

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)

JARDEL OLIVEIRA SANTOS

TERESINA
Estado do Piauí - Brasil
Agosto - 2008

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)

JARDEL OLIVEIRA SANTOS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Produção Vegetal.

**TERESINA
Estado do Piauí - Brasil
Agosto - 2008**

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)

JARDEL OLIVEIRA SANTOS
Biólogo

Orientadora: Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

Co-Orientador: Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Produção Vegetal.

TERESINA
Estado do Piauí - Brasil
Agosto – 2008

S237d

Santos, Jardel Oliveira.

Divergência genética em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) / Jardel Oliveira Santos. – Teresina, 2008.
97f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí,
2008.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

1. Feijão-fava 2. Recursos genéticos. 3. Composição físico-química 4. Nodulação 5. Análise multivariada.

I. Título.

CDD - 583.79

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)

JARDEL OLIVEIRA SANTOS

Comissão julgadora:

Profa. Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo
Laboratório de Biologia do Solo/IPA

Prof. Dr. José Airton Rodrigues Nunes
Departamento de Planejamento e Política Agrícola/CCA/UFPI

Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo
Departamento de Engenharia Agrícola e Solos/CCA/UFPI
Co-Orientador

Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes
Departamento de Fitotecnia/CCA/UFPI
Orientadora

"Compreender que há outros pontos de vista é o início da sabedoria"

Thomas Campbell

"Aceita o conselho dos outros, mas nunca desista da tua opinião".

William Shakespeare

*À minha mãe Maria Helena,
que desde os primeiros anos de vida
semeou em mim o gosto e a importância pelo saber.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me fortalecer nos momentos difíceis e permitir que essa etapa fosse concluída;

À Universidade Federal do Piauí, pela formação e auxílio para execução da pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto de pesquisa com *Phaseolus lunatus*;

À Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes, pela confiança, amizade e ensinamentos importantes transmitidos durante o curso e, principalmente, pela forma vigilante e atenta na orientação desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo, pelas orientações e atenção dispensada;

À Profa. Dra. Ângela Celis de Almeida Lopes, pelas sugestões, ensinamentos e amizade, que de forma serena e objetiva tem conduzido muitos alunos ao mundo da pesquisa científica;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelos ensinamentos transmitidos;

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Marques da Silva, Chefe do Departamento de Química, pela concessão do Laboratório para realização de análises;

À Profa. Dra. Maria Marlúcia Gomes Pereira, Coordenadora do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA) da UFPI, que gentilmente cedeu o Laboratório de Físico-Química para realização das análises;

Ao Prof. Dr. Zeomar Nitão Diniz e aos demais funcionários do NUEPPA, pelo auxílio nas determinações físico-químicas;

Ao Prof. Dr. Arnaud Azevedo Alves e aos técnicos do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia, pela disponibilidade do espaço e auxílio nas determinações das frações de fibra;

Ao Prof. Dr. Sebastião Barros, pela montagem do sistema utilizado na determinação do ácido cianídrico e orientação dispensada durante as determinações;

Ao Engenheiro Agrônomo Júlio César Lopes da Costa, pelo auxílio durante as coletas do solo no município de Água Branca, PI;

À Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), pela disponibilização do Laboratório de Biologia do Solo, para o isolamento e caracterização dos rizóbios;

À Pesquisadora Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo, pelas sugestões, orientação e contribuição nas etapas de isolamento e caracterização dos rizóbios;

Aos amigos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Teresinha Xavier, Maria Almeida, Marise Caribé e Antônio Junior, que me acolheram em Recife, durante a fase de isolamento e caracterização dos nódulos;

Aos estagiários, pesquisadores e funcionários do Laboratório de Biologia do Solo do IPA, Maria do Carmo Barreto, André Sueldo, Maríilha Mendes, Eyde Simões e Sr. Mário, que me auxiliaram durante o isolamento e caracterização dos rizóbios;

Aos amigos e estagiários do Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais: Ana Clara de S. Meireles, Eva Maria Rodrigues Costa, Ethyênne Moraes Bastos, Elton Markes, Dogival Alves Cavalcante Júnior, Iradênia Sousa, Jocélia Mayra Machado Alves, Marla Ariane Silva, Paula Verena C. Sobral e Raimundo Nonato Silva, pela “mão-de-obra barata e qualificada”, que muito contribuiu nas coletas dos dados;

As alunas da Universidade Estadual do Piauí, Carol Melo e Cândida Mendes pela fundamental contribuição na coleta dos nódulos do experimento piloto;

À todos os colegas da Pós-Graduação, em especial às mais próximas, Eliane Monteiro, Solranny Silva e Mércia Carvalho, pelas grandiosas contribuições, sugestões, auxílio e conversas, as quais aluguei por muitas horas com as famosas “piadas sem graça”;

À minha mãe Maria Helena, pelo exemplo de vida, dedicação e honestidade a ser seguido;

Aos irmãos Gicélio Oliveira, Gicélia Oliveira e em especial a Gláucia Oliveira, que sempre acreditou na minha capacidade e me forneceu meios para poder concluir o curso;

À todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização desse trabalho, possibilitando alcançar mais um degrau na infinita escada do conhecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Gênero <i>Phaseolus</i>	17
2.1.1. Classificação botânica.....	17
2.1.2. Complexo gênico.....	18
2.2. A espécie <i>Phaseolus lunatus</i> L.	19
2.2.1. Centro de origem da variabilidade.....	20
2.2.2. Conservação da espécie	20
2.2.3. Composição físico-química das sementes	21
2.2.3.1. Umidade	22
2.2.3.2. Lipídios	23
2.2.3.3. Minerais.....	23
2.2.3.4. Proteínas	24
2.2.3.5. Carboidratos.....	25
2.2.3.6. Ácido cianídrico	26
2.3. Fixação biológica de Nitrogênio	27
2.3.1. Classificação dos rizóbios	28
2.3.2. Diversidade dos rizóbios	30
2.4. Análises multivariadas.....	32
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

4. CAPÍTULO I	52
 Divergência genética para caracteres físicos e químicos de sementes em feijão-fava (<i>Phaseolus lunatus</i> L.)	
4.1. RESUMO.....	52
4.2. ABSTRACT	53
4.3. INTRODUÇÃO	54
4.4. MATERIAL E MÉTODOS	56
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.6. REFERÊNCIAS	64
5. CAPÍTULO II	75
 Divergência genética entre isolados nativos noduladores do feijão-fava (<i>Phaseolus lunatus</i> L.)	
5.1. RESUMO.....	75
5.2. ABSTRACT	76
5.3. INTRODUÇÃO	76
5.4. MATERIAL E MÉTODOS	78
5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
5.6. REFERÊNCIAS	85
6. CONCLUSÕES GERAIS	97

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)

Autor: Jardel Oliveira Santos

Orientadora: Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

Co-Orientador: Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

RESUMO

Objetivou-se realizar a caracterização física e química de sementes em feijão-fava e estimar a divergência genética entre sub-amostras e entre rizóbios nativos noduladores do feijão-fava. Na caracterização, o material genético constou de 27 sub-amostras, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-Fava da Universidade Federal do Piauí, cultivadas no ano agrícola de 2006. As sementes dessas sub-amostras foram avaliadas com relação aos seguintes caracteres químicos: umidade (8,26 a 11,25 g/100g), cinzas (2,62 a 3,70 g/100g), extrato etéreo (0,16 a 0,93 g/100g), proteína bruta (16,85 a 23,41 g/100g), extrato não nitrogenado (62,24 a 70,07 g/100g), fibra alimentar total (24,21 a 62,42 g/100g), fibra insolúvel (5,65 a 11,88 g/100g), fibra solúvel (15,82 a 53,11 g/100g) e ácido cianídrico (44,49 a 160,63 mg/kg). Os caracteres físicos avaliados nas sementes foram: comprimento (9,66 a 18,52 mm), largura (7,41 a 11,83 mm), espessura (5,33 a 6,90 mm) e massa de 100 sementes (27,60 a 87,79 g), que possibilitaram a classificação quanto à forma (esférica, elíptica e oblonga / reniforme), perfil (achatado e semi-achatado) e tamanho (pequeno, médio, normal e grande). A divergência genética entre as sub-amostras foi estimada pelo método de agrupamento de Tocher, com o emprego da distância de Mahalanobis, como medida de dissimilaridade, formando-se dez grupos. O método de Singh, utilizado para estimar a contribuição relativa de cada caráter na expressão da divergência genética, indicou que a fibra alimentar total (48,62%) e a fibra solúvel (46,03%) foram os que mais contribuíram para a divergência total (94,65%) entre as sub-amostras de feijão-fava avaliadas. Na estimativa da divergência genética entre os rizóbios nativos, os genótipos UFPI-468 (Boca de Moça) e UFPI-491 (Fava Miúda) foram utilizados como planta isca de rizóbio, em amostras de solos coletadas nos distritos de Nova Esperança

(07°77'10"S e 93°51'58"W) e Santa Rita (07°71'49"S e 93°60'08"W), município de Água Branca, PI, que funcionaram como fonte de inóculo. Dos nódulos coletados, foram identificados 79 isolados que, mediante a caracterização morfológica e fisiológica, foram reunidos em sete grupos de divergência pelos métodos de Tocher (sete grupos) e cinco grupos pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA (Unweighted pair group method Average), ambos exibindo concordância na alocação dos isolados. Entre os grupos, evidenciou-se isolados dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*.

Palavras-chave: Semente, caracteres físicos e químicos, nodulação, isolados nativos, rizóbios.

GENETIC DIVERGENCE OF LIMA BEAN (*Phaseolus lunatus* L.)

Author: Jardel Oliveira Santos

Adviser: Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

Co-Adviser: Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

ABSTRACT

This study aimed the physical and chemical characterization of lima bean seed and evaluates the genetic divergence among samples and among native rhizobia nodulated of the lima bean. In this characterization, the genetic material consisted of 27 samples from the "BAG de Feijão-Fava Universidade Federal do Piauí", cultivated in the 2006 year crop. The seeds of these samples were evaluated regarding to chemical characters: moisture (8.26 to 11.25 g/100g), ashes (2.62 to 3.70 g/100g), ethereal extract (0.16 to 0.93 g/100g), crude protein (16.85 to 23.41 g/100g), non-nitrogen extract (62.24 to 70.07 g/100g), total dietary fiber (24.21 to 62.42 g/100g), insoluble fiber (5.65 to 11.88 g/100g), soluble fiber (15.82 to 53.11 g/100g) and cyanic acid (44.49 to 160.63 mg / kg). The physical characteristics evaluated in the seeds were: length (9.66 to 18.52 mm), width (7.41 to 11.83 mm), thickness (5.33 to 6.90 mm) and weight of 100 seeds (27.60 to 87.79 g), which permitted the classification of the seeds as to form (spherical, elliptical and oblong / reniform), profile (flat and semi-flat) and size (small, medium, normal and great). The genetic divergence among the samples was estimated by Tocher grouping method, with the employment of the Mahalanobis's distance, as a measure of dissimilarity, that resulted in ten groups. The Singh's method was used to estimate the relative contribution of each character in the expression of genetic divergence. The total dietary fiber (48.62%) and soluble fiber (46.03%) were those who most contributed to total divergence (94.65%) among the samples of lima beans evaluated. In the genetic divergence estimation among the native rhizobia, the genotypes UFPI-468 (Boca de Moça) and UFPI-491 (Fava Miúda) were used as bait of rhizobium plant, with samples of soil collected in districts of Nova Esperança (07°77'10"S e 93°51'58"W) and Santa Rita (07°71'49"S e 93°60'08"W), in Água Branca county,

Piauí State who worked as a source of inoculum. From the nodules that were collected, 79 isolates were identified, and according to the morphological and physiological characterization, were clustered in groups of divergence by the Tocher's method (seven groups) and Unweighed pair group method Average (UPGMA) (five groups) agreement with the allocation of strains. It could be observed among groups, there were strains of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* and *Rhizobium*.

Key words: Seeds, physical and chemical character, nodulation, isolates native, rhizobia.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-fava, *Phaseolus lunatus* L., é a segunda leguminosa de maior importância do gênero, e devido ao conteúdo protéico e paladar característico, é mundialmente utilizado em pratos, nas mais diferentes culinárias, recebendo várias denominações, em função da região cultivada ou forma de utilização na alimentação. Nos Estados Unidos, é conhecida popularmente como lima bean, butter bean, sieva bean e sugar bean; na França, haricot de lima, haricot du cap e pois du cap; no México, feijol lima; na Alemanha, limabohne e mondbohne; na Espanha, frijol de luna, haba lima, judia de lima ou pallar; no Japão, lai mame ou aoi mame (NIAS, 2008; GRIN, 2008); e no Brasil, fava, feijoal, bongue, mangalô-amargo, fava-belém, fava-terra, feijão-espadinho, feijão-farinha, feijão-favona, feijão-fígado-de-galinha, feijão-verde ou feijão-de-lima (OLIVEIRA et al., 2004; GRIN, 2008).

De acordo com Yokoyama et al. (1996), o feijão é cultivado em cerca de 100 países em todo o mundo, e os gêneros *Phaseolus* e *Vigna* são os mais utilizados, apresentando como atrativo a produção de grãos com tamanhos e cores variadas. Contudo, a produção mundial de feijão está ligada a um grande número de gêneros e espécies, o que dificulta uma análise comparativa dos índices de produtividade. Considerando-se apenas o gênero *Phaseolus*, o Brasil é o maior produtor mundial, seguido pelo México, sendo que *P. lunatus*, *P. coccineus* e *P. acutifolius* contribuem com cerca de 5% da produção mundial deste gênero.

Segundo o IBGE (2006), no Brasil foram produzidas 14.951 ton de grãos secos do feijão-fava, numa área plantada de 37.521 ha. Os Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Pernambuco, Piauí, Sergipe, Maranhão e Alagoas, em ordem decrescente, são os maiores produtores, e juntos fazem do Nordeste, a maior região produtora, com 14.128 ton, em 36.209 ha. Nessa região, o feijão-fava é usado como fonte alternativa de alimento e renda pela população, principalmente por pequenos produtores. A região Sudeste tem o Estado de Minas Gerais como único

produtor, com 711 ton, e a região Sul produz apenas 112 ton, no Rio Grande do Sul.

O feijão-fava é considerado mais tolerante à seca, ao excesso de umidade e ao calor (VIEIRA, 1992). Contudo, seu cultivo é relativamente limitado, sendo que as principais razões são: a maior tradição de consumo dos feijões comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* L.), o paladar do feijão-fava e o tempo de cocção mais longo, além da falta de cultivares recomendadas para as condições climáticas das regiões produtoras (GUIMARÃES et al., 2007; LEMOS et al., 2004 e SANTOS et al., 2002).

Dentre os diversos alimentos utilizados pelo homem, os grãos da família das leguminosas desempenham importante papel na dieta da maioria das populações, e um aspecto de grande relevância é a disponibilidade de proteína vegetal (PROLLA, 2006). De acordo com as recomendações da FAO/OMS/ONU, as necessidades de proteína para um indivíduo adulto ficam entre 0,8 a 1,0 g/Kg/dia. Por isso, segundo Leon et al. (1993), todos os países devem priorizar a busca por novas espécies, para atender à crescente demanda de proteínas, sendo que as leguminosas tropicais de grão constituem uma boa alternativa para solucionar o problema da dependência alimentar.

Além do conteúdo protéico, outras características relacionadas à qualidade do grão, como as físicas, químicas e culinárias, são consideradas importantes para os consumidores de feijão, figurando, portanto, como caracteres adicionais na seleção de genótipos superiores em programas de melhoramento (HERRERA et al., 2002). Para tais características, temos entre as leguminosas, um grande número de espécies exibindo substancial variabilidade provocada por fatores como a cultivar, localização geográfica, condições de crescimento ou até o processo de melhoramento (MESQUITA et al., 2007; CASTELLÓN et al., 2003).

No cultivo das leguminosas, é importante o conhecimento sobre a eficiência e a diversidade de grupos-chave de bactérias, como os rizóbios noduladores que fixam N₂ (BNLNFN), uma vez que o nitrogênio é considerado um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento vegetal. Segundo Melloni et al. (2006), a diversidade e a eficiência de tais bactérias é principalmente estimada a partir da coleta ou cultivo de plantas-isca, em solos de determinadas áreas, usadas como fonte de inóculo, das quais são extraídos os nódulos, que passam pelas etapas de desinfecção e isolamento, realizado em meio de cultura específico para o crescimento de rizóbios.

Obtido os isolados, as colônias de bactérias passam por caracterizações fenotípicas, genotípicas, bioquímicas e filogenéticas (SILVA et al., 2007; FREITAS et al., 2007). A eficiência dos rizóbios é verificada através da avaliação da matéria seca da parte aérea, concentração de nitrogênio, número, matéria fresca e atividade de nódulos presentes (MELLONI et al., 2006; VIEIRA; TEIXEIRA, 2005).

Os estudos sobre a divergência genética, utilizando as técnicas multivariadas, realizam-se por meio da avaliação simultânea de vários caracteres, que permitem inúmeras inferências a partir do conjunto de dados existentes (CRUZ et al., 2004). Essas técnicas, empregadas tanto para caracteres expressos por dados quantitativos quanto qualitativos, têm facilitado o estudo sobre a diversidade de diferentes grupos de organismos e gerado informações importantes para o melhoramento, manutenção dos recursos genéticos vegetais (RIBEIRO et al., 2005; BENIN et al., 2002) e identificação de microrganismos (SILVA et al., 2007; FREITAS et al., 2007).

Assim, objetivou-se realizar a caracterização física e química de sementes em feijão-fava e estimar a divergência genética entre sub-amostras e entre rizóbios nativos noduladores do feijão-fava.

A dissertação foi estruturada em dois capítulos, cujos títulos foram: “Divergência genética para caracteres físicos e químicos de sementes em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)” e “Divergência genética entre isolados nativos de rizóbio noduladores do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)”.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Phaseolus*

No gênero *Phaseolus*, tanto as espécies silvestres como as cultivadas apresentam-se distribuídas em três centros localizados na América Latina, definidos como centro Mesoamericano, Norte e Sul Andino. O centro Mesoamericano compreende mais de 40 espécies, entre as quais estão as cinco cultivadas, *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray e *P. polyanthus* Greeman; o centro Norte dos Andes, o mais pobre em espécies, contém somente quatro das cultivadas e algumas espécies silvestres; e o centro Sul Andino, comporta duas espécies cultivadas, *P. vulgaris* e *P. lunatus*, seus respectivos ancestrais silvestres e poucas espécies silvestres (DEBOUCK, 1991).

2.1.1. Classificação botânica

Segundo Melchior (1964), o gênero *Phaseolus* pertence à ordem Rosales, subtribo Phaseolinae, tribo Phaseoleae, subfamília Papilionoideae e família Leguminosae, no entanto, Cronquist (1988) classifica-o na subclasse Rosidae, ordem Fabales e família Fabaceae. Broughton et al. (2003) afirmam que essa família é uma das maiores entre as dicotiledôneas, com 643 gêneros e 18.000 espécies distribuídas por todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais.

A respeito do número exato de espécies classificadas no gênero *Phaseolus*, a literatura apresenta controvérsias de informações. Segundo Silva et al. (2003), revisões de gênero indicam que esse número pode variar de 31 a 52 espécies, todas originárias do Continente Americano, no entanto, apenas cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L. (feijão-comum), *P. lunatus* L. (feijão-fava), *P. coccineus* L. (feijão-ayocote), *P. acutifolius*

A. Gray (feijão-tepari) e *P. polyanthus* Greeman (feijão de toda uma vida) (DEBOUCK, 1991, ZIMMERMANN; TEIXEIRA, 1996).

2.1.2. Complexo gênico

Conforme Zimmermann e Teixeira (1996), as espécies do gênero *Phaseolus* são todas diplóides, cujo número cromossômico predominante é $2n=22$, no entanto, nesse gênero, o número cromossômico pode, raramente, variar, ocorrendo $2n=20$ (MERCADO-RUARO; DELGADO SALINAS, 1998).

Os trabalhos desenvolvidos por Marechal et al. (1978) estabeleceram distâncias taxonômicas entre as espécies cultivadas do gênero *Phaseolus*, que posteriormente foram confirmadas pelos estudos químicos e moleculares de Gepts (1990), e permitiram estabelecer, para o gênero, três conjuntos gênicos distintos: o primário, o secundário e o terciário. No conjunto primário, onde o fluxo gênico é relativamente livre e a fertilidade é completa (sem barreiras genéticas), os descendentes de cruzamentos entre espécies cultivadas e silvestres podem ter menor adaptação; são encontradas quatro formas cultivadas *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* e *P. lunatus*. O conjunto gênico secundário, em que o fluxo é possível, apresentando, contudo fertilidade reduzida (barreiras genéticas moderadas) contém *P. coccineus* e *P. vulgaris*. Já no conjunto gênico terciário, que é caracterizado pelo fluxo gênico difícil, apresentando fertilidade baixíssima (barreiras genéticas fortes), sendo inclusive necessário resgate de embriões para viabilizar os descendentes, estão as espécies: *P. acutifolius/P. filiformis*, *P. ritensis*, *P. acutifolius*, *P. vulgaris/P. coccineus*, *P. ritensis*, *P. metcalfei* e *P. polystachus* (BAUDOIN; 2001).

