

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-MELHORAMENTO
GENÉTICO DE PLANTAS**

ANTONIO ELTON DA SILVA COSTA

**DIVERSIDADE MOLECULAR DE ACESSOS, ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS
GENÉTICOS E DE ADAPTABILIDADE E ESTABILIDADE EM LINHAGENS DE
GUANDU (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh)**

**Recife-PE
Dezembro de 2021**

ANTONIO ELTON DA SILVA COSTA

DIVERSIDADE MOLECULAR DE ACESSOS, ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS E DE ADAPTABILIDADE E ESTABILIDADE EM LINHAGENS DE GUANDU (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de concentração: Melhoramento Genético de Plantas.

ORIENTAÇÃO:

Professor PhD. Carlos Antonio Fernandes Santos – orientador - Embrapa Semiárido, Petrolina – PE

Recife-PE

2021

Diversidade molecular de acessos, estimativas de parâmetros genéticos e de adaptabilidade e estabilidade em linhagens de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh)

Antonio Elton da Silva Costa

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 03/12/2021.

Orientador:

Professor PhD. Carlos Antonio Fernandes Santos
(Embrapa Semiárido)

Examinadores:

Profa. Dra. Gheysa Coelho Silva – DEPA/UFRPE

Prof. Dr. José Luiz Sandes de Carvalho Filho – DEPA/UFRPE

Prof. Dr. Sirando Lima Seido – Faculdade São Francisco de Juazeiro

Prof. Dr. Luiz Cláudio Costa Silva – Universidade Estadual de Feira de Santana

RECIFE - PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C837d Costa, Antonio Elton da Silva
Diversidade molecular de acessos, estimativas de parâmetros genéticos e de adaptabilidade e estabilidade em linhagens de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) / Antonio Elton da Silva Costa. - 2021. 138 f. : il.
- Orientador: Carlos Antonio Fernandes Santos.
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas, Recife, 2021.
1. Desempenho produtivo. 2. Diversidade genética. 3. Germoplasma. 4. Herdabilidade. 5. Interação genótipos x ambientes. I. Santos, Carlos Antonio Fernandes, orient. II. Título

CDD 581.15

Aos meus pais José e Elza. À minha esposa Cristina.
Ao meu filho Elias. Aos meus demais familiares e
amigos que tanto me apoiaram,

DEDICO

“...e Ihe chamou Ebenézer; e disse: Até aqui nos
ajudou o Senhor”.

1 Samuel 7:12

A Deus.

OFERECIMENTO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as graças alcançadas, por me guiar, me dar saúde, força e sua Luz para continuar. Agradeço a Deus por estar findando mais esse ciclo, e confiante n'Ele, alcançar novas vitórias, não porque eu mereça, mas porque sou eterno dependente de suas graças.

Aos meus pais José Rodrigues da Costa e Elza Rodrigues da Silva Costa, por todo carinho e apoio. Aos meus irmãos Simone, Sebastião e Altieres da Silva Costa, por todo suporte e companheirismo. A minha esposa Cristina dos Santos Ribeiro Costa, pelo companheirismo, atenção, preocupação, carinho e paciência. Ao meu filho Elias Davi Ribeiro Costa por me elevar a outra dimensão quando o desespero apertava.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento de Plantas pela oportunidade de realização do doutorado.

A Embrapa Semiárido por todo suporte e estrutura que foram imprescindíveis para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador, PhD. Carlos Antonio Fernandes Santos, por toda a atenção e direcionamento, todos ensinamentos e conhecimento transmitidos, meu muito obrigado.

A Embrapa Algodão e Jalmi Guedes Freitas pela parceria na realização dos ensaios de competição, em Barbalha - CE.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela disponibilização de recursos, para desenvolver o projeto.

Aos professores do PPAMGP, Dr. Dimas Menezes, Dr. José Luiz Sandes de Carvalho Filho, Dra. Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho, Dra. Vivian Loges, Dra. Gheysa Coelho Silva, Dr. Édson Ferreira da Silva, Dra. Luiza Suely Semen Martins,

Roseane Cavalcanti dos Santos, Dr. Péricles Albuquerque, Dr. Antonio Francisco de Mendonça Júnior, Dra. Rosimar dos Santos Musser, Dr. José Wilson da Silva e Dr. Gerson Quirino Bastos.

Aos funcionários e ex-funcionários da Embrapa Semiárido por toda contribuição. Douglas Cordeiro De Carvalho, Cláudio Roberto de Sá e equipe do Campo Experimental Caatinga; Luis Henrique Bezerra Cabral e equipe do Campo Experimental Bebedouro; Francisco Alves Da Silva, Valfredo dos Santos e equipe do Campo Experimental de Mandacaru. Diniz Da Conceição Alves, Nerivargas de Souza e João Bosco Nunes Marinho. Antônio Pereira de Lima, Hélio Macedo Araújo, Justino Bahia, Francisco de Assis e Izaias Aderval da Silva.

Aos amigos que fazem ou já fizeram parte do Laboratório de Genética: Carlos Antonio Silva, Andressa Mirelle Santos Lourenço, Kamila Lopes Santos, Silvia Cristinna Alves Rodrigues, Mariane de Moraes de Lacerda Marques, Lucas Silva dos Santos, Maria Eduarda Marinho de Sousa, Danillo Olegário Matos da Silva, Deisy Aiane Lima de Aquino, Viviane Nunes dos Santos, Flávia Medeiros e José Williano de Souza Farias por contribuírem diretamente para a realização do trabalho.

Aos meus amigos do PPGAMGP: Damião Raniere Queiroz, Cristina dos Santos Ribeiro Costa, Ana Maria Maciel dos Santos, Sergio Rogério Alves de Santana, Djayran Sobral Costa, Islan Diego Espíndula de Carvalho e Fabian Santana Silva pelo companheirismo e apoio.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Temperatura, graus Celsius

ΔK - critério usado Evanno et al. (2005) para determinação do valor mais provável de K segundo estatística *ad hoc* ΔK , baseada na taxa de variação da probabilidade logarítmica dos dados em relação ao número de grupos inferidos pelo software Structure

\sim - símbolo que em matemática é usado para se referir aos termos “aproximação” ou “aproximadamente” ou “cerca de”

F_n - derivado de planta filial cujo índice n indica a geração da semente

\sqrt{x} - raiz quadrada do valor x

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Onze grupos de maturação observados em guandu, estabelecidos em latitude 17°.....6

CAPÍTULO II

Tabela 1. Grupo de ligação (GL), temperatura de anelamento (Ta) e parâmetros genéticos estimados em 73 acessos com base em 11 *loci* microssatélites desenvolvidos para guandu.....54

Tabela 2. Análise molecular de variância (AMOVA) em 73 acessos de guandu avaliados com 11 *loci* microssatélite.....55

Tabela 3. Diferenciação genética (FST) entre populações pareadas de acessos de guandu de dez origens avaliadas com 11 *loci* microssatélites.....56

CAPÍTULO III

Tabela 1. Esquema da análise de variância, com informação dentro de parcela, para estimativas dos quadrados médios (QM) e esperanças dos quadrados médios [E(QM)].....66

Tabela 2. Quadrados médios (QM) para as variáveis número de dias até o início do florescimento na parcela (NIF), número de dias até a floração de 50% das plantas na parcela (NDF); número de dias até a maturação (NDM), altura de planta (APM), número de vagens (NVP), comprimento de vagens (CDV), número de grãos/vagem (NGV), peso de 100 grãos (P100) e produção de grãos (PROD) em 30 linhagens das gerações F₃, F₄, F₅ e F₆ do cruzamento ICPL 90045 × UW10 de guandu.....68

Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson estimados entre a média e estimativas de herdabilidades no sentido amplo calculadas via método ANOVA e REML/BLUP para nove características, avaliadas nas gerações F₃, F₄, F₅ e F₆ de guandu.....74

Tabela 4. Herdabilidades estimadas via métodos da unidade de desvio padrão (h_{UP}^2) e regressão pai-filho F₆ vs F₃ (h_{PF}^2) em dados das gerações F₃ e F₆. Para NIF: número de dias até o início do florescimento na parcela; NDF: número de dias até a floração de 50% das plantas na parcela; NDM: número de dias até a maturação; APM: altura de planta; NVP: número de vagens por planta; CDV: comprimento de vagens; NGV:

número de grãos por vagem; P100: peso de 100 grãos; PROD: produção de grãos por planta.....76

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Municípios, datas de semeio, altitude, latitude, longitude, produtividade média de grãos (\bar{Y}_j), graus de liberdade do resíduo (GL_R), coeficientes de variação (CV) e quadrado médio do resíduo QM_R , em experimentos conduzidos nos locais Campo Experimental de Barbalha, CE (CEB); Campo Experimental da Caatinga (CEC), Petrolina, PE; e Campo Experimental de Mandacaru (CEM), Juazeiro, BA.....99

Tabela 2. Parentais e estimativas de parâmetros de estabilidade e adaptabilidade para produtividade (kg ha^{-1}) e ANOVA conjunta para 21 linhagens de guandu mais a variedade controle 'guandu Petrolina', avaliados em oito ambientes, três em condições de sequeiro e cinco irrigados, usando o método Eberhart e Russell (1966).....100

Tabela 3. Estabilidade e adaptabilidade segundo método AMMI e resultado do teste Gollob para a análise SREG (GGE biplot), com as proporções da taxa de interação para cada eixo principal para 21 genótipos de guandu e a variedade controle 'guandu Petrolina', avaliados em oito ambientes, três de regime sequeiro e cinco sob condições irrigadas.....101

Tabela 4. Parâmetros de estabilidade e adaptabilidade, produtividade, dias para colheita (DPC) e altura (cm) de linhagens selecionadas entre 21 de guandu avaliadas em oito ambientes de acordo com os métodos de Eberhart e Russell (E&R), AMMI e GGE biplot.....102

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Série histórica relativa à produção e produtividade global de guandu, no período de 1961 a 2019 (FAO 2019).....9

CAPÍTULO II

Figura 1. Dendrograma UPGMA do coeficiente de similaridade de Jaccard entre 73 acessos de guandu, de 10 regiões / origens, avaliados com 11 *loci* microssatélites. Correlação cofenética=0,82. Índia (ICPL 88018, ICPL 90044, ICPL 90046, ICPL 90050, ICPL 90052, ICP 6, ICP 2582, ICP 7182 e ICP 7623); Anagé, BA (Anage10, Anage11, Anage12, Anage13, Anage14, Anage15, Anage16); Abaira, BA (Abaira20, Abaira21, Abaira22, Abaira23, Abaira24, Abaira25), Seabra, BA (Seabra30, Seabra31, Seabra33, Seabra34 e Seabra35); Jacobina, BA (Jacobina50, Jacobina51, Jacobina52, Jacobina53, Jacobina54, Jacobina55, Jacobina56, Jacobina57 e Saude55); Mairi, BA (Mairi01, Mairi02, Mairi03, Mairi04, Mairi05 e Mairi06); Triunfo, PE (Triunfo01, Triunfo02, Triunfo05, Triunfo07, Triunfo08, Triunfo09 e Triunfo10); Moreilândia, PE (Moreilandia18, Moreilandia19, Moreilandia20, Moreilandia21, Moreilandia23, Moreilandia24, Exu25 e Exu26); São Carlos, SP (G08, G12, G15, G22, G25, G27, G30, G40 e G61) e; Central América (FAO03, FAO08, UW10, FAO25, UWS103, UWS107 e UWS127).....57

Figura 2. Estimação do número ótimo de clusters (K) de acessos de guandu no STRUCTURE, de acordo com o critério ΔK de Evanno et al. (2005).....58

Figura 3. Estrutura genética de 73 acessos de guandu com base em análise Bayesiana, considerando K=2 obtida pelo método de ΔK . Cada linha representa um acesso de guandu. Cada cor representa a provável linhagem do conjunto do qual o acesso ou acesso parcial foi derivado. Análise realizada com 11 *loci* microssatélites, no software Structure 2.3.4.....59

CAPÍTULO III

Figura 1. Médias nas gerações F₃, F₄, F₅ e F₆ no cruzamento ICPL 90045 x UW10 de guandu para as variáveis: dias para início da floração na parcela (NIF), dias para floração de 50% das plantas na parcela (NDF), número de dias para maturação de 95% das vagens (NDM), altura de planta (APM), número de vagens (NVP), comprimento de vagens (CDV), número médio de grãos/vagem (NGV), peso de 100 grãos (P100) e produção de grãos (PROD). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Bonferroni (p<0.05).....69

Figura 2. Estimativas da herdabilidade no sentido amplo $h^2_{a-E(QM)}$ com base na [E(QM)] da ANOVA e herdabilidade da média de linhagem h^2_{a-REML} pelo método da

máxima verossimilhança restrita (REML) em quatro gerações, F₃, F₄, F₅ e F₆ para as características: dias para início da floração na parcela (NIF), dias para floração de 50% das plantas na parcela (NDF), número de dias para maturação de 95% das vagens (NDM), altura de planta na maturação (APM), número de vagens (NVP), média do comprimento de vagens (CDV), média do número de grãos (NGV), peso de 100 grãos (P100) e produção de grãos (PROD).....70

Figura 3. Estimativas dos coeficientes de variação genética entre famílias (CVge) e coeficiente de variação ambiental (CVe) entre as gerações F₃, F₄, F₅ e F₆ de guandu com base na análise de variância (ANOVA) e modelos mistos via método máxima verossimilhança restrita (REML) para os caracteres: para início da floração na parcela (NIF), dias para floração de 50% das plantas na parcela (NDF), número de dias para maturação de 95% das vagens (NDM), altura de planta na maturação (APM), número de vagens (NVP), média do comprimento de vagens (CDV), média do número de grãos (NGV), peso de 100 grãos (P100) e produção de grãos (PROD).....73

CAPÍTULO IV

Figura 1. Biplot AMMI utilizando as médias correspondente da representação dos 21 genótipos de guandu mais a variedade guandu Petrolina avaliados em oito ambientes para produtividade Tratamentos: 1= 183, 2= 162, 3= 190, 4= 130, 5= 110, 6= 181, 7= 106, 8= 186, 9= 100, 10= 179, 11= 96, 12= 87, 13= 126, 14= 129, 15= 159, 16= 90, 17= 182, 18= 184, 19= 158, 20= 102, 21= 45 e 22= guandu Petrolina. Ambientes testados: Barbalh1 e Barbalh2 (Barbalha, CE); Caating1, Caating2, Caating3 (Petrolina, PE); e Mandaca1, Mandaca2 e Mandaca3 (Juazeiro, BA).....103

Figura 2. Biplot AMMI com os dois primeiros componentes principais correspondente à representação dos 21 genótipos de guandu mais a variedade guandu Petrolina, avaliados em oito ambientes para produtividade Tratamentos: 1= 183, 2= 162, 3= 190, 4= 130, 5= 110, 6= 181, 7= 106, 8= 186, 9= 100, 10= 179, 11= 96, 12= 87, 13= 126, 14= 129, 15= 159, 16= 90, 17= 182, 18= 184, 19= 158, 20= 102, 21= 45 e 22= 'guandu Petrolina'. Ambientes testados: Barbalh1 e Barbalh2 (Barbalha, CE); Caating1, Caating2, Caating3 (Petrolina, PE); e Mandaca1, Mandaca2 e Mandaca3 (Juazeiro, BA)104

Figura 3. GGE biplot correspondente a representação dos 21 genótipos mais a variedade guandu Petrolina avaliados em oito ambientes relativos à produtividade (kg ha⁻¹) em guandu. Tratamentos: 1= 183, 2= 162, 3= 190, 4= 130, 5= 110, 6= 181, 7= 106, 8= 186, 9= 100, 10= 179, 11= 96, 12= 87, 13= 126, 14= 129, 15= 159, 16= 90, 17= 182, 18= 184, 19= 158, 20= 102, 21= 45 e 22= 'guandu Petrolina'. Ambientes testados: Barbalh1 e Barbalh2 (Barbalha, CE); Caating1, Caating2, Caating3 (Petrolina, PE); e Mandaca1, Mandaca2 e Mandaca3 (Juazeiro, BA).....105

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
SUMÁRIO.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	xviii
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	2
2. REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Descrição Botânica, Taxonomia e Adaptação	5
2.2 Origem e Distribuição	7
2.3 Importância econômica	8
2.4 Melhoramento genético do guandu.....	9
2.5 Métodos de Melhoramento em guandu	11
2.6 Diversidade Genética em guandu.....	17
2.7 Marcadores Moleculares.....	18
2.8 Parâmetros genéticos no melhoramento de guandu	21
2.9 Adaptabilidade e estabilidade	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO II	38
ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS DE DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM ACESSOS DE GUANDU USANDO LOCI DE MICROSSATÉLITES	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS	42
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO III	60

HERDABILIDADE EM LINHAGENS DE QUATRO GERAÇÕES DE GUANDU: COMPARAÇÃO DE ESTIMATIVAS DE QUATRO MÉTODOS	61
RESUMO	61
ABSTRACT	62
INTRODUÇÃO	63
MATERIAL E MÉTODOS	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO IV	81
PARÂMETROS DE ADAPTABILIDADE E ESTABILIDADE PARA PRODUÇÃO DE GRÃOS EM LINHAGENS DE GUANDU NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO	82
RESUMO	82
ABSTRACT	83
INTRODUÇÃO	84
MATERIAL E MÉTODOS	85
RESULTADOS	88
DISCUSSÃO	91
CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
ANEXOS	108

RESUMO

Diversidade molecular de acessos, estimativas de parâmetros genéticos e de adaptabilidade e estabilidade em linhagens de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh)

O guandu é espécie de múltiplos usos, podendo ser usada para a produção de grãos, de forragem e como melhorador de solos. Apesar de ser uma importante espécie em regiões semiáridas de outros países têm sido pouco estudada e utilizada no semiárido brasileiro. Os objetivos desse trabalho foram: estimar parâmetros de diversidade e estrutura genética em acessos; estimar e comparar herdabilidades usando diferentes métodos estatísticos e; estimar parâmetros de adaptabilidade e estabilidade para produtividade de grãos em linhagens de guandu. No primeiro capítulo foi realizada a caracterização da diversidade molecular de acessos do BAG guandu com marcadores SSR's. Setenta e três acessos de guandu, de 10 procedências, foram genotipados com 11 *loci* de SSR, distribuídos nos 11 cromossomas de guandu. A AMOVA revelou grande diferenciação genética entre as populações, com F_{ST} variando de 0,22 a 0,25. A heterozigosidade esperada (H_E) nos acessos foi maior que a heterozigosidade observada (H_O) em oito dos 11 *loci*. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,13 a 0,67 entre os 11 *loci*. A similaridade genética entre os acessos de guandu variou de 0,36 a 0,93, indicando alta variabilidade entre os acessos, com a formação de três grupos, sendo um exclusivamente com acessos brasileiros. Dois grupos foram formados na análise no Structure, indicando reduzido compartilhamento alélico entre as populações do nordeste do Brasil com as demais populações. No segundo capítulo foram estimadas e comparadas herdabilidades calculadas usando quatro diferentes métodos. Trinta famílias subdivididas em seis da geração F_3 , e oito famílias para cada uma das gerações F_4 , F_5 e F_6 foram avaliadas em experimento com delineamento em blocos casualizados, com três repetições. As herdabilidades foram estimadas no sentido amplo pelo método ANOVA [$h^2_{a-E(QM)}$], modelos mistos via REML/BLUP (h^2_{a-REML}), regressão pai-filho (h^2_{PF}) e unidade do desvio padrão (h^2_{UP}). $h^2_{a-E(QM)}$ e $h^2_{a-REML} > 0,70$ foram estimadas para duas variáveis em quatro gerações, para duas variáveis em três gerações e em duas gerações para duas variáveis. Estimativas com base na regressão ou correlação pai-filho apresentaram limitações, com valores negativos ou superior a unidade. Correlações $> 0,99$ ($p < 0,01$) entre as herdabilidades estimadas com os métodos ANOVA \times REML, indicando concordância. Foi observada ausência de colinearidade entre médias das variáveis com estimativas das h^2 . Correlações de 1,0 ($p < 0,01$) entre herdabilidades \times coeficiente de variação genético indicam que esse último parâmetro pode ser usado de forma indireta, na ausência de estimativas de h^2 . Para o terceiro capítulo, 21 linhagens desenvolvidas no programa de melhoramento de guandu da Embrapa Semiárido, mais a variedade 'guandu Petrolina' (controle), foram avaliadas em oito ambientes. Os experimentos conduzidos em cinco ambientes irrigados e em três sob regime de sequeiro, usando delineamento em blocos casualizados com três repetições. Foi realizada a correção da produção de grãos por covariância com o stand médio de plantas. Parâmetros de adaptabilidade e estabilidade foram estimados pelos métodos de Eberhart e Russell, AMMI e GGE biplot com análise SREG. O coeficiente de variação para os experimentos foi de 6,06, com dados transformados por raiz quadrada. Os efeitos de todas fontes de variação foram significativos ($p < 0,01$). A linhagem 87, 100 e 158 apresentaram rendimento de grãos elevados e superior à média geral dos experimentos, boa estabilidade e ampla

adaptabilidade nos ambientes avaliados, considerando simultaneamente os parâmetros dos métodos Eberhart e Russell, AMMI e GGE biplot. Sendo linhagens com potencial para lançamento como cultivar e recomendação para cultivo de guandu na região semiárida brasileira. A caracterização molecular dos acessos de guandu possibilitou a identificação de estrutura genética populacional com diferenciação moderada a alta, fluxo gênico limitado e compartilhamento de alelos restrito entre populações do Nordeste do Brasil com populações da Índia, São Paulo, SP e América Central. Isso denota a importância dos acessos do Nordeste brasileiro para incrementar a variabilidade do germoplasma do guandu. Por meio de novas expedições para coleta, seja nos locais de origem dessas populações avaliadas, ou em outras regiões do Nordeste do Brasil em que o guandu é historicamente cultivado por pequenos agricultores, há a possibilidade de aumentar o número de amostras e prováveis alelos de interesse para o melhoramento genético de guandu. Dos métodos usados para as estimativas de herdabilidade método com base na esperança dos quadrados médios da ANOVA e a abordagem com base em modelos mistos, REML/BLUP, apresentaram resultados semelhantes, e foram superiores aos métodos com base na regressão e correlação pai-filho. As estimativas de parâmetros de adaptabilidade e estabilidade em linhagens de guandu desenvolvidas pelo programa de melhoramento de guandu possibilitaram a seleção de linhagens com real potencial para recomendação e registro de cultivares da espécie. Dentre os genótipos avaliados, as linhagens 87, 100 e 158 apresentaram ampla adaptabilidade e boa previsibilidade e produtividade acima da média geral nos ambientes estudados.

Palavras-chave: Desempenho produtivo; diversidade genética; germoplasma; herdabilidade; interação genótipos x ambientes; SSR.

ABSTRACT

Molecular diversity of accessions, estimates of genetic parameters and adaptability and stability in pigeonpea lines *Cajanus cajan* (L.) Millspaugh

Pigeonpea is a species with multiple uses, and can be used for the production of grains, forage and as a soil improver. Despite being an important species in semiarid regions of other countries, it has been little studied and used in the Brazilian semiarid region. The aims of this study were to estimate diversity parameters and genetic structure in accessions; estimate and compare heritability using different statistical methods and; to estimate adaptability and stability parameters for grain yield in pigeonpea lines. In the first chapter, the characterization of the molecular diversity of pigeonpea BAG accessions with SSR's markers was performed. Seventy-three accessions, from 10 sources, were genotyped with 11 SSR *loci*, distributed in 11 pigeonpea chromosomes. AMOVA revealed great genetic differentiation between populations, with F_{ST} ranging from 0,22 to 0,25. Expected heterozygosity (H_E) in accessions was greater than observed heterozygosity (H_o) in eight of the 11 *loci*. The polymorphic information content (PIC) ranged from 0,13 to 0,67 among the 11 *loci*. The genetic similarity among pigeonpea accesses ranged from 0,36 to 0,93, indicating high variability among accessions, with the formation of three groups, one exclusively with Brazilian accessions. Two groups were formed in the Structure analysis, indicating reduced allelic sharing between the populations of northeastern Brazil with the other populations. In the second chapter, heritability calculated using four different methods were estimated and compared. Thirty families subdivided into six of the F_3 generation, and eight families for each of the F_4 , F_5 and F_6 generations were evaluated in a randomized block design, with three replications. Broad-sense heritability was estimated by the ANOVA method [$h^2_{a-E(QM)}$], mixed models via REML/BLUP (h^2_{a-REML}), parent-offspring regression (h^2_{PF}) and standard deviation unit (h^2_{UP}). $h^2_{a-E(QM)}$ and $h^2_{a-REML} > 0,70$ were estimated for three variables in four generations, for four variables in three generations, and one generation for two variables. Estimates based on regression or parent-offspring correlation had limitations, with negative values or greater than unity. Correlations $> 0,99$ ($p < 0,01$) between heritability estimated with the ANOVA \times REML methods, indicating agreement. Absence of collinearity between means of variables with estimates of h^2 was observed. Correlations of 1.0 ($p < 0,01$) between heritability \times genetic variation coefficient indicate that this last parameter can be used indirectly, in the absence of h^2 estimates. For the third chapter, 21 strains developed in the pigeonpea breeding program at Embrapa Semiárido, plus the 'guandu Petrolina' variety (control), were evaluated in eight environments. The experiments carried out in five irrigated and three under rainfed, using a randomized block design with three replications. Correction of grain production by covariance with the average stand of plants was performed. Adaptability and stability parameters were estimated by the methods of Eberhart and Russell, AMMI and GGE biplot with SREG analysis. The coefficient of variation for the experiments was 6,06, with data transformed by square root. The effects of all sources of variation were significant ($p < 0,01$). Lines 87, 100 and 158 showed high grain yield and above the general average of the experiments, good stability and wide adaptability in the evaluated environments, considering simultaneously the parameters of the Eberhart and Russell, AMMI and GGE biplot methods. Being strains with potential for release as a cultivar and

recommendation for pigeonpea cultivation in the Brazilian semiarid region. The molecular characterization of pigeonpea accessions allowed the identification of population genetic structure with moderate to high differentiation, limited gene flow and restricted allele sharing between populations from Northeastern Brazil with populations from India, São Paulo, SP and Central America. This denotes the importance of accessions from the Brazilian Northeast to increase the variability of pigeonpea germplasm. Through new expeditions for collection, either in the places of origin of these populations evaluated, or in other regions of Northeastern Brazil where pigeonpea is historically cultivated by small farmers, there is the possibility of increasing the number of samples and probable alleles of interest for the genetic improvement of pigeonpea. Among methods used for heritability estimates, the expected mean squares from ANOVA method and the REML/BLUP mixed-model approach, showed similar results, and were superior to the methods based on regression and parent-offspring correlation. The estimates of adaptability and stability parameters in pigeonpea lines developed by the pigeonpea breeding program enabled the selection of lines with real potential for recommendation and recording of cultivars of the species. Among the evaluated genotypes, the 87, 100 and 158 lines showed wide adaptability and good predictability and productivity above the general average in the studied environments.

Key-words: Genetic diversity; genotype-by-environment interaction; germplasm; heritability; production performance; SSR

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO GERAL

Pulses são espécies entre as leguminosas produzidas na forma de grãos secos para o consumo humano. Essas espécies de importância em diversos países, têm reconhecido papel na segurança nutricional e na sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola global, de forma que 2016 foi declarado pelas Nações Unidas, como o ano das *pulses* (Calles et al. 2019). Essa entidade, por meio de campanhas sociais em meios de comunicação, projetou o estímulo ao crescimento do consumo em até 10%, além de promover a conscientização sobre os benefícios do uso (Chauhan et al. 2016). Dentre essas leguminosas, o guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] se destaca por fazer parte do rol de culturas com contribuição direta para segurança alimentar de diversos países em desenvolvimento, em especial na Índia, maior produtor e consumidor desse grão, além de diversos países do continente africano (FAO 2019).

A exemplo do que ocorrera com outras leguminosas de interesse agrícola, como feijão e soja, onde o melhoramento genético teve importante contribuição para a expansão e consolidação comercial, com aporte de cultivares superiores (Ramalho et al. 2012), na cultura do guandu situação semelhante pode ser traçada e já é realidade em alguns países. Casos como a Índia e o Malawi, exemplos do sucesso de cultivo do guandu, com programas de melhoramento para essa cultura bem estabelecidos, com desenvolvimento de cultivares híbridas com bom desempenho produtivo e precocidade, uns dos objetivos principais para o melhoramento da cultura (Kaoneka et al. 2016).

No Brasil o guandu é uma cultura pouco difundida, apesar de ser uma espécie com características de interesse para agricultores, em especial no semiárido brasileiro na agricultura de subsistência, por sua resiliência em solos pobres em nutrientes, além de tolerância ao déficit hídrico (Varshney et al. 2017) e capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com rizóbios, bactérias fixadoras de nitrogênio (Saxena 2008). Atributos que fazem do guandu uma importante alternativa para a agricultura dependente de chuva e produtores com baixo acesso a fertilizantes químicos. Isso denota para a agricultura local, real potencial do guandu e requer maior atenção das instituições de pesquisas e de melhoristas, como alternativa para incluí-lo nos sistemas agropecuários para produção de grãos e forragem ou ainda como espécie melhoradora de solo.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, nas unidades da Embrapa Semiárido em Petrolina - PE e Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos – SP, tem

desenvolvido as ações de pesquisa conduzidas com vistas ao melhoramento de guandu para produção de grãos e forragem.

A Embrapa Semiárido iniciou estudos com guandu no período de 1991 a 1998 (comunicação pessoal) a partir de introduções de germoplasma provenientes do ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics), sediado na Índia, e da FAO América Latina e Caribe (Food and Agriculture Organization of the United Nations), além da inclusão de acessos coletados em diversas áreas produtoras do Nordeste do Brasil, em áreas de cultivo tradicional, formando uma coleção com mais de 200 acessos, com margem para ser ampliada (Santos et al. 2000). As pesquisas conduzidas por essa instituição têm proporcionado a recomendação de variedades resultantes de introduções de germoplasma de outros países (Santos et al. 2001, Araújo et al. 2004). Para maiores avanços no programa de melhoramento, foram conduzidos trabalhos iniciais de caracterização de acessos usando variáveis de interesse para a cultura, tais como precocidade, tamanho reduzido, produtividade elevada, maior número de grãos por vagem e maior tamanho de grão (Santos et al. 2000). Nesses trabalhos foram identificados acessos com potencial para uso como parentais em hibridações manuais para seleção de linhagens recomendadas para as condições locais de cultivo, algo inédito até o momento (Godoy et al. 2013), e que ofertaria cultivares mais produtivas aos agricultores.

Os avanços biotecnológicos e a disponibilidade de marcadores moleculares tornaram possível a caracterização de acessos de forma mais breve. Além dos trabalhos já realizados, com a caracterização usando marcadores morfológicos (Santos et al. 1994, 2000), a caracterização molecular dos acessos é imprescindível para programas de melhoramento, pois permitem estimar parâmetros de diversidade genética e mensurar a variabilidade existente no germoplasma. As estimativas de diversidade somadas aos parâmetros genéticos, como herdabilidade e coeficientes de variação, são ideais para definir estratégias que aumentam a probabilidade do sucesso no melhoramento do guandu.

O banco ativo de germoplasma de guandu na Embrapa Semiárido é referência no Brasil, sendo uma coleção que engloba acessos coletados no Nordeste do Brasil. A região possui um histórico de cultivo tradicional, com longo processo de adaptação às condições tropicais e semiáridas, com contribuições dos produtores que realizaram seleções para algumas características, contribuições importantes para a incorporação do germoplasma dessa região no melhoramento dessa leguminosa.

Com a retomada das atividades do programa de melhoramento genético de guandu para o semiárido espera-se somar aos resultados iniciais obtidos, novos avanços, como a realização de hibridações usando como parentais acessos de diferentes origens, caracterizados com bons índices produtivos e outras características de interesse como precocidade e porte (Santos et al. 2000). Tais ações propiciam o desenvolvimento de novas linhagens, que poderão ser selecionadas para registro e recomendação, e que podem contribuir diretamente para o estabelecimento do cultivo de guandu no semiárido do nordeste brasileiro.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, realizar genotipagem, selecionar e estimar parâmetros genéticos em acessos e populações de guandu, além de estimar parâmetros de adaptabilidade e estabilidade em linhagens para viabilizar programa de melhoramento da espécie para o semiárido brasileiro, considerando a produção de grãos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição Botânica, Taxonomia e Adaptação

Cajanus cajan (L.) Millspaugh recebe diferentes nomes, dos quais o mais conhecido na literatura é *pigeonpea*, palavra essa em inglês, que em tradução livre para o português, significa “ervilha de pombo”, originada em Barbados (Plukenet, 1692), onde as sementes serviam para alimentar pombos. No Brasil recebe o nome de feijão-guandu ou guandu, e em algumas regiões também é conhecido popularmente como andu. Dentro da classificação da FAO para leguminosas, o guandu é classificado como *pulse*, termo em inglês usado para culturas entre as leguminosas que são colhidas exclusivamente para consumo como grãos secos, como o feijão e grão de bico (FAO 1994).

O gênero *Cajanus* pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, mesma de outras espécies de importância agrícola como a soja (*Glycine max* L.), o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e espécies do gênero *Vigna*. A subtribo é Cajaninae (Remanandan 1990, Kumar et al. 2017) cujas plantas pertencentes a ela apresentam uma característica que as distinguem das demais subtribos: a presença de glândulas vesiculares nas folhas, cálice e nas vagens (Moteetee e Van Wyk, 2006). De acordo com van der Maesen e Remanandan (1986), 32 espécies são reportadas no gênero *Cajanus*, sendo a maioria delas encontradas na Índia e na Austrália. Desse total de espécies, somente *Cajanus cajan* é tido como cultivado na subtribo Cajaninae (Sharma et al. 2008).

São diversas as publicações indicando que a espécie como sendo parente próxima de *Cajanus scarabaeoides* (Ladizinsky e Hamel 1980, Aruna et al. 2005, Semwal et al. 2018) e de acordo Mallikarjuna et al. (2012), essas duas espécies apresentam traços muito próximos. Nesse estudo, os autores destacam que a espécie cultivada apresenta poucas características que a distingue de *C. scarabaeoides*, como morfologia da flor, cor e morfologia da vagem, constrição da vagem, cor e estrofiolo da semente e peso de 100 sementes. Dessa forma, a hipótese é que *C. cajanus* seria resultado de seleções para porte e vigor de planta, deiscência das vagens e tamanho de semente (Kumar et al. 2017).

Quando cultivado na forma anual ou mais comumente semi-perene, o guandu tem porte arbustivo lenhoso, e mede entre 1 e 2 m de altura, no entanto, pode atingir alturas de 3 a 4 m quando cultivada em manejo plurianual ou perene (Singh e Oswalt 1992).

Suas folhas são constituídas geralmente por três folíolos em formato lanceolados ou elípticos, variando de 6,0 a 17,0 cm de comprimento por 3,0 cm de largura, são pubescentes, com maior frequência de tricomas na superfície inferior do que na superior (Seiffert e Thiago 1983, Singh e Oswalt 1992). As inflorescências localizam-se em um pedúnculo que mede de 1,0 a 8,0 cm, compondo uma panícula terminal em plantas de crescimento de tipo indeterminado, e em cacho em forma de corimbo nas de crescimento determinado, com floração acrópeta, tanto dentro do cacho quanto no galho. As flores têm tamanho de 1,5 a 1,8 cm, comumente com cores amarela ou laranja, já as cores das estrias no lado dorsal do estandarte e a segunda cor das asas e pétalas da quilha podem ser vermelhas ou púrpura, aparecendo em racemos terminais ou axilares, formando inflorescências medindo de 4,0 a 12,0 cm de comprimento. (Kumar et al. 2017). As vagens podem ser retas ou achatadas lateralmente, apresentam forma oblonga, com variação na coloração: verde, roxo, roxo escuro ou misto verde e roxo. O número de sementes por vagem pode variar até nove, as quais tem formato redondo e podem apresentar variações no tamanho e na coloração. O desenvolvimento das sementes é visível sete dias após a polinização, a maturidade fisiológica é atingida em 30 dias, e as sementes apresentam teor de umidade indicado para colheita aos 40 dias, após a polinização (Rao e Rao 1974; Singh e Oswalt 1992).

O guandu possui ampla variação na maturação, com uma faixa temporal de 85 - 300 dias para as vagens atingirem maturidade, e baseado no número de dias para 50% de florescimento (<50 - >160 dias) foram estabelecidos 11 grupos de maturação para a cultura (Tabela 1) (Saxena 2008, Saxena et al. 2019a). Para fins práticos, de acordo com as observações dos melhoristas, esse número foi reduzido para cinco grupos de maturação (Saxena et al. 2019b). Essa classificação não é inteiramente confiável para todos os locais, em face da fenologia do guandu ser altamente influenciada pelo fotoperiodismo, temperatura e suas interações.

Tabela 1. Onze grupos de maturação observados em guandu, estabelecidos em latitude 17°.

Grupo Amplo	Subgrupo de maturação	Dias para Florescimento
Superprecoce	00	<50
Extraprecoce	0	51-60
Precoce	I	61-70

	II	71-80
	III	81-90
	IV	91-100
Mediano	V	101-110
	VI	111-130
	VII	131-140
Tardio	VIII	141-160
	IX	>160

Adaptado de Saxena et al. (2017)

Com cultivo predominantemente em regiões semiáridas, o guandu é uma espécie de dias curtos que se desenvolve entre as latitudes 30° N e S. Quanto à temperatura, a faixa ideal varia de 25,0 a 30,0 °C. Esses dois fatores influenciam fortemente na formação dos botões, que são iniciados quando o guandu é exposto ao regime de fotoperíodo curto (Saxena et al. 2019a). Em estudo realizado no Quênia, Silim et al. (2007) estudaram o comportamento de genótipos de guandu dos diferentes grupos de maturação, quando expostos a diferentes comprimentos de dia, sob temperatura ambiente. Eles demonstraram ocorrer atraso na iniciação floral do guandu quando a duração do dia foi estendida além das 13 h. Os autores também relataram as temperaturas médias ótimas para a floração que foram: 24,7°C para os genótipos extraprecoces; 23,1°C para os precoces, 22,2 °C para os medianos e 18,3 °C para os genótipos de maturação tardia.

