



**INSTITUTO POLITÉCNICO de PORTALEGRE**



**ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA de ELVAS**

Dissertação

Mestrado em Agricultura Sustentável

**Avaliação da diversidade genética de uma coleção portuguesa de ervilha  
(*Pisum sativum* L.) através de marcadores morfológicos e moleculares**

**Ana Maria de Brito Tavares Correia de Campos**

**Orientadores:**

**Noémia do Céu Machado Farinha (orientador interno)**

**Maria da Graça Mendonça Pereira (orientador externo)**

**2014**



Este trabalho não contempla as críticas e correções sugeridas pelo Júri



Assinatura dos Membros do Júri:

---

(Presidente do Júri)

---

(Orientador Interno)

---

(Orientador Externo)

---

(Arguente)

Classificação Final: : \_\_\_\_\_



## **Agradecimentos**

Manifesto os meus sinceros agradecimentos a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram decisivamente para a realização desta dissertação:

- Ao Diretor da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologia e Recursos Genéticos do INIAV-Elvas, Doutor Benvindo Martins Maçãs que me possibilitou a realização deste trabalho na Estação de Melhoramento de Plantas, dando-me forte motivação;

- À Doutora Maria da Graça Mendonça Pereira, orientadora deste trabalho, pelos ensinamentos, estímulo e constante disponibilidade concedida para a realização desta dissertação;

- À Professora Doutora Noémia do Céu Machado Farinha pela orientação do trabalho e preciosas sugestões na revisão do manuscrito;

- Aos colegas e técnicos do setor das proteaginosas pela colaboração dada aos trabalhos inseridos no programa de melhoramento de ervilha;

- Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e compreensão;

- Finalmente, a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram e apoiaram.

Os trabalhos aqui desenvolvidos foram financiados pelo projeto PRODER PA 18646 “**VALORIZAÇÃO DAS VARIEDADES TRADICIONAIS DE LEGUMINOSAS PARA GRÃO**”.



## Resumo

Este trabalho tem como principal objetivo avaliar a diversidade genética de uma coleção portuguesa de ervilha constituída por 50 populações e 2 variedades comerciais utilizando para o efeito 44 descritores morfológicos e 30 marcadores RAPD. Os ensaios foram instalados nos campos experimentais do INIAV-Elvas, durante 2 anos. Os dados morfológicos e moleculares foram analisados através das técnicas de taxonomia numérica utilizando o programa NTSYS-pc. As características morfológicas que apresentaram maiores coeficientes de variação foram a altura da planta, a altura da 1ª vagem, a densidade das manchas das estípulas, o comprimento do pedúnculo e o número de vagens por planta. Os marcadores moleculares utilizados não foram suficientes para a identificação de todas as populações o que justifica que este trabalho continue a ser realizado. Foram selecionadas populações com potencial interesse para integrarem o programa de melhoramento. Destacamos as populações Gp2460\_B, Gp2461\_B, Gp3155\_V e Gp3256\_V com características interessantes para a produção hortícola. Outras populações, tais como as Gp3493\_V e Gp4269\_B serão mais adequadas para alimentação animal. Outras ainda, não sendo interessantes pela produção, poderão ser integradas em esquemas de cruzamentos artificiais para introduzir características específicas, por exemplo as populações Gp3154\_B e Gp2464\_B para reduzir altura da planta e a precocidade e as populações Gp3261\_V e Gp3150\_V para aumentar o teor em proteína.

Palavras Chave: recursos genéticos, leguminosas para grão, ervilha, caracterização morfológica, marcadores RAPD

## **Abstract**

The main objective of this research was the evaluation of genetic diversity in a Portuguese collection of peas including 50 populations and 2 commercial varieties using for this purpose 44 morphological descriptors and 30 RAPD markers. The trial was established in the experimental fields of INIAV-Elvas and followed during 2 years. The morphological and molecular data were analyzed using the numerical taxonomy techniques with the NTSYS-pc program. The morphological characteristics that showed higher coefficients of variation were plant height, the height of the 1st pod, the density of flecking on stipules, the peduncle length and the number of pods per plant. Molecular markers used were not sufficient to identify all the populations leading to the need for this work to continue. The study allowed the selection of populations of potential interest to include the breeding program. We highlight the Gp2460\_B, Gp2461\_B, Gp3155\_V and Gp3256\_V populations with interesting features for the horticulture production. Other populations, such as Gp3493\_V and Gp4269\_B, were found to be more suitable for fodder production. Other populations, even if not interesting for feed or food production, can be used in artificial crosses to improve specific characteristics, for example a reduction in plant height by using Gp3261\_V and Gp3150\_V populations or an increase in the protein content and in precocity by using Gp3154\_B and Gp2464\_B populations.

Key words: genetic resources, grain legumes, pea, morphological characterization, molecular markers

## Índice Geral

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iv</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de Quadros</b> .....	<b>ix</b>
<b>Abreviaturas/Acrónimos</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	<b>5</b>
2.1. A cultura da ervilha .....	5
2.1.1. Origem e história .....	5
2.1.2. Taxonomia.....	6
2.1.3. Descrição botânica .....	7
2.1.4. Composição da semente.....	8
2.1.5. Distribuição geográfica e sua importância .....	10
2.1.6. Exigências edafo-climáticas .....	14
2.1.7. Fases do ciclo cultural .....	15
2.2. Recursos genéticos .....	16
2.2.1. Coleções de germoplasma .....	16
2.2.2. Caracterização das coleções de germoplasma .....	19
2.2.1.1. Marcadores morfológicos e agronômicos .....	19
2.2.1.2. Marcadores Moleculares .....	20
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>23</b>
3.1. Material vegetal em estudo.....	23
3.2. Caracterização edafoclimática do local de ensaio .....	24
3.3. Procedimento experimental .....	27
3.4. Observações fenológicas e morfológicas .....	28
3.5. Análises bromatológicas .....	33
3.6. Análises moleculares.....	33
3.6.1. Extração e quantificação de ADN .....	33
3.6.2. Marcadores RAPDs .....	34
3.7. Tratamento estatístico .....	35
3.7.1. Dados morfológicos .....	35
3.7.2. Dados moleculares.....	36
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	<b>37</b>

4.1. Caracterização morfológica .....	37
4.1.1. Características qualitativas .....	37
4.1.1.1. Semente .....	37
4.1.1.2. Folha .....	40
4.1.1.3. Flor .....	41
4.1.1.4. Vagem .....	43
4.1.2. Características quantitativas .....	43
4.1.2.1. Características gerais das populações .....	43
4.1.2.2. Método de aglomeração .....	46
4.1.2.3. Método de ordenação .....	49
4.2. Caracterização molecular .....	56
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>61</b>
<b>6. Referências bibliográficas .....</b>	<b>63</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>71</b>

## Índice de Figuras

Fig. 1 – Centros de origem da ervilha .....	5
Fig. 2 – Planta de <i>P. sativum</i> var. ....	7
Fig. 3 – Morfologia da planta e diversos tipos de folha de ervilha .....	8
Fig. 4 – Evolução da área e produção mundial de ervilha proteagínosa .....	10
Fig. 5 – Produção de ervilha proteagínosa por continente em 2012 .....	11
Fig. 6 – Evolução da área semeada de ervilha proteagínosa por continente .....	11
Fig. 7 – Evolução da produção de ervilha proteagínosa por continente .....	12
Fig. 8 – Países maiores produtores mundiais de ervilha proteagínosa em 2012 .....	12
Fig. 9 – Evolução da produção nos principais países produtores da Europa .....	13
Fig. 10 – Evolução da área nos principais países produtores da Europa.....	13
Fig. 11 – Fases do ciclo vegetativo da ervilha .....	15
Fig. 12 – Banco Português de Germoplasma Vegetal, Braga.....	17
Fig. 13 – “Svalbard Seed Vault”, Noruega .....	18
Fig. 14 – Localização dos ensaios na folha 4 e na folha 5.....	24
Fig. 15 – Diagrama ombrométrico de Gaussen com a média de 30 anos.....	25
Fig. 16 – Dados de precipitação .....	26
Fig. 17 – Dados de temperatura média .....	26
Fig. 18 – Esquema de campo do ensaio, para os dois anos, com duas repetições dispostas em blocos casualizados .....	27
Fig. 19 – Densidade das manchas das estípulas.....	29
Fig. 20 – Medição do pedúnculo da flor.....	30
Fig. 21 – Tipo de enrugamento dos cotilédones; (1) ausente; (2) presente .....	31
Fig. 22 – Dentição do bordo do folíolo .....	32
Fig. 23 – Classificação da forma da base do estandarte .....	32
Fig. 24 – Forma da parte distal da vagem .....	33
Fig. 25 – Distribuição das 52 populações de ervilha quanto à cor dos cotilédones.....	37
Fig. 26 – Distribuição das 52 populações de ervilha de acordo com o tipo de enrugamento dos cotilédones .....	38
Fig. 27 – Distribuição das 30 populações de ervilha quanto à cor do tegumento.....	38
Fig. 28 – Distribuição das 30 populações de ervilha quanto ao marmoreado do tegumento.....	39
Fig. 29 – Distribuição das 30 populações de ervilha em relação à intensidade das manchas violetas no tegumento .....	39