Em relação ao *P. lunatus*, a diversidade das espécies de *Phaseolus* está organizada em conjunto gênico primário, formado pelos respectivos parentes silvestres; conjunto gênico secundário, organizado pelas espécies *P. pachyrrhizoides*, *P. augusti* e *P. bolivianus*; e conjunto gênico terciário, formado por *P. maculatus*, *P. ritensis*, *P. polystachyus* e *P. salicifolius*, sendo que todos os conjuntos são compostos por espécies silvestres (BALDOIN, 2001). Enquanto que em relação ao feijão comum (*P. vulgaris*), a diversidade das espécies de *Phaseolus* está organizada em conjuntos

gênicos primário, secundário, terciário e quaternário (DEBOUCK, 1999), sendo que *P. lunatus* junto com as espécies silvestres *P. filiformis* e *P. angustissimus* formam o conjunto gênico quaternário.

Segundo Silva e Costa (2003), o conhecimento sobre o "pool gênico", ou complexo gênico oferece a possibilidade de estruturar a diversidade genética de forma a estimular a sua utilização. A determinação desses conjuntos gênicos para as espécies cultivadas do gênero *Phaseolus* possibilita ampliar a base genética e maximizar os ganhos de seleção, melhorando a atuação das espécies no melhoramento genético (CAMARENA, 2005).

2.2. A espécie *Phaseolus lunatus* L.

O feijão-fava, considerada a espécie mais importante do gênero depois do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), é uma leguminosa tropical caracterizada por elevada diversidade genética e elevado potencial de produção, que se adapta às mais diferentes condições ambientais, mas desenvolve-se melhor nos trópicos úmidos e quentes (MAQUET et al., 1999). A cultura do feijão-fava se adéqua melhor em solo areno-argiloso, fértil e bem drenado, tendo bom rendimento com pH entre 5,6 e 6,8 (VIEIRA, 1992).

Segundo Zimmermann e Teixeira (1996), o *P. lunatus* pode ser identificado como uma leguminosa de germinação epígena; onde as folhas geralmente apresentam coloração escura, mais persistente que em outras espécies do gênero, mesmo depois do amadurecimento das vagens; bractéolas pequenas e pontiagudas; vagens bastante compridas e de forma geralmente oblonga e recurvada, com duas alturas distintas (ventral e dorsal) e número de sementes por vagem variando de duas a quatro. Tais sementes exibem grade variação de tamanho e cor de tegumento (SANTOS et al., 2002). Uma característica marcante do feijão-fava, que a distingue facilmente de outros feijões, são as linhas que se irradiam do hilo para a região dorsal das sementes, mas em algumas variedades essas linhas podem não ser tão facilmente observadas (VIEIRA, 1992).

2.2.1. Centro de origem da variabilidade

Alguns autores consideram o continente asiático como o centro de origem da variabilidade do *P. lunatus* (FORNES MANERA, 1983), no entanto, de acordo com a teoria de Mackie (1943), a origem da variabilidade do feijão-fava encontra-se na América Central, Guatemala, de onde se dispersou em três direções, possivelmente seguindo a rota do comércio:

- I. Ramificação Hopi, seguindo para o norte, atingindo os Estados Unidos, região de clima frio. As sementes dessa ramificação são médias e achatadas, definidas como grupo Sieva;
- II. Ramificação Caribe, seguindo para leste, atingindo as Antilhas e, daí, para o norte da América do Sul, extensão caracterizada por zonas calcáreas e secas (desde Yucatan até as Antilhas). As sementes são pequenas e globosas, definidas como grupo Batata;
- III. Ramificação Inca, seguindo para o sul, atingindo a América Central pela Colômbia, Equador e Peru. As sementes são grandes e achatadas, definidas como grupo Big lima.

As variedades Mesoamericanas de *P. lunatus*, que compreendem o sudeste dos Estados Unidos até o Panamá, tendo como zonas principais o México, Guatemala, Nicarágua, El Salvador, Honduras e Costa Rica, apresentam sementes pequenas de cor escura (grupo Sieva), todavia, na Europa são mais cultivados variedades com sementes grandes, achatadas e tegumento branco (grupo Big lima).

2.2.2. Conservação da espécie

A conservação da diversidade genética intra-específica de *P. lunatus* ocorre nos Bancos de Germoplasma, principalmente nos Estados Unidos (USDA), México (INIFAP) e Colômbia (CIAT), que têm coletado germoplasma para resgatar material tradicional cultivado em várias regiões do trópico americano, onde o desaparecimento tem sido mais rápido (CAMARENA, 2005).

De acordo com Knudsen (2000), conforme dados do Internacional Institute of Plant Genetic Resources (IPGRI), as coleções de germoplasma de *P. lunatus* podem ser encontradas nas seguintes instituições: Estação Experimental Agropecuária Salta,

Argentina; Instituto de Investigación Agrícola El Vallecito e Universidade Autônoma Gabriel René Moreno, Bolívia; Faculdade de Ciências Agrárias e Universidade Austral de Chile, Chile; Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colômbia, com entradas provenientes de diferentes países (Belize, Brasil, Colômbia, Honduras, México, Panamá, Filipinas e Venezuela); Centro Agronômico Tropical de Investigación e Enseñanza (CATIE) e Escola de Biología, Costa Rica; Instituto de Investigações Fundamentais em Agricultura Tropical (INIFAT), Cuba; Estação Experimental Portoviejo, INIAP, Equador; Centro Universitário de Sur Occidente (CUNSUROC) e Universidade de San Carlos, Guatemala; Ciências Agropecuárias e Instituto de Ecologia Aplicada de Guerrero (INEAGRO), México; Estação Experimental Agropecuária La Molina, Universidade Nacional Hermilio Valdizan (UNHEVAL) e Universidade Nacional Agrária La Molina, Peru.

No Brasil, o Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), localizado em Brasília, DF, conserva uma Coleção de Base de *Phaseolus* spp., com 12.488 sub-amostras de 20 espécies, 6 subespécies e 16 variedades, sendo que 32,20 % dessas sub-amostras foram coletados no país; *P. lunatus* é a segunda espécie com maior número de sub-amostras presentes na coleção, perfazendo 7,80 % (WETZEL et al., 2006). Em Viçosa, MG, no Banco de Germoplasma de Hortaliças, encontram-se 401 variedades tradicionais de feijão-fava do Brasil (KNUDSEN, 2000). Na região Nordeste, nos Estados de Pernambuco e Piauí, encontram-se também Coleções de Germoplasma, principalmente de variedades crioulas, na Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Recife, e na Universidade Federal do Piauí, em Teresina, com sub-amostras, obtidos a partir de coletas efetuadas na região Meio-Norte do Brasil e intercâmbios com outras instituições (COSTA et al., 2007).

2.2.3. Composição físico-química das sementes

Os caracteres físico-químicos das sementes contribuem para a variabilidade das espécies vegetais, estando presentes nas listas de descritores publicadas pelo IPGRI (2001), e juntamente com os caracteres morfológicos e agronômicos, contribuem para a descrição completa dos germoplasmas.

Os programas de melhoramento têm incluído as propriedades tecnológicas, nutricionais e estéticas dos grãos entre os critérios de seleção, procurando associá-las com características agronômicas relacionadas à produtividade. Segundo Herrera et al. (2002), a transferência de caracteres dos grãos, que influem em sua aceitação comercial, possibilita a oferta de melhores cultivares para produtores e consumidores. Para Bleil (1998), é crescente a preocupação em fornecer alimentos com boa qualidade nutricional, devido aos novos hábitos criados pela indústria alimentar, marcados pelo excesso de produtos artificiais.

A avaliação dos alimentos através de caracteres que envolvem análises físicas e químicas é uma das formas de se detectar problemas relacionados à qualidade do produto (BASSINELLO et al., 2003). A partir dos resultados obtidos nessas análises, pode-se conhecer o balanço nutricional dos alimentos, avaliar a disponibilidade dos nutrientes e verificar a adequação da dieta. Segundo Lima et al. (2007), tal tarefa é fundamental para os alimentos consumidos tradicionalmente no Brasil, devido apresentarem composição, com grande diversidade, pouco conhecida.

A distribuição e a qualidade dos componentes químicos dos grãos são os principais responsáveis pelas diferenças no valor nutritivo, juntamente com a presença de fatores que afetam o aproveitamento de alguns nutrientes importantes. Para o feijão-fava, informações sobre a composição dos grãos ainda são escassas (OGUNJI et al., 2003).

2. 2.3.1. Umidade

O grau de umidade é um fator crítico na determinação da viabilidade e longevidade das sementes e grãos. Segundo Bragantini (2005), existem dois tipos principais de água na composição das sementes ou grãos, a água livre, que é facilmente removida pelo calor; e a água de constituição, que está fortemente fixada nas células.

Para atingir maiores lucros, alguns produtores de grãos costumam comercializá-los quando estes, depois de secos, apresentam o máximo de umidade. No entanto, essa prática pode comprometer a qualidade, pois grãos e sementes com alto conteúdo de umidade têm o tempo de armazenamento, em condições viáveis, reduzido, devido

ao efeito dominante das atividades de insetos e fungos (LUZ, 2002). Para disciplinar a questão, o Ministério da Agricultura estabelece que a umidade dos grãos a serem comercializados como seco deve estar entre 12 e 14%, e para valores acima, a porcentagem é transformada em um valor que é subtraído da massa final do produto comercializado.

No comércio de grãos tem ocorrido enormes perdas, em virtude da forma inadequada do armazenamento, sendo a umidade excessiva uma das principais causas. Segundo Ribeiro et al. (2007), o elevado teor de umidade em grãos armazenados provoca alterações nas propriedades químicas, relacionadas ao cozimento e pode até mesmo comprometer a aceitação comercial dos grãos. O efeito da temperatura e do tempo de estocagem pode acelerar essa ação.

2.2.3.2. Lipídios

Os lipídios são componentes essenciais das estruturas biológicas, e juntamente com as proteínas e carboidratos, fazem parte de um grupo conhecido como biomoléculas. Geralmente são extraídos dos alimentos com auxílio de solventes orgânicos (éter etílico, éter de petróleo e hexano) (MADRUGA; ALDRIGUE, 2000).

Além da fração lipídica, outras substâncias são também arrastadas com o solvente durante a extração, dentre estas os álcoois e óleos voláteis, clorofila e resinas (RECH et al., 2006). Segundo o Instituto Adolfo Lutes (1995), nos alimentos em que as concentrações dessas outras substâncias extraídas junto com lipídios são significativamente elevadas, a denominação mais adequada para a determinação é extrato etéreo. Normalmente, esta denominação ocorre quando se utiliza o éter de petróleo como solvente na extração (MESQUITA et al., 2007, ANTUNES et al., 1995).

Para o feijão-fava podemos encontrar na literatura relatos da quantificação de lipídios variando entre 2,0% (BRESSANI e ELIAS, 1980) ou de 0,88 a 1,42% (AZEVEDO et al., 2003).

2.2.3.3. Minerais

Devido à importância que os minerais representam para o funcionamento metabólico normal de um organismo, o conteúdo mineral dos grãos do feijão-fava não pode ser desprezado, principalmente pela considerável presença dos minerais potássio, fósforo, magnésio, cálcio, ferro dentre outros (OLOGHOBO; FETUGA, 1983; APATA; OLOGHOBO, 1994).

A determinação do conteúdo de cinzas em uma amostra indica a riqueza de micronutrientes e macronutrientes presentes (SILVA, 1990) e a determinação fracionada destes nutrientes fornece o balanço entre eles. Porém, segundo Diniz et al. (2001), o fracionamento não é muito vantajoso, tendo em vista que minerais são muito variáveis e possuem relação direta com o solo onde a semente foi cultivada.

Dentre os grupos dos minerais normalmente presentes, destacam-se como macrominerais Ca, K, Mg, Na, P e os microminerais Co, Cr, Cu, Fe Mn, Zn, sendo os dois últimos citados como minerais ultratraços, ou seja, elementos essenciais ao organismo em concentrações de nanogramas (MORGANO et al., 2002).

Na literatura, encontram-se trabalhos que estimam herdabilidade e o controle de genes envolvidos no acúmulo dos minerais (QUINTANA et al., 1996; MIGLIORANZA et al., 2003).

2.2.3.4. Proteínas

As proteínas das leguminosas são fontes potenciais de nutrientes valiosos, sendo objeto de diversos estudos, a fim de se obter um melhor uso (TINTORÉ et al., 2004). Segundo Rios et al. (2003), um de seus problemas nutricionais é a baixa digestibilidade, quando comparadas com as proteínas animais. Por outro lado, a presença de fatores antinutricionais como os compostos fenólicos e os pigmentos presentes no tegumento do grão, reduzem o valor biológico das proteínas (CHIARADIA et al., 1999).

Os feijões, por proporcionarem nutrientes essenciais, são utilizados como alternativa em substituição a carnes e outros produtos protéicos pela população de baixa renda. Contudo, Ogunji et al. (2003) avaliando seis espécies de feijão, incluindo o feijão-fava, observaram que os índices dos aminoácidos sulfurados presentes nas

proteínas eram insuficientes, demonstrando que os feijões são inadequados para consumo individual de proteína, porém se combinado com outros alimentos, que supram à carência de aminoácidos, mostram-se promissores. No feijão-comum, um dos maiores problemas é o baixo valor nutricional das principais proteínas, albumina e globulina, decorrente dos reduzidos teores e biodisponibilidade de aminoácidos sulfurados (PEREIRA; COSTA, 2002). De acordo com Rios et al. (2003), as condições e o tempo de armazenamento podem alterar o valor nutricional das proteínas. Em feijão-fava, Tintoré et. al. (2004) determinaram a quantidade relativa das proteínas: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas, bem como dos aminoácidos presentes. Destas, apenas as prolaminas mostraram-se ricas em aminoácidos sulfurados.

2.2.3.5. Carboidratos

A principal função dos carboidratos é prover um suprimento contínuo de energia às células do organismo (KOKUSZKA, 2005). Nas leguminosas, esses são constituídos principalmente de amido, carboidrato complexo; um polissacarídeo formado por várias unidades de glicose, encontrado na forma de amilose (cadeias retas) e de amilopectina (cadeias ramificadas) (BRAGA, 2003).

As fibras representam os carboidratos resistentes à digestão enzimática e às secreções do trato intestinal humano, que desempenham o papel de manter a integridade funcional do trato gastrintestinal, com reconhecida importância na prevenção de diversas doenças, como prisão de ventre, hemorróidas e outras (BUENO, 2005). Segundo Diniz et al. (2001), as fibras estão presentes principalmente no tegumento dos grãos e os seus percentuais dependem do estágio de formação desta camada. De acordo com Garbelotti e Torres (2005), leguminosas como feijão e grão-de-bico podem ser consideradas como as principais fontes de fibra alimentar benéfica à saúde humana.

A fração fibrosa dos alimentos é representada pelos constituintes da parede celular: hemicelulose, celulose e lignina, que correspondem a Fibra alimentar total (FAT), sendo celulose e lignina, a Fibra alimentar insolúvel (FAI) e hemicelulose, a Fibra alimentar solúvel (FAS). No entanto, a maioria das tabelas de composição dos alimentos ao invés de apresentarem essas frações mostra apenas o valor da fibra bruta.

Segundo Giuntini et al. (2003), essa determinação subestima o real valor da fração alimentar total, que é devidamente quantificada através dos métodos enzimicos-gravimétricos, por serem os que mais se aproximam da digestão humana.

Os referidos métodos têm sido atualmente empregados em trabalhos sobre a quantificação da divergência para o conteúdo fibroso de feijões (LONDERO et al., 2006; LONDERO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008a; RIBEIRO et al., 2008b).

2.2.3.6. Ácido cianídrico

A produção do ácido cianídrico (HCN) é um fenômeno relativamente comum entre plantas superiores, encontrado em aproximadamente 3.000 diferentes espécies de plantas, muitas das quais pertencentes às famílias *Rosaceae*, *Fabaceae*, *Linaceae*, *Compositae* e outras (VETTER, 2000; McMAHON et al., 1995; CONN, 1980). Várias delas produzem quantidades suficientes de compostos cianogênicos, que podem funcionar como formas de transporte de nitrogênio reduzido ou de moléculas químicas na defesa contra insetos.

Segundo Roel et al. (2003) considera-se que a dose letal de HCN seja de aproximadamente 1,0 a 4,0 mg de HCN por kg de peso vivo, sendo a tolerância estendida para 100 mg/kg se a absorção for cutânea.

Os glicosídeos cianogênicos conhecidos como linamarina e lotaustralina, sob a ação de ácidos ou enzimas, sofrem hidrólise e liberam acetona, açúcar e ácido cianídrico, o princípio tóxico formado (SANTOS et al., 2005; ROEL et al., 2003; VETTER, 2000). Frehner et al. (1990) identificaram no feijão-fava a presença desses dois monoglicosídeos, nas vagens e sementes depois da antese.

Entre as leguminosas que produzem HCN, somente o feijão-fava pode contê-lo em quantidade elevada, sendo este o responsável pelo seu sabor amargo, característica ausente em outras espécies de feijão (VIEIRA, 1992). Azevedo et al. (2003) encontraram o conteúdo tóxico variando de 15-25 ppm a 115-150 ppm, em sete variedades de feijão-fava comercializadas no CEASA-PI.

O consumo de grãos secos de feijão-fava com paladar amargo deve ser precedido de cuidados, como deixar os grãos de molho durante uma noite e eliminar a água antes do cozimento (VIEIRA, 1992). Segundo Azevedo et al. (2003), para eliminar a

toxicidade do feijão-fava e utilizar as sementes na alimentação humana, é necessário submetê-las à cocção por três a cinco vezes, com total substituição da água utilizada. Ihimire et al. (2004) encontraram maior redução do HCN nos grãos do feijão-fava a partir da exposição em ácido clorídrico por 30 minutos, além de garantir a permanência de altos índices de triptofano nos grãos, um aminoácido importante para síntese protéica e regulação de alguns mecanismos fisiológicos.

2.3. Fixação biológica de Nitrogênio

Em regiões tropicais e subtropicais, espécies vegetais fixadoras de nitrogênio atmosférico (N_2) podem contribuir com mais de 80% da dieta protéica humana, sendo que a fixação de N_2 constitui um dos principais suportes à produção vegetal e manejo do solo (VALARINI, 2002). Tal fixação ocorre devido ao complexo enzimático nitrogenase, que converte o N_2 em amônia (NH_4) e assim disponibiliza nitrogênio para as plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os rizóbios, como são denominados comumente, são bactérias do solo que crescem na rizosfera das plantas, sendo responsáveis pela fixação do N_2 e proporcionando o aumento da disponibilidade de nutrientes que influenciam positivamente na morfologia e fisiologia da planta (VESSEY, 2003). Contudo, nem todas as bactérias presentes no solo formam associações especializadas, de forma que o nitrogênio fixado seja disponibilizado diretamente a planta hospedeira, como as da família Rhizobiaceae, que estabelecem associações simbióticas em nódulos de raízes da família Fabaceae (Leguminaceae) (VALARINI, 2002).

Os caracteres utilizados para verificar a eficiência da nodulação são: número, massa seca ou fresca de nódulos, massa seca da parte aérea e área foliar, que pode ser estimada através do folíolo central (QUEIROGA et al., 2003).

Segundo Starkanova et al. (1999), a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada um processo chave para o manejo agrícola sustentável, podendo proporcionar às plantas menor dependência à aplicação de fertilizantes químicos nitrogenados e fosfatados. Hara e Oliveira (2004) isolaram, em solos da Amazônia, estirpes de rizóbios tolerantes à acidez do solo e à presença do alumínio tóxico, capazes de solubilizar e disponibilizar fosfatos em níveis satisfatórios tanto para si como

para a planta hospedeira. Soares et al. (2006), avaliando a eficiência agrônômica de estirpes previamente selecionadas de rizóbio, em simbiose com o feijoeiro, no campo, constataram aumento no rendimento e acúmulo de N₂ nos grãos do feijoeiro.

Outra forma de utilização da eficiência e diversidade de grupos-chave de bactérias, como as que nodulam leguminosas e fixam N₂, é em áreas que passaram por processos de degradação ambiental, como as de mineração, uma vez que essas bactérias participam dos processos de ciclagem de nutrientes e contribuem para a sustentabilidade das áreas que passam por processo de revegetação (MELLONI et al., 2006).

2.3.1. Classificação dos rizóbios

Inicialmente, as bactérias formadoras de nódulos em leguminosas eram todas classificadas no gênero *Rhizobium*, apresentando seis espécies *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* e *R. japonicum* (FRED et al., 1932). O círculo de hospedeiros era um fator importante para efeito de classificação, porém esse aspecto deixou de ser considerado, devido ao grande número de exceções nos grupos, e os avanços das pesquisas darem maior ênfase às características morfológicas, fisiológicas e moleculares na classificação das estirpes (WANG et al., 2008).