2.2 Origem e Distribuição

A origem de *C. cajan* por muito tempo foi debatida entre historiadores e cientistas, que defendiam as origens do guandu como africana ou indiana. O principal argumento dos que defendiam a origem africana era a presença da espécie selvagem endêmica na África, *C. kerstingii* (Kassa et al. 2012). De acordo com van der Maesen (1990), existem amplas evidências linguísticas, número de espécies selvagens, incluindo o potencial progenitor selvagem (*C. cajanifolius*) e dados arqueológicos para concluir que o principal centro de origem do guandu é a Índia.

Recentes estudos têm ratificado essas informações, como Fuller e Harvey (2006), que a partir de análises baseadas no mapa de distribuição selvagem desenvolvido por van der Maesen e Somaatmadja (1989), inferiram que o guandu

seria originário de regiões nos estados indianos Orissa, Andhra Pradesh e Chattisgarh. Posteriormente, Saxena et al. (2014), em estudo em que detalharam os níveis de variabilidade genética em 184 genótipos de guandu, com representação de 18 espécies de *Cajanus* spp. dos *pools* genéticos primário (77 genótipos), secundário (69 genótipos) e terciário (38 genótipos), além de germoplasma cultivado em três continentes, com uso de 1616 marcadores SNP's (*single nucleotide polymorphisms*). Esses autores, indicaram de acordo com o nível mais alto de polimorfismo em parentes selvagens e raças terrestres encontrado, a província central da Índia, Madhya Pradesh, como centro de origem do guandu, região mais ao sul do que a inferida por Fuller e Harvey (2006).

Outra ferramenta amplamente usada para estudar a dispersão do guandu são os registros arqueológicos. A partir deles já se pode revelar a presença de sementes em Maharashtra, um estado da Índia, datadas com existência do século III A.C. ao século II A.C. conforme apontam Kassa et al. (2012). Nesse mesmo estudo é proposto a provável rota de dispersão de guandu a partir da Índia, feito pela Malásia e a África Oriental, para a África Ocidental e, finalmente, para as Índias Ocidentais, culminando com a chegada do guandu as terras do Novo Mundo, através do comércio de escravizados da África.

2.3 Importância econômica

Na agricultura de subsistência em áreas semiáridas, o guandu tem uma longa história e a sua habilidade em produzir economicamente em solos com déficits hídricos o torna uma importante cultura para a agricultura dependente de chuva (Varshney et al. 2017). Pode participar dos sistemas de produção das propriedades agrícolas como fornecedora de grãos, como planta forrageira ou ainda como espécie melhoradora de solo.

A cultura é pouco difundida no Brasil e a ausência de cultivares mais produtivas, técnica de manejo e de utilização tem dificultado avaliações do real potencial do guandu para as condições socioeconômicas do semiárido brasileiro, notadamente para os pequenos e médios produtores. Os países asiáticos são os maiores produtores mundiais de guandu, sendo a Índia, o maior produtor. O seu cultivo na Índia, ocupa cerca de 5,4 milhões de hectares, o que corresponde a quase 80% de toda a área cultivada no mundo, enquanto a produção mundial de grãos de guandu foi 4,8 milhões de toneladas, com a Índia respondendo por quase 70% dessa produção (FAO 2019) (Figura 1).

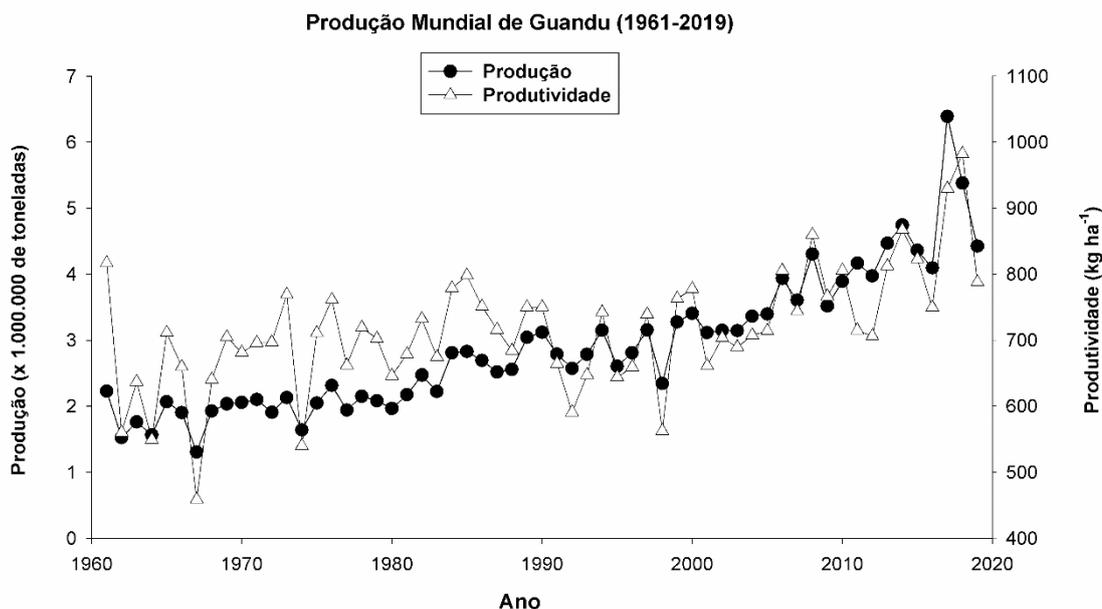


Figura 1. Série histórica relativa à produção e produtividade global de guandu, no período de 1961 a 2019 (FAO 2019).

No Brasil as últimas informações oficiais são de 1975, quando o país alcançou 1404 toneladas de grãos, sendo que as áreas com até 10 hectares de cultivo responderam por 89% desta produção (IBGE 1979). Desse total, 40,0 % foi consumido pelos próprios produtores, e o restante encaminhado para o comércio, seja por venda direta do produtor ao consumidor ou através de intermediários.

Para o homem, o mais comum é o consumo dos grãos, sem nenhum processamento ou processados como enlatados ou farináceos (Saxena 2008). O conteúdo proteico da semente varia entre 12,4 a 29,7%, com média de 21,2% (Remanandan 1990). Contudo, em relação ao valor de aminoácidos, há deficiências para os aminoácidos sulfurados metionina e cistina, além do triptofano (Saxena et al. 2010), como geralmente ocorre com outras leguminosas, mas que podem ser supridos com a complementação do arroz, por exemplo. No Brasil, os grãos do guandu são consumidos preferencialmente verdes, sendo também comum o consumo de sementes secas, enquanto que na Índia os grãos são inicialmente descascados em moinhos rústicos e os cotilédones separados, resultando em um produto final chamado “dahal”.

2.4 Melhoramento genético do guandu

O guandu possui um tamanho de genoma de 833,1 Mbp (Varshney et al. 2012),

sendo uma espécie diploide com $2n = 2x = 22$, assim como para a maioria das espécies do gênero *Cajanus*, com exceção do *C. kertsingii*, com $n=16$ (Dundas 1990, Bohra et al. 2017). É uma planta de conhecida resiliência, devido a isso, o mesmo é cultivado em ambientes menos propícios agricolamente, com baixo uso de insumos e propensos a riscos, ao que pesem a ocorrência de estresses biótico e abiótico. Esses fatores juntos colaboram nas diferentes regiões produtoras de guandu para a ocorrência de uma lacuna entre o real potencial produtivo da espécie e os índices observados pelos produtores (Bohra et al. 2020). De acordo com Mula e Saxena (2010), o potencial produtivo de guandu é de cerca de 2.500 kg ha^{-1} , patamar muito superior as médias de produtividade obtidas por produtores da Ásia ($866,2 \text{ kg ha}^{-1}$) e da África ($736,2 \text{ kg ha}^{-1}$) (Varshney et al. 2012). Apesar da importância do guandu para essas regiões, é notável que o melhoramento para a cultura ainda é incipiente. Segundo Varshney et al. (2012), essa restrição no melhoramento se deve aos poucos recursos genômicos e aos baixos níveis de diversidade genética no *pool* genético primário do guandu cultivado. Para esses autores, por pertencer a um grupo de culturas órfãs (ou negligenciadas), os investimentos na pesquisa não beneficiam essa cultura de destacada importância em diversas regiões pobres do mundo para a segurança alimentar de diversos povos que ali habitam.

No Brasil, a Embrapa Semiárido iniciou os estudos com guandu no período de 1991 a 1998 (comunicação pessoal) a partir de introduções de germoplasma provenientes do ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics), na Índia, da FAO América Latina e Caribe (Food and Agriculture Organization of the United Nations) e de acessos coletados em diversas áreas produtoras do Nordeste, onde a cultura é plantada em pequena escala. Do total de quase 400 acessos de guandu da Embrapa Semiárido, 182 foram introduzidos de outros países, principalmente da Índia, e o restante foi coletado no Nordeste ou introduzidos de outras regiões do Brasil. Esta coleção foi ampliada com a inclusão de linhagens selecionadas dentro dos cruzamentos efetuados, entre alguns germoplasma introduzido e coletado. Os trabalhos de pesquisa na Embrapa Semiárido resultaram na recomendação de duas cultivares: guandu forrageiro Taipeiro e do guandu granífero Petrolina (Santos et al. 2001).

No geral, os resultados desses estudos em Petrolina, com genótipos graníferos, forrageiros e de produção mista, destacaram o potencial do guandu para as condições semiáridas do sertão pernambucano e a possibilidade de inclusão dessa leguminosa em sistemas diversificados de exploração agropecuária das pequenas e médias

propriedades. Para a produção de massa seca, o guandu forrageiro apresenta a vantagem de produzir nos primeiros seis meses do ano e em períodos de aguda escassez de forragem, quando comparado a outras leguminosas, como a *Leucena*. Já o guandu granífero, ou de aptidão mista, deveria ser considerado para as pequenas propriedades, pois possibilita a colheita de grãos em períodos críticos do ano, em que outras leguminosas já completaram o seu ciclo e não têm mais a capacidade de produzir grãos.

A retomada do programa de melhoramento vegetal do guandu para o semiárido é necessária e urgente, considerando os resultados iniciais obtidos e a existência de um banco ativo de germoplasma de referência no Brasil, disponível na Embrapa Semiárido, associando com estimativas de parâmetros genéticos e seleção e avaliação multilocal de linhagens, visando à recomendação de novas cultivares que apresentem fenótipos desejáveis para porte, produtividade e precocidade.

2.5 Métodos de Melhoramento em guandu

O sistema reprodutivo da espécie é um fator que deve ser levado em consideração pelo melhorista na condução de um programa de melhoramento de qualquer espécie (Bradshaw 2017). A compreensão desse fator influenciará na maneira como os processos de melhoramento e seleção possam ser maximizados para um melhor efeito (Brown e Caligari 2011). No guandu, a frequência de cruzamentos naturais varia entre 3,0 e 40,0 % (Kumar et al. 2017). Característica única em relação às demais espécies de leguminosas cultivadas, a qual se deve a morfologia floral do guandu, estruturada de forma que, permite além da autopolinização a ocorrência de polinização cruzada (Saxena 2008).

De acordo com (Saxena 2008), ao longo da história, nos programas de melhoramento do guandu foram ignoradas pelos melhoristas as consequências do frequente cruzamento da espécie na eficiência de seleção. Isso porque os métodos de melhoramento usados eram os delineados para culturas autógamas. Ainda segundo esse autor, isso foi um fator limitante ao sucesso no melhoramento de características quantitativas, como as relacionadas à produção. Os tradicionais métodos de melhoramento, seleção, hibridação, mutação e poliploidia, têm sido empregadas em guandu com alguns relatos de sucesso (Sharma et al. 2008). Na Índia, onde estão estabelecidos os principais grupos de pesquisa da cultura, os esforços iniciais no melhoramento iniciaram-se com trabalhos concentrados na seleção no germoplasma disponível. Posteriormente, foram realizadas pesquisas

focadas no melhoramento com base na recombinação, e já durante a década de 1990, foi dada ênfase a produção de híbridos (Wanjari et al. 2016).

2.5.1 *Germoplasma e seus usos*

A exploração da variabilidade existente em uma espécie sempre foi o ponto de partida para o melhoramento genético das plantas cultivadas. Seja com uso de variedades promissoras como parentais para hibridação, bem como com uso direto, por meio de seleção de genótipos superiores, para lançamento de cultivares (Saxena 2008).

Harlan e Wet (1971) sistematizaram a classificação do germoplasma quanto às relações entre plantas cultivadas e espécies aparentadas em uma estrutura com quatro subdivisões, conhecida como *pool* genético ou conjunto de genes. A classificação é feita de acordo com a facilidade de ocorrer hibridação entre os componentes do germoplasma, e consequente troca de alelos entre eles. Dessa forma, no *pool* genético primário são inclusos o germoplasma cultivado de *Cajanus*, no qual os genótipos são facilmente cruzados entre si para produzir progênie fértil (Saxena et al. 2018).

O *pool* genético secundário abriga o germoplasma selvagem que, por hibridação, embora com certo grau de dificuldade, chega a produzir híbridos, no entanto, possuem viabilidade inferior, com grau variável de esterilidade masculina ou feminina devido a várias aberrações cromossômicas ou outras incompatibilidades. Desse conjunto de genes são exemplos de usos no melhoramento de guandu o uso de genótipos com elevado teor de proteína que fora transferido com sucesso (Saxena e Sawargaonkar 2015), e espécies como *C. scarabaeoides*, *C. sericeus*, *C. reticulatus* e *C. cajanifolius*, que foram usadas em trabalhos para criar sistemas de esterilidade masculina nuclear citoplasmática (Saxena et al. 2010).

No *pool* genético terciário são incluídos todos os parentes selvagens não cruzáveis, espécies aparentadas entre outros gêneros ou pouco relacionadas no mesmo gênero, sendo comum a esterilidade do híbrido, requerendo uso de técnicas de hibridação, como resgate de embriões para tornar possível a obtenção do híbrido. Das vintes espécies que compõem esse *pool* genético, até então são reportados o uso em cruzamentos de duas espécies para transferência de características de interesse em guandu. Híbridos de guandu foram obtidos a partir do cruzamento com *C. platycarpus*, sendo necessário utilização de polinizações auxiliadas por hormônios e procedimentos *in vitro*. Em trabalho mais recente usando *C. volubilis*, outra espécie

desse *pool* genético, foram obtidas linhas precoces de guandu (Mallikarjuna et al. 2017). Por sua vez o conjunto de genes quaternário é composto por espécies de diferentes gêneros, e em sua maioria por leguminosas tidas como sub-exploradas. (Mallikarjuna et al. 2014, Saxena et al. 2018).

Os bancos de germoplasma do ICRISAT (13632 acessos), National Bureau of Plant Genetic Resources of India (11229 acessos), Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, com 4116 acessos, e Ministério da Agricultura do Quênia, com 1288 acessos, possuem as maiores coleções do gênero *Cajanus*.

2.5.2 Introdução de germoplasma

Há exemplos de uso do germoplasma no melhoramento de guandu em diferentes países. Saxena (2008), ao listar os principais marcos do melhoramento de guandu em diferentes países, aponta os principais programas de melhoramento a utilizarem essa importante ferramenta. São países como Nepal, cujo programas de melhoramento são baseados em sua maioria em *landraces* e acessos também introduzidos da Índia pelo ICRISAT, que também provê a introdução de materiais para fomentar a pesquisas em outros países como Tanzânia, Etiópia, Ruanda, Sudão, Somália e Burundi.

No início do século XX os EUA, iniciaram um programa de melhoramento de guandu na Universidade do Havaí, que se estabeleceu após o lançamento da cultivar Norman, desenvolvida a partir de seleções em materiais introduzidos do Paquistão na Carolina do Norte e Flórida (Killinger 1968). Como o melhoramento da cultura nos EUA visava à produção de forragem, com a introdução de outras espécies forrageiras ocorreu diminuição do interesse pelo guandu. Com isso, de fato importante para a cultura nesse país, ocorreu o desenvolvimento em Minnesota de três variedades de guandu MN1, MN5 e MN8 de maturação precoce para as áreas com uma estação quente curta que foram introduzidas em alguns países pelo ICRISAT (Saxena 2008, Vales et al. 2012).

Trabalhos conduzidos pela Embrapa Semiárido têm buscado a identificação de materiais para produção de grãos, forragem ou com aptidão mista, ou seja, para uso com produção de massa verde e forragem. Em um desses estudos Santos et al. (2000), em experimento conduzido com 18 genótipos de guandu precoces, com ciclo inferior a 110 dias, indicaram ICPL 90050 para uso pelos agricultores, por apresentar características de interesse, como produtividade de 862,0 kg ha⁻¹, ciclo inferior a 100 dias para a primeira colheita, cor de grãos e porte.

Em estudo com 82 acessos de guandu como alternativa para a produção de forragem com tolerância à seca, a Embrapa Semiárido identificou o genótipo D₁ Dwarf (D₁ Type) com potencial forrageiro. O mesmo foi avaliado por um período de seis anos consecutivos, que comprovou o potencial agrônômico, resultando no lançamento da cultivar de guandu forrageiro denominada guandu Taipeiro pela instituição (Araújo et al. 2004).

2.5.3 Seleção de progênies

O programa de melhoramento de guandu granífero da Embrapa Semiárido tem conduzido experimentos buscando identificar linhagens promissoras. Em boa parte desses trabalhos o melhoramento do guandu tem sido feito por meio de seleção em populações segregantes de cruzamentos (Nogueira et al. 2013). No início dos anos 2001, pesquisas conduzidas na Embrapa Semiárido resultaram no lançamento da cultivar guandu Petrolina. Essa cultivar foi obtida após realização de três ciclos de seleção massal, em plantas do acesso UW 10, desenvolvido pela Universidade das Índias Ocidentais, em Trinidad e Tobago (Santos et al. 2001). Em trabalhos conduzidos na Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos – SP, por meio de seleções no germoplasma existente na instituição, foi lançada a cultivar BRS Mandarin. Cultivar essa, inicialmente usada com propósito para biodescompactação de solos e posteriormente ganhou notoriedade de uso na produção de forragem (Godoy e Santos 2010).

Saxena et al. (2016) apontam que o método de condução de populações segregantes genealógico, ou pedigree, foi amplamente utilizado por melhoristas indianos no desenvolvimento de cultivares de guandu. No levantamento realizado por esses autores, 82 das 87 cultivares de guandu foram lançadas utilizando esse método. Os autores destacam ainda que mesmo com os riscos de ocorrer polinização cruzada, na maioria das cultivares não houve controle de polinização. Recentemente foi lançado nos Estados Unidos da América a cultivar Lázaro que é insensível ao fotoperíodo, desenvolvida após vários ciclos de seleção usando o método pedigree (Viteri et al. 2020). Outro exemplo de utilização pelos melhoristas usando esse método, foi no desenvolvimento da variedade indiana Phule Tur-12, que associa produtividade superior a 1500,0 kg ha⁻¹ e resistência a murcha, nematoide do cisto e brocas (Bedis et al. 2014). Vales et al. (2012), em estudo para desenvolvimento de materiais com menor número de dias para floração de 50,0 % das plantas, utilizaram o método pedigree. Nesse trabalho, os pesquisadores identificaram linhagens com

florescimento entre 46 e 56 dias, e que completaram ciclo de desenvolvimento em altas latitudes. Segundo eles, esses materiais seriam indicados para novos nichos como o consórcio com trigo.

Ultimamente, outro método condução de populações segregantes utilizado tem sido o método descendência de uma única semente, o qual é associado ao avanço rápido de geração (RGA - *rapid generation advance*) no melhoramento de guandu. Essa tecnologia baseia-se no uso de sementes imaturas para produção de plantas *in vitro*, de forma que há redução na duração dos ciclos de melhoramento (Samineni et al. 2020). Em guandu, os poucos estudos recentemente publicados, demonstram a eficácia dessa tecnologia pouco explorada no melhoramento, devido a fatores como a sensibilidade ao fotoperíodo, pois a maioria dos genótipos usados requer longos períodos de escuridão para induzir a floração (Saxena et al. 2019c). Avanços no melhoramento do guandu, com a obtenção de materiais de maturação precoce tornaram possíveis o uso dessa tecnologia na cultura. É o que mostra estudo conduzido por Saxena et al. (2017), que usando sementes imaturas de guandu conseguiram obter sementes de quatro gerações dentro de um ano, com uso de ambiente controlado. Segundo o referido estudo, é indicado o uso de sementes imaturas com cerca de 35 dias após a floração, com as quais foram observados elevados índices de germinação, semelhantes ao uso de sementes com maturação completa, e formação de plântulas viáveis.

2.5.4 Linhas puras

O desenvolvimento de linhagens tem sido praticado há décadas para o desenvolvimento de cultivares com alto rendimento e incorporação de características de interesse agrônomo no melhoramento da maioria das culturas autógamas. No guandu, a hibridação natural é conhecida desde 1914, à qual foi atribuída a ampliação da variabilidade existente para diversos caracteres na espécie (Saxena 2008). Ainda assim, o desenvolvimento de linhas puras para a obtenção de novas cultivares tem sido realizado por melhoristas, sendo que na Índia o uso desse método resultou no lançamento de cerca de 100 cultivares. Fato esse que contribuiu tanto para expansão da área cultivada, quanto na produção de guandu indiana, porém, com menor impacto no aumento da produtividade de guandu (Saxena 2008, Saxena et al. 2019a).

No Brasil esse método predomina em programas de melhoramento de guandu para a produção de forragem, como as pesquisas realizadas pela Embrapa Pecuária Sudeste, que conduziu diversos estudos com uso desse método (Fernandes et al.

2007). Godoy e Batista (2002) avaliaram a produtividade de 17 linhas puras de guandu promissoras para lançamento de cultivares, e identificaram entre elas três cultivares que foram estáveis quanto aos testes realizados em cinco locais diferentes.

2.5.5 Híbridação

A produção de híbridos é uma tecnologia de uso já estabelecido em várias culturas agrícolas de polinização aberta, a exemplo do sucesso observado na produção de milho. Nas leguminosas essa tecnologia foi adotada, sendo que o guandu foi quem primeiramente obteve sucesso comercial nesse grupo de culturas. Essa mudança por novas tecnologias no melhoramento do guandu na Índia foi impulsionada pelos índices de produção estagnados, e oferta e demanda que afetaram diretamente, elevando o preço. Isso afetou a segurança nutricional da maioria da população que dependem não só do guandu, como das demais *pulses* que são fontes mais acessíveis de proteína (Sameer Kumar et al. 2016).

As iniciativas para desenvolvimento de híbridos de guandu foram conduzidas pelo International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT) e pelo Indian Council of Agricultural Research (ICAR), os quais desenvolveram pesquisas por 39 anos até o lançamento de duas cultivares híbridas comerciais, GTH1 e ICPH 26 (Saxena 2015). Os trabalhos iniciais foram desenvolvidos com mais de 7000 acessos visando a identificação de fontes de macho-esterilidade citoplasmática (CSM), no entanto, foram identificadas apenas fontes de macho-esterilidade genética (GMS). Com essas fontes, as pesquisas foram continuadas e os pesquisadores buscaram entender questões desconhecidas como a proporção de vigor híbrido no guandu (Saxena et al. 2018).

Nos últimos anos os avanços no melhoramento do guandu via híbridação têm desenvolvimento simultâneo aos avanços da genômica, com disponibilização de diversas ferramentas e abordagens biotecnológicas recentes, que têm proporcionado promover a consolidação e o fortalecimento da tecnologia de híbridos para a cultura. Como exemplos dos usos e potencial dessas abordagens e tecnologias, Saxena et al. (2015) indicaram o uso de abordagens para aprimorar a produção de híbridos e estudar a heterose em guandu, além da base molecular da macho-esterilidade nuclear-citoplasmática e, marcadores moleculares para restauração da fertilidade e avaliação da pureza de híbridos.

2.6 Diversidade Genética em quandu

Desde os primórdios da agricultura o melhoramento genético tem sido feito direta ou indiretamente pelo homem, com avanços até atingir o atual cenário do moderno melhoramento genético de plantas, com a aplicação de ferramentas e técnicas que otimizam o trabalho do melhorista (Fu 2015). Nesse contexto, existe a constante necessidade de explorar a diversidade genética existente nas populações de plantas, pois no manejo dos recursos genéticos das culturas, os parentes selvagens são continuamente requisitados (Mondini et al. 2019).

Diversidade genética é comumente descrita como a variedade de alelos e genótipos em uma população, sendo a base para a existência de diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais em indivíduos e populações (Gomes et al. 2018). Segundo Bhandari et al. (2017), erros na conceituação desse termo tem ocorrido de forma que diversidade genética e variabilidade genética têm sido tratadas como sinônimos, erroneamente. Segundo esses autores, variabilidade genética é a variação nos alelos dos genes ou nas sequências de DNA / RNA no pool gênico de uma espécie ou população, sendo expressa em termos como formas alternativas no fenótipo. Já a diversidade genética, conforme esses autores, é um termo mais abrangente que engloba toda a variabilidade existente entre os diferentes genótipos com respeito à composição genética total de genótipos relacionada a uma única espécie ou entre espécies. A diversidade genética é gerada por mutações, já a amplitude de frequências de diferentes alelos é alterada devido à migração, seleção e à deriva genética (Frankham et al. 2002).

A diversidade genética é um importante atributo que viabiliza as populações existência a longo prazo devido a influências no potencial adaptativo, endogamia e deriva genética. Havendo redução na diversidade genética, as populações terão menor habilidade para responder a mudanças no ambiente, seja uma melhoria, visando obter maiores ganhos produtivos, por exemplo, ou quanto a mudanças que porão em risco a existência dessas populações (Gomes et al. 2018). Uma vez que a vulnerabilidade das populações naturais aumenta quando elas têm limitação no potencial de resposta a essas mudanças.

A avaliação da diversidade genética pode ser estimada de diferentes formas, como a avaliação de características morfológicas, que consiste na caracterização de populações de plantas usando caracteres morfoagronômicos (Fu 2015). Apesar do relativo menor custo, que pode ser apontado como vantagem para o uso dessas técnicas, elas são altamente influenciadas por fatores ambientais. Posteriormente, na

era pré-genômica, visando reduzir o impacto desses fatores na análise, as pesquisas foram então baseadas em técnicas bioquímicas como isoenzima e eletroforese de proteínas (Govindaraj et al. 2015).

Com o advento da biotecnologia, diversos avanços foram alcançados e novas técnicas moleculares foram então empregadas, para medir a variação genética, como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphisms*), SSR (*simple sequence repeat*) and SNP (*Single nucleotide polymorphism*) (Mondini et al. 2009).

Em estudos de diversidade genética, comumente têm sido adotados parâmetros que avaliam a variação genética dentro e entre populações. No primeiro caso, os parâmetros mais comuns adotados na medição da diversidade genética têm sido baseados (i) no polimorfismo alélico, (ii) na heterozigosidade e também pelo (iii) parâmetro *theta* (θ). Já os parâmetros adotados para medir a variação genética entre as populações, ou as frequências de alelos e genótipos, têm sido (i) a estimativa de *Fst* e estatísticas análogas, (ii) a distância genética, como *D* de Nei e (iii) a divergência de sequência (Mohammadi e Prasanna 2003, Fu 2015).

Estudos de diversidade genética em guandu têm sido publicados, sendo amplamente difundido o uso de marcadores moleculares, com destaque para o uso de marcadores SSR que têm contribuído significativamente em programas de melhoramento da cultura em diferentes países, com programas de melhoramento bem estabelecidos. Petchiammal et al. (2015) observaram polimorfismo em SSR's em estudo com guandu, e estimaram variação alélica de 1,7 alelos por *locus*. Já Sousa et al. (2011), em estudo de diversidade realizado com transferibilidade de microssatélites de feijão-caupi para guandu, encontraram valores médios de 5,1 alelos por *locus*.

Ao estudarem parâmetros de diversidade genética em guandu, Bohra et al. (2017) estimaram diversidade de genes (GD) com valores entre 0,1 e 0,7, com média de 0,5, o que indica baixa variabilidade entre os genótipos estudados. Porém, de acordo com os autores, a baixa variabilidade observada entre os genótipos utilizados era esperada, em decorrência da estreita base genética entre os genótipos domesticados de guandu.

2.7 Marcadores Moleculares

Entre as tradicionais atividades agrícolas realizadas pelo homem primitivo, pode-se considerar que o melhoramento foi realizado de forma indireta. Isso devido a

seleção realizada pelos agricultores ao escolherem as plantas por meio da observação do fenótipo desejado em uma safra para plantio na próxima. Já o melhoramento de plantas feito de forma sistemática é uma atividade mais recente e existe a cerca de 200 anos (Lee et al. 2015). Dos diferentes marcos durante esse período, um dos principais foram os achados de Gregor Mendel que deram base genética para o melhoramento moderno. Os descritos de Mendel mostram o uso de marcadores genéticos, do tipo marcadores morfológicos, utilizados para estudar a herança de algumas características em ervilha. Essa mesma classe de marcadores foi usada posteriormente em pesquisas com feijão e com moscas da fruta para estabelecer a então teoria da ligação genética (Adhikari et al. 2017). Desde então, o trabalho dos melhoristas, na busca de identificação de variações genéticas que propiciaram ganhos genéticos, foi realizado mediante a avaliação de características fenotípicas, por meio do melhoramento convencional. Para muitos caracteres de interesse as etapas necessárias no melhoramento exigem longos períodos, e assim, o uso de marcadores morfológicos é desvantajoso. Outra desvantagem no uso desse tipo de marcadores, se deve ao fato de serem influenciados pelas condições do ambiente (Milach 1999), não garantido assim, que o fenótipo observado é consequência dos fatores genéticos. Com os avanços da biotecnologia, outra estratégia adotada pelos melhoristas foi o uso de marcadores moleculares, passando pelos marcadores citológicos e bioquímicos até os marcadores de DNA e RNA (Karlik e Tombuloğlu 2016).

Um marcador molecular é o nome dado a uma sequência de DNA com uma posição conhecida presente em um mapa de ligação ou em um cromossomo, podendo ou não essa sequência estar ligada à expressão fenotípica de um gene, que é usada para se distinguir com facilidade dois indivíduos intimamente relacionados (Ramesh et al. 2020). Marcadores moleculares são ferramentas biotecnológicas com ampla aplicação, tais como uso forense, avaliação de paternidade, diagnóstico de doenças, sistemática, estudos filogenéticos, biologia de conservação, entre outros, com garantia de associar variações genotípica e fenotípica eficientemente (Varshney et al. 2005, Poczai et al. 2013). Com o uso deles se tornou possível a avaliação quantitativa, precisa e ampla do genoma, com polimorfismos ao nível do DNA (Ben-Ari e Lavi 2012). O uso dessa classe de marcadores permitiu então aos melhoristas, a avaliação de genótipos em diferentes estádios de desenvolvimento da planta sem que as condições ambientais influenciem.

Os métodos inicialmente usados eram baseados em hibridização, e essa classe de marcadores de DNA foram substituídos rapidamente após o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Winter e Kahl 1995). Diversos novos marcadores de DNA foram descobertos e desenvolvidos com importantes avanços que permitiram a otimização para uso dessas ferramentas no melhoramento de plantas. Dentre esses, marcadores microssatélites têm amplo uso nessa área, visto a frequência de importantes estudos publicados com uso dos mesmos.

Microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR – *Simple sequence repeats* e STR – *short tandem repeats*) são curtas sequências de DNA, geralmente com comprimento de 1 a 6 pares de bases (pb) repetidos em tandem (Caixeta et al. 2014). Podem ser classificados com base em seu tamanho, tipo de unidade de repetição e localização no genoma. Microssatélites são abundantes e têm boa distribuição em organismos eucariotos, sendo características desses marcadores, as grandes variações no número de repetição, apontadas como resultado de eventos mutagênicos dinâmicos e complexos, como *crossing over* desigual, retrotransposição e deslizamento da DNA polimerase (Caixeta et al. 2014). Os *loci* SSR são marcadores moleculares com elevado polimorfismo de regiões repetitivas devido à ocorrência desses eventos mutagênico, além do que, é comum ocorrer a preservação entre os indivíduos de mesma espécie, das sequências de DNA que flanqueiam essas repetições. Cada microssatélite constitui um *locus* genético multialélico, altamente variável, de grande conteúdo informativo com expressão codominante, ou seja, permite a diferenciação entre indivíduos homocigotos e heterocigotos para determinado *locus*. Além dessa característica, a alta reprodutibilidade e simplicidade da PCR são outras vantagens presentes em SSR's que contribuem para que os mesmos tenham uso para diversos fins, incluindo o melhoramento de plantas (Xu 2010, Caixeta et al. 2014).

No melhoramento genético do guandu microssatélites são relatados para uso em estudos de diversidade genética, seleção assistida por marcadores (SAM), desenvolvimentos de mapa de ligação, análises de QTLs e ultimamente uso em estudos de seleção genômica ampla (Bohra et al. 2017, 2020). Com destaque para os programas de melhoramento para o desenvolvimento de híbridos em guandu, com mapas genéticos consenso desenvolvidos (Bohra et al. 2012) e estudos com SAM para identificação das linhas parentais empregadas nos sistemas de macho-esterilidade (Sheikh et al. 2016).

2.8 Parâmetros genéticos no melhoramento de guandu

Nas últimas décadas, mesmo com os avanços na produção global de guandu, foram obtidos pequenos ganhos relacionados à produtividade. Característica essa que é um dos principais objetivos e desafios para os melhoristas da cultura nos países onde o cultivo do guandu já é tradicional. Uma das alternativas para obtenção de melhores índices de produtividade para a cultura é a identificação de materiais superiores e com potencial produtivo nos bancos de germoplasma existentes da espécie ou entre materiais de agricultores tradicionais (Galian et al. 2015).

A existência de variabilidade é parte importante para o sucesso do programa de melhoramento de qualquer espécie. Explorar a variação genética existente em populações de plantas permite aos melhoristas a obtenção de novas cultivares, suprindo a demanda para as características de interesse do mercado. Boa parte dos fenótipos dessas características são mensuráveis e expressos de forma quantitativa, ou seja, têm distribuição contínua (Mackay 2016). Esse tipo de variação incorre em complexidade genética, visto que há vários genes envolvidos, influenciados pelo efeito ambiental, não ocorrendo então, a formação de classes fenotípicas facilmente distinguíveis (Ramalho et al. 2017).

Diferenciar genótipos avaliados, além de quantificar a variabilidade e a forma como esses caracteres são herdados tem sido o objetivo de diversos estudos. As respostas e o entendimento dos resultados obtidos só são possíveis graças a aplicação da genética quantitativa. De acordo com Cruz et al. (2014), esse ramo da genética é fundamental a qualquer programa de melhoramento, que tem como objetivo comum a identificação, o acúmulo e a perpetuação de genes favoráveis para determinada característica. Ainda de acordo com esses autores, para que essa manipulação seja possível e exitosa, de forma que os ganhos obtidos sejam mantidos, são ações necessárias, identificar a natureza da ação dos genes envolvidos no controle dessa característica. Isso se torna possível mediante a estimativa de parâmetros genéticos, tais como variâncias aditivas e não aditivas, correlações, herdabilidade dentre outros. Correlações que auxiliam, principalmente quando há caracteres de interesse com baixa herdabilidade ou de difícil mensuração, sendo também úteis para a eficiência da seleção simultânea. Os componentes de variância genética e fenotípica permitem estimar a acurácia e a herdabilidade, que contribuem para a eficácia das inferências de médias genotípicas e fenotípicas (Resende e Duarte 2007, Lira et al. 2017).

2.8.1 Herdabilidade: definição, importância, métodos de estimação

Importantes avanços na agricultura moderna foram obtidos por meio do melhoramento tradicional. Com contribuição da seleção fenotípica, amplamente usada para selecionar genótipos com combinações específicas de características de interesse agrônomo em diversos programas de melhoramento (Jauregui et al. 2011). Para alcançar êxito na adoção desse método, é necessário saber se o comportamento observado pelo genótipo é mero efeito do ambiente ou de cunho genético. Como relata Acquaah (2012), devido aos genes não serem expressos em um vácuo, e sim em um ambiente, um fenótipo observado é resultado da interação entre os alelos que codificam determinada característica e o ambiente no qual os alelos estão sendo expressos. Estimar a relação existente entre a variação fenotípica e variação genética para a característica a ser melhorada, assim como a confiabilidade do valor fenotípico como guia para o valor genético, é papel da herdabilidade.

A herdabilidade é um parâmetro genético chave para os programas de melhoramento. Esse termo foi primeiramente definido pelo geneticista animal Jay Laurence Lush nos anos 1940 (Holland et al. 2003) como sendo “a fração da variância observada causada pelas diferenças na hereditariedade” (Nyquist e Baker 1991). Sewall Wright, orientador de Lush em seu PhD, usou o termo em 1920 em seus estudos (Bell 1977). Posteriormente, os geneticistas a subdividiram em herdabilidade no sentido restrito, proporção da variância total que é atribuível à variação nos valores genéticos aditivos (h^2), e nos valores genéticos totais, a herdabilidade no sentido amplo (H^2). Quanto à simbologia adotada na literatura, tornou-se padrão o uso do símbolo h^2 para denotar referência à herdabilidade no sentido restrito. Em consequência desse símbolo estar associado a terminologia usada por Sewal Wright, ao usar o símbolo h para se referir a hereditariedade. Termo definido como coeficiente de regressão parcial padrão, ou seja, a proporção correspondente dos desvios padrão. Cujo o quadrado dessa correlação, h^2 , é definida como a proporção de variação no fenótipo que é atribuível a trilha (*path*) do genótipo para o fenótipo na população (Visscher et al. 2008). Assim para evitar erros de interpretação nas publicações, ao se referir a herdabilidade no sentido amplo, tem-se adotado o símbolo com letra maiúscula, H^2 (Nyquist e Baker 1991, Priyadarshan 2019).

Diferentes metodologias disponíveis na literatura são usadas para estimar herdabilidades em guandu e em outras espécies leguminosas. O método tradicionalmente usado para estimar herdabilidade é baseado na análise de variância,

por meio do uso das esperanças do quadrado médio (Nyquist e Baker 1991, Acquaah 2012). Ao estudar a magnitude de parâmetros genéticos de linhagens de guandu, Pandey et al. (2015), por meio desse método, estimaram a herdabilidades no sentido amplo para 11 características, reportando estimativas de herdabilidade superiores a 0,80.

