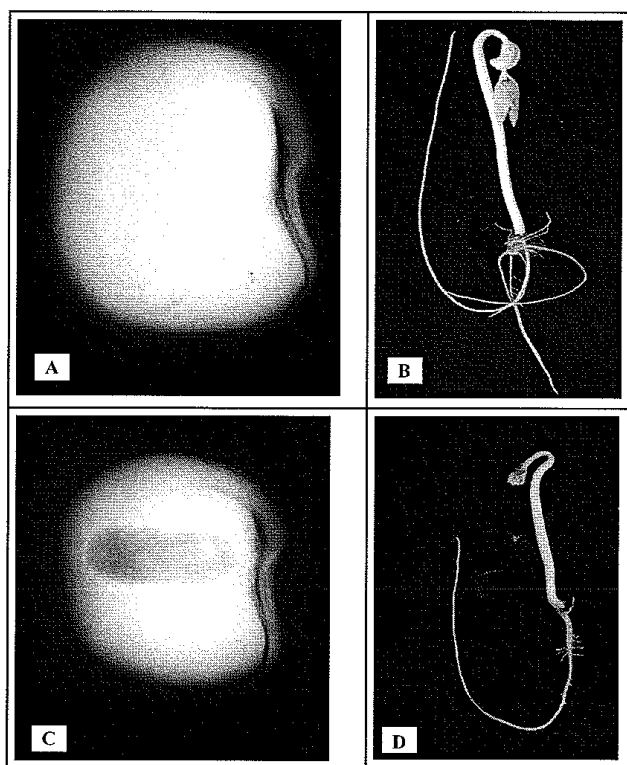


Figure 1. Image of a seed of the L ESP 10 line obtained from X-ray, undamaged by weevils (A), ranking 1.1, resulting in a normal seedling (B). Image of the seed of cultivar IPA-206 obtained from X-ray, with weevil damage (C), with ranking 1.3, resulting in an abnormal seedling (D) (imagem de semente da linhagem L ESP 10 obtida por meio do teste de raios X, sem dano por caruncho (A), nota 1.1, originando uma plântula normal (B). Imagem de semente da cultivar IPA-206 obtida por meio do teste de raios X, com dano por caruncho (C), nota 1.3, originando uma plântula anormal (D)). Piracicaba, USP/ESALQ, 2009.

severe damage to the cotyledonal region, ranked as 2.3 and gave rise to an abnormal seedling (Figure 2B).

Figure 2C shows a seed classified as 3.2, which has severe damage to the embryonic region and light damage to the cotyledonal region, resulting in an abnormal seedling (Figure 2D).

Figure 2E has a seed with severe damage to the cotyledons and the embryonic axis, classified as 3.3, which produced a dead seed on the germination test (Figure 2F). Based on an analysis of the seeds of the three cultivars and two lines, it was seen that severe damage to the embryonic axis and cotyledons resulted in dead seeds or abnormal

seedlings. The same result was also verified in common bean seeds (Forti *et al.*, 2008) and in soybean seeds (Pinto *et al.*, 2009), where that stinkbug damage ranked as severe, that is, occurring to the embryonic axis and, or the cotyledons, resulted in abnormal seedlings or dead seeds.

The results show, therefore, that X-ray are efficient for evaluating weevil damage in cowpea seeds, and permit this damage to be associated with harmful effects caused at germination.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Graduate Program in Crop

Science of USP/ESALQ, where the research project was done; The institutions which supported this research project: CAPES, CNPq, UFRPE, IPA, Embrapa and Hortivale Ltda.