Jordan (1984) modificou a taxonomia do rizóbio, subdividindo o gênero em *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. O segundo gênero criado, *Bradyrhizobium*, é caracterizado por apresentar cepas de crescimento lento, reação básica em meio de cultura LMA (Levedura Manitol Ágar), com diâmetro menor ou igual a 1 mm e crescimento em 5 a 7 dias, contendo as espécies *R. japonicum* e *R. lupini*, com características semelhantes. No gênero *Rhizobium* permaneceram as três espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti* e *R. loti*, sendo considerados três biovars da primeira espécie: *R. leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii* e bv. *phaseoli*. Segundo Moreira e Siqueira (2006), atualmente, com o uso das técnicas moleculares, são descritos seis gêneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium*.

O gênero *Rhizobium* apresenta células aeróbias, Gram negativas, com forma de bacilos, que medem 0,5-1,0 x 1,3-3,0 µm, e a motilidade é realizada por flagelos (1-6),

que podem ser peritróicos ou subpolares; as colônias geralmente são brancas ou bege, circulares, concavas, semitranslúcidas ou opacas e mucilaginosas, medindo 2-4 mm de diâmetro aos 3-5 dias de incubação em meio LMA (WANG et al., 2008; BÉCQUER, 2004). O crescimento em meio de carboidratos geralmente é rápido, reação ácida e abundante quantidade de polissacárideo extracelular, assim como os demais gêneros. A temperatura ótima de crescimento ocorre entre 25-30 °C e pH 6-7, porém, podem crescer em extremos de temperatura (4,0-42,5 °C) e pH (4,5-9,5); são quimiorganotróficas, utilizando uma série de carboidratos e sais de ácidos orgânicos como fontes de carbono, sem a formação de gás (MARIN et al., 2008). Segundo Bécquer (2004), dentre as espécies descritas nesse gênero até o ano de 2001, formando nódulos com *Phaseolus vulgaris*, encontram-se *R. tropici*, *R. etlii*, *R. gallicum* e *R. giardinii*.

O gênero *Sinorhizobium*, cujas cepas são produtoras de ácido e de crescimento rápido, como as de *Rhizobium*, foi segregado das cepas de rizóbios que formam nódulos na soja (*Glycine max* L.), especificamente *R. fredii* e *R. meliloti* (MARIN et al., 2008), devido às diferenças entre as seqüências do gene 16S rRNA (WANG et al., 2008). As células bacterianas apresentam a forma de bacilos, que medem 0,5-1,0 x 1,2-3,0 µm; a temperatura ótima de crescimento varia entre 25 e 30 °C, mas muitas estirpes crescem a 35°C e outras a 10°C; o pH ótimo está entre 6 e 8, porém algumas estirpes crescem em pH 5 e outras em pH 10,5; são bactérias quimiorganotróficas, utilizando uma série de carboidratos (exceto celulose e amido) e sais de ácidos orgânicos como fonte de carbono (BÉCQUER, 2004).

Devido a existência de cepas com características intermediárias, às típicas espécies rápidas de *Rhizobium* e espécies lentas de *Bradyrhizobium*, ocorreu a formação do gênero *Mesorhizobium*. Nesse gênero, as células bacterianas são bacilos, que medem 0,4-0,9 x 1,2-3,0 µm; as colônias em meio LMA são circulares, convexas, semitranslúcidas e mucilaginosas, com 2-4 mm de diâmetro, após 5 dias de incubação a 28°C, contudo, algumas espécies apresentam menos de 1 mm após 7 dias de incubação (WANG et al., 2008). Todas as cepas produzem ácido em LMA. Todas as espécies assimilam glicose, raminose e sacarose metabolizando-os em produtos ácidos, sendo que o pH ideal para crescimento está entre 4,0 e 10,0 e a temperatura

entre 37 a 40 °C (MARIN et al., 2008).

O gênero *Bradyrhizobium* apresenta células bacterianas aeróbias, Gram-negativas, bacilos que medem 0,5-0,9 x 1,2-3,0 µm, com um flagelo polar ou subpolar, e crescimento pouco e lento, em meio enriquecido com levedura; são pleomórficas e não formam esporos (WANG et al., 2008; BÉCQUER, 2004). As colônias são circulares, raramente translúcidas, brancas e convexas, com diâmetro menor que 1 mm após 5-7 dias de incubação. Podem formar colônias do tipo seco, opacas, freqüentemente punctiformes e produtoras de álcali. Ormenõ- Orrillo et al. (2006) identificaram a espécie *Bradyrhizobium yuanmingense* nodulando o feijão-fava, cujos isolados apresentavam taxa de crescimento lento, atingindo colônias com tamanho de 1-3 mm, entre 5-6 dias. Entretanto, um grupo de isolados com taxa de crescimento considerado extra-lento, atingindo colônias de tamanho > 1 mm, entre 7-10 dias, não apresentou similaridade com nenhuma espécie já descrita no gênero *Bradyrhizobium*, o que representa uma grande diversidade desconhecida entre os microrganismos noduladores do feijão-fava. Segundo Euzéby (2008), existem ainda descritas as espécies *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense*, *B. betae* e *B. canariense*, pertencentes a esse gênero.

O gênero *Azorhizobium* possui uma única espécie descrita, *A. caulinodans*, que forma nódulos efetivos em talos e raízes de *Sesbania rostrata*. Segundo Wang et al. (2008), as células bacterianas apresentam forma de bacilos que medem 0.5-0.6 x 1.5-2.5 µm, movendo-se em meio sólido devido a presença de flagelos peritricos e em meio líquido, com flagelo lateral. As colônias são circulares, translúcidas, gomosas, cor cremosa e apresentam crescimento tão rápido como as do gênero *Rhizobium* (medindo mais de 2 mm de diâmetro, após 2 dias), produzem álcali em meio LMA. Ao contrário de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, esse gênero não assimila açúcares (exceto glicose) (MARIN et al., 2008) e segundo Young (1996), quanto à posição filogenética, encontra-se mais afastado do gênero *Rhizobium*.

O gênero *Allorhizobium* também apresenta, até agora, uma única espécie descrita, *A. undicola* (LAJUDIE et al., 1998), isolada a partir de nódulos de *Neptuna natans*, uma planta aquática africana do Senegal (WANG et al., 2008).

Até recentemente era aceito que as leguminosas eram noduladas exclusivamente por membros das α-Proteobactérias pertencentes a alguns gêneros

relacionados à família Rhizobiaceae, acima descritos. Nos últimos anos, entretanto, um número de outras α -proteobactérias foram mostradas como noduladoras de leguminosas incluindo *Methylobacterium*, (SY et al, 2001), *Blastrobacter* (VAN BERKUN e EARDLY, 2002) e *Devosia* (RIVAS et al., 2002).

Atualmente membros de β -Protobactérias foram descobertas nos nódulos de leguminosas tropicais incluindo, *Burkholderia sp.* estirpes (STM 678 e STM 815), *Ralstonia taiwanesis* (LMG 19424) isoladas de *Mimosa pudica* (Chen et al. 2001, 2003 e 2007).

2.3.2. Diversidade dos rizóbios

A utilização da diversidade dos microrganismos ocorre, principalmente, através do conhecimento das características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, filogenéticas e genéticas, que são aplicadas de forma conjunta ou individual nos trabalhos sobre rizóbios (ORMENÕ-ORRILLO et al., 2006; ZRIBI et al., 2005; FENG et al., 2002; ANYANGO et al., 1995; SOARES et al., 2006; STROSCHEIN, 2007). Atualmente todas essas técnicas são utilizadas para distinção de estirpes de rizóbios, constituindo a taxonomia polifásica, mantendo o uso dos métodos fenotípicos clássicos, que nunca entraram em desuso ou tornar-se-ão obsoletos. Segundo Bécquer (2004), a diversidade genética dos microrganismos nunca poderá ser avaliada por um único critério, ainda que sejam as técnicas moleculares.

A captura dos microrganismos na rizósfera das plantas é feita com a utilização de planta-isca, cuja principal característica é a promiscuidade, constituindo um dos métodos mais utilizados para avaliar a diversidade de bactérias noduladoras de leguminosas e fixadoras de N_2 (BNLFN) nos solos. Hungria (1994) recomenda a coleta de nódulos para isolamento ou de solos que serão utilizados como fonte de inóculos, em um raio de 30 cm da planta-isca, na profundidade de 0 a 20 cm. O isolamento normalmente é realizado a partir da seleção aleatória dos maiores nódulos, de coloração intensa avermelhada, firmando a presença de leghemoglobina e conseqüente fixação ativa de N_2 .

Melloni et al. (2006) avaliaram a eficiência e a diversidade fenotípica de populações de BNLFN em solos de áreas de mineração de bauxita, nos ambientes de

campo e serra, baseados nas seguintes características culturais: tempo de crescimento, diâmetro da colônia, alteração do meio e produção de goma. Os autores construíram dois dendrogramas de similaridade, um para os isolados de feijão-caupi e outro para feijão-comum utilizados como plantas-isca. O feijão-caupi mostrou-se com um maior número de grupos de diversidade, em ambos os ambientes. De acordo com Santos et al. (2007) e Melloni et al. (2006), além do número de grupos de diversidade, a caracterização fenotípica de isolados também pode estimar a diversidade das populações de rizóbio através dos índices: Shanon e Weaver, riqueza de Margalef e outros, aplicados quando populações são obtidas de formas diferenciadas, como isolamento dos microrganismos coletados sob diferentes áreas, coberturas vegetais e ou diferentes manejos.

Entre isolados de rizóbio nativos existe eficiente fixação do N_2 , que pode contribuir para aumentar a produção de grãos e reduzir os custos com fertilizantes nitrogenados, entretanto, é necessária a avaliação, de modo a possibilitar a seleção de estirpes altamente eficientes em condições adversas (SANTOS et al., 2005). Silva et al (2007) identificaram entre isolados de rizóbios nativos, estirpes resistentes à temperatura elevada e resistentes aos antibióticos kanamicina e ácido nalidíxico, com potencial para utilização em regiões semi-áridas. Segundo Vieira et al (2005), as estirpes nativas de rizóbio podem ser tão eficientes quanto as estirpes selecionadas, quando condições adequadas de expressão do seu alto potencial de fixação de N_2 são fornecidas.

Na literatura são encontrados diversos trabalhos sobre fixação biológica de nitrogênio, em diferentes leguminosas, tais como: amendoin (SANTOS et al., 2005), feijão-caupi (VIEIRA et al., 2005, ZILLI et al., 2006), feijão-caupi e feijão-comum (MELLONI et al., 2006), feijão-comum (MOTASSO et al., 2002), que além de identificar a diversidade dos rizóbios, também avaliam a eficiência dessas bactérias no processo da FBN.

Considerando-se que a FBN é mediada por uma ampla gama de microrganismos procariotos, com substancial diversidade morfológica, fisiológica, genética, bioquímica e filogenética (SILVA et al., 2007), espera-se que estudos envolvendo um simbiote pouco conhecido como o *Phaseolus lunatus*, proporcionem o isolamento de novas

estirpes de rizóbio, com características importantes para adaptação ecológica e maior eficiência na fixação biológica de nitrogênio.

2.4. Análises multivariadas

As técnicas multivariadas possibilitam a avaliação simultânea de vários caracteres e permitem que inúmeras inferências sejam feitas a partir do conjunto de dados existentes (FONSECA; SILVA, 1999). Essas técnicas podem gerar informações importantes para manutenção dos recursos genéticos, na simplificação de bancos de germoplasma e formação de coleções núcleo (ARIEL et al., 2006); além de auxiliar na escolha de descritores que melhor representem à diversidade presente nos Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) (FONSECA; SILVA, 1999). Para os programas de melhoramento, as técnicas multivariadas auxiliam, sobretudo, na identificação de combinações híbridas de maior heterozigose e de maior efeito heterótico (CARVALHO et al., 2003), e na indicação de potenciais genitores a serem utilizados (KARASAWA et al., 2005).

Com relação aos bancos de germoplasma, a própria caracterização das sub-amostras empregadas nessas análises, possibilita a identificação de duplicatas e o intercâmbio de germoplasma entre pesquisadores. As duplicatas são presenças inconvenientes em BAG, por reduzirem o espaço disponível para conservação e avaliação do material, além de não contribuírem para a variabilidade genética, principal motivo da conservação (FONSECA; SILVA, 1999).

Em programas de melhoramento, o efeito heterótico pode ser estimado pela natureza preditiva dos genótipos com o uso das análises multivariadas, que tomam por base as características agronômicas, morfológicas, moleculares, entre outras, e dispensam a obtenção das combinações híbridas entre as sub-amostras, tornando-se vantajosas em relação aos métodos quantitativos, que utilizam as análises dialélicas (CRUZ et al., 2004).

Entre as análises multivariadas destacam-se os métodos de agrupamento por otimização e os hierárquicos, que realizam o agrupamento de sub-amostras utilizando algum critério, mas, geralmente, mantêm o princípio de estabelecer maior homogeneidade dentro do grupo que entre os grupos (CRUZ et al., 2004).

O método de otimização mais utilizado é o método de Tocher, que usa o critério do estabelecimento de grupos, de forma que a distância média intragrupos seja sempre inferior a qualquer distância intergrupos (RAO, 1952). Os métodos hierárquicos envolvem a construção de uma hierarquia aglomerativa ou divisiva em forma de um dendrograma, aonde as observações vão sendo combinadas passo-a-passo e não há um número pré-definido de grupos que serão formados. Entre os mais utilizados estão o método de ligação simples (single linkage) ou vizinho mais próximo, ligação completa (complete linkage) ou vizinho mais distante e ligação média entre grupos (UPGMA) (CRUZ, 2001).

O método de otimização de Tocher permite a formação de grupos mutuamente exclusivos, enquanto que os métodos hierárquicos apresentam uma grande possibilidade de números de grupos, cabendo ao pesquisador adotar àquela que melhor represente a estrutura de agrupamento esperada, com base no seu conjunto de dados (BERTAN et al., 2006). Segundo Cruz et al (2004), o estabelecimento de um exame visual de pontos onde ocorram altas mudanças de níveis possibilita a delimitação dos grupos.

O agrupamento de Tocher é normalmente utilizado juntamente com o UPGMA, que revelam correspondência na alocação dos elementos nos grupos (ARIEL et al., 2006). A concordância com o agrupamento de Tocher permanece mesmo quando outro agrupamento hierárquico é utilizado ou técnica multivariada. Karasawa et al. (2005), trabalhando com tomates, encontraram correspondência na formação de grupos pelos métodos de Tocher e Vizinho Mais Próximo. Abreu et al. (2004), através dos componentes principais e agrupamento de Tocher, identificaram concordantemente as mesmas sub-amostras de feijão-de-vagem como as mais distantes. Por isso o agrupamento de Tocher tem sido eficiente na identificação da diversidade genética em genótipos de feijão (COIMBRA; CARVALHO, 1998) ou de genitores promissores para o melhoramento de caracteres nutricionais nos grãos de feijão (RIBEIRO et al., 2005).

O UPGMA, que utiliza a média das distâncias entre todos os pares de genótipos para formação de cada grupo, é adotado em grande escala no melhoramento vegetal, na representação das distâncias em estudos multivariados, apresentando superioridade em relação aos demais hierárquicos, em estudos filogenéticos (BERTAN et al., 2006).

Ariel et al. (2006) definiram esse método como o de melhor ajuste, seguido dos métodos do vizinho mais próximo e do vizinho mais distante, através dos coeficientes de correlação cofenética, que estima o grau de ajuste entre as matrizes de dissimilaridade observada e a matriz resultante do agrupamento. Elias et al. (2007) também utilizaram o método UPGMA para agrupamento de cultivares locais de feijão preto, do Estado de Santa Catarina, devido a superioridades em relação aos demais métodos hierárquicos, em fornecer informações genealógicas ou pedigree.

A aplicação dos métodos de agrupamento depende da utilização de uma medida de dissimilaridade previamente estimada (CRUZ et al.; 2004), entre as quais encontram-se a distância euclidiana e a distância generalizada de Mahalanobis. Esta última é uma medida obtida a partir de dados quantitativos, com repetição, que foi proposta por Mahalanobis, em 1936, sendo amplamente empregada em estudos de divergência nas mais diferentes culturas, tais como: arroz (ZIMMER et al., 2003), melancia (SOUZA et al., 2005), aveia (BENIN et al., 2003) e feijão (ELIAS et al., 2007; ABREU et al., 2004; MACHADO et al., 2002; COIMBRA; CARVALHO, 1998).

O emprego das análises multivariadas a partir das medidas de dissimilaridades aumenta a probabilidade de se recuperar genótipos superiores nas gerações segregantes (CARVALHO et al., 2003), sobretudo, quando se realiza o cruzamento entre indivíduos mais afastados gerados por essas análises (KARASAWA et al., 2005). Segundo Coimbra e Carvalho (1998), a identificação de genótipos contrastantes através da distância generalizada de Mahalanobis é relevante para o programa de melhoramento lograr êxito na seleção. Todavia, a escolha de genótipos deve ser feita considerando também seus comportamentos per se (ABREU et al., 2004), ou seja, o mais apropriado é recomendar cruzamentos entre genótipos divergentes, mas que também evidenciem desempenho superior em relação aos principais caracteres de importância agrônômica (COIMBRA; CARVALHO, 1998).

Para os caracteres qualitativos, também avaliados no melhoramento vegetal e na caracterização de microrganismos, são utilizados índices ou coeficientes para transformação dos dados originais em matrizes de dissimilaridade, que são posteriormente analisadas de forma multivariada. Sudré et al. (2006) e Bento et al. (2007), em estudos sobre divergência de pimentas e pimentões, utilizaram dados

multicategóricos multiclases e binários, para construção de agrupamento pelos métodos do vizinho mais próximo e Tocher. Fernandes et al. (2003) caracterizaram geneticamente estirpes de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros de Sergipe, empregando o coeficiente de Jacard para construção de dendrograma pelo método UPGMA. Freitas et al. (2007) utilizaram o coeficiente de Jacard para construir um dendrograma de similaridade, com base em características fenotípicas de bactérias que nodularam Jacatupé.

Segundo Ariel et al. (2006), quando não se tem informação sobre a relação genética entre a maioria dos genótipos, não se pode determinar que método de agrupamento seja mais acurado. Entretanto, para os estes é importante que diferentes critérios de agrupamento sejam utilizados, e que se considere como correta a estrutura resultante da maior parte deles, para se assegurar que o resultado obtido não seja um artefato da técnica utilizada, tendo em vista que cada técnica multivariada impõe certo grau de estrutura aos dados no reconhecimento da diversidade genética.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F.B.; LEAL, N.R.; RODRIGUES, R.; AMARAL JR., A.T; SILVA, D.J.H. Divergência genética entre acessos de feijão-de-vagem de crescimento indeterminado. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.3, p.547-552, 2004.

ANTUNES, P.L.; BILHALVA, A.B.; ELIAS, M.C.; SOARES, G.J.D. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivares rico 23, carioca, piratã-1 e rosinha-g2. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, n.1, p.12-18, 1995.

ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied And Environmental Microbiology**, v.61, n.11, p.4016-4021, 1995.

APATA, D.F.; OLOGHOBO, A.D. Biochemical evaluation of some Nigerian legume seeds. **Food Chemistry**, v.49, n.4, p.333-338, 1994.

ARRIEL, N.H.C.; MAURO, A.O.D.; MAURO, S.M.Z.D.; BAKKE, O.A.; UNÊDA-TREVISOLI, S.H.; COSTA, M.M.; CAPELATO, A.; CORRADO, A.R. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.801-809, 2006.

AZEVEDO, J. DE 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).

BASSINELLO, P.Z.; COBUCCI, R. DE M. A; ULHÔA, V.G.; MELO, L.C.; PELOSO, M.J.D. **Aceitabilidade de três cultivares de feijoeiro comum**. Santo Antônio de Goiás, 2003. 6p. (Embrapa Arroz e Feijão: Comunicado Técnico, 66).

BAUDOIN, J.P. Contribuição des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v.5, n.4, p.221-230, 2001.

BÉCQUER, C.J. Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias. **Revista Biología**, v.18, n.1, p.9-29, 2004.

BENIN, G.; CARVALHO, F.I.F. DE; OLIVEIRA, A.C.; MARCHIORO, V.S.; LORENCETTI, C.; KUREK, A.J.; SILVA, J.A.G. DA ; CRUZ, P.J.; HARTWIG, I. Comparação entre medidas de dissimilaridade e estatísticas multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia. **Ciência Rural**, v.33, n.4, p.657-662, 2003.

BENIN, G.; CARVALHO, F.I.F. DE; ASSMANN, I.C.; CIGOLINI, J.; CRUZ, P.J.; MARCHIORO, V.S.; LORENCETTI, C.; SILVA, J.A.G. Identificação da dissimilaridade genética entre genótipos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo preto. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n.3, p.179-184, 2002.

BENTO, C. DOS S.; SUDRÉ, C.P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E.M.; PEREIRA, M.G. Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. **Scientia Agraria**, v.8, n.2, p.149-156, 2007.