A herdabilidade no sentido restrito tem sido comumente estimada usando o método da regressão pai-filho, que consiste na análise dos dados de uma geração qualquer F_t , tida como parental, com os dados da geração posterior, tida como geração filial, denominada de F_{t+1} , obtendo-se então o coeficiente de regressão b , que representa a herdabilidade no sentido restrito (Smith e Kinman 1965, Holland et al. 2003). Millawithanachchi et al. (2015) usaram esse método para estimar h^2 de características em feijão-caupi nas gerações F_4 , F_5 e F_6 , adotando essas estimativas para seleção de linhagens com elevada produção de grãos.

Com base no método da regressão pai-filho, Frey e Horner (1957) desenvolveram o método que consiste na estimativa de h^2 em termos da unidade de desvio padrão, estabelecendo valor máximo de 100% em contraste com o método original que tem diferentes máximos para cada experimento. Msolla e Mduruma (2007) estimaram h^2 para características relacionadas a maturação em populações F_2 e F_3 de feijão comum derivadas de cruzamento entre cultivar tardia e precoce, reportando estimativas de h^2 variando entre 0,39 para preenchimento de vagem a 0,59 para dias até início da floração.

Em alternativa aos métodos já citados tem-se também estimação de herdabilidade com usos modelos mistos, via máxima verossimilhança restrita ou REML (*restrict maximum likelihood method*). Hussain et al. (2021), ao estudarem 20 linhagens extra precoces de guandu, estimaram parâmetros genéticos, dentre eles herdabilidade no sentido amplo para dez características agrônômicas, resultando na seleção de 12 linhagens para ensaios de competição.

Outros métodos de estimativa são relatados na literatura. O método de análise de covariância ou método ANCOVA é um método usado para estimativas de h^2 . Segundo Casler (1982) esse é um procedimento eficiente para estimar a herdabilidade para um conjunto de pais e seus filhos avaliados conjuntamente em várias repetições ou ambientes.

Também é comum na literatura, a estimativa da herdabilidade realizada, que determina o progresso alcançado no processo de seleção em relação as diferentes gerações com base no diferencial de seleção aplicado (Holland et al. 2003).

2.9 Adaptabilidade e estabilidade

Na maioria dos programas de melhoramento genético de plantas ao menos três etapas são comuns: 1) escolha dos parentais com potencial para gerar a população base; 2) seleção de plantas superiores nas progênies obtidas; e 3) avaliação em um determinado número de ambientes, para minimizar as inconsistências devidas à variação ambiental (Vasconcelos et al. 2011, Cruz et al. 2014). É na terceira etapa onde é feita classificação dos materiais mais promissores selecionados nas etapas anteriores, e, a atenção do melhorista deve ser redobrada devido a possíveis inconsistências quanto ao efeito da interação genótipos e ambientes (G×A). Essa interação ocorre quando há resposta diferencial dos genótipos em diferentes ambientes, o que tende a dificultar a seleção de genótipos com ampla adaptação. Na ocorrência de interação, as estimativas de variância genética podem ser inconsistentes, de forma que os ganhos genéticos obtidos por meio de seleção podem ser superestimados, reduzindo então o sucesso pretendido pelo programa de melhoramento (Silva e Duarte 2006).

Essas avaliações também são conhecidas por ensaios multiambientes (do inglês *multi-environment trials*), onde os genótipos selecionados são avaliados em diferentes anos, estações e locais. A partir deles, se obtém informações referentes ao desempenho dos materiais sob diferentes condições desses fatores apresentados, e serão fundamentadas as indicações para registro da cultivar então desenvolvida. No Brasil, os melhoristas seguem as recomendações estabelecidas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para realização dos testes de Valor de Cultivo e Uso (VCU) com base no Registro Nacional de Cultivares (RNC) e pelo Sistema Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) (CultivarWeb 2019, http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultiv-arweb/cultivares_registradas.php).

Com esses ensaios é possível prever o comportamento e os efeitos da interação G×A sobre os genótipos avaliados, estudos de adaptabilidade e estabilidade. Um genótipo é considerado estável quando o mesmo possui habilidade de responder vantajosamente a variações no ambiente ao qual ele é submetido. Já sua estabilidade está relacionada à previsibilidade de seu comportamento sob diferentes condições ambientais (Souza et al. 2020). Várias abordagens estatísticas têm sido usadas nas análises da interação G×A, com evolução a partir da tradicional ANOVA conjunta de experimentos (Plaisted e Peterson 1958, Cruz et al. 2014). Subsequentemente, foram desenvolvidos os métodos de estudo da adaptabilidade e

estabilidade fenotípica, baseados em análise de regressão, como Finlay e Wilkinson (1963) e Eberhart e Russell (1966), dos quais derivaram vários outros métodos por meio de modificações.

Posteriormente, os métodos não paramétricos para estabilidade e adaptabilidade ganharam destaque como Lin e Binns (1988), tido como sendo mais simples e de mais fácil interpretação, usa estimador eficaz dos parâmetros adaptabilidade e estabilidade fenotípica (Cruz et al. 2014). Outro método frequentemente usado na avaliação de adaptabilidade e estabilidade de genótipos é o modelo de efeitos principais aditivos e de interação multiplicativa (AMMI - *additive main effect and multiplicative interaction*) (Zobel et al. 1988). Modelo esse que combina o uso de componentes aditivos para descrever os efeitos principais de genótipos e de ambientes, e componentes multiplicativos, para descrever os efeitos da interação $G \times A$, com saída de gráfico de dispersão dos genótipos e dos ambientes (*biplot*) para interpretação da estabilidade fenotípica e a adaptabilidade dos genótipos aos ambientes (Yokomizo et al. 2013). A partir de modificações no método AMMI, Yan et al. (2000) propuseram a análise GGE (*genotype and genotype-environment interaction*), usada para analisar os efeitos da interação $G \times A$, agrupando os efeitos do genótipo (G) e da interação $G \times A$ (efeito multiplicativo), submetendo esses efeitos à análise de componentes principais (ACP). Denominado pelos autores de GGE biplot, essa análise tem sido amplamente aplicada em programas de melhoramento de plantas (Balestre et al. 2009).

Além desses métodos, tem sido comum o uso de modelos mistos para análises de adaptabilidade e estabilidade, por meio da abordagem REML/BLUP, que tem como vantagens de uso, a aplicabilidade para as situações de dados desbalanceados e de heterogeneidade de variâncias (Resende 2004, 2015).

O uso dos métodos tradicionais por programas de melhoramento de guandu é frequentemente relatado na literatura, sendo o método de Eberhart e Russell (1966) o mais adotado nas análises em estudos como os de Tyagi e Agarwal (1995), Patel et al. (2009), Patel e Tikka (2014), Chaudhari et al. (2020), assim com AMMI, em estudos mais recentes GGE *plot* (Yohane et al. 2021). No Brasil, estudos publicados com adaptabilidade e estabilidade dessa cultura são escassos, existindo para guandu granífero, até o presente momento, o estudo publicado por Santos et al. (2000). Esses autores conduziram experimentos para avaliação da produção de grãos e massa seca ao sol em 47 genótipos de guandu por três anos. Com avaliação da adaptabilidade e estabilidade de dez genótipos com diferentes portes e ciclos vegetativos e

identificação de três genótipos com elevada produtividade e com parâmetros de adaptabilidade e estabilidade considerados bons segundo os autores.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acquaah G (2012) **Principles of plant genetics and breeding**. John Wiley & Sons, Oxford, 740p.
- Adhikari S, Saha S, Biswas A, Rana TS, Bandyopadhyay TK e Ghosh P (2017) Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. **The Nucleus** **60**: 283-297.
- Araújo FP, Menezes EA e Santos CAF (2004) Recomendação de variedade de guandu forrageiro. **Embrapa Semiárido-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**.
- Aruna R, Rao DM, Reddy LJ, Upadhyaya HD e Sharma HC (2005) Inheritance of trichomes and resistance to pod borer (*Helicoverpa armigera*) and their association in interspecific crosses between cultivated pigeonpea (*Cajanus cajan*) and its wild relative *C. scarabaeoides*. **Euphytica** **145**: 247-257.
- Balestre M, Von Pinho RG, Souza JC e Oliveira RL (2009) Genotypic stability and adaptability in tropical maize based on AMMI e GGE biplot analysis. **Genetics and Molecular Research** **8**: 1311-1322.
- Bhandari HR, Bhanu AN, Srivastava K, Singh MN e Shreya HA (2017) Assessment of genetic diversity in crop plants-an overview. **Advances in Plants & Agriculture Research** **7**: 00255.
- Bedis MR, Deshmukh GP, Pawar YR e Harer PN (2014) Phule Tur-12 a new high yielding, pigeonpea variety for central zone of India. **Legume Research-An International Journal** **37**: 585-589.
- Bell AE (1977) Heritability in retrospect. **Journal of Heredity** **68**: 297-300.
- Ben-Ari G e Lavi U (2012) Marker-assisted selection in plant breeding. In Altman A, Hasegawa PM (eds.) **Plant biotechnology and agriculture**. Elsevier, Cambridge, p. 163-184.
- Bohra A, Jha R, Pandey G, Patil PG, Saxena RK, Singh IP, Singh D, Mishra RK, Mishra A e Singh F (2017) New hypervariable SSR markers for diversity analysis, hybrid purity

testing and trait mapping in Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]. **Frontiers in plant science** **8**: 377.

Bohra A, Saxena KB, Varshney RK e Saxena RK (2020) Genomics-assisted breeding for pigeonpea improvement. **Theoretical and Applied Genetics** **133**: 1721-1737.

Bohra A, Saxena RK, Gnanesh BN, Saxena K, Byregowda M, Rathore A, KaviKishor PB, Cook DR e Varshney RK (2012) An intra-specific consensus genetic map of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] derived from six mapping populations. **Theoretical and applied genetics** **125**: 1325-1338.

Bradshaw JE (2017) Plant breeding: past, present and future. **Euphytica** **213**: 60.

Brown J e Caligari P (2011) **An introduction to plant breeding**. John Wiley & Sons Wiley, Hoboken, 209p.

Caixeta ET, Ferrão LFV, Maciel-Zambolim E e Zambolim L (2014) Molecular Markers. In Borém A e Fritsche-Neto R (eds) **Biotechnology and Plant Breeding**. Academic Press, San Diego, p. 19-47.

Calles T, Xipsiti M e Castello R (2019) Legacy of the international year of pulses. **Environmental earth sciences** **78**: 1-8.

Casler MD (1982) Genotype× Environment Interaction Bias to Parent-Offspring Regression Heritability Estimates 1. **Crop Science** **22**: 540-542.

Chaudhari S, Tikle AN, Patil SB, Kumar S e Saxena K (2020) Genotypex Environment Interaction for Fertility Restoration and Yield Traits in Pigeonpea (*Cajanus cajan*) Hybrids. **Agricultural Research** **9**: 508-515.

Chauhan JS, Singh BB e Gupta S (2016) Enhancing pulses production in India through improving seed and variety replacement rates. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding** **76**: 410-419.

Cruz CD, Carneiro PCS e Regazzi AJ (2014) **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. rev. e ampl.** Editora da UFV, Viçosa, 668p.

- Dundas IS (1990) Pigeonpea: cytology and cytogenetics-perspectives and prospects. In Nene YL, Hall SD, Sheila VK (eds.) **The pigeonpea**. CAB International, Wallingford, p. 117-136.
- Eberhart SA t e Russell WA (1966) Stability parameters for comparing varieties 1. **Crop science** **6**: 36-40.
- FAO (2019) FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations; Statistical Division. Roma. Disponível em < <https://faostat3.fao.org/home> >. Acessado em 07, Novembro de 2021.
- FAO (Food And Agriculture Organization of the United Nations) (1994) Definition and classification of commodities, 4. Pulses and derived products.
- Fernandes FD, Faleiro FG, Ramos AKB, Amabile RF, Barcellos AO, Godoy R e Ledo FJS (2007) **Potencial forrageiro de linhagens puras selecionadas de guandu**. Embrapa Cerrados - Boletim de pesquisa e desenvolvimento (INFOTECA-E), 14p.
- Finlay KW e Wilkinson GN (1963) The analysis of adaptation in a plant-breeding programme. **Australian journal of agricultural research** **14**: 742-754.
- Frankham R, Ballou SEJD, Briscoe DA e Ballou JD (2002) **Introduction to conservation genetics**. Cambridge university press, 617 p.
- Frey KJ e Horner T (1957) Heritability In Standard Units 1. **Agronomy Journal** **49**: 59-62.
- Fu Y-B (2015) Understanding crop genetic diversity under modern plant breeding. **Theoretical and Applied Genetics** **128**: 2131-2142.
- Fuller DQ e Harvey EL (2006) The archaeobotany of Indian pulses: identification, processing and evidence for cultivation. **Environmental archaeology** **11**: 219-246.
- Galian JLEE, Mohan N, Kumar CVS e Mallesh P (2015) Genetic variability studies in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **The Journal of Research ANGRAU** **43**: 1-7.
- Godoy R e Batista LAR (2002) Produtividade de forragem de linhagens puras selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) MILLSP) forrageiro. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife In **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE)**.

- Godoy R e Santos PM (2010) **Guandu BRS Mandarin**. São Carlos, Embrapa Pecuária Sudeste. 1 Folder.
- Godoy R, Souza FHD, Santos PM (2013) Pigeonpea selection and breeding. In Jank L, Chiari L, Valle CB, Simeão RM (eds) **Forage breeding and biotechnology**, Embrapa, Brasília, p. 107-118.
- Gomes Viana JP, Bohrer Monteiro Siqueira MV, Araujo FL, Grandó C, Sanae Sujii P, Silvestre E de A, Novello M, Pinheiro JB, Cavallari MM e Brancalion PHS (2018) Genomic diversity is similar between Atlantic Forest restorations and natural remnants for the native tree *Casearia sylvestris* Sw. **PLoS one 13**: e0192165.
- Govindaraj M, Vetriventhan M e Srinivasan M (2015) Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. **Genetics research international 2015**, 43148.
- Harlan JR e Wet JMJ (1971) Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon 20**: 509-517.
- Holland JB, Nyquist WE e Cervantes-Martínez CT (2003) Estimating and interpreting heritability for plant breeding: an update. **Plant breeding reviews 22**: 9-112.
- Hussain ME, Sharma S, Joel AJ, Ravikesavan R, Senthil N e Senthil A (2021) Genetic variability of agronomic traits in extra-early maturing Introgression Lines (ILs) of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.)]. **Electronic Journal of Plant Breeding 12**: 507-514.
- Jaureguy LM, Chen P e Scaboo AM (2011) Heritability and correlations among food-grade traits in soybean. **Plant Breeding 130**: 647-652.
- Kaoneka SR, Saxena RK, Silim SN, Odeny DA, Ganga Rao NVPR, Shimelis HA, Siambi M e Varshney RK (2016). Pigeonpea breeding in eastern and southern Africa: challenges and opportunities. **Plant Breeding 135(2)**: 148-154.
- Karlik E e Tombuloğlu H (2016) Molecular Markers and Their Applications. In Hakeem KR, Tombuloğlu H e Tombuloğlu G (eds) **Plant Omics: Trends and Applications** Springer, Basel, p. 137-157.
- Kassa MT, Penmetsa RV, Carrasquilla-Garcia N, Sarma BK, Datta S, Upadhyaya HD, Varshney RK, von Wettberg EJB e Cook DR (2012) Genetic patterns of domestication

in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) and wild *Cajanus* relatives. **PLoS one** **7**: e39563.

Killinger GB (1968) Pigeonpeas (*Cajanus cajan* (L.) Druce), a useful crop for Florida. In **Soil Crop Sci Soc Fla Proc** **28**: 162-167.

Kumar CVS, Naik SS, Mohan N, Saxena RK e Varshney RK (2017) Botanical Description of Pigeonpea [*Cajanus Cajan* (L.) Millsp.]. In Varshney RK, Saxena RK e Jackson AS (eds) **The Pigeonpea Genome. Compendium of Plant Genomes A book series (CPG)** Springer, Cham, p. 17-29.

Ladizinsky G e Hamel A (1980) Seed protein profiles of pigeon pea (*Cajanus cajan*) and some *Atylosia* species. **Euphytica** **29**: 313-317.

Lee J, Chin JH, Ahn SN e Koh H-J (2015) Brief history and perspectives on plant breeding. In Koh HJ, Kwon SY e Thomson M (eds) **Current Technologies in Plant Molecular Breeding**. Springer, New York, p. 1-14.

Lin CS e Binns MR (1988) A superiority measure of cultivar performance for cultivarx location data. **Canadian journal of plant science** **68**: 193-198.

Lira EG, Amabile RF, Fagioli M e Montalvão APL (2017) Genetic parameters, phenotypic, genotypic and environmental correlations and genetic variability on sunflower in the Brazilian Savannah. **Ciência Rural** **47**: e20160719.

Mackay TFC (2016) Quantitative Genetic Variation. In Kliman RM (ed) **Encyclopedia of evolutionary biology**. Elsevier, Amsterdam, p. 372-376.

Mallikarjuna N, Saxena K, Lakshmi J, Varshney R, Srikanth S e Jadhav D (2012) Differences between *Cajanus cajan* (L.) Millspaugh and *C. cajanifolius* (Haines) van der Maesen, the progenitor species of pigeonpea. **Genetic resources and crop evolution** **59**: 411-417.

Mallikarjuna N, Saxena RK, Gowda MB e Varshney RK (2017) Wide crossing Technology for Pigeonpea Improvement. In Varshney RK, Saxena RK Jackson SA (eds) **The Pigeonpea Genome**. Springer, Chamford, p. 31-39.

- Mallikarjuna N, Srikanth S, Kumar CVS, Srivastava RK, Saxena RK e Varshney RK (2014) Pigeonpea. In Singh M, Bisht IS e Dutta M (eds) **Broadening the Genetic Base of Grain Legumes**. Springer, New Delhi, p. 149-159.
- Milach SCK (1999) Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In Queiróz MA, Goedert CO, Ramos SRR (eds) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Embrapa Semiárido, Petrolina.
- Millawithanachchi MC, Sumanasinghe VA, Bentota AP e Abeysiriwardena S de Z (2015) Performance of different breeding methods in cowpea (*Vigna unguiculata* (L). Walp) improvement programmes. **Tropical Agricultural Research** **26**: 294 - 302.
- Mohammadi SA e Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. **Crop science** **43**: 1235-1248.
- Mondini L, Noorani A e Pagnotta MA (2009) Assessing plant genetic diversity by molecular tools. **Diversity** **1**: 19-35.
- Moteetee A e Van Wyk B-E (2006) A revision of the genus *Bolusafr*a (tribe Phaseoleae, Fabaceae). **South African Journal of Botany** **72**: 604-608.
- Msolla SN e Mduruma ZO (2007) Estimate of Heritability for Maturity Characteristics of an Early x Late Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cross (TMO 216 x CIAT 16-1) and Relationships Among Maturity Traits with Yield and Components of Yield. **Tanzania Journal of Agricultural Sciences** **8**: 11-18.
- Mula MG e Saxena KB (2010) **Lifting the level of awareness on pigeonpea-a global perspective**. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Andhra Pradesh, 540p.
- Nogueira TO, Nascimento RC, Barbosa MVN, Ferreira GO, Santos CAF e Vitorino WRS (2013) Inventário do Banco de Germoplasma de Guandu da Embrapa Semiárido. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 8., 2013 In **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**.
- Nyquist WE e Baker RJ (1991) Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. **Critical reviews in plant sciences** **10**: 235-322.

- Pandey P, Kumar R e Pandey VR (2015) Genetic studies for quantitative traits in pigeonpea [Cajanus cajan (L.) Millsp.]. **Research on Crops** **16**: 154-161.
- Patel PT e Tikka SBS (2014) Gene action and stability parameters for yield and yield components, maturity duration and protein content of CGMS lines, pollen fertility restorers and their hybrids in pigeonpea [Cajanus cajan (L.) Millsp.]. **Euphytica** **199**: 349-362.
- Patel PT, Chauhan RM, Parmar LD e Tikka SBS (2009) Phenotypic stability of yield and related traits in pigeonpea. **Legume Research-An International Journal** **32**: 235-239.
- Petchiammal KI, Muthiah AR e Jayamani P (2015) Molecular characterization of cultivated and wild Cajanus species using Simple Sequence Repeat markers. **Legume Research-An International Journal** **38**: 742-747.
- Plaisted RL e Peterson LC (1959) A technique for evaluating the ability of selections to yield consistently in different locations or seasons. **American Potato Journal** **36**: 381-385.
- Plukenet L (1692) Phytographia 3, Table 213, Figure 3.
- Poczai P, Varga I, Laos M, Cseh A, Bell N, Valkonen JPT e Hyvönen J (2013) Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. **Plant methods** **9**: 1-32.
- Priyadarshan PM (2019) **Plant breeding: classical to modern**. Springer, Singapore, 570p.
- Ramalho MAP, Bruzi AT e Teixeira RKS (2017) Quantitative Genetics in Breeding. In Silva FL, Borém A, Sedyama T e Ludke WH (eds.) **Soybean Breeding**. Springer, Cham, p. 113-129.
- Ramalho MAP, Dias LAS, Carvalho BL (2012) Contributions of plant breeding in Brazil: progress and perspectives. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **12(SPE)**: 111-120.
- Ramesh P, Mallikarjuna G, Sameena S, Kumar A, Gurulakshmi K, Reddy BV, Reddy PCO e Sekhar AC (2020) Advancements in molecular marker technologies and their applications in diversity studies. **Journal of Biosciences** **45**: 1-15.

- Rao KVM e Rao GR (1974) Gibberellin-like substances in developing and germinating seeds of pigeon pea (*Cajanus indicus* Spreng). **Indian Journal of Plant Physiology: Official Publication of the Indian Society for Plant Physiology** **17**: 65.
- Remanandan P (1990) Pigeonpea: genetic resources. In Nene YL, Hall SD, Sheila VK (eds.) **The pigeonpea**. CAB International, Wallingford, p. 89-117.
- Resende MDV (2004) **Métodos estatísticos ótimos na análise de experimentos de campo**. Embrapa Florestas-Documentos (INFOTECA-E).
- Resende MDV (2015) **Genética quantitativa e de populações**. Suprema, Visconde do Rio Branco 463p.
- Resende MDV e Duarte JB (2007) Precision and quality control cultivars evaluation experiments. **Tropical Agricultural Research** **37**: 182-194.
- Sameer Kumar CV, Wani SP, Kumar N, Jaganmohan Rao P, Saxena KB, Hingane AJ, Sudhakar C, Pushpavalli S, Yamini KN e Shruthi HB (2016) Hybrid Technology—a new vista in pigeonpea breeding. **The Journal of Research PJTSAU** **44**: 1-13.
- Samineni S, Sen M, Sajja SB e Gaur PM (2020) Rapid generation advance (RGA) in chickpea to produce up to seven generations per year and enable speed breeding. **The Crop Journal** **8**: 164-169.
- Santos CAF, Araujo FP e Menezes EA (2000) Avaliação de genótipos de guandu de diferentes ciclos e portes no Sertão pernambucano. **Magistra** **12**: 31-40.
- Santos CAF, de Araújo FP, Menezes EA e Cavalcanti J (2001) Guandu Petrolina. **Embrapa Semi-Árido. Instruções Técnicas**.
- Santos CAF, Menezes EA, Araújo FP (1994) Divergência genética em acessos de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **29(11)**: 1723-1726.
- Saxena K, Choudhary AK, Srivastava RK, Bohra A, Saxena RK e Varshney RK (2019b) Origin of early maturing pigeonpea germplasm and its impact on adaptation and cropping systems. **Plant Breeding** **138**: 243-251.

- Saxena KB (2008) Genetic improvement of pigeon pea—a review. **Tropical plant biology** 1: 159-178.
- Saxena KB (2015) From concept to field: evolution of hybrid pigeonpea technology in India. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding** 75: 279-293.
- Saxena KB e Sawargaonkar SL (2015) Genetic enhancement of seed proteins in pigeonpea—methodologies, accomplishments, and opportunities. **International Journal of Scientific Research** 4: 3-7.
- Saxena K, Saxena RK e Varshney RK (2017) Use of immature seed germination and single seed descent for rapid genetic gains in pigeonpea. **Plant Breeding** 136: 954-957.
- Saxena KB, Saxena RK, Hickey LT e Varshney RK (2019c) Can a speed breeding approach accelerate genetic gain in pigeonpea? **Euphytica** 215: 202.
- Saxena KB, Saxena RK, Sharma S, Kumar CVS, Sultana R, von Wettberg EB e Varshney RK (2018) The drivers and methodologies for exploiting wild *Cajanus* genome in pigeonpea breeding. **Euphytica** 214: 222.
- Saxena KB, Sultana R, Bhatnagar-Mathur P, Saxena RK, Chauhan YS, Kumar R V, Singh IP, Rajee RS e Tickle AN (2016) Accomplishments and challenges of pigeonpea breeding research in India. **The Indian Society of Genetics & Plant Breeding** 76: 467-482.
- Saxena KB, Sultana R, Mallikarjuna N, Saxena RK, Kumar R V, Sawargaonkar SL e Varshney RK (2010) Male-sterility systems in pigeonpea and their role in enhancing yield. **Plant Breeding** 129: 125-134.
- Saxena RK, Saxena KB e Varshney RK (2019a) Pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.): An Ideal Crop for Sustainable Agriculture. In A Al-Khayri JM, Jain SM, Johnson DV (eds) **Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes**. Springer, Berlin, p. 409-429.
- Saxena RK, Saxena KB, Pazhamala LT, Patel K, Parupalli S, Sameerkumar C V e Varshney RK (2015) Genomics for greater efficiency in pigeonpea hybrid breeding. **Frontiers in plant science** 6: 793.

- Saxena RK, Von Wettberg E, Upadhyaya HD, Sanchez V, Songok S, Saxena K, Kimurto P e Varshney RK (2014) Genetic diversity and demographic history of *Cajanus* spp. illustrated from genome-wide SNPs. **PLoS One** **9**: e88568.
- Seiffert NF e Thiago L (1983) **Legumineira: cultura forrageira para produção de proteína**. EMBRAPA, Campo Grande, 51p.
- Semwal DP, Ahlawat SP e Pradheep K (2018) Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] and its wild spp. germplasm collection status, diversity distribution and trait-specific germplasm mapping using GIS tools in India. **Legume Research-An International Journal** **41**: 656-662.
- Sharma KK, Sreelatha G, Bhatnagar-Mathur P, Saxena KB e Rao DM (2008) Pigeonpea. In: Kole C e Hall TC (Eds) **Compendium of transgenic crop plants: transgenic legume grains and forages**. Blackwell Publishing Limited, Oxfordshire, p. 133-161.
- Sheikh W, Dedhrotiya A, Khan N, Rathod A, Kalaskar S e Acharya S (2016) Molecular markers linked to fertility restorer gene in A2 cytoplasm male sterility of pigeon pea [*Cajanus cajan*]. **Electronic Journal of Plant Breeding** **7**: 871-876.
- Silim SN, Gwataa ET, Coeb R e Omanga PA (2007) Response of pigeonpea genotypes of different maturity duration to temperature and photoperiod in Kenya. **African Crop Science Journal** **15**: 73-81.
- Silva WCJ e Duarte JB (2006) Métodos estatísticos para estudo de adaptabilidade e estabilidade fenotípica em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **41**: 23-30.
- Singh F e Oswalt D (1992) **Pigeonpea Botany and Production Practices**. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics: Hyderabad, 38p.
- Smith JD e Kinman ML (1965) The Use of Parent-Offspring Regression as an Estimator of Heritability 1. **Crop Science** **5**: 595-596.
- Sousa ACB, Godoy R, Sforça DA, Campos T, Zucchi MI, Jank L e Souza AP de (2011) Genetic diversity analysis among pigeonpea genotypes adapted to South American regions based on microsatellite markers. **Scientia Agricola** **68**: 431-439.

- Souza MH, Pereira Júnior JD, Steckling SDM, Mencialha J, Dias FS, Rocha JRASC, Carneiro PCS e Carneiro JES (2020) Adaptability and stability analyses of plants using random regression models. **PloS one 15**: e0233200.
- Tyagi PC e Agarwal MC (1995) Phenotypic stability for seed yield in pigeonpea. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 55**: 148-150.
- Vales MI, Srivastava RK, Sultana R, Singh S, Singh I, Singh G, Patil SB e Saxena KB (2012) Breeding for earliness in pigeonpea: Development of new determinate and nondeterminate lines. **Crop science 52**: 2507-2516.
- van der Maesen LJG (1990) Pigeonpea origin, history, evolution, and taxonomy. In: Nene YL, Hall SD e Sheila VK (eds) **The Pigeonpea**. CAB International, Wallingford, p 15-46.
- van der Maesen LJG e Remanandan P (1986) Germplasm collection, evaluation and utilization. In Tikka SBS (ed) **Pigeonpea genetics and improvement**. Sharda Publishing Academy, Gujarat, p. 3-29.
- van der Maesen LJG e Somaatmadja S (1989) **Plant Resources of South-East Asia**. Pudoc, Wageningen, 105p.
- Varshney RK, Chen W, Li Y, Bharti AK, Saxena RK, Schlueter JA, Donoghue MTA, Azam S, Fan G, Whaley AM, Farmer AD, Sheridan J, Iwata A, Tuteja R, Penmetsa RV, Wu W, Upadhyaya HD, Yang SP, Shah T, Saxena KB, Michael T, McCombie WR, Yang B, Zhang G, Yang H, Wang J, Spillane C, Cook DR, May GD, Xu X e Jackson SA (2012) Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. **Nature Biotechnology 30**: 83-89.
- Varshney RK, Graner A e Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology 23**: 48-55.
- Varshney RK, Saxena RK e Jackson SA (2017) The Pigeonpea Genome: An Overview. In Varshney RK, Saxena RK e Jackson S (eds) **The Pigeonpea Genome. Compendium of Plant Genomes A book series (CPG)** Springer, Cham, p. 1-4.
- Vasconcelos ES, Reis MS, Cruz CD, Sedyama T e Scapim CA (2011) Integrated method for adaptability and phenotypic stability analysis. **Acta Scientiarum. Agronomy 33**: 251-257.

- Visscher PM, Hill WG e Wray NR (2008) Heritability in the genomics era—concepts and misconceptions. **Nature reviews genetics** 9: 255-266.
- Viteri DM, Bosques A, Linares AM, Huynh B, Roberts PA, Sarmiento L e Pérez M (2020) Registration of photoperiod insensitive pigeonpea cultivar 'Lázaro'. **Journal of Plant Registrations** 14: 97-101.
- Wanjari KB, Raje RS, Durgesh K, Prashat GR e Joshi R (2016) Pigeonpea improvement through conventional breeding. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding** 76: 483-495.
- Winter P, Kahl G (1995) Molecular marker technologies for plant improvement. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 11: 438-448.
- Xu Y (2010) **Molecular plant breeding**. Cabi, Wallingford, 734p.
- Yan W, Hunt LA, Sheng Q e Szlavnic Z (2000) Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. **Crop science** 40: 597-605.
- Yohane EN, Shimelis H, Laing M, Mathew I e Shayanowako A (2021) Genotype-by-environment interaction and stability analyses of grain yield in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science** 71: 145-155.
- Yokomizo GK-I, Duarte JB, Vello NA e Unfried JR (2013) Análise AMMI da produtividade de grãos em linhagens de soja selecionadas para resistência à ferrugem asiática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 48: 1376-1384.
- Zobel RW, Wright MJ e Gauch Jr HG (1988) Statistical analysis of a yield trial. **Agronomy journal** 80: 388-393.

CAPÍTULO II

Diversidade e estrutura genética de acessos de guandu usando *loci* de microssatélites

**Artigo publicado na revista
Genetics and Molecular Research
(ISSN 16765680)**

ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS DE DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM ACESSOS DE GUANDU USANDO LOCI DE MICROSSATÉLITES

Antonio Elton da Silva Costa¹; Carlos Antônio Fernandes Santos²

¹Engenheiro-agrônomo, Doutorando em Melhoramento de Plantas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Petrolina, PE

²Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE

Autor correspondente: carlos-fernandes.santos@embrapa.br

RESUMO

O guandu é uma cultura subutilizada no Brasil, mas com demanda crescente para produção de grãos e forragem. Parâmetros de diversidade e estrutura populacional em 73 acessos de guandu, de 10 procedências, sendo sete do Nordeste e uma do Sudeste do Brasil, uma da América Central e outra da Índia, foram estimados no presente estudo, para orientar programas de recursos genéticos e melhoramento da espécie. Diversidade e polimorfismo alélico, análise molecular de variância (AMOVA), análise alélica Bayesian (Structure) e dendrograma foram estimados com 11 *loci* de microssatélites, distribuídos nos 11 cromossomos de guandu. A AMOVA revelou grande diferenciação genética entre as populações de guandu, com F_{ST} variando de 0,22 a 0,25. A heterozigosidade esperada (H_E) nos acessos foi maior que a heterozigosidade observada (H_O) em oito dos 11 *loci*, com H_O variando de 0,06 a 0,55. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,13 a 0,67 entre os 11 *loci*. A similaridade genética entre os acessos de guandu variou de 0,36 a 0,93, indicando alta variabilidade entre os acessos, com a formação de três grupos, sendo um exclusivamente com acessos brasileiros. Dois grupos foram formados na análise no Structure, indicando reduzido compartilhamento alélico entre as populações do nordeste do Brasil com as demais populações. Os resultados realçam a importância da incorporação do germoplasma do nordeste do Brasil em programas de melhoramento dessa leguminosa, bem como o aumento da variabilidade de coleções de germoplasma com a ampliação da coleta de acessos em outras regiões do nordeste do Brasil.

Palavras-chave: Análise bayesiana; *Cajanus cajan*; Dendrograma; Leguminosa para grão seco; Nordeste brasileiro; andu.

GENETIC DIVERSITY AND STRUCTURE OF PIGEONPEA GERMPLOSM ASSESSED BY MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

Pigeonpea is an important grain legume in different regions of the world. Pulse cultivated mainly by small farmers in many semi-arid tropical regions, pigeonpea has various purposes, including food security, livestock feed and agroforestry systems. Parameters of genetic diversity and structure in 73 pigeonpea accessions from 10 origins were estimated in the present study, to guide genetic resources and crop breeding. Allelic diversity and polymorphism, molecular analysis of variance (AMOVA), Bayesian analysis (Structure) and dendrogram were estimated with 11 microsatellite *loci*. AMOVA revealed wide genetic differentiation among pigeonpea populations, with F_{ST} ranging from 0,22 to 0,25. Expected heterozygosity (H_E) in the accessions was greater than the heterozygosity observed (H_O) in eight of the 11 *loci*, with H_O ranging from 0,06 to 0,55. Polymorphic information content ranged from 0,13 to 0,67 among the 11 *loci*. Genetic similarity among pigeonpea accessions ranged from 0,26 to 0,93, indicating high variability among them, with the formation of three groups, one including all Brazilian accessions. Two groups were formed in the Structure analysis, indicating reduced allele sharing between the populations of Northeast Brazil and other populations. Results highlight the importance of incorporating germplasm from Brazilian Northeast into pigeonpea breeding programs, as well as increasing the variability of germplasm collections expanding accessions collected in other areas of Northeast Brazil.

Key words: Bayesian analysis; Brazil Northeast; *Cajanus cajan*; Dendrogram; Pulses; Redgram

INTRODUÇÃO

O guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh), como outras *pulses*¹ da família Fabaceae, é uma importante fonte de proteínas, principalmente para pessoas de baixa renda, que não têm acesso às proteínas de origem animal. Evidências arqueológicas indicam que o guandu é nativo do sul da Ásia, mais precisamente das regiões de Orissa, Northern Andhra, Chattisgarh, na Índia (Fuller e Harvey 2006). Do sul da Ásia, o guandu foi disseminado para o restante da Ásia e introduzido na África, de onde foi levado para o continente americano durante o tráfico de escravos (Godoy et al. 2013). O guandu é uma espécie diploide ($2n = 2x = 22$), formado por 833,1 milhões de pares de bases (Mpb) (Varshney et al. 2012).

Essa leguminosa é a sexta *pulse* de importância mundial, com produção de 6,81 mi de t, em 2017, em área 7,02 mi de ha, sendo que a Índia (71,5%), Mianmar (11,7%) e Malawi (6,9%) responderam por 90,1% dessa produção (FAOSTAT 2020). No Nordeste brasileiro, o guandu tem importância localizada em áreas de transição do semiárido para o agreste ou em áreas de altitude elevada (Santos et al. 1994). No Brasil não existem dados oficiais de área e produção do guandu. As cultivares recomendadas ou registradas de guandu no Brasil são resultantes da seleção de linhagens dentro de populações (Godoy et al. 2013) ou introduções de germoplasma de outros países (Santos et al. 1999), sendo que programas de melhoramento, envolvendo hibridações manuais e seleção de linhagens, são inexistentes (Godoy et al. 2013). No Brasil existem raros bancos de germoplasma dessa leguminosa, com destaque para quase 400 acessos disponíveis na Embrapa Semiárido.

O guandu é uma cultura resiliente às limitações ambientais e mudanças climáticas, cultivado principalmente em regiões semiáridas (Varshney et al. 2017), sendo que no Brasil é usado para produção de grãos e com demanda crescente para produção de forragem (Santos et al. 2000). Adicionalmente, é uma espécie que tem a habilidade de retirar fósforo ligado ao ferro em solos do semiárido pobres nesse elemento, no qual espécies como sorgo e milho não retiram, sendo essa capacidade atribuída ao ácido piscídico e seus derivados (Ae et al. 1990).

Estimativas de parâmetros de diversidade genética em coleções de germoplasma são importantes para programas de melhoramento, sendo que com o advento de marcadores moleculares essas estimativas foram facilitadas, com preferência para microssatélites, devido ao multialelismo, abundância e codominância

¹ Termo em inglês usado para descrever entre as leguminosas, aquelas colhidas unicamente para consumo como grãos secos

(Sharma et al. 2018). Odeny et al. (2009) identificaram 35 *loci* de microssatélites polimórficos em 24 linhagens de guandu. Saxena et al. (2010) identificaram outros 13 microssatélites polimórficos em 32 cultivares e oito genótipos silvestres de guandu. Bohra et al. (2011) identificaram 842 microssatélites polimórficos em um conjunto de 22 genótipos de guandu. Sarika et al. (2013) disponibilizaram base de dados de 123387 microssatélites identificados no genoma do guandu, que precisaram ser validados.

