Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Diversidade genética, domesticação e plasticidade fenotípica de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)

Josilane Souza da Penha

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2018

Josilane Souza da Penha
Bacharel em Ciências Biológicas

Diversidade genética, domesticação e plasticidade fenotípica de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **GIANCARLO CONDE XAVIER OLIVEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Penha, Josilane Souza da

Diversidade genética, domesticação e plasticidade fenotípica de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) / Josilane Souza da Penha. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

85 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Phaseolus lunatus* L. 2. Índice de plasticidade fenotípica 3. cpSSR 4. ncSSR 5. Diversidade genética 6. Domesticação I. Título

A Deus, que pela sua infinita bondade, me guiou, protegeu e me deu forças para concluir esta etapa da minha vida

OFEREÇO

A minha família, em especial aos meus pais João e Edinir e irmãos, pelo apoio e incentivo na busca desse sonho. A meu noivo José Ribamar, que esteve presente em todos os momentos, me ajudando sempre que precisei.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, por meio da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e do Departamento de Genética, por uma excelente estrutura de ensino e pesquisa que fizeram parte e foram de suma importância para a minha formação acadêmica e pela oportunidade da realização do meu doutorado.

Aos professores do departamento de Genética, em especial ao Programa de Pós-graduação em “Genética e Melhoramento de Plantas”.

Ao professor Giancarlo Conde Xavier Oliveira, pela orientação, paciência e todo conhecimento compartilhado durante o doutorado.

Às professoras Ângela Celis de Almeida Lopes e Regina Lucia Ferreira Gomes, pela co-orientação, pela ajuda e incentivo desprendido, desde a graduação até a finalização do doutorado.

Aos professores José Baldin Pinheiro e Maria Imaculada Zucchi, pelo apoio e ensinamentos durante minha pesquisa junto ao laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento.

À CAPES e ao CNPQ pela concessão de bolsa de estudos e pelo financiamento das pesquisas indispensáveis à realização deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Evolução – Hendrie, Gláucia, Débora, Vivian, Jayça e Igor, pela agradável convivência.

Aos amigos da ESALQ, especialmente a Diane, Massaine, Éllida, Marcela, Camila e Igor, pelos momentos de convivência, companheirismo e amizade.

Aos Grupos de Oração Universitária ”Água Viva” e “Sopro da Vida” e GPP, lugar de acolhimento, amor e fé. Onde pude está mais perto de Deus, dentro da universidade. Agradeço imensamente a todos os ‘luquinhas’ que conheci e convivi, por cada abraço e palavra, por todos os momentos de alegria e de oração.

Aos meus amigos do Grupo de Recursos Genéticos e Melhoramento de Feijão-fava da UFPI, em especial a Verônica e Rafael.

A minha família, que sempre me incentivou a realizar meus sonhos e estiveram comigo em todos os momentos.

Ao meu noivo, José Ribamar, que esteve ao meu lado, ouvindo, falando e apoiando em todos os momentos, obrigada por todo amor, paciência e dedicação.

A Deus Pai, Deus Filho e Deus Espírito Santo, fonte de todo amor e misericórdia infinita.

SUMÁRIO

RESUMO 6
ABSTRACT 7
LISTA DE FIGURAS 8
LISTA DE TABELAS 9
1. INTRODUÇÃO 11
1.1. OBJETIVO GERAL 12
1.1.1. Objetivos específicos 13
2. REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1. ASPECTOS GERAIS DO FEIJÃO-FAVA 15
2.2. ORIGEM E DOMESTICAÇÃO DA ESPÉCIE 17
2.3. CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO DA ESPÉCIE 17
2.4. MARCADORES MOLECULARES DE MICROSSATÉLITES NUCLEARES 20
2.5. MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES CLOROPLASTIDIAIS 22
2.6. PLASTICIDADE FENOTÍPICA 24
3. MATERIAL E MÉTODOS 29
3.1. PLASTICIDADE FENOTÍPICA 29
3.1.1. Material vegetal 29
3.1.2. Análise Estatística 30
3.2. MARCADORES MOLECULARES DE MICROSSATÉLITES 30
3.2.1. Material vegetal 30
3.2.2. Extração e quantificação de DNA 32
3.2.3. Desenvolvimento de biblioteca genômica com microssatélites nucleares (ncSSR) 33
3.2.4. Identificação de motivos microssatélites (ncSSR) 35
3.2.5. Amplificação e detecção de polimorfismo de marcadores ncSSR e cpSSR 36
3.2.6. Análises genéticas 36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
4.1. PLASTICIDADE FENOTÍPICA EM FEIJÃO-FAVA 39
4.1.1. Número de dias para o florescimento (NDF) 39
4.1.2. Número de dias para maturação das vagens (NDM) 42
4.1.3. Número de vagens por planta (NVP) 43
4.1.4. Número de sementes por planta (NSP) 45
4.1.5. Comprimento da vagem (CV) 47
4.1.6. Largura da vagem (LV) 49
4.1.7. Número de lóculos por vagem (NLV) 50
4.1.8. Número de sementes por vagem (NSV) 52
4.1.9. Peso de 100 sementes (P100S) 54
4.1.10. Índice de Plasticidade Fenotípica (IPF) 56
4.1.11. Correlação entre caracteres 58
4.2. DIVERSIDADE DE MARCADORES CLOROPLASTIDIAIS 61
4.3. DIVERSIDADE GENÉTICA DE FEIJÃO-FAVA POR MARCADORES MICROSSATÉLITES NUCLEARES 66
5. CONCLUSÕES 73
REFERÊNCIAS 75

RESUMO

Diversidade genética, domesticação e plasticidade fenotípica de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma importante espécie da família Fabaceae, que possui ampla distribuição mundial. A origem e a domesticação da espécie são apontadas no continente americano, no entanto, os locais exatos ainda não estão totalmente esclarecidos, devido à ampla distribuição e a escassez de populações silvestres. Além disso, há perda de germoplasma de feijão-fava em muitas áreas de distribuição natural, o que mostra a importância dos Bancos de Germoplasma, da caracterização da diversidade e dos estudos de domesticação da espécie. O estudo da diversidade genética a nível molecular vem sendo bastante realizado, os marcadores moleculares de microssatélites (SSR), se destacam. O feijão-fava conta com poucos estudos usando como ferramentas os SSRs, não possuindo locos específicos para a espécie, o que limita o conhecimento sobre sua genética. Assim, objetivou-se desenvolver locos microssatélites nucleares (ncSSR) específicos a espécie para estudar a diversidade genética, bem como, o processo de domesticação entre acessos silvestres e domesticados em diferentes países (Brasil, México, Peru, Colômbia e Argentina), por marcadores SSR cloroplastidiais (cpSSR), além de estudar a plasticidade fenotípica de acessos brasileiros. Estimou-se a plasticidade fenotípica de 12 acessos do Brasil em quatro ambientes com diferentes adubos (1 – controle sem adubação; 2 – adubação mineral NPK; 3 – adubação orgânica de esterco bovino; 4 – adubação mineral e orgânica). O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições. Os caracteres avaliados foram: Número de Dias para Floração (NDF), Número de Dias para Maturação (NDM), Número de Vagens por Planta (NVP), Número de Sementes por Planta (NSP), Comprimento de vagem (CV), Largura da Vagem (LV), Número de Lóculos por Vagem (NLV), e Peso de Cem Sementes (P100S). Realizou-se a análise de variância e estimou-se o índice de Plasticidade Fenotípica (IPF) e a Correlação de Pearson entre os caracteres. Para a determinação da diversidade e estrutura genética foram usados marcadores microssatélites, sendo cinco locos cloroplastidiais (cpSSR) e três locos nucleares (ncSSR), em 44 acessos de feijão-fava. Foi possível detectar-se plasticidade fenotípica nos acessos de feijão-fava. Todos os caracteres, com exceção de NDF e NSV, apresentaram interação genótipo × ambiente significativa para os quatro ambientes avaliados. NVP e NSP tiveram os maiores IPF (0,82) e NDF o menor (0,06), sendo assim o mais e o menos plástico, respectivamente, nos quatro ambientes. A maior correlação positiva foi observada entre NVP x NSP, de modo que seus valores variam na mesma direção. NVP x P100S apresentaram a maior correlação negativa. A diversidade genética observada com marcadores microssatélites nucleares e cloroplastidiais mostrou-se maior em acessos do México (cpSSR = 0,163; ncSSR = 0,15), seguido do Brasil (cpSSR = 0,111; ncSSR = 0,00). Em nível de variedades, os acessos silvestres tiveram menor diversidade em cpSSR (0,16) e maior em ncSSR (0,14) do que os domesticados (cpSSR = 0,119; ncSSR = 0,02). Altos níveis de variação e diferenciação genética foram observadas entre países, com 94% da variação e F_{st} = 0,874 e entre variedades, com 87% e F_{st} = 0,944 em cpSSR. Já em ncSSR, variação e diferenciação maiores ocorreram entre acessos (61%; F_{st} = 0,771) e dentro de variedades (80%; F_{st} = 0,778). Essas diferenças podem estar relacionadas a diferenças no padrão de herança dos marcadores. Os SSR cloroplastidiais são mais conservados e tem herança maternal. Assim, os acessos de mesmo país conservam os mesmos haplótipos, apresentando baixa diferenciação entre eles. O contrário ocorre com os SSR nucleares, que possuem herança biparental e maior porcentagem de mutação. Apresentando assim, maior diferenciação entre os acessos, que é favorecida pelo sistema reprodutivo predominantemente autógamo. Os acessos domesticados brasileiros estão mais próximos geneticamente dos acessos silvestres mexicanos, podendo ter sido resultantes da domesticação de indivíduos silvestres do México.

Palavras-chave: *Phaseolus lunatus* L.; Índice de plasticidade fenotípica; cpSSR; ncSSR; Diversidade genética; Domesticação

ABSTRACT

Genetic diversity, domestication and phenotypic plasticity of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.)

Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an important species of the Fabaceae family, which is distributed worldwide. The origin and domestication of the species is not fully understood due to the wide distribution and lack of wild accessions, as well as the loss of germplasm in many areas of its natural distribution, which indicates the importance of germplasm banks and the characterization of diversity and of domestication studies. The study of genetic diversity at the molecular level has been quite accomplished, the molecular markers od microsatellites (SSR), stand out. The lima bean has few studies using as tools the SSRs, not having specific loci for the species, which limits the knowledge about its genetics. Thus, the objective was to develop specific nuclear microsatellite loci (ncSSR) to study the genetic diversity, as well as the domestication process involving wild and domesticated accessions in different countries (Brazil, Mexico, Peru, Colombia and Argentina), by chloroplastids SSR markers (cpSSR), besides to study the phenotypic plasticity of Brazilian accessions. The phenotypic plasticity of 12 accessions from Brazil was estimated in four environments with different fertilizers (1 - control without fertilization, 2 - mineral fertilization with NPK, 3 - organic fertilization with bovine manure, 4 – mineral [NPK] and organic fertilization [manure]). The design was completely randomized with three replicates. The evaluated traits were: Number of Days for Flowering (NDF), Number of Days for Maturation (NDM), Number of Pods per Plant (NVP), Number of Seeds per Plant (NSP), Pod Length (CV), Pod Width (LV), Number of Locules per Pod (NLV), and Weight of One Hundred Seeds (P100S). The analysis of variance was performed, the index of Phenotypic Plasticity (IPF) and the Pearson Correlation between the characters were estimated. Microsatellite markers were used for the determination of genetic diversity and structure, with five chloroplastid (cpSSR) and three nuclear loci (ncSSR) in 44 accessions of lima bean. There was phenotypic plasticity in the accessions of lima bean. All characters except for NDF and NSV presentated genotype x environment interaction significant for the four environments evaluated. NVP and NSP had the highest (0.82) and NDF the lowest (0.06) IPF, thus being the most and the least plastic, respectively, in the four environments. The highest positive correlation was observed between NVP x NSP, so that their values vary in the same direction. NVP and P100S had the highest negative correlation. The genetic diversity observed with nuclear and chloroplast microsatellite markers was greater in accessions from Mexico (cpSSR = 0.163; ncSSR = 0.15), followed by Brazil (cpSSR = 0.111; ncSSR = 0.00). At the variety level, wild accessions had lower diversity with cpSSR (0.16) and higher diversity with ncSSR (0.14) than domestic (cpSSR = 0.119; ncSSR = 0.02). High levels of variation and genetic differentiation were observed among countries, with 94% of the variation and F_{st} = 0.874, and between varieties, with 87% and F_{st} = 0.944 with cpSSR. With ncSSR, greater variation and differentiation occurred between accessions (61%, Fst = 0.771) and within varieties (80%, Fst = 0.788). These differences may be related to differences in the inheritance pattern of the markers. Chloroplast SSRs are more conserved and have maternal inheritance. Thus, accessions from the same country retain the same haplotypes, presenting low differentiation between them. The opposite occurs with nuclear SSR, which has a biparental inheritance and a higher percentage of mutation. Thus, a greater differentiation exists between the accessions, which is favored by the predominantly autogamous reproductive system. Brazilian domesticated accessions are genetically closest to the Mexican wild accessions, and may have resulted from the domestication of wild individuals from Mexico.

Keywords: *Phaseolus lunatus* L.; Phenotypic plasticity index; cpSSR; ncSSR; Genetic diversity; Domestication

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Padrões de normas de reação de genótipos em ambientes diferentes 25

Figura 2. Normas de reação dos caracteres: (A) Número De Dias para o Florescimento (NDF); (B) Número de Dias para Maturação das Vagens (NDM); (C) Número de Vagens por Planta (NVP); (D) Número de Sementes por Planta (NSP); (E) Comprimento da Vagem (CV); (F) Largura da Vagem (LV); (G) Número de Lóculos por Vagem (NLV); (H) Número de Sementes por Vagem (NSV) e (I) Peso de Cem Sementes (P100S) em 12 acessos de feijão-fava em ambientes com diferentes adubações do solo 41

Figura 3. Rede de haplótipos observados em acessos de feijão-fava. Cada círculo representa um haplótipo, e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Diferentes cores representam acessos de países diferentes.....64

Figura 4. Análise de componentes principais (ACP) com base em cinco locos cpSSR para 44 acessos de feijão-fava. Círculos azul e vermelho indicam a formação de grupo 1 e 2, respectivamente. 66

Figura 5. Gráfico das frequências alélicas dos três locos de SSR, estimados em 44 acessos de feijão-fava de diferentes países e variedades. 67

Figura 6. Estimativa de número de clusters (K) mais adequado para as amostras analisadas e gráfico de estrutura genética pela análise Bayesiana de três locos ncSSR em Feijão-Fava. Cada cor Indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas. 70

Figura 7. Análise de Componentes Principais com base em três locos ncSSR em 44 acessos de Feijão-Fava. Círculos azul e vermelho indicam a formação de grupo 1 e 2, respectivamente. 70

Figura 8. Dendrograma mostrando as relações genéticas com base em três locos ncSSReEntre 44 acessos de feijão-fava. A) Mostrando todos os acessos. B) Com base nos diferentes países.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de acessos usados para o estudo de plasticidade fenotípica em feijão-fava, sobre quatro diferentes substratos. 29

Tabela 2. Relação de acessos usados no estudo de diversidade genética e domesticação em feijão-fava. 31

Tabela 3. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubações diferentes, para o Número de Dias para o Florescimento. 40

Tabela 4. Médias do caráter Número de Dias para Florescimento de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações. 41

Tabela 5. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubações diferentes, para o Número de Dias para Maturação das vagens. 42

Tabela 6. Médias do caráter Número de Dias para Maturação das vagens de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes tipos de adubação. 43

Tabela 7. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubação diferentes, para o Número de Vagens por Planta. 44

Tabela 8. Médias do caráter Número de Vagens por Planta de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes tipos de adubação. 45

Tabela 9. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubações diferentes, para o Número de Sementes por Planta. 45

Tabela 10. Médias do caráter Número de Sementes por Planta de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações. 47

Tabela 11. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubação diferentes, para o Comprimento da Vagem. 47

Tabela 12. Médias do caráter Comprimento da Vagem de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações. 48

Tabela 13. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubação diferentes, para a Largura da Vagem. 49

Tabela 14. Médias do caráter Largura da Vagem de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações. 50

Tabela 15. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubações diferentes, para o Número de Lóculo por Vagem. 51

Tabela 16. Médias do caráter Número de Lóculos por Vagem de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações. 52

Tabela 17. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubações diferentes, para o Número de Sementes por Vagem. 53

Tabela 18. Médias do caráter Número de Sementes por Vagem de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações. 54

Tabela 19. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubação diferentes, para o Peso de Cem Sementes. 55

Tabela 20. Médias do caráter Peso de Cem Sementes, em gramas, de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações. 56

Tabela 21. Índice de plasticidade fenotípica (IPF) de nove caracteres de 12 acessos de feijão-fava, crescidos em quatro ambientes. 58

Tabela 22. Estimativas de coeficientes de Correlação de Pearson dos caracteres Número De Dias Para O Florescimento (NDF), Número De Dias Para Maturação (NDM), Número De Vagens Por Planta (NVP), Número De Sementes Por Planta (NSP), Comprimento De Vagem (CV), Largura Da Vagem (LV), Número De Lóculos Por Vagem (NLV), Número De Sementes Por Vagem (NSV) e Peso De Cem Sementes (P100S) de 12 acessos de feijão-fava em quatro ambientes. 61

Tabela 23. Estimativas de diversidade genética para os locos cpSSR polimórficos em 44 acessos de feijão-fava. A = número de alelos, I = índice de shannon, h = diversidade gênica..... 62

Tabela 24. Estimativas de diversidade genética de locos cpSSR nos grupos de acessos de diferentes países e variedades. A_m = número médio de alelos, I = índice de shannon, h = diversidade gênica..... 63

Tabela 25. Haplótipos cloroplastidiais obtidos para acessos de diferentes países de origem e variedade, com base em cinco locos cpSSR. 63

Tabela 26. Análise de variância molecular (amova) baseada em cinco locos cpSSR para diferentes acessos de feijão-fava. G.L. = graus de liberdade. 65

Tabela 27. Marcadores SSR sintetizados, com seus respectivos motivos e tamanhos esperados. 67

Tabela 28. Estimativas de diversidade genética de três locos ncSSR avaliados em 44 acessos de feijão-fava. A = número de alelos, H_O = heterozigosidade observada, H_E = heterozigosidade esperada e estimativa de coeficiente de endogamia (*f*). 68

Tabela 29. Estimativas de diversidade genética de três locos ncSSR avaliados em 44 acessos de feijão-fava, considerando diferentes países e variedade. Número de indivíduos (N), número médio de alelos (A_m), heterozigosidades observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E) e coeficiente de endogamia (*f*). 69

Tabela 30. Análise de variância molecular (amova) baseada em três locos ncSSR em 44 acessos de feijão-fava. G.l. = graus de liberdade. 71

1. INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma das cinco espécies do gênero *Phaseolus* explorada comercialmente, com potencial para fornecer proteína vegetal (Vieira, 1992) e a segunda leguminosa de maior importância do gênero (Maquet *et al.* 1999). É mundialmente utilizada em pratos nas mais diversas culinárias, recebendo várias denominações, em função da região cultivada ou forma de utilização na alimentação, entre elas fava, fava-belém, feijão-espadinho, feijão-de-lima ou fava-de-lima (GRIN, 2018).

A importância econômica e social do feijão-fava se deve principalmente à sua rusticidade em regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro, o que possibilita prolongar a colheita em período seco (Azevedo *et al.* 2003). Os grãos verdes e secos, as vagens verdes e as folhas do feijão-fava podem ser consumidos pelo homem. Trata-se de uma das principais leguminosas cultivadas na região tropical que apresenta potencial para o fornecimento de proteína vegetal à população e diminuição da dependência, quase exclusiva, do feijão comum do grupo carioca (Vieira, 1992).

No entanto, apesar de cultivada em vários estados e de apresentar capacidade de adaptação mais ampla que o feijão comum, seu o cultivo ainda tem pouca relevância no país. Acredita-se que as principais razões para o seu cultivo relativamente limitado sejam: a maior tradição de consumo do feijão comum e feijão-caupi, o paladar do feijão-fava e o seu tempo de cocção mais longo. O feijão-fava tem merecido pouca atenção por parte dos órgãos de pesquisa e extensão, resultando em limitado conhecimento a respeito das suas características agronômicas e potencialidades (Santos *et al.* 2002).

No Brasil, foram produzidas 21.004 toneladas de grãos secos, com um rendimento médio da produção de 194 quilogramas por hectare (kg/ha) no ano de 2017. Um rendimento médio muito baixo quando comparado com o rendimento do feijão comum no mesmo ano (1563 kg/ha). É cultivada principalmente na Região Nordeste, tendo o Ceará como principal estado produtor, com 7095 ton e rendimento médio de 137 kg/ha, seguida de Pernambuco (3249 ton e 290 kg/ha) e Paraíba (3008 ton e 165 kg/ha). Na Região Centro-Oeste, o estado de Goiás, é o responsável pela quase totalidade da produção de feijão-fava, de 1281 ton, com o maior rendimento médio (2114 kg/ha) (IBGE, 2018). É preferencialmente cultivada por pequenos produtores, por conta da sua rusticidade e colheita prolongada em períodos secos (Azevedo *et al.* 2003).

A baixa produtividade do feijão-fava pode ser atribuída ao fato de parte da produção ser oriunda de pequenos produtores, em consórcios com milho, mandioca, mamona ou babaçu, utilizando-se estas culturas como suporte para o seu desenvolvimento vegetativo (o feijão-fava tem hábito indeterminado), sem adoção de tecnologia que vise o aumento da

produtividade. Geralmente, apenas o excedente da produção é comercializado em feiras livres, o que a define como cultura de subsistência. Seu cultivo ainda é relativamente limitado. Dentre as razões para esse cultivo limitado, estão a maior tradição de consumo dos feijões comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e o sabor amargo do feijão-fava, conferido pela presença de toxinas (HCN). Além dessas, uma das principais razões para que o feijão-fava ainda seja pouco cultivado é a falta de cultivares recomendadas para as regiões produtoras (Guimarães *et al.* 2007). Assim, é importante a realização de estudos com feijão-fava no Brasil. O potencial econômico da cultura e a falta de informações que subsidiem a sua exploração tornam evidente a necessidade do desenvolvimento de pesquisa em genética, recursos genéticos, pré-melhoramento e melhoramento genético, além de se conhecer a história evolutiva e processo de domesticação da espécie.

Devido à erosão da diversidade genética das espécies silvestres e cultivadas tem-se intensificado a conservação de germoplasma, com o objetivo de preservar a variabilidade genética e de selecionar espécies para programas de melhoramento (Villalobos *et al.* 1991). A utilização da variabilidade genética das plantas conservadas em bancos de germoplasma requer que as subamostras sejam caracterizadas e documentadas, facilitando a identificação daquelas potencialmente úteis para os programas de melhoramento genético (Faleiro, 2003).

A caracterização da variabilidade genética nas diferentes espécies vêm sendo bastante estudada. Os marcadores moleculares estão sendo cada vez mais usados na determinação da diversidade genética. Dentre eles, os marcadores microssatélites são eficientes no estudo de diversidade genética, estrutura populacional, processo de origem e domesticação. O feijão-fava ainda conta com poucos estudos, principalmente, na caracterização por marcadores moleculares. Visto que, não possui marcadores microssatélites nucleares específicos, o que limita a ampliação do conhecimento sobre a espécie.

Devido aos aspectos acima citados, os objetivos deste trabalho foram:

1.1. Objetivo geral

Estudar a diversidade genética e a plasticidade fenotípica de feijão-fava, bem como, contribuir para o entendimento do processo de domesticação da espécie.

1.1.1. Objetivos específicos

1. Desenvolver marcadores microssatélites nucleares específicos para a espécie *Phaseolus lunatus* L.;

2. Estudar a diversidade genética de acessos de feijão-fava originados da América do Sul do Banco de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí e acessos vindos do México usando os marcadores microssatélites desenvolvidos;

3. Analisar os padrões de distribuição da variação haplotípica dos acessos domesticados e silvestres de feijão-fava, através de marcadores microssatélites cloroplastidiais (cpSSR), podendo assim gerar mais informações sobre o processo de domesticação da espécie;

4. Estudar a plasticidade fenotípica de acessos de feijão-fava através da resposta a diferentes tipos de adubação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais do feijão-fava

O feijão-fava pertence ao gênero *Phaseolus*, estando classificado na divisão Angiospermae, classe Dycotiledoneae, subclasse Rosidae, ordem Fabales, subordem Leguminoseae, família Leguminosae (Fabaceae), subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae e subtribo Phaseolineae (Souza e Lorenzi, 2008).

A família Fabaceae tem distribuição mundial, com cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies e está entre as maiores famílias das angiospermas. Suas espécies são de grande interesse econômico, principalmente para alimentação humana e adubação verde (Souza e Lorenzi, 2008). Dentre as 40 tribos pertencentes à família Fabaceae, a tribo Phaseoleae se destaca por possuir 75% das leguminosas comercializadas mundialmente, tais como: feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), soja (*Glycine max*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (Broughton *et al*. 2003).