BERTAN, I.; CARVALHO, F.I.F. DE; OLIVEIRA, A.C. DE; VIEIRA, E.A.; HARTWIG, I.; SILVA, J.A.G. DA; SCHMIDT, D.A.M.; VALÉRIO, I.P.; BUSATO, C.C.; RIBEIRO, G. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, n.3, p.279-286, 2006.

BLEIL, S.I. O padrão alimentar ocidental: considerações sobre a mudança de hábitos no Brasil. **Revista Cadernos de Debate/UNICAMP**, v.6, n.1, p.1-25, 1998.

BRAGA, S. DOS B. **Caracterização Física, Química e Presença de Fatores Antinutricionais em Diferentes Variedades de Feijão-de-Lima (*Phaseolus lunatus* L.) cultivada no Estado da Paraíba**. 2003, 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – UFPB, João Pessoa – PB.

- BRAGANTINI, C. **Alguns aspectos do armazenamento de sementes e grãos de feijão**. Santo Antônio de Goiás, 2005. 28p. (Embrapa Arroz e Feijão: Documentos, 187).
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G. Nutritional value of legume crops for humans and animals. In: SUMMERFIELD, R.J; BUNTING, A.H. [Ed]. **Advances in legume science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1980. p. 135-155.
- 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.
- BUENO, R.O.G. **Característica de qualidade de biscoito e barras de cereais ricos em fibras alimentares a partir de farinha de semente e polpa de nêspera**. 2005, 206f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – UFPR, Curitiba - PR.
- CAMARENA, F. Magnitud e impacto potencial de la liberación de los organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales. Caso: **Leguminosas de grano**. p. 19-40. En: O. Hidalgo; W. Roca; E.N. Fernández-Northcote (eds.). Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales: Casos Algodón, Leguminosas de grano, Maíz y Papa. Consejo Nacional del Ambiente. Lima, Perú, 2005.
- CARVALHO, L.P. DE; LANZA, M.A.; FALLIERI, J.; SANTOS, J.W. DOS. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1149-1155, 2003.
- CASTELLÓN, R.E.R.; ARAÚJO, F.M.M.C. DE; RAMOS, M.V.; ANDRADE NETO, M.; FREIRE FILHO, F.R.; GRANGEIRO, T.B.; CAVADA, B.S. Composição elementar e caracterização da fração lipídica de seis cultivares de caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.7, n.1, p.149-153, 2003.
- CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; PRESCOTT, A.R.; KIERANS, M.; SPRENT, J.L. Nodulation of *Mimosa* spp. by the β -proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.16, p.1051-1061, 2003.

- CHEN, W.M.; LAEVENS, S.; LEE, T.M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1729-1735, 2001.
- CHEN, W.M.; DE FARIA, S.M.; JAMES, E.K.B.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.L.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes Mimosa bimucronata and Mimosa scabrella. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.1055-1059, 2007.
- CHIARADIA, A.C.N.; COSTA, N.M.B.; GOMES, J.C. Retirada do tegumento e da extração dos pigmentos na qualidade protéica do feijão-preto. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.131-136, 1999.
- COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F. Divergência genética em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com grão tipo carioca. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n.3, p.211-217, 1998.
- CONN, E. E. Cyanogenic compounds. **Annual Review of Plant Physiology**, v.31, p.433-451, 1980.
- COSTA, E.M.R.; SANTOS, J.O.; SILVA, S.C.C.C.E; LOPES, A.C.A.; GOMES, R.L.F. Dissimilaridade de acessos de fava do banco de germoplasma da Universidade Federal do Piauí. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, VI, 2007, Cidade do México. **Anais...** Cidade do México: Universidad Autonoma Chapingo, 2007, v.1, p.362, p.43.
- CRONQUIST, A. **Devolution and classification of flowering plants**. New York: New York Botanical Garden, 1988. 555 p.
- CRUZ, C.D. **Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001. 648 p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. 480 p.
- DEBOUCK, D.G. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. In:

- SINGH, S. P. (Ed.). **Common bean improvement in the twenty-first century**. Dordrecht: Kluwer, 1999. p. 25-52.
- DEBOUCK, D.G. Systematics and morphology. In: SCHOONHOVEN, A. Van; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. p.55-118.
- DINIZ, M. DO C.; SILVA, C.L. DA; ARAGÃ, N.L. DE L.; MUNIZ, M.B.; FERREIRA, G.M.; OLIVEIRA, M.R.T. DE. Caracterização química e tecnológica de 4 variedades de feijão macasar verde (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) comercializadas e consumidas no município de Campina Grande–PB. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.3, n.1, p.91-100, 2001.
- ELIAS, T.H.; GONCALVES-VIDIGAL, M.C.; GONELA, A.; VOGT, G.A. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão-preto em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1443-1449, 2007.
- EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/b/bradyrhizobium.html>>. Acesso em: 28 fev. 2008.
- FENG, L.; ROUGHLEY, R.J.; COPELAND, L. Morphological changes of Rhizobia in peat cultures. **American Society for Microbiology**, v.68, n.3, p.1064-1070, 2002.
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.7, p.835-842, 2003.
- FONSECA, J.R.; SILVA, H.T. Identificação de duplicidades de acessos de feijão por meio de técnicas multivariadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.3, p.409-414, 1999.
- FORNES MANERA, J. **Cultivo de habas y guisantes**. Barcelona: Sintes, 1983. 143p.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I; McCOY, E. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison, W.I. University of Wisconsin. 1932. 342p.
- FREHNER, M.; SCALET, M.; CONN, E.E. Pattern of the Cyanide-Potential in Developing fruits implications for plants accumulating cyanogenic monoglucosides

(*Phaseolus lunatus*) or cyanogenic diglucosides in their seeds (*Linum usitatissimum*, *Prunus amygdalus*). **Plant Physiology**, v.9, n.1, p.28-34, 1990.

FREITAS, A.D.S. DE; VIEIRA, C.L.; SANTOS, C.E. DE E.S.; STAMFORD, N.P.; LYRA, M. DO C.C.P. DE. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v.66, n.3, p.497-504, 2007.

GARBELOTTI, M.L.; TORRES, E.A.F.S. Contribuição de fibras dos alimentos segundo porção individual servida. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v.15, n.1, p.15-16, 2005.

GEPTS, P. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. **Economic Botany**, v.44, n.3 suplemento, p.28-38, 1990.

GIUNTINI, E. B.; LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. Potencial de fibra alimentar em países ibero-americanos: alimentos, produtos e resíduos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.53, n.1, p.14-19, 2003.

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>. 04 maio 2008.

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.

HARA, F.A. DOS S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v.34, n.3, p.343-357, 2004.

HERRERA, P.P.; ESQUIVEL, G.E.; SERNA, R.R.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, n.2, p.172-180, 2002.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: Hungria, M.; Araujo, R.S. (Org.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994, p.45-61.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados agregados:** pesquisa: produção agrícola municipal. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=p&o=20&i=P>> Acesso em 20 maio 2008.

IHIMIRE, I.G.; EGUAVOEN, I.O.; ONIMAWO, I.A. Dehydrocyanation of cultivars of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and its effect on tryptophan content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, n.3, p.246-250, 2004.

IPGRI - **International Plant Genetic Resources Institute.** Descritores para *Phaseolus lunatus* (Feijão-espadinho). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 2001, 44p.

JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae. CONN. 1938. In: KRIEG, N.R., (ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p.234-256.

KARASAWA, M.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C.P.; SILVA, M.P.; RIVA, E.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T. Aplicação de métodos de agrupamento na quantificação da divergência genética entre acessos de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.1000-1005, 2005.

KNUDSEN, H. Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe. Primera edición. **International Plant Genetic Resources Institute** (IPGRI), Roma, 2000. 381p.

KOKUSZKA, R. **Avaliação do teor nutricional de feijão e milho cultivados em sistemas de produção convencional e agroecológico na região centro-sul do Paraná.** 2005, 113f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – UFPR, Curitiba - PR.

LAJUDIE, P. DE; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, n.1, p.1277-1290, 1998.

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

LEÓN, R.; ANGULO, I.; JARAMILLO, M.; REQUENA, F.; CALABRESE, H. Caracterización química y valor nutricional de granos de leguminosas tropicales para la alimentación de aves. **Zootecnia Tropical**, v.11, n.2, p.151-170, 1993.

LIMA, A.; SILVA, A.M.O.E.; TRINDADE, R.A.; PAVAN, R.; MANCINI FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.1, p.695-698, 2007.

LONDERO, P.M.G.; RIBEIRO, N.D.; CARGNELUTTI FILHO, A.; RODRIGUES, J. DE A.; ANTUNES, I.F. Herdabilidade dos teores de fibra alimentar e rendimento de grãos em populações de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.51-58, 2006.

LONDERO, P.M.G.; RIBEIRO, N.D.; CARGNELUTTI FILHO. Teores de fibra e rendimento de grãos em populações de feijão. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.1, p.167-173, 2008.

LUZ, M.L. Medidores de umidade. **Revista Internacional de Semente**. 2002. Disponível em: <<http://www.seednews.inf.br/portugues/seed61/artigocapa61.shtml>>. Acesso em 25 fev 2008.

MACHADO, C. DE F.; NUNES, G. H. DE S.; FERREIRA, D. F.; SANTOS, J. B. DOS. Divergência genética entre genótipos de feijoeiro a partir de técnicas multivariadas. **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.251-258, 2002.

MACKIE, W.W. Origin dispersal and variability of the Lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Hilgardia**, v.15, n.1, p.1-29, 1943.

MADRUGA, M.S.; ALDRIGUE, M.L. **Manual de Análise de Alimentos**. João Pessoa – PB, 2000. p.15-28.

MAHALANOBIS, P.C. **On the generalized distance in statistics**. Proceedings of the National Institute of Sciences of India, New Delhi, v.2, p.49-55, 1936.

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.

MARECHAL, R.; MASHERPA, J. M.; STAINIER, F. **Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques traitées para l'analyse informatique**. Boissiera 28, 1978, 273p.

MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R. DOS S., BALDANI, J.I. **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf>>. Acesso em 28. fev. 2008.

McMAHON, J.M.; WHITE, W.L.B.; SAYRE, R.T. Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Experimental Botany**. v.46, n.288, p.731-741, 1995.

MELCHIOR, H. **A Engler's syllabus der pflanzenfamilien**. 12. ed. Berlin: Gebrüder Bornträger, 1964. 666p.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M. DE S.; NÓBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. DE. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata*(L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.2, p.235-246, 2006.

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

- MESQUITA, F.R.; CORREA, A.D.; ABREU, C..M.P. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência Agrotecnologia**, v.31, n.4, p.1114-1121, 2007.
- MIGLIORANZA, E.; ARAUJO, R.; ENDO, R.M.; SOUZA, J.R.P.; MONTANARI, M.A. Teor de cálcio em frutos de diferentes cultivares de feijão-vagem. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.2, p.158-161, 2003.
- MOULIN, L; CHEN, W.M.; BÉNA, G; DREYFUS, B; BOIVIN-MASSON, C. **Rhizobia: the family is expanding**. In: FINAN, T.; O'BRIAN, M.; LAYZELL, D.; VESSEY, K.; NEWTON, W. (Eds) Nitrogen Fixation: Global Perspectives, CAB International, 2002. pp 61-65.
- MOREIRA, F.M. DE S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**, 2. ed. Lavras, MG, 2006. p.449-471.
- MORGANO, M.A.; PAULUCI, L.F.; MANTOVANI, D.M.A.B.; MORY, E.E.M. Determinação de minerais em café cru. **Ciência, Tecnologia e Alimentos**, v.22, n.1, p.19-23, 2002.
- MOTASSO, L.; MOTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS M.A.T.; HUNGRIA, H. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v.73, n.2-3, p.121-123, 2002.
- MOURA, N.C. DE; BRAZACA-CANNIATTI, S.G. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.270-276, 2006.
- NIAS - **National Institute of Agrobiological Sciences**. Disponível em: <<http://www.gene.affrc.go.jp>>. Acesso em: 10 mar. 2008.
- OGUNJI, J.O.; WIRTH, M.; OSUIGSUIGWE, D.I. Nutrient composition of some tropical legumes capable of substituting fish meal in fish diets. **Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics**, v.104, n.2, p.143-148, 2003.

- OLIVEIRA, A.P. DE; ALVES, E.U.; ALVES, A.U.; DORNELAS, C.S.M.; SILVA, J.A. DA; PORTO, M.L.; ALVES, A.V. Produção de feijão-fava em função do uso de doses de fósforo em um Neossolo Regolítico. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.3, p.543-546, 2004.
- OLOGHOBO, A.D.; FETUGA, B.L. Compositional differences in some limabean (*Phaseolus lunatus*) varieties. **Food Chemistry**, v.10, n.1, p.297–307, 1983.
- ORMENÕ-ORRILLO, E.; VINUESA, P; ZÚÑIGA-DAVILA, D.; MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular diversity of native *Bradyrhizobia* isolated from (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.1, p.253-262, 2006.
- PEREIRA, C.A. DOS S.; COSTA, N.M.B. Proteínas do feijão preto sem casca: digestibilidade em animais convencionais e isentos de germes (germ-free). **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.5-14, 2002.
- PROLLA, I.R.D. **Características físico-químicas de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2006. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - UFPR, Santa Maria, PR.
- QUEIROGA, J.L.; ROMANO, E.D.U.; SOUZA, J.R.P; MIGLIORANZA, E. Estimativa da área foliar do feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) por meio da largura máxima do folíolo central. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.1, p.64-68, 2003.
- QUINTANA, J.M.; HARRISON H.C.; NIENHUIS, J.; PALTA J.P.; GRUSAK, M.A. Variation in calcium concentration among sixty s1 families and four cultivars of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.121, n.5, p.789-793, 1996.
- RAO, R.C. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: J. Wiley, 1952. 330p.
- RECH, C.L. DE S.; XAVIER, E.G.; PINO, F.A.B.D.; ROLL, V.F.B.; RECH, J.L.; CARDOSO, H.B.P.; NASCIMENTO, P.V.N. **Análises bromatológicas e segurança laboratorial**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2006. v.1. 130p.

RIBEIRO, N. D.; ANTUNES, I.F.; POERSCH, N.L.; ROSA, S.S. DA; TEIXEIRA, M.G.; GOMES, A.L.S. Potencial de uso agrícola e nutricional de cultivares crioulas de feijão. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.628-634, 2008a.

RIBEIRO, N.D.; LONDERO, P.M.G.; CARGNELUTTI FILHO, A. Teores de fibra e o rendimento de grão em populações de feijão. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.1, p.167-173, 2008b.

RIBEIRO, N.D.; LONDERO, P.M.G.; HOFFMANN JUNIOR, L.; POERSCH, N.L.; CARGNELUTTI FILHO, A. Dissimilaridade genética para teor de proteína e fibra em grãos de feijão dos grupos preto e de cor. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.11, n.2, p.167-173, 2005.

RIBEIRO, N.D.; RODRIGUES, J. DE A.; CARGNELUTTI FILHO, A.; POERSCH, N.L.; TRENTIN, M.; ROSA, S.S. DA. Efeito de períodos de semeadura e das condições de armazenamento sobre a qualidade de grãos de feijão para o cozimento. **Bragantia**, v.66, n.1, p.157-163, 2007.

RIOS, A. DE O.; ABREU, C.M.P. DE; CORRÊA, A.D. Efeito da estocagem e das condições de colheita sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, suplemento, p.39-45, 2003.

RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBBA-RAO, N.S.; MATEOS, P.F.; GILLIS, M.; DAZZO, F.B.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5217-5222, 2002.

ROEL, A.R.; SILVA, M.J.; MENEZES, G.P. **Cultivo da mandioca e derivados, engorda de frango caipira, apontamento dos cursos**. Campo Grande: Graf News. mar. 2003.

SANTOS, C.E. DE R.E.S.; STAMFORD, N.P.; NEVES, M.C.P.; RUNJANEK, N.G.; BORGES, W.L.; BEZERRA, R.V.; FREITAS, A.D.S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.4,

p.249-256, 2007.

SANTOS, 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**, v.37, n.10, p.1407-1412, 2002.

SANTOS, M.G.; CARVALHO, C.E.M., KELECOM, A.; RIBEIROS, M.L.R. DA C.; FREITAS, C.V.C.; COSTA, L.M. DA; FERNANDES, L.V. DE G. Cianogênese em esporófitos de pteridófitas avaliada pelo teste do ácido pícrico. **Acta Botânica Brasileira**, n.19, v.4, p.783-788, 2005.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 2 ed. Viçosa: UFV, 1990, 165p.

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

SILVA, V.N. DA; L.E. DE S.F. DA; FIGUEIREDO, M. DO V.B.; CARVALHO, F.G. DE; SILVA, M.L. R.B. DA. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.1, p.16-21, 2007.

SOARES, A.L. DE L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M. DO; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B. DE; MOREIRA, F.M. DE S. Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native nodulating populations in Perdões (MG - Brazil): I - cowpea. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.5, p.795-802, 2006.

SOUZA, F.F.; QUEIRÓZ, M.A. DIAS, R.S.C. Divergência genética em linhagens de melancia. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2, p.179-183, 2005.

STARKANOVA, G.; VORISEK, K.; MIKANOVA, O.; RONDOVA, D. P-solubilization activity of Rhizobium species strains. **Rostlinna Vyroba**, v.45, n.9, p.403-406, 1999.

STROSCHEIN, M.R.D. **Caracterização de bactéria fixadora de nitrogênio em *Lupinus albus***. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - UFSM, Santa Maria, PR.

SUDRÉ, C.P.; CRUZ, C.D.; RODRIGUES, R.; RIVA, E.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; SILVA, D.J.H.; PEREIRA, T.N.S. Variáveis multicategóricas na determinação da divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. **Horticultura Brasileira**, v.24, n.1, p.88-93, 2006.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON C.; DREYFUS, B. Methylothetic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 214-220, 2001.

TINTORÉ, S.G., AGUIRRE, J.P., ANCONA, D.B. Extraction and characterization of soluble protein fractions from *Phaseolus lunatus* L seeds. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.54, n.1, p.81-88, 2004.

VALARINI, M.J. Genética e melhoramento da fixação biológica de nitrogênio. In: **Recursos genéticos e melhoramento-microrganismos**. MELO, I.S. DE; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. Embrapa, Jaguariúna, 2002. 455-476p.

VAN BERKUM, P.; EARDLY B.D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1132-1136, 2002.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v.255, n.2, p.571-586, 2003.

VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon**, v.38, n.1, p.11-36, 2000.

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

VIEIRA, R.F.; TSAI, S.M.; TEIXEIRA, M.A. Nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em feijoeiro com estirpes nativas de rizóbio, em solo tratado com lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.10, p.1047-1050, 2005.

WANG, E.T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; LÓPEZ, I. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. **Microbios en línea**. Disponível em:

<www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>. Acesso em: 05 jan. 2008.

WETZEL, M.M.V. DA S.; SILVA, D.B. DA; SILVA, H.T. DA; NETO, L.G.V.P.; FONSECA, J.R. **Acervo de recursos genéticos de *Phaseolus* spp. conservados à longo prazo**. Brasília, 2006. 10p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 129).

YOKOYAMA, L.P.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. eds. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (POTAFOS), 1996. p.1-20 p.

YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K. Diversity and phylogeny of rhizobia". **New Phytol.** v.133, n.1, p.87-94, 1996.

ZILLI, J.E; VALICHESKI, R.R.; RUMJANEK, N.G.; ARAÚJO, J.L.S.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M.C.P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas do solo de cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.811-818, 2006.

ZIMMER, P.D.; OLIVEIRA, A.C. DE; CARVALHO, F.I.F. DE; KOPP, M.M.; FREITAS, F.A. DE; MATTOS, L.A.T. DE. Dissimilaridade genética em arroz de sequeiro sob encharcamento. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.201-206, 2003.

ZIMMERMANN, M.J.O; TEIXEIRA, M.G. Origem e evolução. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. eds. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (POTAFOS), 786p, 1996.

ZRIBI, K.; MHAMDI, R.; HUGUET, T; AOUANI, M.E. Diversity of *Sinorhizobium Meliloti* and *S. medicae* nodulating *Medicago Truncatula* according to host and soil origins. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, n.6-7, p.1009-1015, 2005.

4. CAPÍTULO I

Divergência genética para caracteres físicos e químicos de sementes em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)

Genetic divergence for physical and chemical characters of seeds in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.)

Jardel Oliveira Santos¹ Regina Lucia Ferreira Gomes^{2*} Ângela Celis de Almeida Lopes³ Solranny Carla Costa Silva¹ Ethyenne Moraes Bastos⁴ Eva Maria Rodrigues Costa⁵

RESUMO

Objetivou-se realizar a caracterização física e química de sementes e estimar a divergência genética entre sub-amostras de feijão-fava. O material genético constou de 27 sub-amostras, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-Fava da Universidade Federal do Piauí, cultivadas no ano agrícola de 2006. As sementes dessas sub-amostras foram avaliadas com relação aos seguintes caracteres químicos: umidade (8,26 a 11,25 g/100g), cinzas (2,62 a 3,70 g/100g), extrato etéreo (0,16 a 0,93 g/100g), proteína bruta (16,85 a 23,41 g/100g), extrato não nitrogenado (62,24 a 70,07

¹ Mestrado em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI). Campus Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, 64.049-550, Teresina, PI, Brasil.