Estimativas de diversidade genética usando microssatélites em guandu foram reportadas por Zavinon et al. (2020) em 77 *landraces* do Benin, usando 30 *loci*, por Sharma et al. (2018) em 96 acessos indianos, usando 33 *loci*, por Manju et al. (2017) em 40 genótipos indianos, usando 65 *loci*, Durgesh et al. (2015) em 73 genótipos indianos e linhagens interespecíficas de *Cajanus* spp., usando 43 *loci*, e Kumari et al. (2014) em 51 acessos de guandu indiano e sete espécies silvestres de *Cajanus* spp., usando 40 *loci*. No Brasil, Sousa et al. (2011) estimaram a diversidade em 77 acessos de guandu adaptados à região sul-sudeste, usando 43 *loci*. No entanto, ainda falta um estudo compressivo do germoplasma brasileiro do guandu.

Assim, o objetivo desse estudo foi estimar parâmetros de diversidade e estrutura genética em 73 acessos de guandu de 10 procedências, incluindo oito do Brasil, utilizando *loci* microssatélites para orientar programas de recursos genéticos e melhoramento da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal e Extração de DNA

Foram avaliados 73 acessos de guandu, procedentes de 10 regiões, sendo sete do Nordeste e uma do Sudeste do Brasil, uma da Índia e outra do escritório da FAO na América Central (Caribe): Abaíra, BA (6 acessos), Anagé, BA (7 acessos), Índia (9 acessos), Jacobina e Saúde, BA (9 acessos), Mairi, BA (6 acessos), Moreilândia e Exu, PE (8 acessos), Seabra, BA (5 acessos), Triunfo, PE (7 acessos), São Carlos, SP (9 acessos) e América Central (7 acessos) (Fig. 1). Os acessos brasileiros são resultantes de coletas de germoplasma realizadas no Nordeste de acessos do Sudeste, procedentes da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Os acessos de origem indiana são procedentes do International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). Todos os acessos estão preservados no Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido em Petrolina - PE.

Foram coletadas amostras foliares de plantas jovens de todos os acessos e armazenadas a -80°C até o momento da extração de DNA. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo Doyle e Doyle (1990) com algumas modificações: as centrifugações foram realizadas a 10000 rpm, concentração de beta mercaptoetanol a 2%, e tempo de incubação das amostras por 30 min a 60°C . Após ressuspensão do sedimento final em tampão TE (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM), a solução de DNA foi tratada com RNase para remover RNAs co-isolados. A quantificação e a integridade do DNA foram verificadas em gel de agarose 0,8%, seguido de diluição do DNA genômico a 40 ng mL^{-1} .

PCR e amplificação dos microssatélites

Loci de microssatélites desenvolvidos por Bohra et al. (2011) foram usados para genotipagem de todos os acessos. *Screening* inicial foi realizado com conjunto de 42 *loci* (Anexo 1) para identificação de um *locus* polimórfico por grupo de ligação do guandu ($n=11$) (Tabela 1), conforme mapa publicado por Bohra et al. (2012). As reações em cadeia da polimerase (PCRs) para amplificações dos *loci* foram realizadas para o volume final de reação 12 μL contendo 1x do tampão de PCR, 2 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de dNTPs, 5 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ DNA, 0,2 μM de cada *primer* e 0,1 U de Taq DNA polimerase.

Os fragmentos de DNA foram amplificados usando o programa *touchdown* de PCR (Termociclador Biometra, modelo-T1 Thermoblok): desnaturação inicial de 5 min a 95°C , seguido por cinco ciclos de desnaturação por 20s a 94°C , anelamento por 20s de acordo com a temperatura de cada par de 'primers' (Tabela 1), sendo a temperatura de anelamento reduzida em 1°C por ciclo, e extensão por 30s a 72°C . Posteriormente, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 20s, seguidos de anelamento por 20s na temperatura de cada par de 'primers' e extensão por 30s a 72°C e 15 min de extensão final a 72°C . Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturada a 6% em placa de vidro tipo sanduíche de 60 poços. Para visualização dos produtos de PCR, os géis foram corados em nitrato de prata (Creste et al. 2001).

Análises dos dados moleculares

Foram selecionados *loci* de microssatélites que apresentaram polimorfismo de fácil visualização e interpretação. Os dados genotípicos de cada acesso foram submetidos às análises para estimativas de parâmetros de diversidade genética:

maior frequência de alelos (MAF), número de genótipos (NG), número de alelos (NA), número de alelos privados (NAP), diversidade de genes (DG), heterozigosidade esperada (HE), heterozigosidade observada (HO) e conteúdo de informação polimórfica (PIC), disponíveis no software PowerMarker (Liu e Muse 2005) e no macro de Excel GenAlEx (Peakall e Smouse 2006).

Dados dos *loci* de microssatélites foram codificados para presença (1) ou ausência (0) para estimar as relações genéticas entre os acessos de guandu, com dendrograma construído pelo método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*), com base no coeficiente de similaridade de Jaccard. O ajuste do dendrograma foi avaliado pela correlação cofenética, ou seja, a correlação entre a distância real e as distâncias representadas graficamente, no software NTSYSpc (Rohlf 2000).

Análise de variância molecular (AMOVA), sem estrutura regional dos dados e com a decomposição da variação genética total entre populações, entre indivíduos e dentro de indivíduos, por meio dos quadrados médios, foi realizada no software GenAlEx (Peakall e Smouse 2006), com a opção 'Codom-Allelic' para estimar F_{ST} . As significâncias das estimativas de F_{ST} e número de migrantes (N_m) foram obtidas pelo método de randomização, com 9999 permutações.

A estrutura alélica de cada acesso de uma população foi avaliada pelo método de agrupamento bayesiano com o software Structure (Pritchard et al. 2009). A análise bayesiana foi realizada com *burn-in* de 50000 iterações e 100000 simulações do método de Monte Carlo com Cadeia Markov (MCMC). Uma série contínua de K foi testada, de 1 a 10, em 10 execuções, frequências de alelos correlacionados e modelo de mistura (*admixture model*). Foram introduzidos dados de conhecimento prévio sobre a origem da população, subdividindo os acessos em dez grupos iniciais, de acordo com os locais de coleta. A determinação do valor mais provável de K foi realizada usando a estatística *ad hoc* ΔK , que é baseada na taxa de variação da probabilidade logarítmica dos dados em relação ao número de grupos inferidos pelo Structure (Evanno et al. 2005). Definido o K, a estrutura da população foi inferida por meio de uma nova execução no mesmo software, desta vez usando um período de *burn-in* de 50000 e um comprimento de execução de 500000 repetições de MCMC com o mesmo modelo mencionado acima. Para a apresentação gráfica dos resultados da estrutura das populações foi utilizado o servidor Clumpak (Kopelman et al. 2015).

RESULTADOS

Diversidade genética e análise UPGMA

Foi identificado pelo menos um *locus* de microssatélite nos 11 grupos de ligações genéticas do guandu (Tabela 1), entre os 42 *loci* avaliados inicialmente. Quarenta alelos (NA) foram revelados pelos 11 *loci* de microssatélites nos 73 acessos de *C. cajan* (Tabela 2), com média de 3,64 alelos por *locus*. A maior frequência de alelos (MFA) variou de 0,39 (CcM1962) a 0,92 (CcM402), com média por *locus* de 0,56. O número de alelos efetivos (NE) variou entre 1,14 (CcM402) a 2,29 (CcM492) com valor médio de 1,78. O número de genótipos (NG) foi de 78 com média de 7,09 por *locus*, com o menor número de genótipos nos *loci* CcM402, CcM1791 e CcM2911, 3, e o maior número de genótipos, 12, nos *loci* CcM492 e CcM1962. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,13 (CcM402) a 0,67 (CcM1962) entre os 11 *loci*, com valor médio de 0,46. A média da diversidade de genes (DG) foi de 0,53, com menor valor no *locus* CcM402 (0,14), e o maior no *locus* CcM1962 (0,72) (Tabela 2).

A heterozigosidade esperada (H_E) nos acessos foi maior que a heterozigosidade observada (H_o) em oito dos 11 *loci*. Os valores de H_o variaram de 0,06 (CcM402) a 0,55 (CcM2542), com média de 0,32 entre os *loci*. Para os valores de H_E a variação foi de 0,08 (CcM402) a 0,53 (CcM492) com média de 0,38 (Tabela 2). Alelos privados (NPA) foram observados em três *loci*, CcM1573, CcM1962 e CcM2542, com um, seis e quatro alelos, respectivamente. Nos acessos ICPL 88018, ICPL 90044, ICPL 90046, ICPL 90050, ICPL 90052 e ICP 2582 foram encontrados um ou mais alelos privados dos 11 alelos privados identificados nos 73 acessos de guandu encontrados em três *loci*. Todos os alelos privados foram identificados em acessos de origem indiana.

A similaridade genética entre os acessos das 10 populações de guandu variou de 0,26 a 0,93 indicando alta variabilidade entre os acessos avaliados (Fig. 2). No ponto de corte de 0,30 é possível observar a formação de três grupos: um grupo com todos os acessos brasileiros, o segundo grupo com o acesso UW10 (América Central) e ICPL 88018 (Índia) e o terceiro grupo com acessos de origem indiana (Fig. 2). As maiores similaridades (0,93) foram observadas entre os acessos Jacobina51 e Jacobina56 e entre os acessos Morelandia19 e Exu25 (Fig.2). Os menores coeficientes de similaridades foram observados com sete acessos de origem indiana (Fig. 2). A correlação cofenética de 0,82 indica moderado ajuste entre a distância real e as distâncias representadas graficamente.

Estrutura populacional por análise molecular de variância e bayesiana

A análise de variância molecular (Amova) revelou grande diferenciação genética entre as 10 populações de guandu avaliadas, $F_{ST} = 0,25$ (Tabela 2). Considerando as oito populações brasileiras $F_{ST}=0,23$ e reduzindo para as sete populações amostradas no nordeste brasileiro $F_{ST} = 0,22$ (Tabela 2), também indicando de moderada a alta diferenciação genética (Wright 1978). O número de migrantes (Nm) foi próximo de 0,8 nas três situações analisadas, sendo ligeiramente superior entre os acessos do Nordeste brasileiro (Tabela 2). A maioria dos valores F_{ST} das populações foram significativas, indicando diferenciação de moderada a elevada entre pares de populações de guandu, exceto para populações amostradas em Seabra, BA x Abaíra, BA, Abaíra, BA x Triunfo, PE e Abaíra, BA x São Carlos, SP (Tabela 3).

O número de subpopulações sugeridas nas análises bayesianas, nos softwares Structure e Structure Harvester foi $K = 2$ (Figura 3), indicando que as populações de guandu foram divididas em um grupo com acessos com longa adaptação no Brasil e outro grupo com acessos da América Central e acessos indianos. A estrutura genética indica compartilhamento de alelos entre acessos de São Carlos, SP, América Central e Índia e ausência de compartilhamento de alelos nos acessos coletados no nordeste do Brasil, com algumas exceções em Mairi, BA, Anagé, BA e Abaíra, BA (Fig. 3).

DISCUSSÃO

O guandu é uma cultura subutilizada no Brasil, sem dados oficiais e com cultivo limitado a algumas regiões brasileiras, refletindo no número reduzido de acessos preservados em bancos de germoplasma, existentes quase que exclusivamente nas unidades da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, e Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. O presente estudo considera, de forma pioneira, o mais amplo estudo com acessos do Nordeste do Brasil, amostrado em regiões onde o cultivo da leguminosa é expressivo, comparando a sua estrutura e evolução populacional com germoplasma de duas importantes regiões do mundo de cultivo do guandu: Índia e América Central.

Análise UPGMA do presente estudo, com 73 acessos de origem indiana, caribenha e brasileira, indica alta similaridade genética, variando de 0,26 a 0,93, corroborando com as estimativas de Manju et al. (2017), que variou de 0,45 a 0,93 em 40 acessos indiano. Similaridade genética menor foi reportada por Sharma et al. (2018), variando de 0,2 a 0,32 em 96 acessos indianos, e por Songok et al. (2010), variando de 0,1 a 0,45 em 88 acessos de origem indiana e do leste da África. A análise

UPGMA do presente estudo indica a realização de cruzamentos entre acessos dos três diferentes grupos identificados, com destaque para cruzamentos de acessos de origem indiana com acessos de longa adaptação no Brasil. Os acessos de origem indiana apresentam como características principais a precocidade e o porte reduzido, enquanto acessos brasileiros apresentam grãos e vagens de maior tamanho.

Os 11 *loci* identificados no presente estudo podem ser empregados para estimativas de diversidade genética e estrutura populacional, pois apresentaram PIC superior a 0,33. Com exceção do CcM402, no grupo de ligação sete, que deve ser substituído por outro *locus*, nesse grupo de ligação, de maior PIC. Como discutido por Hamilton (2009), com a aplicação de *loci* não-ligados ou em diferentes cromossomos, associado com a frequência alélica, é possível identificar plantas ou linhagens homozigotas únicas entre bilhões de outras, tornando essas estimativas de extrema valia em melhoramento vegetal e mesmo em disputas comerciais. Sharma et al. (2018) analisaram acessos de guandu com 44 *loci* microssatélites distribuídos nos 11 grupos de ligações, sendo que destes apenas o CcM 0402 é comum ao *loci* avaliados no presente estudos, indicando a necessidade de padronização de *loci* para estudos populacionais na espécie.

O número de alelos *locus* no presente estudo variou entre dois e seis alelos, com média de 3,64, sendo superior à média de 1,7 reportada Petchiammal et al. (2015), e inferior à média de 5,4 reportada por Sousa et al. (2011). A média de diversidade de genes de 0,53 é superior à média reportada por Bohra et al. (2017), refletindo a estreita base genética do germoplasma de guandu. A heterozigosidade observada (0,32) foi inferior à esperada (0,37), típico de espécies que tem alta frequência de autofecundação. Sousa et al. (2011) também reportaram deficiência de heterozigotos em estudos com germoplasma de guandu.

Os valores do PIC dos *loci* de microssatélites variaram entre 0,13 e 0,67, com a maioria dos primers usados, exceto o CcM402, classificados, segundo Botstein et al. (1980), como razoavelmente ou altamente informativos (Tabela 2), sendo sugeridos para estudos de diversidade genética populacional em guandu. De acordo com Serrote et al. (2020) quanto maior o PIC maior é a capacidade de detecção de polimorfismo de um *locus* microssatélite.

A proporção de alelos raros observados no presente estudo foi inferior à de outros estudos que avaliaram a abundância de alelos. Songok et al. (2010) relatam a existência de 39% de alelos classificados com raros em guandu. De acordo com Dwivedi et al. (2017) essa classe de alelos, com frequência inferior a 5%, apesar de

terem menor probabilidade de controlar característica agronômicas de interesse, persistem mesmo com a seleção natural ou humana e são alelos potenciais em populações naturais para algumas características menos comuns nas plantas domesticadas.

A F_{ST} variou de 0,22 a 0,25 nas populações de guandu, considerando todas as populações ou com redução para os acessos amostrados no nordeste brasileiro, indicando alta diferenciação genética entre as populações analisadas, sendo sugeridas amostragens de outras regiões brasileiras, e principalmente, de outras regiões do Nordeste do Brasil, para aumentar a variabilidade do germoplasma do guandu. Baixa a moderada diferenciação entre populações de guandu tem sido reportada por Kumari et al. (2014) ($F_{ST}=0,17$), por Zavinon et al. (2020) ($F_{ST}=0,12$), enquanto Saxena et al. (2014) reportaram alta diferenciação entre populações de diferentes regiões ($F_{ST}=0,36$), corroborando com o presente estudo.

O número de migrantes (Nm) estimado no presente estudo foi baixo, em torno de 0,8, nas três situações, todas as populações, populações brasileiras e populações do nordeste do Brasil, indicando fluxo gênico limitado entre elas. Zavinon et al. (2020) estimaram Nm de 17,0 com *loci* de microssatélites e 1,6 com *loci* de *single nucleotide polymorphisms* (SNP). Para Wang (2004), uma regra geral amplamente aceita pela comunidade de conservação é que um migrante por geração em uma população é o nível apropriado de fluxo gênico.

A formação de apenas dois grupos na análise bayesiana indica o compartilhamento de alelos, indicados na cor azul no gráfico (Fig. 3), entre os acessos de São Carlos, SP (Sudeste do Brasil), América Central e Índia, enquanto os acessos coletados no Nordeste brasileiro compartilham diferentes alelos (cor laranja, Fig. 3), com algumas exceções na região de Mairi, Abaíra e Anagé. As regiões de Jacobina, Seabra, Triunfo e Moreilândia apresentam perfil único, com pouco compartilhamento com acessos indiano, que é o centro de origem do guandu (Fuller e Harvey 2006). Esse resultado é inesperado e novas investigações são sugeridas para avaliar a origem e evolução do germoplasma dessas regiões do Nordeste brasileiro.

O germoplasma de guandu do Nordeste do Brasil tem longo processo de adaptação às condições tropicais e semiáridas, com seleções realizadas pelos produtores principalmente para porte semi-arbóreo, maior peso de 100 grãos, maior comprimento de vagens e produção de forragem, tornando importante a incorporação desse germoplasma em melhoramento dessa leguminosa, pelo menos nas condições brasileiras (Santos et al. 1999).

CONCLUSÕES

Os acessos de guandu avaliados possuem estrutura genética populacional com diferenciação moderada a alta, fluxo gênico limitado e compartilhamento de alelos restrito entre populações do Nordeste do Brasil com populações da Índia, São Paulo, SP e América Central. Os acessos coletados no Nordeste são alternativas para aumentar a variabilidade do germoplasma do guandu. Novas expedições de coleta nos locais de origem dessas populações avaliadas e em outras regiões do Nordeste do Brasil poderiam ser realizadas com o objetivo de aumentar o número de amostras e prováveis alelos de interesse para o melhoramento genético de guandu.

REFERÊNCIAS

- Ae N, Arihara J, Okada K, Yoshihara T e Johansen C (1990) Phosphorus uptake by pigeonpea and its role in cropping systems of the Indian subcontinent. **Science** **248**:477-480.
- Bohra A, Dubey A, Saxena RK, Penmetsa RV, Poornima KN, Kumar N, Farmer AD, Srivani G, Upadhyaya HD, Gothwal R, Ramesh S, Singh D, Saxena K, Kishor PBK, Singh NK, Town CD, May GD, Cook DR e Varshney RK (2011) Analysis of BAC-end sequences (BESs) and development of BES-SSR markers for genetic mapping and hybrid purity assessment in pigeonpea (*Cajanus* spp.). **BMC Plant Biology** **11**:56.
- Bohra A, Saxena RK, Gnanesh BN, Saxena K, Byregowda M, Rathore A, KaviKishor PB, Cook DR e Varshney RK (2012) An intra-specific consensus genetic map of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] derived from six mapping populations. **Theoretical and Applied Genetics** **125**:1325-1338.
- Botstein D, White RL, Skolnick M e Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics** **32**:314.
- Creste S, Neto AT e Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter** **19**:299-306.
- Doyle JJ e Doyle JD (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** **12**:39-40.

- Durgesh K, Raje RS, Singh AK, Singh AM, Pandey A e Singh NK (2015) Assessment of genetic diversity based on agro-morphological traits and genic microsatellite markers in inter-specific derivatives and cultivars of pigeonpea. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding** **75**:215-224.
- Dwivedi SL, Scheben A, Edwards D, Spillane C e Ortiz, R (2017) Assessing and exploiting functional diversity in germplasm pools to enhance abiotic stress adaptation and yield in cereals and food legumes. **Frontiers in Plant Science** **8**:1461.
- Evanno G, Regnaut S e Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology** **14**:2611-2620.
- FAOSTAT (2020) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acessado em 15 december 2020.
- Fuller DQ e Harvey EL (2006) The archaeobotany of Indian pulses: identification processing and evidence for cultivation. **Environmental archaeology** **11**:219-246.
- Godoy R, Souza FHD e Santos PM (2013) Pigeonpea selection and breeding. In Jank L, Chiari L, Valle CB, Simeão RM (eds.) **Forage breeding and biotechnology**, Embrapa, Brasília.
- Hamilton MB (2009) **Population genetics**. Wiley-Blackwell, Chichester, 407p.
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA e Mayrose I (2015) Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources** **15**:1179-1191.
- Kumari R, Agrawal K e Bhat KV (2014) Analysis of genetic diversity and its stratification in pigeonpea germplasm using BES-derived microsatellite markers. **Indian Journal of Biotechnology** **13**:473-485.
- Liu K e Muse SV (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics** **21**:2128-2129.

- Manju Y, Kumar YY, Pushpendra K, Kumar SR, Renu Y, Pawan K, Shaily J, Mahesh R, Neelam Y, Upadhyaya HD e Rajendra K (2017) Molecular diversity analysis as an improvement tool for pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.)]. **Research Journal of Biotechnology** 12:75-86.
- Odeny DA, Jayashree B, Gebhardt C e Crouch J (2009) New microsatellite markers for pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). **BMC Research Notes** 2:35.
- Peakall R e Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** 6:288-295.
- Petchiammal KI, Muthiah AR e Jayamani P (2015) Molecular characterization of cultivated and wild *Cajanus* species using Simple Sequence Repeat markers. **Legume Research-An International Journal** 38:742-747.
- Pritchard JK, Stephens M e Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155:945-959.
- Rohlf FJ (2000) **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.10**. Exeter Publishing, Setauket.
- Santos CAF, Menezes EA e Araújo FP (1999) Introdução coleta e caracterização de recursos genéticos de guandu para produção de grãos e forragem. In Queiroz MA, Goedert CO, Ramos SRR, (orgs) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste**. Embrapa, Petrolina. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104415/1/Carlos-Antonio.pdf>.
- Santos CAF, Menezes EA, Araújo FP (1994) Divergência genética em acessos de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 29:1723-1726.
- Sarika AV, Iquebal MA, Rai A e Kumar D (2013) PIPEMicroDB: microsatellite database and primer generation tool for pigeonpea genome. **Database** 2013:bas054.
- Saxena RK, Prathima C, Saxena KB, Hoisington DA, Singh NK e Varshney RK (2010) Novel SSR markers for polymorphism detection in pigeonpea (*Cajanus* spp.). **Plant Breeding** 129:142-148.

- Saxena RK, Von Wettberg E, Upadhyaya HD, Sanchez V, Songok S, Saxena K, Kimurto P e Varshney RK (2014) Genetic diversity and demographic history of *Cajanus* spp. illustrated from genome-wide SNPs. **PLoS One** **9**:e88568.
- Serrote CML, Reiniger LRS, Silva KB, Rabaiolli SMS e Stefanel CM (2020) Determining the Polymorphism Information Content of a Molecular Marker. **Gene** **726**:144175.
- Sharma P, Singh I, Sirari A, Singh S e Khosla G (2018) Genetic divergence studies through microsatellite markers in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L) Millsp.]. **Legume Research-An International Journal** **43**:312-319.
- Songok S, Ferguson M, Muigai AW e Silim S (2010) Genetic diversity in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] landraces as revealed by simple sequence repeat markers. **African Journal of Biotechnology** **9**:3231-3241.
- Sousa ACBD, Godoy R, Sforça DA, Campos TD, Zucchi MI, Jank L e Souza APD (2011) Genetic diversity analysis among pigeonpea genotypes adapted to South American regions based on microsatellite markers. **Scientia Agricola** **68**:431-439.
- Varshney RK, Chen W, Li Y, Bharti AK, Saxena RK, Schlueter JA, Donoghue MTA, Azam S, Fan G, Whaley AM, Farmer AD, Sheridan J, Iwata A, Tuteja R, Penmetsa RV, Wu W, Upadhyaya HD, Yang SP, Shah T, Saxena KB, Michael T, McCombie WR, Yang B, Zhang G, Yang H, Wang J, Spillane C, Cook DR, May GD, Xu X e Jackson SA (2012) Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. **Nature Biotechnology** **30**:83–89.
- Varshney RK, Saxena RK e Jackson SA (2017) The Pigeonpea Genome: An Overview. In Varshney RK, Saxena RK, Jackson S (eds) **The Pigeonpea Genome. Compendium of Plant Genomes A book series (CPG)**. Springer, Cham, p. 1-4.
- Wang J (2004) Application of the One-Migrant-per-Generation Rule to Conservation and Management. **Conservation Biology** **18**:332-343.

Wright S (1978) **Evolution and the Genetics of Population, Variability within and among Natural Populations**. University of Chicago Press, Chicago.

Zavinon F, Adoukonou-Sagbadja H, KeilWagen J, Lehnert H, Ordon F e Perovic D (2020) Genetic diversity and population structure in Beninese pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Huth] landraces collection revealed by SSR and genome wide SNP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution** 67:191-208.

Tabela 1. Grupo de ligação (GL), temperatura de anelamento (Ta) e parâmetros genéticos estimados em 73 acessos com base em 11 *loci* microssatélites desenvolvidos para guandu.

Loci	GL	Ta (°C)	MAF	NG	NA	NAP	NE	Ho	HE	PIC
CcM2485	1	60	0,76	9	4	0	1,49	0,16	0,21	0,37
CcM492	2	59	0,40	12	6	0	2,29	0,45	0,52	0,65
CcM1791	3	64	0,60	3	2	0	1,72	0,41	0,41	0,36
CcM1962	4	59	0,39	12	6	6	2,24	0,25	0,50	0,67
CcM810	5	59	0,44	6	3	0	1,95	0,25	0,45	0,55
CcM2542	6	59	0,45	8	4	4	1,99	0,55	0,46	0,53
CcM402	7	64	0,92	3	2	0	1,14	0,06	0,08	0,13
CcM2911	8	60	0,69	3	2	0	1,34	0,19	0,24	0,33
CcM126	9	61	0,54	11	5	0	1,92	0,28	0,40	0,58
CcM1573	10	64	0,49	5	3	1	1,71	0,50	0,40	0,40
CcM2735	11	59	0,48	6	3	0	1,65	0,45	0,36	0,48
Total				78	40	11				
Média			0,56	7,09	3,64	1	1,77	0,32	0,37	0,46

*MFA = Maior frequência de alelos; NG = número de genótipos; NA = número total de alelos; NE = Número efetivo de alelos; NAP = número de alelos privados; HE = heterozigosidade esperada; Ho = heterozigosidade observada; PIC = conteúdo de informação polimórfica.

Tabela 2. Análise molecular de variância (AMOVA) em 73 acessos de guandu avaliados com 11 *loci* microsatélite.

Fontes de variação	GL	QM	Variância estimada	Variância total (%)	Estatística F_{ST}	p-valor	Nm
Entre populações	9	14,11	0,78	25	0,25	<0,001	0,73
Entre indivíduos	63	2,82	0,54	18			
Dentro de indivíduos	73	1,74	1,74	57			
Total	145		3,06	100			
Entre populações BR	7	11,36	0,63	23	0,23	<0,001	0,84
Entre indivíduos BR	49	2,40	0,28	10			
Dentro de indivíduos BR	57	1,84	1,84	67			
Total	113		2,75	100			
Entre Populações NE	6	10,15	0,57	22	0,22	<0,001	0,88
Entre indivíduos NE	41	2,30	0,28	11			
Dentro de indivíduos NE	48	1,75	1,75	67			
Total	95		2,60	100			

p-valor baseado em 9999 permutações aleatórias. GL=Graus de liberdade. QM=Quadrado médio. Nm=Número de migrantes. BR=Brasil. NE= Nordeste do Brasil.

Tabela 3. Diferenciação genética (F_{ST}) entre populações pareadas de acessos de guandu de dez origens avaliadas com 11 *loci* microssatélites.

Origem	Anagé	Abaira	Seabra	Jacobina	Mairi	Triunfo	Moreilândia	São Carlos	América Central
Índia	0,20**	0,13**	0,28**	0,34**	0,22**	0,31**	0,34**	0,22**	0,20**
Anagé, BA		0,08*	0,30**	0,32**	0,22**	0,23**	0,25**	0,18**	0,29**
Abaira, BA			0,17**	0,18**	0,07*	0,06*	0,17**	0,12**	0,25**
Seabra, BA				0,12*	0,29**	0,29**	0,26**	0,32**	0,40**
Jacobina, BA					0,27**	0,27**	0,30**	0,29**	0,35**
Mairi, BA						0,22**	0,32**	0,12**	0,33**
Triunfo, PE							0,09*	0,26**	0,41**
Moreilândia, PE								0,35**	0,41**
São Carlos, SP									0,15**

Significância de F_{ST} baseada em 999 permutações, ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$

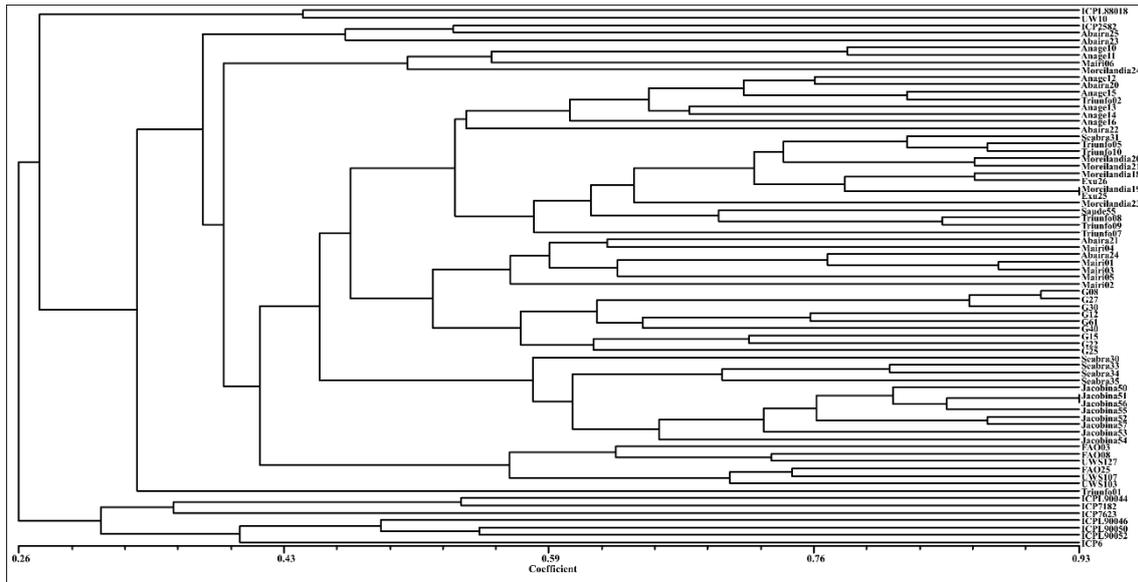


Figura 1. Dendrograma UPGMA do coeficiente de similaridade de Jaccard entre 73 acessos de guandu, de 10 regiões / origens, avaliados com 11 *loci* microssatélites. Correlação cofenética=0,82. Índia (ICPL 88018, ICPL 90044, ICPL 90046, ICPL 90050, ICPL 90052, ICP 6, ICP 2582, ICP 7182 e ICP 7623); Anagé, BA (Anage10, Anage11, Anage12, Anage13, Anage14, Anage15, Anage16); Abaira, BA (Abaira20, Abaira21, Abaira22, Abaira23, Abaira24, Abaira25), Seabra, BA (Seabra30, Seabra31, Seabra33, Seabra34 e Seabra35); Jacobina, BA (Jacobina50, Jacobina51, Jacobina52, Jacobina53, Jacobina54, Jacobina55, Jacobina56, Jacobina57 e Saude55); Mairi, BA (Mairi01, Mairi02, Mairi03, Mairi04, Mairi05 e Mairi06); Triunfo, PE (Triunfo01, Triunfo02, Triunfo05, Triunfo07, Triunfo08, Triunfo09 e Triunfo10); Moreilândia, PE (Moreilandia18, Moreilandia19, Moreilandia20, Moreilandia21, Moreilandia23, Moreilandia24, Exu25 e Exu26); São Carlos, SP (G08, G12, G15, G22, G25, G27, G30, G40 e G61) e; Central América (FAO03, FAO08, UW10, FAO25, UWS103, UWS107 e UWS127).

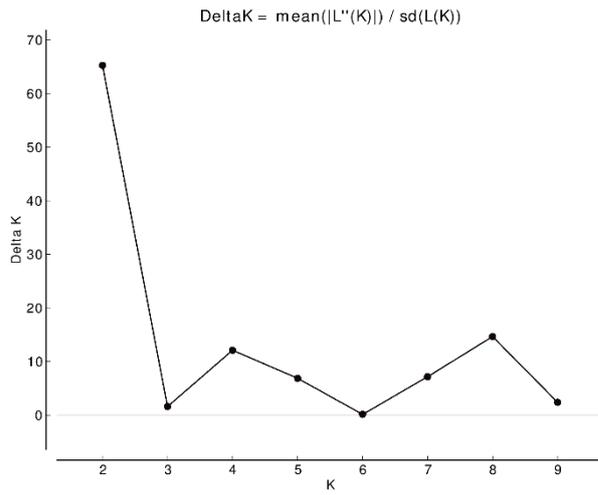


Figura 2. Estimação do número ótimo de clusters (K) de acessos de guandu no STRUCTURE, de acordo com o critério ΔK de Evanno et al. (2005).

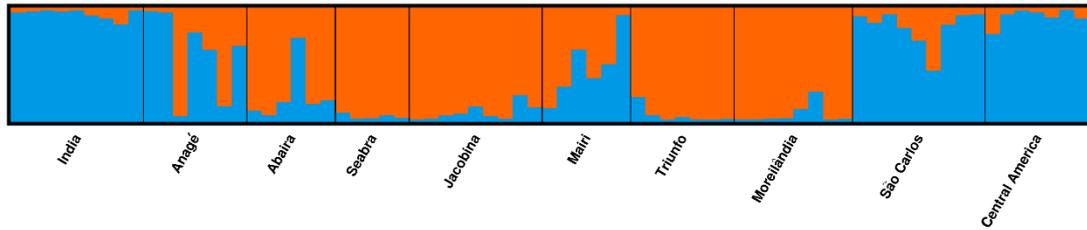


Figura 3. Estrutura genética de 73 acessos de guandu com base em análise Bayesiana, considerando $K=2$ obtida pelo método de ΔK . Cada linha representa um acesso de guandu. Cada cor representa a provável linhagem do conjunto do qual o acesso ou acesso parcial foi derivado. Análise realizada com 11 *loci* microssatélites, no software Structure 2.3.4.

CAPÍTULO III

Herdabilidade em linhagens de quatro gerações de guandu: comparação de estimativas de quatro métodos

**Artigo submetido a revista
Ciência e Agrotecnologia
(ISSN 1981-1829)**

HERDABILIDADE EM LINHAGENS DE QUATRO GERAÇÕES DE GUANDU: COMPARAÇÃO DE ESTIMATIVAS DE QUATRO MÉTODOS

Antonio Elton da Silva Costa^{1*}, Carlos Antonio Fernandes Santos²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, PE

² Embrapa Semiárido. CP 023, CEP: 56302-970, Petrolina, PE, Brasil.

Autor correspondente: carlos-fernandes.santos@embrapa.br

RESUMO

O guandu é espécie de múltiplos usos com importância em regiões semiáridas de diversos países, mas pouco estudada e utilizada no semiárido brasileiro. O objetivo desse estudo foi estimar e comparar herdabilidade usando diferentes métodos, para nove variáveis, em trinta linhagens de guandu das gerações F₃, F₄, F₅ e F₆. As linhagens foram avaliadas em experimento com delineamento em blocos casualizados, com três repetições e parcelas contendo duas linhas de plantio e 20 plantas/parcela. Foram estimadas herdabilidade no sentido amplo pelo método ANOVA [$h^2_{a-E(QM)}$], REML/BLUP (h^2_{a-REML}), regressão pai-filho (h^2_{PF}) e unidade do desvio padrão (h^2_{UP}). As estimativas de $h^2_{a-E(QM)}$ e h^2_{a-REML} foram de magnitude próxima, com valores semelhantes em sete das variáveis analisadas. $h^2_{a-E(QM)}$ e $h^2_{a-REML} > 0,70$ foram estimadas para três duas variáveis em quatro gerações, para duas variáveis em três gerações duas variáveis para duas gerações e duas variáveis para uma geração indicando maior controle genético e facilidade na seleção. Estimativas com base na regressão ou correlação pai-filho apresentaram alguns valores negativos ou superior a unidade, indicando limitações. Correlações $> 0,99$ ($p < 0,01$) entre as herdabilidades estimadas com os métodos ANOVA x REML foram encontradas, indicando concordância. Foi observada ausência de colinearidade entre médias das variáveis com estimativas das h^2 . Correlações de 1,0 ($p < 0,01$) entre herdabilidades x coeficiente de variação genético indicam que esse último parâmetro pode ser usado de forma indireta, na ausência de estimativas de h^2 .

Termos para indexação: *Cajanus cajan*; modelos mistos; quadrado médio esperado; parâmetros genéticos; regressão pai-filho

Heritability in four-generation pigeonpea lines: comparison of estimates from four methods

ABSTRACT

Pigeonpea is a species of multiple uses with importance in semiarid regions of several countries, but is understudied and little used in the Brazilian semiarid region. The aim of this study was to estimate and compare heritability using different methods for nine variables in 30 pigeonpea lines from F₃, F₄, F₅ and F₆ generations. The experiment was conducted in a randomized block design with three replications and plots containing two planting rows 20 plants/plot. Broad-sense heritability was estimated by the ANOVA method [$h^2_{a-E(QM)}$], REML/BLUP approach (h^2_{a-REML}), parent-offspring regression (h^2_{PF}) and standard deviation unit (h^2_{UP}). The estimates of $h^2_{a-E(QM)}$ and h^2_{a-REML} were of close magnitude, with similar values in seven of the analyzed variables. Values of $h^2_{a-E(QM)}$ and $h^2_{a-REML} > 0,70$ were estimated for two variables in four generations, two variables in three generations, in two variables in two generations and one generation for one variable, indicating greater genetic control and ease of selection. Values of h^2_{UP} and h^2_{UP} above 0,70 were estimated for four and five variables, respectively, with negative values observed for P100 in both methods. Estimates based on regression or parent-offspring correlation had some negative values or greater than unity, indicating limitations. Correlations $> 0,99$ ($p < 0,01$) between heritability estimated with the ANOVA × REML methods, indicating agreement. Absence of collinearity between means of variables with estimates of h^2 was observed. Correlations of 1,0 ($p < 0,01$) between heritability × genetic variation coefficient indicate that this last parameter can be used indirectly, in the absence of h^2 estimates.