O gênero *Phaseolus*, tem sua origem no continente americano, e se concentra nas regiões tropical e temperada. Estimativas mostram que há cerca de 50 espécies, sendo cinco delas domesticadas: *P. vulgaris*, *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray e *P. polyanthus* Greenm. Essas cinco espécies pertencem a duas linhagens distintas, sendo que *P. lunatus* L. está em um clado a parte das demais, que inclui a diversificação sul-americana e oceânicas de *Phaseolus*. (Baudoin *et al*. 2004).

A espécie *P. lunatus* L. pode ser encontrada sob a forma de duas variedades botânicas: *P. lunatus* var*. lunatus*, que inclui as populações domesticadas, e *P. lunatus* var. *silvester*, constituída das populações silvestres (Baudet, 1977). Indivíduos silvestres são caracterizados por hábito de crescimento indeterminado, período prolongado de floração e grande número de vagens (Zoro bi *et al.* 2003), enquanto que os indivíduos domesticados possuem hábito de crescimento determinado e período de floração curto e uniforme. O *pool* gênico primário de *P. lunatus* L. compreende populações silvestres e domesticadas, sendo dividido em dois grupos: Andino (sementes grandes) e Mesoamericano (sementes pequenas). Formas intermediárias, resultante da hibridação natural de formas silvestres e domesticadas, são observadas por toda a América Latina (Baudoin *et al.* 2004).

A variedade silvestre de *P. lunatus* L. é encontrada apenas na América, enquanto que a cultivada é amplamente distribuída pelas regiões tropicais e algumas regiões temperadas. A distribuição geográfica do feijão-fava se estende do clima extremamente seco da costa peruana, ao clima tropical úmido da região amazônica no Equador e Peru, e aos climas temperados das altitudes acima de 2500 m de altitude. As formas silvestres com sementes pequenas se estendem em baixas altitudes desde o México, através da América

Central e América do Sul até a Argentina. E as domesticadas ocorrem desde o sudoeste dos Estados Unidos, América Central até a costa leste do Brasil, principalmente no Nordeste (Baudoin *et al.* 2004; Andueza-Noh *et al.* 2013). Sementes grandes silvestres têm sua distribuição restrita a costa oeste do Pacífico, Equador e norte do Peru, e as domesticadas ocorrem no Equador, Peru, Colômbia, Bolívia e Argentina (Baudoin *et al.* 2004; Motta-Aldana *et al.* 2010).

O feijão-fava tem grande importância dentro do gênero *Phaseolus,* juntamente com o feijão comum. Seu cultivo ocorre na América do Norte, América do Sul, Europa, leste e oeste da África e sudeste da Ásia (Baudoin, 1988). Seus grãos constituem-se em uma importante fonte de alimento, ricos em proteínas para a população em vários municípios nordestinos, juntamente com o feijão-caupi, milho e mandioca (Azevedo *et al.* 2003) e são consumidos pelo homem sob a forma de grãos verdes e secos, vagens verdes e folhas. Além disso, esta espécie também pode ser utilizada na alimentação animal. É considerada mais tolerante à seca, ao excesso de umidade e ao calor, em comparação a outras espécies (Vieira, 1992).

Para os maias da Península de Yucatán, México, o feijão-fava é a quarta principal cultura, sendo plantado no sistema agrícola tradicional conhecido como “milpa” (Martínez-Castillo *et al*. 2006). O milpa é um antigo sistema agrícola mesoamericano de terras secas baseado no cultivo cíclico, onde a vegetação é cortada e queimada para plantar um grupo de culturas básicas como milho, abóbora e feijões. Juntamente com espécies secundárias, como *Capsicum* spp., *Ipomoea batatas* L. e *Solanum esculentum* L. Depois de 2 a 3 anos de cultivo (dependendo da fertilidade do solo), a terra descansa por 5-15 anos antes de iniciar-se um novo ciclo. Em Cuba, é explorado em cultivo não comercial em áreas pequenas, em que a diversidade é observada apenas no nível de propriedades e jardins familiares (Castiñeiras *et al*. 2007).

O feijão-fava apresenta ciclo anual, bienal ou perene, germinação epígea e hábito de crescimento indeterminado ou determinado. Possuem folhas trifoliadas; inflorescência de 8 a 25 cm; vagens de 30-80 mm de comprimento e 15-20 mm de largura, com duas a quatro sementes, pêndula, comprida, achatada e pontiaguda; sementes de 6-10 mm de comprimento e 5-9 mm de largura, podem assumir a forma romboide, redonda ou reniforme. O peso de 100 sementes varia de 30g a 300g (Vieira, 1992; Beyra e Artiles, 2004). Predominantemente autógama, com uma taxa de fecundação cruzada que pode chegar até 38,1% (Penha *et al.* 2017). Suas sementes possuem linhas que se irradiam do hilo para a região dorsal, que as diferenciam de outros feijões, mas em algumas variedades essas linhas podem ser ausentes (Vieira, 1992).

2.2. Origem e domesticação da espécie

Supõe-se que a espécie tenha se originado na Guatemala, por conter formas silvestres e trepadeiras com sementes pequenas (Vieira, 1967). A ampla distribuição e a falta de acessos silvestres de feijão-fava em muitas áreas de distribuição natural têm dificultado a determinação dos centros de domesticação da espécie. Estudos feitos por Motta-Aldana *et al*. (2010) a partir de DNA de cloroplasto de 109 acessos de feijão-fava apontaram para dois grandes centros de domesticação: (1) o Andino, localizado no Equador e norte do Peru, em que as plantas possuem sementes grandes e são adaptadas a altas altitudes; e (2) o Mesoamericano, que se estende do centro-oeste do México a Honduras, onde as plantas têm sementes pequenas e ocorrem em altitudes mais baixas.

A existência de dois conjuntos gênicos, um Andino (AG) e um Mesoamericano (MA) foi corroborada por trabalhos feitos com DNA ribossomal de 151 acessos selvagens e domesticados, sendo que o conjunto gênico mesoamericano possui dois grupos geneticamente e geograficamente distintos (MI e MII) (Serrano-Serrano *et al*. 2010). O centro AG abrange o Equador e o oeste e norte do Peru, o MI localiza-se no centro-oeste do México, incluindo a faixa costeira do Pacífico e o MII começa no sul do México, estendendo-se ao longo do Caribe e da América do Sul. Essa hipótese sobre a distribuição geográfica do germoplasma de feijão-fava é confirmada por um estudo de 262 de acessos em que se utilizou DNA de cloroplasto (Andrueza-Noh *et al*. 2013), sugerindo múltiplas origens de domesticação para a espécie. Outra espécie de grande importância com múltiplos eventos de domesticação é o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

O processo de domesticação tem como principais características a perda dos mecanismos de dispersão e dormência das sementes, que dificulta a disseminação e sobrevivência em novos ambientes. Outras características são o hábito de crescimento determinado e a ausência de fibras nas vagens, que leva a indeiscência das vagens e falta de dispersão das sementes (Broughton *et al*. 2003).

2.3. Conservação de recursos genéticos e melhoramento da espécie

A pesquisa em recursos genéticos e melhoramento vegetal é uma das atividades mais importantes para o país, tendo dado grande contribuição para a agricultura brasileira nas últimas décadas. Os programas de melhoramento genético são dependentes da base genética disponível principalmente nos bancos de germoplasma, que são a base para o desenvolvimento de cultivares (Queiroz e Lopes, 2007).

Os recursos genéticos vegetais referem-se à variabilidade de espécies de plantas de uso atual ou com potencial para uso futuro em programas de melhoramento, constituindo

parte importante da biodiversidade e promovendo o desenvolvimento da agricultura (Pereira *et al*. 2010). Um banco de germoplasma geralmente compreende variedades tradicionais e melhoradas da espécie cultivada, e amostras de espécies silvestres, tanto nativas como exóticas (Faleiro *et al*. 2008). Esses recursos servem de matéria-prima para o melhoramento genético, na busca por genótipos mais adaptados a fim de atender às necessidades dos agricultores e do mercado atual (Nass *et al*. 2007). Os trabalhos com recursos genéticos envolvem atividades como coleta, documentação, conservação, caracterização, avaliação e utilização do germoplasma (Nick *et al*. 2010).

A variabilidade genética disponível nas espécies pode ser ampla e cada espécie pode apresentar milhares de variantes; assim, pode-se admitir que uma coleção de germoplasma, por maior que seja, é apenas uma pequena amostra da variabilidade total (Allard, 1970).

A conservação da variabilidade genética de plantas pode ocorrer de duas maneiras: conservação *in situ* e *ex situ*. Na conservação *in situ*, as espécies são deixadas em seus *habitats* naturais, para que seus conjuntos gênicos e/ou seus ecossistemas sejam preservados. Para que a conservação seja eficiente, é necessário o conhecimento da biologia reprodutiva, ecologia, padrões de distribuição, existência de variabilidade genética, entre outras características importantes. A conservação *ex situ* é a manutenção de genes e complexos de genes em condições artificiais, fora do seu *habitat* natural, podendo ser feita em coleções de pólen, sementes, culturas de tecidos e coleções mantidas em campo (Nass, 2007).

As coleções de germoplasma *ex situ* aumentaram enormemente em número e tamanho, nas últimas três décadas, devido a esforços globais para a conservação genética de plantas para a agricultura e alimentação (Odong *et al*. 2013).

Bancos de germoplasma são estruturas físicas usadas para armazenar germoplasma, que serve como um reservatório de genes para usos e conservação da variabilidade das espécies. Eles podem ser: bancos de sementes, onde se conservam sementes ortodoxas em condições controladas de temperatura e umidade; bancos de campo, nos quais se conservam espécies com sementes recalcitrantes ou de propagação vegetativa; e bancos *in vitro*, onde as coleções de germoplasma são mantidas pelo cultivo dos tecidos vegetais em laboratório em condições que reduzam o crescimento das amostras. Além da conservação, os bancos também fazem a caracterização e avaliação do germoplasma. Para a maioria das espécies cultivadas existe um grupo de descritores mínimos que deve ser registrado para cada genótipo, entre os quais alguns dados de características agronômicas (Bespalhok *et al*. 2008).

As atividades de coleta e conservação de recursos genéticos de plantas constituem-se em atividades de alto custo e baixo retorno econômico a curto prazo. Além

disso, o desequilíbrio provocado pelo monocultivo, via de regra, compromete a conservação *ex situ* das espécies vegetais. Em alguns programas de melhoramento de espécies cultivadas, vem-se processando, gradativamente, a perda de variabilidade genética, devido principalmente ao pouco interesse em conservar material que não apresente características desejáveis, para os objetivos dos programas (Paiva, 1994).

A caracterização de diversidade genética proporciona o melhor conhecimento do germoplasma e é necessária para etapas posteriores de desenvolvimento de materiais melhorados e estratégias de conservação das espécies. A diversidade genética tem sido estudada através de análises fenotípicas e mensuração de características agromorfológicas, além da variação a nível molecular (Nass, 2007).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse pela conservação de recursos fitogenéticos de populações silvestres, devido à enorme reserva de variabilidade genética que elas contêm, podendo serem utilizadas como fonte de novas variações para o melhoramento e para garantir a segurança alimentar, melhor produção agrícola e aumento da produtividade, no contexto do crescimento populacional e mudanças climáticas aceleradas (Andueza-Noh *et al*. 2016).

Pesquisas com feijão-fava também vêm sendo conduzidas na busca do conhecimento da distribuição da diversidade genética em locais de agricultura tradicional, onde se utilizam especialmente variedades silvestres, a fim de apontar áreas onde a conservação é necessária e para estabelecer estratégias para conservação *in situ*. No entanto, Baudoin (1988), alerta para o risco de perda de germoplasma principalmente no centro primário de diversidade, que está situado na América Latina. Nos últimos anos, esforços significativos de coleta, caracterização da diversidade genética e domesticação da espécie vêm sendo feitos.

No México, considerado como centro de domesticação da espécie *P. lunatus* L., ela pode ser encontrada na forma silvestre e domesticada. Tem-se observado erosão genética em muitas regiões de populações silvestres, devido à perturbação humana do ecossistema. Na tentativa de minimizar isso, esforços estão sendo feitos para a preservação e conservação dessas populações. O centro de Investigação Científica de Yucatán (CICY), no México, vem realizando coletas de populações silvestres para a conservação em banco de germoplasma, com o propósito de assegurar sua conservação e aproveitamento sustentável (Andueza-Noh *et al*. 2016). Muitos estudos estão sendo realizados com o objetivo de se entender o estado da diversidade genética, os processos evolutivos e domesticação desses acessos (Martínez-Castillo *et al*. 2006; Martínez-Castillo *et al*. 2007; Serrano-Serrano *et al*. 2012; Andueza-Noh *et al*. 2013; Martínez-Castillo *et al*. 2014).

As coleções de germoplasma de feijão-fava são conservadas em bancos de germoplasma. Os mais importantes bancos de germoplasma localizam-se no Departamento

de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), Estados Unidos, no Instituto Nacional de Investigação Florestal, Agrícola e Pecuária (INIFAP), México e no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, este possuindo a maior coleção de *Phaseolus* do mundo. Essas instituições vêm buscando resgatar material cultivado em várias regiões, onde a erosão genética tem sido mais rápida (Camarena, 2005).

Outras instituições que possuem coleções de germoplasma da espécie são: Estação Experimental Agropecuária Salta, Argentina; Instituto de Investigação Agrícola "El Vallecito" e Universidade Autônoma Gabriel René Moreno, Bolívia; Faculdade de Ciências Agrárias e Universidade Austral de Chile, Chile; Centro Agronômico Tropical de Investigação e Enseñanza (CATIE) e Escola de Biologia, Costa Rica; Instituto de Investigações Fundamentais em Agricultura Tropical (INIFAT), Cuba; Universidade de San Carlos, Guatemala; Ciências Agropecuárias, Instituto de Ecologia Aplicada de Guerrero (INEAGRO), México.

No Brasil, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), é detentora da maior coleção de feijão-fava, com 988 acessos (Quintana *et al*. 2010). Encontram-se também bancos de germoplasma na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, na Universidade Federal de Pernambuco e na Universidade Federal do Piauí (UFPI). Na UFPI, foi implantado, em 2005, o Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-fava (BAGF-UFPI), onde se iniciaram coletas de variedades locais em comunidades agrícolas, feiras e mercados, tendo sido incorporados inicialmente 211 acessos provenientes dos estados do Piauí, Maranhão, Pernambuco e Bahia. A partir de então, coletas e intercâmbios vêm sendo realizados, em parceria principalmente com a Embrapa Cenargen e CIAT. Muitos estudos estão sendo realizados, mostrando que o BAGF-UFPI possui grande variabilidade genética, com grande potencial para uso em programas de melhoramento (Carmo, 2011; Silva, 2011; Carmo *et al*. 2013; Assunção Filho, 2012; Penha *et al*. 2017).

2.4. Marcadores moleculares de microssatélites nucleares

Atualmente, estão disponíveis diversos métodos moleculares de caracterização de germoplasma. Entre esses métodos, aqueles que revelam polimorfismo de sequências de DNA, conhecidos como marcadores moleculares, têm sido de grande importância para a análise de diversidade genética (Ferreira *et al*. 2007).

Os marcadores moleculares podem ser definidos como fenótipo molecular resultante de um gene expresso, ou de um segmento específico de DNA, correspondendo a regiões expressas ou não do genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1998), que podem ser usados para detectar polimorfismo (adição, deleção e substituição) entre diferentes genótipos ou alelos de um gene, em nível de população ou *pool* gênico. Seu número é quase ilimitado e

são desprovidos de efeito epistático ou pleiotrópico, não sofrem influência ambiental, além de possuir um número maior de locos quando comparados aos marcadores fenotípicos (Jiang, 2013; Nass, 2007).

Inúmeras aplicações têm sido identificadas para os marcadores moleculares, se destacando o estudo da diversidade genética, construção de mapas genéticos e mapeamento de características de interesse, caracterização de germoplasma, seleção assistida, seleção em gerações precoces, estimação de níveis de alogamia e endogamia em uma espécie (Nass, 2007; Borém e Miranda, 2009).

Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites se destacam por sua eficiência. Também conhecidos como SSR (*simple sequence repeats*), são formados por fragmentos de um a seis pares de bases repetidas em *tandem*, sendo chamados, correspondentemente, de mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ou hexanucleotídicos, distribuídos no genoma de plantas e animais (Borém e Miranda, 2009; Jiang, 2013). A técnica consiste na amplificação de DNA genômico por meio da PCR, usando um par de *primers* de tamanho curto, que se pareia com sequências conservadas de DNA, flanqueando uma sequência de microssatélites, que pode ocorrer aleatoriamente ao longo do genoma ou dentro de genes, sendo específicos neste último caso (Ramalho *et al*. 2012). A técnica de SSR revela polimorfismo em um loco devido a diferenças no número de vezes em que as sequências se repetem (Ferreira *et al*. 2007), resultando em padrões de bandas em gel, que representam os diferentes genótipos.

As variações encontradas nos microssatélites devem-se a mutações, que podem adicionar ou deletar pares de bases. Os mecanismos propostos para explicar essas variações seriam o elevado número de permuta desigual e erros da enzima DNA polimerase durante a replicação. A importância dos microssatélites reside principalmente na alta variabilidade encontrada (Borém e Caixeta, 2009).

As vantagens dos SSRs são: a transmissão codominante, pois são mais informativos para diferenciação de heterozigotos e homozigotos; natureza multialélica; extensa cobertura genômica; relativa abundância; boa reprodutibilidade e simplicidade da técnica e a pequena quantidade de DNA requerida devido à utilização de PCR (Powell *et al*. 1996). A limitação dos SSRs está na necessidade de serem específicos para cada espécie, não sendo possível a utilização de "*primers* universais". Suas vantagens fazem com que esses marcadores sejam ferramentas eficientes usadas em diferentes estudos e em várias espécies (Borém e Caixeta, 2009).

Nos estudos com SSRs, a genotipagem convencional é realizada pela visualização dos produtos da PCR em géis de agarose e/ou acrilamida corados com brometo de etídio e nitrato de prata, respectivamente, levando em consideração a presença e ausência de fragmentos na forma de bandas (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os SSRs também podem

ser marcados com fluorescência na extremidade 5' (Missiaggia e Grattapaglia, 2006) de modo que quando excitado por determinado comprimento de onda emite luminescência. Essa fluorescência permite a visualização e a análise dos fragmentos obtidos em sequenciador automático (Alekcevetch, 2013).

Marcadores microssatélites desenvolvidos para feijão comum e transferidos para feijão-fava vêm sendo usados para a descrição da estrutura e diversidade genética da espécie. Ouédraogo *et al*. (2005) comparam a diversidade genética obtida em populações silvestres da Costa Rica, usando marcadores enzimáticos e microssatélites. A estrutura e diversidade genética de populações silvestres do México vêm sendo bastante estudadas, mostrando que o país é um importante centro de diversidade da espécie (Martínez-Castillo *et al*. 2006, 2007, 2014). Montejo-Rojas *et al*. (2013) usaram microssatélites para determinar a diversidade genética de uma coleção de variedades domesticadas do Caribe. Locos microssatélites também foram usados para avaliar os níveis de introgressão em três complexos silvestre-domesticado de feijão-fava da Península de Yucatán, no México e analisar seu impacto na diversidade genética desta cultura (Félix *et al*. 2014).

2.5. Marcadores moleculares microssatélites cloroplastidiais

Os genomas de organelas são tipicamente não-recombinantes, com herança uniparental e efetivamente haploide. Os marcadores de organelas têm sido usados para estudos evolutivos de populações de plantas, incluindo aqueles sobre padrões de migração e níveis de diferenciação (Provan *et al*. 2001).

A variação em genoma cloroplastidial tem sido uma importante fonte de informações para a biologia de plantas. O uso de técnicas de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), traz muitas informações sobre a evolução de plantas em um alto nível taxonômico, mas oferece limitação entre e dentro de espécies intimamente relacionadas. Análises de sequências de DNA têm confirmado que a taxa de evolução molecular em genomas de clorosplastos é relativamente baixa. Apesar desta aparente conservação, recentemente tem-se descoberto e explorado um potencial informativo de regiões não-codificantes de genomas cloroplastidiais em nível de espécies e populações (Ebert e Peakall, 2009; Jakobsson *et al*. 2007).

O nível de conservação gênica, a disponibilidade de *primers* e a falta de recombinação, têm feito do genoma cloroplastidial uma ferramenta atrativa para estudos filogenéticos em plantas. *Primers* universais têm sido desenvolvidos, mostrando-se eficientes na detecção de polimorfismo em várias espécies, trazendo valiosas informações. A descoberta de polimorfismos de repetições mononucleotídicas tem trazido grandes

contribuições para estudos de ecologia e biologia evolutiva em plantas e animais (Provan *et al*. 2001).

Os marcadores microssatélites de cloroplastos (cpSSRs), também conhecidos como *chloroplast simple sequence repeats* (cpSSRs), desenvolvidos pela primeira vez como marcadores genéticos por Powell *et al*. (1995a, b), são sequências altamente polimórficas, geralmente com repetições de adenina (A) ou timina (T) de até 15 pares de bases (pb). Estão localizadas principalmente nas regiões não-codificantes, mostrando variação intraespecífica no número de repetições. A amplificação por PCR de SSRs usa *primers* específicos flanqueando as regiões de SSRs, produzindo fragmentos que exibem diferentes tamanhos, correspondendo à adição e/ou deleção de nucleotídeos na região repetida (Provan *et al*. 2001, [Figura 1]; Angioi *et al*. 2009a; Ebert e Peakall, 2009).

Primers universais desenvolvidos devido à alta conservação das regiões flanqueadoras de locos cpSSRs em diferentes espécies, inclusive em leguminosas, mostraram-se eficientes (Angioi *et al*. 2009a). Os cpSSRs têm mostrado maior nível de diversidade em comparação aos marcadores baseados em RFLPs cloroplastidiais. Possuem uma taxa de mutação baixa quando comparados aos microssatélites nucleares (Provan *et al*. 2001).

Em virtude da herança uniparental na maioria das espécies (em algumas, a herança é biparental), os marcadores cloroplastidiais refletem a propagação de gametas masculinos (gimnospermas) ou femininos (angiospermas). Tendem, assim, a reduzir o tamanho efetivo populacional do genoma cloroplastidial em comparação ao genoma nuclear, sendo mais sensíveis aos efeitos genéticos populacionais, como deriva genética. Potencialmente, são indicadores mais efetivos de subdivisões e diferenciação populacionais, além de possibilitarem a detecção da direção de hibridização (Ebert e Peakall, 2009; Birky, 2008; Petit *et al*. 2005).

Devido à herança genômica haploide, os marcadores de cloroplastos têm sido de grande importância no entendimento de processos que determinam a estrutura e variação dentro e entre populações naturais, revelando processos históricos aleatórios como “bottlenecks” e efeito fundador (Provan *et al*. 2001).

Marcadores microssatélites cloroplastidiais e nucleares vêm sendo amplamente usados em estudos da evolução de plantas cultivadas, ajudando na identificação de progenitores, quantificando a diversidade entre plantas domesticadas e seus parentes silvestres e a taxa de introgressão na evolução das espécies. Também indicam que os processos de domesticação e seleção têm levado a um decréscimo da variação dos *pools* gênicos de muitas espécies cultivadas, quando comparados aos de seus ancestrais silvestres (Provan *et al.* 2001).

Em feijão-fava, estudos com marcadores moleculares de cloroplastos são escassos. Fofana *et al*. (2001) estudaram a diversidade genética de acessos domesticados e silvestres originados de vários países, usando duas sondas de cpDNA. Motta-Aldana *et al*. (2010) usaram dois espaçadores intergênicos de DNA de cloroplasto e o espaçador interno do DNA ribossomal (ITS) para estudar o processo de domesticação da espécie. Para investigar o processo de domesticação do *pool* gênico Mesoamericano, Andueza-Noh *et al*. (2013) usaram os mesmos dois espaçadores intergênicos de DNA de cloroplastos que o trabalho citado anteriormente. Microssatélites cloroplastidiais ainda não foram usados em feijão-fava. Em feijão comum, alguns trabalhos foram feitos com cpSSRs (Sicard *et al*. 2005; Angioi *et al*. 2009ab, 2010; Desiderio *et al*. 2013).

2.6. Plasticidade fenotípica

Plasticidade fenotípica é a capacidade de um organismo de expressar diferentes fenótipos, em resposta às mudanças das condições ambientais bióticas ou abióticas. Organismos individuais podem mudar sua bioquímica, fisiologia, desenvolvimento, morfologia ou comportamento em resposta aos estímulos ambientais. Essa habilidade é muito importante em plantas, já que, por serem sésseis, estão sujeitas às mais diversas variações das condições ambientais em que vivem (Agrawal, 2001; Schlichting, 1986).

Respostas plásticas são características e/ou recursos específicos, que podem variar entre genótipos, populações e espécies (Sultan, 2000).

A plasticidade tem sido amplamente reconhecida como um significante modo de diversidade fenotípica e, assim, tida como um importante aspecto de como os organismos se desenvolvem, funcionam e evoluem em seus ambientes. Essa visão tem levado a uma redefinição do genótipo como repertório de possibilidades fenotípicas ou “norma de reação”, ao invés de um resultado fixo (Sultan, 2000).

