



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARINARA FERNEDA VENTORIM

**CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE
GENÓTIPOS DE FEIJÃO AZUKI**

Londrina
2019

MARINARA FERNEDA VENTORIM

**CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE
GENÓTIPOS DE FEIJÃO AZUKI**

Defesa de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientadora: Prof. Dr^a. Lúcia Sadayo Assari
Takahashi

Coorientadora: Dr^a. Maria Paula Barion Alves
Nunes

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ventorim, Marinara Ferneda.

Caracterização morfoagronômica e molecular de genótipos de feijão azuki / Marinara Ferneda Ventorim. - Londrina, 2019.

61 f. : il.

Orientador: Lúcia Sadayo Assari Takahashi.

Coorientador: Maria Paula Barion Alves Nunes.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Vigna - Tese. 2. Vigna angularis - Tese. 3. Melhoramento genético - Tese. I. Sadayo Assari Takahashi, Lúcia . II. Barion Alves Nunes, Maria Paula . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

MARINARA FERNEDA VENTORIM

**CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE
GENÓTIPOS DE FEIJÃO AZUKI**

Defesa de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Lúcia Sadayo Assari
Takahashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Thiago Ometto Zorzenoni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Nelson Fonseca da Silva Jr
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

Londrina, 26 de Fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais
Sandra e Gelásio.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realizar o Mestrado, juntamente à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa cedida durante os dois anos de estudo. Aos técnicos do departamento, por toda colaboração para condução do experimento.

Agradeço a minha orientadora Lúcia A. S. Takahashi, pelos ensinamentos transmitidos desde o começo dessa jornada, pelos momentos de turbulência em que ela sempre agiu como a calma, obrigada!

À minha co-orientadora Maria Paula, por me incentivar e acreditar na realização deste trabalho.

À Jessica Delfini, pelas análises AFLP. À Renata Giacomini pelo auxílio na estatística.

À todos os amigos que me acompanharam ao longo destes dois anos, e que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Meus amigos da Pós e amigos do laboratório. Em especial agradeço a Emanuelli, Débora, Natália e Ana Carolina, pela amizade, parceria, e auxílio.

Reservo este parágrafo para agradecer duas pessoas, que sabem da importância que tiveram para que este trabalho tenha sido concluído. À Gustavo Freiria, também conhecido por Viola, por todos os ensinamentos e ajuda nos momentos em que mais precisei, e também pela paciência (rs), obrigada! Ao meu grande amigo Luíz Ruela, nossa amizade começou no dia em que semeamos o experimento, e prevalece até hoje, obrigada pela dedicação incansável, por estar presente, por não me deixar desistir, e claro, por todas as cervejas e risadas (e que foram muitas).

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais, por todo apoio durante esses anos de estudos, pela confiança depositada em mim, e pela dedicação incansável por nossa família.

Finalizo agradecendo à Deus, por todas essas oportunidades recebidas, dos estudos, da família, das amizades colocadas em meu caminho, sem Ele nada é possível.

“Florescer exige passar por todas as estações”.

VENTORIM, Marinara Ferneda. **Caracterização morfoagronômica e molecular de genótipos de feijão azuki**. 2019. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O feijão azuki (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi e Ohashi, tem se popularizado no Brasil devido a popularização da cultura asiática e devido as propriedades nutricionais e nutracêuticas que apresenta. Atualmente há apenas uma cultivar registrada no país, sendo comum a utilização de materiais crioulos e locais. O objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética de acessos de feijão azuki pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Londrina. Trinta e dois acessos foram avaliados com base em suas características morfológicas, e 38 molecularmente. Para avaliação das características morfoagronômicas foi realizado a semeadura em blocos ao acaso, quatro repetições, com 28 acessos, oriundos de material crioulo da região e quatro materiais também pertencentes ao gênero *Vigna*. Os acessos foram caracterizados conforme descritores morfoagronômicos e molecularmente por meio do método AFLP. Para a AFLP, os acessos foram cultivados até o desenvolvimento do primeiro trifólio, o qual foi coletado e submetido à análise. A dissimilaridade genética foi estimada por meio da distância generalizada de Mahalanobis e agrupadas pelo método de UPGMA. Os dados qualitativos e quantitativos agruparam os genótipos em cinco grupos, com distâncias de 0,4 e 75 respectivamente. Os principais caracteres responsáveis pelo agrupamento dos AZP em único grupo foram: porte e hábito de crescimento, coloração da flor, da vagem no ponto de colheita e das sementes. A variável NVAG não apresentou diferenças significativas, indicando baixa relevância para diferenciação dos materiais. As características TVAG, P100 e COMPF foram as que mais contribuíram para quantificação da divergência. Apenas 38% dos fragmentos gerados pela AFLP apresentaram polimorfismo. Segundo a análise molecular o genótipo Caupi apresentou menor dissimilaridade aos genótipos AZP. Os genótipos AZP não são divergentes entre si.

Palavras-chave: *Vigna*. *Vigna angularis*. Melhoramento genético.

VENTORIM, Marinara Ferneda. **Morphagronomic and Molecular characterization of Azuki bean genotypes**. 2019. 61 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019

ABSTRACT

The azuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi, is of great food and cultural importance in Asian countries, while in Brazil, its consumption has been increasing due to the popularization of Asian culture, nutritional and nutraceutical properties. Currently, there is only one cultivar registered in the country, therefore, it is common the use of landraces and local materials. The objective of this work was to estimate the genetic diversity of Azuki bean accesses belonging to the Germplasm Bank of the State University of Londrina. Thirty-two accessions were morphologically evaluated, and 38 accession were evaluated based on their molecular characteristics. For the evaluation of the morpho-agronomic characteristics, field sowing was performed in randomized blocks with four replications, containing 28 accesses, originating from landraces materials from the region and four materials also belonging to the genus *Vigna*. The accessions were characterized according to agro-morphological descriptors and molecularly through the AFLP method. For molecular characterization, the accessions were cultivated in a greenhouse until the development of the first trefoil, which was collected and submitted to the analysis. From the obtained results, the genetic dissimilarity was estimated through the generalized distance of Mahalanobis and grouped by the UPGMA method for both analyzes. Qualitative and quantitative data grouped the genotypes into five groups, with distances of 0.4 and 75, respectively. The main traits responsible for grouping AZP in a single group were: size and growth habit, flower color, pod color at harvest point and seeds. The NVAG variable showed no significant differences, indicating low relevance for differentiation of materials. The TVAG, P100 and COMPF characteristics contributed the most to quantify the divergence. The AZP genotypes were related in a single group according to morphoagronomic analysis, and grouped with the Caupi genotype through the AFLP, differing from the other groups. The AZP genotypes are not divergent.

Keywords: *Vigna*. *Vigna angularis*. Plant breeding.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sementes dos acessos de CP1 (a), MV1 (b), AZ1 (c), AZ2 (d), AZ3 (e), AZ5 (f), AZ6 (g), AZ7 (h), Coimbra (i) e AZP (j).....	29
Figura 2 - Folha dos 32 genótipos do gênero <i>Vigna</i> avaliados.....	38
Figura 3 - Flores dos 32 genótipos do gênero <i>Vigna</i> avaliados.....	38
Figura 4 - Planta inteira representativa do genótipo AZP	39
Figura 5 - Coloração da vagem dos 32 genótipos do gênero <i>Vigna</i> avaliados	39
Figura 6 - Dendrograma das distâncias genéticas dos caracteres qualitativos dos 32 genótipos do gênero <i>Vigna</i>	41
Figura 7 - Dendrograma das características quantitativas dos 32 genótipos do gênero <i>Vigna</i> avaliados.....	48
Figura 8 - Variáveis canônicas dos 32 genótipos do gênero <i>Vigna</i> avaliados	49
Figura 9 - Dendrograma das distâncias genéticas dos 38 genótipos do gênero <i>Vigna</i> estudados através da análise AFLP.....	51
Figura 10 - Agrupamento dos genótipos através da análise AFLP, determinado pelo software Structure.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização dos acessos segundo a “Cor” e “Formato” das sementes dos genótipos <i>Vigna</i> avaliados.	28
Tabela 2 -	Caracteres qualitativos avaliados para os 32 genótipos de <i>Vigna</i>	29
Tabela 3 -	Caracteres quantitativos avaliados para os 32 genótipos de <i>Vigna</i>	29
Tabela 4 -	Variáveis qualitativas dos 32 genótipos do gênero <i>Vigna</i>	34
Tabela 5 -	Resumo da análise de variância das características quantitativas avaliadas	42
Tabela 6 -	Médias das variáveis quantitativas dos 32 genótipos do gênero <i>Vigna</i> agrupadas pelo teste de Scott e Knott à 5% de probabilidade.....	42
Tabela 7 -	Contribuição relativa de oito características para dissimilaridade genética de 32 genótipos do gênero <i>Vigna</i> pelo método de Singh.....	44
Tabela 8 -	Combinações de primers seletivos de AFLP utilizados, número de fragmentos amplificados, número de fragmentos polimórficos e porcentagem de polimorfismo por primer.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	GÊNERO <i>VIGNA</i>	12
2.2	FEIJÃO AZUKI	12
2.2.1	ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO FEIJÃO AZUKI	14
2.3	MELHORAMENTO GENÉTICO	15
2.4	DIVERGÊNCIA GENÉTICA	17
2.5	CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA	20
2.6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	21
3	ARTIGO A: CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO AZUKI	25
3.1	RESUMO	25
3.2	ABSTRACT	26
3.3	INTRODUÇÃO	27
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.4.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DOS GENÓTIPOS	30
3.4.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	31
3.4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA – VARIÁVEIS QUALITATIVAS	33
4.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA – VARIÁVEIS QUANTITATIVAS	43
4.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	50
5	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores de feijão ficando em terceira posição no ranking mundial (FAO, 2017). Desde 1568 há relatos da diversidade da cultura, embora não seja possível precisar as espécies cultivadas, existia diversos feijões e favas (GANDAVO, 2001). Dentre as espécies de feijão cultivadas no país, encontram-se reguladas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) gêneros *Phaseolus* e *Vigna*, os quais apresentam relevante papel econômico e social (BRASIL, 2008), além da importância alimentícia (FAO, 2017).

O feijão azuki (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi e Ohashi) apesar de pouco conhecido pela população brasileira, é uma espécie de valor alimentício e cultural nos países asiáticos. No Japão é considerado a segunda leguminosa economicamente mais importante, depois da soja (FAO, 2017). Nos últimos anos seu consumo vem se tornando popular no Brasil devido as propriedades nutricionais que esta espécie apresenta e também devido a popularização da culinária japonesa. Seu consumo em forma de grão e de extrato da leguminosa é apontado como benéfico, devido às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que possui.

Atualmente apenas uma cultivar de feijão azuki está registrada no Brasil, no entanto, genótipos crioulos são cultivados por diversos produtores locais.

Com a domesticação dos materiais, as características presentes nas plantas, consideradas selvagens inicialmente, são perdidas. Dessa forma, quando se procura variabilidade genética e resgate de caracteres consideradas importantes para atender a demanda de novos genótipos, os materiais crioulos são fundamentais. Esses materiais vêm sendo selecionados ao longo dos anos e são altamente adaptados às diferentes regiões produtoras, sendo considerados importantes fontes de variabilidade genética para os programas de melhoramento.

Nos Bancos de Germoplasma encontra-se diversidade de materiais, os quais devem ser corretamente caracterizados para possível utilização nos programas de melhoramento.

A disponibilidade somente é possível mediante a correta identificação, avaliação e caracterização dos genótipos através de caracteres morfológicos, agronômicos e moleculares. Quando realizada, a caracterização é o primeiro passo para a manutenção da diversidade genética de uma espécie e sucesso dos programas de melhoramento.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é caracterizar e estimar a diversidade genética de acessos de feijão azuki pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Londrina com base em suas características morfológicas, agronômicas e moleculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GÊNERO *VIGNA*

O gênero *Vigna* compreende cerca de 160 espécies, as quais estão divididas em sete subgêneros. Dentre elas, as mais cultivadas estão o *V. radiata* (feijão-mungo-verde), *V. angularis* (feijão-adzuki), *V. umbellata* (feijão-arroz) e *V. unguiculata* (caupi), principalmente na Ásia (STEELE; MEHRA, 1980). Na Ásia, o subgênero *Ceratotropis* representa o grupo dominante de espécies de *Vigna* produzidos, o qual possui seu centro de origem no sul e sudoeste do continente.

Cultivado em diversas regiões do mundo, possui 11 materiais considerados relevantes no cenário agrícola. É altamente relacionado ao gênero *Phaseolus*. Das leguminosas produzidas, grande parte da população depende diretamente do consumo de grãos de *Phaseolus* ou *Vigna*, sendo a maior parte da produção destas leguminosas é direcionada para o consumo local (TOMOOKA et al. 2005).

O feijão-mungo-verde é usado na forma de brotos, conhecido como “moyashi”. Já o feijão-arroz é utilizado para substituir o feijão-comum nos restaurantes que praticam a macrobiótica (VIEIRA et al., 1992). Dentre estes, o Feijão-Caupi, mais estudado no Brasil dos *Vigna*, também é conhecido como feijão frade e feijão de corda, é uma leguminosa granífera, rica em proteínas e aminoácidos essenciais, sendo de grande utilização na alimentação humana e animal (BIODIVERSITY INTERNATIONAL, 2007; PASSOS et. al, 2007).

Já o Azuki é consumido de maneira semelhante ao feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), nas colônias asiáticas, principalmente nas japonesas, onde o consumo é maior, este é utilizado para o preparo de doces (VIEIRA, 2002).

2.2 FEIJÃO AZUKI

Também conhecido por feijão-adzuki ou feijão-azuki; em espanhol, por *frijol adzuki* ou *judía adzuki* e em inglês, por *adzuki bean* ou *azuki*

bean (VIEIRA et al., 2001), é uma espécie pertencente à família das leguminosas, amplamente cultivado no Japão, China, Coreia do Sul e Taiwan, representando uma cultura valorosa nesses países (LUMPKIN; MCCLARY, 1994).

Apresenta como centro de origem a China, maior produtor e consumidor mundial do grão e que possui um longo histórico, produzindo em torno de 300 mil toneladas anualmente. Além da China, a Coreia e Japão são grandes consumidores da leguminosa (CHEN et al., 2015). Atualmente é encontrado em mais de 30 países, e seu consumo faz parte da dieta de aproximadamente um bilhão de pessoas (YANG et al., 2015).