^{2*} Departamento de Fitotecnia, CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil. E-mail: rlfgomes@ufpi.edu.br. Autor para correspondência.

³ Departamento de Biologia, Centro de Ciências da Natureza (CCN), UFPI, Teresina, PI, Brasil.

⁴ Graduação em Ciências Biológicas, CCN, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

⁵ Graduação em Engenharia Agrônômica, CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

g/100g), fibra alimentar total (24,21 a 62,42 g/100g), fibra insolúvel (5,65 a 11,88 g/100g), fibra solúvel (15,82 a 53,11 g/100g) e ácido cianídrico (44,49 a 160,63 mg/kg). Os caracteres físicos avaliados nas sementes foram: comprimento (9,66 a 18,52 mm), largura (7,41 a 11,83 mm), espessura (5,33 a 6,90 mm) e massa de 100 sementes (27,60 a 87,79 g), que possibilitaram a classificação quanto à forma (esférica, elíptica e oblonga/reniforme), perfil (achatado e semi-achatado) e tamanho (pequeno, médio, normal e grande). A divergência genética entre as sub-amostras foi estimada pelo método de agrupamento de Tocher, com emprego da distância de Mahalanobis, como medida de dissimilaridade, formando-se dez grupos. O método de Singh, utilizado para estimar a contribuição relativa de cada caráter na expressão da divergência genética, indicou que fibra alimentar total (48,62 %) e a fibra solúvel (46,03%) foram os caracteres que mais contribuíram para a divergência total (94,65%) entre as sub-amostras de feijão-fava avaliadas.

Palavras-chave: Germoplasma, proteína, ácido cianídrico, dissimilaridade.

ABSTRACT

This study aimed the physical and chemical characterization of the lima bean seeds and to evaluated the genetic divergence among samples. In this characterization, the genetic material consisted of 27 samples, from the "BAG de Feijão-Fava Universidade Federal do Piauí", cultivated in the 2006 year crop. The seeds of these samples were evaluated regarding to chemical characters: moisture (8.26 to 11.25 g/100g), ashes (2.62 to 3.70 g/100g), ethereal extract (0.16 to 0.93 g/100g), crude protein (16.85 to 23.41 g/100g), non-nitrogen extract (62.24 to 70.07 g/100g), total dietary fiber (24.21 to 62.42 g/100g), insoluble fiber (5.65 to 11.88 g/100g), soluble fiber (15.82 to 53.11 g/100g) and cyanic acid (44.49 to 160.63 mg / kg). The physical characters evaluated in the seeds were: length (9.66 to 18.52 mm), width (7.41 to 11.83 mm), thickness (5.33 to 6.90 mm) and weight of 100 seeds (27. 60 to 87.79 g), which permitted the classification as to form (spherical, elliptical and oblong / reniform), profile

(flat and semi-flat) and size (small, medium, normal and great). The genetic divergence among the samples was estimated by the Tocher grouping method, with the employment of the Mahalanobis distance, as a measure of dissimilarity that formed ten groups. The Singh method, used to estimate the relative contribution of each character in the expression of genetic divergence, indicated that the total dietary fiber (48.62%) and soluble fiber (46.03%) were those who most contributed the total divergence (94.65%) among the samples of lima beans evaluated.

Key words: Germoplasm, protein, cyanic acid, dissimilarity.

INTRODUÇÃO

Das 40 espécies do gênero *Phaseolus* encontradas nas Américas, somente cinco são cultivadas: *P. vulgaris* (feijão-comum), *P. lunatus* (feijão-fava), *P. coccineus* (feijão-ayocote), *P. acutifolius* (feijão-tapiri) e *P. polyanthus* (feijão de toda uma vida) (DEBOUCK, 1991). Dentre essas, a segunda espécie mais importante é o *P. lunatus* (MAQUET et al., 1999).

No Brasil, o feijão-fava é cultivado principalmente na região Nordeste, com exceção da Bahia, recebendo várias outras denominações populares, como: fava, favabelém, feijão-espadinho, feijão-farinha, feijão-fígado-de-galinha, feijão-de-lima ou favade-lima. Representa uma fonte potencial de proteína vegetal e de outros compostos nutricionais em elevados teores, à disposição dos apreciadores dessa leguminosa (VIEIRA, 1992; AZEVEDO et al., 2003).

As características relacionadas à qualidade do grão, físicas, químicas e culinárias, são importantes para os consumidores de feijão, sendo consideradas como critérios adicionais de seleção nos programas de melhoramento (HERRERA et al., 2002). Em feijão-fava, segundo BRESSANI & ELIAS (1980), a composição química de grãos secos é de 62,9% de carboidratos; 25,0% de proteína; 6,1% de fibras; 3,9% de cinzas e 2,0% de extrato etéreo. Já AZEVEDO et al. (2003), em sete cultivares da mesma espécie, observaram variação de 64,40 a 73,59% de carboidratos; 17,95 a

26,70% de proteína bruta; 2,27 a 4,59% de fibra bruta; 3,06 a 4,10% de cinzas e 0,88 a 1,42% de extrato etéreo; e também a presença de conteúdo cianogênico na faixa de 15-25 a 115-150 mg/kg, caracterizando o sabor amargo.

O cultivo do feijão-fava sofre limitações devido principalmente à maior tradição de consumo do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), o paladar amargo e o tempo de cocção mais longo de seus grãos (LYMMAN, 1983; GUIMARÃES et al., 2007), além da ausência de cultivares no mercado, que atendam às preferências de cada região.

Em programas de melhoramento, é recomendável evitar cruzamentos entre genótipos do mesmo padrão de similaridade, para que a variabilidade não seja restrita e inviabilize os ganhos genéticos a serem obtidos pela seleção (COIMBRA & CARVALHO, 1998). Segundo CRUZ et al. (2004), o efeito heterótico pode ser estimado preditivamente entre genótipos pela utilização das análises multivariadas, manuseio simultâneo de vários caracteres ou diretamente na medida de dissimilaridade requerida para execução da análise. Assim, tomando-se por base estimativas da divergência genética entre genótipos, é possível inferir sobre a capacidade específica de combinação e a heterose, antes de se realizar os cruzamentos no campo, com a maior chance de identificar e recuperar combinações mais promissoras nas populações segregantes (OLIVEIRA et al., 2003; ABREU et al., 2004).

Análise multivariada em estudos sobre divergência genética tem sido uma ferramenta intensivamente utilizada em pesquisas, nas várias culturas, como o quiabo (MARTINELLO et al., 2001), tomate (KARASAWA et al., 2005) e feijão (COIMBRA & CARVALHO, 1998, FONSECA & SILVA, 1999; ELIAS et al., 2007). Dentre as metodologias disponíveis, o uso da distância generalizada de Mahalanobis (D^2), como medida de dissimilaridade, e o método de agrupamento de Tocher têm sido eficientes na identificação da diversidade genética.

A estruturação de grupos de divergência é fundamental para a escolha de genitores, sendo que cruzamentos a partir de genótipos reunidos em grupos afastados são considerados mais promissores pelo indicativo de serem mais dissimilares (BENIN et al., 2002).

Assim, objetivou-se realizar a caracterização física e química de sementes e estimar a divergência genética entre sub-amostras em feijão-fava.

MATERIAL E MÉTODOS

O material genético constou de 27 sub-amostras de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-Fava (BAG de Feijão-Fava) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), cultivados no ano agrícola de 2006 (Tabela 1).

As análises químicas foram realizadas nos seguintes laboratórios: Controle de Qualidade Físico-Químico, do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos, e Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia, ambos do Centro de Ciências Agrárias da UFPI; e Química, do Departamento de Química, do Centro de Ciências da Natureza, da UFPI.

As amostras de 200 g de sementes de cada uma das sub-amostras de feijão-fava foram trituradas, em um multi-processador elétrico, acondicionadas em sacos plásticos de polietileno e armazenadas em local seco e fresco, entre 19 a 25°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas às análises químicas, conforme procedimento da AOAC (1995), sendo avaliados os seguintes caracteres: teor de umidade (UMD), determinado por secagem em estufa a 105°C, até a obtenção de peso constante; teor de cinza (CZ), determinado pelo método gravimétrico, baseado na perda de peso do material submetido ao aquecimento a 550°C; extrato etéreo (EE), quantificado após extração com éter de petróleo, usando aparelho de Soxhlet; proteína bruta (PB), determinada pelo método micro-Kjeldahl; extrato não nitrogenado (ENN), calculado por diferença, de acordo com a expressão: $100 - (\text{umidade} + \text{cinzas} + \text{extrato etéreo} + \text{proteína bruta})$; fibra em detergente neutro (FDN) representando a fibra alimentar total, e fibra em detergente ácido, representando a fibra insolúvel, determinadas segundo metodologia proposta por Van Soest e Wine, descrita por SILVA (1990); hemicelulose (HEM), representando a fibra solúvel, obtida por diferença: $\text{FDN} - \text{FDA}$; e ácido cianídrico (HCN), determinado quantitativamente pelo método argentométrico.

Na caracterização física das sementes foram avaliados: comprimento (C),

largura (L) e espessura (E), correspondendo às medidas em milímetros, determinadas com paquímetro digital, em dez sementes tomadas ao acaso; e a massa de 100 sementes (M100S), referente ao peso, em gramas, de 100 grãos tomados ao acaso. Mediante essa caracterização, as sementes foram classificadas quanto ao tamanho, segundo Mateo Box, citado por VILHORDO et al. (1996), em: pequena (massa de 100 sementes menor que 30 g), média (31 a 40 g), normal (41 a 59 g), e grande (massa de 100 sementes maior que 60 g). Quanto à forma, a classificação das sementes foi realizada em função do índice J, obtido pela relação entre comprimento e largura (C/L), em: esférica (1,16 a 1,42 mm), elíptica (1,43 a 1,65 mm) e oblonga/reniforme curta (1,66 a 1,85 mm). A classificação quanto ao perfil ocorreu em função do índice H, com base na relação espessura/largura (E/L), em: achatada (menor que 0,69 mm) e semi-achatada (0,70 a 0,79 mm), segundo Puerta Romero, citado por VILHORDO et al. (1996).

As análises de variância de cada caráter foram realizadas de acordo com o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para comparação entre as médias das sub-amostras, utilizou-se o critério de agrupamento de Scott-Knott (SCOTT & KNOTT, 1974), a 5% de probabilidade.

Na análise multivariada, a divergência genética entre as sub-amostras foi determinada pelo método de agrupamento de Tocher (RAO, 1952), com o emprego da distância generalizada de Mahalanobis, como medida de dissimilaridade. A identificação da importância dos caracteres foi feita com base no método de Singh (SINGH, 1981), complementada pelo método de descarte de variáveis, conforme a metodologia de GARCIA (1998).

As análises estatístico-genéticas foram realizadas com auxílio do programa Genes (CRUZ, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise univariada

As sub-amostras de feijão-fava diferiram ($P < 0,05$) com relação a todos os caracteres avaliados (Tabela 2), o que indica a presença de variabilidade genética e,

conseqüentemente, a possibilidade de obtenção de ganhos genéticos com a seleção de genótipos superiores. Quanto aos coeficientes de variação experimental (CV), os valores mínimo e máximo observados foram de 2,17% (extrato não nitrogenado) e 21,49% (hemicelulose).

A determinação do teor de umidade nas sementes apresentou média de 9,68 g/100g, e em todas as sub-amostras foi inferior ou igual a 11 g/100g, média recomendada pela Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária (SEAGRI, 2008), para armazenamento de sementes e grãos de feijão, a longo prazo. Tais resultados revelam que as sementes provenientes do BAG de Feijão-Fava da UFPI encontravam-se devidamente conservadas e, portanto, em condições para realização de qualquer análise. Segundo LUZ (2002), um alto conteúdo de umidade pode diminuir o desempenho fisiológico das sementes, além de favorecer a atividade de insetos e fungos que prejudicam o armazenamento de sementes e grãos.

Com relação ao teor de cinzas, os valores mínimo e máximo observados foram de 2,62 g/100g (UFPI-177) e 3,70 g/100g (UFPI-264), respectivamente, com média geral de 3,21 g/100g. Segundo MADRUGA & ALDRIGUE (2000), as cinzas de um alimento correspondem ao resíduo obtido por incineração, em temperaturas de 550 a 570°C, e a sua determinação permite a avaliação dos minerais presentes nos alimentos. Esses minerais são de grande importância nas dietas, uma vez que contribuem para o perfeito equilíbrio orgânico, fazendo parte de praticamente todos os tecidos do corpo humano, além de desempenhar papel importante em muitos processos metabólicos.

O conhecimento da fração mineral é necessário, porque os teores dos diferentes componentes desta fração variam grandemente, não só de um alimento para outro, como também num mesmo alimento. Tal fração é composta por ferro, cálcio, fósforo, zinco e cobre, e para cada um destes há variações de porcentagem no alimento estudado. AZEVEDO et al. (2003) encontraram teores de cinza variando de 3,06% a 4,10%, com médias de cálcio e fósforo de 0,06% e 0,30%, respectivamente, indicando ser o feijão-fava mais rico em fósforo. As sub-amostras UFPI-264, UFPI-229, UFPI-222 e UFPI-234, que apresentaram os maiores teores de cinza, podem ser bastante promissoras quanto à presença de fósforo e cálcio.

Quanto ao extrato etéreo, as sub-amostras apresentaram média de 0,50 g/100g,

mínimo de 0,16 e máximo de 0,93 g/100g. Destacaram-se as sub-amostras UFPI-177 e UFPI-491, com valores de 0,93 e 0,88 g/100g, respectivamente. AZEVEDO et al. (2003) observaram variação de 0,88% a 1,42%.

Para o teor de proteína, a média foi de 20,76 g/100g. As sub-amostras se agruparam em duas classes, sendo que os valores mais baixos variaram entre 16,85 a 19,68 g/100g e os mais altos, entre 20,25 a 23,41 g/100g. Esses resultados indicam a possibilidade de seleção de sub-amostras com teores mais elevados de proteína. Os valores máximo e mínimo observados por Azevedo et al. (2003) foi de 17,95 a 26,70%, e de 21 a 30%, por McLEESTER (1973).

Na determinação do extrato não nitrogenado, fração correspondente aos carboidratos, observou-se que os valores mínimo e máximo foram de 62,24 e 70,07 g/100g, respectivamente, com média de 65,85 g/100g. As sub-amostras UFPI-173 (70,07 g/100g) e UFPI-32 (69,54 g/100g) apresentaram as maiores médias.

As fibras possuem um valor nutricional específico em função das diferentes frações encontradas: a fibra insolúvel e a fibra solúvel. Conforme a revisão apresentada por GONÇÁLVES et al. (2007), as fibras insolúveis diminuem o tempo do trânsito intestinal, aumentam o volume do bolo fecal, retardam a absorção de glicose e a hidrólise do amido; já as fibras solúveis, que auxiliam na normalização da microbiota intestinal, são eficientes para tratamento da constipação intestinal, diminuem o índice glicêmico dos alimentos, aumentam o poder de saciedade de uma refeição e auxiliam no tratamento do colesterol. Para fração de fibra alimentar total, determinada a partir da fibra em detergente neutro (FDN), observou-se que os valores mais elevados foram entre 52,62 e 62,42 g/100g, e os mais baixos entre 24,26 a 38,18 g/100g. Na fração insolúvel, determinada a partir da fibra em detergente ácido (FDA), a sub-amostra UFPI-220 apresentou a maior média, 11,88 g/100g. As menores médias observadas situavam-se entre 5,65 a 5,82 g/100g. Na fração solúvel, hemicelulose, as sub-amostras com as médias mais altas variaram de 45,77 a 53,11 g/100g, e as mais baixas, de 15,82 a 23,33 g/100g.

As sub-amostras UFPI-264, UFPI-134, UFPI-173, UFPI-220, UFPI-274, UFPI-237, UFPI-251, UFPI-275, UFPI-282, UFPI-491 e UFPI-228 apresentaram os mais baixos teores de ácido cianídrico. Considerando-se esse caráter, o interesse dos

melhoristas é no sentido de selecionar genótipos com as menores médias, tendo em vista a sua relação com o paladar amargo, característico de algumas variedades do feijão-fava, que tem de certa forma limitado seu consumo (LYMAN, 1983; AZEVEDO et al., 2003). Segundo FREHNER et al. (1990), os glicosídeos cianogênicos linamarina e lotaustralina, que conferem o efeito tóxico do HCN no feijão-fava, são produzidos na vagem e sementes, desde os primeiros dias após a antese, mas somente sob a ação de choque mecânico ou fermento ocorre a liberação das enzimas responsáveis pela quebra dos glicosídeos (VETTER, 2000).

Para os caracteres físicos da semente, as médias do comprimento, largura, espessura e massa de 100 sementes foram de 13,23 mm, 9,27 mm, 5,99 mm e 46,74 g, respectivamente (Tabela 3). O acesso UFPI-276 apresentou as maiores médias, com valores de 18,52 mm, 11,83 mm, 6,90 mm e 87,79 g, para esses caracteres. Os mais baixos valores situaram-se entre 9,66 a 11,31 mm, para o comprimento da semente; 7,41 a 8,02 mm, para a largura da semente; 5,33 a 5,84 mm, quanto a espessura da semente e para massa de 100 sementes, entre 27,60 a 38,49 g. Os CV's, com amplitude de 4,56% (espessura das sementes) a 18,01% (massa de 100 sementes), foram considerados satisfatórios para os descritores utilizados.

Considerando os padrões de forma, perfil e tamanho das sementes (Tabela 3) e cor do tegumento (Tabela 1), verifica-se que o feijão-fava apresenta bastante variação, constituindo-se numa excelente opção de incremento estético de grãos, entre as leguminosas usadas para alimentação.

Na classificação das sementes das sub-amostras, prevaleceu a forma esférica (18 sub-amostras), perfil achatado (19 sub-amostras) e tamanho normal (10 sub-amostras). MACKIE (1943) identificou, em *P. lunatus*, três grupos de semente segundo a forma e o tamanho: o Sieva, com sementes médias e achatadas (na ramificação Hopi), o Batata, com sementes pequenas e globosas (na ramificação Caribe), e o Big lima, sementes grandes e achatadas (na ramificação Inca), propondo que os grupos de diversidade formados teriam sido decorrentes da dispersão vinculada à rota do comércio. Posteriormente, comprovando a ampla variabilidade das sementes de *P. lunatus*, em Cuba, foram encontrados entre 173 sub-amostras, além dos grupos Sieva, Batata e Big lima, sementes com algumas características intermediárias a esses três

grupos, capazes de formar novos grupos: o Batata-Sieva e o Sieva-Big lima (ESQUIVEL, et al., 1990).

Segundo VARGAS et al (2003), as características morfológicas das sementes de feijão-fava têm sido um dos principais critérios utilizados para explicar a origem e a diversidade na espécie, e além disso, são os principais parâmetros usados pelos consumidores durante a escolha do produto na prateleira. Quanto ao feijão-comum, para o qual existe uma maior definição de preferência no mercado, as variedades mais procuradas pelo produtor e atacadista, são as que apresentam sementes de formato elíptico e perfil cheio. O consumidor de feijão-comum tem preferência por semente de tamanho pequeno, massa de 100 sementes entre 20 e 30 gramas, pois cultivares com valores acima de 30 gramas apresentam problemas de comercialização (CHIORATO, 2005).

Análise multivariada

As medidas de dissimilaridade entre os pares de sub-amostras, expressas pela distância generalizada de Mahalanobis (D^2), indicaram que o valor mínimo ocorreu entre as sub-amostras UFPI-222 e UFPI-278 ($D^2 = 21,50$), as menos divergentes e que as sub-amostras UFPI-282 e UFPI-491 ($D^2 = 294,53$), foram as mais divergentes (Tabela 4). O emprego das análises multivariadas, a partir das medidas de dissimilaridade, aumenta a probabilidade de se recuperar genótipos superiores nas gerações segregantes (CARVALHO et al., 2003), sobretudo quando se realiza o cruzamento entre indivíduos de grupos mais afastados, gerados por estas análises (KARASAWA et al., 2005). De acordo com COIMBRA & CARVALHO (1998), o mais apropriado é recomendar cruzamentos entre genótipos divergentes, mas que também apresentem desempenho superior com relação aos principais caracteres de importância econômica, logo, devem-se considerar também os comportamentos *per se* na escolha dos genótipos (ABREU et al., 2004).