Uma norma de reação é tida como os diferentes padrões fenotípicos possíveis que um determinado genótipo pode expressar, quando exposto a diferentes condições ambientais (Via *et al*. 1995; Pigliucci, 2005). Um genótipo pode variar sua expressão dependendo das condições ambientais externas e internas. As normas de reação podem ser determinadas pela mensuração de caracteres fenotípicos em diferentes condições ambientais, de clones ou indivíduos semelhantes geneticamente, como sementes de uma mesma planta. O leque de ambientes experimentais pode incluir condições extremas ou irreais para investigar os limites da expressão fenotípica potencial ou se restringir apenas aos ambientes naturais que a espécie habita, para investigar informações ecológicas e evolutivas (Sultan, 2000). A comparação das normas de reação de diferentes genótipos

captura os três componentes mais importantes da variância fenotípica: efeitos genéticos, efeitos ambientais e a interação entre eles (Figura 1) (Paaby e Testa, 2018).

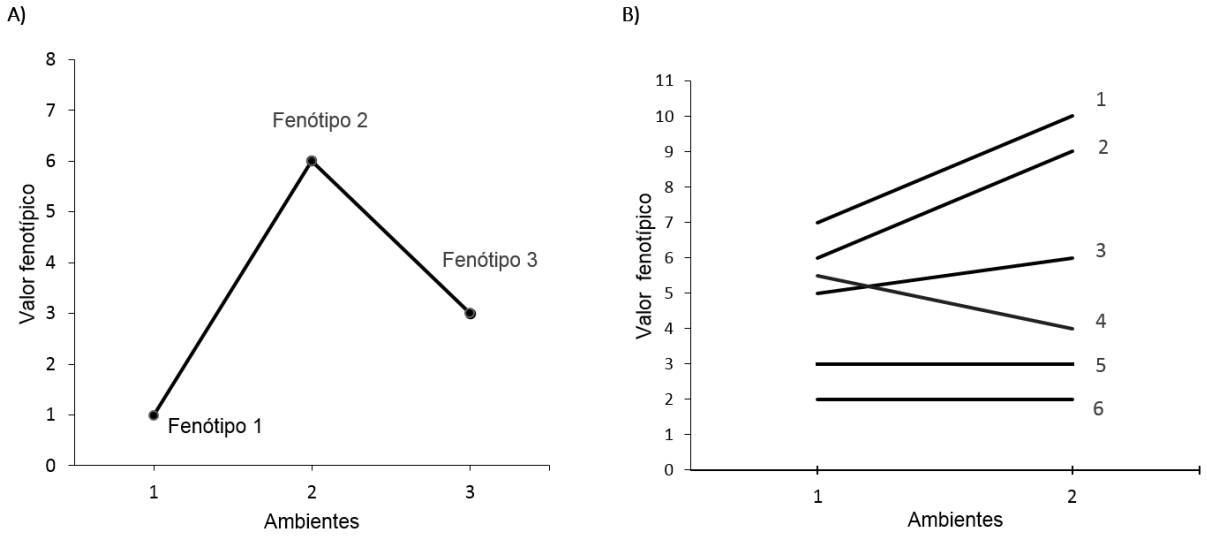

Figura 1. Padrões de norma de reação de genótipos em ambientes diferentes. A) A variação de uma característica pode ser plotada através da variação nos diferentes ambientes, produzindo uma norma de reação. O padrão de variação de um genótipo pode ser visualizado através de um gráfico dos seus valores fenotípicos para determinada característica em cada ambiente. O genótipo representado apresentou variações significativas nos diferentes ambientes. B) As normas de reação 1 e 2 ambos exibem plasticidade fenotípica, pois os genótipos 1 e 2 produzem valores de fenotípicos diferentes nos ambientes. Aqui o genótipo 1 exibe um valor médio maior que o genótipo 2, mas a influência do ambiente é igual em ambos. Normas 3 e 4 também exibem plasticidade, e as inclinações não-paralelas indicam interação GXE, o ambiente afeta diferentemente os genótipos. As normas 5 e 6 não apresentam plasticidade, pois o ambiente não tem efeito no fenótipo.

Plasticidade é considerada adaptativa quando os indivíduos mantêm a viabilidade e reprodução em meio a diferentes condições ambientais. Tem-se proposto que a plasticidade é uma estratégia alternativa à adaptação genética para lidar com a heterogeneidade ambiental, no tempo e no espaço. Muitos trabalhos vêm sendo realizados nas mais diferentes espécies, sobre as respostas das plantas a mudanças ambientais, mostrando o caráter adaptativo da plasticidade (Schlichting, 1986; Berg *et al*. 2005).

As plantas podem responder nas diferentes condições ambientais, não só mudando suas características morfológicas/fisiológicas, mas alterando também a quantidade e a qualidade de suas sementes e modificando a morfologia e a bioquímica de sementes e frutos. A estrutura, o desenvolvimento e morfologia da descendência podem ser influenciados pelo ambiente materno. Pode-se observar, em certas espécies, mudanças na estrutura ou espessura das sementes ou pericarpo, para manter a qualidade e quantidade de embriões, ambos importantes no desenvolvimento inicial da planta (Schlichting, 1986; Sultan, 2000).

A ausência de resposta morfológica aos ambientes não necessariamente significa que a planta carece de plasticidade. Uma relativa estabilidade de características

morfológicas pode ser amenizada pela plasticidade de características fisiológicas. Uma planta pode responder a mudanças ambientais por uma simples alteração na taxa de crescimento sem afetar a alocação de recursos ou a sua morfologia. Alternativamente, pode haver alteração do desenvolvimento, resultando em mudanças morfológicas ou alocação (Schlichting, 1986).

Os indivíduos de uma mesma espécie podem variar plasticamente por ordens de magnitude em tamanho, taxa de crescimento, alocação de energia para diferentes órgãos, reprodução e constituição química. Embora os fatores que provocam diferenças fenotípicas sejam ambientais, a capacidade de responder a estímulos tem base genética e pode evoluir sob a seleção natural. A variação genética na plasticidade fenotípica (conhecido como interação genótipo-ambiente) é um indicador do potencial de resposta à seleção e manutenção da plasticidade em uma população. A plasticidade é favorável se o ambiente é variável, se estímulos ambientais são confiáveis, de modo que os indivíduos possam expressar o fenótipo apropriado em cada ambiente (Callaway *et al*. 2003).

A intensidade da plasticidade pode estar relacionada ao tempo de desenvolvimento dos caracteres. Caracteres formados durante longo período de desenvolvimento, como altura, número de folhas e matéria seca total, são mais sujeitos à influência ambiental e, consequentemente, espera-se maior variação fenotípica, ou seja, são mais plásticos, quando comparadas com os caracteres desenvolvidos rapidamente, como estruturas reprodutivas. Sabe-se que características evolutivas responsáveis pela perpetuação da espécie, como estruturas reprodutivas, devem ser conservadas a fim de não comprometer a sobrevivência da espécie; por isso, é de esperar baixa plasticidade no florescimento (Schlichting, 1986; Oliveira, 2001).

As plantas podem responder aos diferentes ambientes pela plasticidade no seu desenvolvimento. Além de traços morfológicos e alocação, características anatômicas como vascularização e área foliar, número de nós e ramos, altura e espessura do caule, podem variar com o ambiente. Estudos de plasticidade anatômica em plantas têm mostrado maneiras sutis de ajustar o fenótipo para manter as funções em condições contrastantes. Em plantas herbáceas, por exemplo, o sombreamento pode alterar a arquitetura da planta, bem como tamanho e estrutura dos órgãos. O tempo de desenvolvimento em plantas pode ser plástico. A plasticidade do desenvolvimento pode se limitar aos estágios iniciais do ciclo da vida ou variar entre diferentes genótipos, populações e espécies (Sultan, 2000).

A plasticidade afeta também características do sistema de reprodução, alocação reprodutiva e fenologia. Descobriram-se casos em que plantas normalmente auto incompatíveis passam a realizar autofertilização, em resposta a idade floral e ausência de produção de frutos, garantindo assim, a reprodução quando a fecundação cruzada falha.

Nesses casos, a mudança plástica pode ocorrer devido ao ambiente interno da planta, disponibilidade de recursos ou outras condições externas (Sultan, 2000).

As respostas plásticas na reprodução, tanto na fenologia quanto na alocação de energia, afetam a aptidão das plantas e a resposta à seleção natural. Plantas podem florescer precocemente em condições desfavoráveis, ou retardar a floração em condições favoráveis, investindo em um maior crescimento vegetativo. Esse padrão reprodutivo reflete diferentes prioridades em diferentes ambientes. Assim, em solos pobres de nutrientes, as plantas têm uma vida mais curta e a maximização precoce da floração é vantajosa. Em solos ricos de nutrientes, as plantas têm vida longa, com grande crescimento vegetativo, seguido de uma posterior floração, maximizando seu desempenho (Sultan, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Plasticidade fenotípica

3.1.1. Material vegetal

Para o estudo de plasticidade fenotípica foram obtidos 12 acessos de feijão-fava vindos do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-fava da Universidade Federal do Piauí (BAGF-UFPI) (Tabela 1). Para se obter uma quantidade apropriada de sementes mais homogênea geneticamente para cada acesso, foi realizada a multiplicação do material, retirando sementes de apenas uma planta por acesso para o experimento.

Tabela 1. Relação de acessos usados para o estudo de plasticidade fenotípica em feijão-fava, sobre quatro diferentes substratos.

GENÓTIPOS	ACESSO	PROCEDÊNCIA
1	UFPI 793	Maranhão
2	UFPI 810	Piauí
3	UFPI 817	Paraíba
4	UFPI 818	Maranhão
5	UFPI 852	Tocantins
6	UFPI 854	São Paulo
7	UFPI 859	Ceará
8	UFPI 864	Ceará
9	UFPI 873	Paraíba
10	UFPI 877	Piauí
11	UFPI 928	Pernambuco
12	UFPI 929	Pernambuco

O experimento foi conduzido em estufa no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, no período de junho de 2017 a fevereiro de 2018. Os acessos foram plantados em vasos de plástico de 15 litros, colocados em bancadas, com temperatura e irrigação controladas. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Plantaram-se 3 sementes por vaso, realizando o desbaste com 20 dias após a germinação, deixando apenas uma planta por vaso.

Os acessos foram submetidos a quatro tipos de adubação: 1) sem adubação (controle); 2) adubação mineral de macro e micronutrientes (NPK); 3) adubação orgânica (esterco bovino e terra na proporção de 1:2) e 4) adubação mineral NPK e orgânica (mantendo-se as mesmas doses dos ambientes anteriores).

Os caracteres avaliados foram: Número de dias até florescimento (NDF); número de dias até a maturação (NDM), quanto 90% das vagens já estavam maduras; número de

vagens por planta (NVP); número de sementes por planta (NSP); Comprimento da vagem (CV); Largura da vagem (LV); Número de lóculos por vagem (NLV); Número de sementes por vagem (NSV); peso de cem sementes (P100S).

3.1.2. Análise Estatística

As análises dos dados foram realizadas usando o programa estatístico GENES (Cruz, 2016). Foram feitas análises de variância (ANOVA) individual e conjunta dos doze genótipos, nos quatro ambientes, estimando o grau de significância pelo teste F a 5% de probabilidade. As médias de cada acesso por ambiente foram submetidas ao teste de Scott-Knott a 5%, para comparação entre elas.

Para a quantificação da plasticidade fenotípica das diferentes variáveis analisadas foi calculado o índice de Plasticidade (IP), obtido a partir da diferença entre médias dos valores máximos e mínimos encontrado em cada acesso nos ambientes, dividido pela média do valor máximo (Valladares *et al*. 2000). Segundo Valladares *et al* (2005), variáveis com IP superior a 0,6 são consideradas muito plásticas e as com IP próximo de zero são não plásticas.

Também foi avaliado o coeficiente de correlação de Pearson, visando estimar a ocorrência de correlações entre as nove características e assim encontrar possíveis padrões de alocação de recursos entre elas. Correlações positivas mostram que os caracteres têm respostas diretas, aumentando ou diminuindo seus valores juntos. Ao passo que correlações negativas indicam um padrão em que as respostas das características analisadas são inversas, isto é, uma aumenta à medida que a outra diminui seu valor.

3.2. Marcadores moleculares de microssatélites

3.2.1. Material vegetal

Neste trabalho foram usados 23 acessos de feijão-fava do Banco de Germoplasma de Feijão-fava da Universidade Federal do Piauí, originados de diferentes estados do Brasil e considerados domesticados (n° 1 a 30 da Tabela 2); quatro acessos vindos do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), originados de diferentes países da América do Sul (n° 31 a 35 da Tabela 2) e 17 acessos silvestres (n° 36 a 53 da Tabela 2) originados do México, intercambiados pelo Centro de Investigação Científica de Yucatan (CICY) e também.

Tabela 2. Relação de acessos usados no estudo de diversidade genética e domesticação em feijão-fava.

(Continua)

ORDEM	ACESSOS	PROCEDÊNCIA	VARIEDADE
1	UFPI 777	BAHIA	DOMESTICADA
2	UFPI 780	BAHIA	DOMESTICADA
3	UFPI 782	BAHIA	DOMESTICADA
4	UFPI 787	BAHIA	DOMESTICADA
5	UFPI 793	MARANHÃO	DOMESTICADA
6	UFPI 795	PIAUÍ	DOMESTICADA
7	UFPI 798	MARANHÃO	DOMESTICADA
8	UFPI 799	MARANHÃO	DOMESTICADA
9	UFPI 800	PIAUÍ	DOMESTICADA
10	UFPI 804	PIAUÍ	DOMESTICADA
11	UFPI 810	PIAUÍ	DOMESTICADA
12	UFPI 813	PARAÍBA	DOMESTICADA
13	UFPI 814	PARAÍBA	DOMESTICADA
14	UFPI 817	PARAÍBA	DOMESTICADA
15	UFPI 818	MARANHÃO	DOMESTICADA
16	UFPI 857	CEARÁ	DOMESTICADA
17	UFPI 868	CEARÁ	DOMESTICADA
18	UFPI 873	PARAÍBA	DOMESTICADA
19	UFPI 877	PIAUÍ	DOMESTICADA
20	UFPI 879	CEARÁ	DOMESTICADA
21	UFPI 927	PERNAMBUCO	DOMESTICADA
22	UFPI 928	PERNAMBUCO	DOMESTICADA
23	UFPI 930	ALAGOAS	DOMESTICADA
24	UFPI 935	SERGIPE	DOMESTICADA
25	UFPI 936	SERGIPE	DOMESTICADA
26	UFPI 937	ALAGOAS	DOMESTICADA
27	UFPI 939	PERNAMBUCO	DOMESTICADA
28	UFPI 940	PERNAMBUCO	DOMESTICADA
29	UFPI 941	PARAÍBA	DOMESTICADA
30	UFPI 960	SERGIPE	DOMESTICADA
31	UFPI 1078	ARGENTINA	DOMESTICADA
32	UFPI 1098	PERU	DOMESTICADA
33	UFPI 1099	COLOMBIA	DOMESTICADA
34	UFPI 1105	PERU	DOMESTICADA
35	UFPI 1150	ARGENTINA	DOMESTICADA
36	JMC1383	MÉXICO	DOMESTICADA
37	JMC1388	MEXICO	SILVESTRE
38	JMC1389	MEXICO	SILVESTRE
39	JMC1390	MÉXICO	SILVESTRE

Tabela 2. Relação de acessos usados no estudo de diversidade genética e domesticação em feijão-fava.
(conclusão)

ORDEM	ACESSOS	PROCEDÊNCIA	VARIEDADE
40	JMC1392	MEXICO	SILVESTRE
41	JMC1393	MEXICO	SILVESTRE
42	JMC1394	MÉXICO	SILVESTRE
43	JMC1398	MEXICO	SILVESTRE
44	JMC1400	MEXICO	SILVESTRE
45	JMC1401	MÉXICO	SILVESTRE
46	JMC1402	MEXICO	SILVESTRE
47	JMC1404	MEXICO	SILVESTRE
48	JMC1405	MÉXICO	SILVESTRE
49	JMC1406	MEXICO	SILVESTRE
50	JMC1407	MEXICO	SILVESTRE
51	JMC1410	MÉXICO	SILVESTRE
52	JMC1411	MEXICO	SILVESTRE
53	JMC1412	MEXICO	SILVESTRE

Os acessos do Brasil e os vindos do CIAT foram plantados em tubetes de plástico em casa-de-vegetação, sendo amostrados de 2 a 3 plantas por acesso. Folhas jovens foram coletadas e imediatamente imersas em nitrogênio líquido e depois liofilizadas por 48h (-50ºC, pressão de 0,04 mbar). O tecido seco foi triturado em moinho mecânico e armazenado em tubos plásticos devidamente identificados. Nos foram enviados o DNA dos acessos do México, com 5 amostras por acesso.

3.2.2. Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA foi realizada por meio do protocolo CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1987). Cerca de 30 mg de tecido foliar de cada amostra foi colocado em microtubos de 2 mL. Os microtubos receberam a adição de 700 µL de tampão de extração CTAB (pré-aquecido a 65ºC) e foram levados ao banho-maria (65ºC) por 60 minutos, com agitação manual por inversão a cada 10 minutos.

Após os tubos atingirem a temperatura ambiente, foram adicionados 600 µL de solução composta de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção de 24:1 e centrifugados por 10 minutos a 10.000 rotações por minuto (rpm); em seguida, o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Adicionaram-se 500 µL de isopropanol gelado aos tubos, que foram agitados novamente por inversão. Em seguida, os tubos foram levados ao freezer -20°C por 60 minutos para ocorrer precipitação do DNA; após isso, os tubos foram

novamente centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm para descarte do sobrenadante retendo-se apenas o precipitado.

Em seguida, efetuou-se a lavagem do precipitado com 500 µL de etanol 70 % gelado, invertendo-se os tubos levemente e levando-os à centrífuga por 5 minutos a 10.000 rpm, com posterior descarte do sobrenadante. Os precipitados permaneceram a temperatura ambiente por 12 horas (*overnight*) para evaporação do etanol. Após a secagem, foram adicionados 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM de EDTA pH 8,0), para diluir os precipitados. Posteriormente, 2 µL de RNAse (10 mg mL^{-1}) foram adicionados aos tubos e levados ao banho-maria a 37°C por 4 horas, seguindo-se a desnaturação da RNAse a 50°C por 10 minutos e, logo a seguir, o armazenamento no freezer.

A quantificação do DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1% com *Syber safe* em comparação com concentrações de 25, 50 e 100 ng de DNA padrão do fago lambda. As amostras foram diluídas para a concentração final de 10 ng/µL.

3.2.3. Desenvolvimento de biblioteca genômica com microssatélites nucleares (ncSSR)

O desenvolvimento de uma biblioteca genômica foi realizado no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em 2016. Uma segunda biblioteca foi construída durante o curso de Microssatélites para estudos genéticos de eucariotos, na Universidade de Campinas (UNICAMP), em 2017.

As construções das bibliotecas foram realizadas utilizando o protocolo descrito por Billote *et al*. (1999). Uma amostra de DNA da espécie foi digerida para gerar fragmentos de tamanhos adequados. Aproximadamente 5 µg do DNA genômico foi digerido utilizando a enzima *Afa I* na concentração de 10ug/µL em tampão 1X por 3 horas a 37ºC. Posteriormente, efetuou-se a ligação dos adaptadores *Afa*21 (5’ CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3’) e *Afa*25 (5’ TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3’). A reação utilizou 3 µl do DNA digerido, 0,4 µM de cada adaptador e 2 U da enzima T4 DNA Ligase em tampão 1X, sendo incubada a 20ºC por 2 horas.

Após a ligação, os fragmentos foram pré-amplificados visando aumentar a quantidade de fragmentos e garantir que a ligação tivesse ocorrido. A reação de pré-amplificação utilizou 5 µl do produto da ligação, 0,4 µM do *primer Rsa21*, tampão 1 X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP e 3U de *Taq* DNA polimerase. O ciclo total de pré-amplificação foi feito em termociclador BioRad programado para iniciar com 4 minutos a 95ºC, seguido de 20 ciclos de 94ºC por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final de 8 minutos a 72°C. Parte do produto da PCR (10µl) foi

submetida à eletroforese em gel de agarose 1,0%, TBE 1% com *syber safe* e marcador *ladder* para verificar a ocorrência da amplificação.

O produto da PCR foi purificado, preparando-se o DNA para a etapa seguinte. Após a purificação, procedeu-se à seleção de fragmentos contendo microssatélites. Os fragmentos contendo sequências ricas em GA/CT, AT/TA e CA/GT foram selecionados por meio de hibridização com sondas biotiniladas, biotina IIIII$(CT)_8$ e biotina IIIII$(GT)_8$ e recuperados através da ligação a *beads* magnéticas. Os fragmentos selecionados foram amplificados utilizando-se 20 µl dos fragmentos, 0,4 µM do *primer Rsa21*, tampão 1 X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP e 3U de *Taq* DNA polimerase. A amplificação foi programada para iniciar com 1 minuto a 95ºC, seguido de 25 ciclos de 94ºC por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, com extensão final de 5 minutos a 72°C. Após a amplificação, os fragmentos foram ligados em vetor de clonagem pGEM-T Vector, através da reação a 16ºC por 15 horas, contendo 11,5 µl de tampão, 1 µl de plasmídeo, 1,5 µl de enzima ligase e 6 µl dos fragmentos.

Na transformação química, 100 µl de células competentes foram misturados com 8 µl da ligação e levados a choque térmico. Depois disso, foram adicionados 450 µl de meio LB e a mistura foi incubada por 50 minutos a 37°C, em seguida sendo centrifugada a 3000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* transferido para placa de Petri com meio LB sólido contendo ampicilina, IPTG e X-Gal. As placas foram levadas à estufa a 37°C por 15 horas. Após o tempo de crescimento, as colônias de coloração branca foram repicadas com palitos estéreis em poços de placa ELISA contendo 140 µl de meio 2YT-HMFM e 100 µl de ampicilina por poço. As placas ficaram mantidas em estufa a 37°C por 15 horas e depois transferidas ao freezer -20°C. Para verificar se os clones transformados contêm insertos, realizou-se uma reação de amplificação contendo 2 µl do conteúdo de cada poço da placa ELISA e 23 µl de um mix contendo 0,4 mM de dNTPs, 0,25 µM de *Rsa21*, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, 0,4 mM $MgCl_2$ e tampão 10X. A amplificação foi programada para iniciar com 4 minutos a 95ºC, seguidos de 30 ciclos de 94ºC por 30 segundos, 52°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com extensão final de 8 minutos a 72°C. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de TBE 1X. A presença de duas bandas no mesmo poço do gel mostrava que havia dois clones com insertos diferentes no mesmo poço da placa, e determinava o descarte das amostras desse tipo.

Na etapa seguinte, realizou-se o isolamento do DNA plasmidial das colônias recombinantes. Em placa de 96 poços fundos foi adicionado 1 ml de meio Circle Grow contendo ampicilina e 2 µl dos clones em cada poço. Em seguida, a placa foi selada com adesivo e perfurada com agulha sobre cada poço para aeração durante o crescimento, com incubação em agitador a 37°C e 300 rpm por 22 horas. Após esse período, a placa foi

centrifugada a 3000 rpm por 6 minutos e o sobrenadante descartado por inversão. A cada poço foram adicionados 240 µl de meio GTE e a placa foi selada e agitada em vórtex por 2 minutos. A placa voltou à centrífuga por 6 minutos a 4000 rpm, sendo descartado o sobrenadante em seguida. Foi feita outra lavagem com 60 µl de GTE e 5 µl de RNAse e então a placa foi selada e levada ao vórtex por 5 minutos. A cada poço adicionaram-se 60 µl de NaOH 0,2M-SDS 1%, selando-se novamente e invertendo-se 10 vezes. Em seguida, adicionaram-se 60 µl de KOAc 3M em cada poço e a placa foi selada e invertida 10 vezes, sendo incubada em estufa a 90°C por 30 minutos. Depois disso, a placa foi esfriada em gelo e centrifugada por 4 minutos a 4000 rpm.

Uma placa-filtro foi fixada sobre uma placa ELISA, encaixando-se todos os poços, passando-se todo o volume da placa anterior para a placa-filtro, deixando-se apenas um precipitado branco no fundo, que foi descartado. O conjunto placa-filtro e placa ELISA foi então centrifugado a 4000 rpm por 4 minutos, a 20ºC. A placa filtro foi descartada e a cada poço da placa ELISA foram adicionados 110 µl de isopropanol. A placa foi selada e invertida 20 vezes e, em seguida, centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos a 20ºC. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µl de etanol 70%, sendo a placa centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado novamente. A placa foi deixada invertida em papel absorvente e levada à centrífuga a 600 rpm por 1 minuto; depois ficou secando na bancada por 30 minutos. Após a secagem, adicionaram-se 60 µl de água ultrapura autoclavada e a placa foi deixada sobre a bancada por 15 horas. A qualidade e a concentração de DNA de uma amostra aleatória foram verificadas em gel de agarose 1%, utilizando-se 3 µl de plasmídeos em comparação com um plasmídeo comercial. As placas foram mantidas congeladas a -20ºC.

Para o sequenciamento, purificaram-se as amostras com 80 µl de isopropanol 65%. A reação de sequenciamento foi realizada com 2 µl de tampão Save Money, 2 µl de Big Dye Terminator, 0,5 µM de *primer* SP6 e 4 µl de plasmídeo. O programa de desnaturação inicial a 96ºC por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de amplificação, a 95ºC por 45 segundos, 50ºC por 30 segundos e 60ºC por 4 minutos. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático e as sequências obtidas foram processadas no programa GeneMarker.