Possui alto valor nutricional e é cultivado visando o consumo humano. Suas sementes são usualmente utilizadas na produção de sobremesas ou recheios para massas e pastéis devido a sua doçura natural e sabor agradável. Nas colônias asiáticas, principalmente nas japonesas, onde é mais popular, este é utilizado para o preparo de doces (VIEIRA, 2002).

Sua produção visa atender a alimentação humana, no entanto, também pode ser utilizado na fabricação de cosméticos e remédios, adubação verde, forragem e cobertura vegetal do solo (VIEIRA et al., 2001). Além da importância alimentícia, diversas pesquisas evidenciam os benefícios do consumo do extrato e de suas sementes, devido as propriedades antioxidantes e anti-inflamatória que possui.

É amplamente utilizado na fitoterapia chinesa por milhares de anos (LUO et al., 2016), além do consumo de suas sementes ser considerado saudável em diversos países (REDDY et al., 2017). Possui em sua composição um elevado teor de carboidratos, proteínas, e lipídios, assim como vitaminas e minerais (DURAK et al., 2013). A composição do extrato de sementes de azuki é de 4,9% de água, 6,7% de proteína, 17,2% de gordura, 5,8% de cinzas, 65,4% de carboidratos. Além disso, possui em torno de 11 g de fibra alimentar por kg de extrato (SATO et al., 2008).

O consumo de grãos e produtos relacionados está se tornando popular devido a preocupações com a saúde humana. Foram reportados diversos resultados sobre os extratos de azuki possuírem uma diversidade de funções fisiológicas, como antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-cancerígenas e anti-diabéticas (LUO et al., 2016). Os compostos bioativos encontrados na

casca de suas sementes têm recebido um interesse significativo devido suas propriedades antioxidantes e promotoras de saúde, como os polifenóis (LIN; LAY, 2006).

2.2.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO FEIJÃO AZUKI

No Brasil, a produção de azuki não é contabilizada com precisão, porém estima-se uma produtividade que varia entre 1000 kg ha⁻¹ a 1200 kg ha⁻¹ (AMBROSANO et al., 2014). Informações referentes à área cultivada e número de produtores também não são exatas (ALMEIDA et al., 2013).

Segundo Richetti e Ito (2015), a produtividade da cultura está relacionada ao planejamento da produção, à qualidade das sementes e insumos, tratos culturais, questões climáticas e por fim seu sucesso está atrelado aos preços de comercialização e custos de produção.

O feijão azuki é uma espécie autógoma, podendo haver uma taxa de polinização cruzada de 1% (YAMAMOTO et. al., 2006). É uma cultura diploide ($2n = 2x = 22$), com tamanho de genoma de aproximadamente 500 Mb.

A cultura se desenvolve bem em clima subtropical, com temperaturas que variam de 18 a 30 °C, não tolera geadas e é sensível ao fotoperíodo. Prefere solos de textura argilosa e arenosa, bem drenados. É uma espécie herbácea, geralmente de porte ereto e crescimento determinado, entretanto, existem materiais trepadores ou prostrados. De ciclo curto, com altura média entre 20 a 50 cm e sementes oblongas a ovais, lisas e de coloração variável, podendo ser vermelho-escuras, cinza, pretas, brancas, amarelo-esverdeadas ou até mosqueadas (AMBROSANO et al., 2014). Esses autores recomendam uma densidade de semeadura de 50 a 60 cm entre as linhas e de 10 a 15 plantas por metro e a colheita das vagens deve ser realizada quando estão maduras e quase secas, ocorrendo entre 70 e 80 dias e 120 e 150 dias, para materiais determinados e indeterminados trepadores, respectivamente. Seu rendimento pode variar entre 1000 e 1200 kg ha⁻¹ de grãos.

Características como o hábito de crescimento, especificidades das sementes, ciclo da cultura variam conforme a cultivar. As cultivares Kintoki e Dainagon, são de hábito de crescimento determinado e suas sementes possuem cor vermelha, pesando de 10 a 15 gramas cada 100 unidades respectivamente (VIEIRA et al., 1992). O ciclo biológico das cultivares varia conforme a época em que é cultivado, situando-se entre 3 a 5 meses.

A época da colheita também difere entre as espécies. Em ensaios com os feijões arroz, caupi, azuki, fava, mungo verde e comum, cultivados em diferentes locais e épocas, o feijão azuki apresentou maior variabilidade em seu ciclo biológico e desuniformidade na maturação quando comparados ao feijão comum, necessitando realizar a colheita em duas vezes quando cultivado na época da “seca”. Na época das águas, as cultivares tiveram o ciclo entre 69 e 82 dias, variando conforme o local produzido, assim como na época da seca, o qual variou de 89 a 106 dias. A maturação desuniforme das vagens, eleva os custos para produzir a cultura devido a demanda de maior mão de obra utilizada na colheita, pode ser benéfica no plantio das “águas”, pelo fato das chuvas não coincidirem com o período da colheita (VIEIRA et al., 1992).

No Brasil, a cultura é pouco estudada e explorada. Há apenas uma cultivar de feijão azuki cadastrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no entanto são utilizados pelos produtores diversos materiais não registrados, sendo considerados como crioulos ou selvagens.

2.3 MELHORAMENTO GENÉTICO

O melhoramento das diversas culturas de interesse agrônômico é direcionado a atender às necessidades humanas, e dentro desse processo é fundamental entender a genética de adaptação das plantas aos diversos habitats em que são cultivadas.

As características genéticas relacionadas a adaptação das espécies de habitats selvagens difere das mesmas espécies adaptadas a ambientes criados pelo homem. Para o feijão azuki (*Vigna angularis*), a variedade selvagem (var. *nipponensis*) difere da variedade cultivada (var.

angularis), no que se refere as características reprodutivas, como número, tamanho, dispersão e dormência de sementes (KAGA et al., 2008).

Com o progresso do cultivo ao longo dos anos e, conseqüentemente, com a ocorrência de cruzamentos naturais e seleção natural, e artificial pelos produtores, selecionando sementes de plantas com base em suas preferências visuais e culinárias, e dessa forma, surgiram muitos tipos de plantas e de grãos. Os materiais genéticos provenientes das introduções mais antigas são considerados exóticos e são comumente chamados de cultivares locais ou crioulas. Esses materiais constituem o germoplasma básico do País e partir dele pode-se melhorar diversas cultivares (FREIRE FILHO, 2011).

Nos Bancos de Germoplasma, estão disponíveis matéria prima básica para o melhoramento. Estes são responsáveis pela conservação da biodiversidade agronômica (AGRAWAL et al., 2007). As coleções presentes nos Bancos atuam como “depósitos genéticos” e visam assegurar a preservação da espécie e sua variabilidade para uso futuro (MELO et al., 2002). Dessa forma, os bancos de germoplasma tem sua importância dentro dos programas de melhoramento e na conservação e preservação da diversidade genética, os quais ficam disponíveis aos melhoristas para o acesso em diferentes pesquisas (BESPALHOK et al., 1999).

A dificuldade do uso apropriado dos recursos genéticos nos programas de melhoramento é decorrente da falta da correta caracterização e documentação adequada dos materiais (NASS, 2001). As atividades relacionadas aos recursos genéticos são caracterizadas pelo alto custo e retorno a longo prazo. A introdução e troca, coleta, caracterização, avaliação, documentação e conservação de germoplasma, são passos essenciais que não podem ser subestimados. Um sincronismo apropriado entre essas atividades é necessário para que o banco seja eficiente na manutenção da variabilidade genética e também para assegurar a utilização do germoplasma. Entretanto, as atividades nesses bancos demandam pesquisadores qualificados em diversas áreas do conhecimento, além da conservação da variabilidade genética para o futuro, a real utilização dos acessos disponíveis é outro objetivo importante (NASS; PATERNIANI, 2000).

A partir da década de 1970, iniciaram-se coletas e avaliações de germoplasma na China, seguido da construção de coleções de acessos e pesquisa de diversidade genética utilizando marcadores moleculares. Mais tarde em 1980, a introdução e a criação de novas variedades promoveram o desenvolvimento do feijão-mungo-verde e azuki (CHENG; TIAN, 2011).

No leste asiático se encontra o maior número de acessos de germoplasma desta espécie (XU et al., 2000). Em 2005 totalizou-se mais de 30 mil germoplasmas de leguminosas coletados e conservados no banco genético da China, incluindo 11 gêneros e 17 espécies. Um total de 4856 germoplasmas foram avaliados quanto suas características agronômicas e compiladas no “Catalogue of Chinese Food Legume”, sendo 4272 materiais conservados no banco genético do país (CHENG; TIAN, 2011).

O feijão-caupi, pertencente também ao gênero *Vigna*, é mais estudado no Brasil, e por ser uma espécie autógama, os métodos de melhoramento utilizados para a cultura são: introdução de germoplasma; seleção massal em cultivares locais; seleção de planta individual com teste de progênie em cultivares locais; método genealógico; método da descendência de uma única semente (single seed descent) (BRIM, 1966; FEHR et al., 1987); método da descendência de uma única vagem (single pod descent) (FEHR et al., 1987); e método dos retrocruzamentos (FREIRE FILHO, 2011).

A disponibilidade de genótipos adaptados às condições edafoclimáticas do local depende da caracterização, identificação e seleção de genótipos com potencial para o melhoramento visando aumento do rendimento e da qualidade, assim como para o cultivo agrícola (MOREIRA et al., 2009).

Quando comparado a outras culturas, o azuki tem potencial genético pouco explorado, sendo necessário disponibilizar aos melhoristas materiais genéticos presentes nos bancos de germoplasma para ampliação da variabilidade genética e a partir disso obter novas cultivares de interesse econômico aos produtores, e adaptadas aos locais produtivos, resistentes a doenças e pragas (FREIRE et al., 2007).

2.4 DIVERGÊNCIA GENÉTICA

Estudos sobre a divergência genética permitem a caracterização dos acessos (COSTA, 2010), e ser usado para identificar linhagens puras ou cultivares com respeito a proteção varietal e manutenção de germoplasma, removendo duplicatas que podem estar presentes no banco (GUPTA; GOPALAKRISHNA, 2009).

Estimar a variabilidade entre genótipos permite obter informações a respeito do germoplasma, aumenta a eficiência da amostragem de genótipos, auxilia na definição de cruzamentos artificiais e a incorporação de genes de germoplasma exótico. Também auxilia na indicação de cultivares para determinadas regiões, quando se objetiva aumentar a base genética (MOHAMMADI; PRASANNA, 2003).

É possível avaliar a diversidade entre e dentro de populações, fornecendo informações para identificar indivíduos divergentes, auxiliando o melhorista na seleção de combinações mais promissoras e favoráveis para cruzamentos (FALEIRO et al., 2011), visam identificar genitores para formação de populações com variabilidade genética, e consequente ganho genético em ciclos sucessivos de seleção (PASSOS et al., 2007).

Na identificação dos parentais divergentes, é aconselhado selecionar dentro dos grupos, os parentais com maiores médias em relação aos caracteres que se deseja melhorar, objetivando a máxima concentração de alelos favoráveis conforme o intuito da seleção (PASSOS et al., 2007). Entretanto, selecionar genótipos superiores não é uma tarefa fácil, uma vez que as características de importância, principalmente de herança quantitativa, são altamente influenciadas pelo ambiente e inter-relacionadas (SOUSA et al., 2018).

Para um programa de melhoramento que visa melhorar e obter novas variedades, a diversidade genética é um pré-requisito, e para tanto, quando explorada de maneira racional, a partir de uma coleção de germoplasma, é necessário a correta caracterização, a qual pode ser realizada por parâmetros morfológicos e agrônômicos (CARVALHO et al., 2016).

Segundo Coelho et al. (2007), a eficiência da conservação e o aproveitamento da variabilidade disponível aumentam quando o material é devidamente caracterizado. Toda essa variabilidade genética só é acessível e utilizável quando se faz uma avaliação correta do material, sendo a descrição

das introduções ou acessos fundamentais para a manutenção e exploração do potencial das coleções. A descrição dos acessos é comumente realizada com base nas características morfológicas e agronômicas das plantas, assim como o uso de técnicas moleculares para o estudo da variabilidade (KARP et al., 1997).

A partir da década de 80, técnicas de genética molecular passaram a ser empregadas, permitindo que estudos de identificação, caracterização e mapeamento genético passassem a ser realizados com mais segurança, rapidez e eficiência, e possibilitou avaliar a variabilidade genética entre acessos (XAVIER et al., 2005).

Contudo, estudos sobre a diversidade genética têm sido realizados objetivando identificar grupos de cultivares com maior similaridade. Rodrigues et al. (2002) ao quantificarem a divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão, utilizando 40 descritores morfológicos, conforme a relação de descritores estabelecida no Decreto no 2366/97 (Brasil, 1997) juntamente com outras variáveis, constataram que o uso destas técnicas, possibilitam reunir as cultivares estudadas em grupos distintos de similaridade genética.

Ainda assim, em avaliações de banco de germoplasma, coeficientes de similaridade permitem identificar a presença de duplicatas, que podem ser descartadas para redução do custo e da mão de obra necessária para conservá-las (CRUZ et al., 2014).

As medidas de dissimilaridade permitem quantificar e informar ao melhorista o grau de semelhança ou de diferença entre dois genótipos, no entanto, o número de estimativas obtidas é relativamente grande, o que impossibilita o reconhecimento de grupos homogêneos através de um exame visual. Para este reconhecimento, é fundamental utilização de métodos de agrupamento ou de projeções de distâncias em gráficos bidimensionais, em que cada coordenada é obtida a partir da medida de dissimilaridade escolhida (CRUZ et al., 2014).

Souza et al. (2018) avaliaram a variação genotípica para tolerância à seca entre genótipos de milho, e também buscaram identificar híbridos com elevada produtividade de grãos em condições de déficit hídrico e

irrigação plena. Utilizando a análise multivariada, foi possível identificar a diversidade genética útil para tolerância à seca.

2.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA

Caracterizar um material consiste em anotar seus caracteres botânicos de alta herdabilidade, que são visíveis ou mensuráveis e que se expressam em diversos ambientes (VALLS, 1988). Considera-se aspectos morfológicos e fenológicos para este processo, utilizando descritores, que são bem definidos para fins de reprodução, e que levem em consideração seus diferentes usos, assim como a diversidade genética (COSTA, 2010).

O descritor é “a característica morfológica, fisiológica, bioquímica ou molecular que seja herdada geneticamente, utilizada na identificação da cultivar”, conforme instituído pela Lei de Produção de Cultivares de nº 9.456, sancionada em 25 de abril de 1997.