Na análise do agrupamento das sub-amostras pelo método de Tocher, observou-se a formação de dez grupos (Tabela 5). O grupo 1, com seis sub-amostras, reuniu duas, que se destacaram quanto ao teor de cinzas (UFPI-222 e UFPI-229); quatro,

dentre aquelas que apresentaram melhor teor de proteína bruta (UFPI-222, UFPI-229, UFPI-243 e UFPI-278), em geral com sementes esféricas e semi-achatadas, exceto UFPI-278 (perfil achatado), prevalecendo o tamanho pequeno em três sub-amostras (UFPI-222, UFPI-230 e UFPI-237). Por outro lado, esse grupo também contém cinco sub-amostras com a segunda maior concentração de ácido cianídrico, caráter indesejável. No grupo 2, contendo sete sub-amostras, prevaleceram aquelas com caracteres desejáveis, como: alto teor de cinzas (UFPI-234 e UFPI-264), elevado teor de proteína bruta (UFPI-216, UFPI-234, UFPI-251, UFPI-264, UFPI-275 e UFPI-274), menores concentrações de ácido cianídrico (UFPI-228, UFPI-251, UFPI-264, UFPI-274 e UFPI-275) e forma elíptica (UFPI-251 e UFPI-275). O grupo 3, quatro sub-amostras, destacaram-se pelo alto teor de proteína (UFPI-189 e UFPI-468), alto teor de extrato não nitrogenado (UFPI-177) e forma elíptica (UFPI-272 e UFPI-468). O grupo 4, duas sub-amostras, destacou-se pelos altos teores de proteína bruta (UFPI-121 e UFPI-280), fibra em detergente neutro e hemicelulose (UFPI-121).

Em relação ao grupo 5, com duas sub-amostras, verificou-se altos teores de proteína bruta (UFPI-134) e extrato não nitrogenado (UFPI-173), baixo conteúdo de ácido cianídrico e sementes de forma elíptica, em ambas; e no grupo 6, com duas sub-amostras também, observou-se altos teores de extrato etéreo (UFPI-491) e proteína bruta (UFPI-276 e UFPI-491), baixa concentração de ácido cianídrico (UFPI-491) e elevada média de massa de 100 sementes (UFPI-276 e UFPI-491). As sub-amostras UFPI-32 (grupo 7) e UFPI-271 (grupo 8) apresentaram médias altas para teor de fibra em detergente neutro e hemicelulose, respectivamente, e sementes achatadas de tamanho normal. Já a sub-amostra UFPI-220, grupo 9, apresentou elevado teor de proteína. No grupo 10, encontra-se a sub-amostra UFPI-282, caracterizada pelos altos teores de proteína bruta e hemicelulose. Os genótipos desses dois últimos grupos apresentaram baixa concentração de ácido cianídrico.

Considerando o desempenho das sub-amostras (Tabelas 2 e 3), as medidas de dissimilaridade (Tabela 4) e os grupos de sub-amostras estabelecidos pelo método de Tocher (Tabela 5), verifica-se que os cruzamentos UFPI-491 com UFPI-282, UFPI-121, UFPI-220 e UFPI-229 constituem boas opções para obtenção de populações segregantes com altos teores de proteína e fibras e baixo conteúdo de ácido cianídrico.

RIBEIRO et al. (2005), também utilizando o método de otimização de Tocher, encontraram eficiência na identificação de genitores promissores para programas de hibridação controlada, com vistas ao desenvolvimento de germoplasma com teores de proteína e de fibra acima da média. Segundo COIMBRA & CARVALHO (1998), a distância generalizada de Mahalanobis, pode ser utilizada para detecção da diversidade genética entre genótipos superiores de feijão, em programas de melhoramento genético. Porém, deve-se ainda considerar o controle gênico, pois a eficiência da predição está vinculada à existência de efeitos de dominância nos genes envolvidos na expressão dos caracteres.

Analisando o local de procedência das sub-amostras (Tabela 1), verifica-se que UFPI-275 e UFPI-274, pertencentes ao grupo 2, são provenientes do Estado da Paraíba, contudo, UFPI-278 e UFPI-276, com a mesma procedência, encontram-se nos grupos 1 e 6, respectivamente. Os genótipos oriundos do Piauí: UFPI-189, UFPI-121, UFPI-491 e UFPI-32, distribuíram-se, respectivamente, nos grupos 3, 4, 6 e 7. Já as sub-amostras UFPI-468, UFPI-280 e UFPI-282, originárias do Maranhão, encontram-se nos grupos 3, 4 e 10, respectivamente; enquanto UFPI-177 e UFPI-134, oriundos do Ceará, fazem parte dos grupos 3 e 5. Esses resultados permitem concluir que não houve relação entre diversidade genética, baseadas nos caracteres físicos e químicos das sementes, e a procedência geográfica, conforme já constatado em outros trabalhos realizados com abóbora (RAMOS et al., 2000), quiabo (MARTNELLO et al., 2001), feijão-vagem (ABREU et al., 2004) e feijão-fava (GUIMARÃES et al., 2007).

O método de SINGH (1981), utilizado para estimar a contribuição relativa de cada caráter na expressão da divergência genética, indicou que fibra insolúvel (48,62%) e fibra solúvel (46,03%), foram os caracteres que mais contribuíram para a divergência total (94,65%) entre as 27 sub-amostras de feijão-fava (Tabela 6). A retirada dos caracteres com mais baixa contribuição, espessura da semente, massa de 100 sementes, teor de ácido cianídrico, largura da semente, extrato não nitrogenado e extrato etéreo, provocou alteração na formação original dos grupos, logo, mesmo apresentando baixa contribuição, estes caracteres foram importantes no estabelecimento dos grupos de divergência, conforme o método de GARCIA (1998). ABREU et al. (2004), utilizando a mesma metodologia, em sub-amostras de feijão-

vagem (*P. vulgaris*), consideraram oito caracteres sem importância para divergência genética, devido a não alteração no formato do grupo original, porém, o peso de 100 sementes, de baixa magnitude, foi mantido, pois a sua retirada causou alteração nos grupos. Segundo COELHO et al. (2007), em trabalhos desenvolvidos com sub-amostras de feijão, caracteres relacionados à produtividade, como a massa de 100 sementes, são mais discriminantes em populações mais uniformes, contudo, entre genótipos crioulos, devido à alta heterogeneidade na produção, apresentam uma baixa discriminação. FONSECA & SILVA (1999) também apontam a massa de 100 sementes como um caráter importante para efeito de separação de sub-amostras de feijão.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do Projeto de Pesquisa com *P. Lunatus* e a concessão de bolsas de mestrado e iniciação científica.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F.B. et al. Divergência genética entre acessos de feijão-de-vagem de crescimento indeterminado. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.3, p.547–552, 2004.
- AOAC - Internacional. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16th ed., Arlington, 1995.
- AZEVEDO, J.N.; FRANCO, L.J.D.; ARAÚJO, R.O.C. **Composição química de sete variedades de feijão-fava**. Teresina. EMBRAPA, 2003. 4p.(EMBRAPA MEIO-NORTE. Comunicado Técnico, 152)
- BENIN, G. et al. Identificação da dissimilaridade genética entre genótipos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo preto. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n.3, p.179-184, 2002.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G. Nutritional value of legume crops for humans and animals. In: SUMMERFIELD, R.J; BUNTING, A.H. [Ed]. **Advances in legume science**. Kew:

Royal Botanic Gardens, 1980. p. 135-155.

CARVALHO, L.P. DE. et al. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1149-1155, 2003.

CHIORATO, A.F. **Divergência genética em acessos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do Banco de Germoplasma do Instituto Agrônomo-IAC**. 2004. 85f. Dissertação (Mestrado em Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Curso de Pós-Graduação Instituto Agrônomo de Campinas.

COELHO, M.M.et al. Diversidade genética em acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência Rural**, v.37, n.5, p.1241-1247, 2007.

COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F. Divergência genética em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com grão tipo carioca. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n.3, p.211-217, 1998.

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: versão Windows. Viçosa: UFV, 2001. 642 p.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2004. 480 p.

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

ELIAS, T.H. et al. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão-preto em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1443-1449, 2007.

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

FONSECA, J.R.; SILVA, H.T. da. Identificação de duplicidades de acessos de feijão por meio de técnicas multivariadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.3, p.409-414, 1999.

FREHNER, M.; SCALET, M.; CONN, E.E. Pattern of the Cyanide-Potential in Developing fruits implications for plants accumulating cyanogenic monoglucosides (*Phaseolus lunatus*) or cyanogenic diglucosides in their seeds (*Linum usitatissimum*,

Prunus amygdalus). **Plant Physiol.** v.9, n.1, p.28-34, 1990.

GARCIA, S.L.R. **Importância de características de crescimento, de qualidade da madeira e da polpa na diversidade genética de clones de eucalipto.** 1998. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestal). - Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestal, Universidade Federal de Viçosa.

GONÇALVES, M. da C.R. et al. Fibras dietéticas solúveis e suas funções nas dislipidemias. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.22, n.2, p.167-73, 2007.

GUIMARAES, W. N. et al. 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.

HERRERA, P.P. et al. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, n.2, p.172-180, 2002.

KARASAWA, M. et al. Aplicação de métodos de agrupamento na quantificação da divergência genética entre acessos de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.1000-1005, 2005.

LUZ, M.L. Medidores de umidade. **Revista Internacional de Semente.** 2002. Disponível em: <<http://www.seednews.inf.br/portugues/seed61/artigocapa61.shtml>>. Acesso em: 25 fev 2008.

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

MACKIE, W.W. Origin dispersal and variability of the Lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Hilgardia**, v.15, n.1, p.1-29, 1943.

MADRUGA, M.S.; ALDRIGUE, M.L. **Manual de análise de alimentos.** João Pessoa - PB, 2000. p. 15-28.

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. SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. Indian **Journal of Genetic and Plant Breeding**, v.41, n.2, p.237-245, 1981.

MARTINELLO, G.E. et al. Divergência genética em acessos de quiabeiro com base em

- marcadores morfológicos. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.1, p.52–58, 2001.
- McLEESTER, R.C. et al. Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*. **Phytochemistry**, v.12, n.1, p.85-93, 1973.
- OLIVEIRA, F.J. et al. Divergência genética entre cultivares de caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.5, p.605-611, 2003.
- RAMOS, S.R.R. et al. Divergência genética em germoplasma de abóbora procedente de diferentes áreas do Nordeste. **Horticultura Brasileira**, v.18, n.3, p.195-199, 2000.
- RAO, R.C. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: J. Wiley, 1952. 330 p.
- RIBEIRO, H.J.S.S.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H.; MIYAGUI, D.T. Propriedades físicas e químicas de feijão comum preto, cultivar IAPAR 44, para envelhecimento acelerado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 165-169, 2005.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v.30, n.3, p.507-512, 1974.
- SEAGRI - **Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária**. Culturas agrícolas. pesquisa: feijão. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/Feijao.htm>> Acesso em 20 mai 2008.
- SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 2 ed. Viçosa: UFV, 1990. 165p.
- SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v.41, n.2, p.237-245, 1981.
- VARGAS, E.M.; CASTRO, E.; MACAYA, G.; ROCHA, O. J. Variación del tamaño de frutos y semillas en 38 poblaciones silvestres de *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) del Valle Central de Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v.51, n.3, p.707-724, 2003.
- VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon**, v.38, n.1, p.11-36, 2000.
- VIEIRA, R.F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, v.16, n.174, p.30-37, 1992.
- VILHORDO, B.W.; MIKUSINSKI, O.M.F.; BURIN, M.E.; GANDOLFI, V.H. Morfologia. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Coord.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996. p. 71-99.

Tabela 1 Relação das 27 sub-amostras de feijão-fava avaliadas, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí, segundo local de origem e cor do tegumento da semente. Teresina, PI, 2008.

Código do BAG	Local de origem	Cor do tegumento
UFPI-32	Várzea Grande - PI	marrom
UFPI-121	Bom Jesus - PI	bege
UFPI-134	Ceasa - CE	branco
UFPI-173	origem desconhecida	rajado com branco e bege
UFPI-177	Ceasa - CE	bege
UFPI-189	Inhuma - PI	branco
UFPI-216	Itapiraquan - GO	roxo
UFPI-220	Ipamari - GO	marrom
UFPI-222	Ipameri - GO	roxo
UFPI-228	Porto Firme - MG	roxo
UFPI-229	Rio Casca - MG	roxo
UFPI-230	Porto Firme - MG	roxo
UFPI-234	Coimbra - MG	roxo
UFPI-237	Bom Sucesso - MG	marrom pintado
UFPI-243	Rio Casca - MG	marrom
UFPI-251	Cácere - MT	rajado com bege e preto
UFPI-264	Ipanema - MG	preto
UFPI-271	Paraguai	branco
UFPI-272	origem desconhecida	creme
UFPI-274	Cajazeiras - PB	branco
UFPI-275	Cajazeiras - PB	preto rajado
UFPI-276	Cajazeiras - PB	rajado com roxo e branco
UFPI-278	Cajazeiras - PB	bege
UFPI-280	Maranhão	branco
UFPI-282	Fazenda Santa Fé - MA	roxo
UFPI-468	São Domingos - MA	creme
UFPI-491	Várzea Grande - PI	creme com hilo diferente

Tabela 2 Médias¹ dos teores (g/100g) de umidade (UMD), cinzas (CZ), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), extrato não nitrogenado (ENN), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM) e ácido cianídrico (HCN, mg/kg) em sementes das 27 sub-amostras de feijão-fava. UFPI, Teresina, PI, 2008.

Sub-amostra	UMD	CZ	EE	PB	ENN	FDN	FDA	HEM	HCN
UFPI-32	8,94e	3,22d	0,67c	17,84b	69,54a	56,43a	10,42b	46,01a	104,42b
UFPI-121	10,41b	3,05e	0,56c	21,34a	64,89c	54,43a	7,08e	47,35a	87,68b
UFPI-134	10,54b	3,39b	0,55c	22,28a	63,38c	33,42c	5,65f	27,77c	47,22c
UFPI-173	9,48d	3,16d	0,60c	16,85b	70,07a	29,83c	6,50e	23,33d	50,54c
UFPI-177	10,39b	2,62g	0,93a	18,55b	68,05b	35,86c	7,37e	28,50c	87,52b
UFPI-189	9,76c	3,03e	0,47d	20,25a	66,33b	45,32b	9,50c	35,82b	92,33b
UFPI-216	8,57f	3,10e	0,54c	20,90a	66,89b	30,27c	8,36d	21,92d	97,08b
UFPI-220	9,81c	3,09e	0,33d	20,67a	65,96b	39,35b	11,88a	27,47c	53,26c
UFPI-222	10,06c	3,57a	0,24e	20,66a	65,19c	45,85b	8,81d	37,04b	82,83b
UFPI-228	9,37d	3,12e	0,63c	19,52b	67,32b	33,13c	10,31b	22,83d	75,38c
UFPI-229	10,79b	3,63a	0,41d	22,98a	62,24c	38,18c	8,59d	29,59c	83,76b
UFPI-230	10,37b	3,16d	0,76b	18,63b	67,18b	40,89b	8,42d	32,46b	117,38b
UFPI-234	8,52f	3,54a	0,59c	21,32a	66,12b	40,57b	10,53b	30,04c	96,64b
UFPI-237	9,80c	3,44b	0,71c	19,68b	66,58b	24,26c	8,44d	15,82d	62,59c
UFPI-243	11,25a	3,15d	0,37d	21,57a	63,58c	41,75b	8,33d	33,43b	84,30b
UFPI-251	9,03e	3,46b	0,34d	20,56a	66,32b	42,10b	8,59d	33,51b	64,60c
UFPI-264	9,42d	3,70a	0,21e	22,27a	64,34c	43,57b	8,36d	35,21b	44,49c
UFPI-271	10,61b	3,40b	0,38d	21,63a	64,00c	52,62a	6,85e	45,77a	160,63a
UFPI-272	9,79c	2,68g	0,47d	19,20b	67,83b	46,52b	9,51c	37,02b	88,96b
UFPI-274	10,16c	3,25d	0,45d	21,26a	64,77c	40,54b	8,54d	32,00b	58,00c
UFPI-275	8,26f	3,48b	0,62c	21,84a	65,68c	29,98c	8,45d	21,53d	66,02c
UFPI-276	9,09e	3,29c	0,32d	22,65a	64,52c	46,88b	6,64e	40,24b	116,68b
UFPI-278	9,86c	3,49b	0,43d	21,86a	64,11c	27,95c	9,42c	18,53d	98,22b
UFPI-280	9,34d	3,06e	0,46d	20,82a	66,49b	26,60c	5,82f	20,79d	100,94b
UFPI-282	9,66c	2,85f	0,41d	21,14a	65,59c	62,42a	9,31c	53,11a	66,58c
UFPI-468	9,04e	3,14d	0,16e	23,41a	63,94c	31,08c	9,91b	21,17d	102,01b
UFPI-491	9,13e	3,34c	0,88a	20,77a	66,46b	35,55c	8,39d	27,15c	71,88c
Média Geral	9,68	3,21	0,50	20,76	65,85	39,82	8,52	31,31	83,77
CV %	2,83	8,13	20,26	6,50	2,17	16,67	8,27	21,49	19,90

¹Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, pertencem a uma mesma classe, de acordo com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

Tabela 3 Médias¹ dos caracteres físicos (mm) comprimento (C), largura (L) e espessura (E) das sementes e massa de 100 sementes (M100S) em g; e classificação das sementes quanto à forma, perfil e tamanho, em sementes das 27 sub-amostras de feijão-fava. UFPI, Teresina, PI, 2008.

Sub-amostra	C	L	E	M100S	Forma	Perfil	Tamanho
UFPI-32	15,80b	10,30b	5,97c	54,00b	ELP	AC	N
UFPI-121	10,90e	8,88d	6,29b	38,49d	ESF	SAC	M
UFPI-134	14,00c	9,72c	5,45d	47,84c	ELP	AC	N
UFPI-173	15,40b	9,88c	6,06c	56,81b	ELP	AC	N
UFPI-177	13,70c	9,87c	5,94c	45,82c	ESF	AC	N
UFPI-189	14,10c	10,50b	6,39b	60,25b	ESF	AC	G
FPI-216	12,00d	8,58d	5,45d	34,29d	ESF	AC	M
UFPI-220	9,66e	7,48e	5,94c	28,01d	ESF	SAC	P
UFPI-222	9,94e	7,68e	5,95c	29,41d	ESF	SAC	P
UFPI-228	11,10e	8,02e	5,42d	30,94d	ESF	SAC	M
UFPI-229	10,50e	8,16e	5,95c	33,11d	ESF	SAC	M
UFPI-230	10,50e	7,42e	5,58d	27,60d	ESF	SAC	P
UFPI-234	11,31e	8,21e	5,84d	34,47d	ESF	SAC	M
UFPI-237	10,60e	7,77e	5,61d	28,51d	ESF	SAC	P
UFPI-243	10,50e	7,94e	5,99c	30,69d	ESF	SAC	M
UFPI-251	12,50d	8,62d	5,33d	35,48d	ELP	AC	M
UFPI-264	12,40d	8,71d	5,37d	34,71d	ESF	AC	M
UFPI-271	13,40c	9,51c	5,91c	48,92c	ESF	AC	N
UFPI-272	15,50b	10,00b	6,21c	57,99b	ELP	AC	N
UFPI-274	15,70b	10,30b	6,12c	61,14b	ESF	AC	G
UFPI-275	14,90b	10,20b	6,10c	63,52b	ELP	AC	G
UFPI-276	18,50a	11,80a	6,91a	87,79a	ELP	AC	G
UFPI-278	12,20d	9,25c	6,31b	47,40c	ESF	AC	N
UFPI-280	14,00c	10,10b	6,47b	56,46b	ESF	AC	N
UFPI-282	14,50c	10,30b	6,53b	55,57b	ESF	AC	N
UFPI-468	14,70b	10,10b	6,47b	47,71c	ELP	AC	N
UFPI-491	18,10a	10,60b	6,31b	85,17a	ORC	AC	G
Médias	13,23	9,27	5,99	46,74			
CV%	7,68	5,96	4,56	18,01			

¹Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, pertencem a uma mesma classe, de acordo com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Forma (ESF: esférica, ELP: elíptica, ORC: oblonga/reniforme curta); Perfil (AC: achatada, SAC: semi-achatada); Tamanho (P: pequeno, M: médio, N: normal e G: grande)

Tabela 4 Medidas de dissimilaridade entre 27 sub-amostras do feijão-fava com base na distância generalizada de Mahalanobis. Teresina, PI, 2008.

Sub-amostra	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
UFPI-32=1	171,63	156,46	99,01	138,65	82,32	66,63	163,96	165,12	89,61	226,20	129,61	95,13	160,34
UFPI-121=2		99,72	121,04	63,92	59,89	112,44	103,10	87,78	125,27	76,48	77,73	160,50	104,07
UFPI-134=3			56,32	119,75	114,83	90,14	178,28	106,09	119,84	90,11	97,66	149,21	72,60
UFPI-173=4				121,16	119,71	50,97	164,50	133,74	106,30	141,06	109,69	119,02	73,43
UFPI-177=5					46,11	105,80	150,97	183,24	112,97	205,40	98,48	224,80	171,20
UFPI-189=6						68,00	80,65	93,78	53,24	139,77	66,24	105,97	110,06
UFPI-216=7							99,02	100,04	39,43	144,29	73,50	49,20	63,27
UFPI-220=8								54,30	38,23	100,50	58,75	75,33	65,50
UFPI-222=9									60,50	34,22	38,24	51,01	24,74
UFPI-228=10										134,18	35,52	49,68	54,39
UFPI-229=11											82,55	108,48	42,02
UFPI-230=12												86,93	49,81
UFPI-234=13													48,86
UFPI-237=14													
UFPI-243=15													
UFPI-251=16													
UFPI-264=17													
UFPI-271=18													
UFPI-272=19													
UFPI-274=20													
UFPI-275=21													
UFPI-276=22													
UFPI-278=23													
UFPI-280=24													
UFPI-282=25													
UFPI-468=26													
UFPI-469 =27													

Continuação...