Fig. 30 – Distribuição das 52 populações de ervilha de acordo com a presença da cor negra do hilo na semente .....	40
Fig. 31 – Distribuição das 52 populações de ervilha de acordo com a presença de folíolos nas folhas.....	40
Fig. 32 – Distribuição das 52 populações de ervilha quanto à presença da coloração antociânica no ponto de inserção das estípulas .....	41
Fig. 33 – Distribuição das 52 populações de ervilha em relação à dentição do bordo do folíolo .....	41
Fig. 34 – Distribuição das 52 populações de ervilha quanto à cor do estandarte e da asa ...	42
Fig. 35 – Distribuição das 52 populações de ervilha quanto à forma da base do estandarte	42
Fig. 36 – Formas da base do estandarte da flor observadas nas populações em estudo .....	42
Fig. 37 – Distribuição das 52 populações de ervilha de acordo com a forma da parte distal da vagem .....	43
Fig. 38 – Dendrograma baseado na análise dos valores médios obtidos nos 2 anos de avaliação .....	47
Fig. 39 – Projeção das 52 populações no plano definido pelas componentes 1 e 2 .....	50
Fig. 40 – Projeção das 24 características no plano definido pelas componentes 1 e 2.....	51
Fig. 41 – Projeção das 52 populações no plano definido pelas componentes 1 e 3 .....	55
Fig. 42 – Projeção das 24 características no plano definido pelas componentes 1 e 3 .....	55
Fig. 43 – Padrão de amplificação gerado pelo “primer” OPN04 .....	56
Fig. 44 – Dendrograma obtido com base na matriz de similaridade genética calculada a partir dos marcadores RAPDs .....	58

## Índice de Quadros

Quadro 1 – Teor de proteína bruta da semente de leguminosas .....	9
Quadro 2 – Composição em aminoácidos (%) da semente de leguminosas .....	9
Quadro 3 – Número de amostras do género <i>Pisum</i> existentes em diversas coleções de germoplasma.....	18
Quadro 4 – Populações estudadas e suas origens.....	23
Quadro 5 – Parâmetros fenológicos utilizados na avaliação .....	28
Quadro 6 – Características morfológicas quantitativas avaliadas .....	28
Quadro 7 – Características morfológicas qualitativas avaliadas .....	30
Quadro 8 – Programa de amplificação das amostras de ADN.....	34
Quadro 9 – Sequências nucleotídicas dos "primers" utilizados na análise de RAPD.....	35
Quadro 10 – Limites de variação observados nas 24 características avaliadas no ensaio de 2011/2012 .....	44
Quadro 11 – Limites de variação observadas nas 24 características avaliadas no ensaio de 2012/2013 .....	45
Quadro 12 – Correlação entre as características originais e as três primeiras componentes .....	49
Quadro 13 – Número total de fragmentos e número de fragmentos polimórficos obtidos por cada "primer" .....	57



## Abreviaturas/Acrónimos

ADN – Ácido desoxirribonucleico

cm – centímetro

CGIAR – Consultive Group on International Agricultural Research

C.V. – Coeficiente de variação

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

E. U. A. – Estados Unidos da América

FAO – Food and Agriculture Organization

Gord – Gordura bruta

ha – hectare

IBPGR – International Board for Plant Genetic Resources

ICARDA – International Center for Agriculture Research in the Dry Areas

IFAP – Instituto Financeiro de Agricultura e Pescas

INE – Instituto Nacional de Estatística

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IPGRI – International Plant Genetic Resources Institute

l – litro

m – metro

ml – mililitro

mm – milímetro

NP – Norma Portuguesa

PCR – Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)

PRODER PA – Programa de Desenvolvimento Rural – pedido de apoio

Prot – Proteína bruta

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

TBE – Tris borate EDT

Ton - Tonelada

UPOV – International Union for the Protection of new Varieties of Plants

UNESCO – United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization

U. E. – União Europeia

°C – graus centígrados







## 1. Introdução

O crescimento da população mundial, a carência generalizada de proteína vegetal, a crise energética e a escolha de uma dieta alimentar equilibrada fazem estimular o interesse pelas leguminosas ricas em proteína. Neste grupo está incluído o grão-de-bico, a fava, a lentilha, a ervilha, o feijão e o feijão-frade que fazem parte da Dieta Mediterrânica, reconhecida pela UNESCO desde Dezembro de 2013 (Guerreiro, 2014).

A procura de grãos de leguminosas ricas em proteína vegetal é cada vez maior, uma vez que não é permitida a utilização de proteína de origem animal nas rações para animais. Mais de 70% das necessidades de proteína vegetal da U.E. estão pendentes de importações de soja de países terceiros, principalmente dos EUA. Para colmatar este *deficit* torna-se necessário o desenvolvimento de variedades de leguminosas para grão que sejam altamente produtivas (Barroso *et al.*, 2007), capazes de ultrapassar as limitações impostas por fatores abióticos (clima e solo) e por fatores bióticos (doenças, pragas e infestantes).

As leguminosas apresentam várias características únicas sendo uma delas a capacidade de estabelecerem uma relação de simbiose entre as suas raízes e a bactéria do solo *Rhizobium*. Esta simbiose permite a fixação do azoto atmosférico, reduzindo assim as necessidades de fertilização azotada destas culturas.

A introdução deste tipo de cultura nos sistemas agrícolas pode contribuir para uma melhor gestão da exploração por favorecer a quebra do ciclo das doenças e pragas provocados pela monocultura dos cereais, melhorar a diversidade microbiana do solo, melhorar a agregação e a conservação do solo contribuindo para a sustentabilidade da agricultura.

Economicamente, as leguminosas são o segundo grupo de culturas mais importante a seguir aos cereais, e representam cerca de 27% da produção de grãos. É considerada a terceira maior família botânica, compreende mais de 650 géneros e cerca de 18.000 espécies (Lewis *et al.*, 2005).

Entre as várias leguminosas para grão, a ervilha poderá ser uma das espécies que pode ser introduzida nos sistemas de produção em Portugal. Em rotação com cereais, permite um aumento de rendimento da cultura seguinte e contribui para a diminuição dos custos de produção.

As variedades de ervilha podem ser classificadas em três grupos de acordo com a utilização final: hortícola, forrageira ou proteagínosa (Cousin, 1996). Na ervilha hortícola, as vagens ou as sementes são colhidas antes da maturação e destinam-se exclusivamente para a alimentação humana. As sementes apresentam baixos teores de fibras e elevados teores em açúcar. Na ervilha forrageira, o principal objetivo da cultura é a produção de biomassa que pode ser utilizada como forragem, feno, silagem, cobertura de solo ou pastoreio direto. Como proteagínosa, a cultura é colhida no final da maturação da planta sendo as sementes utilizadas para a alimentação animal.

Segundo Dordio (1990), a cultura da ervilha proteagínosa, introduzida em Portugal em 1986, não teve um grande impacto na agricultura portuguesa devido às suas produções baixas. Contudo, o cultivo de leguminosas, numa agricultura cada vez mais racional e sustentável, e como alternativa à monocultura dos cereais, poderá ser uma opção pelo que é necessário desenvolver variedades com boa adaptação às nossas condições edafo-climáticas (Reis e Rodrigues, 2010).

Este trabalho insere-se no âmbito do projeto PRODER PA 18646, financiado pelo IFAP que tem como objetivo a promoção e valorização de populações tradicionais de leguminosas para grão (grão de bico, fava, chícharo, ervilha e feijão), contribuindo assim para incentivar uma maior utilização destas espécies nos sistemas de agricultura.

Entre as espécies avaliadas no projeto, o presente trabalho teve como objetivo principal estudar a variabilidade de uma coleção de germoplasma de ervilha (*Pisum sativum* L.), pertencente ao INIAV-Elvas, constituída por 50 populações colhidas em diferentes regiões de Portugal e duas variedades comerciais.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Caracterizar a coleção utilizando 18 caracteres morfológicos qualitativos, 18 caracteres morfológicos quantitativos e 5 caracteres fenológicos;
2. Determinar a composição química das sementes (proteína total, gordura e fibra bruta);
3. Caracterizar as populações através de marcadores moleculares RAPD;
4. Comparar os dados morfológicos com os dados moleculares;
5. Selecionar populações com potencial interesse para integrarem o programa de melhoramento desta espécie.



## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. A cultura da ervilha

#### 2.1.1. Origem e história

Vavilov (1949) considera a Etiópia, a Bacia do Mediterrâneo e a Ásia Central como o principal centro de origem da ervilha (Fig. 1) e o Próximo Oriente como o centro de origem secundário. Mais tarde, Zohary e Hopf (1993;1998) confirmaram os centros de origem indicados por Vavilov.

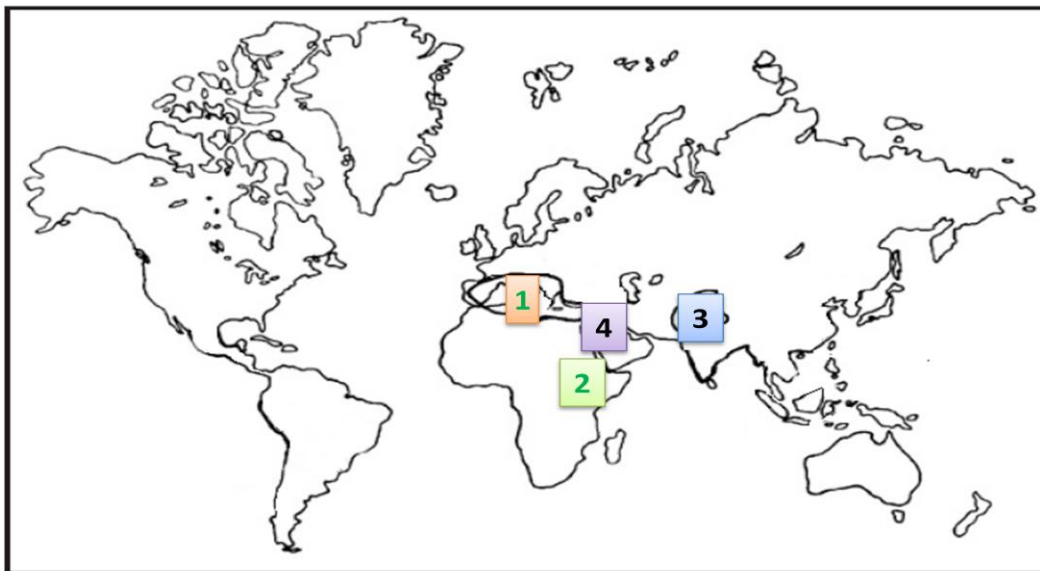


Fig. 1 – Centros de origem da ervilha, segundo Vavilov (1949): 1-Bacia do Mediterrâneo, 2-Etiópia, 3- Ásia Central; 4-Próximo Oriente

As leguminosas para grão foram sempre uma presença constante na agricultura desde tempos imemoráveis. Existem indicações que a cultura da ervilha é tão antiga como a cultura da cevada ou do trigo (Zohary e Hopf, 1973), conhecidas desde a pré-história.

Sementes carbonizadas encontradas nos locais de origem da ervilha revelam que esta cultura já era utilizada durante o período neolítico, desde os anos 6000-7000 a.C. na Europa e na Ásia Menor (Ladizinsky e Adler, 1976; Muehlbauer, 1992).

Os povos arianos (povos oriundos das estepes da Ásia Central), nas suas migrações, favoreceram a dispersão da cultura principalmente nos continentes Asiático e Europeu devido, não só, às suas propriedades mas essencialmente devido à sua facilidade de conservação e transporte (de Candolle, 1883).

A ervilha era apreciada pelas antigas civilizações Grega, como indica o botânico grego Theophrastus, e Romana como descreve Caio Plínio no livro *Naturalis Historia* sendo empregue na culinária (Cousin, 1974; 1992).

Na Idade Média, séc. XIII, a ervilha era uma das principais fontes da alimentação sendo utilizada em seco na preparação de sopas e de purés.

A ervilha foi introduzida no continente americano por Cristóvão Colombo, na sua primeira viagem à Ilha de Santo Domingo, no Séc. XV, durante a época dos Descobrimentos.

A partir do séc. XVII, em França e na Holanda, com a evolução das técnicas de cultivo, passou-se a consumir não só o grão seco, como até então, mas como um vegetal, em verde (Cousin, 1974; Cousin 1992).

A origem do nome desta espécie está sujeita a discussão. Segundo de Candolle (1883), os povos Pelasgos que habitavam junto ao Mar Egeu (pré-Helénicos) designavam-na por Pizzelle, os povos Helénicos por *Pisos* ou *Pison*, e os povos Latinos por *Pisu*. Atualmente, em países de língua inglesa, a ervilha designa-se por *Pea* (Gritton, 1986).

### **2.1.2. Taxonomia**

A ervilha pertence, taxonomicamente, à ordem *Fabales*, família *Fabaceae* (*Leguminosae*), género *Pisum*. Considera-se que este género é constituído por apenas duas espécies: a espécie cultivada *Pisum sativum* L. e a espécie selvagem *Pisum fulvum* Sibth. e Sm. (Hoey *et al.*, 1996), ambas diploides, com  $2n=14$  (Hancock, 2004). A espécie *P. sativum* engloba as variedades *sativum* e *arvense*,

ambas utilizadas na agricultura. A variedade *sativum* apresenta flores brancas e sementes de cor verde ou creme e a variedade *arvense* apresenta flores violetas e sementes coloridas (Fig. 2).

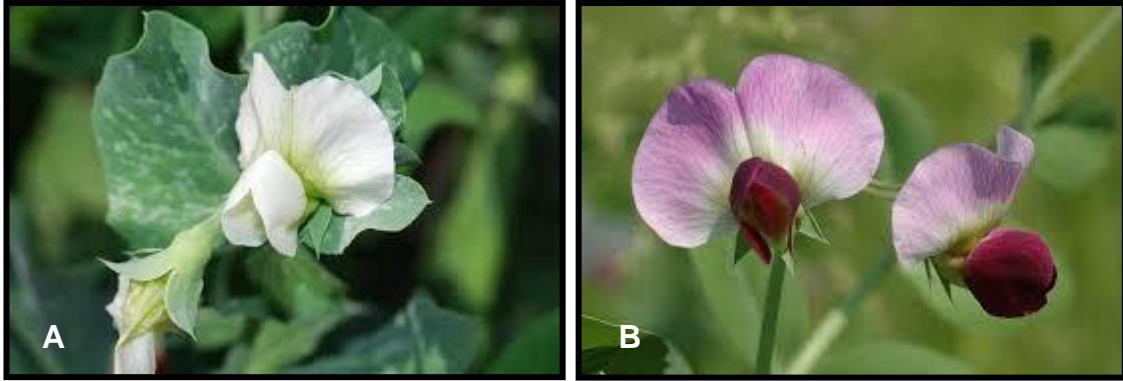


Fig. 2 – Planta de *P. sativum* var. *sativum* L. (A) planta de *P. sativum* var. *arvense* L. (B)

### 2.1.3. Descrição botânica

A ervilha é uma planta anual herbácea, com germinação hipógea e com um crescimento indeterminado.

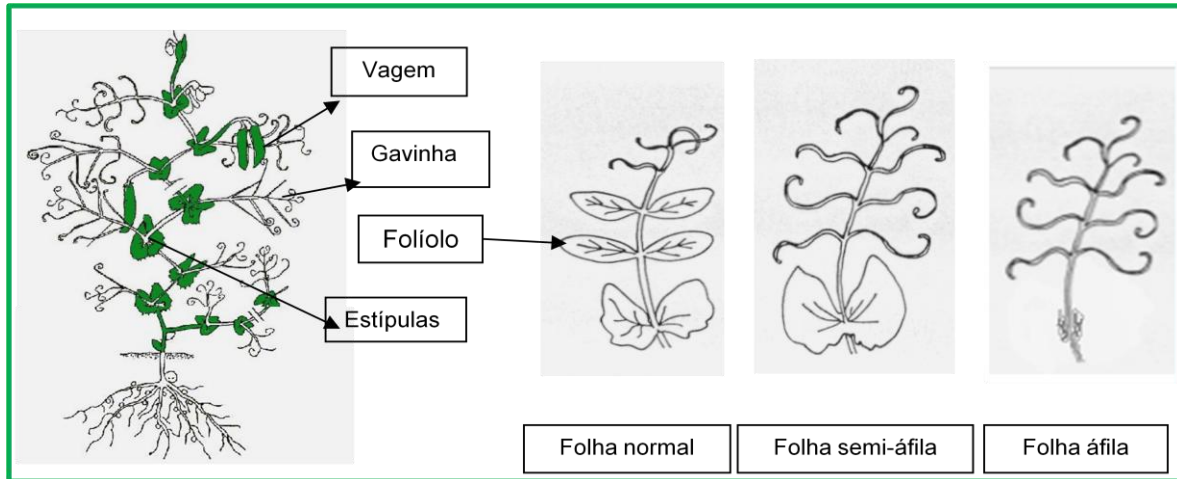
A raiz é profunda podendo atingir cerca de 1 a 1,50 m, com muitas raízes secundárias (cabelame). Possui nódulos nas raízes onde fixa o azoto atmosférico por ação da simbiose que estabelece com a bactéria *Rhizobium leguminosarum*.