Para uma correta caracterização morfológica juntamente com as avaliações a campo, deve ser seguido uma lista mínima de descritores pré-estabelecidos e considerados preliminares como: nome comum, código de registro no Banco Ativo de Germoplasma, emergência, floração inicial, floração média, cor da flor, forma do folíolo central, distribuição das vagens na copa da planta, hábito de crescimento, porte da planta, ciclo e cor da semente (ARAÚJO et al., 1984).

Até o presente momento não há descritores exigidos pelo MAPA para a cultura do feijão-azuki (BRASIL, 2018), no entanto, para a espécie *Vigna unguiculata*, a qual pertence ao mesmo gênero está padronizado os seguintes descritores conforme o MAPA (2003):

- A) Descritores: Antocianina no hipocótilo (ausente, presente); Cor da flor (branca, roxa, outra); Uniformidade da cor da flor (uniforme, desuniforme); Cor da folha no início do florescimento (verde claro, verde, verde escuro); Comprimento e largura do folíolo central da ramificação principal no início do florescimento; Hábito de crescimento (determinado ou indeterminado) Porte da planta no início do florescimento (ereto, semi-ereto ou prostrado); Cor do

hipocótilo (verde, roxa, outra); Cor do tegumento (preto, vermelho, bege, mosqueado, outra); Cor do hilo; Forma da semente; Brilho da semente.

- B) Características Agronômicas: Ciclo (número de dias da emergência ao início do florescimento); Ciclo (número médio de dias da emergência à maturação no ponto de colheita da primeira florada); População de plantas estabelecida por área no início da emissão das ramificações; Peso de mil sementes; Matéria verde, matéria seca (forrageiro) ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{ano}$); Capacidade de rebrota se forrageiro (alta, média e baixa); Utilização se forrageiro (corte, pastejo, adubação verde).

Além destes, também deve-se observar se há reação a pragas, identificando a reação da cultivar à insetos e patógenos, avaliando a ocorrência e o grau de incidência a campo. Deve-se avaliar a reação a adversidades, a produtividade e a qualidade, entre outras informações adicionais que possam ser pertinentes (MAPA, 2003).

Entretanto, caracterizar morfológicamente pode apresentar algumas limitações, como influências ambientais e a difícil medição dos caracteres avaliados (KARP et al., 2007). Devido a estas limitações, técnicas bioquímicas como isoenzimas, eletroforese de proteínas e marcadores moleculares começaram a ser utilizados, porém sem substituir a caracterização morfológica, sendo essas técnicas consideradas complementares.

2.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Estudos de identificação, caracterização e mapeamento genético de materiais anteriormente eram realizados apenas segundo seus caracteres morfoagronômicos, no entanto com a evolução da genética, passou-se a utilizar técnicas de genética molecular, o que representou uma maior segurança, rapidez e eficiência além de possibilitar avaliar a variabilidade genética entre os acessos (XAVIER et al., 2005; LU et al., 2009).

Os descritores morfológicos são comumente utilizados para o registro e lançamento de novas variedades. Porém, para uma maior confiança

dos resultados, os descritores de DNA, baseados no genótipo do indivíduo, tem se popularizado, devido ao seu potencial de distinção entre genótipos morfologicamente similares e geneticamente aparentados (MILLACH, 1998).

Cada genótipo possui uma sequência de nucleotídeos que compõe seu DNA. A detecção de diferenças entre essas sequências revela um padrão único, ou seja, uma impressão digital genética (*genetic fingerprinting*) que pode ser utilizada na identificação de indivíduos e também para testes de paternidade. Essas impressões digitais podem ser detectadas através de marcadores moleculares, medindo a distância genética entre os genótipos em estudo (LANZA et al., 2000).

Com o desenvolvimento de marcadores de DNA é possível determinar a variabilidade genética dentro e entre espécies de um mesmo gênero, determinação da conservação e ordem de genes em espécies de gêneros diferentes e em estudos genômicos mais elaborados, como a identificação de genes específicos (BRONDANI et al., 2003).

O uso de marcadores moleculares permite acessar a variabilidade existente entre indivíduos. Existem duas classes de marcadores moleculares, os baseados em hibridação como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e minissatélites; e os que são baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction), que inclui RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); Microssatélites –SSR (Simple Sequence Repeats); AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism); ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) e os marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) (MENDES, 2014).

A técnica baseada em PCR para análises de DNA, Amplified Fragments Length Polymorphism (AFLP) traduzido para o português “Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados”, mostra-se um confiável marcador molecular genético. A técnica permite diferenciar significativamente níveis de polimorfismo de DNA por meio de rastreamento rápido de muitos loci genéticos independentes em um único ensaio (VOS, et al., 1995).

Seu manuseio permite estudos genéticos detalhados em um grande número de genótipos com menor esforço em comparação com outras técnicas. O AFLP alia a especificidade dos sítios de restrição do RFLP à

praticidade da amplificação do PCR, apresentando-se como poderosa ferramenta na caracterização de genomas e no mapeamento genético (VOS et al., 1995). O nível de variação detectado pelo AFLP depende do número de pares de primers e da distância genética entre as variedades analisadas (CHEN et al., 2011).

A técnica baseia-se na digestão simultânea do DNA genômico com duas enzimas de restrição. São utilizados adaptadores específicos, com terminais complementares às extremidades coesivas dos sítios de restrição, que são ligados aos fragmentos de DNA digeridos. Dois adaptadores específicos são usados em cada sítio de restrição. Os fragmentos digeridos e com os adaptadores ligados a eles são submetidos a uma reação de PCR com primers pré-seletivos, cuja sequência é complementar à dos adaptadores, acrescidos de um nucleotídeo arbitrário na sua extremidade 3'. É realizada uma amplificação pré-seletiva visando o aumento da proporção dos fragmentos de interesse e uma seleção inicial destes. Os fragmentos pré-amplificados são submetidos às reações de amplificação seletiva, utilizando primers com a mesma sequência dos primers pré-seletivos acrescida de dois nucleotídeos arbitrários na extremidade 3'. Com o gel de sequenciamento é feita a detecção dos fragmentos polimórficos, utilizando um dos primers seletivos marcados com radioatividade ou com fluorescência (VOS et al., 1995; LANZA et al., 2000).

A técnica AFLP permitiu detectar polimorfismo genético equivalente e maior divergência entre espécies de *Elaeis oleífera* e *E. guineenses*, sendo esta uma técnica capaz de fornecer um modo rápido e eficaz de caracterizar uma coleção de acessos genéticos (BARCELOS et al., 2002).

Chen et al. (2011) utilizaram a técnica AFLP para avaliar a extensão da diversidade entre os NaN_3^- mutantes induzidos e variedades comerciais de *Phaseolus vulgaris* introduzidas da China. Todos os pares de primers AFLP produziram fragmentos de DNA bem definidos e polimorfismo entre os 46 acessos de feijoeiro. Dessas 46 amostras de DNA de feijoeiro amplificadas com reação em cadeia da polimerase (PCR) com 8 pares de primers pré-selecionados, foram obtidos 516 fragmentos, dos quais 448 foram

polimórficos. Os autores afirmam, que o maior número de fragmentos polimórficos confirma a eficiência de detecção do polimorfismo da AFLP.

3 ARTIGO A: CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO AZUKI.

3.1 RESUMO

O feijão azuki (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi e Ohashi, tem se popularizado no Brasil devido a popularização da cultura asiática e devido as propriedades nutricionais e nutracêuticas que apresenta. Atualmente há apenas uma cultivar registrada no país, sendo comum a utilização de materiais crioulos e locais. O objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética de acessos de feijão azuki pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Londrina. Trinta e dois acessos foram avaliados com base em suas características morfológicas, e 38 molecularmente. Para avaliação das características morfo-agronômicas foi realizado a semeadura em blocos ao acaso, quatro repetições, com 28 acessos, oriundos de material crioulo da região e quatro materiais também pertencentes ao gênero *Vigna*. Os acessos foram caracterizados conforme descritores morfoagronômicos e molecularmente por meio do método AFLP. Para a AFLP, os acessos foram cultivados até o desenvolvimento do primeiro trifólio, o qual foi coletado e submetido à análise. A dissimilaridade genética foi estimada por meio da distância generalizada de Mahalanobis e agrupadas pelo método de UPGMA. Os dados qualitativos e quantitativos agruparam os genótipos em cinco grupos, com distâncias de 0,4 e 75 respectivamente. Os principais caracteres responsáveis pelo agrupamento dos AZP em único grupo foram: porte e hábito de crescimento, coloração da flor, da vagem no ponto de colheita e das sementes. A variável NVAG não apresentou diferenças significativas, indicando baixa relevância para diferenciação dos materiais. As características TVAG, P100 e COMPF foram as que mais contribuíram para quantificação da divergência. Apenas 38% dos fragmentos gerados pela AFLP apresentaram polimorfismo. Segundo a análise molecular o genótipo Caupi apresentou menor dissimilaridade aos genótipos AZP. Os genótipos AZP não são divergentes entre si.

Palavras-chave: *Vigna*, *Vigna angularis*, melhoramento genético, AFLP.

3.2 ABSTRACT

Morphagronomic and Molecular characterization of Azuki bean genotypes

The azuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi), is of great food and cultural importance in Asian countries, while in Brazil, its consumption has been increasing due to the popularization of Asian culture, nutritional and nutraceutical properties. Currently, there is only one cultivar registered in the country, therefore, it is common the use of landraces and local materials. The objective of this work was to estimate the genetic diversity of Azuki bean accesses belonging to the Germplasm Bank of the State University of Londrina. Thirty-two accessions were morphologically evaluated, and 38 accession were evaluated based on their molecular characteristics. For the evaluation of the morpho-agronomic characteristics, field sowing was performed in randomized blocks with four replications, containing 28 accesses, originating from landraces materials from the region and four materials also belonging to the genus *Vigna*. The accessions were characterized according to agro-morphological descriptors and molecularly through the AFLP method. For molecular characterization, the accessions were cultivated in a greenhouse until the development of the first trefoil, which was collected and submitted to the analysis. From the obtained results, the genetic dissimilarity was estimated through the generalized distance of Mahalanobis and grouped by the UPGMA method for both analyzes. Qualitative and quantitative data grouped the genotypes into five groups, with distances of 0.4 and 75, respectively. The main traits responsible for grouping AZP in a single group: size and growth habit, flower color, pod color at harvest point and seeds. The NVAG variable showed no significant differences, indicating low relevance for differentiation of materials. The TVAG, P100 and COMPF characteristics contributed the most to quantify the divergence. The AZP genotypes were related in a single group according to morphoagronomic analysis, and grouped with the Caupi genotype through the AFLP, differing from the other groups. The AZP genotypes are not divergent.

Keywords: *Vigna*, *Vigna angularis*, plant breeding.

3.3 INTRODUÇÃO

O feijão azuki (*Vigna angularis*), também conhecido como feijão adzuki, apresenta como centro de origem a China, maior produtor e consumidor mundial do grão (CHEN et al., 2015). Acredita-se que foi domesticado a partir das espécies selvagens, *V. angularis* var. *nipponensis*. Seu local de domesticação não é definido com precisão, porém acredita-se que tenha ocorrido na China, Japão e Coréia, países poderia retirar consumidores da leguminosa onde são cultivadas amplamente (LESTARI et al., 2014).

Atualmente é encontrado em mais de 30 países, e seu consumo faz parte da dieta de aproximadamente um bilhão de pessoas (YANG et al., 2015). Seu alto valor nutricional o torna atrativo ao consumo humano, muito utilizado na produção de sobremesas. Nas colônias asiáticas, principalmente nas japonesas, onde é mais popular, este é utilizado para o preparo de doces (CHEN et al., 2015; LESTARI et al., 2014; VIEIRA, 2002).

Além da importância alimentícia, por ser fonte de carboidrato, gorduras e proteínas (SATO et al., 2008), diversas pesquisas evidenciam os benefícios do consumo do extrato e de suas sementes, devido as propriedades antioxidantes e anti-inflamatória que possuem, além da presença de compostos fenólicos e flavonoides (LIN; LAY, 2006).

Em busca do aperfeiçoamento dos materiais, variedades locais evoluíram ao longo do tempo através da interação entre o homem, a agricultura e o meio ambiente, selecionando-as para atender as necessidades humanas (CARVALHO et al., 2016). Com a evolução das cultivares, as características presentes nas plantas consideradas selvagens inicialmente, são perdidas. Dessa forma, quando se procura variabilidade genética e resgate de caracteres considerados importantes para uma cultivar, os materiais crioulos são fundamentais. Neste sentido, buscar cultivares superiores requer explorar a variabilidade genética nos cruzamentos de grupos geneticamente divergentes, possibilitando uma estratégia na obtenção de ganhos de seleção (CRUZ et al., 2014).

Para os programas de melhoramento genético de plantas que visam melhorar e obter novas variedades, além da variabilidade genética entre materiais, é fundamental que estes sejam corretamente caracterizados e

identificados dentro de uma coleção de germoplasma, podendo ser realizada por parâmetros morfológicos e agronômicos (CARVALHO et al., 2016). Além da caracterização morfoagronômica, resultados obtidos a partir do uso de marcadores moleculares permitem acessar a variabilidade existente entre indivíduos, como a técnica AFLP obtida através de PCR (MENDES, 2014).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar e avaliar morfoagronomicamente e molecularmente genótipos de feijão azuki, e a possibilidade de selecionar linhagens para futuro desenvolvimento de uma cultivar.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual de Londrina (UEL). A área experimental pertence ao Departamento de Agronomia da UEL, localizada a 23°23' S e 51°11' W e altitude média de 566 m, na qual o solo é classificado como Nitossolo Vermelho Eutroférico latossólico (EMBRAPA, 2006). Foi realizada análise de solo do local e as correções e adubações necessárias conforme as recomendações para a cultura.

Inicialmente a coleção de feijão azuki crioulo pertencente ao banco de germoplasma da UEL foi cultivada a campo na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina para uma prévia avaliação e identificação de genótipos mais promissores. A semeadura deste material crioulo foi realizada adotando espaçamento de 0,40 m entre linhas e 0,12 m entre plantas. Os genótipos foram colhidos individualmente e avaliados quanto à altura de planta, número de ramos, diâmetro do caule, número de vagens, tamanho das vagens e peso de 100 sementes de cada planta.