Tabela 5 Grupos de sub-amostras de feijão-fava estabelecidos pelo método de Tocher, com base na dissimilaridade expressa pela distância generalizada de Mahalanobis. Teresina, PI, 2008.

Grupo	Sub-amostra
1	UFPI-222, UFPI-278, UFPI-237, UFPI-229, UFPI-230, UFPI-243
2	UFPI-251, UFPI-264, UFPI-234, UFPI-216, UFPI-228, UFPI-275, UFPI-274
3	UFPI-189, UFPI-468, UFPI-272, UFPI-177
4	UFPI-121, UFPI-280
5	UFPI-173, UFPI-134
6	UFPI-276, UFPI-491
7	UFPI-32
8	UFPI-271
9	UFPI-220
10	UFPI-282

Tabela 6 Contribuição relativa dos caracteres físicos e químicos para a divergência genética entre as 27 sub-amostras de feijão-fava, pelo método proposto por SINGH (1981). Teresina, PI, 2008.

Caráter	Valor (%)	Valor acumulado (%)
Fibra insolúvel	48,62	48,62
Fibra solúvel	46,03	94,65
Fibra alimentar total	2,96	97,61
Comprimento da semente	0,48	98,09
Cinzas	0,45	98,54
Umidade	0,41	98,95
Proteína bruta	0,23	99,18
Extrato etéreo	0,19	99,37
Extrato não nitrogenado	0,17	99,54
Largura da semente	0,14	99,68
Ácido cianídrico	0,12	99,80
Massa de 100 sementes	0,12	99,92
Espessura da semente	0,08	100,00

5. CAPÍTULO II

Diversidade genética entre isolados nativos de rizóbios noduladores do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)

Genetic diversity among isolates native of rhizobia nodulated of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.)

Jardel Oliveira Santos¹ Ademir Sérgio Ferreira de Araújo^{2*} Regina Lucia Ferreira Gomes³ Ângela Célis de Almeida Lopes⁴ Márcia do Vale Barreto Figueiredo⁵

RESUMO

Objetivou-se caracterizar a diversidade genética entre rizóbios nativos noduladores do feijão-fava em solos do Estado do Piauí. Os genótipos do feijão-fava, UFPI-468 (Boca de Moça) e UFPI-491 (Fava Miúda), foram usados como planta isca de rizóbio, em amostras de solos coletadas nos distritos de Nova Esperança (07°77'10"S e 93°51'58"W) e Santa Rita (07°71'49"S e 93°60'08"W), do município de Água Branca, PI, que funcionaram como fonte de inóculo. No isolamento, utilizou-se nódulos coletados aos 45 dias após a emergência das plântulas, período que apresentou os maiores valores para o número e a biomassa

¹Mestrado em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI). Campus Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, 64.049-550, Teresina, PI, Brasil.

^{2*}Departamento de Departamento de Engenharia Agrícola e Solos. CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil. E-mail: asfaruaj@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

³Departamento de Fitotecnia, CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

⁴Departamento de Biologia, Centro de Ciências da Natureza (CCN), UFPI, Teresina, PI, Brasil.

⁵Laboratório de Biologia do Solo, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Av. San Martin, Recife, PE.

dos nódulos. Foram identificados 79 isolados que a partir da caracterização morfológica e fisiológica reuniram-se em sete grupos de divergência pelo método de Tocher e em cinco grupos pelo método UPGMA, com concordância na alocação dos isolados entre os métodos. Entre os grupos, identificou-se isolados dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*.

Palavras-chave: divergência fenotípica, fixação biológica de N₂, nodulação.

ABSTRACT

The genetic diversity among native rhizobia nodulated of Lima bean in soil the State of Piauí was characterized and evaluated. The genotypes lima bean, UFPI-468 (Boca de Moça) and UFPI-491 (Fava Miúda), were used as bait to rhizobium plant, with samples of soil collected in the districts of Nova Esperança (07°77'10"S e 93°51'58"W) and Santa Rita (07°71'49"S e 93°60'08"W), in Água Branca county, State of Piauí who worked as a source of inoculum. For isolation, the nodules were collected at 45 days after the emergence of seedlings, a period that showed higher figures for the number of nodules and biomass. In total 79 isolates were obtained that characterization of morphological and physiological gathered in groups of divergence by the methods of Tocher (seven groups) and UPGMA (five groups) agreement with the allocation of strains. It could be observed that the among groups, there were strains of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* and *Rhizobium*.

Key words: phenotypic divergence, biological N₂ fixation, nodulation

INTRODUÇÃO

Dentre os sistemas biológicos envolvendo plantas e microrganismos, a simbiose rizóbio-leguminosa é a de maior expressão econômica (Franco et al., 2002), trazendo benefícios para a sustentabilidade agrícola, devido ao processo de fixação biológica do N₂ (FBN) (Xavier et al., 2006). Durante o processo, as bactérias comumente conhecidas por rizóbios quebram a tripla ligação do N₂ atmosférico,

através do complexo enzimático conhecido por nitrogenase (Hungria & Araújo, 1994), liberando NH_3 para assimilação pela planta. Em troca, a planta fornece fotossintatos para a bactéria, mantendo-se um equilíbrio biológico. Embora a FBN apresente gastos energéticos para a planta, em comparação com o uso de adubos nitrogenados, o processo apresenta vantagens tanto para a planta e o ambiente quanto para o produtor.

Dentre as leguminosas cultivadas no mundo, as espécies do gênero *Phaseolus* (*P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. polianthus*) têm grande importância e apresentam a capacidade de realizar a FBN. No Brasil, os estudos sobre FBN nesse gênero têm focado principalmente o *P. vulgaris*, havendo estirpes de rizóbio recomendadas para uso comercial. Para o *P. lunatus* não há isolados ou estirpes selecionadas para a inoculação, devido, principalmente, a inexistência de trabalhos com isolamento, caracterização e seleção das bactérias nativas capazes de nodular esta espécie.

Os trabalhos sobre isolamento, caracterização e seleção de rizóbios buscam entender suas relações ecológicas e evolutivas, visando encontrar isolados que apresentem eficiência simbiótica e tolerância aos fatores bióticos e abióticos (Straliotto & Rumjanek, 1999). Esses estudos têm revelado alto grau de diversidade nas populações destas bactérias nos solos, devido às diferentes características morfológica, fisiológica, genética, bioquímica e filogenética (Silva et al., 2007).

Atualmente, as ferramentas da biologia molecular vêm sendo utilizadas para estudos da diversidade das bactérias nativas do solo. Entretanto, os métodos clássicos para caracterização dos rizóbios, através das variáveis morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, são bastante úteis e necessários para estudos iniciais e complementares da diversidade destes microrganismos. Além disso, o uso de técnicas biométricas e processos preditivos, como as análises multivariadas, auxiliam no entendimento da diversidade, por considerarem simultaneamente essas diferenças morfológicas, fisiológicas, agronômicas e bioquímicas (Cruz et al., 2004).

Vários estudos já foram realizados visando à avaliação da diversidade genética de rizóbios noduladores de leguminosas herbáceas (Aguilar et al., 2001; Fernandes et al., 2003; Freitas et al., 2007) e arbóreas (Lammel et al., 2007; Vargas et al., 2007). Entretanto, no Brasil, existe carência de estudos sobre a diversidade de isolados de rizóbios noduladores do feijão-fava. Neste sentido objetivou-se

caracterizar a diversidade genética entre rizóbios nativos noduladores do feijão-fava em solos do Estado do Piauí.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus da Socopo, em Teresina, PI, no período de 24 de março a 06 de junho de 2007.

As sub-amostras de feijão-fava utilizadas foram UFPI-491 (Boca de Moça) e UFPI-468 (Fava Miúda), oriundas do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-Fava (BAG de Feijão-Fava) da UFPI. Esses genótipos foram selecionados por serem bastante cultivados nos Estados do Piauí e Maranhão, e segundo os dados de procedência, UFPI-491, originário do município de Várzea Grande, PI, apresenta sementes com tegumento creme e médias de comprimento e largura de 17,53 e 18,18 mm, respectivamente, enquanto UFPI-468 é originário do município de São Domingos, MA, com sementes de tegumento creme e médias de comprimento e largura de 11,77 e 9,26 mm, respectivamente.

Os genótipos foram cultivados em sacos plásticos, contendo 5 kg de solo, Latossolo Argissolo, coletado na profundidade de 0,0 a 0,2 m, em áreas que apresentavam histórico de mais de um ano de cultivo do feijão-fava. As áreas selecionadas localizam-se nos distritos de Nova Esperança (07°77'10"S e 93°51'58"W) e Santa Rita (07°71'49"S e 93°60'08"W), no município de Água Branca, PI, cujas análises químicas e físicas foram realizadas no Laboratório de Solos da Embrapa Meio-Norte (Tabelas 1 e 2). Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso, no arranjo fatorial 2 (tipo de solo) x 2 (genótipo) x 3 (período de avaliação), com quatro repetições.

Na semeadura, foram colocadas quatro sementes por saco e, após 15 dias da emergência, foi realizado o desbaste, deixando-se uma planta por saco. A adubação mineral isenta de N, foi aplicada no plantio, conforme as recomendações técnicas para a cultura (Vieira, 1992). Os sacos foram irrigados diariamente, para manter a umidade do solo próxima à capacidade de campo (método gravimétrico).

A capacidade de nodulação foi avaliada aos 30, 45 e 60 dias após a emergência das plântulas, a partir do número, biomassa e tamanho dos nódulos e massa seca da parte aérea. Tais avaliações foram realizadas em cada planta, individualmente, após separar a parte aérea do sistema radicular, na altura no colo. A determinação da massa seca da parte aérea ocorreu em estufa a 60°C. Para determinação do número e biomassa dos nódulos, procedeu-se a lavagem do sistema radicular. O tamanho dos nódulos foi calculado a partir da relação entre a massa úmida e o número dos nódulos. Os dez nódulos maiores e viáveis foram reservados para dessecar em tubos de ensaio, com sílica gel e uma fina camada de algodão e vedados com tampa de rosca.

O isolamento e a caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica dos isolados foram realizados no Laboratório de Biologia do Solo da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), segundo a metodologia proposta por Hungria (1994). Os nódulos utilizados nessas etapas foram coletados aos 45 dias após a emergência das plântulas, período em que se observaram os maiores valores para o número e biomassa dos nódulos.

O isolamento foi efetuado em placas de Petri contendo meio de cultura LMA, pH 6,8, acrescido de indicador vermelho congo e incubados a 28°C, por período necessário para se evidenciar o crescimento das colônias (Vincent, 1970). As características morfológicas observadas foram: forma da colônia (FC: R - redonda, E - elipsóide), elevação (EL: C - convexa, A - achatada) e cor (CC: BL - branca/leitosa, T - transparente).

As características fisiológicas foram avaliadas em isolados crescidos em meio de azul de bromotimol observando-se: tempo de crescimento (TC: R - rápido, 1 a 3 dias, I - intermediário, 4 a 5 dias); formação de ácidos e álcalis (FAA: AC - ácida, AL - alcalina), formação de muco (FM: A - ausente, P - presente); volume do muco (VM: UM - muito, M - médio, P - pouco e S - seco) (Melloni, 2006); elasticidade do muco (EM: P - presença de fio, A - ausência de fio) e produção de bolhas (PB: P - presente, A - ausente). Em todos os isolados foram efetuados teste de Gram e estes apresentaram coloração rósea (Gram -: negativo).

As comparações de médias foram realizadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na análise da divergência genética entre os isolados, a moda dos dados referentes às características morfológicas e fisiológicas, sem repetição, foi utilizada para obtenção da matriz de dissimilaridade, que posteriormente foi submetida às técnicas de análises multivariadas: método de Tocher e método hierárquico UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). O corte no dendrograma gerado pelo método UPGMA foi efetuado no ponto em que se observou a mudança brusca de nível, conforme a recomendação de Cruz et al. (2004). Essas análises e a construção do dendrograma foram realizadas com auxílio do programa GENES (Cruz, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nodulação

O efeito do período de avaliação (30, 45 e 60 dias) dos nódulos foi significativo ($P < 0,01$) para todos os caracteres (Tabelas 3 e 4). A biomassa e o número dos nódulos avaliados aos 45 dias foram mais que o dobro dos avaliados aos 30 dias, porém não se observou diferença significativa entre 45 e 60 dias. Xavier et al. (2006) observaram diferenças significativas entre amostras de Latossolo Amarelo, oriundas da região Nordeste do Brasil, para o número e a biomassa de nódulos, usando como planta-isca o feijão-caupi. Informações relacionadas ao número e massa de nódulos são critérios freqüentemente utilizados pela RELARE (Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola) para avaliação da eficiência na simbiose entre rizóbios e leguminosas.

Quanto ao tamanho dos nódulos, os menores e os maiores foram observados, respectivamente, nas avaliações aos 30 e 60 dias, sendo que aos 45 dias, os nódulos não diferiram dos demais. Com relação à massa seca da parte aérea, verificou-se que a quantidade obtida foi diretamente proporcional ao tempo para avaliação, portanto, aos 60 dias de emergência, que corresponde ao início do florescimento dos genótipos de feijão-fava usados como planta-isca, estimou-se a maior média. A matéria seca também pode ser utilizada como critério de avaliação da eficiência de uma estirpe. Zilli et al. (2006) indicaram estirpes com potencial como

inoculantes a partir da produção de matéria seca da parte aérea e do acúmulo de N. Os resultados da produção de matéria seca da parte aérea dos genótipos UFPI-491 e UFPI-468 revelaram que a população nativa de rizóbios presente nas amostras de solo nos distritos de Nova Esperança e Santa Rita tem potencial para o isolamento de estirpes eficientes e, sobretudo competitivas.

A interação entre solos e genótipos foi significativa para o número de nódulos. O genótipo UFPI-491 destacou-se tanto nas amostras de solo de Nova Esperança quanto de Santa Rita, contudo a maior quantidade de nódulos do referido genótipo foi contabilizada nas amostras de Nova Esperança. Essa maior nodulação apresentada pelo genótipo UFPI-491, que segundo os dados de procedência apresenta maior tamanho de semente, está de acordo com os resultados obtidos por Dobert & Blevins (1993), que estimou correlação positiva entre o tamanho da semente, a massa e o número de nódulos produzidos, em cinco variedades de feijão de lima.

Isolamento

No cultivo dos genótipos de *P. lunatus*, em solos de Santa Rita e Nova Esperança foram obtidos 79 isolados puros com diferentes características fenotípicas das colônias bacterianas (Tabelas 5 e 6). As características morfológicas, em geral, apresentaram pequena variação, para a forma das colônias, entre os isolados. Todos os isolados apresentaram formato arredondado, exceto o ISO-SRB02 e o ISO-SRM13 com formato elipsóide, oriundos do solo de Santa Rita. Os isolados obtidos, tanto do solo de Santa Rita quanto de Nova Esperança, apresentaram colônias dos tipos convexa (21 e 46 isolados, respectivamente) e achatada (seis isolados em cada tipo de solo). Entretanto, no genótipo UFPI-491, todos os isolados apresentaram colônias com elevação do tipo convexa. A maioria dos isolados apresentaram colônias com cor branca e aspecto leitoso, enquanto que apenas nove isolados apresentaram colônias transparentes. Segundo Jordan (1984), as colorações encontradas nas colônias de rizóbios podem ser branca, amarela ou rósea, sendo incomum encontrar rizóbios formando colônias de cor amarela ou rosada (Hungria, 1994), embora alguns estudos encontraram isolados com colônias de coloração amarela (Soares et al., 2006; Santos et al., 2007).

A observação dos resultados indica que há uma diversidade morfológica entre rizóbios nativos noduladores de feijão-fava nos solos do Piauí. Diversidade morfológica entre outros grupos de rizóbios também foi verificada por Silva et al. (2007) e Martins et al. (1997a) para isolados obtidos em solo de Pernambuco e Mato Grosso do Sul, respectivamente.

Os isolados oriundos do solo de Nova Esperança e Santa Rita apresentaram crescimento rápido (31 e 10 isolados, respectivamente) e intermediário (21 e 17 isolados, respectivamente). Os padrões de crescimento observados indicam que os isolados podem estar mais adaptados às condições edafoclimáticas da região, uma vez que o crescimento rápido e intermediário favorece maior capacidade de sobrevivência no solo, se comparada aos isolados de crescimento lento (Medeiros et al., 2007).

Em relação à produção de ácido e álcali, observou-se, nos isolados oriundos do solo de Nova Esperança, a prevalência de reação ácida (38 isolados). Por outro lado, os isolados oriundos do solo de Santa Rita apresentaram reação alcalina (16 isolados) e ácida (11 isolados). A presença de isolados de crescimento intermediário e com produção de álcali, características que distinguem o gênero *Bradyrhizobium* (Vargas et al., 2007), sugere que este gênero realiza simbiose com *P. lunatus*. Resultados semelhantes foram observados por Ormeno-Orrillo et al. (2006), em isolados obtidos em nódulos de feijão-fava cultivado em solos do Peru, nos quais o gênero *Bradyrhizobium* foi o simbiote predominante. As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são capazes de formar simbiose com inúmeras espécies, tais como *Phaseolus vulgaris* (Parker, 2002), *Glycine max* (Hungria, 1993), *Vigna unguiculata* (Zilli et al., 2006), e *Arachis hypogaea* (Gerin et al., 1996).

Seguindo a classificação proposta por Melloni (2006), a maioria dos isolados apresentou colônias com elevada produção de muco (49 isolados). Entretanto, foram encontrados isolados com colônias de moderada (19 isolados), baixa (10 isolados) e sem (1) produção de muco. A produção de muco (exopolissacarídeo), encontrada na maioria dos isolados, é uma característica importante relacionada com o processo inicial de infecção nas raízes (Freitas et al., 2007). Desta forma, isolados que apresentam essa característica tem maior vantagem competitiva na infecção, colonização e formação de nódulos.

O método de agrupamento de Tocher possibilitou formar sete grupos distintos, baseados nas características morfológicas e fisiológicas das colônias (Tabela 7). A maioria dos isolados (62 isolados) foram reunidos no grupo 1, predominantemente oriundos do solo de Nova Esperança. Entretanto, para se obter mais informações a respeito da seletividade dos isolados, conforme o solo e o genótipo, realizou-se um novo agrupamento com os isolados presentes no grupo 1. Desta forma, foram formados quinze subgrupos de divergência a partir do reagrupamento, encontrando-se subgrupos compostos por isolados seletivos para os solos (subgrupos 01 e 02), genótipos (subgrupos 04 e 06) e ambos (subgrupos 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14 e 15). Assim, embora que os solos não apresentem grandes diferenças quanto à composição química e localização geográfica, as características fenotípicas observadas pelos isolados aludem que estes passaram por diferente pressão ambiental seletiva, pelo fato de que apenas seis subgrupos (02, 03, 04, 05, 06 e 07) apresentaram isolados dos solos de Nova Esperança e Santa Rita.

O grupo 2 foi formado por isolados oriundos dos solos de Nova Esperança e Santa Rita, noduladores do genótipo UFPI-491. Os isolados desse grupo caracterizam-se por apresentar colônias de formato arredondado, cor transparente, ou branca, aspecto leitoso, elevação convexa, com crescimento rápido ou intermediário, reação ácida no meio, baixo volume de muco com formação de fio e bolhas. Já o grupo 3 foi formado predominante por isolados noduladores do genótipo UFPI-468, que apresentaram colônias de formato arredondado, elevação convexa, cor transparente, crescimento rápido, com reação alcalina, médio volume de muco com ausência de fio e formação de bolhas.

A divergência observada entre os isolados dos grupos 2 e 3 indicam seletividade dos isolados em relação aos genótipos utilizados. Segundo Hartwig (1998), além das condições edafoclimáticas, as características genotípicas do macrossimbionte influenciam na especificidade simbiótica. Alguns trabalhos, no Brasil, têm mostrado variabilidade quanto à nodulação, por estirpes de rizóbios, em genótipos de soja (Bohrer & Hungria, 1998), feijão-comum (Franco et al., 2002) e feijão-caupi (Xavier et al., 2006).

No grupo 4 foram reunidos os isolados que apresentaram colônias de formato arredondado, com elevação convexa ou achatada, cor branca, aspecto leitoso, crescimento intermediário, reação ácida e média produção de muco. Os isolados

ISO-SRM20, ISO-NEB20 e ISO-NEB01 destacaram-se dos demais formando grupos unitários. O ISO-SRM20 apresentou colônia de formato arredondado, achatada, cor branca, aspecto leitoso, crescimento intermediário, reação alcalina e elevada produção de muco (grupo 5); ISO-NEB20 com colônia de formato arredondado, elevação côncava, cor transparente, crescimento rápido, reação ácida e elevada produção de muco com presença de fios (grupo 6) e ISO-NEB01 por possuir colônia de formato arredondado, elevação côncava, cor branca, aspecto leitoso, crescimento intermediário, reação ácida e sem produção de muco (colônia seca) (grupo 7).