Index terms: *Cajanus cajan*; genetic parameters; expected mean square; mixed models; parent-offspring regression

INTRODUÇÃO

O guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) é uma leguminosa com importância em alguns países, especialmente para povos de regiões subtropicais e tropicais, devido ao seu teor proteico e rusticidade (Cullis e Kunert 2017). O guandu é predominantemente cultivado na Índia, que responde por cerca de 75% da produção mundial em uma área estimada de 5,6 milhões de hectares (FAO 2019).

Apesar dos avanços obtidos via melhoramento genético na produção global de guandu, pequenos ganhos de produtividade foram obtidos, um dos principais objetivos e desafios para os melhoristas da cultura (Saxena et al. 2021). Estimativas e análises dos parâmetros genéticos importantes na predição de ganhos de produtividade, para seleção de genótipos superiores, têm possibilitado importantes avanços agronômicos de diversas características agronômicas quantitativas (Silva et al. 2018), sendo a herdabilidade um parâmetro fundamental no melhoramento genético clássico.

Embora o termo herdabilidade tenha sido inicialmente usado em 1920 por Sewall Wright (Bell 1977), só em 1940 sua definição foi dada pelo geneticista animal Jay Laurence Lush (Holland et. 2003). A herdabilidade no sentido amplo é a variância genética em relação à variância fenotípica em uma população para uma determinada característica, enquanto no sentido restrito considera apenas a variação nos valores genéticos aditivos, excluindo as variâncias devido a dominância e epistasia (Visscher et al. 2008).

Os principais métodos para estimativas de herdabilidade se enquadram em três estratégias (Brown e Caligari 2008): 1) métodos como função dos componentes de variância, tendo como exemplos a) a esperança dos quadrados médios da análise de variância (ANOVA) e b) os máxima verossimilhança restrita (REML) (Holland et al. 2003). 2) No segundo grupo têm-se os métodos baseados na regressão entre a prole e um, ou ambos pais, com o qual é estimada a herdabilidade no sentido restrito (Smith e Kinman 1965) e a herdabilidade em unidade-padrão, em termos de desvio-padrão (Frey e Horner 1957). E, por último, 3) métodos que expressam efetivamente a herdabilidade realizada com a seleção, que determina o quanto do diferencial de seleção aplicado nas gerações anteriores foi alcançado como uma resposta na progênie avaliada (Holland et al. 2003, Brown e Caligari 2008).

Usando o método ANOVA Obala et al. (2016) estimaram no guandu valores de h^2 no sentido amplo variando de 0,519 para número de nós/planta a 0,999 para dias para florescimento, sendo de particular interesse a h^2 de 0,519 para teor de proteínas nos grãos. Em estudo conduzido com dados de cinco gerações de guandu, Ajay et al.

(2012) estimaram altos valores para herdabilidade e avanço genético em caracteres relacionados à produção, indicando eficácia na seleção realizada. Adotando modelos mistos, Sharma et al. (2019) relataram elevada herdabilidade no sentido amplo (>70%) para a maioria dos caracteres avaliados. Não foram encontrados na literatura estimativas de herdabilidades e outros parâmetros genéticos em populações de guandu conduzidas no nordeste brasileiro ou no Brasil.

O objetivo do presente estudo foi estimar e comparar herdabilidades pelos métodos das esperanças de quadrados médios da ANOVA, regressão pai-filho e máxima verossimilhança restrita (REML), nas gerações F_3 , F_4 , F_5 e F_6 de um cruzamento de guandu granífero para apoiar no desenvolvimento de cultivares da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em área do Campo Experimental Caatinga, na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE (09°09'S, 40°22'W, 365.5 m asl). Foram avaliadas 30 linhagens de diferentes gerações de guandu derivadas do cruzamento ICPL 90045 × UW10: seis linhagens F_3 , e oito linhagens para cada uma das gerações F_4 , F_5 e F_6 . O acesso ICPL 90045 foi desenvolvido pelo ICRISAT como planta extra precoce, com maturação inferior a 90 dias; altura da planta menor do que 100 cm; grãos pequenos, com peso de 100 grãos de ~9 g; média de três grãos por vagem; vagem com ~6 cm. O acesso UW10 foi desenvolvido na Universidade Trinidad-Tobago, e apresenta ciclo superior a 100 dias; grãos maiores com peso 100 grãos de ~11 g, média de cinco grãos por vagem; e vagem com ~6,2 cm de comprimento (Santos et al. 2000).

Para obtenção das sementes das linhagens avaliadas nas gerações F_3 , F_4 , F_5 e F_6 as plantas foram protegidas para evitar possíveis cruzamentos, isolando-as antes da antese com sacos de tecido-não-tecido (TNT). As mudas utilizadas foram obtidas por semeio em bandejas de isopor com 200 células, contendo substrato comercial, com distribuição de duas sementes por célula. As mudas foram transplantadas após desenvolvimento das primeiras folhas definitivas, quinze dias após o semeio. O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizados, com três repetições e vinte plantas por parcelas, distribuídas em duas linhas de 2,5 m de plantio, com cinco covas/linha. Durante a condução do experimento as plantas foram irrigadas por gotejamento, além da realização de tratamentos culturais na área quando necessários, sem aplicação de fertilizantes.

Variáveis analisadas

Os seguintes caracteres foram avaliados: 1) Número de dias até o início da floração na parcela (NIF); 2) Número de dias até a floração de 50% das plantas na parcela (NDF); 3) Número de dias até a maturação (NDM), com 95% das vagens na parcela com coloração marrom, típica das vagens maduras; 4) Altura das plantas na maturação (APM), com medida tomada da base da planta até o término do ramo principal; 5) Comprimento médio de vagem (CDV), avaliado em amostras de cinco vagens tomadas aleatoriamente (mm); 6) Número de vagens por planta (NVP); 7) Número médio de grãos por vagem da amostra (NGV), avaliadas em cinco vagens amostradas ao acaso; 8) peso de 100 sementes (P100), g; 9) Produção de grãos (PROD), peso total de grãos colhidos por planta, g ou kg.

Herdabilidades no sentido amplo ($h^2_{a-E(QM)}$) estimadas usando esperanças de quadrados médios da ANOVA

Os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste Kolmogorov–Smirnov, usando o PROC GLM (SAS, 2015). As variáveis que não atenderam as pressuposições foram transformadas para raiz quadrada (\sqrt{x}). Para APM, NVP, CDV, NGV, P100 e PROD, variáveis com informações dentro de parcelas, os componentes de variância foram calculados com o procedimento PROC VARCOMP (SAS 2015), usando a esperança do quadrado médio esperado, segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + b_j + e_{ij} + \pi_{ijk}$$

em que: Y_{ijk} é o valor observado na k -ésima planta, na j -ésima repetição, do i -ésimo tratamento; μ é a média geral; t_i é o efeito aleatório do i -ésimo tratamento ($i=1, 2, \dots, n$); b_j é o efeito aleatório j -ésimo bloco ($j=1, 2, \dots, r$); e_{ij} é o efeito aleatório da variação entre parcelas; π_{ijk} é o efeito aleatório da variação entre plantas dentro de parcela. Para as demais características, NIF, NDF e NDM, os parâmetros foram estimados com a esperança do quadrado médio, segundo o modelo estatístico:

$$y_{ij} = m + b_j + t_i + e_{ij}$$

em que: y_{ij} é o valor observado da característica estudada, no tratamento i ($i=1, 2, \dots, l$) e no bloco (ou repetição) j ($j=1, 2, \dots, J$); m é a média geral (de todas as observações) do experimento; t_i é o efeito do tratamento i ; e_{ij} é o erro associado à observação y_{ij} ou efeito dos fatores não-controlados sobre ela.

Os estimadores dos componentes de variância foram estimados segundo Cruz et al. (2014) (Tabela 1):

Tabela 1. Esquema da análise de variância, com informação dentro de parcela, para estimativas dos quadrados médios (QM) e esperanças dos quadrados médios [E(QM)].

FV	GL	QM	E(QM)
Blocos	r-1	-	-
Linhagens	n-1	QM1	$\sigma^2_d + p\sigma^2_e + pr\sigma^2_g$
Entre parcelas	(r-1)(n-1)	QM2	$\sigma^2_d + p\sigma^2_e$
Dentro da Parcela	nr(p-1)	QM3	σ^2_d

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; r: repetições; n: número de linhagens; p: número de plantas; σ_g^2 é a variância genotípica entre os tratamentos; σ_e^2 é a variância entre parcelas dentro de tratamento, de natureza ambiental; σ_d^2 é a variância entre plantas dentro da parcela, de natureza genética e ambiental.

$$\hat{\sigma}_g^2 = \frac{QM1 - QM2}{rp}$$

$$\hat{\sigma}_e^2 = \frac{QM2 - QM3}{p}$$

$$\hat{\sigma}_d^2 = QM3$$

onde: σ_g^2 é a variância genotípica entre os tratamentos; σ_e^2 é a variância entre parcelas dentro de tratamento, de natureza ambiental; σ_d^2 é a variância entre plantas dentro da parcela, de natureza genética e ambiental; r é o número de repetições; p é o número de plantas na parcela.

As herdabilidades no sentido amplo segundo método ANOVA ($h_{a-E(QM)}^2$) e o coeficiente de variação genética entre famílias (CVge) e coeficiente de variação ambiental (CVe) foram estimados segundo Cruz et al. (2014):

$$h_{a-E(QM)}^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{QM1/rp}$$

$$CVge = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_g^2}}{\bar{X}}$$

$$CVe = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_e^2}}{\bar{X}}$$

onde \bar{X} é a média dos fenótipos avaliados.

Situações em que a relação CVge/CVe é igual ou superior a unidade (1,0), há condição favorável à seleção (Vencovsky e Barriga 1992).

Herdabilidade estimada com REML/BLUP - máxima verossimilhança restrita / melhor predição linear não viciada (h_{a-REML}^2)

As estimativas foram obtidas pelo procedimento REML/BLUP (máxima verossimilhança restrita / melhor predição linear não viciada). Para as variáveis APM, NVP, CDV, NGV, P100 e PROD, com informação ao nível de planta, as análises foram feitas segundo o modelo linear:

$$y = X_r + Z_g + W_p + e$$

em que: y é o vetor de dados, r é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral, g é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios), p é o vetor dos efeitos de parcela, e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos. A estimação dos parâmetros genéticos foi realizada por meio do modelo 18 de análise no software genético estatístico SELEGEN-REML/BLUP (Resende 2016). Para NIF, NDF e NDM os parâmetros genéticos foram estimados considerando o modelo 21 do mesmo software, conforme o modelo estatístico:

$$y = Xr + Zg + e$$

em que: y é o vetor de dados, r é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral, g é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios).

Herdabilidades estimadas via regressão pai-filhos (h_{PF}^2) nas gerações F₆ e F₃

As diversas seleções efetuadas durante o avanço de gerações impossibilitaram estimar as variâncias aditiva e de dominância, e, por conseguinte a herdabilidade no sentido restrito, como discutido por Vencovsky e Barriga (1992). As sucessivas autofecundações praticadas resultam em elevada homozigose e na igualdade entre a herdabilidade do sentido amplo e a herdabilidade no sentido restrito (Hanson 1963).

O método da regressão pai-filhos foi usado para estimar as herdabilidades entre as gerações F₆ e F₃ (h_{PF}^2), geração filial e parental, respectivamente. As estimativas foram realizadas de acordo com Smith e Kinman (1965); $h_{PF}^2 = \frac{b}{2r_{op}}$, onde, b é o coeficiente de regressão e $2r_{op}$ é o coeficiente de relação entre pais-filhos, 0,5 para F₃. As análises foram feitas via procedimento PROC REG (SAS 2015).

Herdabilidades estimadas entre as gerações F₆ e F₃ via método da unidade de desvio padrão (h_{UP}^2)

As estimativas de herdabilidade foram também realizadas usando método da unidade de desvio padrão (h_{UP}^2) segundo Frey e Horner (1957): (h_{UP}^2) é a correlação entre as médias das linhagens entre as gerações F₆ e F₃, consideradas como geração filial e parental, respectivamente. As herdabilidades foram estimadas usando o procedimento PROC CORR (SAS 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as variáveis apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$), com exceção para comprimento de vagens (CDV) e número de grãos (NGV) (Tabela 2). Os coeficientes de variação (CV) variaram entre 8,93% para CDV a 32,32% para produção de grãos (PROD) (Tabela 2), indicando de bom a razoável controle experimental.

Tabela 2. Quadrados médios (QM) para as variáveis número de dias até o início do florescimento na parcela (NIF), número de dias até a floração de 50% das plantas na parcela (NDF); número de dias até a maturação (NDM), altura de planta (APM), número de vagens (NVP), comprimento de vagens (CDV), número de grãos/vagem (NGV), peso de 100 grãos (P100) e produção de grãos (PROD) em 30 linhagens das gerações F₃, F₄, F₅ e F₆ do cruzamento ICPL 90045 × UW10 de guandu.

Fonte de variação	Quadrado Médio								
	NIF	NDF	NDM	APM	NVP ¹	CDV	NGV	P100	PROD ¹
Blocos	10,21	16,84	70,74	38964,80	75,28	319,23	7,02	8,04	79,90
Gerações	249,28**	159,31**	148,98*	46359,34**	88,15*	1223,75 ^{NS}	3,49 ^{NS}	161,30*	69,44**
Entre parcelas	-	-	-	1887,65**	13,20 ^{NS}	262,37**	1,34**	16,59**	3,27 ^{NS}
Dentro de parcelas	15,41	13,44	37,81	619,09	6,80	28,93	0,25	1,76	2,67
Média	55,36	61,64	103,28	101,60	9,18	60,24	3,75	9,98	5,05
CV (%)	7,09	5,95	5,95	24,49	28,39	8,93	13,29	13,28	32,32

** , * e ^{NS}: significativo a 1% e 5% e não-significativo, respectivamente, pelo teste F.

¹Dados transformados por raiz quadrada de x

As médias das variáveis número de dias até o início do florescimento (NIF), número de dias até a floração de 50% das plantas (NDF), altura de planta na maturação (APM), número de dias para a maturação das vagens (NDM), número de vagens/planta e produção de grãos (PROD) foram inferiores na geração F₃ em relação as outras três gerações ($p < 0,05$), não apresentando diferenças significativas para as

variáveis comprimento de vagem (CDV), número de sementes/vagem (NGV) e peso e 100 grãos (P100) (Figura 1). Todas as variáveis analisadas não apresentaram diferenças significativas entre as médias das gerações F₄, F₅ e F₆ (Figura 1).

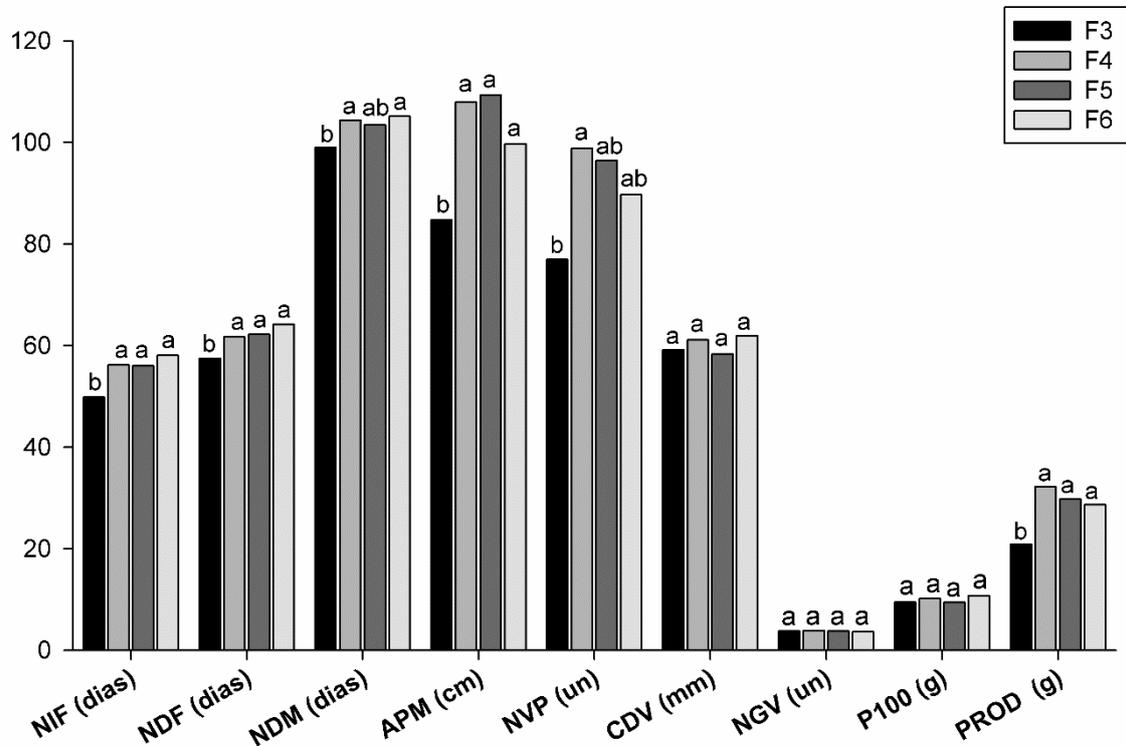


Figura 1. Médias nas gerações F₃, F₄, F₅ e F₆ no cruzamento ICPL 90045 × UW10 de guandu para as variáveis: dias para início da floração na parcela (NIF), dias para floração de 50% das plantas na parcela (NDF), número de dias para maturação de 95% das vagens (NDM), altura de planta (APM), número de vagens (NVP), comprimento de vagens (CDV), número médio de grãos/vagem (NGV), peso de 100 grãos (P100) e produção de grãos (PROD). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Herdabilidade no sentido amplo ($h^2_{a-E(QM)}$) – Método ANOVA

A $h^2_{a-E(QM)}$ para NIF apresentou tendência de crescimento entre as gerações, chegando próximo de 1,0 na geração F₆, exceto entre as gerações F₃ e F₄, que apresentou diminuição no valor estimado (Figura 2). Para NDF ocorreu aumento da $h^2_{a-E(QM)}$ da geração F₃ para a geração F₄, seguido de redução nos valores estimados para as gerações F₅ e F₆ (Figura 2). Em NDM a $h^2_{a-E(QM)}$ apresentou diminuição no

valor estimado entre as gerações F₃ e F₄, seguido de aumento da geração F₄ para a geração F₅, e nova redução no valor estimado entre as gerações F₅ e F₆ (Figura 2).

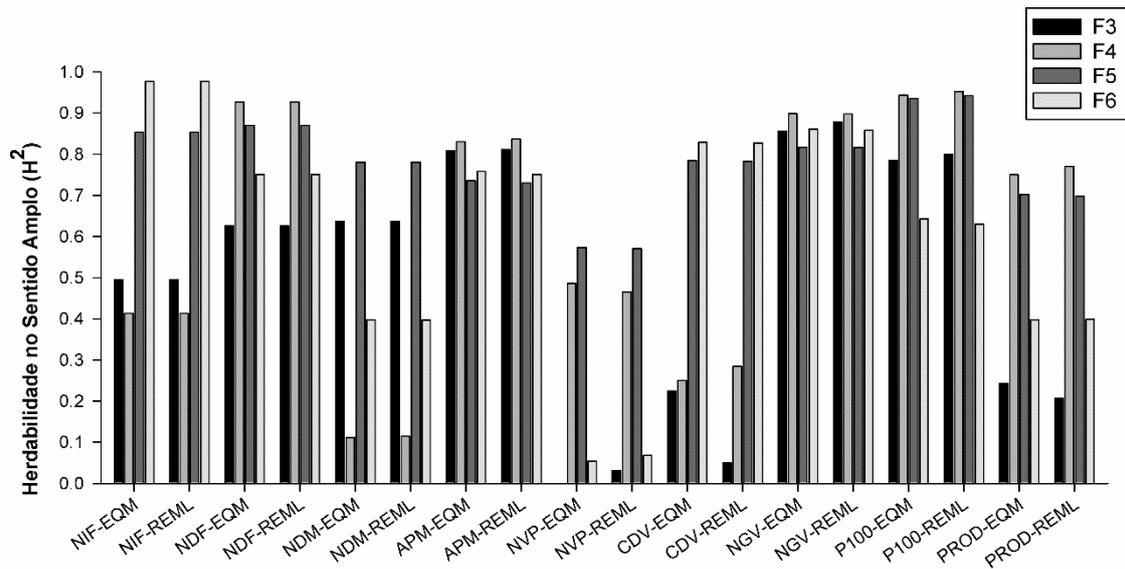


Figura 2. Estimativas da herdabilidade no sentido amplo $h^2_{a-E(QM)}$ com base na [E(QM)] da ANOVA e herdabilidade da média de linhagem h^2_{a-REML} pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) em quatro gerações, F₃, F₄, F₅ e F₆ para as características: dias para início da floração na parcela (NIF), dias para floração de 50% das plantas na parcela (NDF), número de dias para maturação de 95% das vagens (NDM), altura de planta na maturação (APM), número de vagens (NVP), média do comprimento de vagens (CDV), média do número de grãos (NGV), peso de 100 grãos (P100) e produção de grãos (PROD).

Houve acréscimo nas estimativas de $h^2_{a-E(QM)}$ da geração F₃ para F₄ para altura de planta na maturação (APM), com o maior valor estimado, 0,83 (Figura 2). Já na geração F₅ ocorreu redução, observando-se a menor $h^2_{a-E(QM)}$ para essa variável, 0,74, seguido pequeno aumento na geração F₆.

Nas estimativas de $h^2_{a-E(QM)}$ para número de vagens por planta (NVP) identifica-se aumento da geração F₄ para a F₅ (Figura 2), com progresso desde a F₃, que apresentou valor negativo, e por isso foi considerado igual a zero, atingindo 0,57 na geração F₅, com posterior redução em F₆.

Dentre as variáveis analisadas, comprimento médio de vagens (CDV) foi a única a apresentar aumento consecutivo da $h^2_{a-E(QM)}$ ao longo do avanço de todas as gerações avaliadas (Figura 2). Observou-se aumento da $h^2_{a-E(QM)}$ da F₃ para F₄, alcançando na sequência aumento para F₅, até o valor máximo de 0,83 em F₆. Nas

estimativas de $h_{a-E(QM)}^2$ para o número médio de grãos por viagem (NGV) observou-se aumento de 0,86 na F₃ para 0,90 na F₄ (Figura 2), com redução da herdabilidade estimada em F₅ com posterior aumento F₆.

Quanto as $h_{a-E(QM)}^2$ para peso de 100 grãos, os maiores valores estimados via método ANOVA ocorreram nas gerações F₄ e F₅, 0,94 após acréscimo em relação a F₃, com redução no parâmetro na F₆, menor valor estimado para a variável (Figura 2). Produção de grãos por planta (PROD) apresentou a menor estimativa de $h_{a-E(QM)}^2$ em F₃ (Figura 2), e o maior valor estimado na variável na geração F₄, seguido de sucessivas reduções da $h_{a-E(QM)}^2$ para 0,70 e 0,40 em F₅ e F₆, respectivamente.

Herdabilidade no sentido amplo (h_{a-REML}^2) – Método REML/BLUP

Para NIF observou-se redução na estimativa de $h_{a-E(QM)}^2$ entre as gerações F₃ e F₄, seguido de aumentos nas duas outras estimativas, com valor máximo de 0,98 na geração F₆ (Figura 2). Após o menor valor de $h_{a-E(QM)}^2$ estimado para NDF na geração F₃, a estimativa máxima ocorreu na geração F₄ para essa variável, com valores inferiores estimados nas gerações F₅ e F₆ (Figura 2). Para NDM a $h_{a-E(QM)}^2$ houve oscilação entre os valores estimados, sendo observada diminuição entre as gerações F₃ e F₄, seguido de aumento da geração F₄ para a geração F₅, e nova redução no valor estimado entre a gerações F₅ e F₆ (Figura 2).

Para APM, o maior valor de h_{a-REML}^2 foi observado na F₄, 0,84, com aumento em relação a F₃, 0,81, e estimativas para F₅ e F₆ de inferiores, 0,73 e 0,75, respectivamente. A estimativa em F₃ de h_{a-REML}^2 para NVP foi igual a 0,03, com aumento nos valores estimados nas duas gerações seguintes, com valor máximo na geração F₅, 0,57, seguido de redução em F₆ para 0,07 (Figura 2).

Aumentos nos valores de h_{a-REML}^2 foram observados com o avanço das gerações para CDV (Figura 2). O menor valor foi estimado na F₃, 0,03, com aumentos nas gerações seguintes, com valor máximo na F₆, 0,83. NGV apresentou a menor amplitude entre os valores estimados, com maior na geração F₄, seguido de reduções nos valores nas duas gerações seguintes para h_{a-REML}^2 (Figura 2).

O maior valor entre todas as h_{a-REML}^2 foi observado em P100, na geração F₄, 0,95, seguido de reduções nos valores das estimativas nas gerações F₅ e F₆, geração essa com menor valor das herdabilidades estimadas por REML (Figura 2). O menor valor de h_{a-REML}^2 estimado para PROD foi observado na geração F₃, 0,21, com maior

estimativa na F₄, seguido de menores valores estimados nas gerações F₅ e F₆ (Figura 2).

No presente estudo, observa-se a alta convergência dos parâmetros de h^2 estimados com as duas metodologias ANOVA e REML/BLUP, nas gerações F₃, F₄, F₅ e F₆ obtidas do cruzamento os genótipos de guandu, ICPL 90045 × UW10, sendo que 23 entre os 36 valores estimados foram de igual magnitude pelos dois métodos. Para Hill (2013), entre as várias metodologias disponíveis para estimação desse parâmetro, o método baseado na ANOVA e uso de modelos mistos, como via REML/BLUP, auxiliam o melhorista nas escolhas das estratégias e metodologias adequadas para seleção de genótipos superiores.

Em estudo com eucalipto, Rocha et al. (2006), ao compararem os métodos ANOVA e REML/BLUP para estimativas de herdabilidade no sentido restrito, também verificaram que os dois métodos proporcionaram estimativas com valores próximos em magnitude. Para Rodrigues et al. (2017) a superioridade da abordagem REML na estimativa de componentes de variância ocorre com o desbalanceamento no conjunto de dados, sendo que em condições de dados balanceados ou com baixo grau de desbalanceamento, as estimativas são semelhantes. Estimativas de h^2 via REML/BLUP em espécies florestais são reportadas como superiores em relação a ANOVA (Farias Neto e Resende, 2001).

Coeficientes de variações genética e ambiental estimados via ANOVA e via REML/BLUP

Os coeficientes de variação genética (CV_{ge}) estimados via método ANOVA e via REML foram semelhantes (Figura 3). Para NIF observa-se aumento para esse parâmetro com o avanço das gerações, com a maior variabilidade na geração F₆. O valor mais alto estimado para NDF ocorreu na F₅, situação semelhante também para NDM, onde o menor valor ocorreu na F₄ (Figura 3).

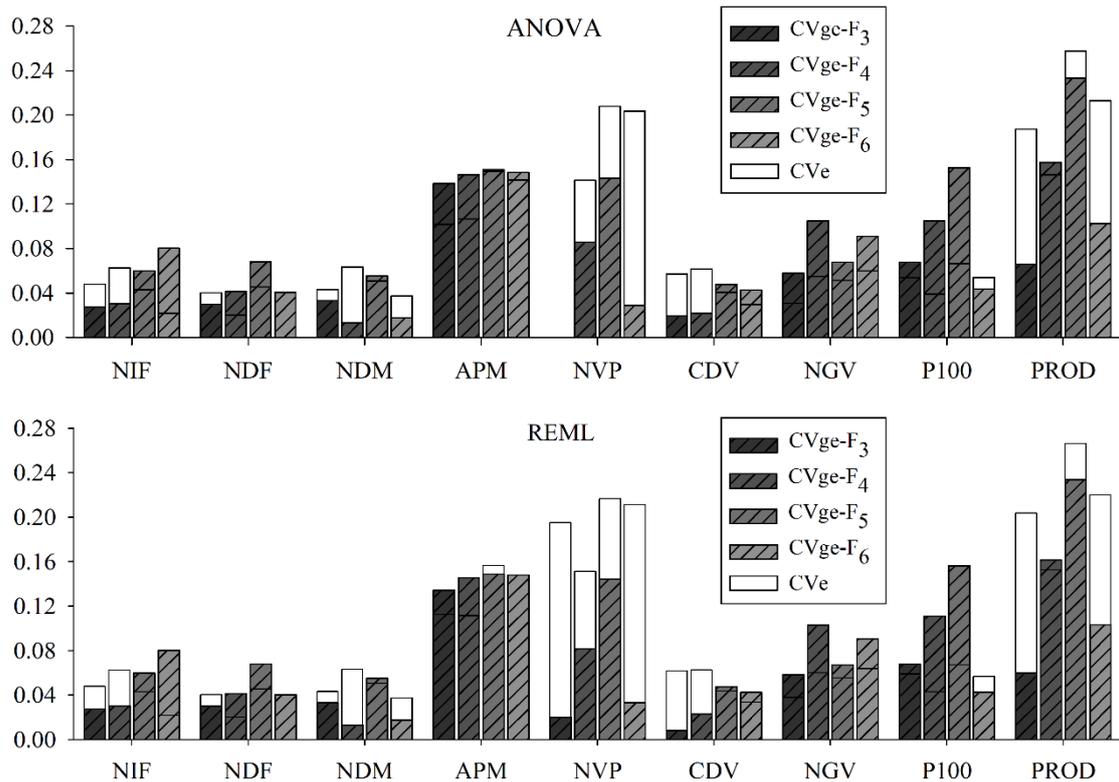


Figura 3. Estimativas dos coeficientes de variação genética entre famílias (CVge) e coeficiente de variação ambiental (CVe) entre as gerações F₃, F₄, F₅ e F₆ de gandu com base na análise de variância (ANOVA) e modelos mistos via método máxima verossimilhança restrita (REML) para os caracteres: altura da planta (APM), número de vagens por planta (NVP), média do comprimento de vagem (CDV), média do número de grãos por vagem (NGV), massa de 100 grãos (P100) e produção por planta (PROD).

Valores distintos em relação ao método usado foram observados para CVge em APM apenas na geração F₃, que foi ligeiramente superior com o método ANOVA, mesma situação ocorrida em CDV (Figura 3). Para NVP e P100 os valores estimados para a F₄ também foram superiores com o método ANOVA em relação à estimativa com REML. Em NVG e PROD os valores estimados pelos dois métodos foram iguais, de forma que o maior valor estimado para NVG ocorreu na F₄, e maior variabilidade observada para PROD ocorreu na F₅ (Figura 3).

Relação entre CVge/CVe igual ou superior a unidade (1,0) foi estimada em uma das gerações para NDM, F₅, e para PROD na F₄, bem como em duas gerações para NIF e CDV, nas gerações F₅ e F₆ (Figura 3). Valores de CVge maiores que CVe foram estimados em três das quatro gerações avaliadas para NDF nas F₄ a F₆, APM nas

gerações F₃, F₄ e F₆, além de P100 em F₃, F₄ e F₅. Para NVP todos os valores da relação CVge/CVe foram <1,0, enquanto para NGV todos os valores foram >1,0.

A presença de herdabilidades elevadas é essencial ao melhorista, pois ela aponta para confiabilidade do valor fenotípico como guia para existência de valor genético. O presente estudo indica que a CVge pode ser usada de forma indireta, quando estimadores confiáveis de h^2 não forem possíveis de aplicação, seja devido a estrutura populacional ou ao delineamento experimental. Para Obala et al. (2018), a associação da h^2 com outros parâmetros, como CVge, resulta em maior confiabilidade para a estimativa de ganho genético esperado na seleção fenotípica.

Correlações entre as médias das variáveis, herdabilidades e CVge

Os valores de herdabilidade da média da linhagem h_{a-REML}^2 , estimados com estimativas REML, foram semelhantes aos valores estimados via método ANOVA (Figura 2), resultando em coeficientes correlações próximos da unidade correlação, 0,99 (Tabela 3), com destaque para as estimativas de h_{a-REML}^2 de NIF, NDF e NDM que apresentaram valores de igual magnitude em relação as estimativas de $h_{a-E(QM)}^2$ em todas as gerações avaliadas (Figura 2).

Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson estimados entre a média e estimativas de herdabilidades no sentido amplo calculadas via método ANOVA e REML/BLUP para nove características, avaliadas nas gerações F₃, F₄, F₅ e F₆ de guandu.

Geral[#]	$h_{a E(QM)}^2$	$h_{a REML}^2$	CVge_{E(QM)}	CVge_{REML}}
Média	0,03 ^{NS}	0,01 ^{NS}	-0,21 ^{NS}	-0,18 ^{NS}
$h_{a E(QM)}^2$		0,99 ^{**}	0,42 [*]	0,47 ^{**}
$h_{a REML}^2$			0,42 [*]	0,47 ^{**}
CVge _{E(QM)}				1,00 ^{**}
Desenvolvimento Vegetativo[#]	$h_{a E(QM)}^2$	$h_{a REML}^2$	CVge_{E(QM)}	CVge_{REML}}
Média	-0,22 ^{NS}	-0,23 ^{NS}	0,39 ^{NS}	0,39 ^{NS}
$h_{a E(QM)}^2$		1,00 ^{**}	0,53 [*]	0,53 [*]
$h_{a REML}^2$			0,53 [*]	0,53 [*]
CVge _{E(QM)}				1,00 ^{**}
Componentes de Produção[#]	$h_{a E(QM)}^2$	$h_{a REML}^2$	CVge_{E(QM)}	CVge_{REML}}
Média	-0,15 ^{NS}	-0,20 ^{NS}	-0,53 [*]	-0,48 [*]
$h_{a E(QM)}^2$		0,99 ^{**}	0,39 ^{NS}	0,50 [*]
$h_{a REML}^2$			0,40 ^{NS}	0,50 [*]
CVge _{E(QM)}				1,00 ^{**}

[#]Geral: todas as variáveis; Desenvolvimento vegetativo: NIF, NDF, NDM e APM; Componentes de Produção: NVP, CDV, NGV, P100 e PROD.

******, * e ^{NS}: significativo a 1% e 5% de probabilidade e não-significativo, respectivamente pelo teste t

Correlações não-significativas foram estimadas entre média da variável $\times h^2_{a E(QM)}$, média da variável $\times h^2_{a REML}$, e entre média da variável $\times CVge_{E(QM)}$ e média da variável $\times CVge_{REML}$, considerando o conjunto das variáveis (Tabela 3), indicando ausência de linearidade entre esses dois parâmetros. Nos avanços de gerações foi realizada seleção positiva para componentes de produção, para maior tamanho do grão, maior comprimento de vagem e maior número de vagens por planta. Enquanto para as variáveis de desenvolvimento vegetativo a seleção sempre foi negativa, ou seja, para menor número de dias para floração e maturação.

Correlações negativas foram estimadas para média da variável $\times CVge_{E(QM)}$ e média da variável $\times CVge_{REML}$, quando as variáveis de produção foram analisadas separadamente (Tabela 3). Correlações positivas e significativas foram estimadas entre $h^2_{a E(QM)} \times CVge_{E(QM)}$, $h^2_{a E(QM)} \times CVge_{REML}$, $h^2_{a REML} \times CVge_{E(QM)}$ e $h^2_{a REML} \times CVge_{REML}$ para o conjunto das variáveis e com redução para variáveis vegetativas e de componentes de produção exceto para correlações entre $h^2_{a E(QM)} \times CVge_{E(QM)}$ e $h^2_{a REML} \times CVge_{E(QM)}$ para componentes de produção (Tabela 3), indicando aumento conjunto nesses parâmetros.

Herdabilidades estimadas via unidade de desvio padrão (h^2_{UP}) e pelo método regressão pai-filho (h^2_{PF})

Os valores estimados via método de unidade de desvio padrão foram superiores aos estimados via regressão pai-filho em seis das nove variáveis avaliadas, entre as gerações F₃ e F₆ (Tabela 4). O valor estimado para NIF via unidade de desvio padrão foi próximo ao estimado na regressão pai-filhos, h^2_{UP} , 0,11 e h^2_{PF} , 0,05. Para NDF, a h^2_{PF} foi de 0,75, inferior a h^2_{UP} , estimada em 0,93. A maior diferença entre os valores estimados pelos dois métodos foi observada em NDM, cuja estimativa de h^2_{UP} foi ~9x superior a h^2_{PF} . O maior valor estimado entre as variáveis via método da unidade de desvio padrão foi observado para APM, que também apresentou o maior valor pelo método de regressão.

Diferentemente do observado nas estimativas de $h^2_{a E(QM)}$ e $h^2_{a REML}$, a proporção de valores estimados para h^2_{UP} e h^2_{PF} superiores 0,70 foi menor. A maior diferença entre os valores estimados foi observada para NIF, cujo o valor mais baixo de $h^2_{a E(QM)}$ e $h^2_{a REML}$ observado foi de 0,41, variando a 0,98, já os estimados para h^2_{UP}

e h_{PF}^2 foram 0,11 e 0,05, respectivamente. Já para NDF e APM, os resultados estimados via h_{UP}^2 e h_{PF}^2 foram de magnitude semelhante aos estimados pelos métodos ANOVA e REML.

Tabela 4. Herdabilidades estimadas via métodos da unidade de desvio padrão (h_{UP}^2) e regressão pai-filho F_6 vs F_3 (h_{PF}^2) em dados das gerações F_3 e F_6 . Para NIF: número de dias até o início do florescimento na parcela; NDF: número de dias até a floração de 50% das plantas na parcela; NDM: número de dias até a maturação; APM: altura de planta; NVP: número de vagens por planta; CDV: comprimento de vagens; NGV: número de grãos por vagem; P100: peso de 100 grãos; PROD: produção de grãos por planta.

Herdabilidade	NIF	NDF	NDM	APM	NVP	CDV	NGV	P100	PROD
h_{UP}^2	0,11	0,93	0,92	0,97	0,43	0,49	0,92	-0,51	0,80
h_{PF}^2	0,05	0,75	0,10	0,85	0,25	0,31	1,44	-0,18	1,04

Os valores estimados para NVP e CDV via método da unidade de desvio padrão foram próximos, com h_{UP}^2 iguais a 0,43 e 0,49, respectivamente (Tabela 4). Para essas duas variáveis, os valores estimados via regressão foram inferiores e h_{PF}^2 , 0,25 em NVP e 0,31 em CDV.