3.2.4. Identificação de motivos microssatélites (ncSSR)

A identificação de microssatélites foi feita através do programa Websat (http://wsmartins.net/websat). O desenho dos primers que flanqueiam os microssatélites foi feito usando o programa Primer3. Os parâmetros serão configurados para a obtenção de

primers cujo produto final da amplificação esteja no intervalo de 100 a 300 pb, o tamanho dos *primers* fique entre 18 e 22 pb e a porcentagem de GC, no intervalo de 40% a 60%.

Para a otimização das reações, os primers foram testados em diferentes temperaturas de anelamento e diferentes concentrações de $MgCl_2$ (1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM). Os testes foram realizados com DNA de cinco acessos diferentes. E os produtos das PCRs visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2% e comparados com marcador de peso molecular *ladder* de 100pb.

3.2.5. Amplificação e detecção de polimorfismo de marcadores ncSSR e cpSSR

Os *primers* SSRs foram sintetizados com uma cauda M13 no *primer* forward. As amplificações dos locos foram realizadas por meio de PCR com volume final de 10 µL, contendo 10 ng de DNA genômico, 1X de tampão, 2,5 ng de BSA, 2,5mM de MgCl, 200 µM de cada um dos dNTPs, 1,5 pmols do primer forward, 2,5 pmols do primer reverse, 1,5 pmols do primer M13 e 1U de Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador ProFlex com as seguintes condições: 94ºC por 4 minutos; 30 ciclos a 94ºC por 1 minuto, 58ºC por 1 minuto e 72ºC por 1 minuto; seguidos de 8 ciclos de 94ºC por 40 segundos, 53ºC por 40 segundos e 72ºC por 40 segundos, além de um passo final a 72ºC por 10 minutos para extensão final dos fragmentos. A qualidade das amplificações dos locos SSR foi verificada visualmente por meio de eletroforese em gel de agarose 2% com os produtos da PCR corados com SYBR Safe (Invitrogen).

Os produtos das PCRs foram analisados no equipamento ABI 3500xl. A análise e determinação dos tamanhos dos fragmentos SSR foi realizada com auxílio do programa GeneMarker (Applied Biosystems).

3.2.6. Análises genéticas

Para os cpSSRs, os alelos foram tratados como haplótipos e para a análise da diversidade foram estimados o número total e efetivo de haplótipos, e a diversidade haplotipica, utilizando-se o programa GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2012). As relações genéticas entre os acessos silvestres e domesticados foram estudadas através de estimativas de distâncias genéticas, com a construção de uma rede de haplótipos, usando o critério de 95% de parcimônia, através do programa NETWORK (Fluxus Technology Ltda). A distribuição hierárquica da variação haplotípica dentro e entre grupos de variedades foi avaliada com as Análises de Variância Molecular e também a Análises de Componentes Principais através do programa GenAlEx 6.5.

Para avaliar o efeito fundador, como resultado da domesticação, foram comparadas a diversidade genética total de acessos silvestres com a diversidade de acessos domesticados. A percentagem de redução da diversidade genética (%r), citada por Andueza-Noh *et al*. (2013), foi calculada como %r = (Hw - Hd)/Hw, onde Hw é a diversidade genética dos acessos silvestres e Hd é a diversidade genética dos acessos domesticados.

Para os SSR nucleares, as frequências alélicas, o número de alelos por loco e as heterozigosidades observada e esperada de cada loco, bem como a estrutura da variabilidade visualizada através de dendrogramas, construídos com a matriz de distâncias genéticas de Nei (1978). A partir das distâncias genéticas foram realizados a análise de componentes principais. Essas análises foram feitas no programa GeneAlEx, com auxílio do Microsoft Excel. A estrutura genética foi avaliada também pelo programa STRUCTURE 2.3.3 a fim de definir o número de grupos (k) mais provável nas amostras. A distribuição da variação genética entre e dentro dos grupos de acessos foi avaliada com base nas médias de Análises de Variância Molecular (AMOVA), obtidas no programa GeneAlEx

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Plasticidade fenotípica em feijão-fava

4.1.1. Número de dias para o florescimento (NDF)

Na tabela 3 estão apresentados os dados da análise de variância conjunta para o número de dias para o florescimento de feijão-fava. Os resultados mostram que os diferentes ambientes e os genótipos tiveram influência no florescimento. A interação genótipo x ambiente total não foi significativa, porém quando se realiza o desdobramento das interações, encontra-se significância dos genótipos dentro dos ambientes. Examinando cada genótipo, observa-se que os acessos UFPI 817, UFPI 864 e UFPI 873, tiveram interações significativas, sendo assim influenciados pelos ambientes.

O coeficiente de variação genética (CVg), que expressa, em percentagem, a fração genética na média do experimento, foi de 11.59 %. A razão entre o CVg e o coeficiente de variação ambiental (CVa), de 2,41, mostra a parte da variância total que é explicada pelo genótipo. Esses resultados indicam que grande parte da variação fenotípica encontrada se deve à contribuição genética dos acessos. Silva (2009) encontrou, para NDF, um valor de 92,42% de coeficiente de determinação genotípico (herdabilidade para efeitos fixos). Coeficientes de determinação genotípicos mais altos podem estar associados com a menor variação de ambiente e/ou interação genótipo x ambiente (Fehr, 1987), o que é confirmado aqui pela interação GxA não significativa.

As médias de cada genótipo nos quatros ambientes para NDF estão na tabela 4. A maioria dos acessos tiveram NDF iguais estatisticamente nos quatros ambientes. Com exceção dos acessos UFPI 817, UFPI 864 e UFPI 873, que apresentaram o NDF maior no ambiente 1 sem adubação (A1). Sendo assim, apenas para esses acessos, houve influência do ambiente no fenótipo das plantas, sendo plásticos para NDF, os restantes sendo robustos. Dentro do ambiente 2 (A2), com NPK, apenas o acesso UFPI 817 teve uma média significativamente diferente (maior) dos demais. Dentro dos ambientes 1, 3 e 4, tanto UFPI 817 quanto UFPI 873 tiveram médias diferentes (maiores) para NDF. Isso mostra que as condições do solo podem influenciar no número de dias para florescimento, embora as plantas possam ter respostas fenotípicas diferentes.

Carvalho (2012), estudando a influência de adubo orgânico e mineral em feijão-fava, encontrou influência significativa para doses de adubo orgânico, com o NDF de 67,6 dias sem adubação, chegando a 54,6 dias com adubação. A adubação mineral não mostrou influência significativa para NDF.

Tabela 3. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubações diferentes, para o número de dias para o florescimento.

FV	GL	QM
Genótipos (G)	11	433,79**
Ambientes (A)	3	63,24**
G x A	33	$4,48^{ns}$
G / A	44	111,81**
A / G	36	$9,38^{ns}$
A / UFPI 793	3	$3,64^{ns}$
A / UFPI 810	3	$0,56^{ns}$
A / UFPI 817	3	24,67**
A / UFPI 818	3	$9,11^{ns}$
A / UFPI 852	3	$4,11^{ns}$
A / UFPI 854	3	$7,55^{ns}$
A / UFPI 859	3	$2,08^{ns}$
A / UFPI 864	3	17,55*
A / UFPI 873	3	24,22**
A / UFPI 877	3	$2,75^{ns}$
A / UFPI 928	3	$2,22^{ns}$
A / UFPI 929	3	$14,08^{ns}$
Resíduo	96	588,67
Média		51,5
CVa (%)		4,81
CVg (%)		11,59

*, **, ^{ns} = significativo a 5% e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Vemos que os acessos UFPI 817 e UFPI 873, do estado da Paraíba, possuem um florescimento tardio com médias de 69,33 e 56,00 dias, respectivamente, sendo maior que a média geral (51,50). Já os acessos UFPI 928 e UFPI 929, ambos de Pernambuco, foram os mais precoces, com médias de 48,33 e 48,09 dias, respectivamente. Esse padrão pode ser observado na figura 2A, onde se destacam as normas de reação para essa característica.

O feijão-fava, em casa-de-vegetação, em condições de solo com adubação mineral e orgânica recomendada para a espécie, teve uma média de 95,87 dias para o florescimento (Silva, 2011). Em condições de campo, variedades de feijão-fava, apresentaram uma média de 73,55 dias para florescimento (Assunção Filho, 2012). Em ambos os casos, os valores foram maiores que a média de 51,5 dias encontrada aqui. Essas diferenças podem ser devido aos genótipos e às condições ambientais as quais foram submetidos.

Tabela 4. Médias* do caráter Número de Dias para Florescimento de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações.

	Ambiente 1	Ambiente 2	Ambiente 3	Ambiente 4	Médias
UFPI 793	50.00 Ac	48.33 Ab	47.67 Ac	47.67 Ac	48,42
UFPI 810	48.67 Ac	48.39 Ab	48.00 Ac	49.00 Ac	48,52
UFPI 817	73.00 Aa	69.00 Ba	66.00 Ba	69.33 Ba	69,33
UFPI 818	52.00 Ac	48.30 Ab	50.00 Ac	48.33 Ac	50,57
UFPI 852	52.33 Ac	50.38 Ab	50.00 Ac	52.00 Ab	51,18
UFPI 854	51.00 Ac	50.33 Ab	51.00 Ac	47.87 Ac	50,05
UFPI 859	49.67 Ac	47.68 Ab	48.67 Ac	48.33 Ac	48,59
UFPI 864	53.00 Ac	49.67 Bb	48.67 Bc	47.30 Bc	49,66
UFPI 873	60.00 Ab	53.33 Bb	55.00 Bb	55.67 Bb	56,00
UFPI 877	51.67 Ac	49.70 Ab	50.00 Ac	49.67 Ac	50,26
UFPI 928	49.33 Ac	48.67 Ab	48.00 Ac	47.33 Ac	48,33
UFPI 929	51.00 Ac	48.36 Ab	47.00 Ac	46.00 Ac	48,09

*As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo, enquanto que médias seguidas de mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si estatisticamente, a 5% de probabilidade, pelo teste Scott-Knott.

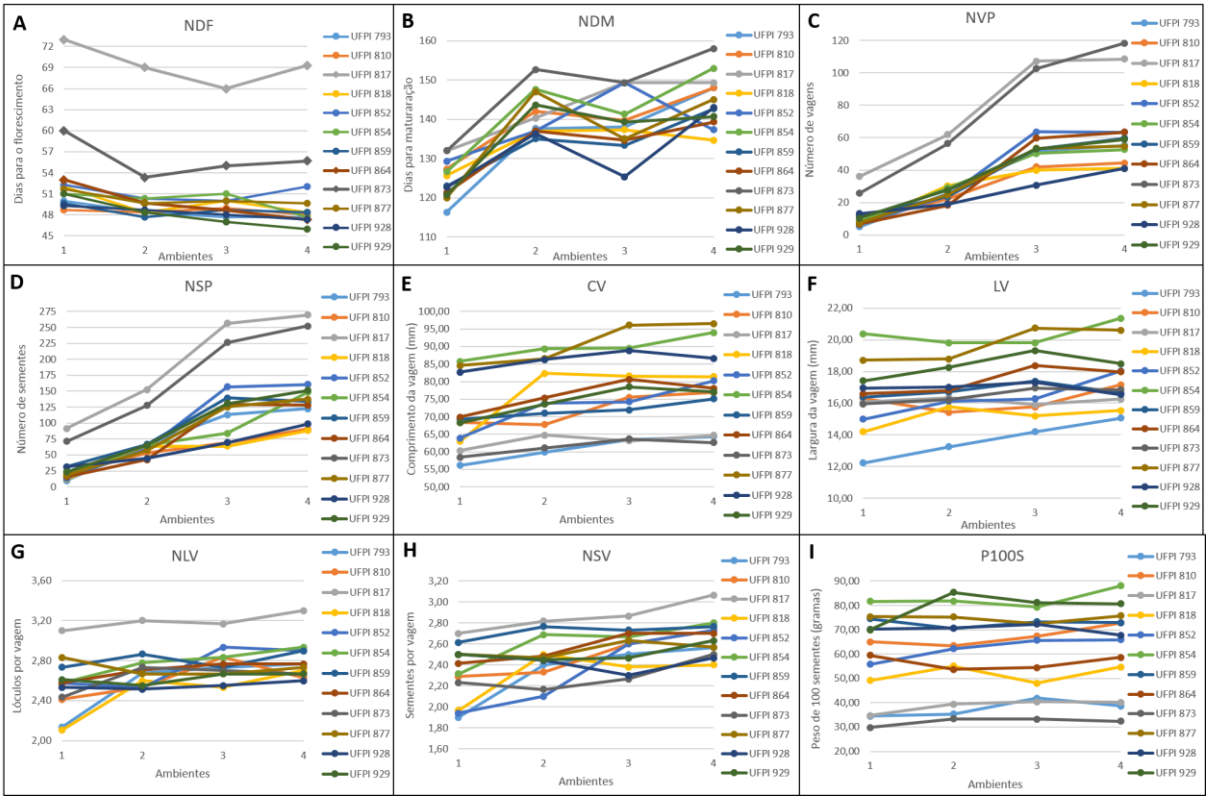

Figura 2. Normas de reação do (A) número de dias para o florescimento (NDF); (B) número de dias para maturação das vagens (NDM); (C) número de vagens por planta (NVP); (D) número de sementes por planta (NSP); (E) comprimento da vagem (CV); (F) largura da vagem (LV); (G) número de lóculos por vagem (NLV); (H) número de sementes por vagem (NSV) e (I) peso de cem sementes (P100S) em 12 acessos de feijão-fava em ambientes com diferentes adubações do solo. Ambiente 1 (controle, sem adubação), 2 (adubação com NPK), 3 (adubação orgânica) e 4 (adubação NPK e orgânica).

4.1.2. Número de dias para maturação das vagens (NDM)

O resumo da análise de variação conjunta referente à característica Dias para Maturação das Vagens se encontra na tabela 5. Os genótipos, os diferentes ambientes e a interação G x A foram significativos para a determinação do caráter. Todos os acessos tiveram interação GxA significativa a nível de 5%, quando analisados individualmente nos ambientes. Os coeficientes de variação ambiental (CVa) e genéticos (CVg) foram baixos. E a razão CVg/CVa foi alta (3,49), mostrando maior contribuição genética para o caráter. No entanto, a variância da interação GxA (Vga=19,08) foi próxima à variância genotípica (Vg=21,15). Isso mostra que a interação GxA teve grande contribuição para o fenótipo dos acessos quanto ao número de dias para maturação das vagens. Como comparação, em feijão-caupi, o CVg foi parecido (2,42%), mas a razão CVg/CVa foi menor (1,48) e a variância da interação GxA foi de 4,19, bem menor que a encontrada neste trabalho (Correa *et al.*, 2012). Valores menores também foram encontrados em feijão comum - Va de 5,07 e Vga de 1,34 - mas o CVg foi parecido (3,23%) (Correa, 2002).

Tabela 5. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubações diferentes, para o número de dias para maturação das vagens.

FV	GL	QM
Genótipos (G)	11	255,58**
Ambientes (A)	3	2715,40**
G x A	33	58,99**
G / A	44	108,14**
A / G	36	280,36**
Resíduo	96	1,75
Média		137,21
CVa (%)		0,96
CVg (%)		3,35

*, **, ^{ns} = significativo a 5% e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

As médias de cada acesso estão dispostas na tabela 6. Todos os acessos tiveram médias estatisticamente diferentes nos quatros ambientes, com um menor NDM no ambiente 1 (sem adubação), mostrando que os acessos são plásticos para essa característica. Os ambientes 2 e 3 foram os menos diversificados nas médias e o ambiente 4 teve o maior número de médias estatisticamente diferentes. Observa-se comportamento contrastante dos acessos nos seus ciclos, nos diferentes ambientes, refletindo a influência do meio na determinação do ciclo dos acessos e estabelecendo relações de interações genótipos por ambientes. A duração do ciclo de um cultivar é uma característica influenciada pelo ambiente, podendo um mesmo genótipo comportar-se de maneira diferente quando submetido a diferentes ambientes.

Os acessos UFPI 854 e UFPI 873 (Figura 2B) se destacaram com as maiores médias, respectivamente de 142,17 e 148 dias, tendo uma maturação mais prolongada no ambiente 4 (adubo orgânico). Precocidade na maturação das vagens, por sua vez, foi observada nos acessos UFPI 928 (131,83 dias) e UFPI 864 (133,08 dias).

Valores de NDM de 120,16 foi encontrado em variedades locais de feijão-fava do Piauí, avaliadas em campo e 150,0 dias em acessos de banco de germoplasma em experimento em casa-de-vegetação, seguindo as condições de adubação (Assunção Filho, 2012; Silva, 2011).

Tabela 6. Médias* do caráter Número de Dias para Maturação das vagens de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes tipos de adubação.

	Ambiente 1	Ambiente 2	Ambiente 3	Ambiente 4	Médias
UFPI 793	116,33 Cf	137,67 Be	138,00 Bc	145,33 Ad	134,33
UFPI 810	127,33 Dc	142,00 Bd	139,67 Cb	148,00 Ac	139,25
UFPI 817	132,00 Da	137,00 Ce	140,33 Bb	149,33 Ac	139,66
UFPI 818	125,67 Cc	137,00 Ae	137,33 Ac	134,67 Bh	133,67
UFPI 852	129,33 Cb	137,00 Be	149,33 Aa	137,33 Bg	138,25
UFPI 854	126,67 Dc	147,67 Bb	141,33 Cb	153,00 Ab	142,17
UFPI 859	123,00 Cd	135,00 Be	133,33 Bd	142,67 Ae	133,50
UFPI 864	121,33 De	137,00 Be	134,67 Cd	139,33 Ag	133,08
UFPI 873	132,00 Da	152,67 Ba	149,33 Ca	158,00 Aa	148,00
UFPI 877	120,00 Ce	147,00 Ab	135,00 Bd	145,00 Ad	136,75
UFPI 928	122,67 Dd	136,33 Be	125,33 Ce	143,00 Ae	131,83
UFPI 929	120,67 Ce	143,67 Ac	139,33 Bb	140,67 Bf	136,08

*As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo, enquanto que médias seguidas de mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si estatisticamente, a 5% de probabilidade, pelo teste Scott-Knott.

4.1.3. Número de vagens por planta (NVP)

A análise de variação conjunta para o Número de Vagens por Planta (Tabela 7) mostrou-se significativa a 5% pelo teste F, para os genótipos, ambientes e a interação genótipo x ambiente, mostrando que os fenótipos dos acessos tiveram influência dos diferentes ambientes. Todos os acessos apresentaram interação GxA significativa a nível de 5%, quando analisados individualmente nos ambientes. A variância da interação GxA (Vga) foi alta (106,78), assim como a variância genotípica (Vg), que atingiu 311,77. Esses valores mostram a significativa contribuição que a interação tem para o NVP. Assim, as condições ambientais que as plantas experimentam têm grande influência sobre esse caráter.

Em feijão comum, encontraram-se estimativas bem menores que as encontradas aqui (Vg=4,10 e Vga=1,00), sendo NVP o caráter com o maior CVa entre todos os caracteres avaliados em três ambientes (Correa, 2002). Em um estudo com linhagens de feijão-caupi, o NVP foi o segundo caráter mais influenciado pela variação do ambiente

(Sampaio *et al.* 2002). Em um outro estudo, o número de vagens por planta foi o caráter mais influenciado por alterações ambientais não controláveis (Barriga e Oliveira, 1982). Em soja, esse é o componente da produção mais influenciável pelas condições de manejo e do ambiente (Heiffig, 2002).

Tabela 7. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubação diferentes, para o Número de Vagens por Planta.

FV	GL	QM
Genótipos (G)	11	255,58**
Ambientes (A)	3	2715,40**
G x A	33	58,99**
G / A	44	1179,13**
A / G	36	1959,82**
Resíduo	96	3,58
Média		40,55
CVa (%)		4,66
CVg (%)		43,55

*, **, ^{ns} = significativo a 5% e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

As médias dos acessos em todos os ambientes foram comparadas pelo teste de média Scott-Knott a 5% de significância (Tabela 8). Destacam-se os acessos UFPI 817 e UFPI 873, apresentando um aumento significativo de valor para os A3 e A4, e as maiores médias de todo o experimento, de 78,50 e 75,75, respectivamente. Já os acessos que tiveram o menor número de vagens foram UFPI 810, do Piauí (26,75) e UFPI 928, de Pernambuco (25,92), além de ter a menor variação do número de vagens entre os quatro ambientes, 36 e 28 vagens, respectivamente. As médias de A1 e A4 do UFPI 817 (36,00 e 108,67) e UFPI 873 (25,67 e 118,3) tiveram diferenças significativas, sendo os mais plásticos para essa característica. Esses acessos são os mesmos que apresentam um florescimento tardio (Figura 2C).

Um aumento significativo no NVP foi registrado em feijão comum para adubação vegetal associada a mineral quando comparada a adubação vegetal apenas (Melém Júnior *et al.* 2011). Diferenças significativas foram observadas como resultado do uso de adubação orgânica e mineral para o NVP em soja (Carvalho, 2011). Nos tratamentos sem adubação, com adubação mineral (NPK), adubação orgânica animal e adubação organomineral, foram obtidos os valores de 19,13, 25,87, 32,67 e 35,87, respectivamente, para o número de vagens por planta. Esse aumento na quantidade de vagens está de acordo com o encontrado aqui.

Tabela 8. Médias* do caráter Número de Vagens por Planta de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes tipos de adubação.

	Ambiente 1	Ambiente 2	Ambiente 3	Ambiente 4	Médias
UFPI 793	5,00 Dd	25,67 Cd	51,67 Be	55,33 Ae	34,42
UFPI 810	8,33 Cd	22,33 Bd	42,00 Af	44,33 Ag	26,25
UFPI 817	36,00 Ca	62,00 Ba	107,33 Aa	108,67 Ab	78,50
UFPI 818	6,33 Cd	30,33 Bc	40,00 Af	41,00 Af	39,42
UFPI 852	6,67 Cd	24,00 Bd	63,67 Ac	63,33 Ac	39,42
UFPI 854	8,00 Cd	29,00 Bc	50,33 Ae	52,67 Ae	35,00
UFPI 859	11,67 Dc	23,67 Cd	53,00 Be	59,67 Ad	37,00
UFPI 864	6,67 Dd	18,33 Ce	59,67 Ad	63,33 Ac	37,00
UFPI 873	25,67 Db	56,33 Cb	102,67 Bb	118,33 Aa	75,75
UFPI 877	7,33 Cd	24,67 Bd	53,33 Ae	54,67 Ae	35,00
UFPI 928	13,00 Dc	19,00 Ce	30,67 Bh	41,00 Af	25,92
UFPI 929	10,33 Dc	27,67 Cc	53,00 Be	59,00 Ad	37,50

*As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo, enquanto que médias seguidas de mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si estatisticamente, a 5% de probabilidade, pelo teste Scott-Knott.

4.1.4. Número de sementes por planta (NSP)

Essa característica mostrou-se significativa a 5% pelo Teste F em todas as fontes de variação (Tabela 9). Todos os acessos tiveram interação GxA significativa a nível de 5%, quando analisados individualmente nos ambientes. Mostrando que o número de sementes de feijão-fava produzidas pelos genótipos foi influenciado pelos diferentes regimes de adubação. O coeficiente de variação ambiental foi baixo, de 2,73%, em comparação com o coeficiente de variação genético. A Vg (1809,21) e Vga (538,77) foram bem altas para o NSP. Mostrando que grande parte da variação fenotípica se deve a diferenças genéticas dos acessos, juntamente com a interação G x A.

Tabela 9. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubações diferentes, para o número de sementes por planta.

FV	GL	QM
Genótipos (G)	11	21717,25**
Ambientes (A)	3	104988,38**
G x A	33	1623,06**
G / A	44	6646,60**
A / G	36	10236,83**
Resíduo	96	6,75
Média		95,12
CVa (%)		2,73
CVg (%)		44,71

*, **, ^{ns} = significativo a 5% e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Foi utilizado o teste de média de Scott-Knott a 5% de significância para comparação das médias dos acessos em cada ambiente (Tabela 10). O ambiente 1 apresentou os menores NSP para todos os acessos, chegando ao maior número nos ambientes 3 e 4. A

maioria dos acessos tiveram médias significativamente diferentes em cada ambiente, mostrando quanto os diferentes substratos influenciam o NSP e também quão plásticos são os acessos.

Novamente os acessos UFPI 817 e UFPI 873 destacam-se dos demais por apresentarem um aumento significativo para os ambientes 3 e 4 e por terem as maiores médias de número de sementes nos quatros ambientes (192,42 e 169,42 sementes). O acesso UFPI 852, de Tocantins, também teve um número de sementes acima da média geral (97,67). Os acessos que tiveram menor número de sementes foram os mesmos que produziram a menor quantidade de vagens (UFPI 810 e UFPI 928).

O NSP dentro de cada ambiente variou de 9,67 a 91,3 sementes no ambiente 1, de 42,67 a 152,67 sementes no ambiente 2, de 63,67 até 256,33 sementes no 3 variou e de 88,33 a 269,33 sementes no 4 (Figura 2D). A diferença entre a maior e a menor média dentro de cada ambiente foi de 81,66, 110, 192,66 e 181 sementes, respectivamente. Assim, no ambiente 1 os acessos apresentaram maior robustez, enquanto que os ambientes 3 e 4 mostraram maior plasticidade dos acessos. O NSP possui o mesmo padrão de resposta que o NVP, pelo fato de estarem diretamente relacionados, de forma que os acessos com menores NSP também tiveram os menores NVP, e os maiores NSP foram os mesmos que produziram os maiores números de vagem.