Os caules são herbáceos, angulosos e ocos, com uma altura variável entre os 25 cm e os 3 metros; possuem entrenós com diferentes comprimentos podendo variar entre os 5 e 50 cm.

As folhas são alternas, compostas por folíolos ovais ou elípticos, inteiros ou dentados (Gritton, 1986). Existem plantas que possuem folhas com folíolos, estípulas e gavinhas (folha normal), folhas com estípulas e gavinhas (folha semi-áfila) e folhas só com gavinhas (folha áfila), como pode ser observado na Fig. 3.

A inflorescência é axilar, solitária ou em racimo floral de 2 ou 3 flores, de cor branca ou violeta com um pedúnculo de tamanho variável. As flores são papilionáceas e têm 5 sépalas e 5 pétalas.

A fecundação é autogâmica, regida por um mecanismo de cleistogamia que controla a deiscência das anteras no interior das flores, provocando a fecundação (Gritton, 1986).



Fonte: Cousin, 1996

Fig. 3 – Morfologia da planta e diversos tipos de folha de ervilha

O fruto é uma vagem, característica das leguminosas, de cor geralmente amarela quando em plena maturação, podendo conter entre 2 e 10 sementes. As sementes podem ser lisas ou rugosas (Franco, 1971), de cor verde, creme ou pigmentada, dependendo das variedades. O número de sementes por vagem depende da variedade e das condições ambientais (Cousin, 1997).

#### 2.1.4. Composição da semente

As sementes de ervilha assim como de outras leguminosas apresentam como característica comum a concentração elevada de proteína bruta, que pode variar muito dentro da mesma espécie (Quadro 1).

Em média, o teor em proteína bruta na semente seca da ervilha varia entre 26 e 33% nas variedades de semente enrugada e 23 e 31% nas variedades de semente lisa (Cousin, 1997).

Quadro 1 – Teor de proteína bruta da semente de leguminosas

Espécie	Mínimo (%)	Máximo (%)
Grão de bico	14,9	29,6
Lentilha	25,0	29,3
Ervilha	15,5	39,7
Fava	22,0	37,0

Fonte: Monti &amp; Grillo, 1983

Em geral, a proteína das leguminosas é rica em aminoácidos essenciais como lisina e triptofano e pobre em aminoácidos sulfurados como a metionina e cistina (Quadro 2). A elevada concentração de lisina na semente de ervilha confere-lhe grande interesse na alimentação animal uma vez que os cereais são deficientes neste aminoácido (Gomez, 1983).

Quadro 2 – Composição em aminoácidos (%) da semente de leguminosas

Aminoácido	Arroz	Fava	Ervilha	Lentilha	Grão-de-bico
Isoleucina	4,2	4,0	4,3	4,3	4,4
Leucina	8,2	7,1	6,8	7,6	7,5
Lisina	3,6	6,5	7,5	7,2	6,7
Metionina	2,1	0,7	0,9	0,8	1,0
Cistina	1,5	0,8	1,1	0,9	1,2
Fenilalanina	4,8	4,3	4,6	5,2	5,7
Tirosina	3,2	3,2	2,7	3,3	2,9
Teonina	3,3	3,4	4,1	4,0	3,8
Valina	5,8	4,4	4,7	5,0	4,5

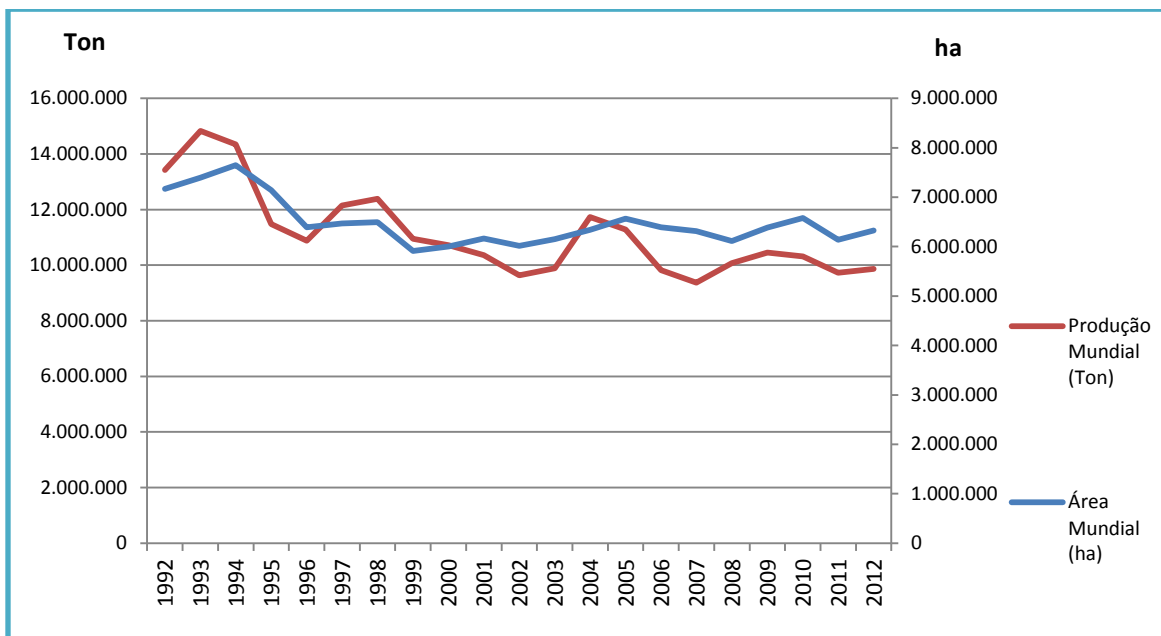
Fonte: Newman *et al.*, 1988

As sementes de ervilha são ainda ricas em fibra e isoflavonóides considerados benéficos à saúde humana, principalmente como anti-cancerígenos (Dixon e Summer, 2003).

### 2.1.5. Distribuição geográfica e sua importância

A ervilha proteagínosa é cultivada numa vasta área geográfica. Pode ser encontrada desde o norte da Europa, parte da Rússia e da China até ao continente Americano e Oceânia.

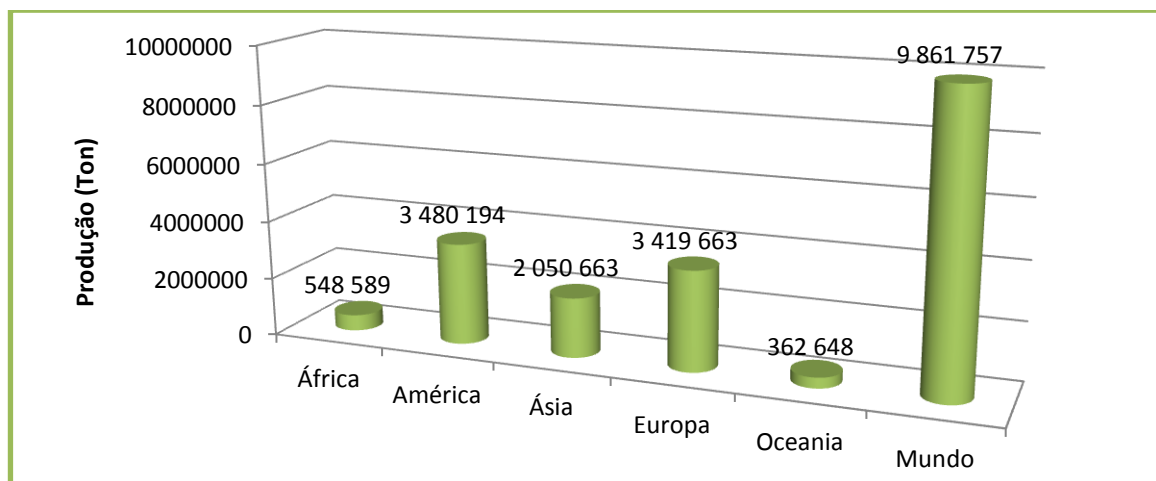
A nível mundial, a ervilha proteagínosa ocupa cerca de 6 400 000 ha de área cultivada (FAO, 2013). Este valor tem-se mantido relativamente estável durante o último decénio (Fig. 4), apesar de ter ocorrido um decréscimo relativamente aos anos de 1992 e 1993. Em 2012 a produção mundial de ervilha proteagínosa atingiu cerca de 9 900 000 toneladas (FAO, 2013).