Vinte e oito acessos considerados mais vigorosos e produtivos foram selecionados para o estudo de variabilidade genética. Estes genótipos, juntamente com a cultivar de feijão azuki Coimbra, seis materiais de azuki e mais duas espécies do gênero *Vigna* (feijão-caupi e feijão mungo-verde) também pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Estadual de Londrina, foram cultivados para obtenção de progênies e demais estudos.

Os genótipos AZP1 à AZP28 correspondem às progênes do material crioulo azuki pré-selecionadas e os genótipos AZ1 à AZ7 às progênes de linhagens de feijão azuki cultivadas na região (Tabela 1). Para caracterização e estudo de diversidade genética, também foram avaliados um acesso de feijão-caupi (CP1) e um de feijão mungo-verde (MV1), ambos pertencentes ao gênero *Vigna*. A cultivar de feijão azuki, Coimbra (C), utilizada como testemunha.

As sementes dos materiais cultivados foram caracterizadas quando a cor e o formato das sementes (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 – Caracterização dos acessos segundo a “Cor” e “Formato” das sementes dos genótipos *Vigna* avaliados.

Nome	Cor	Formato
CP1	Creme	Oblongo
MV1	Verde	Oval
AZ1	Vermelho	Oval
AZ2	Mistura de verde	Oblongo
AZ3	Vermelho	Oblongo
AZ5	Verde	Oblongo
AZ6	Vermelho	Oblongo
AZ7	Verde	Oblongo
Coimbra	Vermelho	Oval
AZP1 a AZP30	Vermelho claro	Oblongo

Fonte: O próprio autor.

Figura 1 - Sementes dos acessos de CP1 (a), MV1 (b), AZ1 (c), AZ2 (d), AZ3 (e), AZ5 (f), AZ6 (g), AZ7 (h), Coimbra (i) e AZP (j).



Fonte: O próprio autor.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições contendo 32 genótipos sendo eles AZP1 a AZP30, AZ1, C, MV1 e CP1. A parcela experimental, constituída de uma linha de 2 metros, em um espaçamento de 0,25 m entre plantas e 0,80 m entre linhas, totalizando 8 plantas de cada tratamento por parcela. Para a bordadura foi utilizado um material crioulo de feijão azuki.

A irrigação, tratos culturais como capina, aplicação de fitossanitários foram realizadas conforme necessidade e demanda da cultura.

3.4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DOS GENÓTIPOS

As avaliações das variáveis qualitativas e quantitativas (Tabela 2 e 3) foram feitas conforme descritores utilizados para a cultura do feijão-caupi (COSTA, 2010).

Tabela 2 – Caracteres qualitativos avaliados para os 32 genótipos de *Vigna*.

Código	Avaliação	Método
TRI	1º Trifólio expandido	Número de dias para a expansão do primeiro trifólio
FLO	Floração	Número de dias da semente à 50 % da floração
PP	Porte da planta	Ereto, semi-prostrado ou trepador
HC	Hábito de crescimento	Determinado ou Indeterminado
CF	Cor da folha	Verde claro, verde, verde escuro
TF	Textura da folha	Coriácea, intermédia, membranosa
PILOF	Pilosidade da folha	Níveis: baixo, médio, alto
PC	Pilosidade no caule	Níveis: baixo, médio, alto
CFLOR	Cor da flor	Branca, amarela ou roxa
CVI	Cor da vagem imatura	Verde claro, verde, verde escuro
CVM	Cor da Vagem madura	Verde claro, verde, verde escuro
CORS	Cor da semente	Coloração do tegumento
FORMS	Forma da semente	Caracterização morfológica
CICLO	Ciclo da cultura	Dias entre semente e colheita

Fonte: O próprio autor.

Tabela 3 - Caracteres quantitativos avaliados para os 32 genótipos de *Vigna*.

Código	Avaliação	Método
--------	-----------	--------

ALT	Altura	Centímetros (cm)
CFC	Comprimento do folíolo central	Centímetros (cm)
LF	Largura da folha	Centímetros (cm)
NVP	Número de vagens por planta	-
TVAG	Comprimento da vagem	Centímetros (cm)
NSV	Número de sementes por vagem	-
NSP	Número de sementes por planta	-
P100	Peso de 100 sementes	Gramas (g)
PROD	Produção	Gramas planta ⁻¹

Fonte: O próprio autor.

3.4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Para avaliação molecular, o total de 38 acessos de feijão pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Estadual de Londrina (UEL) foram cultivados em casa de vegetação. A segunda folha trifoliolada de cada acesso foi coletada, acondicionadas em sílica, e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina para análise molecular.

A extração de DNA foi realizada conforme o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998). Para o rompimento das paredes e membranas celulares, os tecidos foliares passaram por maceração utilizando o aparelho Retsch MM400 Mixer Mill em tubos de 2 mL e em seguida, adicionados 1000µl de tampão de extração CTAB 2% com 2% de β mercaptoetanol em cada amostra.

As amostras permaneceram incubadas a 65°C durante 30 minutos sob agitação, em seguida resfriadas a temperatura ambiente e acrescidas de 600µl de clorofórmio:álcool isoamilico (24:1). Após agitação por inversão durante 5 minutos, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi isolado em tubos de 1,5 mL, sobre o qual adicionou-se 400µl de isopropanol gelado. Após incubação a -20°C por 20 minutos, as amostras passaram por centrifugação durante 5 minutos a 10000 rpm. Lavou-se o precipitado com álcool 70% duas vezes, e uma vez com álcool 100%, e colocado para secar em temperatura ambiente. Em seguida o DNA precipitado foi ressuspendido em 50µl de TE 1% e tratados com 3 µl de RNase 110 ng/µl e incubados por 40 minutos a 37°C e após deixados *over night* a temperatura de 5 °C. Posteriormente foram armazenados a -80°C até o uso.

Para verificar a qualidade e quantidade do DNA total, realizou-se eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

As análises de AFLP transcorreram conforme metodologia descrita por Vos et al. (1995). A restrição do DNA e a ligação ao adaptador foram realizadas simultaneamente. Aproximadamente 700 ng de DNA digeridos com 5 U EcoRI e 1 U MseI a 37 ° C por 4 horas, seguido por ligação de adaptador usando 2 U T4 DNA ligase a 22 ° C por 1 hora e incubação a 70 ° C por 10 min para inativação térmica das enzimas de restrição. A amplificação pré-seletiva, realizada utilizando os conjuntos de primers EcoRI + A e MseI + C, em um volume final de 10 µL, contendo 3,5 µL 3 × padrão diluído. Executou-se a PCR a 72 ° C durante 2 minutos, seguido por 20 ciclos de 94 ° C durante 1 segundo, 56 ° C em 30 segundos e 72 ° C em 2 minutos e extensão final a 60 ° C em 30 minutos. Testou-se oito pares de primers seletivos e os quatro pares mais polimórficos e reproduzíveis selecionados para amplificação seletiva (NED-*Eco*+ACA/*Mse*+CAC; PET-*Eco*+AGC/*Mse*+CTGA; VIC-*Eco*+ACT/*Mse*+CTT; FAN-*Eco*+AAG/*Mse*+CTC). A reação seletiva foi realizada usando 2,5 µL 6 × do padrão diluído em um volume final de 10 mL. A amplificação sucedeu-se com um ciclo inicial de 94 ° C por 2 minutos, seguido de 65 ° C por 30 segundos, 72° C por 2 minutos, oito ciclos de 94 ° C por 1 segundo, 64 ° C por 30 segundos (com um decréscimo de 1 ° C por ciclo) e 72 ° C durante 2 minutos, 23 ciclos de 94 ° C em 1 segundo, 56 ° C em 30 segundos, 72 ° C em 2 min e extensão final a 60 ° C durante 30 minutos.

3.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quanto a análise estatística, para os dados quantitativos foi realizada as análises de homogeneidade de variâncias (Bartley) e normalidade (Shapiro-Wilk). As características CFC, COMPV, NSV, P100 e PROD foram transformadas segundo critério de Box e Cox (1964), os respectivos lambdas foram: 2,0327; 2,3317; 1,4547; 1,4677 e 0,8548, para atenderem os pressupostos. Posteriormente, procedeu-se com a análise de variância para verificar a variabilidade genética existente entre os genótipos. As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. A dissimilaridade

foi estimada com base na distância generalizada (D^2) de Mahalanobis e a contribuição relativa dos caracteres para a divergência foi estimada pelo método de Singh (1981).

Para os caracteres qualitativos empregou-se a análise descritiva dos dados e a dissimilaridade foi estimada com base no coeficiente c para dados multicategóricos, segundo a expressão: $1 - c$. Os agrupamentos para as matrizes qualitativas e quantitativas foi com base no método hierárquico Unweighted Pair-Cluster Method Using Arithmetic Average (UPGMA). Complementarmente, para as características quantitativas empregou-se a técnica de variáveis canônicas.

Para as análises AFLP, os dados foram interpretados de acordo com a ausência ou presença de bandas, gerando uma matriz binária. O coeficiente de similaridade de Jaccard foi usado para estimar as distâncias genéticas entre os acessos de feijão. A representação simplificada das distâncias genéticas entre os acessos obtida utilizando o método hierárquico de UPGMA. Os dados brutos de AFLP foram pontuados para cada combinação de iniciadores utilizando o software GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems) considerando fragmentos de 75-500 pb para gerar a matriz binária utilizada para a estimativa de parâmetros gênicos de população. Para a identificação do número (K) de clusters de indivíduos geneticamente semelhantes, utilizou-se o software Structure v. 2.3.3, com um modelo de mistura, comprimento de queima de 25.000 e 250.000 repetições de MCMC (Cadeia de Markov Monte Carlo) e 10 repetições por K , com K variando de 1 a 4. O número de clusters foi definido igual a 2 usando o website Structure Harvester.

Para o teste de agrupamento de médias e o cálculo da importância relativa das características foram realizados com o auxílio do programa Genes. O programa R foi utilizado para as análises de distância genética, agrupamentos hierárquicos e correlação cofenética (CCC).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA –VARIÁVEIS QUALITATIVAS

As variáveis qualitativas foram avaliadas e classificadas como: Porte: ereto ou semiprostrado; Hábito de crescimento: determinado ou indeterminado; Cor da folha: verde escuro ou verde intermediário; Textura da folha: coriácea ou intermediária; Pilosidade da folha e pilosidade do caule: ausente, baixa, média ou alta; Formato da folha: oblonga ou deltoide; Cor da flor: violeta, amarela ou branca; Cor da vagem imatura: verde claro, verde intermédio ou verde escuro; Cor da vagem madura: palha rajado, palha ou preto; Cor da semente: vermelho claro, vermelho, esverdeada ou branca; Formato da semente: oblonga ou oval; Dias para emergência; Dias para expansão do primeiro trifólio; Dias para florescimento; Ciclo da planta (dias entre semeadura e colheita final).

Tabela 4 - Variáveis qualitativas dos 32 genótipos do gênero *Vigna*.

GEN ¹	Porte	Hab. cresc	Cor folha	Text. folha	Pilos. da folha	Pilos. do caule	Formato da folha	Cor da flor	Cor vag imatura	Cor vag madura	Cor semente	Formato semente	E	1T	F	Ciclo
AZP1	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	15	45	80-94
AZP2	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	15	45	80-94
AZP3	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	17	45	80-94
AZP4	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	17	45	80-94
AZP5	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP6	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP7	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP8	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	17	45	80-94
AZP9	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP10	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP11	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP12	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP13	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	17	45	80-94
AZP14	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	15	45	80-94
AZP15	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	15	45	80-94
AZP16	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP17	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	17	45	80-94
AZP18	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP19	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	17	45	80-94
AZP20	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	17	45	80-94
AZP21	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP22	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP23	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP26	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	17	45	80-94
AZP27	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP28	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
AZP29	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	17	45	80-94
AZP30	Semi	Indet.	VE	COR	Baixa	Baixa	Oblonga	Violeta	VC	P. Rajado	V. claro	Oblongo	9	19	45	80-94
MV1	Ereto	Det.	VE	INT	Alta	Alta	Deltóide	Amarela	VC	Preta	Esverdeado	Oval	10	17	45	80

AZ1	Ereto	Det.	VI	INT	Média	Baixa	Deltóide	Amarela	VI	Palha	V. Vinho	Oval	13	17	45	85
C	Ereto	Det.	VE	INT	Média	Média	Oblonga	Amarela	VE	Palha	V. Vinho	Oval	10	17	45	80
CP1	Semi	Indet.	VE	COR	Ausente	Ausente	Deltóide	Branca	VC	Palha	Branco	Oblongo	9	15	45	88

¹GEN: genótipo; Semi: semiprostrado; Háb. Cresc.: hábito de crescimento; Indet: indeterminado; DET: determinado; VE: verde escuro; VI: verde intermédio; COR: coriácea; INT: intermediária; Text.: Textura; VC: verde claro; Cor vag imatura: cor da vagem imatura; Cor vag madura: cor da vagem madura; P. rajado: Palha rajado; V. claro: vermelho claro; E: emergência; 1T: 1º trifólio completamente expandido; F: dias para floração média.

Fonte: O próprio autor.

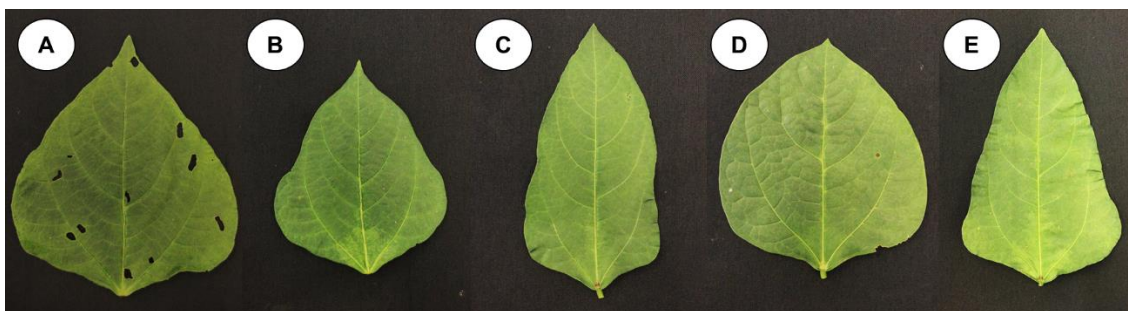
Os genótipos AZ2 a AZ7, apesar de identificados, não se desenvolveram à campo, impossibilitando a caracterização morfoagronômica dos genótipos.