A baixa disponibilidade de nutrientes no solo resultou na diminuição da produção de vagens e sementes por plantas, e isso é confirmado quando se observa o Ambiente 2, em que houve um aumento significativo no NVP e NSP com a adição de adubo NPK, e um aumento maior ainda com a adição de adubo orgânico. A contribuição do adubo orgânico no aumento dos caracteres relacionados à produtividade (NVP e NSP) se deve às melhorias promovidas na qualidade física, química e biológica do solo, bem como à liberação lenta dos nutrientes de maneira a atender à necessidade nutricional da cultura por maior período de tempo (Martins *et al.* 2015).

Tabela 10. Médias* do caráter Número de Sementes por planta de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações.

	Ambiente 1	Ambiente 2	Ambiente 3	Ambiente 4	Média
UFPI 793	9,67 Df	66,33 Cc	113,00 Bg	122,67 Ag	77,92
UFPI 810	19,67 De	53,67 Ce	69,00 Bi	90,67 Ai	58,25
UFPI 817	91,33 Da	152,67 Ca	256,33 Ba	269,33 Aa	192,42
UFPI 818	12,33 Cf	64,00 Bc	63,67 Bj	88,33 Ai	57,08
UFPI 852	13,67 Cf	60,00 Bd	156,67 Ac	160,33 Ac	97,67
UFPI 854	18,33 De	65,67 Cc	84,00 Bh	148,33 Ad	79,08
UFPI 859	31,33 Dc	66,67 Cc	139,33 Ad	134,00 Be	92,83
UFPI 864	15,67 Ce	42,67 Bf	129,33 Ae	128,33 Af	79,00
UFPI 873	71,33 Db	127,67 Cb	226,33 Bb	252,33 Ab	169,42
UFPI 877	18,33 De	57,00 Cd	125,33 Bf	137, 33 Ae	84,50
UFPI 928	31,33 Dc	44,67 Cf	69,33 Bi	98,33 Ah	60,92
UFPI 929	23,33 Dd	65,00 Cc	130,33 Be	151,00 Ad	92,41

*As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo, enquanto que médias seguidas de mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si estatisticamente, a 5% de probabilidade, pelo teste Scott-Knott.

4.1.5. Comprimento da vagem (CV)

O resumo da análise de variação está mostrado na tabela 11. A variação no comprimento da vagem foi significativa em todas as fontes de variação. Isso indica que os diferentes ambientes foram capazes de promover alterações expressivas no comprimento da vagem em feijão-fava. A média do comprimento da vagem foi de 74,73 mm. A razão CVg/CVa foi de 4,57, mostrando que a variação genética dos acessos é maior que a variação ambiental. A variância genotípica (103,09) foi bem superior à variância da interação (6,68), tendo assim uma forte contribuição genética e uma menor influência do ambiente no comprimento de vagem em feijão-fava.

Em experimentos semelhantes, encontrou-se influência significativa no CV para feijão-fava com a aplicação de adubo orgânico, mas foi não significativo para adubação com NPK e para a interação dos dois adubos (Alves, 2006). Em feijão, encontrou-se um aumento no comprimento da vagem com o aumento de doses de adubo orgânico (Santos *et al.* 2001).

Tabela 11. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubação diferentes, para o Comprimento da Vagem.

FV	GL	QM
Genótipos (G)	11	1242,00**
Ambientes (A)	3	582,84**
G x A	33	24,97**
G / A	44	329,23**
A / G	36	71,46**
Resíduo	96	4,94
Média		74,73
CVa (%)		2,97
CVg (%)		13,59

*, **, ^{ns} = significativo a 5% e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Os valores médios para o CV estão apresentados na tabela 12, juntamente com o teste de média de Scott-Knott a 5% de significância.

Os acessos UFPI 854 (SP), UFPI 877 (PI) e UFPI 928 apresentaram as maiores médias, enquanto que os acessos UFPI 793 (MA) e UFPI 873 (PB) tiveram as menores médias de comprimento de vagem. Estes foram também os mais tardios para o florescimento e maturação das vagens, além de produzirem mais vagens e sementes (Figura 2E).

Os acessos tiveram um comprimento de vagem menor no A1 (o menor CV foi do UFPI 793 com 56,10 mm), seguido do A2 e tendo as maiores médias em A3 e A4 (atingindo tamanho máximo no UFPI 877 com 96,55 mm). Com exceção dos acessos UFPI 810 e UFPI 877, que tiveram as médias estatisticamente iguais e menores nos A1 e A2, com um aumento em A3 e A4. O acesso UFPI 859 teve médias iguais e menores nos A1, A2 e A3, tendo o maior CV no A4. UFPI 818 se destaca com a maior diferença no CV do ambiente 1 para o 2 (19,43 mm). Dentro de cada ambiente, os acessos tiveram médias diferentes. O ambiente 1 apresentou quatro grupos de acessos, enquanto que os ambientes 2, 3 e 4 formaram cinco grupos cada.

Resultados semelhantes foram encontrados por Alves (2006), que obteve um comprimento máximo de vagem igual a 87 mm, na presença de adubação orgânica. No feijão-vagem foi verificado aumento no comprimento de vagens, em função da nutrição orgânica e mineral. Santos *et al.* (2001) também constataram um aumento significativo no CV com adição de adubo orgânico. No entanto, Carvalho (2012) não encontrou influência da adubação orgânica, mineral ou organomineral para o CV, em feijão-fava. O mesmo ocorreu em feijão comum, onde não houve interação significativa de adubo orgânico e mineral no CV (Martins *et al.* 2015).

Tabela 12. Médias* do caráter Comprimento da Vagem de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações.

	Ambiente 1	Ambiente 2	Ambiente 3	Ambiente 4	Médias
UFPI 793	56,10 Cd	59,89 Be	63,46 Ae	64,34 Ae	60,95
UFPI 810	68,31 Bb	67,76 Bd	75,51 Ad	76,93 Ad	72,13
UFPI 817	60,33 Bd	64,76 Ad	63,16 Ae	64,69 Ae	63,23
UFPI 818	62,94 Bc	82,37 Ab	81,58 Ac	81,39 Ac	77,07
UFPI 852	63,91 Cc	73,81 Bc	74,28 Bd	80,21 Ac	73,05
UFPI 854	85,73 Ca	89,38 Ba	89,52 Bb	93,94 Aa	89,64
UFPI 859	69,25 Bb	70,96 Bc	71,91 Bd	75,09 Ad	71,80
UFPI 864	69,90 Cb	75,34 Bc	80,68 Ac	78,07 Ad	76,00
UFPI 873	58,47 Bd	61,07 Ae	63,61 Ae	62,61 Ae	61,44
UFPI 877	84,61 Ba	86,53 Ba	96,10 Aa	96,55 Aa	90,95
UFPI 928	82,71 Ba	86,29 Aa	88,86 Ab	86,61 Ab	86,12
UFPI 929	68,27 Cc	73,60 Bd	78,54 Ac	77,04 Ab	74,36

*As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo, enquanto que médias seguidas de mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si estatisticamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

4.1.6. Largura da vagem (LV)

Os resultados da análise de variância para a largura da vagem estão sendo mostrados na tabela 13. Os genótipos, os ambientes e a interação G x A foram significativos pelo teste F a 5% de significância. No entanto, analisando as interações dos ambientes com cada genótipo, nota-se uma interação não significativa no acesso UFPI 817, ou seja, os diferentes ambientes não influenciaram significativamente a largura da vagem nesse acesso, sendo assim mais estável que os outros acessos.

A Vga foi bem menor (0,36) que a Vg (3,35), o CVa também foi baixo, indicando que essa característica tem grande contribuição genética, mas que pode sofrer alterações fenotípicas pelas diferentes condições ambientais. Silva (2015) também encontrou interação significativa para a largura da vagem em acessos de feijão-fava avaliados em dois ambientes.

Tabela 13. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubação diferentes, para a Largura da Vagem.

FV	GL	QM
Genótipos (G)	11	40,28**
Ambientes (A)	3	10,40**
G x A	33	1,18**
G / A	44	10,95**
A / G	36	1,95**
A / UFPI 793	3	4,47**
A / UFPI 810	3	1,72**
A / UFPI 817	3	0,11^{ns}
A / UFPI 818	3	1,43**
A / UFPI 852	3	4,69**
A / UFPI 854	3	1,59**
A / UFPI 859	3	0,55*
A / UFPI 864	3	2,30**
A / UFPI 873	3	0,69**
A / UFPI 877	3	3,68**
A / UFPI 928	3	0,31*
A / UFPI 929	3	1,84**
Resíduo	96	0,10
Média		16,97
CVa (%)		1,85
CVg (%)		10,78

*, **, ^{ns} = significativo a 5% e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Os acessos UFPI 854 e UFPI 877 apresentaram as maiores médias para LV (20,33 mm e 19,70 mm), bem como tiveram as maiores médias para CV (Tabela 14). O acesso UFPI 793 tem a menor média de 13,69 mm e também teve o menor comprimento de vagem. A maioria dos acessos tiveram menores valores de LV no A1 e maiores em A3 e A4, com algumas exceções. Os acessos UFPI 810 e UFPI 854 apresentaram menores valores em A2 e A3, enquanto que o UFPI 928 teve a menor largura no A4 e valores iguais nos demais

ambientes, isso mostra que a largura de vagem pode ser diferentemente modificada pelas condições em que as plantas se encontram. Já UFPI 817 teve larguras de vagem iguais nos quatro ambientes, não apresentando plasticidade para essa característica. O padrão de reação dos acessos nos ambientes pode ser visualizado na figura 2F.

O ambiente 4 apresentou o menor número de grupo de médias diferentes (seis), enquanto que o A1 teve o maior com oito grupos, ao contrário do que foi encontrado para o comprimento. Esse padrão de resposta diferenciado pode ser devido à menor variância genotípica para o LV (3,35) em comparação ao CV (103,09), sendo assim mais influenciado pelos ambientes.

Para efeito de comparação, obteve-se uma média de 18,19 mm para LV em variedades “Boca-de-moça” de feijão-fava (Assunção Filho, 2011) e LV menor que 15,26 mm, em acessos de feijão-fava de crescimento determinado (Carmo *et al.* 2013).

Tabela 14. Médias* do caráter Largura da Vagem de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações.

	Ambiente 1	Ambiente 2	Ambiente 3	Ambiente 4	Médias
UFPI 793	12,23 Dg	13,25 Cg	14,20 Bi	15,07 Af	13,69
UFPI 810	16,31 Bd	15,43 Cf	15,76 Cg	17,17 Ad	16,17
UFPI 817	16,07 Ad	16,36 Ad	15,92 Ag	16,26 Ae	16,15
UFPI 818	14,20 Bf	15,77 Af	15,19 Ah	15,53 Af	15,17
UFPI 852	15,00 Ce	16,12 Be	16,27 Bf	18,03 Ac	16,35
UFPI 854	20,37 Ba	19,81 Ca	19,81 Cb	21,35 Aa	20,33
UFPI 859	16,38 Bd	16,70 Bd	17,38 Ae	16,63 Be	16,77
UFPI 864	16,58 Bd	16,80 Bd	18,37 Ad	17,98 Ac	17,43
UFPI 873	15,96 Bd	16,22 Be	16,95 Ae	16,84 Ae	16,49
UFPI 877	18,71 Bb	18,78 Bb	20,73 Aa	20,60 Ab	19,70
UFPI 928	16,96 Ac	17,00 Ad	17,31 Ae	16,53 Be	16,95
UFPI 929	17,40 Cc	18,26 Bc	19,31 Ac	18,49 Bc	18,36

*As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo, enquanto que médias seguidas de mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si estatisticamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

4.1.7. Número de lóculos por vagem (NLV)

Para o número de lóculos por vagem, os genótipos e os ambientes foram significativos de acordo com a ANOVA (Tabela 15).

Para o número de lóculos por vagem, os genótipos e os ambientes foram significativos a 5% de probabilidade pelo teste F (Tabela 15). A interação genótipo x ambiente também foi significativa, mas quando se analisa cada genótipo, nota-se que apenas os acessos UFPI 793, UFPI 818 e UFPI 852 apresentam interação, ou seja, tiveram NLV influenciados pelos ambientes. Os demais não tiveram interação significativa. Nota-se que o CVe foi maior que o CVg, indicando que a variação fenotípica do número de lóculos por vagem foi devida principalmente aos efeitos dos ambientes. Ressalta-se que esses três

acessos foram suficientes para tornar a interação GxA e a variação ambiental significativas. Em 20 genótipos de feijão comum, encontrou-se uma razão de CVg/CVa de 1,050 para NLV, mostrando que essa característica pode sofrer considerável influência ambiental (Coelho, 2017). O NLV é definido pelo número de óvulos do sistema reprodutivo, tendo assim um maior controle genético, consequentemente mais resistente a fontes de variações. Por isso, apenas três acessos apresentaram mudanças no NLV com os diferentes tipos de adubações.

Tabela 15. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubações diferentes, para o número de lóculo por vagem.

FV	GL	QM
Genótipos (G)	11	0,41**
Ambientes (A)	3	0,35**
G x A	33	0,06*
G / A	44	0,15**
A / G	36	0,08**
A / UFPI 793	3	0,27**
A / UFPI 810	3	$0,09^{ns}$
A / UFPI 817	3	$0,02^{ns}$
A / UFPI 818	3	0,25**
A / UFPI 852	3	0,13*
A / UFPI 854	3	$0,07^{ns}$
A / UFPI 859	3	$0,02^{ns}$
A / UFPI 864	3	$0,03^{ns}$
A / UFPI 873	3	$0,06^{ns}$
A / UFPI 877	3	$0,02^{ns}$
A / UFPI 928	3	$0,05^{ns}$
A / UFPI 929	3	$0,01^{ns}$
Resíduo	96	0,04
Média		2,70
CVa (%)		7,17
CVg (%)		6,59

*, **, ^{ns} = significativo a 5% e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

As médias de cada acesso nos quatro ambientes estão dispostas na tabela 16. Os acessos tiveram médias estatisticamente iguais para os quatro ambientes, com exceção dos acessos UFPI 793 e UFPI 818, que apresentam médias menores no ambiente 1, e também do acesso UFPI 852, que mostrou médias menores em A1 e A2. Assim, houve influência dos ambientes nesses acessos, sendo considerados plásticos para o tipo de adubação do solo. Os demais acessos foram robustos para os ambientes estudados, como observado na figura 2G.

O acesso UFPI 817 teve o maior NLV (3,19), seguido do acesso UFPI 859 (2,81). As menores médias para NLV foram encontradas nos acessos UFPI 818 (2,48) e UFPI 928 (2,54). O ambiente com menor média foi o 1 (2,13) e com maior foi o ambiente 4 (3,30). Dentro de cada ambiente houve a formação de grupos de acessos pelo teste de médias de

Scott-Knott a 5% de significância, onde houve a formação de dois (A2 e A3), três (A4) e quatro (A1) grupos, assim, a maior robustez é observada em A2 e A3, e a maior plasticidade no A1.

Assunção Filho (2012) obteve uma média de 2,58 lóculos por vagem, menor que o achado aqui (2,70) em populações de feijão-fava, e um valor menor ainda foi encontrado por Carmo (2011), um NLV de 2,25.

Tabela 16. Médias* do caráter número de lóculos por vagem de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações.

	Ambiente 1	Ambiente 2	Ambiente 3	Ambiente 4	Médias
UFPI 793	2,13 Bd	2,68 Ab	2,73 Ab	2,77 Ac	2,58
UFPI 810	2,41 Ac	2,53 Ab	2,83 Ab	2,63 Ac	2,60
UFPI 817	3,10 Aa	3,20 Aa	3,17 Aa	3,30 Aa	3,19
UFPI 818	2,10 Bd	2,60 Ab	2,53 Ab	2,70 Ac	2,48
UFPI 852	2,58 Bb	2,53 Bb	2,93 Aa	2,90 Ab	2,73
UFPI 854	2,58 Ab	2,78 Ab	2,83 Ab	2,93 Ab	2,78
UFPI 859	2,73 Ab	2,87 Ab	2,73 Ab	2,90 Ab	2,81
UFPI 864	2,57 Ab	2,71 Ab	2,77 Ab	2,77 Ac	2,70
UFPI 873	2,43 Ac	2,73 Ab	2,70 Ab	2,67 Ac	2,63
UFPI 877	2,84 Aa	2,67 Ab	2,67 Ab	2,73 Ac	2,73
UFPI 928	2,53 Ab	2,51 Ab	2,55 Ab	2,60 Ac	2,54
UFPI 929	2,61 Ab	2,55 Ab	2,67 Ab	2,67 Ac	2,62

*As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo, enquanto que médias seguidas de mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si estatisticamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

4.1.8. Número de sementes por vagem (NSV)

A interação G x A foi não significativa (Tabela 17), no entanto, quando se decompõem as interações, observa-se que nos acessos UFPI 793, UFPI 810, UFPI 818, UFPI 852 e UFPI 854, teve interação significativa, sendo, assim, influenciados pelos ambientes para esse caráter. O CVa (8,88) foi maior que o CVg (6,49), mostrando uma influência ambiental considerável no número de sementes por vagens. A média geral é de 2,50 semente/vagem. Esses acessos que mostraram significância para interação foram os mesmos significativos para NLV, com exceção dos acessos UFPI 810 e UFPI 854, que foram significativos apenas para NSV. O coeficiente de determinação fenotípica do NSV teve o menor valor de todos os caracteres (86,49); esse baixo coeficiente e um alto CVa podem ter-se devido às variações observadas nos acessos que tiveram interação significativa.

Em feijão-fava, Carvalho (2012) não encontrou diferença significativa na aplicação de adubo orgânico e mineral, nem na interação dos dois adubos. Obteve também uma média de 2,4 sementes por vagem, próxima da encontrada aqui. Martins *et al.* (2015) não

encontraram diferenças significativas no NSV submetidos a diferentes tipos de fertilizantes, em feijão comum.

O número de grãos por vagem é definido pelo número de óvulos por vagem e pela frequência de aborto de embriões, sendo um fenótipo quantitativo controlado por vários genes. O conteúdo de óvulos no ovário é de um a quatro e seu número médio por vagem é determinado geneticamente (Tischner *et al*. 2003), sofrendo pouca influência de fatores que modifiquem o ambiente, tais como a aplicação de nutrientes (Carvalho, 2011). Assim, a ação do ambiente sobre a variação se dá pelas diferenças no número de abortos.

Tabela 17. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubações diferentes, para o número de sementes por vagem.

FV	GL	QM
Genótipos (G)	11	0,37**
Ambientes (A)	3	0,70**
G x A	33	$0,07^{ns}$
G / A	44	0,14**
A / G	36	0,12**
A / UFPI 793	3	0,27**
A / UFPI 810	3	0,14*
A / UFPI 817	3	$0,07^{ns}$
A / UFPI 818	3	0,17*
A / UFPI 852	3	0,44**
A / UFPI 854	3	0,13*
A / UFPI 859	3	$0,02^{ns}$
A / UFPI 864	3	$0,07^{ns}$
A / UFPI 873	3	$0,06^{ns}$
A / UFPI 877	3	$0,16^{ns}$
A / UFPI 928	3	$0,02^{ns}$
A / UFPI 929	3	$0,02^{ns}$
Resíduo	96	0,05
Média		2,50
CVa (%)		8,88
CVg (%)		6,49

*, **, ^{ns} = significativo a 5% e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Assim como para o NLV, os acessos UFPI 810 e UFPI 859 tiveram as maiores médias de NSV e os acessos UFPI 793, UFPI 818 e UFPI 852, as menores médias (Tabela 18). A maioria dos acessos teve números de sementes por vagem iguais estatisticamente, nos quatro ambientes. No entanto, os acessos UFPI 793, UFPI 818 e UFPI 854 tiveram médias menores e diferentes dos demais no a1, enquanto que o UFPI 810 e UFPI 852 tiveram diminuição no NSV em A1 e A2 (Figura 2H). Os demais não apresentaram diferenças significativas entres os ambientes. Todos os ambientes formaram dois grupos diferentes, mostrando a baixa variação dessa característica nos acessos estudados.

Tabela 18. Médias* do caráter número de sementes por vagem de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações.

	Ambiente 1	Ambiente 2	Ambiente 3	Ambiente 4	Médias
UFPI 793	1,90 Bb	2,40 Ab	2,50 Ab	2,57 Ab	2,34
UFPI 810	2,29 Ba	2,33 Bb	2,60 Aa	2,73 Aa	2,49
UFPI 817	2,70 Aa	2,82 Aa	2,87 Aa	3,07 Aa	2,86
UFPI 818	1,97 Bb	2,50 Ab	2,38 Ab	2,40 Ab	2,31
UFPI 852	1,94 Bb	2,10 Bb	2,60 Aa	2,73 Aa	2,34
UFPI 854	2,31 Ba	2,69 Aa	2,67 Aa	2,80 Aa	2,62
UFPI 859	2,61 Aa	2,77 Aa	2,73 Aa	2,77 Aa	2,72
UFPI 864	2,41 Aa	2,48 Ab	2,70 Aa	2,70 Aa	2,57
UFPI 873	2,23 Aa	2,17 Ab	2,27 Ab	2,50 Ab	2,29
UFPI 877	2,50 Aa	2,47 Ab	2,63 Aa	2,57 Ab	2,54
UFPI 928	2,50 Aa	2,44 Ab	2,30 Ab	2,47 Ab	2,43
UFPI 929	2,50 Aa	2,45 Ab	2,47 Ab	2,63 Aa	2,51

*As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo, enquanto que médias seguidas de mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si estatisticamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

4.1.9. Peso de 100 sementes (P100S)

O caráter Peso de 100 Sementes, através da ANOVA (Tabela 19) apresentou diferenças significativas para acessos, ambientes e interação GxA. O CVa e a variância da interação GxA (9,70) foram baixos, enquanto que o CVg foi alto, indicando maior variação genética. Carvalho (2012) não encontrou efeito significativo de adubo orgânico, mineral e a interação entre eles em feijão-fava. Em feijão comum, Martins *et al.* (2015) também não encontraram nenhum incremento significativo no P100S submetidos a diferentes fertilizantes, incluindo adubo orgânico e mineral.

A média de P100S foi de 60,51 gramas (g). Valores próximos foram encontrados por Assunção Filho (2012) (56,19 g) e Silva (2015) (58,82 g). Segundo Vieira (1992), o P100S tem grande variabilidade em feijão-fava, podendo variar de 30 g a 300 g. Valor menor foi encontrado por Carmo (2011) com uma média de 25,09 g, em acessos de hábito de crescimento determinado. O peso de cem grãos é importante na classificação do tamanho do grão de cultigrupos relacionados aos seus centros de origem e diversidade (Baudoin, 1988).

Tabela 19. Resumo da análise de variância conjunta com desdobramentos dos quadrados médios da interação de 12 genótipos de feijão-fava em quatro ambientes, com tipos de adubação diferentes, para o peso de cem sementes.

FV	GL	QM
Genótipos (G)	11	3531,43**
Ambientes (A)	3	99,10**
G x A	33	31,20**
G / A	44	906,26**
A / G	36	36,86**
Resíduo	96	2,09
Média		60,51
CVa (%)		2,39
CVg (%)		28,34

*, **, ^{ns} = significativo a 5% e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Os acessos UFPI 854, UFPI 877 e UFPI 929 apresentaram as maiores médias, 82,71 g, 74,69 g e 79,30 g, respectivamente (Tabela 20). Os dois primeiros tiveram maiores médias para CV e LV também. O acesso UFPI 793 tem uma das menores médias (37,59 g) para P100S, bem como maiores médias para CV, LV, NLV e NSV. Os acessos UFPI 817 e UFPI 873 também tiveram as menores médias de P100S (38,67 g e 32,21 g) e os menores CV. O menor P100S foi observado em A1 (29,81 g) e o maior no A4 (88,08 g). Para a maioria dos acessos o maior P100S ocorreu no A4, com exceção dos acessos UFPI 793, UFPI 928 e UFPI 929. Não houve um padrão de resposta nas médias dos acessos nos quatro ambientes: esses comportaram-se de maneira particular a cada um, mostrando a complexidade da expressão dessa característica (Figura 2I).

Carvalho (2012) encontrou peso de 100 grãos de 37,03 g, 35,90 g, 36,83 g e 36,23 g nos tratamentos sem adubo, adubo NPK, adubo orgânico e adubo NPK mais orgânico, respectivamente, mostrando que também não teve um padrão de resposta fenotípica. Essa característica é determinada principalmente pelos genótipos de cada acesso, mas pode variar dependendo das condições edafoclimáticas a que está submetida.

Tabela 20. Médias* do caráter Peso de Cem Sementes, em gramas, de 12 acessos de feijão-fava submetidos a quatro ambientes com diferentes adubações.