Fonte: FAO, 2013

Fig. 4 – Evolução da área e produção mundial de ervilha proteagínosa

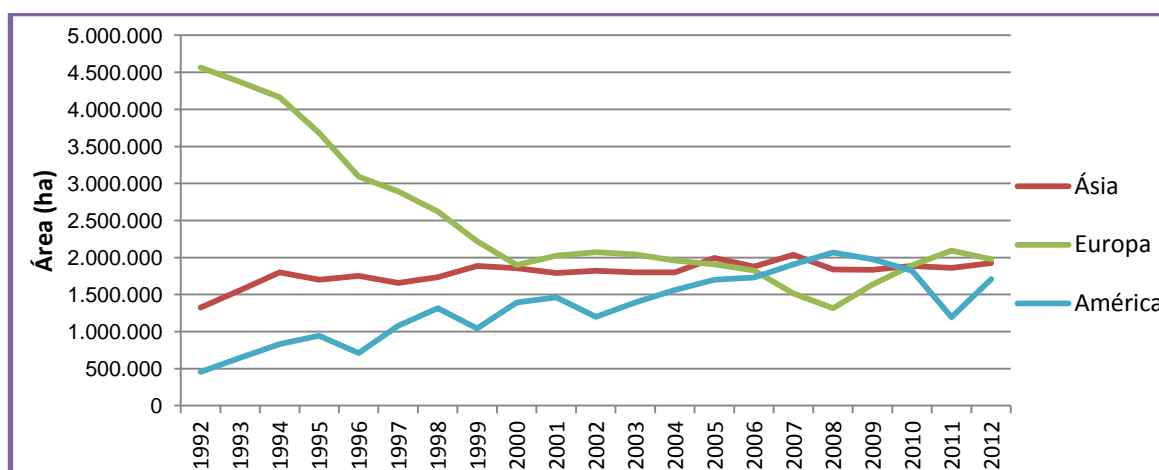
A Europa, a América e a Ásia foram os principais produtores de ervilha proteagínosa, em 2012 (Fig.5), com cerca de 3 480 000 toneladas, 3 420 000 toneladas e 2 050 000 toneladas de produção, respetivamente (FAO, 2013).



Fonte: FAO, 2013

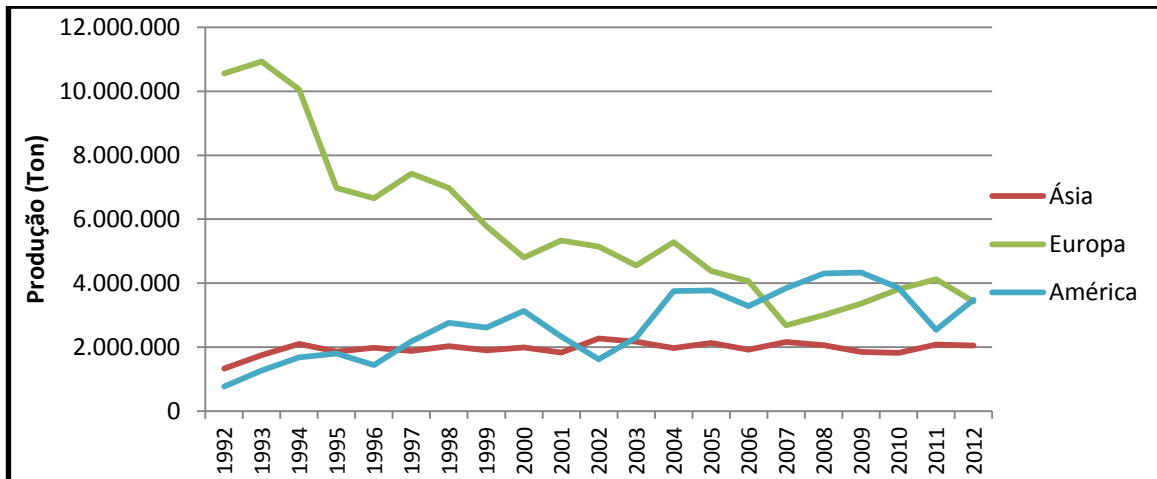
Fig. 5 – Produção de ervilha proteaginososa por continente em 2012

Nos últimos vinte anos, a evolução da área semeada e da produção, na Europa e na América, têm tido grande oscilação, com maior estabilidade na Ásia (Fig. 6 e 7). Na Europa, registou-se um acentuado decréscimo até 1999/2000 observando-se desde então uma tendência para a estabilização, embora com algumas variações tanto na produção como na área ocupada. No continente Americano verifica-se uma tendência geral para um aumento de área e produção. Em relação à área, a Ásia, tinha inicialmente uma posição intermédia relativamente aos outros dois continentes, mas atualmente, os três continentes têm áreas semelhantes. No entanto, a Ásia apresenta menores valores de produção, o que pode denotar a aplicação de tecnologias de produção menos avançada.



Fonte: FAO, 2013

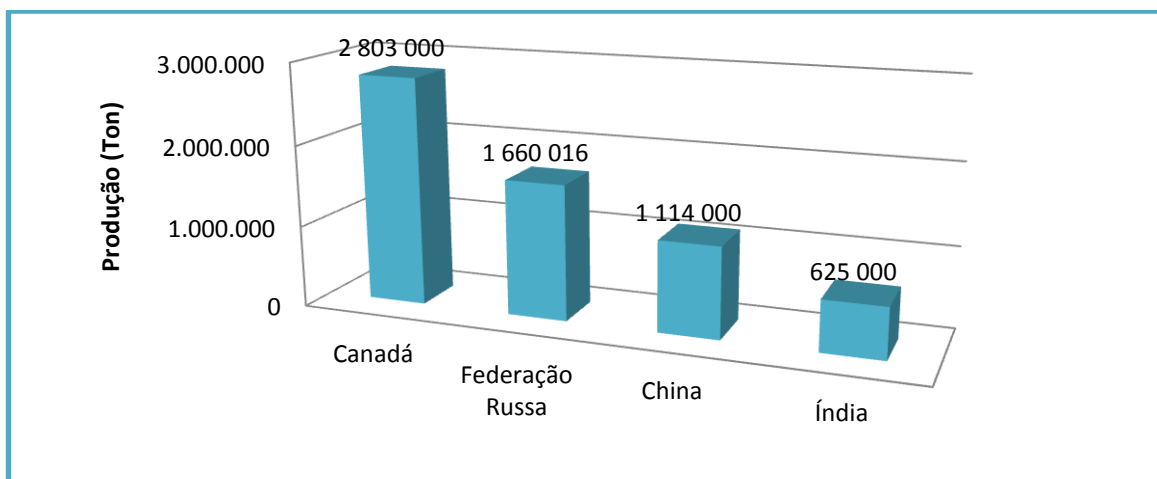
Fig. 6 – Evolução da área semeada de ervilha proteaginososa por continente



Fonte: FAO, 2013

Fig. 7 – Evolução da produção de ervilha proteaginososa por continente

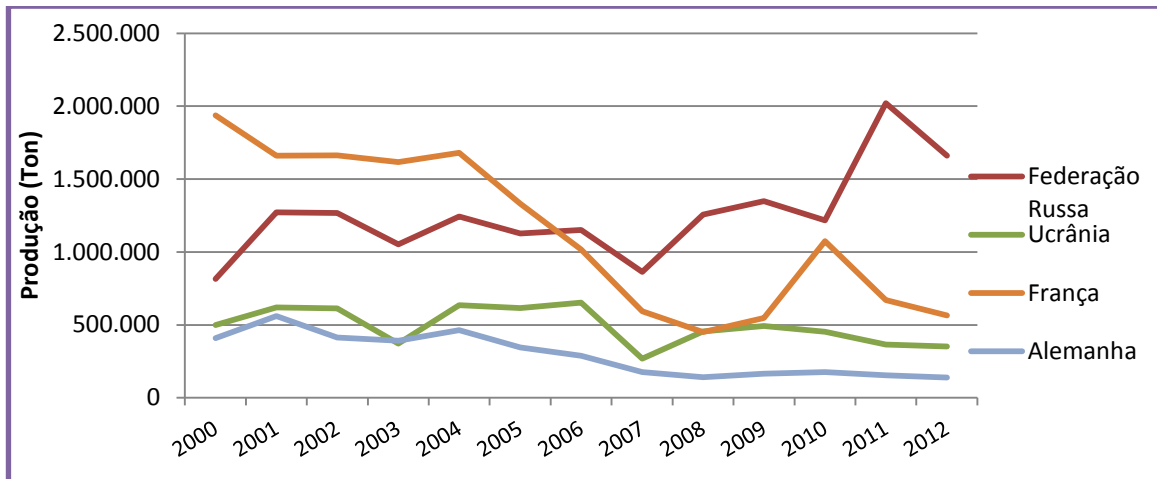
Os países maiores produtores em 2012 (Fig. 8) foram o Canadá com cerca de 2.800.000 toneladas, a Federação Russa com cerca de 1 660 000 toneladas e a China com 1 114 000 toneladas (FAO, 2013).