Segundo a classificação proposta por Wang et al. (2008), as características apresentadas pelos isolados dos grupos formados identificam espécies dos gêneros *Bradyrhizobium* (grupo 1 e subgrupos 03, 04, 06, 09; grupo 5), *Mesorhizobium* (grupo 1 e subgrupos 01, 02, 03, 04, 06, 07, 10, 11, 12, 13, 14; grupo 2, 3, 4, e 7) e *Rhizobium* (grupo 1 e subgrupos 01, 02, 05 e 14; grupo 2 e 6), indicando que o *P. lunatus* apresenta simbiose com uma ampla faixa de rizóbios. Segundo Santos et al. (2007), em geral, as leguminosas tropicais são capazes de formar nódulos com ampla faixa de rizóbios.

A observação do dendrograma a 64,06% de similaridade, evidenciou-se a formação de cinco grupos (Figura 1), com características semelhantes aos grupos obtidos pelo método de Tocher, obedecendo, em geral, a mesma a relação de similaridade entre os isolados. O UPGMA é bastante utilizado no estudo de diversidade com características fenotípicas, por ser uma ferramenta mais restritiva que o método de Tocher (Fernandes et al., 2003; Freitas et al., 2007; Silva et al., 2007). Houve a formação de 42 perfis fenotípicos baseados nas características analisadas e este número foi inferior ao total de isolados observados, sugerindo a presença de duplicidade entre os isolados. Desta forma, há necessidade de estudos futuros para se obter uma classificação mais detalhada desses isolados, utilizando-se ferramentas de biologia molecular. Segundo Martins et al. (1997b), a caracterização morfológica e fisiológica das espécies bacterianas pertencentes à família Rhizobiaceae permitiu uma análise prévia da diversidade, possibilitando a identificação e agrupamento que normalmente costuma estar relacionado com os estudos a nível de DNA.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado do primeiro autor e financiamento do projeto de pesquisa com *P. lunatus*.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, O.M.; LÓPEZ, M.V.; RICCILLO, P.M. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. **Journal of Biotechnology**, v.91, p.181-188, 2001.
- BOHRER, T.R.J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n. 6, p.937-952, 1998.
- CRUZ, C.D. **Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001. 648 p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. 480 p.
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.7, p.835-842, 2003.
- FREITAS, A.D.S. et al. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v.66, n.3, p.497-504, 2007.
- FRANCO, M.C. et al. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.8, p.1145-1150, 2002.
- GERIN, M.A.N. et al. Adubação do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em área de reforma de canavial. **Scientia Agricola**, v.53, n.1, p.84-87, 1996.
- HARTWIG, U.A. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v.1, n.1, p.92-120, 1998.

- HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Org.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994, p.45-61.
- HUNGRIA, M. Efeito das temperaturas elevadas na exsudação de compostos fenólicos que atuam como sinais moleculares na nodulação da soja e do feijoeiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, n.1, p.67, 1993.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae. CONN. 1938. In: KRIEG, N.R., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p.234-256.
- LAMMEL, D.R. et al. Rhizobia and other legume nodule bacteria richness in Brazilian *Araucaria angustifolia* forest. **Scientia Agrícola**, v.64, n.4, p.400-408, 2007.
- MARTINS, L.M.V. et al. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "Rizóbio"**. 14 p, 1997b. EMBRAPA: Comunicado Técnico 19.
- MARTINS, C.M. et al. Caracterização morfológica e avaliação da tolerância em níveis crescentes de NaCl e altas temperaturas de isolados de rizóbio de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp. nativas do Pantanal Mato-Grossense. **Revista Agrícola Tropical**, v.3, n.1, p.7-14, 1997a.
- MEDEIROS, E.V. DE. et al. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.7, n.2, p.160-168, 2007.
- MELLONI, R. et al. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata*(L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.2, p.235-246, 2006.
- ORMENO-ORRILLO, E. et al. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.1, p.253-262, 2006.
- PARKER, M.A. Bradyrhizobia from wild *Phaseolus*, *Desmodium* and *Macroptilium* species in Northern Mexico. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p.2044–2048, 2002.
- SANTOS, C.E.R.E.S. et al. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.4, p.249-256, 2007.

- SILVA, V.N. et al. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.1, p.16-21, 2007.
- SOARES, A.L.L. et al. Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native nodulating populations in Perdões (MG - Brazil): I - cowpea. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.5, p.795-802, 2006.
- STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1999. 58p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 93).
- VARGAS, L. K. et al. Diversidade genética e eficiência simbiótica de rizóbios noduladores de acácia-negra de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 647-654, 2007.
- VIEIRA, R.F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, v.16, n.174, p.30-37, 1992.
- VINCENT, J.M. **A manual for practical study of the root-nodule bacteria**. Oxford. Scientific Publications, 1970. 164 p.
- WANG, E.T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; LÓPEZ, I. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. **Microbios en línea**. Disponível em: <www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>. Acesso em: 05 jan. 2008.
- XAVIER, G.R. et al. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, v.19, n.1, p.25-33, 2006.
- ZILLI, J.E. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas do solo de cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p. 811-818, 2006.

Tabela 1 Caracterização química dos solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI, usados como fonte de inoculo em feijão-fava. Teresina, PI, 2008.

Distrito	pH	MO	P	K	Ca	Mg	H + Al
	(H ₂ O)	(g dm ⁻³)	(mg dm ⁻³)	(cmol _c dm ⁻³)			
Nova Esperança	6,45	58,63	67,40	1,40	6,73	7,26	1,75
Santa Rita	7,20	24,98	95,90	1,80	4,61	2,91	0,89

MO: matéria orgânica.

Tabela 2 Caracterização física dos solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI, usados como fonte de inoculo em feijão-fava. Teresina, PI, 2008.

Distrito	Granulometria (%)				Classificação textural
	Areia fina	Areia grossa	Silte	Argila	
Nova Esperança	16,95	26,50	30,95	25,60	Franco
Santa Rita	43,45	31,30	15,65	9,60	Franco Arenoso

Tabela 3 Estimativas dos quadrados médios obtidos nas análises de variância dos caracteres: biomassa (BN), número (NN) e tamanho dos nódulos (TN) e massa seca da parte aérea (MS), avaliados em feijão -fava. Teresina, PI, 2008.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios			
		BN	NN	TN	MS
Solos (S)	1	0,00	2133,33	19.10^{-6}	28,34
Genótipos (G)	1	0,12	936,33	1.10^{-6}	2,89
Período (P)	2	22,13*	174044,33*	63.10^{-6} *	182,68*
S*G	1	3,06	81840,08**	7,33E-0007	3,43
S*P	2	1,00	14259,08	1.10^{-6}	6,26
G*P	1	3,86	33417,58	10.10^{-6}	11,86
Resíduo	38	1,44	15610,63	8.10^{-6}	9,74

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 4 Médias¹ dos caracteres: biomassa (BN), número (NN), tamanho dos nódulos (TN) e massa seca da parte aérea (MS), avaliados em feijão-fava aos 30, 45 e 60 dias após a emergência. Teresina, PI, 2008.

Tempo (dias)	Caracteres avaliados			
	BN	NN	TN	MS
30	1,03b	188,87b	0,005b	11,52c
45	2,40a	371,12a	0,007ab	15,29b
60	3,37a	367,87a	0,009a	18,26a

¹Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 5 Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de rizóbios noduladores de feijão-fava, oriundos do solo de Santa Rita, município de Água Branca, PI.

Isolados	Características								
	Morfológicas ¹			Fisiológicas ²					
	G1	FC	EL	CC	TC	FAA	FM	VM	EM
ISO-SRB01	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISO-SRB02	E	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISO-SRB03	R	C	T	I	Ac	P	MU	P	P
ISO-SRB04	R	C	T	I	Ac	P	MU	P	P
G2	FC	EL	CC	TC	FAA	FM	VM	EM	PB
ISO-SRM01	R	C	BL	I	Al	P	P	A	P
ISO-SRM02	R	C	T	I	Al	P	MU	A	P
ISO-SRM03	R	C	BL	I	Al	P	M	A	P
ISO-SRM04	R	C	T	I	Al	P	M	A	P
ISO-SRM05	R	C	BL	R	Ac	P	MU	P	P
ISO-SRM06	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISO-SRM07	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISO-SRM08	R	C	BL	I	Al	P	M	A	P
ISO-SRM09	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISO-SRM10	R	C	BL	R	Al	P	P	A	P
ISO-SRM11	R	A	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-SRM12	R	A	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-SRM13	E	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISO-SRM14	R	A	BL	I	Ac	P	M	A	A
ISO-SRM15	R	A	BL	R	Al	P	MU	A	P
ISO-SRM16	R	C	BL	R	Al	P	MU	A	A
ISO-SRM17	R	C	BL	R	Al	P	M	A	P
ISO-SRM18	R	C	BL	R	Al	P	M	A	P
ISO-SRM19	R	C	BL	I	Al	P	M	A	P
ISO-SRM20	R	A	BL	I	Al	P	MU	A	A
ISO-SRM21	R	C	BL	R	Al	P	M	A	P
ISO-SRM22	R	A	BL	R	Al	P	M	A	P
ISO-SRM23	R	C	BL	I	Ac	P	M	A	A

¹Morfológicas: FC - forma da colônia (R: redondas, E: elipsóide), EL - elevação da colônia (C: convexa, A: achatada) e CC - cor (BL: Branca/leitosa, T: transparente).

²Fisiológicas: TC - tempo de crescimento (R: rápido, I: intermediário), FAA - formação de ácido e álcalis (Ac: ácida, Al: alcalina), FM - formação de muco (A: ausente, P: presente), VM - volume do muco (S: seca, P: pouco, M: médio e MU: muito), EM - elasticidade do muco (P: presença de fio, A: ausência de fio), PB - produção de bolhas (A: ausente, P: presente).

G1 - Isolados de rizóbios noduladores dos genótipos do feijão-fava UFPI-491 (Boca de Moça); G2- isolados de rizóbios noduladores dos genótipos do feijão-fava UFPI-468 (Fava Miúda).

Tabela 6 Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de rizóbios, oriundos do solo de Nova Esperança, município de Água Branca, PI noduladores de feijão-fava.

Isolados	Características								
	Morfológicas ¹			Fisiológicas ²					
	G1	FC	EL	CC	TC	FAA	FM	VM	EM
ISO-NEB01	R	C	BL	I	Ac	A	S	0	P
ISO-NEB02	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	A
ISO-NEB03	R	C	T	R	Ac	P	P	P	A
ISO-NEB04	R	C	T	R	Ac	P	MU	P	P
ISO-NEB05	R	C	BL	R	Ac	P	M	A	P
ISO-NEB06	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEB07	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEB08	R	C	BL	I	Al	P	M	A	P
ISO-NEB09	R	C	BL	I	Ac	P	M	P	P
ISO-NEB10	R	C	BL	R	Ac	P	MU	P	P
ISO-NEB11	R	C	BL	R	Ac	P	M	A	P
ISO-NEB12	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISO-NEB13	R	C	BL	R	Al	P	P	P	P
ISO-NEB14	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEB15	R	C	BL	R	Al	P	MU	A	P
ISO-NEB16	R	C	BL	R	Ac	P	P	P	P
ISO-NEB17	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	A
ISO-NEB18	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEB19	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEB20	R	C	T	R	Ac	P	MU	P	A
ISO-NEB21	R	C	T	R	Ac	P	M	P	P
ISO-NEB22	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISO-NEB23	R	C	BL	I	Al	P	P	P	P
ISO-NEB24	R	C	T	R	Al	P	P	A	P
ISO-NEB25	R	C	BL	R	Ac	P	P	A	P
ISO-NEB26	R	C	BL	R	Ac	P	P	A	P
ISO-NEB27	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
G2	FC	EL	CC	TC	FAA	FM	VM	EM	PB
ISO-NEM01	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISO-NEM02	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEM03	R	C	BL	I	Ac	P	M	A	P
ISO-NEM04	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISO-NEM05	R	C	BL	R	Ac	P	M	A	P
ISO-NEM06	R	A	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEM07	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISO-NEM08	R	A	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEM09	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEM10	R	A	BL	R	Ac	P	MU	A	P

Continuação...

Tabela 6 Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de rizóbios, oriundos do solo de Nova Esperança, município de Água Branca, PI noduladores de feijão-fava (Continuação).

G2	FC	EL	CC	TC	FAA	FM	VM	EM	PB
ISO-NEM11	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEM12	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEM13	R	C	BL	R	Al	P	MU	A	P
ISO-NEM14	R	C	BL	R	Al	P	P	A	P
ISO-NEM15	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEM16	R	A	BL	I	Ac	P	MU	A	A
ISO-NEM17	R	A	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEM18	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	A
ISO-NEM19	R	C	BL	R	Al	P	M	A	P
ISO-NEM20	R	C	BL	I	Al	P	M	A	P
ISO-NEM21	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	A
ISO-NEM22	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	A
ISO-NEM23	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISO-NEM24	R	A	BL	I	Ac	P	MU	A	A
ISO-NEM25	R	C	BL	I	Ac	P	UM	A	P

¹Morfológicas forma (R: redondas, E: elipsóide), elevação (C: convexa, A: achatada) e cor (BL: Branca/leitosa, T: transparente); ²Fisiológicas: tempo de crescimento (R: rápido, I: intermediário), formação de ácido e álcalis (Ac: ácida, Al: alcalina), formação de muco (A: ausente, P: presente), volume do muco (S: seca, P: pouco, M: médio e MU: muito), elasticidade do muco (P: presença de fio, A: ausência de fio), produção de bolhas (A: ausente, P: presente); G1 - Isolados de rizóbios noduladores dos genótipos do feijão-fava UFPI-491 (Boca de Moça); G2- isolados de rizóbios noduladores dos genótipos do feijão-fava UFPI-468 (Fava Miúda).

Tabela 7 Grupos e subgrupos de isolados noduladores do feijão-fava, estabelecidos pelo método de Tocher, com base na matriz de dissimilaridade das características morfológicas e fisiológicas.

Grupo	Sub-grupo	Isolados	Nº
1	1	ISO-NEB02, ISO-NEB17, ISO-NEM18, ISO-NEM21, ISO-NEM22, ISO-NEB14, ISO-NEB27, ISO-NEM11, ISO-NEM12	62
	2	ISO-NEB05, ISO-NEB11, ISO-NEM05, ISO-NEB07, ISO-NEB18, ISO-SRM06, ISO-NEM15, ISO-NEB25	
	3	ISO-NEB06, ISO-NEB19, ISO-NEM02, ISO-NEM09, ISO-NEM23, ISO-NEM25, ISO-NEB12, ISO-NEB22, ISO-SRM07, ISO-NEM01, ISO-NEM04, ISO-NEM07, ISO-NEM13, ISO-SRB01	
	4	ISO-NEB08, ISO-SRM03, ISO-SRM17, ISO-SRM18, ISO-SRM21, ISO-NEM19, ISO-NEM20, ISO-SRM01, ISO-NEM14	
	5	ISO-NEB10, ISO-SRM05	
	6	ISO-NEB15, ISO-SRM09, ISO-SRM08, ISO-SRM19, ISO-SRM10	
	7	ISO-SRM11, ISO-SRM12, ISO-NEM10, ISO-NEM17, ISO-SRM15	
	8	ISO-NEM16, ISO-NEM24	
	9	ISO-NEM06, ISO-NEM08	
	10	ISO-SRB02	
	11	ISO-NEM03	
	12	ISO-SRM02	
	13	ISO-SRM16	
	14	ISO-NEB26	
	15	ISO-SRM13	
2		ISO-NEB04, ISO-NEB21, ISO-SRB04, ISO-SRB03, ISO-NEB09, ISO-NEB16, ISO-NEB03, ISO-NEB13, ISO-NEB23	9
3		ISO-NEB24, ISO-SRM04, ISO-SRM22	3
4		ISO-SRM14, ISO-SRM23	2
5		ISO-SRM20	1
6		ISO-NEB20	1
7		ISO-NEB01	1

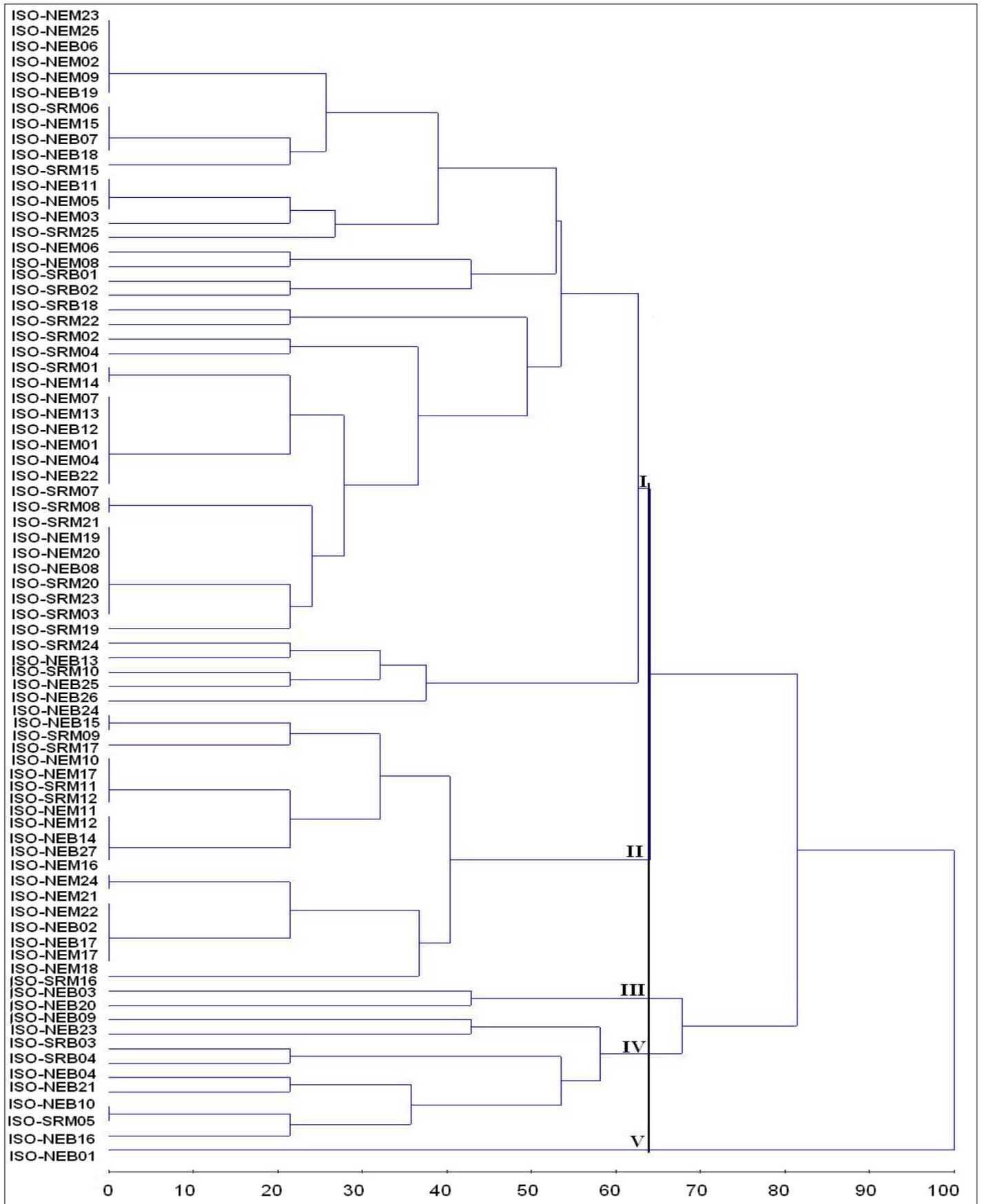


FIGURA 1 Dendrograma da similaridade genética entre 79 isolados, obtido por UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade dos dados morfológicos e fisiológicos.

6. CONCLUSÕES GERAIS

As sub-amostras de feijão-fava do Banco Ativo de Germoplasma da UFPI avaliadas apresentam expressiva divergência genética para os caracteres físicos e químicos da semente.

As distâncias de Mahalanobis e o método de agrupamento de Tocher possibilitam a discriminação de sub-amostras divergentes com relação a caracteres físicos e químicos de semente de feijão-fava.

Os caracteres fibra insolúvel e fibra solúvel são os que mais contribuem para a divergência total entre as sub-amostras de feijão-fava.

O tempo de avaliação da biomassa e número de nódulos é um fator importante na nodulação do feijão-fava.

Os isolados de rizóbio noduladores de fava encontrados nos solos do Estado do Piauí apresentam grande variabilidade morfológica e fisiológica, com a identificação de, pelo menos, quatro grupos de diversidade, pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*.