	Ambiente 1	Ambiente 2	Ambiente 3	Ambiente 4	Médias
UFPI 793	34,46 Ch	35,32 Ch	41,92 Af	38,68 Bh	37,59
UFPI 810	65,06 Cd	63,44 Ce	67,36 Bc	72,75 Ad	67,15
UFPI 817	34,72 Bh	39,44 Ag	40,35 Af	40,19 Ah	38,67
UFPI 818	49,17 Bg	55,10 Af	48,00 Be	54,74 Ag	51,75
UFPI 852	55,76 Cf	62,24 Be	65,63 Ac	65,88 Ae	62,38
UFPI 854	81,61 Ba	81,82 Bb	79,34 Ca	88,08 Aa	82,71
UFPI 859	74,50 Ab	70,64 Bd	73,25 Ab	72,95 Ad	72,83
UFPI 864	59,44 Ae	53,75 Bf	54,49 Bd	58,63 Af	56,58
UFPI 873	29,81 Bi	33,42 Ah	33,23 Ag	32,39 Ai	32,21
UFPI 877	75,37 Ab	75,21 Ac	72,43 Bb	75,77 Ac	74,69
UFPI 928	70,18 Ac	70,74 Ad	72,35 Ab	67,71 Be	70,25
UFPI 929	70,00 Cc	85,34 Aa	81,17 Ba	80,70 Bb	79,30

*As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo, enquanto que médias seguidas de mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si estatisticamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

4.1.10. Índice de Plasticidade Fenotípica (IPF)

Dentre as variáveis analisadas, o padrão do índice de plasticidade (IPF) tendeu a variar em relação aos acessos e às variáveis (Tabela 21). Adotando a classificação de Valladares *et al.* (2005), onde um IPF>0,6 é considerado muito plástico e um IPF próximo de zero é pouco plástico, pode-se afirmar que as características NVP e NSP foram muito plásticas. Isso é corroborado pelos altos e significativos valores ambientais e de interação GxA encontrados nas análises de variância dessas características, além das consideráveis diferenças nas médias nos diferentes ambientes. Essa maior plasticidade está ligada ao padrão de herança genética quantitativa, onde muitos genes colaboram para o fenótipo do caráter, sendo assim mais influenciado pelo meio em que se encontram.

Os caracteres NDF e LV tiveram as menores plasticidades, com valores de 0,06 e 0,09, respectivamente, sendo assim os mais robustos. Os demais caracteres também tiveram baixos índices de plasticidade para os tipos de adubação.

Para o NDF, que teve o menor IPF, os acessos variaram de 0,02 (UFPI 793) e 0,11 (UFPI 864 e UFPI 873). Isso pode ser explicado, por ser uma característica com alta contribuição genética. Os acessos com maiores IPF foram os mesmos que apresentaram uma interação GxA significativa, concordando com os dados da análise de variância. O ambiente 1 (sem adubação) foi o que apresentou maior número de dias para florescimento, isso mostra que a disponibilidade de nutrientes no solo é importante para que a planta consiga iniciar o florescimento. Segundo Taiz e Zeiger (2009), as condições que retardam o crescimento, tais como estresse hídrico e deficiências minerais, tendem a prolongar a fase vegetativa da planta e assim retardar o florescimento. Esses resultados indicam também

que os genótipos podem apresentar plasticidades diferenciadas de acordo com as condições de nutrientes no solo.

O NDM teve o terceiro maior índice de plasticidade (0,15). O acesso UFPI 818 teve a menor plasticidade para maturação, mantendo o padrão fenotípico em meio às diferentes disposições nutricionais do solo, sendo assim robusto para essa característica. Já os acessos UFPI 793 e UFPI 877 foram os mais plásticos para a maturação, com um IPF de 0,20 e 0,18, respectivamente. Quando se observa o NDM desses acessos em cada ambiente, nota-se uma diminuição do ciclo de 29 e 27 dias no ambiente sem adubação (A1).

Para a característica NVP, os IPFs foram bem altos, sendo assim uma característica bastante plástica para todos os acessos. Os menores IPFs foram observados nos acessos UFPI 817 (0,67) e UFPI 928 (0,68), mas ainda assim são acima de 0,6, sendo considerados muito plásticos. São altamente plásticos os acessos UFPI 793 (0,91) e UFPI 852 (0,90), variando o número de vagens nos ambientes de 5 a 56 (aumento de 51 vagens) e 6 a 63 (aumento de 57 vagens), respectivamente. Essa característica é considerada uma das mais influenciáveis pelo meio em diferentes culturas, como soja, feijão e feijão-caupi.

Houve também alta plasticidade no NSP, tendo o mesmo valor de IPF (0,82) do NVP. Esse mesmo padrão de resposta é esperado, visto que essas características estão correlacionadas. Os acessos com maiores e menores plasticidades foram os mais plásticos e menos plásticos também para NVP, tendo índices de plasticidade semelhantes. Os acessos mais plásticos UFPI 793 e UFPI 852 tiveram diferenças entre os ambientes de maior e menor número de sementes de 103 e 146 sementes, respectivamente.

Essa diminuição no número de vagens e sementes por planta pode estar relacionada à alocação de recursos, onde as plantas reduzem o número de vagens e sementes e priorizam a qualidade das mesmas. Vale observar que houve pouco crescimento vegetativo das plantas no ambiente 1, tendo um maior desenvolvimento nos ambientes 3 e 4.

O comprimento da vagem teve pouca plasticidade (0,12). Os acessos com menor IPF foram UFPI 817 e UFPI 928 com 0,07, enquanto que os acessos UFPI 818 e UFPI 852 foram mais plásticos (0,24 e 0,20). Para a largura da vagem encontrou-se o segundo menor IPF (0,09). Os acessos com menores IPF para LV também tiveram os menores para CV, UFPI 817 (0,03) e UFPI 928 (0,04).

As características NLV e NSV tiveram índices de plasticidade próximos (0,11 e 0,14), isso ocorre devido a relação direta entre as mesmas. Os acessos UFPI 793 e UFPI 818 tiveram valores maiores para NLV (0,23 e 0,22) e NSP (0,26 e 0,21), e o acesso UFPI 852 teve a maior plasticidade para NSP (0,29). Já os acessos UFPI 928 e UFPI 929 tiveram os menores IPFs para NLV (0,03 e 0,04). Para o NSV, menores IPFs foram encontrados em UFPI 859 e UFPI 877. A maior plasticidade do NSV se deve à ocorrência de abortos dos

embriões, não produzindo sementes, podendo ser afetados pela disponibilidade de nutrientes.

O peso de cem sementes tem baixo índice de plasticidade fenotípica de 0,11, confirmando a baixa variância da interação GxA mostrada pela análise de variância. O IPF variou de 0,04 (UFPI 877) a 0,18 (UFPI 793 e UFPI 929). Essa característica tem uma alta contribuição genética de cada acesso, sendo menos influenciável pelas condições ambientais. A qualidade das sementes é importante para plantas que produzem sementes, pelo fato de serem o meio de propagação e sobrevivência das espécies vegetais.

Tabela 21. Índice de plasticidade fenotípica (IPF) de nove caracteres* de 12 acessos de feijão-fava, crescidos em quatro ambientes.

	NDF	NDM	NVP	NSP	CV	LV	NLV	NSV	P100S	Médias
UFPI 793	0,05	0,20	0,91	0,92	0,13	0,19	0,23	0,26	0,18	0,34
UFPI 810	0,02	0,14	0,81	0,78	0,12	0,10	0,15	0,16	0,13	0,27
UFPI 817	0,10	0,12	0,67	0,66	0,07	0,03	0,06	0,12	0,14	0,22
UFPI 818	0,07	0,08	0,85	0,86	0,24	0,10	0,22	0,21	0,13	0,31
UFPI 852	0,04	0,13	0,90	0,91	0,20	0,17	0,14	0,29	0,15	0,33
UFPI 854	0,06	0,17	0,85	0,88	0,09	0,07	0,12	0,17	0,10	0,28
UFPI 859	0,04	0,14	0,80	0,78	0,08	0,06	0,06	0,05	0,05	0,23
UFPI 864	0,11	0,13	0,89	0,88	0,13	0,10	0,07	0,11	0,10	0,28
UFPI 873	0,11	0,16	0,78	0,72	0,08	0,06	0,11	0,13	0,11	0,25
UFPI 877	0,04	0,18	0,87	0,87	0,12	0,10	0,06	0,06	0,04	0,26
UFPI 928	0,04	0,14	0,68	0,68	0,07	0,04	0,03	0,08	0,06	0,20
UFPI 929	0,10	0,16	0,82	0,85	0,13	0,10	0,04	0,07	0,18	0,27
Médias	0,06	0,15	0,82	0,82	0,12	0,09	0,11	0,14	0,11	0,27

*Número de dias para o florescimento (NDF), número de dias para maturação (NDM), número de vagens por planta (NVP), número de sementes por planta (NSP), comprimento de vagem (CV), largura da vagem (LV), número de lóculos por vagem (NLV), número de sementes por vagem (NSV) e peso de cem sementes (P100S)

4.1.11. Correlação entre caracteres

As correlações de Pearson entre os caracteres e as probabilidades pelo Teste T foram realizadas (Tabela 22).

A característica NDF mostrou correlação positiva e significativa com o NVP, NSP e NLV. Quanto maior o tempo até o florescimento, maiores foram a produção de vagens e sementes. Isso se deve ao fato de plantas com um maior aporte de nutrientes, possuírem todos os aparatos nutricionais para o florescimento e para a formação de mais vagens e sementes, bem como de vagens com mais lóculos. Enquanto que o déficit de nutrientes disponíveis tende a retardar o período reprodutivo e a quantidade produzida.

O número de dias para florescimento não teve correlação significativa com as demais características, para o coeficiente total. No entanto, para o NDM, o ambiente 1 mostrou correlação positiva, onde uma precocidade no florescimento, resultou em um período de maturação das plantas mais curto. Em relação ao P100S, houve correlação negativa e significativa no A1, sugerindo que a precocidade pode estar associada a aumento no peso das sementes. Isso pode ser resultado de uma otimização das plantas, onde a pouca disponibilidade de nutrientes, leve a diminuição do ciclo de vida, para alocação de recursos na formação das sementes. Segundo Lloyd (1979), em ambientes “hostis”, um tamanho de semente grande é mais vantajoso.

Em estudos com acessos de feijão-fava, Carmo (2011) encontrou correlações fenotípicas para NDF altas e positivas com NDM e LV e negativas para NGV e P100S. Já Silva (2015) achou correlações positivas de NDF com P100S e CV. Assunção Filho (2012), obteve correlação apenas com NDM, sendo esta positiva. Em feijão-caupi, o florescimento mostrou-se correlacionado diretamente com a maturação e número de sementes por vagem (Correa *et al.* 2012). Essas diferenças encontradas estão relacionadas aos diferentes genótipos usados, bem como às condições ambientais em que os genótipos são avaliados.

Quanto ao NDM, só houve correlação em relação ao NVP no A1 e para NSP em A1 e A3, sendo positiva. Portanto, plantas com ciclos de vida maiores resultaram em maior produção de vagens e sementes. Isso é evidenciado quando se observa as médias dos acessos, onde o UFPI 817 e UFPI 873, tiveram os maiores valores para NDF, NDM, NVP e NSP, no ambiente 1. No entanto, Assunção Filho (2012) avaliando plantas de variedades locais em campo, encontrou uma correlação negativa entre NDM e NVP, indicando que a correlação entre ciclo de maturação e quantidade de vagens, pode ser alterada dependendo dos genótipos e das condições ambientais.

O número de vagens por plantas está diretamente relacionado com o NSP, tendo ambos o mais alto valor de correlação (0,9892), bem próximo de 1, que é o valor máximo. Assim, quando se aumenta o NVP, consequentemente o NSP aumenta linearmente. Correlações negativas ocorreram com o CV e P100S, sendo significativas nos ambientes 3 e 4, o que mostra que as plantas que têm nutrientes à disposição, podem ter aumento no número de vagens, mas diminuir o comprimento das vagens e o peso das sementes.

Assunção Filho (2012) encontrou correlações diretas de NVP com CV, LV e P100S. Essas correlações podem estar relacionadas à constituição genética das variedades usadas, que produzem um número de vagens e sementes, assim como dimensões acima das médias geralmente encontradas. Em feijão-caupi, Souza (2005) observou correlações positivas com CV, LV, NGV e P100S.

A característica NSP está correlacionada positivamente com NLV, com exceção do A1, onde não houve correlação. Assim, quanto maior o número de lóculos nas vagens,

maior a quantidade de sementes que a planta produzirá. No ambiente 1, houve redução no NSP independente do NLV, devido à pouca disponibilidade de nutrientes no solo.

Já a correlação NSP x P100S teve uma correlação negativa. A correlação negativa do P100S com o NVP e NSP pode ser devido a mecanismos de adaptação das plantas. Os custos para aumentar o peso de sementes podem gerar redução no número de vagens e sementes produzidas por planta, por meio de mecanismos de compensação de investimentos energéticos, conhecidos por “trade-offs” (Stearns, 1989). Assim, a produção de sementes maiores nas plantas, observada em alguns acessos (UFPI 859, UFPI 864, 877, UFPI 928), no ambiente 1 que é pobre em nutrientes, passaria a ser compensada pela redução significativa no número de vagens e sementes produzidas, visto estarem esses caracteres negativamente correlacionados.

O comprimento da vagem está altamente e positivamente correlacionado com a LV e o P100S, e estes dois entre si. O mesmo foi observado por Assunção Filho (2012) em variedades locais do Piauí. Isso evidencia que quanto maior o comprimento da vagem espera-se que a largura tenha valores maiores, bem como que as sementes sejam maiores e mais pesadas. Esse padrão é observado nos acessos UFPI 854 e UFPI 877, que possuem as maiores médias de dimensões de vagem e P100S. O NLV teve uma correlação alta com CV no ambiente 4, mas não foi significativa, mostrando que um aumento no número de lóculos nem sempre resulta em aumento no CV. Carmo (2011) encontrou também correlação positivas com NLV e NSV.

Os caracteres NLV e NSV têm uma correlação alta e direta, sendo assim esperado, visto que o número de lóculos delimita o número máximo de sementes na vagem, não sendo uma correlação completa devido a ocorrência de abortos das sementes, que tem maior influência ambiental, levando assim a diminuição de do número de sementes por vagem. Altos valores também foram encontrados por Carmo (2011) (0,928) e Assunção Filho (2012) (0,780).

Santos e Vencovsky (1986) afirmam que para um mesmo par de caracteres, podem ser encontradas estimativas com sinal diferentes. Isso é devido a essas correlações terem sido estimadas em diferentes genótipos e ambientes.

Tabela 22. Estimativas de coeficientes de correlação de Pearson dos caracteres número de dias para o florescimento (NDF), número de dias para maturação (NDM), número de vagens por planta (NVP), número de sementes por planta (NSP), comprimento de vagem (CV), largura da vagem (LV), número de lóculos por vagem (NLV), número de sementes por vagem (NSV) e peso de cem sementes (P100S) de 12 acessos de feijão-fava em quatro ambientes.

Variáveis	Correlação (r)				
	Ambiente 1	Ambiente 2	Ambiente 3	Ambiente 4	Todos os ambientes
NDF x NDM	0,6239*	-0,0233^{ns}	0,4481^{ns}	0,3513^{ns}	0,4379^{ns}
NDF x NVP	0,9115**	0,8261**	0,7816**	0,8069**	0,8668**
NDF x NSP	0,8912**	0,8576**	0,8383**	0,8100**	0,8861**
NDF x CV	-0,3971^{ns}	-0,3206^{ns}	-0,4085^{ns}	-0,5200^{ns}	-0,4293^{ns}
NDF x LV	-0,0538^{ns}	-0.0159^{ns}	-0,1312^{ns}	-0,2482^{ns}	-0,1166^{ns}
NDF x NLV	0,5513^{ns}	0,7803**	0,7236**	0,6845*	0,8058**
NDF x NSV	0,3363^{ns}	0,3789^{ns}	0,3275^{ns}	0,6023*	0,4888^{ns}
NDF x P100S	-0,6098*	-0,4570^{ns}	-0,5037^{ns}	-0,5594^{ns}	-0,5512^{ns}
NDM x NVP	0,6557*	0,3573^{ns}	0,5606^{ns}	0,4456^{ns}	0,6353*
NDM x NSP	0,6560*	0,2564^{ns}	0,5807*	0,4362^{ns}	0,6204*
NDM x CV	-0,2417^{ns}	0,0421^{ns}	-0,2470^{ns}	-0,4780^{ns}	-0,2633^{ns}
NDM x LV	0,1036^{ns}	0,4480^{ns}	0,2057^{ns}	0,1614^{ns}	0,2056^{ns}
NDM x NLV	0,2749^{ns}	-0,1374^{ns}	0,2921^{ns}	0,4007^{ns}	0,2702^{ns}
NDM x NSV	0,0488^{ns}	-0,2813^{ns}	-0,0223^{ns}	0,3159^{ns}	-0,0681^{ns}
NDM x P100S	-0,3345^{ns}	0,0774^{ns}	-0,2303^{ns}	-0,3479^{ns}	-0,2824^{ns}
NVP x NSP	0,9963**	0,9858**	0,9681**	0,9823**	0,9892**
NVP x CV	-0,3156^{ns}	-0,4530^{ns}	-0,6256*	-0,6428*	-0,6084*
NVP x LV	0,0323^{ns}	-0,0461^{ns}	-0,1283^{ns}	-0,1068^{ns}	-0,1289^{ns}
NVP x NLV	0,5563^{ns}	0,5686^{ns}	0,4904^{ns}	0,5445^{ns}	0,5501^{ns}
NVP x NSV	0,4906^{ns}	0,1607^{ns}	-0,0328^{ns}	0,4556^{ns}	0,2564^{ns}
NVP x P100S	-0,5178^{ns}	-0,5635^{ns}	-0,6408*	-0,6125*	-0,6560*
NSP x CV	-0,3088^{ns}	-0,5352^{ns}	-0,5032^{ns}	-0,6188*	-0,5622^{ns}
NSP x LV	0,0467^{ns}	-0,1139^{ns}	0,0322^{ns}	-0,0524^{ns}	-0,0646^{ns}
NSP x NLV	0,5487^{ns}	0,7338**	0,6258*	0,5683*	0,7104**
NSP x NSV	0,4955^{ns}	0,2030^{ns}	0,1042^{ns}	0,5203^{ns}	0,3447^{ns}
NSP x P100S	-0,5794*	-0,5860*	-0,5083^{ns}	-0,4960^{ns}	-0,5823*
CV x LV	0,8326**	0,7221**	0,7367**	0,7030*	0,7554**
CV x NLV	0,3010^{ns}	0,2241^{ns}	0,3105^{ns}	0,4137^{ns}	0,2056^{ns}
CV x NSV	0,4125^{ns}	0,2110^{ns}	0,0139^{ns}	-0,2502^{ns}	0,0864^{ns}
CV x P100S	0,8577**	0,7310**	0,8047**	0,6946*	0,7946**
LV x NLV	0,4233^{ns}	-0,0025^{ns}	0,0474^{ns}	0,0072^{ns}	0,1649^{ns}
LV x NSV	0,4613^{ns}	0,3136^{ns}	0,1178^{ns}	0,1892^{ns}	0,2748^{ns}
LV x P100S	0,7287**	0,7502**	0,7056*	0,6437*	0,7266**
NLV x NSV	0,8164**	0,7207**	0,7295**	0,9551**	0,8276**
NLV x P100S	0,2317^{ns}	-0,4031^{ns}	-0,1735^{ns}	-0,1742^{ns}	-0,1309^{ns}
NSV x P100S	0,3741^{ns}	0,1940^{ns}	0,2123^{ns}	0,0345^{ns}	0,2431^{ns}

*, **, ^{ns} = significativo a 5% e 1% de e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

4.2. Diversidade de marcadores cloroplastidiais

Foram testados 14 locos cpSSR dos quais nove amplificaram, mas apenas cinco foram polimórficos, revelando dois alelos cada (Tabela 23). O baixo polimorfismo encontrado é um resultado comum em estudos com cpSSR, que, devido a sua conservação genética por baixa ocorrência de mutações e a herança uniparental, não necessariamente mostram altos níveis de polimorfismos dentro de espécies (Ebert e Peakall, 2009). Angioi *et al*. 2009b,

também encontraram de dois a três alelos por locos, em acessos de feijão comum. O loco CP1 apresentou os maiores índices de diversidade gênica e de Shannon.

Tabela 23. Estimativas de diversidade genética para os locos cpSSR polimórficos em 44 acessos de feijão-fava. A = número de alelos, I = Índice de Shannon, h = diversidade gênica

Locos	**A**	**I**	**h**
SSR07	2	0,023	0,009
SSR12	2	0,170	0,113
SSR19	2	0,120	0,082
CP1	2	0,242	0,166
ccmp2	2	0,000	0,000

Os acessos de feijão-fava originados do México apresentaram valores maiores de número médio de alelos, de índices de diversidade gênica e de Shannon e de polimorfismo entre os países (Tabela 24). Esses resultados são esperados, visto que esses acessos são da variedade silvestre. Segundo Martínez-Castillo *et al.* (2008), valores altos de diversidade genética, geralmente estão associados ao conjunto gênico de feijão-fava silvestre e a variedade domesticada apresenta baixos valores de diversidade. Os acessos do Brasil apresentaram valores de diversidade consideráveis e próximos aos acessos mexicanos. Os acessos da Colômbia e da Argentina apresentaram apenas um alelo cada.

Quando se analisa em nível de variedade, os acessos domesticados apresentam maior diversidade, devido à maior quantidade de acessos e à contribuição dos dois acessos do Peru para o aumento dos índices de diversidade. Os altos níveis de diversidade genética podem se dever a pressões de seleção de diferentes populações humanas que os cultivam, além de estarem sendo representadas por uma maior cobertura geográfica, enquanto que os acessos silvestres são oriundos do mesmo país e de locais próximos. Serrano-Serrano *et al*. (2012) e Andueza-Noh *et al*. (2013) encontram maiores valores de diversidade em acessos silvestres que nos domesticados.

Tabela 24. Estimativas de diversidade genética de locos cpSSR nos grupos de acessos de diferentes países e variedades. A_m = número médio de alelos, I = Índice de Shannon, h = diversidade gênica, %P = porcentagem de polimorfismo

Países/variedades	**$\hat{A}_m$**	**I**	**h**	**%P**
Brasil	1,4	0,168	0,111	40%
Peru	1,2	0,135	0,096	20%
Colômbia	1,0	0,000	0,000	0%
Argentina	1,0	0,000	0,000	0%
México	1,6	0,252	0,163	60%
Domesticados	1,8	0,308	0.191	80%
Silvestres	1,6	0,248	0,160	60%

Os cinco locos de cpSSR formaram oito haplótipos cloroplastidiais diferentes (Tabela 25). Sendo que os haplótipos 1 e 3 foram formados pelos acessos do Peru e do México, respectivamente. Um haplótipo com seis indivíduos foi formado por acessos do Peru e da Colômbia. Esses haplótipos exclusivos evidenciam o alto grau de diferenciação genética dos acessos.

Tabela 25. Haplótipos cloroplastidiais obtidos para acessos de diferentes países de origem e variedade, com base em cinco locos cpSSR.

Haplótipo	**SSR07**	**SSR12**	**SSR19**	**CP1**	**ccmp2**	**Contagem**
1	328	228	399	130	223	2
2	329	228	399	130	223	18
3	329	228	399	131	221	2
4	329	228	399	131	223	43
5	329	228	405	131	223	24
6	329	278	399	130	223	43
7	329	278	399	131	221	6
8	329	278	399	131	223	26

A rede de haplótipos mostrou a existência de grupos consistente quanto à origem dos acessos (Figura 3). Dos oito haplótipos encontrados, quatro foram encontrados apenas nos acessos do México (haplótipos 1, 2, 4 e 5); apenas o haplótipo 4 foi encontrado tanto no acesso UFPI 873 do Brasil quanto no acesso domesticado do México (JMC1383). O haplótipo 4 pode ser considerado ancestral, de acordo com o posicionamento na rede de haplótipos e alta frequência nas amostras. Derivam a partir dele os haplótipos 2 e 5, presentes exclusivamente nos silvestres, e o haplótipo 8, com acessos do Brasil e Argentina. Os haplótipos 1, 6 e 7 derivam de 2 e 3. Os haplótipos 3 e 7 estão presentes nos acessos peruanos, que são os únicos andinos. Serrano *et al*. (2010) sugere uma origem

andina para o feijão-fava com três separações precoces nos três pools gênicos (Andino, Mesoamericano I e II), que evoluíram principalmente por isolamento. No presente estudo, a pequena amostragem de acessos andinos e a falta de variedades silvestres andinas dificultou a obtenção de padrões claros para confirmar essa hipótese.

Os acessos do Brasil apresentaram apenas os haplótipos 6 e 8. O haplótipo 8 também está presente no acesso da Argentina. O acesso Argentino é de origem mesoamericana, daí estar próximo aos brasileiros que também são mesoamericanos. A existência de haplótipos únicos em acessos domesticados poderia se dever à falta de amostragem de acessos silvestres com tais haplótipos ou ser resultado de novos alelos que se originaram durante o processo de domesticação do feijão-fava.