Os genótipos “AZP” (Figura 4) não apresentaram variações nas características qualitativas avaliadas. A emergência do material levou em torno de 9 dias, e entre 15 e 19 dias para expansão completa do primeiro trifólio. De porte semiprostrado, hábito de crescimento indeterminado, com folha formato oblonga (Figura 2) de cor verde claro e textura coriácea, de baixa pilosidade tanto na folha quanto no caule. A floração do material ocorreu aos 45 dias após a semeadura, e as flores apresentaram coloração violeta. Quando imatura, a vagem apresentou coloração verde claro mudando para cor palha rajado (Figura 5) quando seca (maturidade de colheita). Suas sementes de formato oblongo, apresentaram coloração de tegumento vermelho claro. O ciclo do material variou entre 80 e 94 dias da semeadura à colheita.

O CP1 (Feijão-Caupi), também levou 9 dias para a emergência das plântulas, e apresentou porte semiprostrado e hábito de crescimento do tipo indeterminado, com ciclo de 88 dias. Sua folha de formato deltoide e coloração verde escura, não apresentou pilosidade, assim como o caule. As flores (Figura 3) de coloração branca, surgiram após 45 dias da semeadura, que resultaram em vagens de coloração verde clara quando imaturas, e de cor palha quando maduras. A coloração palha das vagens foi uniforme, diferentemente da coloração palha do material AZP, que se apresentou como rajada. As sementes de coloração branca, apresentam formato oblongo.

Os materiais “AZ1” e “C” e “MV1”, apresentaram porte ereto e hábito de crescimento determinado, e também folha de textura intermédia, e flores de coloração amarela, diferindo dos outros materiais principalmente nessas características. Os materiais “AZ1” e “C” apresentaram coloração palha de vagem madura e sementes cor vermelho, enquanto o material MV1, coloração preta e sementes esverdeadas. O material “MV1”, diferente dos demais, possui alta pilosidade nas folhas e caule.

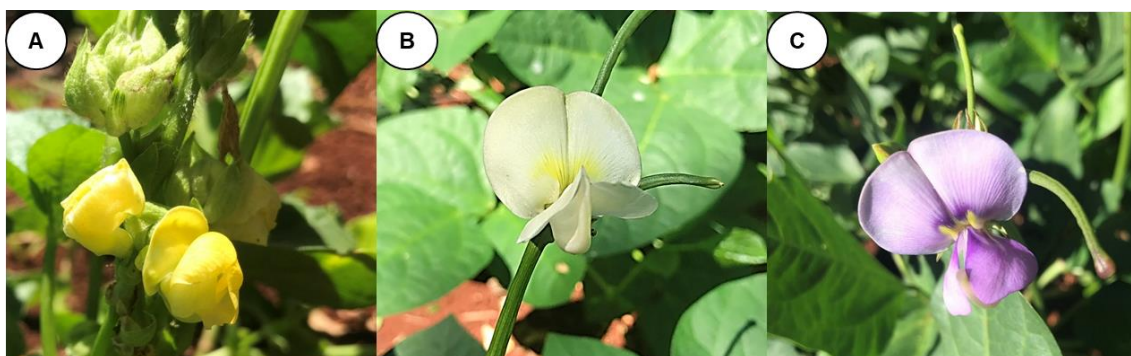
Figura 2 - Folha dos 32 genótipos do gênero *Vigna* avaliados.



Legenda - MV1 (A), AZ1 (B), Coimbra (C), Caupi (D), AZP (E).

Fonte: O próprio autor.

Figura 3 - Flores dos 32 genótipos do gênero *Vigna* avaliados.



Legenda - MV1, AZ1, Coimbra (A); Caupi (B); AZP (C).

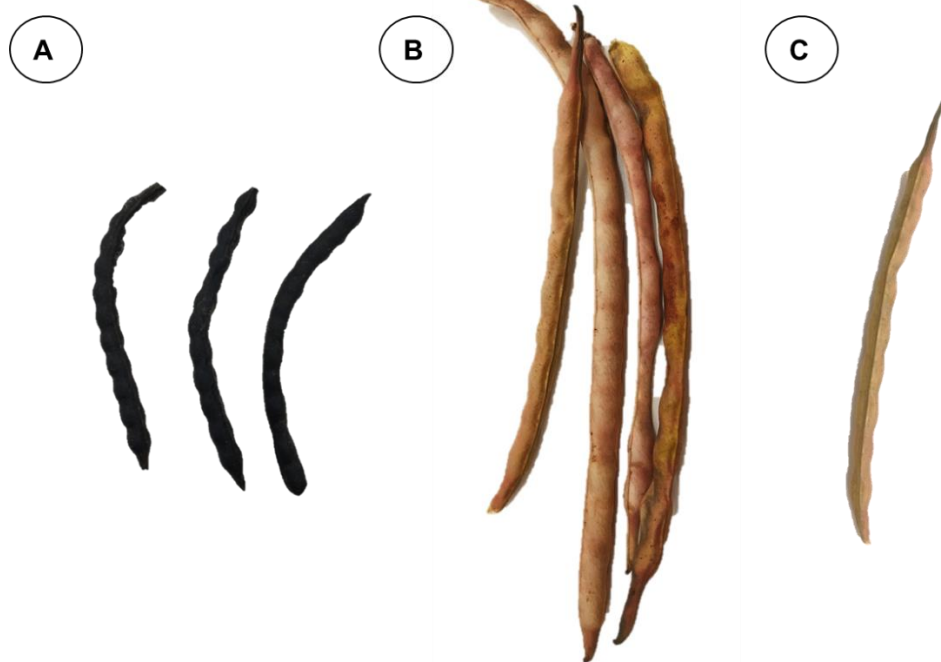
Fonte: O próprio autor.

Figura 4 - Planta inteira representativa do genótipo AZP.



Fonte: O próprio autor.

Figura 5 - Coloração da vagem dos 32 genótipos do gênero *Vigna* avaliados



Legenda 1 – MV1 (A); AZP (B); AZ1, Caupi e Coimbra (C).

Fonte: O próprio autor.

Partindo do pressuposto por Cargnelutti Filho et al. (2008) que mudanças drásticas de nível em dendrograma, indicam união de cultivares heterogêneas, foi estimado o corte. Através do agrupamento UPGMA para características qualitativas, os materiais foram agrupados conforme as distâncias genéticas (Figura 2), com a formação de quatro grupos.

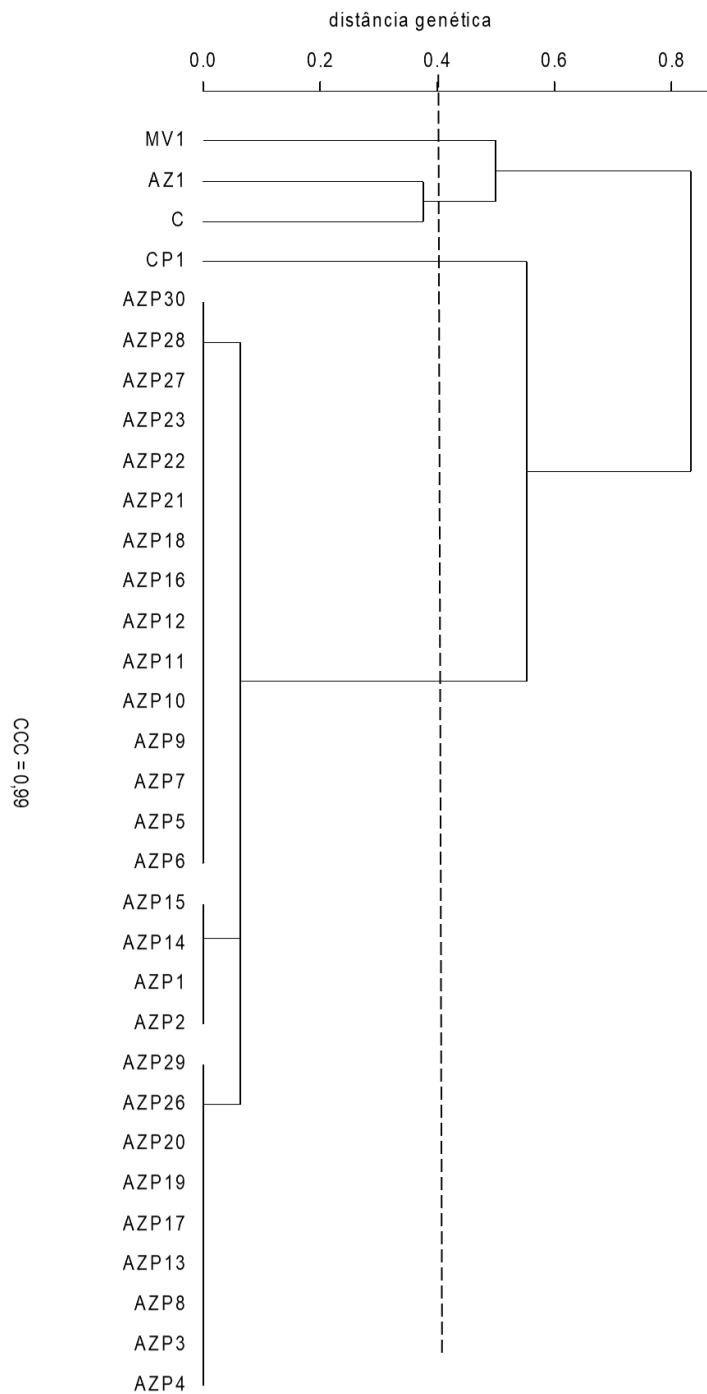
No primeiro grupo, ficou apenas o material MV1 (Feijão-moyashi), o qual foi caracterizado pela presença de pilosidade na folha e no caule, sendo o mais alto nível avaliado, cor da vagem no ponto de colheita preta e sementes esverdeadas. No segundo grupo, os materiais C e AZ1 se uniram.

Apesar dos grupos 1 e 2, apresentarem porte ereto e hábito de crescimento determinado, estes foram diferenciados pela coloração das sementes e a presença de pilosidade na folha e no caule, que se classificaram como média, quando comparadas aos demais.

O terceiro grupo formado pelo genótipo CP1, também por apenas um genótipo, teve como diferencial, a ausência de pilosidade e a coloração da flor e semente, ambas de coloração branca.

O quarto grupo, formado pelos materiais AZP, se diferenciaram dos demais principalmente pelas características cor da flor (violeta), cor da vagem no ponto de colheita (palha rajado) e cor da semente (vermelho claro) (Tabela 4).

Figura 6 - Dendrograma das distâncias genéticas dos caracteres qualitativos dos 32 genótipos de *Vigna*.



Fonte: O próprio autor.

A coloração do tegumento das sementes foi determinante para a formação dos grupos, e é uma característica importante para o feijão azuki, sendo a coloração vermelha a preferida pelos consumidores no Leste da Ásia

(HORIUCHI et al., 2015). A pasta purpúrea vermelha ou roxa escura preparada a partir dos grãos de azuki vermelho quando fervido, é chamada "an" e é um ingrediente importante em doces japoneses e chineses. No Japão, o feijão azuki vermelho é usado para preparar o doce "wagashi" e o prato de feijão cozido com açúcar "amanatto". Alguns doces japoneses são feitos à base de uma pasta amarela de marfim (IVY) preparada a partir de cultivares de adzuki com sementes de IVY. Sendo assim, a coloração da casca é um fator determinante da qualidade e do sabor (HORIUCHI et al., 2015).

Lima et al. (2012) utilizando o método de Tocher, evidenciaram a dissimilaridade genética de genótipos de feijão pela coloração das sementes, agrupando todos os genótipos de tegumento preto em um grupo, sendo esta característica considerada uma das mais importantes dentre os descritores morfológicos utilizados.

Cardona-Ayala et al. (2013), com o objetivo de melhorar o material de feijão-caupi "Crioulo-Córdoba", observaram uma considerável variabilidade genética através dos dias para floração do material, afirmando que a seleção através do número de dias para a floração possibilita a obtenção de genótipos mais precoces e com um melhor rendimento de produtividade. No presente estudo, os dias para a floração não permitiu a diferenciação dos materiais em grupos, já que estes apresentaram um número de dias muito próximo.

Um dos parâmetros observados no agrupamento por Vaz et al. (2017) foi a origem do material avaliado. Os genótipos de feijão-vagem arbustivo de diferentes países de origem tenderam a se agrupar, indicando que germoplasma semelhante é compartilhado entre diferentes países.

Para o estudo da divergência genética, a utilização das distâncias de Mahalanobis (D^2), possibilitou distribuir genótipos de feijão caupi em grupos distintos entre genótipos do tipo prostrado e do semi-prostrado (PASSOS et al., 2007), como observado neste trabalho, em que o material MV1 se diferenciou do segundo grupo, composto por AZ1 e Coimbra apesar de possuírem mesmo hábito de crescimento e porte.

Quando se objetiva identificar genótipos superiores, os parâmetros qualitativos devido à alta herdabilidade, apresentam ganho direto com a seleção pela sua independência ao ambiente (KUMAR; MISRA, 2013).

Entretanto, os parâmetros quantitativos, de suma importância para o melhoramento, são influenciados pelas condições ambientais (CARVALHO et al., 2016).

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA – VARIÁVEIS QUANTITATIVAS

Para os dados quantitativos, a análise de variância (Tabela 5), revelou diferenças significativas para todas as características, exceto para número de vagens por planta ($p < 0,01$).

Tabela 5 - Resumo da análise de variância das características quantitativas avaliadas.

Característica ¹	QMG ²	p-valor	Média	CV ² (%)
ALT	32,758	0,0001	30,402	6,85
COMPF*	1974,6	0,0001	106,74	15,49
LARGF	1,3444	0,0003	7,8727	9,21
NVAG ^{ns}	27,937	0,2831	17,575	27,86
TVAG*	18309	0,0001	230,1	12,36
NSVAG*	24,789	0,0001	15,396	16,86
NSEM	7889,80	0,0001	166,22	23,61
PROD*	75,555	0,0001	15,908	28,13
P100*	262,12	0,0001	32,71	13,15

¹ALT: altura; COMPF: comprimento do folíolo central; NVAG: número de vagens por planta; TVAG: tamanho das vagens; NSVAG: número de sementes por vagem; PROD: produção de sementes por vagem; P100: peso de 100 sementes.

²QMG: quadrado médio do genótipo; Cv: coeficiente de variação ambiental.

*Médias transformadas por Box Cox.

Fonte: O próprio autor.