REFERENCES

- BINO RJ; AARTSE JW; BURG WJ. 1993. Nondestructive X-ray of *Arabidopsis* embryo mutants. *Seed Science Research* 3: 167-170.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária-Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.
- BURG WJ; AARTSE JW; ZWOL RA; JALINK H; BINO RJ. 1994. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. *Journal of American Society for Horticultural Science* 119: 258-263.
- CICERO SM; HEIJDEN GWAM; BURG WJ; BINO RJ. 1998. Evaluation of mechanical damage in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. *Seed Science and Technology* 26: 603-612.
- CICERO SM; BANZATTO JUNIOR HL. 2003. Avaliação do relacionamento entre danos mecânicos e vigor, em sementes de milho, por meio da análise de imagens. *Revista Brasileira de Sementes* 25: 29-36.
- FORTI VA; CICERO SM; PINTO TLF. 2008. Análise de imagens na avaliação de danos mecânicos e causados por percevejo em sementes de feijão. *Revista Brasileira de Sementes* 30: 121-130.
- FREIRE FILHO FR, RIBEIRO VQ, BARRETO PD, SANTOS AA. 2005. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO FR; LIMA JAA; RIBEIRO VQ (eds). *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 29-75.
- GALLO D; NAKANO O; SILVEIRA NETO S; CARVALHO RPL; BATISTA GC; BERTI FILHO E; PARRA JRP; ZUCCHIRI ALVES SB; VENDRAMIM JD; MARCHINI LC; LOPES JRS; OMOTO C. 2002. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ. 920p.
- ISTA. International Seed Testing Association. International rules for testing seed. 1995. *Seed Science and Technology* 13: 300-520.
- ISTA. International Rules for Seed Testing. 1996. *Seed Science and Technology* 24: 336p.
- KAMRASK. 1966. Determination of germinability of melon with X-ray contrast method. *Proceedings of the International Seed Testing Association* 31: 719-729.
- LIU Y; BURG WJ; AARTSE JW; ZWOL RA; JALINK H; BINO RJ. 1993. X-ray studies on changes in embryo and endosperm morphology during priming and inhibition of tomato seeds. *Seed Science Research* 3: 171-178.
- MONDO VHV; GOMES JUNIOR FG; PUPIM TL; CICERO SM. 2009. Avaliação de danos mecânicos em sementes de feijão por meio da análise de imagens. *Revista Brasileira de Sementes* 31: 27-35.
- OBANDO-FLOR EP. 2003. Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da