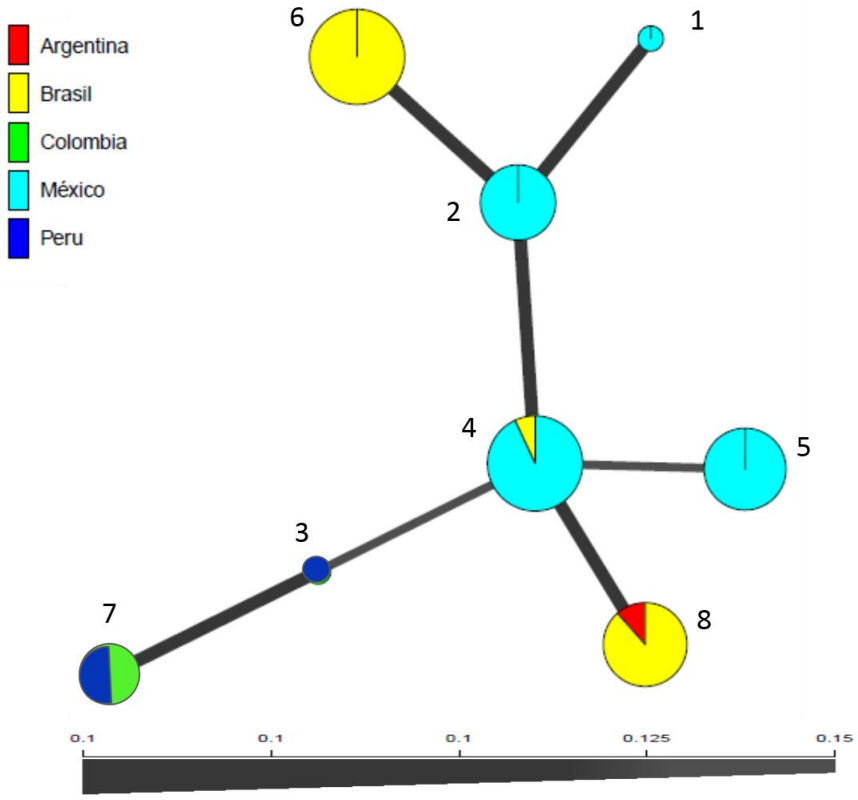

Figura 3. Rede de haplótipos observados em acessos de feijão-fava. Cada círculo representa um haplótipo, e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Diferentes cores representam acessos de países diferentes.

A distribuição da variabilidade genética nos grupos foi feita por meio da AMOVA (Tabela 26), que mostra que a maior parte da variação, quando se consideram os diferentes países de origem, está entre os grupos de países, tendo uma baixa variação dentro (6%) e uma diferenciação entre os países bem alta (F_{st} = 0,874). Quando se comparam os acessos silvestres com os domesticados, a maior proporção de variação está entre as variedades (87%), com alta diferenciação genética (F_{st} = 0,944). Altos níveis de diferenciação genética

observada entre os acessos mostram a variabilidade genética nos diferentes países, além de evidenciar a distinção entre variedades domesticadas e silvestres. Alta diferenciação é esperada devido ao predomínio de autofecundação da espécie, onde diminui a diversidade dentro das populações e aumentam as diferenças entre as populações.

Tabela 26. Análise de variância molecular (AMOVA) baseada em cinco locos cpSSR para diferentes acessos de feijão-fava. G.L. = graus de liberdade.

Fonte de variação	**G.L.**	**Porcentagem da variação (%)**	**Estatística F**
Entre países	4	94%	0,874**
Dentro de países	163	6%	
Entre variedades domesticadas e silvestres	1	87%	0,944**
Dentro de variedades domesticadas e silvestres	163	13%	

**Significativo com *p*<0,01.

A análise de componentes principais (ACP) mostrou que os dois primeiros componentes retiveram 99,94% da variação total (Figura 4). Houve a formação de dois grupos de acessos. O agrupamento 1 foi formado pelo acesso UFPI 873 (Brasil) e os acessos do México, incluindo o único acesso única variedade domesticado do México (JMC1383). No segundo agrupamento estão os acessos brasileiros (exceto o acesso UFPI 873), juntamente com os acessos da Argentina, Colômbia e Peru. Esses agrupamentos são congruentes com a distribuição dos haplótipos, em que os acessos com os haplótipos 1, 2, 4 e 5, com todos os silvestres, estão nos acessos do grupo 1 e os demais haplótipos, nos acessos do grupo 2.

Essa divisão mostra a diferenciação acentuada dos acessos mexicanos com os demais. O México é considerado um importante centro de diversidade genética de populações silvestres, bem como o centro de domesticação do pool gênico mesoamericano, que contém variedades domesticadas e silvestres (Martínez-Castillo *et al*. 2014).

Os acessos do México fazem parte do *pool* gênico mesoamericano; no entanto, pouca informação se tem sobre o *pool* gênico do Brasil e como ocorreu o processo de domesticação aqui. Essa relação próxima entre acessos silvestres mexicanos e domesticados brasileiros pode indicar que acessos de feijão-fava do Brasil foram resultantes do processo de domesticação de plantas silvestres do México. No entanto, é necessária a realização de mais estudos para a confirmação dessa hipótese.

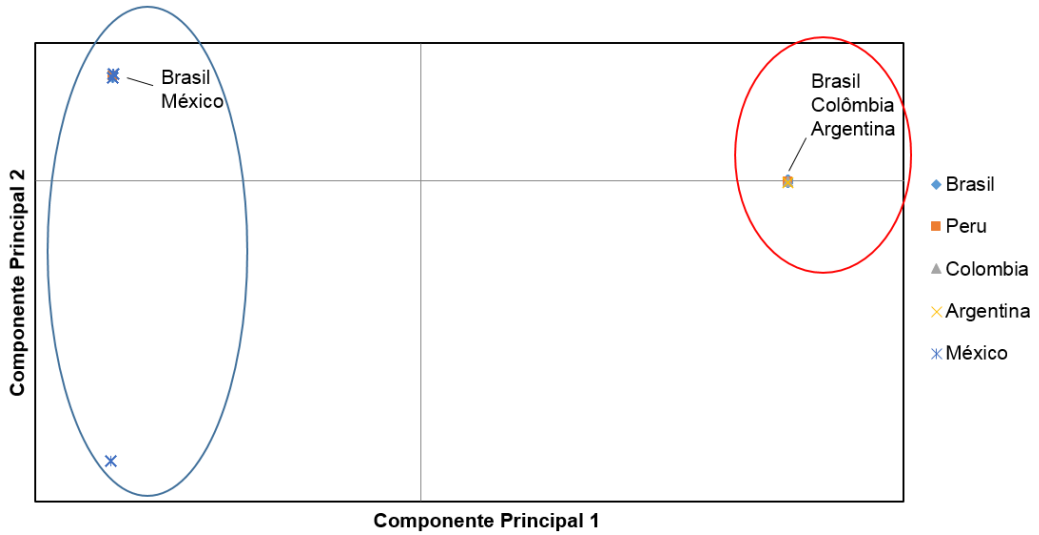

Figura 4. Análise de Componentes Principais (ACP) com base em cinco locos cpSSR para 44 acessos de feijão-fava. Os círculos azul e vermelho indicam a formação de grupo 1 e 2, respectivamente.

Com o objetivo de analisar o efeito fundador da domesticação no feijão-fava no Brasil, a diversidade genética foi comparada entre acessos domesticados do Brasil e silvestres do México, obtendo a porcentagem de redução da diversidade genética (%r). Como resultado, encontrou-se uma redução de 30,62% da diversidade entre acessos domesticados do Brasil e silvestres do México. Muitos trabalhos também apresentaram redução da diversidade genética com a domesticação em feijão-fava (Motta-Aldana *et al*. 2010; Serrano-Serrano *et al*. 2012; Andueza-Noh *et al*. 2015), chegando até a 93% (Andueza-Noh *et al*. 2013). A redução da diversidade genética é uma consequência da domesticação observada em plantas, confirmada através de diversos marcadores bioquímicos e moleculares. O contrário ocorre com dados fenotípicos, devido a estarem sujeitos a diferentes fatores evolutivos (Gepts, 2004).

4.3. Diversidade genética de feijão-fava por marcadores microssatélites nucleares

A partir de duas bibliotecas genômicas construídas durante a execução deste projeto, encontraram-se apenas oito microssatélites. Quatro marcadores SSR foram amplificados e três foram polimórficos e usados para caracterização genética dos acessos de feijão-fava (Tabela 27).

Foi encontrado um número total de 10 alelos para os três locos analisados (Figura 5), sendo três para FF01 e FF08 e quatro para FF05. Cinco alelos foram considerados privados, estando o alelo 248 (FF05) presente apenas nos acessos brasileiros, e os alelos 249 (FF01), 271 e 274 (FF05) e 180 (FF08) sendo restritos aos acessos do México. O maior número de alelos exclusivos dos acessos mexicanos pode estar relacionado ao *pool* gênico

silvestre a que pertencem. Vários estudos mostram maior polimorfismo e maior número de alelos encontrados em acessos silvestres quando comparados aos domesticados (Martínez-Castillo *et al*. 2014; Andueza-Noh *et al*. 2015).

Tabela 27. Marcadores SSR sintetizados, com seus respectivos motivos e tamanhos esperados.

Locos	Sequência	Motivo	Tamanho (pb)
FF01	F: TGGTATTTTGGGATAGCGAGA R: GTGCAATATGGTCAAAACAGAG	$TA_{(6)}$	220-260
FF05	F: TCTGCGTCTTTTTCGTGCT R: AAAGATTTGCCCTCAACTGG	$CTT_{(5)}$	230-280
FF08	F: TACCAGCCGAACCAGATAAC R: GAGTGACTTGATCCCTTCCC	$TA_{(6)}$	130-180

O número de alelos encontrados aqui está abaixo daqueles citados na maioria dos trabalhos com SSR nucleares de feijão comum usados em feijão-fava. Montero-Rojas *et al*. (2013) encontraram um número de alelos variando de 1 a 8 e uma média de 2,6 por loco, a partir de 24 locos desenvolvidos em feijão comum e transferidos para feijão-fava. Já Assunção Filho (2011), usando dois locos SSR, obteve 2 e 3 alelos, em variedades locais de feijão-fava do Piauí. A baixa variabilidade dos locos aqui encontrada pode estar associada à localização desses locos em regiões do DNA mais conservadas, que sofram menos substituições.

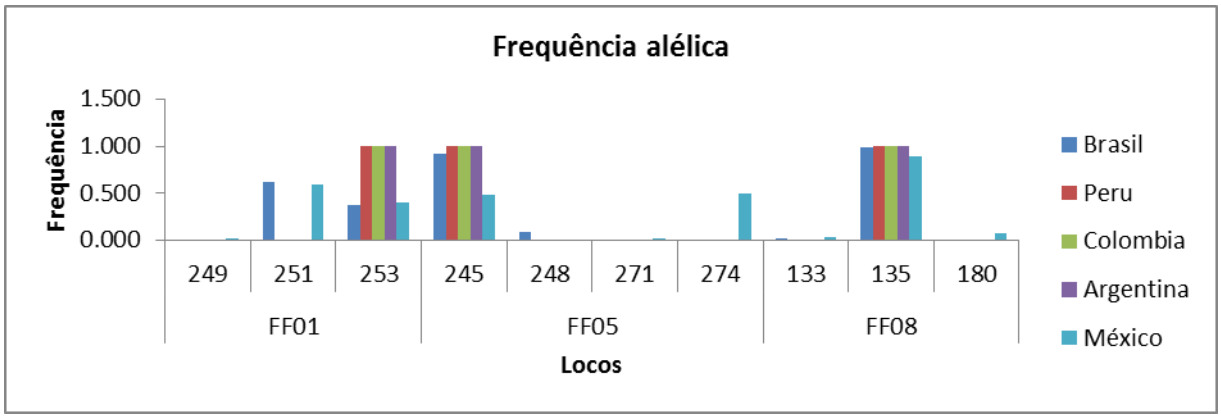

Figura 5. Gráfico das frequências alélicas dos três locos de SSR, estimados em 44 acessos de feijão-fava de diferentes países e variedades.

As heterozigoses médias observada e esperada foram bem diferentes para os locos FF01 e FF05, sendo H_O bem menor. Para o FF08, a H_O e H_E foram próximas, mas a heterozigosidade esperada ainda foi maior, resultando em coeficientes de endogamia (*f*) altos (Tabela 28). Esses valores indicam baixa diversidade genética e alta taxa de

endogamia para esses locos. Esses resultados já eram esperados, visto que é uma espécie mista com predominância de autogamia. Em espécies autógamas, como o feijão, são encontrados valores de H_O muito baixos ou nulos (Burle *et al*. 2010).

Em feijão-fava, baixos valores de H_O também foram observados por Martínez-Castillo *et al*. (2014), que, usando 10 locos SSR, encontraram valores de H_O = 0,00 e H_E = 0,43 para populações silvestres do México. Andueza-Noh *et al*. (2015) também encontraram baixo H_O (0,040), mas um alto H_E (0,67), juntamente com o coeficiente de fixação bem alto (0,943), em 155 acessos domesticados e silvestres.

Tabela 28. Estimativas de diversidade genética de três locos ncSSR avaliados em 44 acessos de feijão-fava. A = número de alelos, H_O = heterozigosidade observada, H_E = heterozigosidade esperada e estimativa de coeficiente de endogamia (*f*).

Locos	**A**	**H_O**	**H_E**	***f***
FF01	3	0,002	0,192	0,988
FF05	4	0,048	0,134	0,767
FF08	3	0,038	0,045	0,514
Médias	**3,33**	**0,029**	**0,124**	**0,756**

O número médio de alelos foi maior para os acessos do México. A heterozigosidade esperada ou índice de diversidade genética foi consideravelmente alta para os acessos do México e Brasil. Os demais não tiveram valores significativos, provavelmente devido ao pequeno tamanho amostral (Tabela 29).

Em relação às variedades, os acessos silvestres mostraram um valor maior de H_E em relação aos domesticados, o que é esperado em espécies domesticadas, devido ao efeito fundador. Valores maiores de diversidade são descritos em acessos silvestres. Andueza-Noh *et al*. (2015) encontraram H_E de 0,68 em acessos silvestres e 0,56 em domesticados em 155 acessos usando 10 locos SSR. No entanto, Ouédraogo *et al*. (2005) encontraram baixa heterozigosidade em populações silvestres da Costa Rica (H_E=0,143). Já em variedades locais do Caribe, foi encontrada heterozigosidade de 0,34 (Montero-Rojas *et al*. 2013). Esses diferentes valores entre variedades podem ser atribuídos a diferentes tamanhos amostrais, ao número de locos usados, e, principalmente, à composição genética das populações estudadas.

Só os acessos mexicanos apresentaram heterozigosidade observada. Os acessos do Brasil não apresentaram indivíduos heterozigotos. Os acessos do Peru, Colômbia e Argentina apresentaram apenas um alelo por loco, tendo os demais parâmetros de diversidade nulos. Essa baixa diversidade genética dos acessos brasileiros é confirmada também pelos cpSSR, que mostrou a perda de diversidade em relação aos mexicanos.

Em relação às variedades, o A_m e a heterozigosidade observada (H_O) foram maiores nos acessos silvestres, mas sendo H_O menor que H_E, indicando assim a presença de endogamia (0,47). Os acessos domesticados tiveram baixa H_O, mostrando uma maior presença de indivíduos homozigotos, daí o alto índice de fixação. Menores diversidades são esperadas para espécies domesticadas devido ao efeito fundador.

Tabela 29. Estimativas de diversidade genética de três locos ncSSR avaliados em 44 acessos de feijão-fava, considerando diferentes países e variedades. Número de indivíduos (N), número médio de alelos (A_m), heterozigosidades observada (Ho) e esperada (H_E) e coeficiente de fixação (*f*).

Países/variedades	N	$\hat{A}_m$	H_O	H_E	*f*
Brasil	69	2	0,0	0,22	1,0
Peru	5	1	0,0	0,0	0,0
Colômbia	3	1	0,0	0,0	0,0
Argentina	3	1	0,0	0,0	0,0
México	84	3	0,15	0,39	0,51
Domesticados	85	2,3	0,02	0.24	0,85
Silvestres	79	3,0	0,14	0,38	0,47
Média		2,67	0,08	0,31	0,66

O número de agrupamentos mais provável encontrado a partir da análise Bayesiana realizada no programa *Structure* com os 44 acessos de feijão-fava foi K=2 (Figura 6). No agrupamento 1 estão representados todos os países, no total de 20 acessos. Os acessos do Brasil e do México estão representados nos dois grupos, no entanto, estão em maior proporção no grupo 2, sendo 14 acessos do Brasil e 10 acessos do México.

A análise de componentes principais mostrou o mesmo padrão de agrupamentos (Figura 7) que a análise Bayesiana, onde os dois primeiros componentes explicam 86,84% da variação observada. Em um agrupamento ficaram os acessos do Peru, da Colômbia e Argentina, juntamente com alguns acessos brasileiros e mexicanos. No segundo agrupamento, observa-se os acessos restantes do Brasil e do México. Também foram formados dois grupos com cpSSR, o que corrobora os resultados com ncSSR.

Esses resultados mostram que os acessos domesticados e silvestres não formam grupos homogêneos distintos, mostrando uma relação complexa de ancestralidade dos acessos silvestres e domesticados, podendo ser em parte causado pelo fluxo gênico, que ocorre livremente entre as variedades. E também pelo baixo caráter informativo dos locos usados aqui.

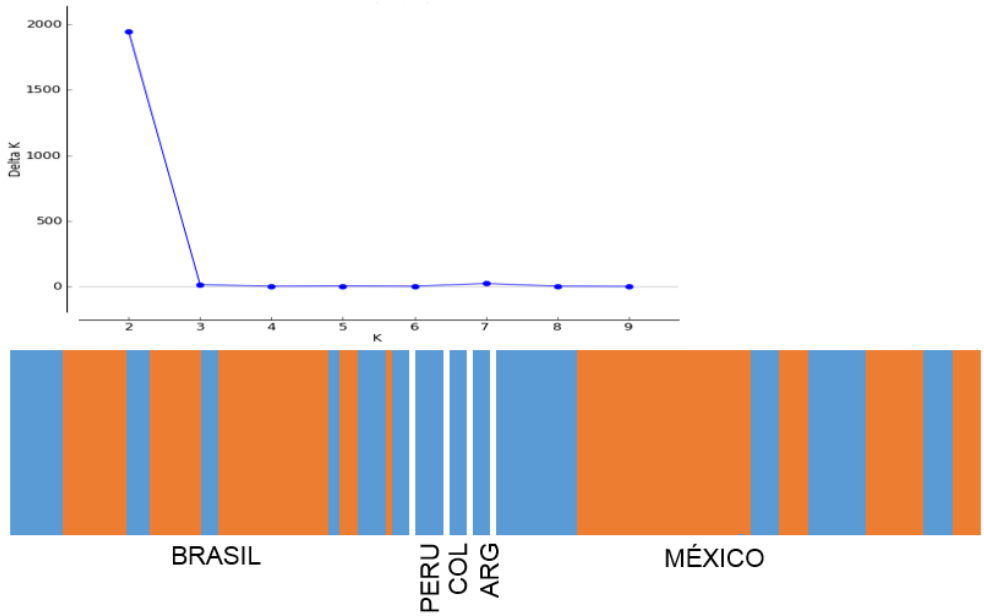

Figura 6. Estimativa de número de clusters (K) mais adequado para as amostras analisadas e gráfico de estrutura genética pela análise bayesiana de três locos ncSSR em feijão-fava. Cada cor indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas.

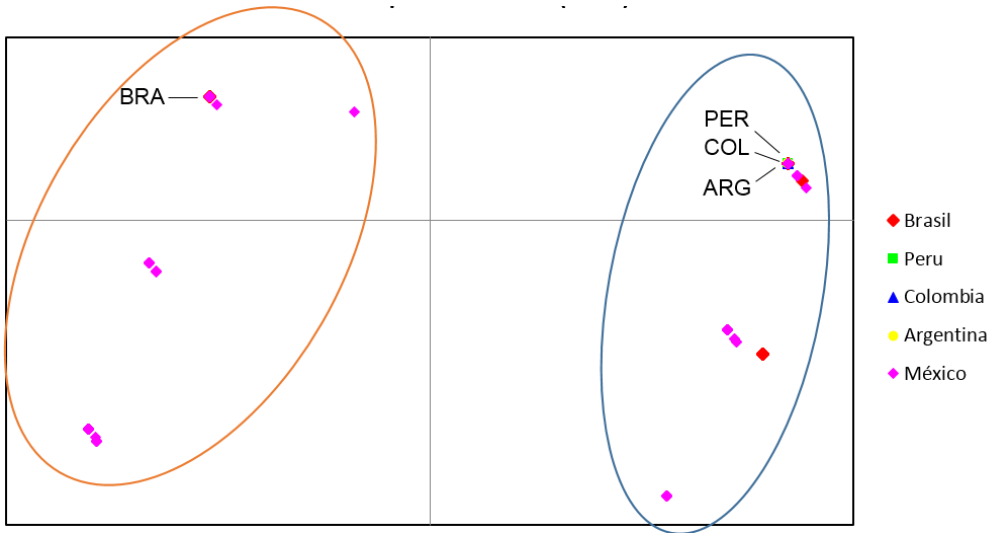

Figura 7. Análise de Componentes Principais com base em três locos ncSSR em 44 acessos de feijão-fava. Os círculos azul e vermelho indicam a formação dos grupos 1 e 2, respectivamente.

A AMOVA mostrou que a maior proporção da variação ocorre entre os acessos de feijão-fava (Tabela 29). Entre os países está a menor parte da variação genética encontrada. O F_{st} é alto, devido à alta divergência entre os acessos. A variação entre variedades domesticada e silvestre é baixa e semelhante a variação entre os países, sendo que dentro das variedades, ou seja, entre e dentro dos acessos, é atribuído a maior parte da variação. Tendo um alto valor de F_{st} (0,778).

Resultados contrários a esses foram observados nos cpSSRs, nos quais a variação foi maior entre países e variedades, com F_{st} maiores. O padrão de herança dos ncSSRs,

diferentes dos cpSSR pode ter contribuído para esses resultados diferentes, tendo em vista que os microssatélites nucleares têm maior taxa de mutação e herança biparental, sofrendo recombinações durante a reprodução das plantas. Além disso, o sistema reprodutivo com predominância de autofecundação, contribui para maior diversidade entre os acessos.

O fluxo gênico baixo entre os países (Nm = 1,54), devido à limitação de dispersão de pólen e sementes causados pelas barreiras geográficas, contribuiu para a manutenção da variabilidade dentro e entre acessos, em regiões próximas. A presença de alelos silvestres em indivíduos domesticados foi observada em populações de feijão-fava no México, onde há a ocorrência de contato simpátrico de variedades silvestres e domesticadas (Félix *et al*. 2014), ocasionando uma menor diferenciação genética entre as variedades, devido ao fluxo gênico existente nessa região. A estimativa de Nm foi maior entre as variedades (20,86). Taxas semelhantes também foram encontradas por Martínez-Castillo *et al* (2007) com Nm de 0,28.

Tabela 30. Análise de variância molecular (AMOVA) baseada em três locos ncSSR em 44 acessos de feijão-fava. G.L. = graus de liberdade.

Fonte de variação	**G.L.**	**Porcentagem da variação (%)**	**Estatística F**
Entre países	4	16%	0,771**
Entre acessos	39	61%	
Dentro de acessos	284	23%	
Entre variedades domesticadas e silvestres	1	20%	0,778**
Dentro de variedades domesticadas e silvestres	42	80%	

** significativo a p<0,01

A análise dos acessos de feijão-fava através de dendrograma mostrou agrupamentos semelhantes aos observados na análise Bayesiana e na ACP (Figura 8A). Na árvore dos acessos, pode-se visualizar a formação de dois grupos distintos. Um primeiro agrupamento onde os acessos do Peru, Colômbia e Argentina, juntamente com cinco acessos brasileiros, sendo dois do estado da Paraíba, dois de Sergipe e um da Bahia, encontram-se na base do dendrograma. Com exceção dos acessos peruanos que são considerados andinos, os demais possuem sementes pequenas, sendo classificados no grupo mesoamericano. Eles estão mais distantes geneticamente dos demais acessos.

O segundo agrupamento engloba acessos do Brasil e do México. A partir deles, os acessos se dividem em dois subgrupos. Um com a maior parte de acessos brasileiros e o outro com a maioria de acessos mexicanos. Não foi possível justificar esses agrupamentos, através das informações que temos sobre esses acessos.

Analisando o dendrograma com os países (Figura 8B), observam-se os acessos do Peru, Colômbia e Argentina com as mesmas distâncias e os acessos brasileiros e mexicanos mais relacionados, mas ainda assim estão distantes, provavelmente por serem de variedades distintas. Isso mostra que os acessos domesticados brasileiros podem ser resultantes do processo de domesticação a partir das populações silvestres mesoamericanas do México.