A característica número de vagens por planta (NVAG), a qual não apresentou diferenças significativas conforme a análise, demonstra não ser uma variável relevante para a diferenciação dos materiais.

As médias foram agrupadas por Scott e Knott (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias das variáveis quantitativas dos 32 genótipos do gênero *Vigna* agrupadas pelo teste de Scott e Knott à 5% de probabilidade

GEN	ALT	COMPF	LARG	TVAG	NSVAG	NSEM	PROD	P100
AZP1	30,5 b	15,17 c	8,25 a	15,14 b	8,91 b	150,73 b	22,41 b	14,85 c
AZP2	31,19 b	15,64 c	8,28 a	16,07 b	9,75 b	241,1 c	31,67 b	14,73 c

AZP3	29,38	15,03 c	8,06 a	15,35 b	9,11 b	175.98 b	24,87 b	14,1 c
AZP4	29,12 b	13,97 c	7,72 a	15,91 b	9,49 b	215.6 c	25,42 b	14,1 c
AZP5	29,13 b	14,78 c	7,86 a	15,15 b	9,08 b	196.15 c	28,27 b	14,47 c
AZP6	29,4a b	14,55 c	7,77 a	15,66 b	9,47 b	198.73 c	29,4 b	14,8 c
AZP7	30,06 b	15,23 c	8,03 a	15,96 b	9,55 b	202.8 c	28,97 b	14,22 c
AZP8	29,5 b	14,69 c	7,82 a	15,2 b	8,4 b	176.7 b	27,11 b	15,3 c
AZP9	29,5 b	14,16 c	7,54 a	15,91 b	8,93 b	148.45 b	22,03 b	14,81 c
AZP10	27,19 a	12,7 b	7,4 a	14,4 b	9,15 b	177.18 b	22,74 b	12,86 c
AZP11	28,37 a	14,36 c	7,88 a	15,5 b	9,2 b	166.5 b	26,05 b	15,52 c
AZP12	30,0 b	14,61 c	7,66 a	15,36 b	8,64 b	166.28 b	24,46 b	14,52 c
AZP13	29,5 b	13,68 c	7,15 a	15,07 b	8,73 b	144.03 b	20,86 b	14,3 c
AZP14	30,31 b	14,57 c	7,61 a	15,11 b	8,86 b	203.5 c	24,38 b	15,84 c
AZP15	30,75 b	15,27 c	8,31 a	15,36 b	8,86 b	160.75 b	23,96 b	14,81 c
AZP16	31,25 b	14,83 c	7,91 a	15,52 b	9,05 b	203.63 c	29,5 b	14,63 c
AZP17	31,31 b	14,86 c	7,78	15,52 b	8,84 b	148.2 b	20,67 b	13,81 c
AZP18	29,5 b	14,68 c	7,87 a	15,73 b	9,18 b	179.23 b	26,22 b	13,15 c
AZP19	33,94 b	14,71 c	7,46 a	16,19 b	9,05 b	176.53 b	25,03 b	14,44 c
AZP20	30,13 b	14,85 c	7,92 a	15,34 b	8,72 b	171.53 b	24,18 b	14,15 c
AZP21	28,19 a	14,56 c	8,08 a	15,22 b	8,31 b	149.88 b	22,24 b	14.69 c
AZP22	29,94 b	14,26 c	7,79 a	14,55 b	8,06 b	143.6 b	22,25 b	15,59 c
AZP23	32,56 b	15,76 c	8,48 a	15,06 b	8,95 b	161.53 b	23,03 b	14,33 c
AZP26	31,56 b	14,51 c	7,74 a	16,38 b	8,71 b	165.45 b	25,04 b	15,36 c
AZP27	29,87 b	13,94 c	7,43 a	14,84 b	8,83 b	200.85 c	24,92 b	14,5 c
AZP28	30,68 b	13,48 c	7,74 a	15,34 b	9,36 b	206 c	25,6 b	14,19 c
AZP29	29,81 b	14,29 c	7,67 a	16,13 b	9,76 b	170.98 b	24,5 b	14,21 c
AZP30	29,63 b	14,38 c	8,11 a	15,47 b	9,12 b	191.95 c	29,62 b	14,99 c
MV1	39,13 c	9,93 a	9,78 b	7,37 a	7,57 b	148.38 b	10,62 a	5,15 a
AZ1	25,75 a	9.28 a	7,31 a	7,07 a	7,54 b	30.25 a	3,12 a	10,32 b
C	26 a	9,21 a	6,37 a	9,59 a	5,69 a	25,13 a	3,54 a	6,38 a
CP1	39,68 c	12,23 b	9,18 b	8,12 a	5,18 a	121.47 b	24,93 b	20,14 d

¹Médias seguidas pelas mesmas letras e na mesma coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott e Knott ao nível de 5% de probabilidade. GEN: genótipo; COMPF: comprimento do folíolo central; LARG: largura da folha; TVAG: tamanho da vagem; NSVAG: número de sementes por vagem; PROD: produção de sementes por planta; P100: peso de 100 sementes.

Fonte: O próprio autor.

A variável altura foi diferenciada em três grupos. Os grupos apresentaram médias de 27,1, 30,34 e 39,41 cm, sendo o último valor

correspondente aos materiais CP1 e MV1, os quais apresentaram maior altura de plantas. As médias do comprimento do folíolo central foram maiores para a maioria dos genótipos AZP (14,55 mm), seguida dos materiais AZP10 e CP1 com 12,23 mm e AZ1 e MV1 de 9,47mm, enquanto a largura da folha diferenciou as médias em dois grupos, com MV1 e CP1 1,71 milímetros menor que os outros genótipos.

Para a variável tamanho de vagens, os genótipos AZP apresentaram média superiores aos outros materiais (15,44 cm), com aproximadamente o dobro do tamanho dos demais materiais (7,52 cm). Já o número de sementes por vagem dos genótipos C e CP1 foram menores que os demais genótipos estudados. O número de sementes por planta possibilitou o agrupamento em 3 grupos com genótipos mais variados. Os genótipos AZ1 e C apresentaram média de 30,25 sementes por planta, no segundo grupo os genótipos AZP e MV1 e CP1 se agruparam (média de 160,17 sementes), e alguns genótipos de AZP se diferenciaram com média de 206 sementes.

A produção de sementes (PROD) por planta, foi a que apresentou médias mais distantes entre os grupos. Os genótipos AZP e CP1, produziram uma média de 25,18 g, enquanto os demais genótipos produziram uma média de 5,76 g. O peso de 100 sementes também apresentou médias mais distantes umas das outras, agrupando os genótipos em 4 diferentes grupos, sendo eles C e MV1 com média de 5,76 g, AZ1 com 10,32 g, os genótipos AZP com 14,55 g, e CP1 com a maior média de 20,14 g.

Através da análise de importância de caracteres de Singh (1981) é possível classificar as variáveis de acordo com suas respectivas contribuições para a divergência genética, identificando as características que mais e menos contribuem para discriminação dos genótipos (Tabela 7).

Tabela 7 - Contribuição relativa de oito características para dissimilaridade genética de 32 genótipos do gênero *Vigna* pelo método de Singh.

Variável	Valor (%)
Altura	11,0162
Comprimento do folíolo central	13,1517
Largura da folha	6,7286
Tamanho da vagem	36,7551
Número de sementes por vagem	3,0560

Número de sementes por planta	9,5776
Produção por planta	2,4616
Peso de 100 sementes	17,2533

Fonte: O próprio autor.

As características tamanho da vagem, peso de 100 sementes e comprimento do folíolo central da folha foram as que mais contribuíram para a quantificação da divergência entre os genótipos estudados, somando mais de 66% de contribuição juntas.

Resultados semelhantes foram observados por Vaz et al. (2017), no qual a contribuição relativa de cada característica à dissimilaridade genética, segundo o método de Singh (1981), indicou que o peso de 100 sementes, contribuiu com 47,25% do total, sendo essa, a característica mais eficiente em explicar a dissimilaridade entre os genótipos e dessa forma, devem ser priorizadas na escolha dos pais nos programas de melhoramento.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Passos et al. (2007), que visando calcular a divergência genética entre genótipos de feijão caupi, constataram que o comprimento de vagem foi uma das variáveis que mais contribuiu para a divergência genética.

Oliveira et al. (2003) ao estudarem o feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] definiram algumas características fenotípicas fundamentais como indicadores na seleção de plantas para o desenvolvimento de possíveis cultivares. Dentre elas, o número médio de vagens por planta e o peso de 100 sementes foram as variáveis mais importantes na seleção para produtividade de grãos.

O peso de 100 sementes também demonstrou ser um importante parâmetro para variabilidade genética em linhagens do material feijão-caupi "Crioulo-Córdoba", indicando a possibilidade de ganho genético quando se deseja a obtenção de cultivares superiores (CARDONA-AYALA et al., 2013).

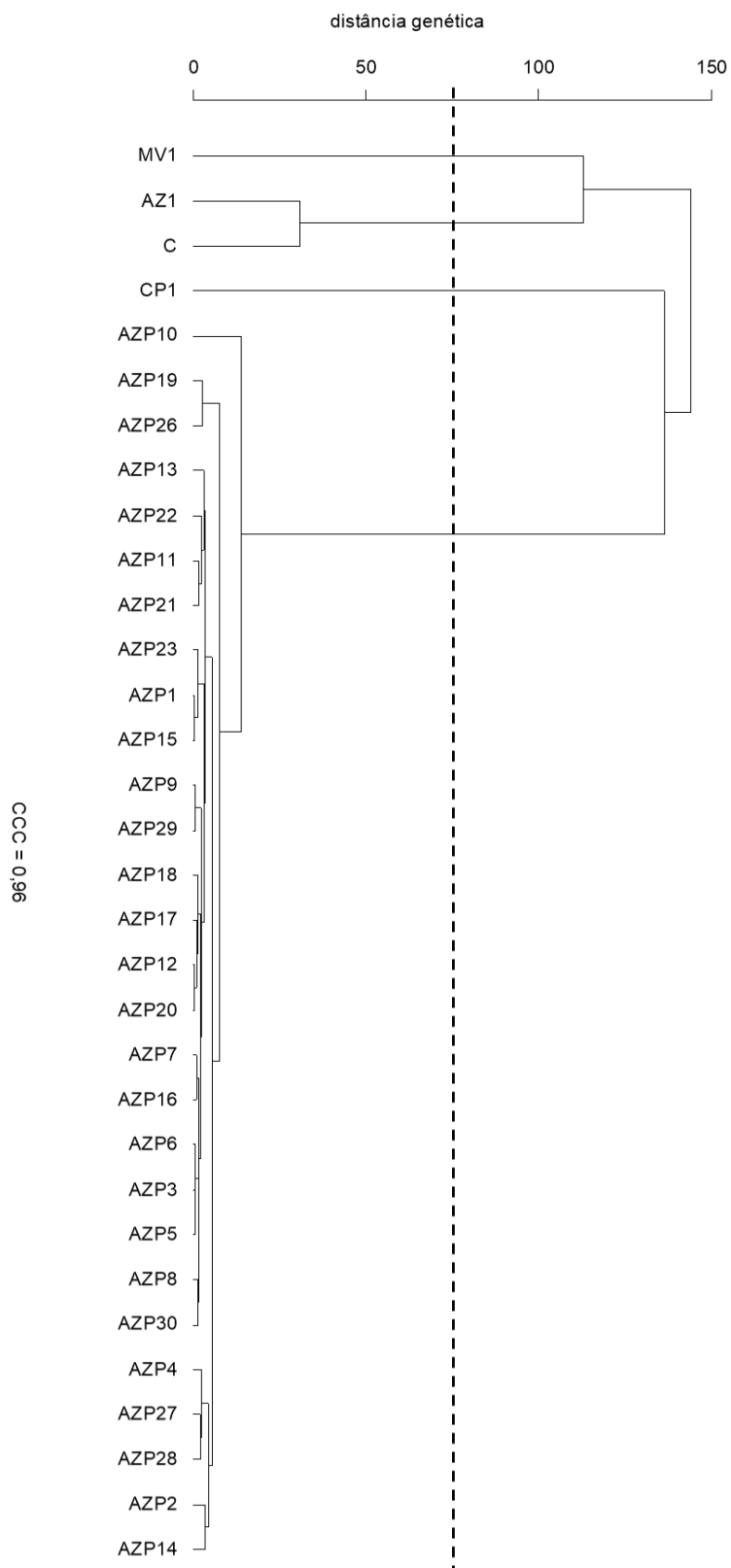
Resultados semelhantes a estes também foram relatados por Correa e Gonçalves (2012), que, ao estudarem a diversidade genética de genótipos de feijão comum cultivados em Mato Grosso do Sul, dividiu os genótipos estudados em três grupos pelo método hierárquico do vizinho mais

próximo e em cinco grupos pelas variáveis canônicas. A massa de cem grãos, também chamada de peso de cem sementes, foi a que mais contribuiu para a dissimilaridade genética, com participação de 65,83%, seguido das variáveis número de grãos por vagem (15,99%), produtividade de grãos (13,55%) e número de vagens por planta (4,69%). No entanto, o número de vagens por planta, foi a variável que menos contribuiu para a dissimilaridade, como também relatado no presente trabalho, no qual a característica número de vagens por planta (NVAG) não apresentou diferenças significativas conforme a análise estatística, indicando que a variável não foi relevante para a diferenciação dos materiais.

Dentro deste contexto, a utilização de técnicas multivariadas se mostra uma opção viável e eficaz, e que permite múltiplas combinações de informações dentro da unidade experimental, através da discriminação do genótipo com base em uma variável complexa (MOREIRA et al., 2009). Através da análise multivariada, é possível reduzir o número de variáveis e, conseqüentemente, a simplificação na obtenção das distâncias genéticas. Sua eficiência depende da quantidade de variação que essas novas variáveis explicam, em relação às variações existentes nos caracteres originais. Também é possível identificar grupos de indivíduos similares, após a estimação de uma matriz de dissimilaridade, de tal forma que exista homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os grupos estabelecidos (CORREA; GONÇALVES, 2012).

O dendrograma das características quantitativas (Figura 7), permitiu a diferenciação dos materiais em quatro grupos, os mesmos grupos diferenciados pelas características qualitativas. Dessa forma, os grupos formados são concordantes entre si.