O valor estimado de h_{UP}^2 para NGV foi elevado, 0,92, observando-se para essa variável estimativa de h_{PF}^2 superior a 1 (Tabela 4). Mesma situação foi observada em PROD, onde h_{PF}^2 também foi superior a 1, entretanto, ocorrendo estimativa de h_{UP}^2 de 0,80. Valores superiores a unidade foi característica observada unicamente nas estimativas via método da regressão pai-filho. Para Cavalli-Sforza e Feldman (1976) herdabilidades superiores a um ocorrem quando a intensidade de seleção for tão intensa que a variância de seleção será pequena, de forma que a variância fenotípica será inferior a variância genética. Frey e Horner (1957) propuseram, então, uma modificação no procedimento para estimação de herdabilidade via regressão, de forma que independente dos efeitos ambientais postulados, o valor estimado será próximo da unidade, conforme o observado no presente estudo.

Assim como ocorreu para NVP na geração F_3 , dois valores negativos foram estimados para P100, $h_{PF}^2 = -0,18$ e $h_{UP}^2 = -0,51$, sendo o método REML o único a não apresentar estimativas negativas. Conforme relatado por Maia et al. (2016), essa é uma característica do método REML que apresenta restrição de não negatividade para as estimativas de componentes de variância. A ocorrência de estimativas

negativas de herdabilidade tem sido reportada por alguns autores, sendo comum de considerá-las igual a zero. Melo et al. (2016) consideraram como zero estimativas negativas de h^2 ao estudarem a distribuição radicular em quatro parentais e 12 progênies de feijão comum, entre plantas das gerações F_3 e F_4 .

Ajay et al. (2012) obtiveram valores estimados considerados altos em gerações de cruzamentos de guandu, que indicam a possibilidade de sucesso com a seleção em gerações posteriores. No presente estudo também foram estimadas herdabilidades acima de 80% para APM e acima de 90% para NVP. Esses resultados indicam maior probabilidade de sucesso na seleção precoce para aquelas características com altos valores de herdabilidade no sentido amplo, como observado para APM, NGV, P100 e NDF (Figura 2), em todas as gerações avaliadas, tanto de $h^2_{a-E(QM)}$ como para h^2_{a-REML} . Esses resultados foram corroborados por estimativas elevadas de h^2_{UP} e h^2_{PF} para as variáveis, NDF, NGV e APM (Figura 3).

As análises nas diferentes gerações indicam aumento nos valores das médias para algumas variáveis, bem como aumentos nos valores dos coeficientes de variação genética. Considerando esse parâmetro genético, observa-se que a seleção precoce foi favorável e que os métodos para estimar as herdabilidades no sentido amplo pelo método ANOVA e via REML/BLUP foram mais adequados no presente caso. O método da unidade padrão possibilitou a obtenção de valores de herdabilidade superiores para a maioria das variáveis em relação ao método da regressão pai-filho.

Segundo Hallauer et al. (2010), estimar parâmetros de herdabilidades é importante para o sucesso de um programa de melhoramento, sendo esperado que sucessivas autofecundações aumentem a variabilidade entre as progênies, com aumento da variância aditiva e conseqüente aumento da herdabilidade. Esse é um estudo pioneiro que estima herdabilidades em uma população de guandu no semiárido brasileiro, comparando h^2 estimadas por diferentes métodos com dois parâmetros populacionais, média e coeficiente de variação genético.

CONCLUSÃO

Herdabilidades $>0,70$ foram estimadas para duas variáveis em quatro gerações, para duas variáveis em três gerações e duas gerações para duas variáveis, indicando maior controle genético e facilidade na seleção. Correlações $>0,99$ ($p<0,01$) entre as herdabilidades estimadas com os métodos ANOVA \times REML, indicando concordância. Foi observada ausência de colinearidade entre médias das variáveis

com estimativas das h^2 . Correlações de 1,0 ($p < 0,01$) entre herdabilidades x coeficiente de variação genético indicam que esse último parâmetro pode ser usado de forma indireta, na ausência de estimativas de h^2 . Estimativas com base na regressão ou correlação pai-filho apresentaram alguns valores negativos ou superior a unidade, indicando limitações.

REFERÊNCIAS

- Ajay BC, Gnanesh BN, Ganapathy KN, Gowda MB, Prasad PS, Veerakumar GN, Venkatesha SC, Fiyaz RA e Ramya KT (2012) Genetic analysis of yield and quantitative traits in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). **Euphytica** **186**:705-714.
- Bell AE (1977) Heritability in retrospect. **Journal of Heredity** **68**:297-300.
- Brown J e Caligari P (2008) **An introduction to plant breeding**. John Wiley & Sons, Oxford, 209p.
- Cavalli-Sforza LL e Feldman MW (1976) Evolution of continuous variation: Direct approach through joint distribution of genotypes and phenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **73**:1689-1692.
- Cullis C, Kunert KJ (2017) Unlocking the potential of orphan legumes. **Journal of experimental botany** **68(8)**:1895-1903.
- Cruz CD, Carneiro PCS e Regazzi AJ (2014) **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. rev. e ampl. UFV, Viçosa, 668p.
- FAO (2019) **FAOSTAT** - Food and Agriculture Organization of the United Nations; Statistical Division. Roma. Disponível em < <https://faostat3.fao.org/home>>. Acessado em 07, Novembro de 2021.
- Farias Neto JTD e Resende MDVD (2001) Aplicação da metodologia de modelos mistos (REML/BLUP) na estimação de componentes de variância e predição de valores genéticos em pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Revista brasileira de fruticultura** **23**:320-324.
- Frey KJ e Horner T (1957) Heritability In Standard Units 1. **Agronomy Journal**, **49**:59-62.

- Hallauer AR, Carena MJ e Miranda Filho JD (2010) **Quantitative genetics in maize breeding**. 3rd ed., Springer-Verlag, Berlim, 500p.
- Hanson WD (1963) Heritability. In Hanson WD e Robinson HF (eds) **Statistical genetics and plant breeding**. NAS-NCR, Washington, p. 125-139.
- Hill WG (2013) Heritability. In Maloy S e Hughes K (eds) **Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)**. Academic Press, New York, p. 432-434.
- Holland JB, Nyquist WE e Cervantes-Martínez CT (2003) Estimating and interpreting heritability for plant breeding: an update. **Plant breeding reviews** **22**:9-112.
- Maia MCC, Macedo LM, Vasconcelos LFL, Aquino JPA, Oliveira LC e Resende MDV (2016) Estimates of genetic parameters using REML/BLUP for intra-populational genetic breeding of *Platonia insignis* Mart. **Revista Árvore** **40**:561-573.
- Melo RC, Schmit R, Cerutti PH, Guidolin AF e Coimbra JLM (2016) Genetic variation in the trait root distribution over segregating generations of common bean. **Euphytica** **207**:665-674.
- Obala J, Saxena RK, Singh VK, Vechalapu S, Das R, Rathore A, Sameer-Kumar CV, Saxena K, Tongoona P, Sibiya J e Varshney RK (2018) Genetic variation and relationships of total seed protein content with some agronomic traits in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). **Australian journal of crop science** **12**:1859-1865.
- Resende MDVD (2016) Software Selegen-REML/BLUP: a useful tool for plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **16**:330-339.
- Rocha MDGDB, Pires IE, Xavier A, Cruz CD e Rocha RB (2006) Avaliação genética de progênies de meio-irmãos de *Eucalyptus urophylla* utilizando os procedimentos REML/BLUP e E(QM). **Ciência Florestal** **16**:369-379.
- Rodrigues HS, Cruz CD, Macêdo JLVD, Resende MDVD, Lopes R e Borém A (2017) Genetic variability and progeny selection of peach palm via mixed models (REML/BLUP). **Acta Scientiarum. Agronomy** **39**:165-173.

- Santos CAF, Araújo FP e Menezes EA (2000) Avaliação de genótipos de guandu de diferentes ciclos e portes no sertão pernambucano. **Magistra** 12:31-40.
- Saxena K, Bohra A, Choudhary AK, Sultana R, Sharma M, Pazhamala LT e Saxena RK (2021) The alternative breeding approaches for improving yield gains and stress response in pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Plant Breeding** 140:74-86.
- Sharma S, Paul PJ, Kumar CV, Rao PJ, Prashanti L, Muniswamy S e Sharma M (2019) Evaluation and Identification of Promising Introgression Lines Derived From Wild *Cajanus* Species for Broadening the Genetic Base of Cultivated Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Frontiers in plant science** 10:1269.
- Silva FMD, Pereira EDM, Val BHP, Perecin D, Mauro AOD e Unêda-Trevisoli SH (2018) Strategies to select soybean segregating populations with the goal of improving agronomic traits. **Acta Scientiarum. Agronomy** 40:e39324.
- Smith JD e Kinman ML (1965) The Use of Parent-Offspring Regression as an Estimator of Heritability 1. **Crop Science** 5:595-596.
- Statistical Analysis System [SAS]. (2015) **SAS/STAT User's guide, Version 9.4**. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Vencovsky R e Barriga P (1992) **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 486 p.
- Visscher PM, Hill WG e Wray NR (2008) Heritability in the genomics era—concepts and misconceptions. **Nature reviews genetics** 9:255-266.

CAPÍTULO IV

**Parâmetros de adaptabilidade e estabilidade para produção de grãos em
linhagens de guandu no semiárido brasileiro**

**Artigo a ser submetido a revista
Euphytica
(ISSN 1573-5060)**

PARÂMETROS DE ADAPTABILIDADE E ESTABILIDADE PARA PRODUÇÃO DE GRÃOS EM LINHAGENS DE GUANDU NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Antonio Elton da Silva Costa^{1*}, Carlos Antonio Fernandes Santos²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, PE

² Embrapa Semiárido. CP 023, CEP: 56302-970, Petrolina, PE, Brasil.

Autor correspondente: carlos-fernandes.santos@embrapa.br

RESUMO

A interação genótipos \times ambientes é um dos principais desafios para o desenvolvimento e recomendação de cultivares. O objetivo desse estudo foi estimar parâmetros de adaptabilidade e estabilidade para produtividade de grãos em 21 linhagens de guandu mais a variedade 'guandu Petrolina' (controle) visando a recomendação de cultivares para o semiárido brasileiro. Vinte e dois genótipos foram avaliados em oito ambientes, com experimentos conduzidos em cinco ambientes irrigados e em três sob regime de sequeiro, usando delineamento em blocos casualizados, com três repetições. Foi realizada a correção da produção de grãos por covariância com o stand médio de plantas. Os métodos Eberhart e Russell, AMMI e GGE biplot com análise SREG foram usados no presente estudo. O coeficiente de variação para os experimentos foi de 12,41, com dados transformados por raiz quadrada. Os efeitos de genótipos, ambientes e a interação genótipos \times ambientes foram altamente significativos ($p < 0,01$), e significativos para blocos ($p < 0,05$). A produtividade média de grãos dos genótipos foi de 1516,31 kg ha⁻¹. As linhagens 87, 100 e 158 apresentaram ampla adaptabilidade e boa previsibilidade simultaneamente pelos três métodos usados, produtividade média de 1529,67, 1701,10 e 1812,03 kg ha⁻¹, respectivamente, alcançando em alguns ambientes rendimento de até 2725,35, 2928,13 e 2955,38 kg ha⁻¹, nessa ordem, sendo indicadas para recomendação como novas cultivares de guandu para o semiárido brasileiro.

Palavras-chave: *Cajanus cajan*, AMMI, GGE biplot, Eberhart e Russell, Interação G \times A, Ensaios multiambientes

ADAPTABILITY AND STABILITY PARAMETERS FOR GRAIN PRODUCTION IN PIGEONPEA LINES IN THE BRAZILIAN SEMIARID REGION

ABSTRACT

The genotypes × environments interaction is one of the main challenges in crop improvement programs for the development and recommendation of cultivars. The aim of this study was to estimate adaptability and stability parameters of grain yield in 21 pigeonpea lines plus the 'guandu Petrolina' variety (control) for the selection and recommendation of cultivars for the semiarid region of northeastern Brazil. Twenty-one lines were evaluated in eight environments, with experiments conducted in five irrigated environments and in three under rainfed conditions using a randomized block design with three replications. Correction of grain yield was performed by covariance with the average stand of plants. The methods used to study adaptability and stability were: Eberhart and Russell, AMMI and GGE biplot with SREG analysis. The coefficient of variation for the experiments was 1.41, with data transformed by square root. The effects of genotypes, environments and the genotype × environment interaction were highly significant ($p < 0.01$), and significant for blocks (0,05). The average yield of the genotypes was $1516.31 \text{ kg ha}^{-1}$. Line 87, 100 and 158 showed broad adaptability and good predictability simultaneously by the three methods used, average yield of 1529.67, 1701.10 and $1812.03 \text{ kg ha}^{-1}$, respectively, reaching in some environments yields of up to 2725.35, 2928.13 and $2955.38 \text{ kg ha}^{-1}$, in that order, being recommended for recommendation as new pigeonpea cultivars for the Brazilian semiarid region.

Keywords: *Cajanus cajan*, AMMI, GGE biplot, Eberhart e Russell, GEI interaction, multi-environment trials

INTRODUÇÃO

O guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) é uma importante fonte de proteínas para populações de países de baixa renda (Waldman et al. 2017). Entretanto, a baixa produtividade do guandu é o principal desafio aos produtores da cultura, o que dificulta suprir a demanda de grãos (Bohra et al. 2020). O desenvolvimento de cultivares de guandu que elevem o patamar de rendimento é o objetivo de programas de melhoramento conduzidos por instituições de diferentes países (Muñoz et al. 2017). O guandu é uma cultura com potencial para diversificação de sistemas produtivos que visem a produção de grãos e forragem, em especial para áreas de semiárido brasileiro. Desenvolver novas cultivares que associem a resiliência da cultura (Varshney et al. 2017) à maior produtividade tem sido um dos objetivos do programa de melhoramento de guandu da Embrapa Semiárido (Santos 2020).

A superioridade de novos genótipos é avaliada em relação aos já cultivados comercialmente, e comprovada por meio do desempenho de campo, em ensaios de competição, devido a existência de resposta diferencial dos genótipos em ambientes diversificados, fenômeno conhecido como interação genótipos \times ambientes (G \times A) (Piepho 1996). A expressão fenotípica pode não se repetir, o que dificulta na recomendação e seleção do melhor genótipo avaliado. Segundo Cruz et al. (2014), para minimizar os efeitos da interação G \times A, é ideal a identificação de genótipos com comportamento previsível (estabilidade), e que respondam bem às variações ambientais em condições específicas e gerais (adaptabilidade).

Diversos métodos são amplamente usados para estudar a adaptabilidade e estabilidade, e são classificados de acordo a abordagem estatística, tais como baseados em análise de variância, baseados em regressão, métodos não-paramétricos e análise multivariada (Bornhofen et al. 2017). Em estudos de adaptabilidade e estabilidade em genótipos de guandu, os métodos comumente usados têm sido os baseados em análise de regressão, como Eberhart e Russell (1966) e os multivariados como AMMI (Zobel et al. 1988) e GGE biplot (Yan et al. 2000). Os métodos AMMI e GGE biplot foram usados por Yohane et al. (2021) para estudar a adaptabilidade e estabilidade de 81 genótipos de guandu avaliados em três ambientes no Malawi, por duas safras, dos quais os autores selecionaram cinco para recomendação de cultivares. Reddy et al. (2011), ao avaliarem dez genótipos de guandu por três anos em condições de sequeiro, adotaram o método de Eberhart e Russell (1966) para estudar adaptação e previsibilidade dos genótipos, selecionando genótipo com boa estabilidade para produção de grãos, número de vagens e tamanho

de sementes. Kumar et al. (2021) recomendaram dois genótipos entre 28 avaliados em regime sequeiro em dez locais, com base nas análises AMMI e GGE biplot.

No Brasil inexistem estudos publicados de adaptabilidade e estabilidade publicados com linhagens de guandu desenvolvidas em programas de melhoramento locais. Segundo Santos et al. (2000), o guandu é uma espécie com características e potencial para cultivo no semiárido brasileiro, devido a resiliência às limitações de fertilidade de solo e estresse hídrico, sendo, contudo, cultivado em pequenas áreas, nos estados da Bahia, Pernambuco e Ceará. O desenvolvimento de cultivares de guandu com bom desempenho produtivo, ampla adaptabilidade e boa estabilidade, além de desenvolvimento precoce, pode contribuir para expansão do cultivo de guandu além das regiões produtoras existentes no semiárido brasileiro.

O objetivo do presente estudo foi estimar parâmetros de adaptabilidade e estabilidade por três métodos para produtividade de grãos em 21 linhagens de guandu, de experimentos conduzidos em cinco ambientes irrigados e três em ambiente sob regime de sequeiro, visando a recomendação e registro de novas cultivares dessa leguminosa para o semiárido brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e ambientes de avaliações

Vinte e dois genótipos de guandu foram avaliados, incluindo 21 linhagens desenvolvidas pelo programa de melhoramento da Embrapa Semiárido e a cultivar controle 'guandu Petrolina', recomendada pela mesma instituição. Seis experimentos foram avaliados em Petrolina, PE e em Juazeiro, BA, nos campos experimentais Caatinga e Mandacaru, respectivamente, sendo quatro em ambientes irrigados por gotejamento, com semeio no segundo semestre de 2019 e 2021, e dois sob regime de sequeiro, com semeio no primeiro semestre de 2020 (Tabela 1). Dois experimentos foram conduzidos no Campo Experimental de Barbalha, da Embrapa Algodão em Barbalha, CE, com semeadura no segundo semestre de 2019, sob condições de cultivo irrigado, e, sob regime de sequeiro com semeadura no primeiro semestre de 2021 (Tabela 1).

Os experimentos foram instalados em parcelas com duas linhas de plantio, com dimensão de 2,4 m x 2,5 m, espaçamento entre linhas de 1,2 m, e entre plantas de 0,5 m, com duas plantas por cova, em delineamento de blocos ao acaso, com três repetições. Durante a condução dos experimentos foram realizados tratamentos culturais, quando necessários, sem aplicação de fertilizantes em todos os ambientes.

Variáveis mensuradas e análises de variâncias para produção de grãos

A colheita foi realizada manualmente após observada maturação em pelo menos 50% de vagens, apresentando coloração amarronzada, típica de vagens maduras. A contagem dos dias para maturação foi feita a partir da data do semeio. A altura das plantas na maturação foi realizada com medição da base da planta até o término do caule principal. As vagens foram beneficiadas com pesagem das sementes por parcela. O rendimento de grãos (kg ha^{-1}) por parcela em cada experimento foi ajustado pelo método da covariância, considerando o stand de plantas médio das parcelas de cada experimento, conforme procedimento estatístico descrito por Vencovsky e Barriga (1992), usando rotina desenvolvida para o procedimento *PROC GLM* do programa SAS.

Inicialmente, foi realizada uma análise de variância individual, seguindo-se da análise conjunta, com verificação da homogeneidade das variâncias residuais dos experimentos (QMR), considerando-se a razão entre o maior e menor QMR. Na presença da heterocedasticidade, os dados foram transformados por raiz quadrada (\sqrt{x}). Para a análise conjunta, os efeitos dos genótipos foram considerados fixos e os relacionados ao ambiente foram considerados aleatórios. Todas essas análises foram realizadas usando o software SAS (SAS 2015), pelo procedimento *PROC GLM* e a opção *Lsmeans*.

Análise de adaptabilidade e estabilidade

As análises de adaptabilidade e estabilidade foram realizadas pelos seguintes métodos: 1) modelo regressão de Eberhart e Russell (1966), 2) AMMI (modelo de efeitos principais aditivos e de interação multiplicativa (Zobel et al. (1988); e 3) GGE biplot (*genotype and genotype-environment interaction*), Yan et al. (2000), por meio do modelo de sítios de regressão ou SREG (regression sites) conforme modelo de Burgueño et al. (2003).

Os estimadores do modelo de Eberhart e Russell (1966) são dados por:

$$Y_{ij} = \beta_{0i} + \beta_{1i}I_j + \delta_{ij} + \bar{\varepsilon}_{ij}$$

onde β_{0i} = média geral do genótipo i ($i = 1, 2, \dots, g$); β_{1i} = resposta linear do genótipo i à variação ambiental; I_j = índice ambiental ($j = 1, 2, \dots, e$); δ_{ij} = desvio da regressão; $\bar{\varepsilon}_{ij}$ = erro experimental médio.

Os parâmetros são determinados de acordo com coeficiente de regressão: $\beta_{1i}=1$ o genótipo apresenta ampla adaptabilidade, $\beta_{1i} > 1$ o genótipo apresenta adaptabilidade a ambientes favoráveis, e $\beta_{1i} < 1$ adaptabilidade a ambientes desfavoráveis. A menor variância dos desvios da regressão, $\delta_{ij} = 0$, define o genótipo como estável. Essa análise foi efetuada usando o software estatístico Genes (Cruz 2013).

O modelo adotado para o método AMMI (Zobel et al. 1988) foi:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + \alpha_j + \sum_{k=1}^n \lambda_k \gamma_{ik} \alpha_{jk} + \rho_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

onde Y_{ij} é a resposta média do genótipo i ($i = 1, 2, \dots$, genótipos G) no ambiente j ($j = 1, 2, \dots$, ambientes E); μ é a média dos tratamentos; g_i é o efeito fixo do genótipo i ; α_j é o efeito fixo do ambiente j ; λ_k é o k -ésimo valor singular (escalar) da matriz de interação original (denotada por GE); γ_{ik} é o elemento correspondente ao i -ésimo genótipo, no k -ésimo vetor singular de cada coluna da matriz GE; α_{jk} é o elemento correspondente ao j -ésimo ambiente na k -ésima linha de vetor singular da matriz GE; ρ_{ij} é o resíduo associado ao termo GE_{ij} da interação clássica do genótipo i com o ambiente j ; ε_{ij} é o erro experimental. A análise AMMI foi realizada com o software SAS (2015), com os *PROC GLM* e *PRO IML*.

Na representação gráfica gerada AMMI1, o eixo das abcissas representa os efeitos principais, ou seja, referentes às médias de genótipos e de ambientes, e as ordenadas expressam os escores de genótipos e ambientes referentes ao primeiro componente da interação, IPCA1. Os genótipos e ambientes com escores mais baixos são os mais estáveis, por apresentarem menor contribuição para a interação. Já a adaptabilidade é avaliada pela observação dos escores para cada par de genótipos e ambientes: genótipos e ambientes com escores de mesmo sinal tendem a interagir positivamente, aspecto indicativo a ser aproveitado na seleção; enquanto pares de genótipos e ambientes com sinais opostos devem interagir negativamente, ou seja, indica combinação desfavorável de genótipo e ambiente (Duarte e Vencovsky 1999). Por meio das representações geradas obtêm-se o gráfico da média \times IPCA1 (AMMI1) que indicam a contribuição de cada genótipo e ambiente para a interação; e um segundo gráfico no qual são consideradas apenas os efeitos da interação, IPCA1 \times IPCA2 (AMMI2). Nesse caso, os genótipos e ambientes mais estáveis são aqueles situados mais próximos a origem para o eixo IPCA2 (Duarte e Vencovsky 1999).

Para as análises via método GGE biplot, os SREG's ou sítios de regressão foram estimados usando o programa SAS (2015) seguindo os procedimentos de Vargas-Hernandez e Crossa (2000) conforme modificação de Burgueño et al. (2003).

$$\bar{Y}_{ij} = \mu + \delta_j + \sum_{k=1}^t \lambda_k \alpha_{ik} \gamma_{jk} + \bar{\varepsilon}_{ij}$$

onde, \bar{Y}_{ij} é a resposta média do genótipo i -ésimo ($i = 1, 2, \dots$, genótipos G) no ambiente j -ésimo ($j = 1, 2, \dots$, ambientes E); μ é a média geral dos tratamentos; δ_j é o efeito do local j ; λ_k ($\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots > \lambda_t$) é o k -ésimo valor singular (escalar) do componente multiplicativo ordenado que permite a imposição de restrições de ortonormalidade nos vetores singulares para os genótipos, $\alpha_{ik} = (\alpha_{1k}, \alpha_{2k}, \dots, \alpha_{gk})$ e locais, $\gamma_{jk} = (\gamma_{1k}, \dots, \gamma_{ek})$, de modo que $\sum_i \alpha_{ik}^2 = \sum_j \gamma_{jk}^2 = 1$ e $\sum_i \alpha_{ik} \alpha_{ik'} = \sum_j \gamma_{jk} \gamma_{jk'} = 0$ para $k \neq k'$; α_{ik} e γ_{jk} para $k = 1, 2, 3, \dots$ são denominados de efeitos primário, secundário, terciário, etc. de genótipos e ambientes, respectivamente; e ε_{ij} é o erro experimental.

A interpretação da representação gráfica do modelo GGE biplot é semelhante à do modelo AMMI: genótipos e ambientes situados próximo as origens do eixo IPCA2, são os mais estáveis (Yan et. 2000). A diferença entre os métodos está na etapa inicial da análise, pois o modelo GGE biplot analisa diretamente o efeito de genótipo mais o efeito da interação GxA, enquanto que a análise AMMI separa G da interação GxA, para na etapa final da análise juntá-los novamente para formação dos gráficos biplot (Yan et al. 2007).

RESULTADOS

Genótipos (G), ambientes (A) e a interação GxA foram altamente significativos pelo teste F ($p < 0,01$) e significativos para blocos ($p < 0,05$) na análise de variância conjunta para os dados de produtividade (Tabela 2). A produtividade média dos genótipos foi de 1516,31 kg ha⁻¹, variando de 277,76 kg ha⁻¹ no ambiente de sequeiro, em Mandacaru, a 2586,18 kg ha⁻¹ no ambiente irrigado, no CEC Petrolina (Tabela 1). O coeficiente de variação para os experimentos foi de 12,41%, com dados transformados por raiz quadrada. A maior produtividade média foi observada no genótipo 106 com 1915,87 kg ha⁻¹, enquanto a menor produtividade ocorreu no tratamento controle, quando Petrolina, 1015,65 kg ha⁻¹ (Tabela 2).

A transformação por raiz quadrada foi eficiente para eliminar a heterocedasticidade, reduzindo a razão entre o maior e o menor quadrado médio do resíduo (QMR) de 17,71 da análise com os dados originais para 6,14 na análise com

dados transformados (Tabela 1). As variâncias são consideradas homogêneas quando a razão for inferior a 7,0 (Pimentel-Gomes e Garcia 2002).

A altura média das plantas foi de 141,31 cm, variando de 96,11 cm na linhagem 126, a 175,40 cm na linhagem 45 (Tabela 2). As linhagens 126 e 130 apresentaram estatura inferior a 100 cm; os genótipos 159, 90, 184 e 'guandu Petrolina' apresentaram alturas médias inferiores a 130 cm; doze linhagens: 110, 129, 96, 106, 179, 87, 162, 102, 182, 183, 158 e 100, apresentaram altura de até 160 cm; e as linhagens 181, 190, 186 e 45 com alturas superiores a 166 cm. A média de dias para primeira colheita foi 128 dias, treze linhagens apresentaram maturação inferior a esse valor, variando de 118 dias na linhagem 129 a 127 dias na linhagem 87. Entre as mais tardias, as linhagens 159, 186, 179, 'guandu Petrolina', 45, 181, 182 e 190 apresentaram valores superiores à média geral, com variação entre 129 e 151 dias para maturação de ao menos 50% das vagens.

Método Eberhart e Russel

Os coeficientes de regressão de 15 genótipos foram estatisticamente iguais a 1, indicando ampla adaptabilidade (Tabela 2). Para estabilidade, cinco dos genótipos avaliados foram classificados com alta previsibilidade, com valores de σ^2_{di} não significativos (Tabela 2). Quatro genótipos foram classificados concomitantemente com ampla adaptabilidade e boa estabilidade: 130, 87, 90, 184 (Tabela 2), dos quais 87 e 90 também foram classificados com produtividade superior à média geral dos experimentos, 1516,31 kg ha⁻¹. As linhagens 100 e 158 apesar do σ^2_{di} significativo, apresentaram R² aproximadamente $\geq 90\%$ (Tabela 2), e esse é um parâmetro auxiliar, relacionado à boa estabilidade produtiva nos ambientes testados.

Os genótipos 181 e 179 foram classificados como adaptados à ambientes favoráveis, $\beta_{1i} > 1$, com imprevisibilidade no comportamento, $\sigma^2_{di} \neq 0$ (Tabela 2). Os parâmetros dos genótipos 162, 110, 96, 126 e 159 indicam serem adaptáveis a ambientes desfavoráveis, $\beta_{1i} < 1$, e imprevisibilidade nos ambientes testados, $\sigma^2_{di} \neq 0$, exceto o 126. Os genótipos 183, 190, 106, 186, 100, 129, 182, 158, 102, 45 e 'guandu Petrolina' apresentam imprevisibilidade nos ambientes testados, $\sigma^2_{di} \neq 0$, apesar de ampla adaptabilidade, $\beta_{1i} = 1$.

Método AMMI

Na análise AMMI, as contribuições dos dois primeiros eixos principais, IPCA1 e IPCA2 foram significativas ($p < 0,05$) (Tabela 3). Os padrões associados à interação

explicados pelos eixos relativos a IPCA1 e IPCA2 corresponderam a 32,47% e 26,99%, com contribuição acumulada de 59,46% da interação GxA (Tabela 3).

O ambiente Mandacaru 3 foi o que menos contribuiu para a interação GxA, seguido dos ambientes Mandacaru 2 e Caatinga 1 (Figura 1). Os genótipos que menos contribuíram para a interação foram 87, 183, 126 e 186, os dois últimos com média de produtividade inferior a 1500 kg ha⁻¹, com destaque para os genótipos 183 e 87, com oitava e décima maior média, 1589,89 e 1529,67 kg ha⁻¹, respectivamente (Tabela 2).

No segundo gráfico AMMI (Figura 2), considerando apenas os efeitos da interação, a representação IPCA1 x IPCA2 reteve 59,46% da soma de quadrados, confirmando as estabilidades dos genótipos 186 e 87, com destaque para o primeiro. Também foi confirmada a boa previsibilidade para o ambiente Mandacaru 3, seguido pelos ambientes Mandacaru 2 e agora, Caatinga 2.

Entre os dez genótipos mais produtivos (Tabela 2), 102, 100, 158, 182 e 87 foram os mais estáveis nessa análise (Figura 2). Com melhor rendimento, o genótipo 181 tem adaptabilidade ao ambiente Caatinga 3, e 106, com segundo melhor desempenho produtivo, apresentou melhor adaptabilidade aos ambientes Barbalha 1 e Mandacaru 1. O genótipo 190 apresentou adaptabilidade aos ambientes Caatinga 2 e Caatinga 3, assim como os escores do genótipo 159 indicam adaptabilidade aos ambientes Mandacaru 2 e 3, e a Barbalha 2.

Os genótipos que mais contribuíram para interação foram 45, 190, 'guandu Petrolina', 102 e 129 (Figura 1) e conseqüentemente, os menos estáveis segundo o método AMMI (Figura 2). Em relação aos ambientes, os que mais contribuíram para a interação foram o primeiro ensaio conduzido em Mandacaru, os dois ensaios conduzidos e Barbalha, seguido do primeiro conduzido em Barbalha (Figura 1 e 2).

Análise GGE biplot

Os componentes foram altamente significativos para os seis primeiros eixos, ICPA1, ICPA2, ICPA3, ICPA4, ICPA5 e ICPA6 pelo teste Gollob ($p < 0,01$) (Tabela 3). Os dez genótipos com estabilidade superior, segundo a análise GGE biplot, foram 102, 110, 100, 130, 186, 158, 87, 182, 184 e 159. Considerando os ambientes, os ensaios conduzidos nos ambientes Mandacaru 1 e 2 foram os mais estáveis, seguido de Barbalha 2 e Caatinga 2 (Figura 3).

Os genótipos que mais contribuíram para a interação GxA pela análise GGE biplot foram 181, 96, 45, 190, 183 e 'guandu Petrolina' (Figura 3), portanto, com previsibilidade inferior. Para os ambientes, os maiores vetores calculados, que

indicam menor estabilidade, foram observados para o primeiro e terceiros ensaios conduzidos na Caatinga, seguidos dos primeiros ensaios conduzidos em Barbalha e Mandacaru (Figura 3). Semelhante ao método AMMI, entre as dez linhagens mais produtivas 102, 100, 158, 87 e 182 apresentaram boa estabilidade, das quais as duas primeiras foram de superior previsibilidade, mas com desempenho produtivo inferior as linhagens 158 e 182.

Comparação de parâmetros e seleção de linhagens pelos os três métodos

As linhagens 158, 100, 87, 90 foram selecionadas pelo método de Eberhart e Russell por apresentarem ampla adaptabilidade, $\beta_{1i}=1$, boa previsibilidade, $\sigma^2_{di}=0$ ou R^2 elevado $\geq 90\%$ e produtividades elevadas, 1812,03, 1701,05, 1529,67 e 1522,89 kg ha⁻¹, respectivamente, incluídas entre as mais produtivas nos ambientes avaliados (Tabela 4).

Pelo método AMMI as linhagens 102, 100, 158, 182 e 87 foram as de melhor desempenho, associando menor contribuição para interação GxA, alta previsibilidade e elevada produtividade (Tabela 4).

Na análise do GGE biplot as linhagens com melhor desempenho simultâneo para produtividade e alta previsibilidade foram 102, 100, 158, 87 e 182 (Figura 3 e Tabela 4). Os genótipos 158 e 182, embora com produtividades elevadas, apresentaram estabilidade inferior as linhagens 102 e 100 com melhor desempenho para esse parâmetro (Figura 3).

Os genótipos 87, 100 e 158 foram classificados com desempenho adequado quanto aos parâmetros de adaptabilidade e estabilidade avaliados nos três métodos usados, Eberhart e Russel, AMMI e GGE biplot, além de ciclo com 127 e 124 dias para as duas últimas linhagens, inferiores à média geral (Tabela 4).

DISCUSSÃO

A interação genótipos x ambientes é um fenômeno que se constitui como um dos principais complicadores, tanto para a fase de seleção quanto para a recomendação de cultivares, sendo os estudos de adaptabilidade e estabilidade alternativas para mitigar ou fazer proveito dos efeitos da interação (Cruz et al. 2014). Essa etapa é importante principalmente para o melhoramento de características quantitativas e complexas como produção de grãos, em especial para o guandu. Com potencial negligenciado e pouco explorado no Brasil em ações de melhoramento, o guandu é uma cultura com relevante importância em diversos países em

desenvolvimento, para o suprimento da necessidade proteica de populações de baixa renda (Yohane et al. 2020). A expansão das áreas de produção do guandu nos últimos anos tem sido superior à ocorrida para soja, feijão-caupi e amendoim em alguns países (Gumma et al. 2019).

Embora já tenham ocorridos avanços com programas de melhoramento já bem estabelecidos (Saxena et al. 2013), a baixa produtividade é um dos principais desafios no melhoramento genético do guandu. No Brasil, até o momento, inexistem estudos de adaptabilidade e estabilidade publicados com linhagens de guandu desenvolvidas para as condições de semiárido. No presente estudo são relatadas linhagens com bom desempenho produtivo, e parâmetros de adaptabilidade e estabilidade adequados, com real possibilidade para serem selecionadas e recomendadas aos produtores. Esse estudo pioneiro, pode contribuir diretamente para expansão do cultivo de guandu no Brasil, tradicionalmente feito por pequenos produtores em áreas de transição do semiárido para áreas mais úmidas, como no agreste nordestino (Costa e Santos 2021).

Em estudos publicados com adaptabilidade e estabilidade em guandu, os métodos mais usados são os de Eberhart e Russell (1996) e AMMI (Zobel et al. 1988), e mais recentemente observa-se crescimento no uso do método GGE biplot (Yan et al. 2000). Na classificação realizada por Flores et al. (1998) o método de Eberhart e Russell é agrupado entre aqueles em que a abordagem estatística associa bem o desempenho genotípico aos parâmetros de estabilidade e adaptabilidade, mas tem baixa correlação com a produtividade. De forma que genótipos com melhor desempenho quanto aos parâmetros adotados por esse método, nem sempre serão aqueles com melhor performance produtiva. Ainda segundo essa classificação, os métodos AMMI e GGE biplot são agrupados entre aqueles onde os parâmetros de estabilidade e produtividade são considerados, simultaneamente, para reduzir o efeito da interação genótipos \times ambientes.

Segundo Scapim et al. (2000), apesar do amplo uso do método Eberhart e Russell, essa é uma abordagem que possui algumas limitações, como o fato de que a média de todas as cultivares em cada ambiente ser tomada como uma medida do índice ambiental e ser usada como uma variável independente na regressão. Não havendo, pois, independência entre as variáveis, principalmente quando se trabalha com um número de cultivares pequeno, inferiores a 15. Outra limitação apontada por esses autores está na variação das estimativas do coeficiente de regressão, que é geralmente pequena e dificulta a classificação do genótipo para estabilidade e

adaptabilidade. Com isso, essa análise é mais confiável para analisar estudos que envolvam poucos ambientes com baixo ou alto desempenho, posto que o ajuste do genótipo pode ser amplamente determinado por seu desempenho em alguns ambientes extremos, levando à geração de resultados enganosos (Fasahat et al. 2015).

Para Rezende et al. (2020), há complementariedade quanto ao uso dos métodos Eberhart e Russell e AMMI, uma vez que o primeiro método avalia a responsividade de cada genótipo às melhorias no ambiente, e nas estimativas AMMI é dada a contribuição do genótipo para a interação G×A sem ruído (Silva e Duarte 2006), pois os autovalores iniciais do componente PCA do modelo AMMI capturam seletivamente o padrão de interação (Gauch e Zobel 1998).

Pelo método de Eberhart e Russell, 18% dos genótipos avaliados foram classificados com ampla adaptabilidade e com boa previsibilidade simultaneamente, com duas linhagens, 87 e 90, apresentando rendimento médio superior à média geral, 1516,31 kg ha⁻¹ (Tabela 2). As linhagens 158 e 100 com terceira e sexta maior produtividade apresentaram boa adaptabilidade, mas σ^2_{di} significativo e coeficiente de determinação que podem ser considerados matematicamente superiores a 90%. De acordo com Cruz et al. (2012) essas linhagens não devem ser descartadas como sendo de baixa estabilidade, pois R² pode ser usado para inferência adicional na estabilidade de genótipos, que quando de magnitude $\geq 90\%$, mesmo com σ^2_{di} significativo, indica boa estabilidade. Dessas quatro linhagens, 158, 87 e 100 foram classificadas entre as dez mais produtivas. Por esse método, a concordância entre bom desempenho produtivo e estabilidade foi baixa, mas foi alta para adaptabilidade, uma vez que, entre as 12 linhagens com desempenho produtivo acima da média, nove apresentaram ampla adaptação aos ambientes (Tabela 2). Reddy et al. (2011) usando esse método, reportaram a ocorrência de genótipos de guandu com ampla adaptabilidade e boa estabilidade entre aqueles mais produtivos, diferindo dos resultados obtidos no presente estudo.