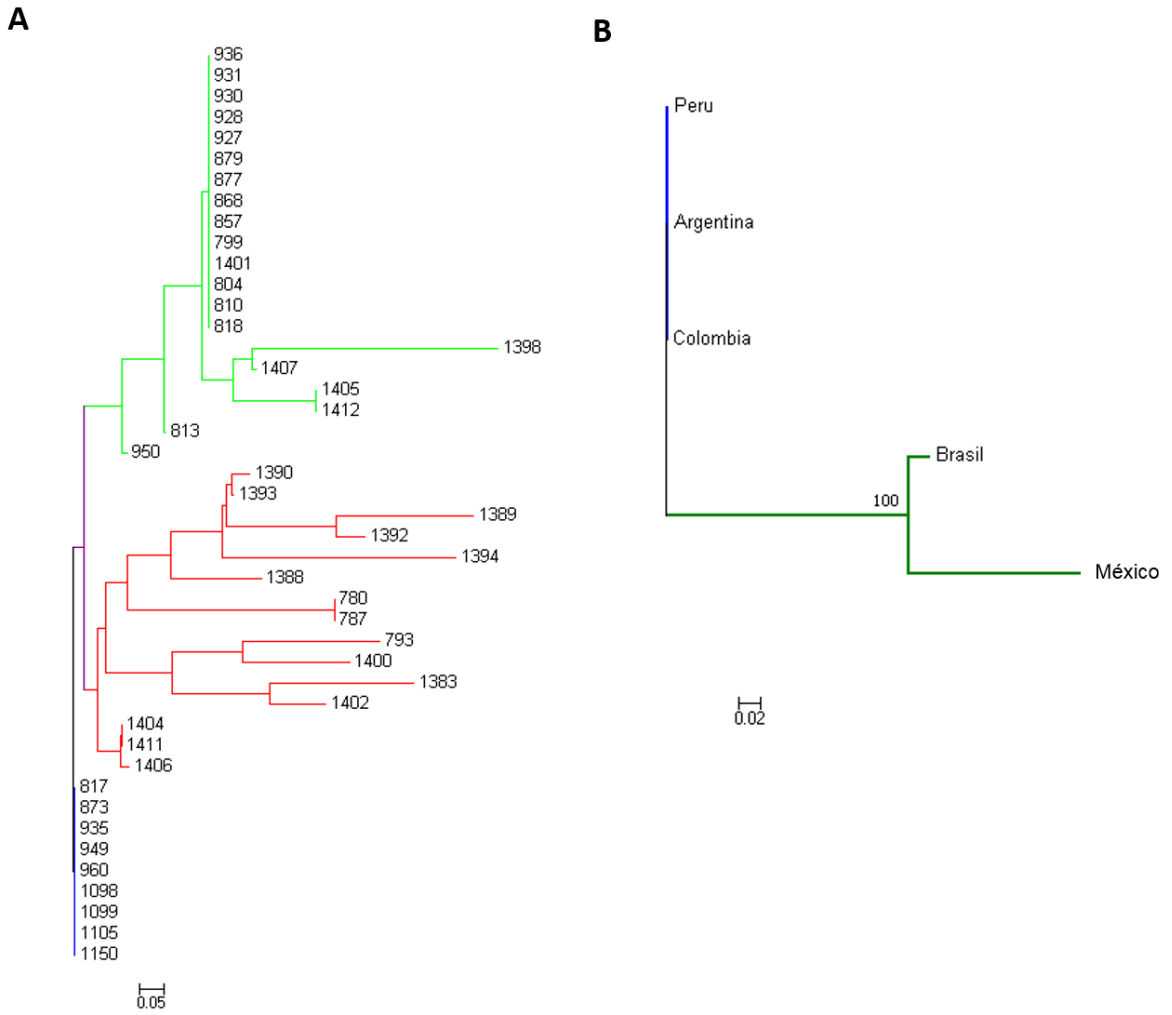

Figura 8. Dendrograma mostrando as relações genéticas com base em três locos ncSSR entre 44 acessos de feijão-fava. (A) mostrando todos os acessos, acessos destacados em azul formam o grupo 1; o grupo 2 é formado pelos acessos em vermelho e azul. (B) com base nos diferentes países.

5. CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos três marcadores microssatélites nucleares específicos para a espécie *Phaseolus lunatus* L. Entre os países, foi observada diversidade genética apenas nos acessos do México, tendo um índice de endogamia médio. Os acessos do Brasil foram homozigotos com completa endogamia. Maior variação genética foi encontrada entre acessos e dentro de variedades, resultado do alto coeficiente de endogamia. Acessos do Brasil e do México estão mais próximos geneticamente.

Variações haplotípicas foram observadas nos acessos brasileiros, peruanos e mexicanos. Entre as variedades, os domesticados tiveram maior diversidade, devido principalmente a diferentes origens. Padrões haplotípicos apontam os acessos silvestres mexicanos como ancestrais dos acessos domesticados brasileiros. Maiores variações genéticas foram observadas entre países e variedades, devido ao alto coeficiente de endogamia pela predominância de autofecundação.

Os diferentes adubos influenciaram o NDM, NVP, NSP, CV, LV, NLV e P100S em 12 acessos de feijão-fava. Nas médias gerais, o ambiente sem adubação provocou retardamento da floração, redução do ciclo de maturação das plantas, diminuição no número de vagens e semente por planta, no comprimento e largura das vagens, bem como redução do número de lóculos e peso de cem sementes. O número de vagens e sementes foram os caracteres mais plásticos e o número de dias para florescimento o menos plástico. Os números de vagens e de sementes foram mais correlacionados positivamente, resultando assim em aumento ou diminuição diretamente proporcional entre eles. Já o número de vagens é inversamente correlacionado ao peso de cem sementes, devido a mecanismos evolutivos de compensação.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, A. A. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. **Science,** v. 294, p. 321-326, 2001.

ALEKCEVETCH, J. C. **Estudo da diversidade genética, por meio de marcadores moleculares de uma população de *Coffea canephora* var. Conilon**. 2013. 92 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas.** São Paulo: Edgard Blucher, 1970. 381 p.

ALVES, A. U. **Rendimento do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) em função da adubação organomineral**. 2006. 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – UFPB, Areias, PB.

ANDUEZA-NOH, R. H.; SERRANO-SERRANO, M. L.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I.; SANCHÉZ DEL PINO, I.; CAMACHO-PÉREZ, L.; COELLO-COELLO, J. MIJANGOS CORTE, J.; DEBOUCK, D. G.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Multiple domestications of the Mesoamerican gene pool of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.): evidence from chloroplast DNA sequences. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, p. 1069-1086, 2013.

ANDUEZA-NOH, R. H.; CAMACHO-PÉREZ, L.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; MAY-PAT, F. Distribuición geográfica de los parientes silvestres del acervo genético mesoamericano del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) em México. **Polibotánica**, n. 41, p. 101-113, 2016.

ANDUEZA-NOH, R. H.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. Domestication of small-seeded lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces in Mesoamerica: evidence from microsatellite markers. **Genetica**, v. 143, p. 657–669, 2015.

ANGIOI, S. A.; DESIDERIO, F.; RAU, D.; BITOCCHI, E.; ATTENE, G.; PAPA, R. Development and use of chloroplast microsatellites in *Phaseolus* spp. and other legumes. **Plant Biology**, v. 11, p. 598–612, 2009a.

ANGIOI, S. A.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; LOGOZZO, G.; DESIDERIO, F.; PAPA, R.; ATTENE, G. Nuclear and chloroplast microsatellite diversity in *Phaseolus vulgaris* L. from Sardinia (Italy). **Molecular Breeding**, v. 23, p. 413–429, 2009b.

ANGIOI, S. A.; RAU, D.; ATTENE, G.; NANNI, L.; BELLUCCI, E.; LOGOZZO, G.; NEGRI, G.; SPAGNOLETTI ZEULI, P. L.; PAPA, R. Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, p. 829–843, 2010.

ASSUNÇÃO FILHO, J. R. **Caracterização de populações da variedade crioula Boca de moça de feijão-fava, utilizando caracteres agromorfológicos e marcadores moleculares**. 2012. 89p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.

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

BARRIGA, R.H.M.P.; OLIVEIRA, A.F.F. de. **Variabilidade genética e correlações entre o rendimento e seus componentes em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região amazônica**. Belém: Embrapa-CPATU, 1982. 16p.

BAUDET, J. C. The taxonomic status of the cultivated types of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Tropical Grain Legume**, Ibadan, v. 7, p. 29–30, 1977.

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

BAUDOIN, J.P.; ROCHA O., DEGREEF J.; MAQUET, A.; GUARINO L. Ecogeography, demography, diversity and conservation of *Phaseolus lunatus* L in the Central Valley of Costa Rica. **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, Italy, 2004.

BAUTISTA, E. A. L. **Modelos lineares mistos e generalizados mistos em estudos de adaptação local e plasticidade fenotípica de *Euterpe edulis*.** 123 p. 2014. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo.

BEYRA, A.; ARTILES, G. R. Revisión taxonômica de los gêneros *Phaseolus* y *Vigna* (Leguminosae – Papilionoideae) en Cuba. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 61, n. 2, p. 135-154, 2004.

BERG, H.; BECKER, U.; MATTHIES, D. Phenotypic plasticity in *Carlina vulgaris*: effects of geographical origin, population size, and population isolation. **Oecologia**, v. 143, p. 220-231, 2005.

BESPALHOK FILHO, J. C.; OLIVEIRA, R. A.; GUERRA, E. P. **Melhoramento de Plantas**. UFPR – Universidade Federal do Paraná, 2008. Disponível em: <www.bespa.agrarias.ufpr.br>. Acesso em agosto, 2017.

BILLOTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.; BAURENS, F. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v. 54, p. 277 - 288, 1999.

BIRKY JR, C. W. Uniparental inheritance of organelle genes. **Current Biology**, v. 18, n.16, 2008.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2009.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2009, 525p.

BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant and soil**. v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.

BURLE, M. L.; FONSECA, J. R.; KAMI, J. A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, p. 801-813, 2010.

CALLAWAY, R. M.; STEVEN, C. P.; RICHARDS, C. L. Phenotypic plasticity and interactions among plants. Ecology, v. 84, n. 5, p. 1115-1128, 2003.

CAMARENA, F. Magnitud e impacto potencial de la liberación de los organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales. Caso: leguminosas de grano. In: HIDALGO, O.; ROCA, W.; FERNÁNDEZ-NORTHCOTE, E. N. (Eds.). **Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales:** casos algodón, leguminosas de grano, maíz y papa. Lima: Consejo Nacional del Ambiente, 2005. p. 19-40.

CARMO, M. D. S. **Variabilidade genética e reação ao Colletotrichum truncatum em feijão-fava de crescimento determinado.** 2011. 132p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.

CARMO, M. D. C.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; PENHA, J. S.; GOMES, S. O.; ASSUNÇÃO FILHO, J. R. Genetic variability in subsamples of determinate growth lima bean. **Crop Breending and Applied Biotechnology**, v. 13, p. 158-164, 2013.

CARVALHO, E. R. et al. Fertilizante mineral e resíduo orgânico sobre características agronômicas da soja e nutrientes no solo. **Revista Ciência Agronômica**, vol.42, n.4, p. 930-939. 2011.

CARVALHO, M. G. **Produção de feijão-fava em função de diferentes doses de adubação orgânica e mineral.** 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI, 2012.

CASTIÑEIRAS, L.; GUZMÀN, F. A.; DUQUE, M. C.; SHAGARODSKY, T.; CRISTÓBAL, R.; VICENTE, M. C. AFLPs and morphological diversity of Phaseolus lunatus L. in Cuban home gardens: approaches to recovering the lost ex situ collection. **Biodiversity and Conservation**, v.16, n.10, p.2847-2865, 2007.

CHUNG, S; STAUB, J.E. The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 757-767, 2003.

CORDEIRO, A.; MARCATTO, C. Milho: a volta das variedades crioulas. In*:* GAIFANI, A.; CORDEIRO, A. **Cultivando a diversidade:** recursos genéticos e segurança alimentar. Rio de Janeiro: assessoria e serviços a projetos em agricultura alternativa, 1994, 205p.

CORREA, A. M. **Caracterização e análise genética de genótipos de feijoeiro comum.** 2002. 148p. Dissertação (mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2002.

CORREA, A. M.; CECCON, G.; CORREA, C. M. A.; DELBEN, D. S. Estimativas de parâmetros genéticos e correlações entre caracteres fenológicos e morfoagronômicos em feijão-caupi. **Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 1, p.88-94, 2012.

DESIDERIO, F.; BITOCCHI, E.; BELLUCCI, E.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; ATTENE, G.; PAPA, R.; NANNI, L. Chloroplast microsatellite diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 312, 2013.

DOEBLEY, J. Molecular systematics and crop evolution. In. Soltis *et al*. (ed.) **Molecular systematics of plants**. Chapman and Hall, New York, p. 202-222, 1992.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.

EBERT, D.; PEAKALL, R. Chloroplast simple sequence repeats (cpSSR): technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, US, v. 9, p. 673-690, 2009.

EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 1792-1797, 2004.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

FALEIRO, F. G. Preservação da variabilidade genética de plantas: um grande desafio. In: **Boletim Agropecuário**. Artigos Agropecuários, 2003. Disponível em: <boletim agropecuário.com.br>.

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**. New York: Macmillan. 525p. 1987.

FÉLIX, D. T.; COELLO-COELLO, J.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Wild to crop introgression and genetic diversity in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in traditional Mayan milpas from Mexico. **Conservation Genetics**, v. 15, p. 1315-1328, 2014.

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

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 379-420.

FOFANA, B.; JARDIN, P.; BAUDOIN, J. P. Genetic diversity in the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by chloroplast DNA (cpDNA) variations. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Holanda, v. 48, n. 5, p. 437-445, 2001.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. **Conservation of plant biodiversity.** Cambridge University Press, Reino Unido, 1995.

GARBÍN, P. M.; ARREGUI, R. Z.; PÉREZ, L. S. Plasticidad fenotípica de *Pinus pinaster* frente a la disponibilidad de nutrientes. **Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales**, v. 24, p. 67-73, 2008.

GEPTS, P. Crop domestication as a long-term selection experimente. **Plant Breeding Reviews**, Berlin, v. 24, p. 1-44, 2004.

GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices** (version 2.9.3.2), 2002. Institute of Ecology, Lausanne. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.

GRIN - **Germplasm Resources Information Network**. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_search.pl?language=pt>. Acesso em 2017.

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

HEIFFIG, L. S. **Plasticidade da cultura da soja (*Glycine Max* (L.) Merrill) em diferentes arranjos espaciais**. 2002. 85 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP. 2002.

HOLWERDA, B. C.; JANA, S.; CROSBY, W. L. Chloroplast and mitochondrial DNA variation in *Hordeum vulgare* and *Hordeum spontaneum*. **Genetics,** v. 114, p. 1271-1291, 1986.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Banco de dados agregados: pesquisa: produção agrícola municipal. Rio de Janeiro, 2018. Disponívelem:<http://www.sidra.ibge.gov.br./bda/tabela/protabl.asp?z=p&o=20&i=P> Acesso em 19 de fevereiro de 2018.

JAKOBSSON, M.; SÄLL, T.; LIND-HALLDÉN, C.; HALLDÉN, C. Evoltion of chroloplast mononucletide microsatellites in *Arabidopsis thaliana*. **Theoretical and Applied Genetics,** v. 114, p. 223-235, 2007.

JIANG, G. L. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In: Plant breeding from laboratories to fields. **Intech**, Croatia, pp. 45-83, 2013.

KAMADA, T.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; FONTES, I. C. P.; FINGER, F. L. Plasticidade fenotípica do óleo essencial em acessos de manjericão (*Ocimum basilicum L.*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 1**, n. 2, p. 13-22, 1999.

KRESS, J. W.; WURDACK, J.K.; ZIMMER, A. E.; WEIGT, A. L.; JANZEN, H. D. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 8369-8374, 2005.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data (software)**. Version 1.1, 2001.

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

MAQUET, A.; BAUDOIN, J. P. Aperçu de la distribution neotropicale de *Phaseolus lunatus*. **J. Botanique.** Bélgica, v. 130, n. 2, p. 93-116, 1997.

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

MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; CAMACHO-PÉREZ, L.; VILLANUEVA-VIRAMONTES, S.; ANDUEZA-NOH, R. H.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. Genetic structure within the Mesoamerican gene pool of wild *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) from Mexico as revealed by microsatellite markers: implications for conservation and the domestication of the species. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 5, p. 1-14, 2014.

MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P.; ZIZUMBO VILLARREAL, D. Genetic erosion and in situ conservation of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces in its Mesoamerican diversity center. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, n. 7, p. 1065-1077, 2008.

MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; ZIZUMBO-VILLARREAL, D.; GEPTS, P.; COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P. Gene Flow and Genetic Struture in the Wild-Weedy-Domesticated Complex of *Phaseolus lunatus* L. in its Mesoamerican Center of Domestication and Diversity. **Crop Science**, v. 47, p. 58-66, 2007.

MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; ZIZUMBO-VILLARREAL, D.; GEPTS, P.; DELGADO-VALERIO, P.; COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P. Structure and genetic diversity of wild population of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan Peninsula, Mexico. **Crop Science,** v. 46, p. 1071-1080, 2006.

MARTINS, J. D. L.; MOURA, M. F.; OLIVEIRA, J. P. F.; OLIVEIRA, M.; GALINDO, C. A. F. Esterco bovino, biofertilizante, inoculante e combinações no desempenho produtivo do feijão comum**. Agroambiente on-line**, v. 9, n. 4, p. 369-376, 2015.

MELÉM JÚNIOR, N. J.; BRITO, O. R.; FONSECA JÚNIOR, N. S.; FONSECA, I. C. B. Nutrição mineral e produção de feijão em áreas manejadas com e sem queima de resíduos orgânicos e diferentes tipos de adubação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 7-18, 2011.

MILLER, M. P. **TFPGA – tools for population genetic analyses v.1.3.**, Northern Arizona University. 1997.

MISSIAGGIA, A; GRATTAPAGLIA, D. Plant microsatellite genotyping with 4-colour fluorescent detection using multiple-tailed primers**. Genetics and Molecular Research**, v. 5, p. 72-78, 2006.

MONTERO-ROJAS, M.; ORTIZ, M.; BEAVER, J. S.; SIRITUNGA, D. Genetic, morphological and cyanogen content evaluation of a new collection of Caribbean lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, p. 2241-2252, 2013.

MOTTA-ALDANA , J.; SERRANO-SERRANO, M. L.; TORRES, H. J.; VILLAMIZAR, C. G.; DEBOUCK, G. D.; CHACÓN, M. I. Multiple origins of lima bean landraces in the Americas: evidence from chloroplast and nuclear DNA polymorphisms. **Crop Science,** v. 50, p. 1773–1787, 2010.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento-Plantas**. Rondonopólis: Fundação MT, p. 29-55. 2001.

NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais.** Brasília – DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

NEI, M. Estimation of average heterozigosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics,** v. 89, p. 583-590, 1978.

NEI, M.; LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 76, p. 5269-5273, 1979.

NICK, C.; SILVA, D. J. H.; MATTEDI, A. P.; PEDROSA, D. A. Conservação *ex situ* dos recursos fitogenéticos. In: PEREIRA, T. N. S. **Germoplasma: Conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas.** Viçosa, MG: Arca, 2010.

ODONG, T. L.; JANSEN, J.; VAN EEUWIJK, F. A.; VAN HINTUM, T. J. L. Quality of core collection for rffrctive utilisation of gentic resources review, discussion and interpretation, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, p. 289-305, 2013.

OLIVEIRA, J. E. Z. **Plasticidade fenotípica da morfologia, de marcadores químicos e da anatomia de acessos de *Bidens pilosa L*. crescidos em quatro altitudes**. 2001. 239p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

OUÉDRAOGO, M.; MAQUET, A.; BAUDOIN, J. P. Étude comparative de la diversité et de la structure génétique de populations sauvages de *Phaseolus lunatus* L. à l'aide des marqueurs enzymatiques et microsatellites. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 9, p. 195-205, 2005.

PAABY, A. B; TESTA, N. D. Developmental plasticity and evolution. In: ROSA L. N.; MULLER G. B. (eds.) **Evolutionary developmental biology**, Springer, 2018.

PAIVA, J. R. Conservação ex situ de recursos genéticos de plantas na região tropical úmida. **Acta amazônica**, v. 24, p. 63-80, 1994.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-na update. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, p. 2537-2539, 2012.

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

PEREIRA, M. P.; SILVA, F. F.; PEREIRA, T. N. S. Recursos genéticos vegetais e o melhoramento de plantas. In: PEREIRA, T. N. S. **Germoplasma: Conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas.** Viçosa, MG: Arca, 2010.

PETIT, R. J.; DUMINIL, J. FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G. G. Comparative organizations of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant population. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 14, p. 689-701, 2005.

PIGLIUCCI, M. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? **Trends in ecology and evolution**, v. 20, n. 9, p. 481-486, 2005

POWELL, W.; MORGANTE, M.; McDEVITT, R.; VENDRAMIN, G.G.; RAFALSKI, J. A. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washigton, v. 92, p. 7759-7763, 1995a.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; MCNICOL, J. W.; MACHRAY, G. C.; DOYLE, J. J.; TINGEY, S. V. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. **Current biology**, Chicago, v. 5, p. 1023-1029, 1995b.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v.1, p.215-222, 1996.

PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P. M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 16, n. 3, p. 142-147, 2001.

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

QUEIROZ, M. A.; LOPES, M. A. Importância dos recursos genéticos vegetais para o agronegócio. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 61-119, 2007.

QUINTANA, L. G.; MELO, M. D.; SILVA, R. N. O.; BURLE, M. L. Diversidade agronômica e morfológica do Banco Ativo de germoplasma de *Phaseolus lunatus* L. da Embrapa. In: **Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos: Bancos de germoplasma: descobrir a riqueza, garantir o futuro.** 2010. Anais. Salvador: Embrapa, 2010.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; ABREU, A. F. B.; NUNES, J. A. R. **Aplicações de genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: Editora UFLA, 2012. 522 p.

SAMPAIO, L. S.; CRAVO, M.; FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. M.; RIBEIRO, V. Q. Avaliação de linhagens de feijão-caupi em Igarapé Açu-PA. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 2006, Teresina. **Anais**... Teresina: Embrapa, 2006.

SANTOS, G. M. OLIVEIRA, A. P.; SILVA, J. A. L.; ALVES, E. U.; COSTA, C. C. Características e rendimento de vagem do feijão-vagem em função de fontes e doses de matéria orgânica. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.19, n.1, p.30-35, 2001.

SANTOS, J. B.; VENCOVSKY, R. Correlações fenotípicas e genética entre alguns caracteres agronômicos do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Prática**, v. 10, p. 265-272, 1986.

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

SCHLICHTING, C.D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 17, p. 667-693, 1986.

SERRANO-SERRANO M.L.; HERNÁNDEZ-TORRES J.; CASTILLO-VILLAMIZAR G.; DEBOUCK D.G.; SÁNCHEZ M.I. Gene pools in wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the americas: evidences for Andean origin and past migrations. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p. 76-87, 2010.

SERRANO-SERRANO, M.L.; ANDRUEZA-NOH, R. H.; MARTINEZ-CASTILLO, J.; DEBOUCK, D. G.; CHACÓN S, M. I. Evolution and domestication of lima bean in Mexico: Evidence from Ribosomal DNA. **Crop Science, v. 52**, p. 1698-1712, 2012.

SICARD, D.; NANNI, L.; PORWRI, O.; BULFON, D.; Papa, R. Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. **Plant Breeding**, v. 124, p. 464-472, 2005.

SILVA, R.N.O. **Diversidade genética em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) por marcadores morfoagronômicos e moleculares.** Dissertação de mestrado-UFPI, Teresina, 2011.

SILVA, R.N.O. **Estudos genéticos em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) visando o melhoramento genético da cultura**. 2015. 98p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, RJ. 2015.

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

SOUZA, V. C., LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

SULTAN, S. E. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. **Trends in plant science**, v. 5, n. 12, p. 537-542, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TISCHNER, T. et al. Genetics of seed abortion and reproductive traits in soybean (Glycine max). **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 2, p. 464-473, 2003.

VALLADARES, F.; ARRIETA, S.; ARANDA, I.; LORENZO, D.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, D.; TENA, D.; SUÁREZ, F.; PARDOS, J. A. Shade tolerance, photoinhibition sensitivity and phenotypic plasticity of *Ilex aquifolium* in continental Mediterranean sites. **Tree Physiology,** v. 25, p. 1041-1052, 2005.

VALLADARES, F.; WRIGHT, S. J.; LASSO, E.; KITAJIMA, K.; PEARCY, R. W. Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a Panamanian rainforest. **Ecology,** v. 81, p. 1925-1936, 2000.

VANICHANON, A.; BLAKE, K. N.; SHERMAN, D. J.; TALBERT, E. L. Multiple origins of allopolyploid *Aegilops triuncialis*. **Theoretical and Applied Genetics,** v. 106, p. 804-810, 2003.

VIA, S.; GOMULLDEWICZ, R.; JONG, G.; SCHEINER, S. M.; SCHLICHTING, C. D.; TIENDEREN, P. H. V. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 212–217, 1995.

VIEIRA, C. **O feijoeiro-comum:** cultura, doenças e melhoramento. Viçosa: Imprensa Universitária, 1967. 220 p.

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

VILLALOBOS, V. M.; FERREIRA, P.; MORA, A. The use of biotechnology in conservation of tropical germplasm. **Biotechnology Advances,** v. 9, n. 3, p. 197-215, 1991.

WEISING, K; GARDNER, R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, v. 42, p. 9-19, 1999.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations.** Chicago: University of Chicago Press, 1978. 573 p.

ZEDER, M. A.; BLADLEY, D. G.; EMSHWILLER, E.; SMITH, B. D. Documenting domestications: New genetic and archaeological paradigms. **University of California**, London, 2006. 361 p.

ZORO BI, I.; MAQUET, A.; BAUDOIN, J. P. Population genetic structure of wild *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), with special reference to population sizes. **American Journal of Botany,** v. 90, p. 897–904, 2003.