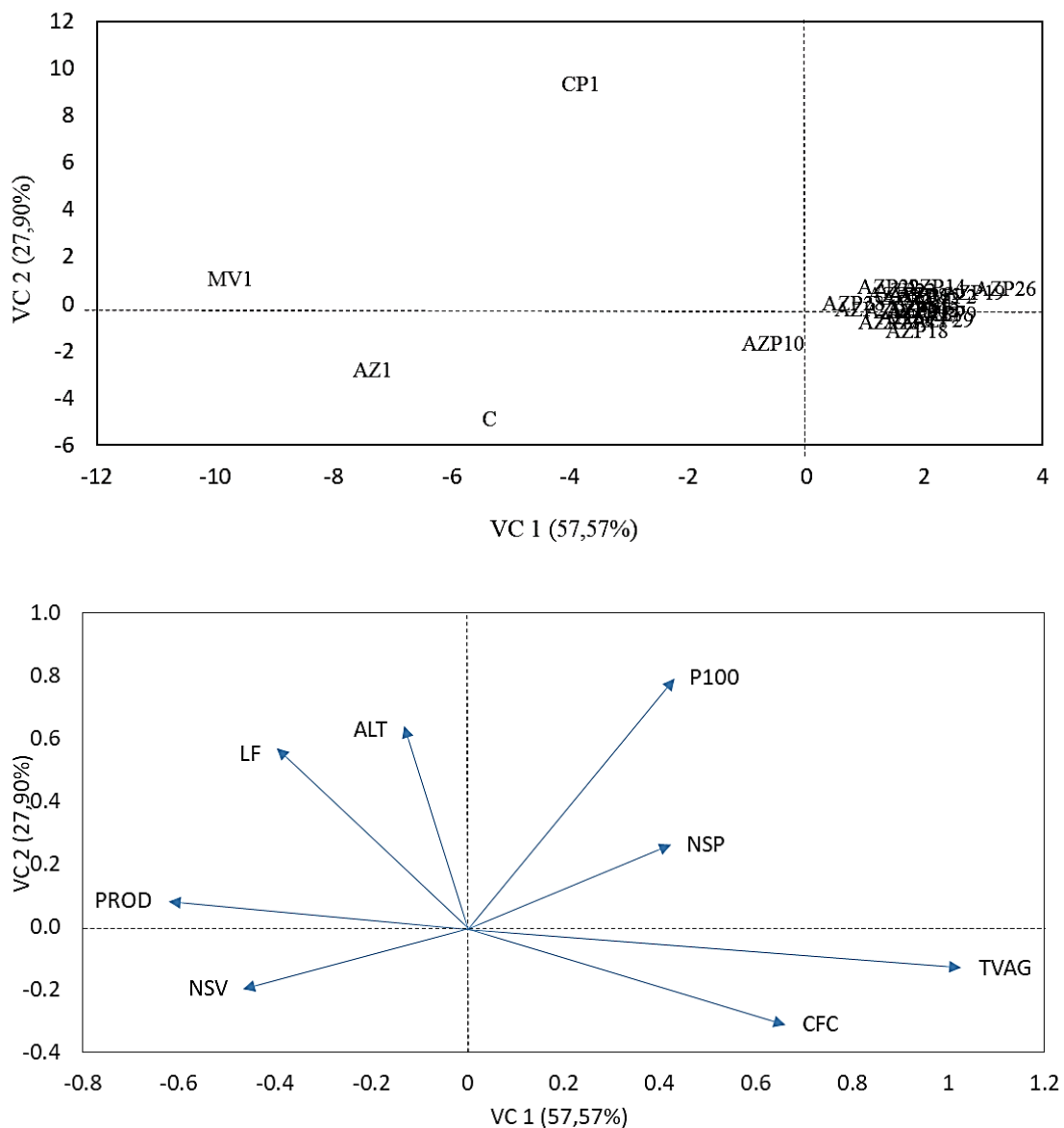
Figura 7 - Dendrograma das características quantitativas dos 32 genótipos do gênero *Vigna*.



Fonte: O próprio autor.

Através da análise de variáveis canônicas, foi possível dividir os acessos em 3 distintos grupos, agrupando MV1, AZ1 e C, e distanciando CP1 e AZP (Figura 8).

Figura 8 - Variáveis canônicas dos 32 genótipos do gênero *Vigna* avaliados.



Fonte: O próprio autor.

O primeiro grupo, formado por MV1, AZ1 e C, tiveram a produção de sementes e o número de sementes por vagem como principais parâmetros de agrupamento, enquanto os genótipos AZP se agruparam

principalmente pelo tamanho da vagem e comprimento do folíolo central. O material CP1, se distanciou dos demais pelos parâmetros altura e largura da folha.

A capacidade produtiva de acessos de feijão-caupi, quantificadas pelo número de sementes e vagens por planta, o peso da planta e o peso de 100 sementes permitiu o agrupamento dos materiais, diferenciando-os dos demais, como observado por Stoloiva e Pereira (2003). No entanto, observou-se no presente trabalho através das variáveis canônicas que o peso de cem sementes e a produção foram correlacionados negativamente.

O tamanho da vagem, conforme a análise, foi responsável pelo agrupamento dos genótipos AZP. O mesmo foi relatado por Stoloiva e Pereira (2003), no qual esta variável, juntamente com o número de dias para floração, agrupou os acessos de feijão-caupi em um segundo grupo.

Os materiais AZP não apresentaram diferenças significativas para a maioria das variáveis qualitativas e quantitativas, no entanto, para a variável Número de sementes por planta, os materiais AZP2, AZP4, AZP5, AZP6, AZP7, AZP13, AZP16, AZP27, AZP28 e AZP30 foram superiores aos demais, se contrapondo ao trabalho Cardona-Ayala et al. (2013), no qual através de uma seleção individual de plantas em população de feijão-caupi, foi constatado uma alta variabilidade genética entre os materiais segundo os caracteres dias para floração, número de ramos primários por planta, comprimento da vagem, sementes por vagem, peso de 100 sementes, comprimento da semente e largura da semente.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Oito pares de primers seletivos foram então testados e os quatro pares de primers mais polimórficos e reproduzíveis foram selecionados para amplificação seletiva (Tabela 8).

Tabela 8 - Combinações de primers seletivos de AFLP utilizados, número de fragmentos amplificados, número de fragmentos polimórficos e porcentagem de polimorfismo por primer.

Combinações de primers	Nº de fragmentos	Nº de fragmentos polimórficos	% de polimorfismo
NED- <i>Eco</i> +ACA/ <i>Mse</i> +CAC	181	106	58.6
PET- <i>Eco</i> +AGC/ <i>Mse</i> +CTGA	225	123	54.7
VIC- <i>Eco</i> +ACT/ <i>Mse</i> +CTT	423	119	28.1
FAN- <i>Eco</i> +AAG/ <i>Mse</i> +CTC	335	95	28.4
Total	1.171	443	38,06

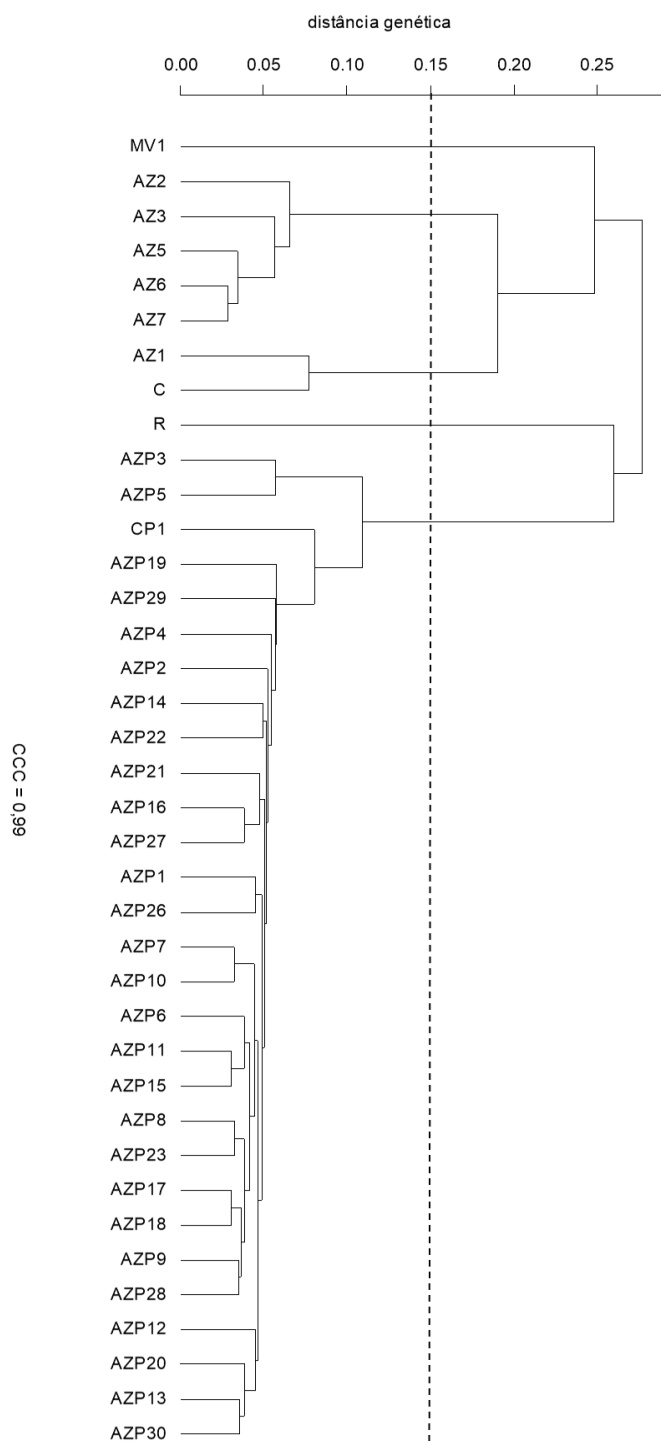
De um total de 1.171 fragmentos, 62% foram monomórficos e 38% apresentaram polimorfismo.

Através do agrupamento UPGMA (Figura 5), foi possível identificar a formação de cinco grupos. Na análise molecular, outros 6 genótipos foram incluídos, destes, 5 feijões considerados genótipos de azuki (AZ2, AZ3, AZ5, AZ6 e AZ7) e um genótipo de *Phaseolus vulgaris* (R).

No primeiro grupo, o genótipo MV1 se isolou dos demais, corroborando com os resultados obtidos nos agrupamentos qualitativos e quantitativos. Já no segundo, os genótipos AZ2, AZ3, AZ5, AZ6 e AZ7, avaliados apenas molecularmente, se agruparam e distanciaram-se do terceiro grupo, o qual é também formado por genótipos de Azuki AZP1 e Coimbra, cultivar registrada.

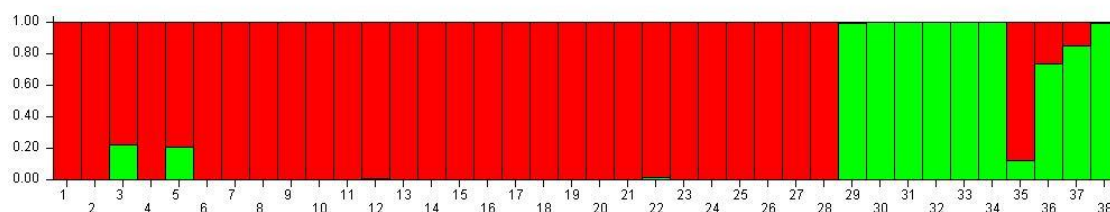
Novamente, os genótipos AZ1 e Coimbra se agruparam e se diferenciaram dos demais, incluindo os AZP. O quarto grupo foi formado apenas pelo material Rosinha, que pertence a outro gênero. Já o quinto agrupamento, uniu os genótipos AZP ao genótipo CP1, demonstrando alta proximidade genética, diferente do que foi evidenciado pelas análises morfológicas, tanto qualitativas quanto quantitativas.

Figura 9 - Dendrograma das distâncias genéticas dos 38 genótipos do gênero *Vigna* estudados através da análise AFLP.



Outro agrupamento foi realizado para confirmação dos resultados moleculares, o qual dividiu os genótipos apenas em 2 grupos (Figura 2).

Figura 10 - Agrupamento dos genótipos através da análise AFLP, determinado pelo software Structure.



Genótipos “AZP” (1 a 28); “AZ1” (29); “AZ2” (30); “AZ3” (31); “AZ5” (32); “AZ6” (33); “AZ7” (34); Caupi (35); Rosinha (36); Mungo verde (37); Coimbra (38).

Fonte: O próprio autor.

A variação genética e as relações entre 31 acessos de *Phaseolus vulgaris* L. e dois representantes de *Vigna unguiculata* L. foram avaliadas por análise de AFLP por Maciel et al. (2003). Foram classificados um total de 263 fragmentos de DNA em todos os materiais usando nove combinações de primers e encontrado mais de 95% de polimorfismo nos produtos da amplificação, indicando alta variação no nível do DNA entre os acessos. Estes resultados se opõem aos relatados no presente trabalho, no qual foi identificado apenas 38% de polimorfismo entre os 38 genótipos, apresentando baixa variação de DNA. Desses 31 acessos, 23 deles (70%) agruparam-se em três grupos, sendo que a maioria das cultivares comerciais (91%) agruparam-se em um único grupo, enquanto as variedades locais foram distribuídas ao longo de toda a variação.

Chen et al. (2011) ao estudarem a diversidade genética em mutantes de feijão comum induzidos por NaN_3^- e variedades comerciais através do método AFLP encontraram 516 fragmentos, dos quais 448 foram polimórficos, o que representa uma taxa de 8% de polimorfismo. O nível de variação detectado pelo AFLP depende do número de pares de primers e da distância genética entre as variedades analisadas CHEN et al. (2011). O maior número de fragmentos polimórficos confirma a eficiência de detecção do polimorfismo da AFLP (MACIEL et al. 2003).

O dendrograma obtido a partir da matriz de similaridade dividiu os acessos estudados por Chen et. al (2011) em dois clusters. Neste estudo, os perfis moleculares obtidos de oito pares de primers AFLP demonstraram alta diversidade genética entre os tipos selvagens Hwachia, 34 mutantes de feijão

comum gerados por NaN_3^- e 11 variedades comerciais introduzidas, e relataram que a mutagênese induzida por NaN_3^- pode efetivamente ampliar a diversidade genética das variedades de feijão, e que alguns dos mutantes produzidos podem ser úteis como fontes de variação para o desenvolvimento de novas variedades melhoradas de feijão (CHEN et al., 2011).