Pelo método AMMI as linhagens selecionadas e que apresentaram melhor desempenho foram 102, 100, 158, 182 e 87. Ainda segundo o método AMMI, as linhagens com baixa previsibilidade foram 45, 190, 'guandu Petrolina', 102 e 129.

No método GGE biplot das linhagens com produtividade superior à média geral, 102, 100, 158, 87 e 182 foram classificadas entre os com estabilidade superior, mesmos genótipos classificados pelo método AMMI diferindo apenas para a classificação de 87, aqui com estabilidade superior a 182. Os demais tratamentos com

boa previsibilidade foram as linhagens 110, 130, 186, 184 e 159, mas com produtividade inferior à média geral. As seleções de linhagens usando os métodos AMMI e GGE biplot foram convergentes com a realizada segundo o método Eberhart e Russell para 87, 100 e 158. (Tabela 4). Por considerar os efeitos principais dos genótipos juntamente com o efeito da interação $G \times A$, a análise SREG é considerada superior ao método AMMI que os estima como efeitos aditivos (Yan 2000). A análise SREG incorpora o efeito de genótipo e tende a ser na maioria dos casos, altamente correlacionada com os escores do primeiro componente principal, permitindo avaliação gráfica do efeito do genótipo (Yan 2001).

As linhagens 126 e 130 apresentaram as menores alturas médias, <100 cm, em relação às demais avaliadas, no entanto, a produtividade inferior à média geral das linhagens e parâmetros de estabilidade e/ou adaptabilidade, estimados pelos três métodos, limitam a sua recomendação ampla. Para Santos et al. (2000), altura da planta reduzida é desejável em guandu granífero pois facilita a colheita, principalmente a semimecanizada.

As linhagens selecionadas nos três métodos são resultantes de cruzamentos realizados no programa de melhoramento de guandu da Embrapa Semiárido (Tabela 1), com a definição dos parentais baseada na precocidade, tamanho reduzido, produtividade elevada, maior número de grãos por vagem e maior tamanho de grão (Santos et al. 2000). Nos cruzamentos foram usados parentais de diferentes origens, entre acessos coletados em expedições realizadas na região nordeste do Brasil e de acessos introduzidos de diferentes países, como Índia. Os acessos de origem indiana apresentam como características principais a precocidade e o porte reduzido e tamanho de grãos reduzido, enquanto os acessos brasileiros apresentam grãos e vagens de maior tamanho maior, com plantas de porte maior (Santos et al. 2000, 2020).

As linhagens 87, 100 e 158 apresentaram rendimento de grãos elevado, superior à média geral dos experimentos, $1504,41 \text{ kg ha}^{-1}$, boa estabilidade e ampla adaptabilidade nos ambientes avaliados, nas análises com os métodos de Eberhart e Russell (Tabela 2), AMMI (Figuras 1 e 2) e GGE biplot (Figura 3). Essas linhagens apresentaram média de $1529,67 \text{ kg ha}^{-1}$, $1701,05 \text{ kg ha}^{-1}$ e $1812,03 \text{ kg ha}^{-1}$, com produtividades de até $2725,35$, $2928,13$ e $2955,38 \text{ kg ha}^{-1}$, respectivamente, em alguns ambientes (Tabela 4). São linhagens que apresentam ainda ciclo inferior à média (Tabela 4), denotando precocidade, característica de interesse aos produtores de área de sequeiro, devido aos curtos períodos chuvosos, com potencial para

avaliações em macroparcelas, visando a sua recomendação para cultivo de guandu na região semiárida brasileira.

CONCLUSÃO

Interação genótipos x ambientes significativa foi observada para produtividade em 21 linhagens de guandu mais a variedade controle 'guandu Petrolina' avaliadas em oito ambientes do Semiárido do Nordeste Brasileiro.

As linhagens 87, 100 e 158 apresentaram ampla adaptabilidade e boa previsibilidade pelos métodos de Eberhart e Russell, AMMI e GGE biplot, além de produtividade acima da média geral nos vários ambientes estudados, sendo indicadas para lançamento como nova cultivar de guandu para o semiárido brasileiro.

REFERÊNCIAS

- Bohra A, Saxena KB, Varshney RK e Saxena RK (2020) Genomics-assisted breeding for pigeonpea improvement. **Theoretical and Applied Genetics** **133**:1721–1737.
- Bornhofen E, Benin G, Storck L, Woyann LG, Duarte T, Stoco MG e Marchioro SV (2017) Statistical methods to study adaptability and stability of wheat genotypes. **Bragantia** **76**:1-10.
- Burgueño J, Crossa J e Vargas M (2003) SAS programs for Graphing GE and GGE Biplots. In: Kang MS (ed) **Handbook of formulas and software for plant geneticists and breeders**. Binghamton, Haworth Reference Press, pp 193-203.
- Costa AES e Santos CAF (2021) Genetic diversity and structure of pigeonpea germplasm assessed by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research** **20**:gmr18807.
- Cruz CD (2013) Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy** **35**:271-276.
- Cruz CD, Carneiro PCS e Regazzi AJ (2014) **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. rev. e ampl.** Ed. da UFV, Viçosa, 2, 668p.

- Cruz CD, Regazzi AJ e Carneiro PCS (2012) **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento**. Ed. da UFV, Viçosa, 514p.
- Duarte JB e Vencovsky R (1999) **Interação genótipos x ambientes: uma introdução a análise "AMMI"**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 60p.
- Eberhart SA e Russell WA (1966) Stability parameters for comparing varieties. **Crop Science** 6:36-40.
- Fasahat P, Rajabi A, Mahmoudi SB, Noghabi MA e Rad JM (2015) An overview on the use of stability parameters in plant breeding. **Biometrics & Biostatistics International Journal** 2:00043.
- Flores F, Moreno MT e Cubero JI (1998) A comparison of univariate and multivariate methods to analyze G×E interaction. **Field Crops Research** 56:271-286.
- Gauch HG e Zobel RW (1988) Predictive and postdictive success of statistical analyses of yield trials. **Theoretical and Applied Genetics** 76:1-10.
- Gumma MK, Tsusaka TW, Mohammed I, Chavula G, Ganga Rao NVPR, Okori P, Ojiewo CO, Varshney R, Siambi A e Whitbread A (2019) Monitoring changes in the cultivation of pigeonpea and groundnut in Malawi using time series satellite imagery for sustainable food systems. **Remote Sensing** 11:1475.
- Kumar MN, Ramya V, Sameer Kumar CV, Raju T, Sunil Kumar NM e Seshu G (2021) Identification of pigeonpea genotypes with wider adaptability to rainfed environments through AMMI and GGE biplot analyses. **Indian J Genet** 81:63-73.
- Muñoz N, Liu A, Kan L, Li MW e Lam HM (2017) Potential uses of wild germplasms of grain legumes for crop improvement. **International Journal of Molecular Sciences is an international** 18:328.
- Piepho HP (1996) Analysis of genotype-by-environment interaction and phenotypic stability. In Kang MS e Gauch HG (eds) **Genotype-by-environment interaction**. CRC Press, Boca Raton, pp 151-174.

- Pimentel-Gomes F e Garcia CH (2002) **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos**. Piracicaba, FEALQ, 309p.
- Reddy D, Venkateswarlu O, Obaiah MC e Jyothi GL (2011) Genotype x environment interaction for grain yield and its components in redgram [*Cajanus cajan* (L.) Millsp]. **Legume Research-An International Journal** **34**:288-291.
- Rezende WS, Cruz CD, Borém A e Rosado RDS (2020) Half a century of studying adaptability and stability in maize and soybean in Brazil. **Scientia Agricola** **78**:e20190197.
- Santos CAF, Araújo FP e Menezes EA (2000) Avaliação de genótipos de guandu de diferentes ciclos e portes no sertão pernambucano. **Magistra** **12**:31-40.
- Santos CAF (2020) **Estratégia para a seleção de linhagens de guandu granífero e forrageiro no Semiárido brasileiro**. Embrapa Semiárido, Petrolina, 19p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 142).
- Saxena KB, Kumar RV, Tikle AN, Saxena MK, Gautam VS, Rao SK, Khare DK, Chauhan YS, Saxena RK, Reddy BVS, Sharma D, Reddy LJ, Green JM, Faris DG, Nene YL, Mula M, Sultana R, Srivastava RK, Gowda CLL, Sawargaonkar SL e Varshney RK (2013) ICPH 2671—the world's first commercial food legume hybrid. **Plant Breeding** **132**:479-485.
- Scapim CA, Oliveira VR, Braccini ADL, Cruz CD, Andrade CADB e Vidigal MCG (2000) Yield stability in maize (*Zea mays* L.) and correlations among the parameters of the Eberhart and Russell, Lin and Binns and Huehn models. **Genetics and Molecular Biology** **23**:387-393.
- Silva WCJ e Duarte JB (2006) Métodos estatísticos para estudo de adaptabilidade e estabilidade fenotípica em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **41**:23-30.
- SAS Institute Inc (2015) **SAS University edition virtual application**. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Vargas Hernández M e J Crossa (2000) **The AMMI analysis and graphing the biplot**. CIMMYT, INT. México, 39p.

- Varshney RK, Saxena RK e Jackson SA (2017) The Pigeonpea Genome: An Overview. In Varshney RK, Saxena RK e Jackson S (eds) **The Pigeonpea Genome. Compendium of Plant Genomes A book series (CPG)**. Springer, Cham, pp 1-4.
- Vencovsky R e Barriga P (1992) **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 486.
- Waldman KB, Ortega DL, Richardson RB e Snapp SS (2017) Estimating demand for perennial pigeon pea in Malawi using choice experiments. **Ecological Economics** **131**:222-230.
- Yan W, Hunt L, Sheng Q e Szlavnic Z (2000) Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. **Crop Science** **40**:597-605.
- Yan W, Kang MS, Ma B, Woods S e Cornelius PL (2007) GGE biplot vs. AMMI analysis of genotype-by-environment data. **Crop Science** **47**:643-653.
- Yan W (2001) GGEbiplot - A Windows application for graphical analysis of multi-environment trial data and other types of two-way data. **Agronomy journal** **93**:1111-1118.
- Yohane EN, Shimelis H, Laing M, Mathew I e Shayanowako A (2021) Genotype-by-environment interaction and stability analyses of grain yield in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science** **71**:145-155.
- Zobel RW, Wright MJ e Gauch HG (1988) Statistical analysis of a yield trial. **Agronomy journal** **80**:388-393.

Tabela 1. Municípios, datas de semeio, altitude, latitude, longitude, produtividade média de grãos (\bar{Y}_j), graus de liberdade do resíduo (GL_R), coeficientes de variação (CV) e quadrado médio do resíduo QM_R , em experimentos conduzidos nos locais Campo Experimental de Barbalha, CE (CEB); Campo Experimental da Caatinga (CEC), Petrolina, PE; e Campo Experimental de Mandacaru (CEM), Juazeiro, BA.

Ambientes	Municípios	Semeio	Altitude (m)	Latitude (S)	Longitude (W)	\bar{Y}_j	GL_R	Coeficiente de variação		QM_R	
								Original	Transformado*	Original	Transformado*
1	CEB	17/10/2019	402	07°17'	39°16'	1648,54	38	18,79	9,79	97423,04	15,28
2	CEB	07/02/2020	388	07°17'	39°16'	1804,17	37	19,48	10,32	122131,64	18,55
3	CEC	09/10/2019	376	09°04'	40°19'	953,77	33	35,73	19,84	115560,41	34,47
4	CEC	07/02/2020	376	09°04'	40°19'	720,47	36	17,49	8,88	15898,42	5,61
5	CEC	28/10/2021	376	09°04'	40°19'	2586,18	36	20,91	10,90	281545,39	29,43
6	CEM	03/10/2019	379	09°23'	40°24'	2096,69	36	19,90	9,72	175871,02	19,14
7	CEM	11/02/2020	379	09°23'	40°24'	277,76	31	75,96	34,42	42844,08	28,70
8	CEM	11/11/2021	379	09°23'	40°24'	2042,93	36	19,76	9,60	165296,51	18,73
Média						1516,31					

* Raiz quadrada.

Tabela 2. Parentais e estimativas de parâmetros de estabilidade e adaptabilidade para produtividade (kg ha^{-1}) e ANOVA conjunta para 21 linhagens de guandu mais a variedade controle 'guandu Petrolina', avaliados em oito ambientes, três em condições de sequeiro e cinco irrigados, usando o método Eberhart e Russell (1966).

Tratamento	Parentais	Média	β_{1i}	σ^2_{di}	R^2	DPC	ALP
183	ICPL900053 x Anagé	1589,89	0,93 ^{NS}	14,65 ^{**}	86,43	124	149,78
162	ICPL89027 x D3 Type	1609,07	0,81 [*]	8,46 [*]	87,04	122	147,33
190	UW 10 x D3 Type	1516,72	0,88 ^{NS}	82,8 ^{**}	57,43	151	169,39
130	ICPL89027 x UW 10	1412,59	1,02 ^{NS}	2,26 ^{NS}	94,71	122	99,27
110	ICPL90045 x UW 10	1218,17	0,81 [*]	27,54 ^{**}	75,00	122	134,39
181	ICPL900053 x Anagé	1915,87	1,56 ^{**}	67,14 ^{**}	83,83	138	166,53
106	ICPL90045 x UW 10	1871,07	1,11 ^{NS}	17,67 ^{**}	88,84	126	142,39
186	ICPL900053 x Anagé	1455,46	1,00 ^{NS}	24,81 ^{**}	83,31	132	171,87
100	ICPL90045 x ICPL89027	1701,05	1,05 ^{NS}	8,94 [*]	91,63	124	152,74
179	ICPL900053 x Anagé	1520,95	1,21 [*]	18,26 ^{**}	90,11	132	145,22
96	ICPL90045 x ICPL89027	1728,30	0,82 [*]	37,72 ^{**}	70,32	126	140,00
87	ICPL90053 x D2 Type	1529,67	1,15 ^{NS}	-3,62 ^{NS}	98,41	127	146,76
126	ICPL89027 x UW 10	1334,53	0,77 ^{**}	5,06 ^{NS}	88,48	122	96,11
129	ICPL89027 x UW 10	1094,60	0,92 ^{NS}	45,86 ^{**}	71,47	118	135,39
159	ICPL89027 x D3 Type	1352,09	0,81 [*]	26,84 ^{**}	75,31	131	109,28
90	ICPL90053 x D3 Type	1522,89	1,15 ^{NS}	-0,47 ^{NS}	96,96	129	119,94
182	ICPL900053 x Anagé	1714,64	0,94 ^{NS}	28,61 ^{**}	79,54	139	149,17
184	ICPL900053 x Anagé	1463,94	0,97 ^{NS}	3,53 ^{NS}	93,41	122	129,42
158	ICPL89027 x D3 Type	1812,03	1,14 ^{NS}	17,05 ^{**}	89,46	124	151,11
102	ICPL90045 x ICPL89027	1583,21	1,15 ^{NS}	24,14 ^{**}	87,07	124	147,55
45	ICPL89020 x D3 Type	1396,54	0,97 ^{NS}	113,8 ^{**}	55,05	133	175,40
'Guandu Petrolina'	UW 10	1015,65	0,85 ^{NS}	70,43 ^{**}	59,33	132	129,83
Média		1516,31				128	141,31
CV (%)		12,41					
QM Bloco		156,16 [*]					
QM Genótipos (G)		182,32 ^{**}					
QM Ambientes (A)		7436,22 ^{**}					
QM GxA		91,51 ^{**}					
QM Resíduo		21,03					

*, ** e NS: significativo a 5%, 1% e não-significativo, respectivamente, pelo teste F; DPC: número de dias para primeira colheita (dias); ALP: Altura de planta (cm); CV: coeficiente de variação; QM: quadrado médio.

Tabela 3. Estabilidade e adaptabilidade segundo método AMMI e resultado do teste Gollob para a análise SREG (GGE biplot), com as proporções da taxa de interação para cada eixo principal para 21 genótipos de guandu e a variedade controle 'guandu Petrolina', avaliados em oito ambientes, três de regime sequeiro e cinco sob condições irrigadas.

AMMI	Autovalores			
	%Explicada	%Acumulada	GL	QM
IPCA1	32,47	32,47	27,00	65,54*
IPCA2	26,99	59,46	25,00	58,84*
IPCA3	18,47	77,93	23,00	43,79 ^{NS}
IPCA4	13,17	91,1	21,00	34,17 ^{NS}
IPCA5	4,59	95,69	19,00	13,17 ^{NS}
IPCA6	3,06	98,75	17,00	9,81 ^{NS}
IPCA7	1,25	100	15,00	4,53 ^{NS}
GGE biplot				
IPCA1	39,17	39,17	27,00	301,55**
IPCA2	21,28	60,45	25,00	176,97**
IPCA3	16,90	77,35	23,00	152,75**
IPCA4	11,26	88,61	21,00	111,41**
IPCA5	4,93	93,54	19,00	53,92**
IPCA6	3,52	97,05	17,00	43,00**
IPCA7	2,23	99,28	15,00	30,90 ^{NS}
IPCA8	0,72	100,00	13,00	11,48 ^{NS}

** , * e ^{NS} significativo a 1%, 5% e não significativo, respectivamente, de acordo com teste F

Tabela 4. Parâmetros de estabilidade e adaptabilidade, produtividade, dias para colheita (DPC) e altura (cm) de linhagens selecionadas entre 21 de guandu avaliadas em oito ambientes de acordo com os métodos de Eberhart e Russell (E&R), AMMI e GGE biplot.

	Linhagens	Produtividade (kg ha ⁻¹)			Eberhart e Russell		AMMI		GGE biplot		DPC (dias)	ALP (cm)
		Média	Maior	Menor	β_{1i}	σ^2_{di}	IPCA1	IPCA2	IPCA1	IPCA2		
Eberhart e Russell	158	1812,03 ⁽³⁾	2955,38 ⁽⁵⁾	239,96 ⁽¹⁰⁾	1,14 ^{NS(11)}	17,05 ^{** (9)}	1,53 ⁽¹⁶⁾	0,31 ⁽⁶⁾	2,13 ⁽⁵⁾	-0,4 ⁽⁶⁾	124 ⁽⁷⁾	151,11 ⁽¹⁷⁾
	100	1701,05 ⁽⁶⁾	2928,13 ⁽⁷⁾	395,39 ⁽⁵⁾	1,05 ^{NS(5)}	8,94 ^{* (7)}	0,89 ⁽¹⁰⁾	-0,23 ⁽⁴⁾	1,12 ⁽¹⁰⁾	0,12 ⁽³⁾	124 ⁽⁷⁾	152,74 ⁽¹⁸⁾
	87	1529,67 ⁽¹⁰⁾	2725,35 ⁽¹¹⁾	186,92 ⁽¹⁴⁾	1,15 ^{NS(14)}	-3,62 ^{NS(4)}	0,09 ⁽¹⁾	-0,49 ⁽⁸⁾	0,22 ⁽²¹⁾	0,49 ⁽⁷⁾	127 ⁽¹³⁾	146,76 ⁽¹²⁾
	90	1522,89 ⁽¹¹⁾	2708,75 ⁽¹²⁾	137,96 ⁽¹⁶⁾	1,15 ^{NS(12)}	-0,47 ^{NS(1)}	0,53 ⁽⁵⁾	-0,94 ⁽¹¹⁾	0,41 ⁽¹⁹⁾	0,86 ⁽¹¹⁾	127 ⁽¹³⁾	146,76 ⁽¹²⁾
AMMI	158	1812,03 ⁽³⁾	2955,38 ⁽⁵⁾	239,96 ⁽¹⁰⁾	1,14 ^{NS(11)}	17,05 ^{** (9)}	1,53 ⁽¹⁶⁾	0,31 ⁽⁶⁾	2,13 ⁽⁵⁾	-0,4 ⁽⁶⁾	124 ⁽⁷⁾	151,11 ⁽¹⁷⁾
	182	1714,64 ⁽⁵⁾	2670,71 ⁽¹⁴⁾	306,1 ⁽⁹⁾	0,94 ^{NS(6)}	28,61 ^{** (16)}	1,26 ⁽¹⁴⁾	0,48 ⁽⁷⁾	1,74 ⁽⁶⁾	-0,56 ⁽⁸⁾	139 ⁽²¹⁾	149,17 ⁽¹⁵⁾
	100	1701,05 ⁽⁶⁾	2928,13 ⁽⁷⁾	395,39 ⁽⁵⁾	1,05 ^{NS(5)}	8,94 ^{* (7)}	0,89 ⁽¹⁰⁾	-0,23 ⁽⁴⁾	1,12 ⁽¹⁰⁾	0,12 ⁽³⁾	124 ⁽⁷⁾	152,74 ⁽¹⁸⁾
	102	1583,21 ⁽⁹⁾	2946,33 ⁽⁶⁾	116,29 ⁽¹⁹⁾	1,15 ^{NS(13)}	24,14 ^{** (12)}	1,66 ⁽¹⁹⁾	-0,19 ⁽³⁾	1,07 ⁽¹¹⁾	-0,04 ⁽¹⁾	124 ⁽⁷⁾	147,55 ⁽¹⁴⁾
	87	1529,67 ⁽¹⁰⁾	2725,35 ⁽¹¹⁾	186,92 ⁽¹⁴⁾	1,15 ^{NS(14)}	-3,62 ^{NS(4)}	0,09 ⁽¹⁾	-0,49 ⁽⁸⁾	0,22 ⁽²¹⁾	0,49 ⁽⁷⁾	127 ⁽¹³⁾	146,76 ⁽¹²⁾
GGE biplot	158	1812,03 ⁽³⁾	2955,38 ⁽⁵⁾	239,96 ⁽¹⁰⁾	1,14 ^{NS(11)}	17,05 ^{** (9)}	1,53 ⁽¹⁶⁾	0,31 ⁽⁶⁾	2,13 ⁽⁵⁾	-0,4 ⁽⁶⁾	124 ⁽⁷⁾	151,11 ⁽¹⁷⁾
	182	1714,64 ⁽⁵⁾	2670,71 ⁽¹⁴⁾	306,1 ⁽⁹⁾	0,94 ^{NS(6)}	28,61 ^{** (16)}	1,26 ⁽¹⁴⁾	0,48 ⁽⁷⁾	1,74 ⁽⁶⁾	-0,56 ⁽⁸⁾	139 ⁽²¹⁾	149,17 ⁽¹⁵⁾
	100	1701,05 ⁽⁶⁾	2928,13 ⁽⁷⁾	395,39 ⁽⁵⁾	1,05 ^{NS(5)}	8,94 ^{* (7)}	0,89 ⁽¹⁰⁾	-0,23 ⁽⁴⁾	1,12 ⁽¹⁰⁾	0,12 ⁽³⁾	124 ⁽⁷⁾	152,74 ⁽¹⁸⁾
	102	1583,21 ⁽⁹⁾	2946,33 ⁽⁶⁾	116,29 ⁽¹⁹⁾	1,15 ^{NS(13)}	24,14 ^{** (12)}	1,66 ⁽¹⁹⁾	-0,19 ⁽³⁾	1,07 ⁽¹¹⁾	-0,04 ⁽¹⁾	124 ⁽⁷⁾	147,55 ⁽¹⁴⁾
	87	1529,67 ⁽¹⁰⁾	2725,35 ⁽¹¹⁾	186,92 ⁽¹⁴⁾	1,15 ^{NS(14)}	-3,62 ^{NS(4)}	0,09 ⁽¹⁾	-0,49 ⁽⁸⁾	0,22 ⁽²¹⁾	0,49 ⁽⁷⁾	127 ⁽¹³⁾	146,76 ⁽¹²⁾
Controle	'guandu Petrolina'	1015,7	1015,65 ⁽²²⁾	2559,98 ⁽¹⁷⁾	116,72 ⁽¹⁸⁾	0,85 ^{NS(15)}	70,43 ^{** (20)}	-2,58 ⁽²⁰⁾	-1,21 ⁽¹⁶⁾	-3,76 ⁽¹⁾	132 ⁽¹⁶⁾	129,83 ⁽¹⁷⁾
Média geral		1516,31	2848,13	255,08							128	141,31

(¹) Ordem de classificação das linhagens para cada parâmetro avaliado.

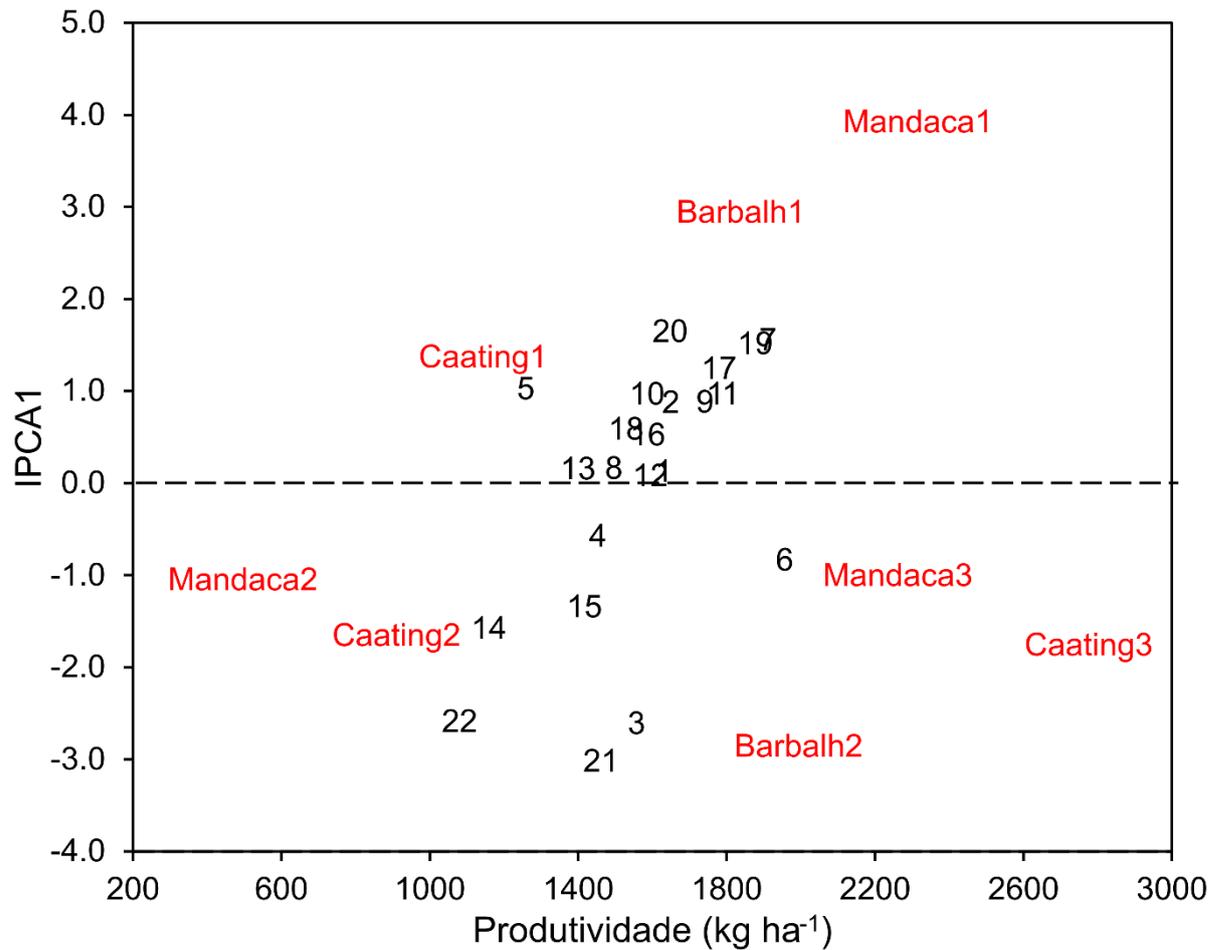


Figura 1. Biplot AMMI utilizando as médias correspondente da representação dos 21 genótipos de guandu mais a variedade guandu Petrolina avaliados em oito ambientes para produtividade Tratamentos: 1= 183, 2= 162, 3= 190, 4= 130, 5= 110, 6= 181, 7= 106, 8= 186, 9= 100, 10= 179, 11= 96, 12= 87, 13= 126, 14= 129, 15= 159, 16= 90, 17= 182, 18= 184, 19= 158, 20= 102, 21= 45 e 22= guandu Petrolina. Ambientes testados: Barbalh1 e Barbalh2 (Barbalha, CE); Caating1, Caating2, Caating3 (Petrolina, PE); e Mandaca1, Mandaca2 e Mandaca3 (Juazeiro, BA).

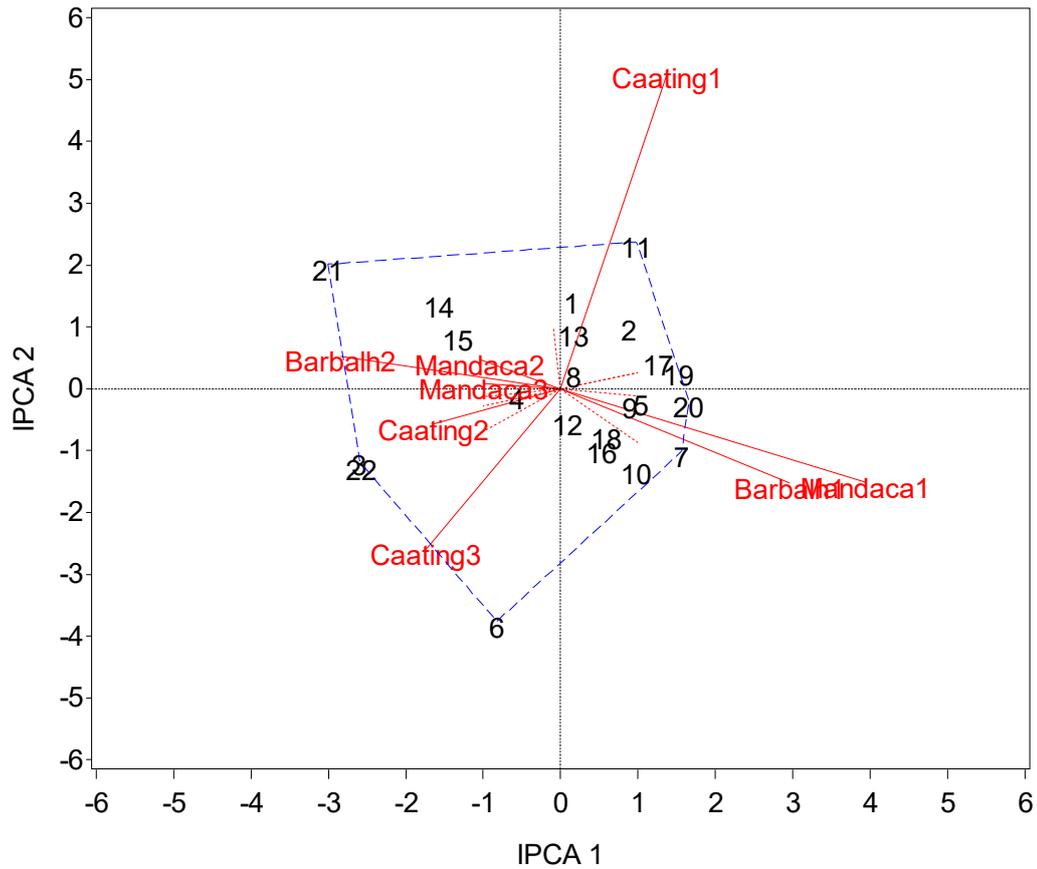


Figura 2. Biplot AMMI com os dois primeiros componentes principais correspondente à representação dos 21 genótipos de guandu mais a variedade guandu Petrolina, avaliados em oito ambientes para produtividade Tratamentos: 1= 183, 2= 162, 3= 190, 4= 130, 5= 110, 6= 181, 7= 106, 8= 186, 9= 100, 10= 179, 11= 96, 12= 87, 13= 126, 14= 129, 15= 159, 16= 90, 17= 182, 18= 184, 19= 158, 20= 102, 21= 45 e 22= 'guandu Petrolina'. Ambientes testados: Barbalh1 e Barbalh2 (Barbalha, CE); Caating1, Caating2, Caating3 (Petrolina, PE); e Mandaca1, Mandaca2 e Mandaca3 (Juazeiro, BA).

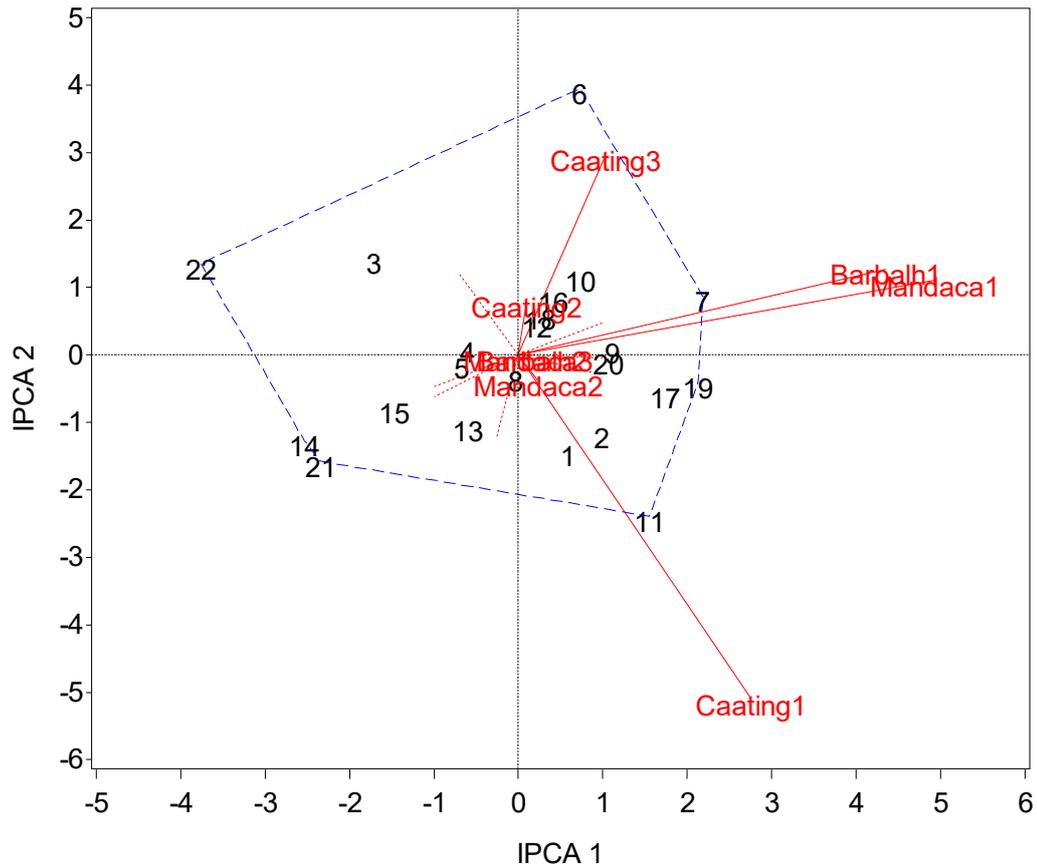


Figura 3. GGE biplot correspondente a representação dos 21 genótipos mais a variedade guandu Petrolina avaliados em oito ambientes relativos à produtividade (kg ha^{-1}) em guandu. Tratamentos: 1= 183, 2= 162, 3= 190, 4= 130, 5= 110, 6= 181, 7= 106, 8= 186, 9= 100, 10= 179, 11= 96, 12= 87, 13= 126, 14= 129, 15= 159, 16= 90, 17= 182, 18= 184, 19= 158, 20= 102, 21= 45 e 22= 'guandu Petrolina'. Ambientes testados: Barbalh1 e Barbalh2 (Barbalha, CE); Caating1, Caating2, Caating3 (Petrolina, PE); e Mandaca1, Mandaca2 e Mandaca3 (Juazeiro, BA).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo é uma relevante contribuição para o programa de melhoramento de guandu da Embrapa Semiárido e talvez, para o melhoramento da cultura no Brasil. Foram importantes etapas conduzidas, como realização de hibridações, condução de populações segregantes, seleção de indivíduos promissores e estimativas de parâmetros genéticos, de diversidade, adaptabilidade e estabilidade que dão consistente base para próximas etapas do programa. Como desafio, o guandu apresenta taxa de cruzamento elevado, apesar de sua estrutura floral favorecer a autofecundação, necessitando de cuidados na condução de populações, como a proteção com tecidos-não-tecidos (TNT), tornando ainda mais desafiante o avanço de gerações e produção de sementes genéticas.

No segundo capítulo, esse trabalho possibilitou um estudo pioneiro e compreensivo da diversidade genética de acessos do germoplasma de guandu, acessos de origem indiana, caribenha e brasileira, que incluem os acessos coletados no nordeste do Brasil. Nessa região, pequenos produtores têm feito o cultivo tradicional com contribuições para incremento em características de interesse na cultura como tamanho de vagem e grão, e porte de planta. Como ações futuras ainda necessárias para uma avaliação ainda mais abrangente da diversidade molecular, requer-se a realização de caracterização com uso de um maior número de marcadores e para isso, é essencial o uso de plataformas de genotipagem automatizadas.

No terceiro capítulo, esse estudo traz uma abordagem sobre a herdabilidade, parâmetro genético importante para o melhoramento de plantas. Dentre as abordagens usadas, observou-se que as estimativas via método ANOVA e modelos mistos por REML/BLUP apresentaram resultados semelhantes, e foram superiores aos métodos com base na regressão e correlação pai-filho.

No quarto capítulo, com as estimativas de parâmetros de adaptabilidade e estabilidade em linhagens de guandu desenvolvidas para o semiárido do nordeste brasileiro, algo ainda inédito para o melhoramento de guandu local, foi possível selecionar linhagens com real potencial para recomendação e registro de cultivares da espécie. Como próximos passos, são necessários a realização de ensaios com macro parcelas em áreas de produtores para essas linhagens selecionadas, e ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) para registro. Além disso, é interessante a condução de novos ensaios de competição em mais locais de diferentes regiões do país para uma provável recomendação mais ampla das

linhagens, e avaliação do desempenho produtivo das mesmas. Das linhagens avaliadas, a 96 e a 130 merecem destaque, pois a altura reduzida é uma característica de interesse para produção de guandu granífero em larga escala com cultivo mecanizado, com maior densidade de plantas/ha, que podem elevar a produtividade dessas linhagens de baixo porte.