Fonte: FAO, 2013

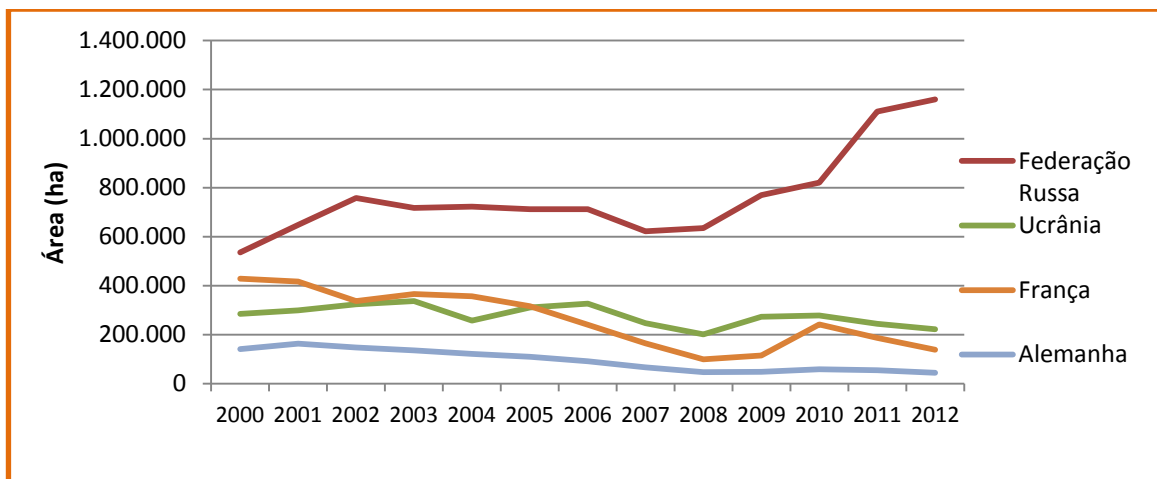
Fig. 8 – Países maiores produtores mundiais de ervilha proteaginososa em 2012

A evolução da produção e da área ocupada pela ervilha proteaginososa nos principais países produtores da Europa Ocidental, como em França e na Alemanha, tem apresentado um decréscimo (Fig. 9 e 10). Por outro lado, na Europa Oriental, como na Federação Russa, tem sido observado um incremento na produção e na área ocupada pela cultura nos últimos anos (FAO, 2013).



Fonte: FAO, 2013

Fig. 9 – Evolução da produção nos principais países produtores da Europa



Fonte: FAO, 2013

Fig. 10 – Evolução da área nos principais países produtores da Europa

A razão da diminuição do interesse na cultura de ervilha na Europa Ocidental prende-se com diversas razões. A nível económico, os acordos internacionais celebrados entre a União Europeia e Países Terceiros protegem a cultura cerealífera europeia e permitem a importação de proteaginosas e oleaginosas isenta de direitos. Os agricultores perderam, assim, o interesse pela cultura, bem como os conhecimentos práticos sobre o seu cultivo e valorização. No campo tecnológico, o investimento na investigação apresenta um enorme declínio que se vai refletir num baixo nível de inovação e de obtenção de novas variedades. (Hausling, 2011).

O aparecimento de novos países consumidores, nomeadamente China e países de Ex-União Soviética, que não estão sujeitos às mesmas regulamentações e normas específicas da União Europeia, no que se refere às condições de produção e de segurança alimentar, poderão comprometer a estabilidade dos mercados e a cadeia de abastecimento da comunidade europeia (Hausling, 2011).

Em Portugal, os dados do INE (2013) referem apenas a existência de duas culturas de leguminosas para grão: o feijão e o grão-de-bico. A cultura da ervilha proteagínosa não tem expressão. A área ocupada pela cultura de ervilha (937 ha) e a produção obtida (6 633 toneladas) destina-se exclusivamente para consumo em verde.

#### **2.1.6. Exigências edafo-climáticas**

A cultura de ervilha está adaptada a regiões de clima seco, desde que a precipitação não seja inferior a 400 mm. No entanto, prefere climas temperados e requer condições húmidas e frias para a germinação. O zero germinativo é de cerca 4,5°C. A temperatura média ótima para o seu desenvolvimento situa-se entre 13° e 18°C.

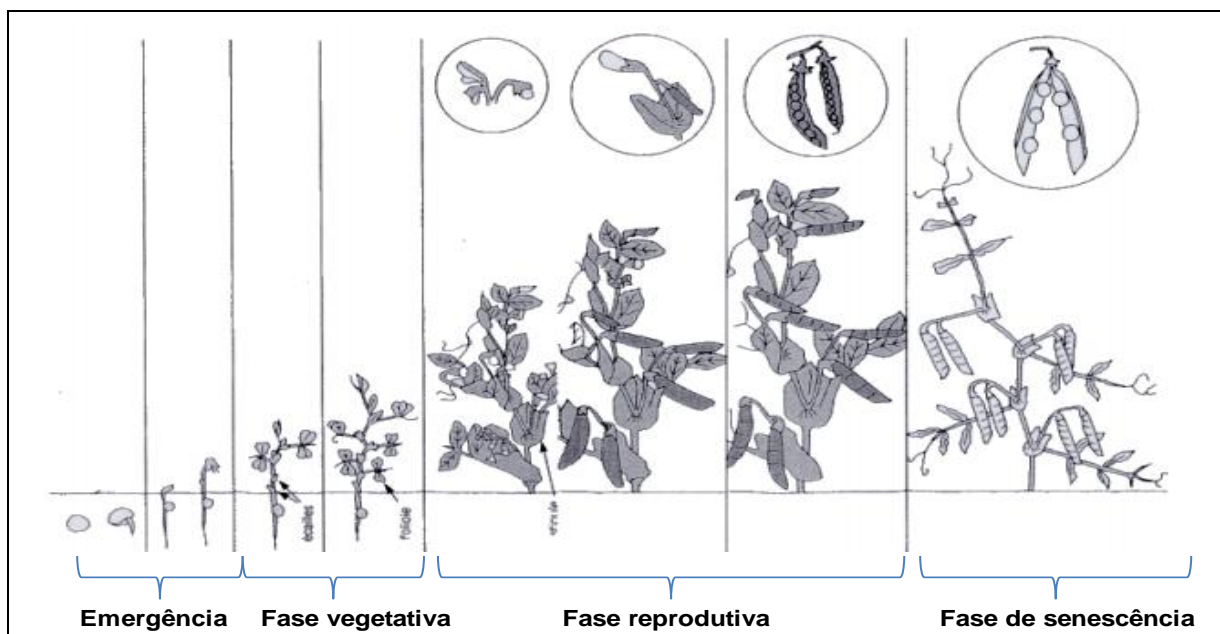
A ervilha é uma planta de dias longos, semeada no fim do Outono para ser colhida no fim da Primavera.

A produção pode ser afetada negativamente se durante a floração e a frutificação ocorrerem temperaturas altas ou se durante a Primavera ocorrerem geadas (Jeuffroy *et al.*, 1990; Ney, 1994).

Segundo Salgueiro (1986), a ervilha proteagínosa é uma cultura que prefere solos francos ou franco/arenosos, bem drenados, férteis e de textura leve, sendo intolerante ao alagamento (Duke, 1981). As plantas são sensíveis à salinidade e extrema acidez, sendo o pH ideal do solo deve situar-se entre 5,5 e 7,0 (Hartmann *et al.*, 1988).

### 2.1.7. Fases do ciclo cultural

A cultura apresenta quatro fases de desenvolvimento (Fig. 11): *fase germinação e emergência*, que compreende o período que vai desde a sementeira até à emergência, isto é, aparecimento do 1º par de folhas (escamosas); *fase vegetativa*, que vai desde o estabelecimento inicial da cultura até ao início da floração; *fase reprodutiva* correspondente ao período entre o início da floração até o início da maturação e *fase de senescência* que corresponde ao período entre o início da maturação e a colheita (Knott, 1987).