Estes resultados confrontam os obtidos na análise morfoagronômica, apresentando o genótipo AZP menos dissimilar ao genótipo Caupi, e mais dissimilar aos materiais de Azuki

5 CONCLUSÃO

Através do estudo das variáveis qualitativas e quantitativas, foi possível dividir os genótipos em cinco grupos, os quais foram dissimilares entre si.

A análise AFLP agrupou o material AZP com o genótipo Caupi, indicando similaridade entre eles, o que não foi observado na análise morfoagronômica.

São necessários maiores estudos quanto a classificação do material crioulo, caracterizado inicialmente como Feijão-Azuki, e agrupado molecularmente ao Caupi.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D.P.; RESENDE, O.; MENDES, U.C.; COSTA, L.M.; CORRÊA, P.C.; ROCHA, A.C. Influência da secagem na qualidade de sementes de feijão azuki. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.8, .2, p.311-315, 2013.

AGRAWAL, R.C.; BEHERA, D. E SAXENA, J. Genebank Information Management System (GBIMS). **Computers and Electronics in Agriculture**, 2007.

AMBROSANO, E.J.; WUTKE, H.B.; KASAI, F.S.; ESTEVES, J.A. **Feijão-adzuki (*Vigna angularis* (Willd.) Owhi e Ohashi) Feijão Arroz (*Vigna umbellata* (Thumb.) Owhi e Ohashi)**. In: AGUIAR, A.T.E.; GONÇALVES, C.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; TUCCI, M.L.S.; CASTRO, C.E.F. Boletim 200 Intruções agrícolas para as principais culturas econômicas. 7 ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2014. p. 173-174.

ARAÚJO, J.P.P. de; RIOS, G.P.; WATT, E.E.; NEVES, B. P. de; FAGERIA, N.K.; OLIVIERA, I. P. de; GUIMARÃES, C.M.; SILVIERA FILHO, A. **A cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.**: descrição e recomendações técnicas de cultivo. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, Circular Técnica n. 18, 1984. 82 p.

BARCELOS, E.; AMBLARD, P.; BERTHAUD, J.; & SEGUIN, M. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 8, p. 1105-1114, 2002.

BESPALHOK FILHO, J. C.; GUERRA e OLIVEIRA. Uso e conservação do germoplasma. In: DESTRO D, MONTALVAN R. (Org.). **Melhoramento Genético de Plantas**. LONDRINA, PR: UEL, 1999, p. 21 - 28.

BIOVERSITY INTERNATIONAL **Descritores para Feijão frade ou caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**; J. Pedro e A. Alves, tradutores; E. Bettencourt, editor. Bioversity International, Roma, Itália, 2007.

Brasil. Presidência da República. Decreto nº 2.366, de 05 de novembro de 1997. DO 216, Brasília, 7 de novembro de 1997, Secção 1, p. 25342.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro Nacional de Cultivares**. Disponível em: <http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php> Acesso em maio de 2018.

BRIM, C. A. A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 6, n. 2, p. 220, 1966.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N. Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas. **Embrapa Arroz e Feijão-Documentos**, 2003.

CARGNELUTTI FILHO, A., RIBEIRO, N. D., REIS, R. C. P., SOUZA, J. R., JOST, E. Comparação de métodos de agrupamentos para o estudo da divergência genética em cultivares de feijão. **Ciência Rural** v. 38, p. 2138-2145, 2008.

CARVALHO, M.; CASTRO, I.; MATOS, M.; LINO-NETO, T.; SILVA, V.; ROSA, E.; CARNIDE, V. Caracterização agro-morfológica de acessos de feijão-frade (*Vigna unguiculata*): bases para o melhoramento. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 4, p. 506-517, 2016.

CHEN, H.; LIUZ, L.; WANG, L.; WANG, S.; SOMTA, P.; CHENG, X. Development and validation of EST-SSR markers from the transcriptome of adzuki bean (*Vigna angularis*). **Plos One**, San Francisco, v. 10, n7, p1-14, 2015.

CHEN, C.L.; WANG, H.H.; JENG, T.L.; CHUANG, S.J.; WEI, M.L.; MIN, S. J. Genetic diversity in NaN₃-induced common bean mutants and commercial varieties detected by AFLP. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. Viçosa, v. 11, n. 4, p. 365-369, Dec. 2011.

CHENG, X. Z.; TIAN, Jing. Status and future perspectives of *Vigna* (mungbean and azuki bean) production and research in China. In: **The 14th NIAS international workshop on genetic resources—Genetic resources and comparative genomics of legumes (Glycine and Vigna)**. Tsukuba: National Institute of Agrobiological Science. 2011. p. 83-86.

COELHO, C. M. M.; COIMBRA, J. L. M.; ARRUDA, C. S.; BOGO, A.; GUIDOLIN, A. F. Diversidade Genética em acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência Rural**, vol. 37, n. 4, p. 1241-1247. 2007.

CARDONA-AYALA, C., ARAMÉNDIZ-TATIS, H., JARMA-OROZCO, A. Variabilidad genética en líneas de frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L. WALP). **Temas Agrarios**, v. 21, n. 2, p. 7-18, 2013.

CORREA, A. M.; GONÇALVES, M. C. Divergência genética em genótipos de feijão comum cultivados em Mato Grosso do Sul. **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, 2012.

COSTA, E.M.R. **Divergência genética entre linhagens africanas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) através de caracterização morfoagronômica e molecular**. 2010. 100 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. Disponível em:

<<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/handle/tede2/6228>> Acesso em: 15 abr. 2018.

CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 188p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 3. ed. v. 2, 668 p., 2014.

DURAK, A. et al. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2177-2183, 2013.

EARL, D.A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4, 359–361, 2012.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1. Ed. Embrapa Cerrados, 2011. 730 p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) SHARASIA, P. L., GARG, M. R.; BHANDERI, B. M. **Pulses and their by-products as animal feed**, edited by T. CALLES; H. P. S. MAKKAR. Rome, FAO. 2017.

FEHR, W. R.; FEHR, E. L.; JESSEN, H. J. *Principles of cultivar development: theory and technique*. New York: Macmillan, 1987. v. 1, p. 319-327.

FERREIRA, D.F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0**. In 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p. 255-258.

FREIRE, M.S.; WETZEL, M.M.V.S.; FAIAD, M.G.; FREIRE, A.B. Germoplasma de caupi: coleção ativa e de base. **Recursos Genéticos e Melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro**. Disponível em:<www.cpatia.embrapa.br/catalogo/livroorg/caupicolbase.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2007.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p

GANDAVO, P. de M. **Tratado da terra do Brasil. Tratado Segundo. Das coisas que são gerais por toda Costa do Brasil.** Capítulo Quarto. Dos mantimentos da terra. [Rio de Janeiro]: Ministério da Cultura. Fundação Biblioteca Nacional. Departamento Nacional do Livro. Criado em: 10 jun. 2002. Disponível em:
http://objdigital.bn.br/Acervo_Digital/livros_eletronicos/tratado.pdf.

GUPTA, S.K.; GOPALAKRISHNA, T. Genetic diversity in blackgram (*Vigna Mungo* (L.) Hepper) using AFLP and transferable microsatellite markers from azuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi). **Genome**, vol. 52, p. 120-128, 2009.

HORIUCHI, Y., YAMAMOTO, H., OGURA, R., SHIMODA, N., SATO, H., & KATO, K. Genetic analysis and molecular mapping of genes controlling seed coat colour in adzuki bean (*Vigna angularis*). **Euphytica**, v. 206, n. 3, p. 609-617, 2015.

HUBISZ, M. J., FALUSH, D., STEPHENS, M., & PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**, 9, 1322-1332, 2009.

KAGA, A. et al. The genetics of domestication of the azuki bean (*Vigna angularis*). **Genetics**, v.178, p. 1013-1036, 2008.

KARP, A.; KROSORICH, S.; BHAT, K.V.; AYOD, I.V.G.; HODGIN, T. Molecular tools in plant genetics resources conservation: A guide to technologies. **Technical Bulletin** n. 2, p. 13-29, 1997.

LESTARI, P. et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism discovery and validation in adzuki bean. **Molecular breeding**, v. 33, n. 2, p. 497-501, 2014.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2000.

LIMA, M. S., et al. Characterization of genetic variability among common bean genotypes by morphological descriptors. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.** Viçosa, v. 12, n. 1, p. 76-84, 2012.

LU, Y.; YAN, J.; GUIMARÃES, C.T.; TABA, S.; HAO, Z.; GAO, S.; CHEN, S.; LI, J.; ZHANG, S.; VIVEK, B.S.; MAGOROKOSHO, C.; MUGO, S.; MAKUMBI, D.; PARENTONI, S.N.; SHAH, T.; RONG, T.; CROUCH, J.H.; XU, Y. Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**. Vol. 115, p. 120:93, 2009.

LIN, P. Y.; LAI, H. M. Bioactive compounds in legumes and their germinated products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(11), 3807–3814, 2006.

LUMPKIN, T.A.; MCCLARY, D.C. Azuki bean: botany, production and uses. Wallingford, UK: CAB international, 1994. 268 p.

LUO, J. et al. Phytochemical distribution in hull and cotyledon of adzuki bean (*Vigna angularis* L.) and mung bean (*Vigna radiate* L.), and their contribution to antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic activities. **Food chemistry**, v. 201, p. 350-360, 2016.

MACIEL, F. L. et al. Genetic relationships and diversity among Brazilian cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, n. 8, p. 887-893, 2003.

MELO, L.A.M.P. de; BURLE, M.L. e NORONHA, S.E. de. Sistema de Informação Geográfica Aplicado a Recursos Genéticos. **Documentos**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 39 p. Brasília, Dez 2002.

MENDES, R.F.M. **Variabilidade genética de genótipos crioulos de feijão-caupi analisada por marcadores ISSR**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Piauí.

MILACH, SCK. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 1999.

MOREIRA, R. M. P.; FERREIRA, J. M.; TAKAHASHI, L. S. A.; VANCONCELOS, M. E. C.; GEUS, L. C.; BOTTI, L. Agronomic potential and genetic divergence among genotypes of bush snap bean. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. suplemento 1, p. 1051-1060, 2009.

MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B. M. Analyses of genetic diversity in crop plants – Salient statistics tools and considerations. **Crop Science**, v. 43, n. 4, p. 1235-1248, 2003.

NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I. S. de, VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 30-55.

NASS, L.L. & PATERNIANI, E. PRE-BREEDING: A LINK BETWEEN GENETIC RESOURCES AND MAIZE BREEDING. **Scientia Agricola**, vol.57, n.3, p.581-587, 2000.

OLIVEIRA, F.J. de; ANUNCIAÇÃO FILHO, C. J. da; BASTOS, G. Q.; REIS, O. V. dos; TEÓFILO, E. M. Caracteres agronômicos aplicados na seleção de

cultivares de feijão-caupi. **Revista Ciência Agronômica**, v.34, n.1, p.5-11, 2003.

PASSOS, A. R., SILVA, S. A., CRUZ, P. J., ROCHA, M. D. M., CRUZ, E. M. D. O., ROCHA, M. A. C. D., ... & SALDANHA, R. B. Divergência genética em feijão-caupi. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.579-586, 2007.

REDDY, C. K., LUAN, F., XU, B. Morphology, crystallinity, pasting, thermal and quality characteristics of starches from adzuki bean (*Vigna angularis* L.) and edible kudzu (*Pueraria thomsonii* Benth). **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 354-362, 2017.

RICHETTI, A. et al. Viabilidade econômica da cultura do feijão-comum, safra da seca 2015, em Mato Grosso do Sul. **Embrapa Agropecuária Oeste- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2014.

RODRIGUES, L. S.; TEIXEIRA, M. G.; DA SILVA, J. B. Divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1275-1284, 2002.

SATO, S.; MUKAI, Y.; YAMATE, J., et al. Effect of polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract on blood pressure elevation and macrophage infiltration in the heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 35:43–9, 2008.

SINGH, D. 1981. The relative importance of characters affecting genetic divergence. *The Indian Journal of Genetics & Plant Breeding* 41: 237-245.

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

SOUSA, R. S.; BASTOS, E. A.; CARDOSO, M. J.; PEREIRA, D. R. Identification of drought-tolerant corn genotypes by multivariate analysis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, n. 3, 2018.

STEELE, W.M. & MEHRA, K.L. **Structure, evolution and adaptation to farming systems and environment in Vigna**. In: SUMMERFIELD, R.J. & BUNTING, A.H., eds. *Advances in Legume Science*. England, Royal Botanic Gardens, 1980. p.459-68.

STOILOVA, T.; PEREIRA, G. Assessment of the genetic diversity in a germplasm collection of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) using morphological traits. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 2, p. 208-215, 2013.

TOMOOKA, N., VAUGHAN, D., XU, R. Q., KASHIWABA, K., & KAGA, A. Japanese native *Vigna* genetic resources. **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2001.

VALLS, F. J. M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., 1988, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 1988. p.106-128.

VAZ, D. C., PEIXOTO DE MORAIS JÚNIOR, O., PEIXOTO, N. Agromorphological characterization and genetic divergence assessment in bush snap bean genotypes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 2, 2017.

VIEIRA RF, VIEIRA C & VIEIRA RF. **Leguminosas graníferas**. Viçosa, Editora UFV. 206p. Feijão azuki: p. 79-85, 2001.

VIEIRA, R.F.; VIEIRA, C.; ANDRADE, G.A. Comparações agronômicas de feijões dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* com o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 841-850, 1992.

VIEIRA, R. F. Comportamento de cultivares de feijão-azuki em diferentes épocas de plantio em Ponte Nova e Leopoldina, Minas Gerais. **Ceres**, v. 49, n. 286, 2002.

VOS, P.; HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T. V. D., HORNES, M., ... & ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; RUMJANEK, N.G. e FREIRE FILHO, F.R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.4, p.353-359, abr. 2005.

XU, R.Q.; TOMOOKA, N.; VAUGHAN, D.A. AFLP markers for characterizing the azuki bean complex. **Crop Science**, Madison, v.40, p. 808-815, maio 2000.

YAMAMOTO, Y.; SANO, C.M.; TATSUMI, Y.; SANO, H. Field analysis of horizontal gene flow among *Vigna angularis* complex plants. **Plant Breeding**, Malden, v. 125, p. 156-160, mar. 2006.

YANG, Y.; PENG, X.; YINGYING, Z.; YUE, G.; GUIXING, R. Antioxidant and immunoregulatory activity of polysaccharides from adzuki beans (*Vigna angularis*). **Food Research International**, Amsterdã, v.77, p. 251-256, nov. 2015.