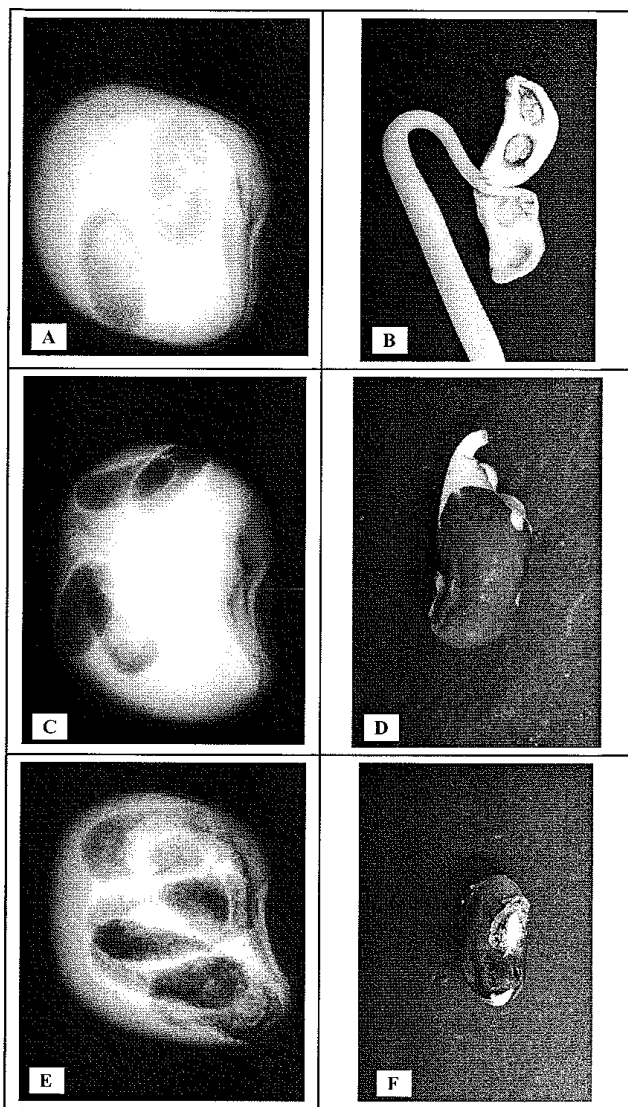


Figure 2. Image of a seed of cultivar IPA-206 obtained from X-ray, with weevil damage (A), with ranking 2.3, resulting in an abnormal seedling (B). Image of a seed of cultivar BRS-Pajeu obtained from X-ray, with weevil damage (C), with ranking 3.2, resulting in an abnormal seedling (D). Image of the seed of cultivar IPA-206 obtained from X-ray, with severe weevil damage (E), with ranking 3.3, resulting in a dead seed (F) (imagem de semente da cultivar IPA-206 obtida por meio do teste de raios X, com dano por caruncho (A), nota 2.3, originando uma plântula anormal (B). Imagem de semente da cultivar BRS-Pajeu obtida por meio do teste de raios X, com dano por caruncho (C), nota 3.2, originando uma plântula anormal (D). Imagem de semente da cultivar IPA-206 obtida por meio do teste de raios X, com dano severo por caruncho (E), nota 3.3, originando semente morta (F)). Piracicaba, USP/ESALQ, 2009.

análise de imagens. Piracicaba: USP-ESALQ, 72p (Tese doutorado).

OLIVEIRA LM; CARVALHO MLM; DAVIDE AC. 2003. Utilização do teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de canafistula (*Peltophorum dubium* (Spengel) Taubert). *Revista Brasileira de Sementes* 25: 116-120.

PEREIRA ACRL; OLIVEIRA JV; GONDIM JUNIOR MGC; CÂMARA CAG. 2008. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Ciência e Agrotecnologia* 32: 717-724.

PINTO TLF; CICERO SM; FORTI VA. 2007. Avaliação de danos por umidade, em semente de soja, utilizando a técnica da análise de imagens. *Revista Brasileira de Sementes* 29: 31-38.

PINTO TLF; CICERO SMC; FRANÇA NETO JB; FORTI VA. 2009. An assessment of mechanical and sink bugs damage in soybean seed using X-ray analysis test. *Seed Science and Technology* 37: 110-120.

PUPIM TL; NOVENBRE ADLC; CARVALHO MLM; CICERO SM. 2008. Adequação do teste de raios X para avaliação da qualidade de sementes de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec.). *Revista Brasileira de Sementes* 30: 28-32.

QUINTINELA ED; NEVES BP; QUINDERÉ MAW; ROBERTS DW. 1991. *Principales plagas del caupi en el Brasil*. Goiânia: Embrapa-CNPAP, 37 p.

SILVA GS. 2005. Nematóides. In: FREIRE FILHO FR; LIMA JAA; RIBEIRO VQ (eds). *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 487-497.

SILVA PHS; CARNEIRO JS; QUINDERÉ MAW. 2005. Pragas. In: FREIRE FILHO FR; LIMA JAA; RIBEIRO VQ (eds). *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 367-402.

SIMAK M. 1980. X-Radiography in research and testing of forest tree seeds. Report SUAS-Department of Silviculture, Umea-Sweden, n. 3, p. 1-34.

SIMAK M. 1991. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. In: GORDON AG; GOSLING P; WANG BSP (eds). *Tree and shrub seed handbook* Zurich: ISTA, p.1-28.

SIMAK M; GUSTAFSSON A. 1953. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. *Hereditas* 39: 458-468.

SINGH BB; EHLERS JD; SHARMA B; FREIRE FILHO FR. 2002. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN CA; TARAWALI AS; SINGH BB; KORMAWA PM; TAWO M. (eds). *Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production*. Ibadan: IITA, p. 22-40.

TANZUBIL PB. 1991. Control of some insect pests of cowpea (*Vigna unguiculata*) with neem (*Azadirachta indica*) in Northern Ghana. *Tropical Pest Management* 37: 216-217.