Fonte: Boyeldieu, 1991

Fig. 11 – Fases do ciclo vegetativo da ervilha

Segundo Gritton (1986), as variedades de ervilha podem ser classificadas em 3 grupos de acordo com a precocidade à maturação. Assim, as variedades precoces necessitam de 1150 a 1200°C acumulados para atingirem a maturação, as variedades tardias cerca de 1550°C e as variedades semi-tardias ou semi-precoces necessitam de valores que se situam no intervalo entre 1200 e 1550°C. As variedades precoces apresentam a primeira flor entre o 8º e 9º nó e as variedades tardias por volta do 13º ao 15º nó.

## **2.2. Recursos genéticos**

### **2.2.1. Coleções de germoplasma**

É do conhecimento geral que a diversidade genética das plantas cultivadas está a diminuir drasticamente como resultado de milhares de anos de domesticação e da atividade de melhoramento de plantas. Daí se reconhece a necessidade de colher e conservar o material genético vegetal, sobretudo das espécies com interesse económico (Ferrão *et al.*, 2008). A conservação dos recursos genéticos tornou-se assim uma prioridade reconhecida a nível mundial.

Desde as primeiras décadas do século passado que as nações sentiram a responsabilidade de manter o património genético vegetal da qual são detentoras. Nesse sentido, em numerosos países, têm sido criados Bancos de Germoplasma que são estruturas de conservação da diversidade genética das espécies, quer cultivadas quer selvagens, com potencialidade de utilização imediata ou futura. Os Bancos têm por missão colher, conservar, caracterizar, avaliar, documentar e valorizar os recursos genéticos, de forma a assegurar a diversidade biológica e a produção agrícola sustentável, atual e futura, em benefício da Humanidade (Barata *et al.*, 2011).

A primeira e mais significativa coleção de germoplasma vegetal foi estabelecida entre 1920 e 1930, por Nicolai Vavilov, em São Petersburgo. Como resultado do seu trabalho foram reunidas cerca de 50 000 amostras de sementes oriundas de 50 países (Ferrão *et al.*, 2008), o que levou à criação do banco de germoplasma atualmente conhecido por “Vavilov All-Union Institute of Plant Industry” (Sprague, 1980). Atualmente existem mais de uma centena de bancos de germoplasma espalhados em todo o mundo (Sachs, 2009).

Após a segunda guerra mundial, a FAO tornou-se a principal organização a promover a conservação dos recursos genéticos das plantas com um grupo de consultadoria em investigação agrária internacional, a Consultive Group on International Agricultural Research – CGIAR (Sprague, 1980). Em 1973 foi criada uma comissão internacional para os recursos genéticos vegetais denominada por

International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) que tinha como função criar uma rede global de bancos de germoplasma (Plucknett *et al.*, 1987). Em 1991, foi substituído pelo International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), assumindo as mesmas funções e objetivos do anterior organismo (Sachs, 2009).

O órgão oficial dos recursos genéticos denomina germoplasma a todo o material que constitui a base física da herança de uma espécie e que se transmite de geração em geração por meio das células reprodutivas (IPGRI, 1994). Deste modo uma coleção de germoplasma pode ser formada por plantas, anteras, sementes, tecidos, células ou estruturas mais simples, tendo como objetivo manter disponível o máximo de diversidade genética da espécie (Costa, 2008).

Em 1977, foi criado em Portugal o mais tarde designado Banco Português de Germoplasma Vegetal (BPGV), em Braga (Fig.12), e contém, entre outras, coleções de milho, cereais, leguminosas, hortícolas aromáticas, medicinais e cucurbitáceas (Farias, 1999).



Fig. 12 – Banco Português de Germoplasma Vegetal, Braga

Por iniciativa do IPGRI e da FAO, em 2004, com o objetivo de garantir a segurança dos alimentos através da conservação, em parceria com o Governo Norueguês, com o GCDT (Global Crop Diversity Trust) e com o Banco Genético Nórdico, foi construído um Banco de Germoplasma no arquipélago de Svalbard (Noruega). Inaugurado em 2008, este Banco (Fig. 13) tem como missão conservar e assegurar

a diversidade biológica de recursos genéticos vegetais para todo o mundo a partir de duplicados existentes nos países de origem (Ferrão *et al.*, 2008).



Fig. 13 –“Svalbard Seed Vault”, Noruega

Todos os países interessados em participar podem depositar sementes, mediante um acordo entre o Governo Norueguês e o país doador, reservando-se a este o direito de retirá-las consoante as necessidades. Portugal também faz parte deste projeto, tendo depositado várias dezenas de sementes portuguesas neste Banco (Ferrão *et al.*, 2008).

No género *Pisum* as principais entidades mundiais responsáveis pelas coleções de germoplasma são o Instituto N. I. Vavilov, na Rússia, com cerca de 6800 acessos, Australian Temperate Field Crop Collection com 6567 acessos e o ICARDA, na Síria, com 6105 acessos (Quadro 3).

Quadro 3 – Número de amostras do género *Pisum* existentes em diversas coleções de germoplasma

Instituto	País	Número de acessos
N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry, St. Petersburg	Rússia	6790
Australian Temperate Field Crop Collection, Horsham	Austrália	6597
International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)	Síria	6105
Plant Germoplasm Introduction and Testing Research Station, Pullman	E.U.A.	5400
Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gaterleben	Alemanha	5336
Instituto del Germoplasma, Bari	Itália	4297

Fonte: Smýkal *et al.*, 2012

Segundo Jaramilo e Baena (2000), a conservação e manutenção do germoplasma não se limita à colheita e armazenamento das sementes. Também deve assegurar a existência do material em condições viáveis, geneticamente íntegras e com as suas características originais, uma vez que a viabilidade do germoplasma conservado vai diminuindo com o tempo assim como a quantidade, devido à sua utilização. Para isso é necessário controlar as condições de armazenamento e de acondicionamento por forma a reduzir a atividade metabólica e todos os processos envolvidos na perda da viabilidade e do vigor das sementes (Pita-Villamil e Martínez-Laborde, 2001) assim como assegurar a renovação e a multiplicação das coleções.

### **2.2.2. Caracterização das coleções de germoplasma**

A avaliação do material contido nas coleções de germoplasma é um processo fundamental, cujo resultado final permite a sua utilização em programas de melhoramento, na investigação pura e noutras áreas de investigação (Farias, 1999). Assim, após a colheita do material deve-se seguir um trabalho de caracterização, de forma a complementar os dados registados durante a colheita de amostras.

Qualquer característica que diferencie indivíduos e que seja facilmente detetável pode ser considerada um marcador genético. Os marcadores podem ser obtidos através de estudos de caracterização fenológica, morfológica e agronómica e/ou na utilização de marcadores moleculares de ADN (Carrera *et al.*, 2004).

#### **2.2.1.1. Marcadores morfológicos e agronómicos**

A caracterização das coleções de germoplasma através de marcadores/descriptores morfológicos e agronómicos baseia-se na utilização de uma lista de características fenotípicas, de fácil identificação tais como cor da semente, porte, altura, forma da folha e vagem.

Este tipo de descritores apresentam como limitação o baixo nível de polimorfismo, baixo número de marcadores disponíveis em cada população, a sua expressão está dependente de vários fatores tais como ambientais e estágio de desenvolvimento da planta. Contudo, este tipo de descritores tem a vantagem de serem de baixo custo, possibilidade de fácil identificação dos materiais e de método de observação simples.

Os marcadores morfológicos têm tido um papel fundamental na divulgação das características agronômicas de novas variedades e influenciam decisivamente a escolha de variedades por parte dos agricultores (Morais, 2010).

### **2.2.1.2. Marcadores Moleculares**

Os marcadores moleculares são uma peça importante para estudar a variabilidade genética existente em coleções de germoplasma (Costa, 2008) e para o melhoramento genético (Pereira *et al.*, 2006). São sequências de ADN que diferenciam dois ou mais indivíduos (Milach, 1998).

Começaram a ser utilizados nos anos 80 do século passado e apresentam vantagens relativamente aos marcadores morfológicos. Existem em maior número, são altamente polimórficos, de rápida identificação e a sua expressão é independente das condições ambientais.

Existem vários tipos de marcadores moleculares conforme a metodologia utilizada. Os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) são baseados na amplificação de segmentos de ADN (Ácido desoxirribonucleico) ao acaso a partir de “primers” (oligonucleotídeos iniciadores de reação) de sequência arbitrária (Williams *et al.*, 1990) através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Os produtos de amplificação são separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados com brometo de etídio.

As principais vantagens da utilização da técnica RAPD em relação a outras técnicas moleculares são a rapidez e facilidade na obtenção de resultados (Samec

*et al.*, 1996), o baixo custo e a não utilização de radioatividade (Costa, 2008). As análises requerem pouca quantidade de ADN.