ANEXOS



Anexo 1. Genótipos avaliados em oito ambientes, cinco sob condições irrigadas e três sob regime de sequeiro analisados no Capítulo IV.

Anexo 2. ANOVA individual para 21 linhagens de guandu mais a variedade controle 'guandu Petrolina', avaliados em oito ambientes, três em condições de sequeiro e cinco irrigados, avaliados no Capítulo IV.

Genótipo	Barbalha-CE		Petrolina-PE			Juazeiro-BA		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
106	2813.40 ^a	1747.55 ^{abcde}	978.06 ^{abc}	741.79 ^{ab}	2937.46 ^{abc}	3019.10 ^a	439.88 ^a	2309.87 ^a
182	2541.02 ^{ab}	2415.98 ^{ab}	1272.44 ^{abc}	769.5 ^{ab}	2162.72 ^{bc}	2670.71 ^a	306.1 ^a	1606.31 ^a
158	2478.81 ^{abc}	1945.99 ^{abcde}	1514.67 ^{ab}	611.22 ^{ab}	2962.19 ^{abc}	2780.99 ^a	239.96 ^a	1969.19 ^a
181	2073.26 ^{abcd}	2296.47 ^{abc}	295.87 ^{bc}	905.35 ^{ab}	5177.55 ^a	2572.78 ^{ab}	145.99 ^a	1838.39 ^a
90	1940.43 ^{abcd}	1584.62 ^{abcde}	714.43 ^{bc}	786.07 ^{ab}	2708.75 ^{abc}	2275,00 ^{ab}	137.96 ^a	2035.87 ^a
87	1923.25 ^{abcd}	1946.57 ^{abcde}	756.78 ^{abc}	538.73 ^{ab}	2725.35 ^{abc}	1983.44 ^{abc}	186.92 ^a	2217.94 ^a
102	1814.14 ^{abcde}	1269.12 ^{bcde}	983.02 ^{abc}	748.19 ^{ab}	2178.09 ^{bc}	2946.33 ^a	116.29 ^a	2608.85 ^a
179	1810.58 ^{abcde}	1931.99 ^{abcde}	611.54 ^{bc}	777.39 ^{ab}	2646.19 ^{abc}	2887.50 ^a	100.72 ^a	1381.95 ^a
100	1777.83 ^{abcde}	1735.12 ^{abcde}	965.56 ^{abc}	706.26 ^{ab}	2417.61 ^{bc}	3005.32 ^a	395.39 ^a	2691.68 ^a
96	1760.21 ^{abcde}	1983.95 ^{abcd}	2354.64 ^a	705.05 ^{ab}	2473.26 ^{bc}	2460.79 ^{ab}	395.49 ^a	1838.89 ^a
162	1707.62 ^{abcde}	1891.28 ^{abcde}	1280.25 ^{abc}	726.9 ^{ab}	1923.68 ^{bc}	2650.79 ^a	481.39 ^a	2150.01 ^a
183	1685.79 ^{abcde}	1953.28 ^{abcde}	1729.81 ^{ab}	711.47 ^{ab}	2729.16 ^{abc}	1869.33 ^{abcd}	232.26 ^a	1858.33 ^a
184	1636.99 ^{abcde}	1362.78 ^{bcde}	726.91 ^{abc}	776.01 ^{ab}	2652.55 ^{abc}	2396.76 ^{ab}	272.02 ^a	1872.97 ^a
190	1622.33 ^{abcdef}	2883.78 ^a	159.08 ^{bc}	1141.84 ^a	2324.89 ^{bc}	1224.62 ^{abcde}	429.26 ^a	2361.99 ^a
186	1620.55 ^{abcdef}	1063.54 ^{de}	1255.30 ^{abc}	641.21 ^{ab}	3306.34 ^{ab}	1694.86 ^{abcde}	239.96 ^a	1969.44 ^a
110	1503.90 ^{bcdef}	806.05 ^e	552.72 ^{bc}	562.96 ^{ab}	1647.06 ^{bc}	2001.72 ^{abc}	390.15 ^a	2220.21 ^a
126	1387.20 ^{cdef}	1141.63 ^{cde}	1065.54 ^{abc}	721.56 ^{ab}	2023.68 ^{bc}	1683.26 ^{abcde}	307.88 ^a	2284.85 ^a
129	1126.08 ^{def}	2279.42 ^{abcd}	719.95 ^{bc}	502.5 ^b	1476.46 ^c	796.75 ^e	73.6 ^a	1749.38 ^a
130	1100.79 ^{def}	1700.3 ^{abcde}	820.17 ^{abc}	697.25 ^{ab}	2855.58 ^{abc}	2015.83 ^{abc}	231.57 ^a	1821.34 ^a
159	885.94 ^{ef}	2226.35 ^{abcd}	717.66 ^{bc}	657.32 ^{ab}	1763.58 ^{bc}	1716.38 ^{abcde}	437.21 ^a	2412.29 ^a
guandu Petrolina'	526.27 ^f	1109.18 ^{de}	142.58 ^c	699.76 ^{ab}	2559.98 ^{bc}	881.14 ^{de}	354.16 ^a	1900.01 ^a
45	495.72 ^f	2429.63 ^{ab}	1405.24 ^{abc}	732.72 ^{ab}	3305.94 ^{ab}	966.04 ^{cde}	131.98 ^a	1775.01 ^a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Bonferroni, a 5% de probabilidade.



The Original by FUNPEC-RP

Genetic diversity and structure of pigeonpea germplasm assessed by microsatellite markers

A.E. da S. Costa¹ and C.A.F. Santos²

¹ Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Melhoramento Genético de Plantas, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil

² Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, Brasil

Corresponding author: C.A.F. Santos

E-mail: carlos-fernandes.santos@embrapa.br

Genet. Mol. Res. 20 (1): gmr18807

Received January 18, 2021

Accepted March 10, 2021

Published March 31, 2021

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr18807>

ABSTRACT. The pigeonpea is an important grain legume in various regions of the world. It is a pulse that is cultivated mainly by small farmers in semi-arid tropical regions for various purposes, including food security, livestock feed, and agroforestry systems. We examined the genetic diversity and structure of 73 pigeonpea accessions from 10 origins, including regions of Brazil, Central America, and India. Allelic diversity and polymorphism, molecular analysis of variance (AMOVA), Bayesian analysis (Structure) and a dendrogram were estimated based on data concerning 11 microsatellite loci. AMOVA revealed wide genetic differentiation among the pigeonpea populations, with F_{ST} ranging from 0.22 to 0.25. Expected heterozygosity in the accessions was greater than the observed heterozygosity in eight of the 11 loci, with the observed heterozygosity ranging from 0.06 to 0.55. Polymorphic information content ranged from 0.13 to 0.67 among the 11 loci. Genetic similarity among pigeonpea accessions ranged from 0.26 to 0.93, indicating considerable variability among them, with the formation of three groups, one of which included all Brazilian accessions. Two groups were formed in the Structure analysis, indicating reduced allele sharing between the populations of Northeast Brazil and other populations. This information highlights the importance of incorporating germplasm from the Brazilian

Northeast into pigeonpea breeding programs in Brazil, to increase the variability in germplasm collections.

Key words: Bayesian analysis; Brazil Northeast; *Cajanus cajan*; Dendrogram; Pulses; Redgram

INTRODUCTION

Pigeonpeas (*Cajanus cajan*), like other pulses in the Fabaceae family, are important sources of protein, especially for the poorest populations with restricted access to animal protein. In addition to the archaeological evidence (Fuller and Harvey, 2006), molecular studies, such as Saxena et al. (2014), confirm that pigeonpea is a species of Indian origin. This crop is the sixth pulse in terms of worldwide importance, with a production of 6.81 Mt in 2017 (FAOSTAT, 2020).

Pigeonpea is a crop that is resilient to environmental limitations and climate change, being grown mainly in semiarid regions (Varshney et al., 2017). It has the ability to absorb phosphorus from soils poor in this nutrient (Ae et al., 1990). In Brazil, the pigeonpea is used for grain production, especially in areas of transition from the semiarid to more humid areas (the northeastern agreste). It has been an alternative to help meet the growing demand for forage production. (Santos et al., 1999).

Despite the agronomic potential of this crop, the pigeonpea is underexploited in plant breeding in Brazil, and the available cultivars are result of line selection within populations (Godoy et al., 2013) or the introduction of germplasm from other countries (Santos et al., 1999). Germplasm collections of this legume are rare; the main one in Brazil includes almost 400 accessions available at Embrapa Semiárido in Petrolina, Pernambuco.

Estimates of genetic diversity parameters in germplasm collections are important for breeding programs. Microsatellites are essential tools for genetic studies due to multiallelism, abundance and codominance (Sharma et al., 2018). Polymorphic pigeonpea microsatellites have been widely reported (Odeny et al., 2009; Saxena et al., 2010; Bohra et al., 2011; Sarika et al., 2013). Zavinon et al. (2020) studied genetic diversity and population structure in 77 Benin landraces, using 30 loci. Sharma et al. (2018) used 33 loci to assess genetic diversity among a set of Indian accessions of male sterile, maintainer and germplasm lines. In Brazil, Sousa et al. (2011) estimated the diversity in 77 accessions of pigeonpea adapted to the south-southeast region, using 43 loci. However, a compressive study of pigeonpea Brazilian germplasm is still lacking.

We examined genetic diversity and structure in 73 accessions of pigeonpea from 10 origins/regions, including eight from Brazil, using microsatellite loci, to help guide programs of genetic resources and improvement of this pulse.

MATERIAL AND METHODS

Plant materials and DNA extraction

Seventy-three pigeonpea accessions from 10 different regions were evaluated; these included seven regions of northeast Brazil and one from the southeast region of Brazil, one from India and the other from the FAO office in Central America (Caribbean), these being Abaíra, BA (six accessions), Anagé, BA (seven accessions), India (nine accessions), Jacobina e Saúde, BA (nine accessions), Mairi, BA (six accessions), Moreilândia and Exu, PE (eight accessions),

Seabra, BA (five accessions), Triunfo, PE (seven accessions), São Carlos, SP (nine accessions) and Central America (seven accessions).

Northeast Brazilian accessions are the result of germplasm collections carried out in the northeast, while the southeast accessions are from Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Indian accessions are from the International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). All accessions are preserved in the pigeonpea Embrapa Semiárido Germplasm collection.

Leaf samples from young plants were collected from all accessions and stored at -80°C . DNA extraction was performed according to the Doyle and Doyle (1990) protocol, with some minor modifications: centrifugations at 10,000 rpm, 2% beta mercaptoethanol concentration, and sample incubation time for 30 minutes at 60°C . After re-suspending the final pellet in TE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA), the DNA solution was treated with RNase to remove co-isolated RNAs. DNA quantification and integrity were verified on 0.8% agarose gel, followed by genomic DNA dilution to 40 ng mL^{-1} .

PCR and microsatellite amplification

Microsatellite loci developed by Bohra et al. (2011) were used for accession genotyping. Initial screening was carried out with a set of 42 loci on five *C. cajan* accessions. According to the quality of the amplification, a polymorphic locus was chosen for each pigeonpea linkage group ($n = 11$) (Table 1), according to a consensus genetic map (Bohra et al., 2012). Polymerase chain reactions (PCRs) for loci amplifications were performed for the final reaction volume of 12 μL , containing 1x of the PCR buffer (Ludwig Biotec, Brazil), 2 mM MgCl_2 (Ludwig Biotec, Brazil), 0.2 mM dNTPs, 5 $\text{ng}\ \mu\text{L}^{-1}$ DNA, 0.2 μM of each primer, and 0.1 U of Taq DNA polymerase.

DNA fragments were amplified with a touchdown PCR program (Biometra, model-T1 Thermoblok): initial denaturation for 5 minutes at 95°C , followed by five cycles of denaturation for 20 seconds at 94°C , annealing for 20 seconds at a temperature according to locus (Table 1) (annealing temperature for each cycle was reduced by 1°C per cycle), and an extension for 30 seconds at 72°C . Subsequently, 30 cycles of denaturation at 94°C for 20 seconds followed by annealing for 20 seconds at a temperature according to Table 1 and an extension for 30 seconds at 72°C , and 15 minutes of final extension at 72°C . PCR amplification products were resolved in 6% denatured polyacrylamide gel electrophoresis on a 60-well sandwich-type glass plate. Gels were stained with a silver nitrate protocol, according to Creste et al. (2001).

Molecular data analysis

Only microsatellite loci that presented consistent amplification and polymorphism, with bands easy to view and interpret, were selected. Genotypic data for each accession were subjected to analysis to estimate parameters of genetic diversity: major allele frequency (MAF), number of genotypes (NG), total number of alleles (NA), number of private alleles (NPA), expected heterozygosity (H_E), observed heterozygosity (H_O) and polymorphism information content (PIC), using the software PowerMarker (Liu and Muse, 2005) and the Excel macro GenAlEx (Peakall and Smouse, 2006).

Microsatellite loci data were coded for presence (1) or absence (0) to estimate genetic relationships between pigeonpea accessions, with a dendrogram constructed by the UPGMA method (unweighted pair group method with arithmetic mean), based on the similarity coefficient Jaccard. The adjustment of the dendrogram was evaluated by the cophenetic

correlation, that is, the correlation between the real distance and the distances represented graphically, in the NTSYSpc software (Rohlf, 2000).

Analysis of molecular variance (AMOVA), without regional data structure, and with the decomposition of the total genetic variation between populations, between individuals and within individuals, using the mean squares, was performed using the Excel macro GenAlEx (Peakall and Smouse, 2006), with the 'Codom-Allelic' option to estimate F_{ST} . The significance of the F_{ST} and number of migrants (N_m) estimates were obtained by the randomization method, with 9999 permutations.

Allelic structure of each accession of a population was evaluated using the Bayesian clustering method with the Structure software (Pritchard et al., 2009). Bayesian analysis was performed with a burn-in of 50,000 iterations and 500,000 simulations of the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method. A continuous series of K was tested, from 1 to 10, in 10 runs. Prior knowledge data on the origin of the population was introduced, subdividing accesses into ten initial groups, according to the origin sites. The determination of the most likely value of K was performed using the *ad hoc* ΔK statistics, which are based on the rate of change of the logarithmic probability of the data about the number of groups inferred by Structure (Evanno et al., 2005). After defining the K , the genetic structure was inferred through a new execution in the same software, this time using a burn-in period of 100,000 and an execution length of 1,000,000 repetitions of MCMC with the same model mentioned above. For the graphical presentation of Structure results, Clumpak server was used (Kopelman et al., 2015).

RESULTS

Genetic diversity and UPGMA analysis

At least one microsatellite locus was identified in the 11 pigeonpea linkage groups (Table 1), among the 42 loci initially evaluated. Forty alleles (NA) were revealed by the 11 loci in the 73 accessions of *C. cajan* (Table 1), with an average of 3.64 alleles per locus.

Table 1. Linkage group (LG), annealing temperature (Ta) and genetic parameter estimates* in 73 pigeonpea accessions, based on 11 microsatellite loci.

Loci	LG	Ta (°C)	MFA	NG	NA	NPA	NE	H _O	H _E	PIC
CcM2485	1	60	0.76	9	4	0	1.49	0.16	0.21	0.37
CcM492	2	59	0.40	12	6	0	2.29	0.45	0.52	0.65
CcM1791	3	64	0.60	3	2	0	1.72	0.41	0.41	0.36
CcM1962	4	59	0.39	12	6	6	2.24	0.25	0.50	0.67
CcM810	5	59	0.44	6	3	0	1.95	0.25	0.45	0.55
CcM2542	6	59	0.45	8	4	4	1.99	0.55	0.46	0.53
CcM402	7	64	0.92	3	2	0	1.14	0.06	0.08	0.13
CcM2911	8	60	0.69	3	2	0	1.34	0.19	0.24	0.33
CcM126	9	61	0.54	11	5	0	1.92	0.28	0.40	0.58
CcM1573	10	64	0.49	5	3	1	1.71	0.50	0.40	0.40
CcM2735	11	59	0.48	6	3	0	1.65	0.45	0.36	0.48
Total				78	40	11				
Mean			0.56	7.09	3.64	1	1.77	0.32	0.37	0.46

*MAF = major allele frequency; NG = number of genotypes; NA = total number of alleles; NE = Number of Effective Alleles; NAP = number of private alleles; H_E = expected heterozygosity; H_O = observed heterozygosity; PIC = polymorphism information content.

The major allele frequency (MAF) ranged from 0.39 (CcM1962) to 0.92 (CcM402), with a locus average of 0.56. The number of genotypes (NG) was 78 with an average of 7.09 per

locus, with the smallest NG in the CcM402, CcM1791 and CcM2911 loci and 12 the highest number in the CcM492 and CcM1962 loci. The content of polymorphic information (PIC) ranged from 0.13 (CcM402) to 0.67 (CcM1962) among the 11 loci, with 0.46 average (Table 1).

Expected accession heterozygosity (H_E) was greater than the observed heterozygosity (H_O) in eight of the 11 loci. H_O values ranged from 0.06 (CcM402) to 0.55 (CcM2542), with an average of 0.32 between the loci. For H_E values, the variation was from 0.08 (CcM402) to 0.52 (CcM492), with a 0.37 average (Table 1). Three loci (CcM1573, CcM1962 and CcM2542) contained one or more of the private alleles (NPA) (Table 1). All private alleles were identified in accessions of Indian origin. Six accessions harbored one private alleles (ICPL 88018, ICPL 90044, ICPL 90050, ICPL 90052) or two private alleles (ICPL 90046 and ICP 2582).

Genetic similarity among the accessions of the 10 pigeonpea populations ranged from 0.26 to 0.93, indicating high variability among them (Figure 1).

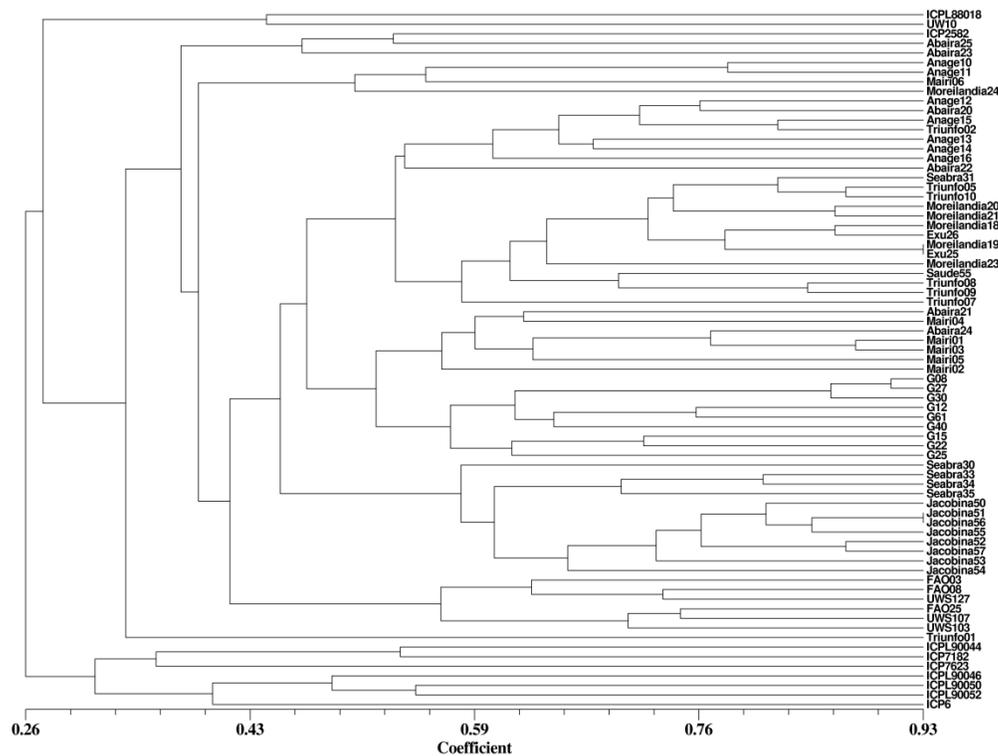


Figure 1. UPGMA dendrogram of the Jaccard similarity coefficient among 73 pigeonpea accessions, from 10 regions/origins, assessed with 11 microsatellite loci. Cophenetic correlation=0.82. India (ICPL 88018, ICPL 90044, ICPL 90046, ICPL 90050, ICPL 90052, ICP 6, ICP 2582, ICP 7182 and ICP 7623); Anagé, BA (Anage10, Anage11, Anage12, Anage13, Anage14, Anage15, Anage16); Abaira, BA (Abaira20, Abaira21, Abaira22, Abaira23, Abaira24, Abaira25); Seabra, BA (Seabra30, Seabra31, Seabra33, Seabra34 and Seabra35); Jacobina, BA (Jacobina50, Jacobina51, Jacobina52, Jacobina53, Jacobina54, Jacobina55, Jacobina56, Jacobina57 and Saude55); Mairi, BA (Mairi01, Mairi02, Mairi03, Mairi04, Mairi05 and Mairi06); Triunfo, PE (Triunfo01, Triunfo02, Triunfo05, Triunfo07, Triunfo08, Triunfo09 and Triunfo10); Moreilândia, PE (Moreilândia18, Moreilândia19, Moreilândia20, Moreilândia21, Moreilândia23, Moreilândia24, Exu25 and Exu26); São Carlos, SP (G08, G12, G15, G22, G25, G27, G30, G40 and G61) and; Central America (FAO03, FAO08, UW10, FAO25, UWS103, UWS107 and UWS127).

At the cut-off point of 0.30, it is possible to observe the formation of three groups: one group with all Brazilian accessions, the second group with accessions UW10 (Central America) and ICPL 88018 (India) and the third group with accessions of Indian origin (Figure 1). The greatest similarities (0.93) were observed between the Jacobina51 and Jacobina56 accessions and between the Moreilândia19 and Exu25 accessions (Figure 1). The lowest similarity coefficients were observed with seven accessions of Indian origin (Figure 1). The cophenetic correlation of 0.82 indicates a moderate adjustment between the actual distance and the graphical distances.

Genetic structure by AMOVA and Bayesian inferences

Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed wide genetic differentiation among the 10 pigeonpea populations, $F_{ST} = 0.25$ (Table 2). In the eight Brazilian populations, F_{ST} was 0.23 and after reducing to the seven populations sampled in northeastern Brazil, F_{ST} was 0.22 (Table 2), also indicating moderate to high genetic differentiation (Wright, 1978). The number of migrants (N_m) was close to 0.80 in the three situations, being slightly lower among accessions in Northeast of Brazil (Table 2). All population F_{ST} values were significant, indicating moderate to high differentiation between pigeonpea population pairs (Table 3).

Table 2. Analysis of molecular variance (AMOVA) in 73 pigeonpea accessions assessed with 11 microsatellite loci.

Source of variation	DF	MS	Estimated Variance	Total variance (%)	F_{ST} Statistic	P-value	Nm
Among Pops	9	14.11	0.78	25	0.25	<0.001	0.73
Among Indiv	63	2.82	0.54	18			
Within Indiv	73	1.74	1.74	57			
Total	145		3.06	100			
Among Pops BR	7	11.36	0.63	23	0.23	<0.001	0.84
Among Indiv BR	49	2.40	0.28	10			
Within Indiv BR	57	1.84	1.84	67			
Total	113		2.75	100			
Among Pops NE	6	10.15	0.57	22	0.22	<0.001	0.88
Among Indiv NE	41	2.30	0.28	11			
Within Indiv NE	48	1.75	1.75	67			
Total	95		2.60	100			

p-value based on 9999 permutations. DF=Degrees of freedom. MS=Mean square. Nm=Number of migrants. BR=Brazil. NE= Northeast Brazil.

Table 3. Genetic differentiation (F_{ST}) in pairs between 10 pigeonpea populations assessed with 11 microsatellite loci.

Origin	Anagé	Abaira	Seabra	Jacobina	Mairi	Triunfo	Moreilândia	São Carlos	Central America
India	0.20**	0.13**	0.28**	0.34**	0.22**	0.31**	0.34**	0.22**	0.20**
Anagé, BA		0.08*	0.30**	0.32**	0.22**	0.23**	0.25**	0.18**	0.29**
Abaira, BA			0.17**	0.18**	0.07*	0.06*	0.17**	0.12**	0.25**
Seabra, BA				0.12*	0.29**	0.29**	0.26**	0.32**	0.40**
Jacobina, BA					0.27**	0.27**	0.30**	0.29**	0.35**
Mairi, BA						0.22**	0.32**	0.12**	0.33**
Triunfo, PE							0.09*	0.26**	0.41**
Moreilândia, PE								0.35**	0.41**
São Carlos, SP									0.15**

Significance of F_{ST} based on 999 permutations, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$

Bayesian clustering method identified the highest value for $K=2$ (Figure 2), indicating that pigeonpea germplasm were divided into a group with accessions with long adaptation in Brazil and another group with accessions from Central America and Indian accessions. The genetic structure indicates the sharing of alleles among accessions in São Carlos, SP, Central America and India, and the absence of allele sharing in accessions collected in northeastern Brazil, with some exceptions in Mairi, BA, Anagé, BA and Abaíra, BA (Figure 3).

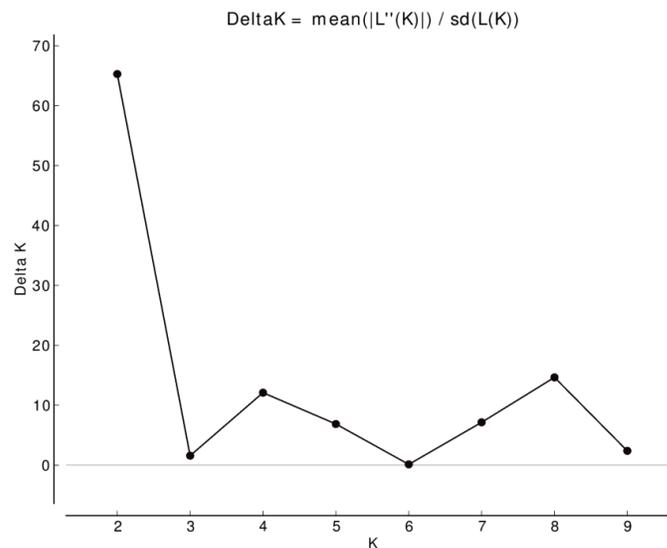


Figure 2. Estimation of the optimum number of clusters (K) of pigeonpea accessions in the STRUCTURE according to ΔK criterion of Evanno et al. (2005).

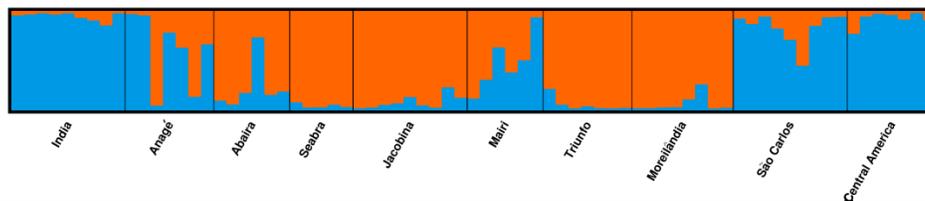


Figure 3. Genetic structure of 73 pigeonpea accessions based on Bayesian analysis, considering $K=2$. Each line represents a pigeonpea accession. Each color represents the probable lineage of the set from which the accession or partial accession was derived. Analysis performed with 11 microsatellite loci, Structure 2.3.4.

DISCUSSION

Pigeonpea is grown in some Brazilian regions, which reflects the reduced number of accessions preserved in germplasm collection, available almost exclusively from Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, and Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. This pioneering study considers the broadest evaluation of accessions from Northeast Brazil, sampled in regions where this pulse is widely cultivated, comparing its genetic structure with germplasm from two important regions of the world of pigeonpea cultivation: India and Central America.

UPGMA analysis showed high genetic similarity, ranging from 0.26 to 0.93, corroborating the estimates by Manju et al. (2017), which ranged from 0.45 to 0.93 in 40 Indian

accessions. Minor genetic similarity was reported by Sharma et al. (2018), ranging from 0.2 to 0.32 in 96 Indian accessions and by Songok et al. (2010), ranging from 0.1 to 0.45 in 88 accessions of Indian and East African origin. The UPGMA analysis of the present study suggests the crossing of accessions of the three different identified groups, with emphasis on the crossings of accessions of Indian origin with Brazilian accessions. The main characteristics of accessions of Indian origin are precocity and small plant size, while Brazilian accessions present larger grains and pods, and adaptation to Brazilian environmental conditions.

Eleven loci identified in our study can be used for genetic structure estimates, as they presented a PIC greater than 0.33, except CcM402 in linkage group seven, which should be replaced by another locus of higher PIC. As discussed by Hamilton (2009), with the application of unlinked loci or on different chromosomes associated with the allelic frequency, it is possible to identify unique homozygous plants or cultivar among billions, making these estimates extremely valuable in plant breeding and even in commercial disputes. Sharma et al. (2018) analyzed pigeonpea accessions with 44 microsatellite loci distributed in the 11 linkage groups, of which only CcM402 is common to the loci evaluated in the present study, indicating the need for standardization of loci for population studies in the species.

The average number of alleles/locus in the present study, 3.64, was higher than the 1.7 average reported by Petchiammal et al. (2015), and below the average of 5.4 reported by Sousa et al. (2011). Observed heterozygosity (0.32) was lower than expected (0.37), typical of species that have a high frequency of self-fertilization. Sousa et al. (2011) also reported heterozygote deficiency in studies with pigeonpea germplasm. Loci PIC values ranged from 0.13 to 0.67, most loci used, except CcM402, were classified, according to Botstein et al. (1980), as medium to highly informative (Table 2), and are recommended for studies of population genetic diversity in pigeonpea. According to Serrote et al. (2020) the higher the PIC, the greater the polymorphism detection capacity of a locus.

Proportion of rare alleles observed in the present study was lower than in other studies. Songok et al. (2010) report the existence of 39% of alleles classified as rare in pigeonpea. According to Dwivedi et al. (2017) this class of alleles, with a frequency of less than 5%, despite being less likely to control agronomic traits of interest, persist even with natural or human selection and are potential alleles in natural populations for some less common characteristics in domesticated plants.

F_{ST} ranged from 0.22 to 0.25 in the pigeonpea populations, considering all populations indicates high genetic differentiation between the populations analyzed. It is suggested additional sampling in other Brazilian regions, especially in others Brazilian Northeast regions to increase the variability of pigeonpea collections. Low to moderate differentiation among pigeonpea populations has been reported by Kumari et al. (2014) ($F_{ST}=0.17$), by Zavinon et al. (2020) ($F_{ST}=0.12$), while Saxena et al. (2014) reported high differentiation among populations from different regions ($F_{ST}=0.36$), corroborating with the present study.

Number of migrants (N_m) estimated in the present study was low, around 0.8 in all three situations, 1) among all 10 populations, 2) among eight Brazilian populations and 3) among seven the northeastern Brazil populations, indicating limited gene flow among them. Zavinon et al. (2020) estimated an N_m of 17.0 with microsatellite loci and 1.6 with single nucleotide polymorphisms (SNP) loci. According to Wang (2004), a general rule, widely accepted by the conservation scientists, is that one migrant per generation in a population is the appropriate level of gene flow.

Formation of only two groups in the Bayesian analysis indicates the sharing of alleles among accessions of São Carlos, SP (Southeast Brazil), Central America and India, (blue color, Figure 3), while the accessions sampled in the Brazilian Northeast presented limited alleles

sharing (orange color, Figure 3), with some exceptions in the region of Mairi, Abaíra and Anagé. Regions of Jacobina, Seabra, Triunfo and Moreilândia have a unique profile, with little sharing with Indian accessions. India is the center of origin of the pigeonpea (Fuller and Harvey, 2006) and the results of the present study are unexpected, suggesting further investigations are required to assess the origin and evolution of germplasm in these regions of Northeast Brazil. Pigeonpea germplasm of northeastern Brazil has a long-term adaptation to tropical and semi-arid conditions, with selections made by growers mainly for semi-arboreal plant size, greater 100 seed weight, greater pod length and forage production, making it important to use this germplasm in pigeonpea improvement, at least in Brazilian conditions (Santos et al., 1999).

Pigeonpea genetic population structures showed moderate to high differentiation, limited gene flow and restricted allele sharing among populations from Northeast Brazil with populations from India, São Paulo, SP, and Central America. Variability of the germplasm collection can be increased with new samples and collections of pigeonpea populations in other regions of Northeast Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank MSc. Deisy Aiane Lima Aquino and MSc. Viviane Nunes dos Santos for their support in laboratory activities. To Capes for the Antonio E. S. Costa scholarship. Carlos A. F. is also a CNPq researcher.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Ae N, Arihara J, Okada K, Yoshihara T, et al. (1990). Phosphorus uptake by pigeonpea and its role in cropping systems of the Indian subcontinent. *Science*. 248: 477-480. <https://doi.org/10.1126/science.248.4954.477>.
- Bohra A, Dubey A, Saxena RK, Penmetsa RV, et al. (2011). Analysis of BAC-end sequences (BESs) and development of BES-SSR markers for genetic mapping and hybrid purity assessment in pigeonpea (*Cajanus* spp.). *BMC Plant Biol*. 11(1): 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-56>.
- Bohra A, Saxena RK, Gnanesh BN, Saxena K, et al. (2012). An intra-specific consensus genetic map of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] derived from six mapping populations. *Theor. Appl. Genet.* 125(6): 1325-1338. <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs00122-012-1916-5>.
- Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32(3): 314.
- Creste S, Neto AT and Figueira A (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Bio. Rep.* 19(4): 299-306. <https://doi.org/10.1007/BF02772828>.
- Doyle JJ and Doyle JD (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Dwivedi SL, Scheben A, Edwards D, Spillane C, et al. (2017). Assessing and exploiting functional diversity in germplasm pools to enhance abiotic stress adaptation and yield in cereals and food legumes. *Front Plant Sci.* 8: 1461. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01461>.
- Evanno G, Regnaut S and Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
- FAOSTAT (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 15 december 2020.
- Fuller DQ and Harvey EL (2006). The archaeobotany of Indian pulses: identification processing and evidence for cultivation. *Environ archaeol.* 11(2): 219-246. <https://doi.org/10.1179/174963106x123232>.
- Godoy R, Souza FHD and Santos PM (2013). Pigeonpea selection and breeding. In: Forage breeding and biotechnology (Jank L, Chiari L, Valle CB, Simeão RM, eds.), Embrapa, Brasília.
- Hamilton MB (2009). Population genetics. Wiley-Blackwell, Chichester.

- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, et al. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol. Ecol. Resour.* 15(5): 1179-1191.
- Kumari R, Agrawal K and Bhat KV (2014). Analysis of genetic diversity and its stratification in pigeonpea germplasm using BES-derived microsatellite markers. *Indian J. Biotechnol.* 13: 473-485.
- Liu K and Muse SV (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics.* 21: 2128-2129.
- Manju Y, Kumar YY, Pushpendra K, Kumar SR, et al. (2017). Molecular diversity analysis as an improvement tool for pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.)]. *Res. J. Biotechnol.* 12: 75-86.
- Odeny DA, Jayashree B, Gebhardt C and Crouch J (2009). New microsatellite markers for pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *BMC Res. Notes.* 2(1): 35. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-35>.
- Peakall R and Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 6: 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
- Petchiammal KI, Muthiah AR and Jayamani P (2015). Molecular characterization of cultivated and wild *Cajanus* species using Simple Sequence Repeat markers. *Legume Res.* 38(6): 742-747. <https://doi.org/10.18805/LR.V38I6.6717>.
- Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155: 945-959.
- Rohlf FJ (2000). NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.10. Exeter Publishing, Setauket.
- Santos CAF, Menezes EA and Araújo FP (1999). Introdução coleta e caracterização de recursos genéticos de guandu para produção de grãos e forragem. In: Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste (Queiroz MA, Goedert CO, Ramos SRR, orgs). Embrapa, Petrolina. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104415/1/Carlos-Antonio.pdf>.
- Sarika AV, Iquebal MA, Rai A and Kumar D (2013). PIPEMicroDB: microsatellite database and primer generation tool for pigeonpea genome. *Database.* 2013: bas054. <https://doi.org/10.1093/database/bas054>.
- Saxena RK, Prathima C, Saxena KB, Hoisington DA, et al. (2010). Novel SSR markers for polymorphism detection in pigeonpea (*Cajanus* spp.). *Plant Breed.* 129(2): 142-148. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01680.x>.
- Saxena RK, Von Wettberg E, Upadhyaya HD, Sanchez V, et al. (2014). Genetic diversity and demographic history of *Cajanus* spp. illustrated from genome-wide SNPs. *PLoS One.* 9(9): 1-9. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088568>.
- Serrote CML, Reiniger LRS, Silva KB, Rabaioli SMS, et al. (2020). Determining the Polymorphism Information Content of a Molecular Marker. *Gene.* 726: 144175. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175>.
- Sharma P, Singh I, Sirari A, Singh S, et al. (2018). Genetic divergence studies through microsatellite markers in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Legume Res.* 43: 312-319. <https://doi.org/10.18805/LR-4022>.
- Songok S, Ferguson M, Muigai AW and Silim S (2010). Genetic diversity in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] landraces as revealed by simple sequence repeat markers. *Afr. J. Biotechnol.* 9(22): 3231-3241.
- Sousa ACBD, Godoy R, Sforça DA, Campos TD, et al. (2011). Genetic diversity analysis among pigeonpea genotypes adapted to South American regions based on microsatellite markers. *Sci. Agric.* 68(4): 431-439. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000400007>.
- Varshney RK, Saxena RK and Jackson SA (2017). The Pigeonpea Genome: An Overview. In: The Pigeonpea Genome. Compendium of Plant Genomes A book series (CPG) (Varshney RK, Saxena RK, Jackson S eds). Springer, Cham.
- Wang J (2004). Application of the One-Migrant-per-Generation Rule to Conservation and Management. *Conserv. Biol.* 18(2): 332-343. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2004.00440.x>.
- Wright S (1978). Evolution and the Genetics of Population, Variability within and among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Zavinon F, Adoukonou-Sagbadja H, KeilWagen J, Lehnert H, et al. (2020). Genetic diversity and population structure in Beninese pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Huth] landraces collection revealed by SSR and genome wide SNP markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 67: 191-208. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00864-9>.