Samec *et al.* (1996) demonstraram que a utilização da técnica RAPD é eficiente para a identificação de genótipos de ervilha, permitindo a obtenção de fragmentos polimórficos que diferenciam as populações. Atualmente, esta técnica continua a ser utilizada para avaliar e caracterizar coleções de germoplasma de ervilha (Baranger *et al.*, 2004; Tar'an *et al.*, 2005; Wani *et al.*, 2013) e de outras espécies de leguminosas (Weder, 2002; Barik *et al.*, 2007; Mahmood *et al.*, 2011)

Na ervilha, a técnica RAPD também tido sido utilizada para o mapeamento de genes relacionados com características morfológicas de interesse agronómico (Cheghamirza *et al.*, 2002; Koveza *et al.*, 2005; Haider *et al.*, 2013) e de genes de resistência a doenças (Pereira *et al.*, 2010; Nisar e Ghafoor, 2011).



### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material vegetal em estudo

A avaliação da diversidade genética foi realizada em 50 populações portuguesas de ervilha (*Pisum sativum* L.) pertencentes à coleção de germoplasma existente no INIAV-Elvas, considerando como testemunhas, duas variedades comerciais, Pixel e Grisel, selecionadas também no INIAV-Elvas. A origem geográfica das populações encontra-se no Quadro 4. Como se pode verificar, a maioria das populações foram colhidas na região do Minho, Beira Litoral, Algarve, regiões do litoral do País e uma minoria da região de Trás os Montes e Interior Alentejano.

Quadro 4 – Populações estudadas e suas origens

População	Proveniência	População	Proveniência
Gp 2460	M. Boi, S. Bartolomeu Messines	Gp 3491	Antas, Terras de Bouro
Gp 2461	Tavira	Gp 3492	Covide, Terras de Bouro
Gp 2462	Mexilhoeira, Portimão	Gp 3493	Covide, Terras de Bouro
Gp 2463	Mexilhoeira, Portimão	Gp 3494	Chamoim, Terras de Bouro
Gp 2464	Espinhaço de Cão, Aljezur	Gp 3495	Choreense, Terras de Bouro
Gp 3148	V.N. Foz Coa	Gp 3497	S. Isabel Montes, Terras de Bouro
Gp 3149	Poiares, Freixo Espada à Cinta	Gp 3498	Alecrimes, Terras de Bouro
Gp 3150	Esturãos, Valpaços	Gp 3499	Freitas, Terras de Bouro
Gp 3151	Friões, Valpaços	Gp 3500	Mosteiro, Vieira do Minho
Gp 3152	Friões, Valpaços	Gp 3501	Anjos, Vieira do Minho
Gp 3153	Soutelinho do Mte, V.P. Aguiar	Gp 3502	Guilhofrei, Vieira do Minho
Gp 3154	Valoura, V.P. Aguiar	Gp 3503	Vale do Rentão, Vieira do Minho
Gp 3155	Carvalhais, Mirandela	Gp 3504	Vale do Rentão, Vieira do Minho
Gp 3156	Vimioso	Gp 3505	Vale do Rentão, Vieira do Minho
Gp 3160	Vale Prados, Mirandela	Gp 3506	Condão, Vieira do Minho
Gp 3254	Cantanhede, Coimbra	Gp 3507	S. Mateus da Rib. Terras Bouro
Gp 3255	Cantanhede, Coimbra	Gp 3508	Faldrem, Vieira do Minho
Gp 3256	Sorgaçosa, Piodão	Gp 4269	Murça
Gp 3257	Sorgaçosa, Piodão	Gp 4270	Murça
Gp 3258	Sorgaçosa, Piodão	Gp 4271	Santiago do Cacém
Gp 3259	Sorgaçosa, Piodão	Gp 4272	Almogrove, Odemira
Gp 3260	S. Martinho Bispo, Coimbra	Gp 4273	Almogrove, Odemira
Gp 3261	Lousa, Torre de Moncorvo	Gp 5422	Porto Espada, Portalegre
Gp 3262	Felgueiras, Torre de Moncorvo	Gp 5423	Odemira
Gp 3263	Almada de Ouro, Odeleite	Grisel	Variedade comercial
Gp 3490	Antas, Terras de Bouro	Pixel	Variedade comercial

### 3.2. Caracterização edafoclimática do local de ensaio

O estudo foi realizado nos campos experimentais do INIAV, em Elvas que têm a seguinte localização: latitude 38° 53' N, longitude 7° 09' W e altitude 208 m. Em 2011/12, o ensaio foi instalado na Folha 4 e no ano 2012/2013 na Folha 5 (Fig. 14).



Fonte: Google

Fig. 14 – Localização dos ensaios na folha 4 e na folha 5

Os ensaios foram instalados em solos classificados como pertencentes à família dos solos mediterrâneos pardos, de quartzodioritos (Pmg), com textura franco-argilo-arenosa e valores de pH próximo da neutralidade.

Elvas insere-se numa região de clima temperado, com Verão quente e chuva abundante no Inverno. Segundo a classificação de Köppen, o clima é mesotérmico húmido com estação quente e seca no Verão (Csa). Na classificação de Thornthwaite o clima é do tipo C<sub>1</sub>b'<sub>4</sub>B'<sub>2</sub>s ou seja sub-húmido seco, com eficiência térmica moderada, 2º mesotérmico, com excesso de água moderado no Inverno (Reis e Gonçalves, 1987).

Segundo os valores médios de 30 anos (período entre 1970 e 2000) do posto de meteorológico de Elvas no diagrama ombrométrico de Gausse (Fig. 15) verifica-se a ocorrência de um período seco ( $P < 2T$ ), com duração aproximada de 5 meses entre os meses de maio a setembro. As precipitações mais elevadas verificam-se nos meses de outubro, novembro e dezembro, ocorrendo um período húmido ( $P > 2T$ ). Assim verifica-se que a pluviosidade e a temperatura ocorrem de forma variável ao longo do ano.

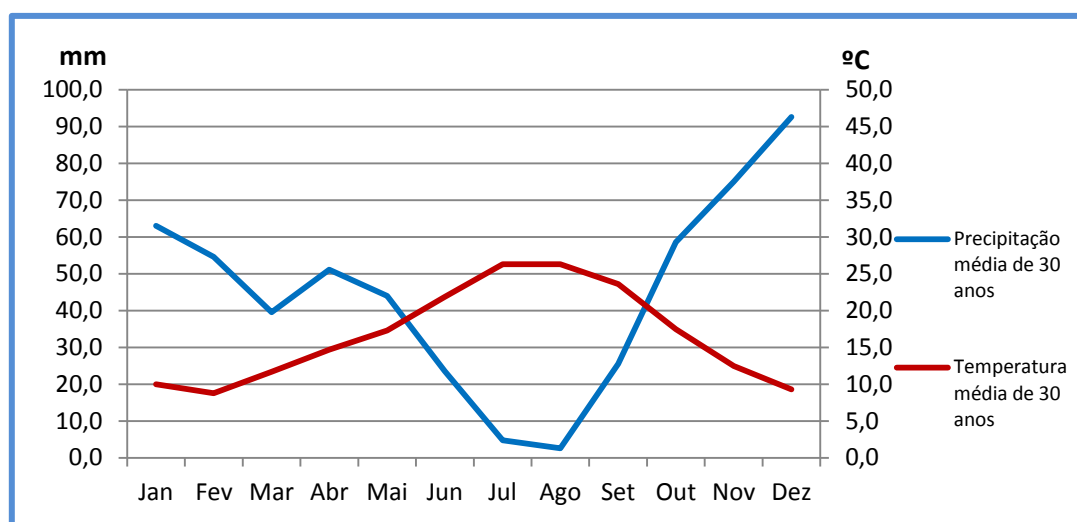


Fig. 15 – Diagrama ombrométrico de Gausse com a média de 30 anos, período entre 1970-2000, do posto meteorológico de Elvas

Os valores da precipitação e da temperatura média no posto meteorológico de Elvas observados nos 2 anos em que decorreram os ensaios encontram-se nas Fig. 16 e Fig. 17 e no anexo1 apresentam-se os referidos valores tabelados.

Em termos gerais, pode dizer-se que o ano agrícola 2011/2012 foi muito seco com apenas 269,7 mm de precipitação total, valores significativamente inferiores à média dos últimos 30 anos, cerca de 535mm, destacando-se os meses de dezembro a março com valores muito reduzidos. Em 2012/2013, a precipitação foi mais elevada, tendo-se registado 639,6 mm, ultrapassando a média da região, com destaque os meses de novembro de 2012 e março de 2013, com 124,2 mm e 167,3 mm, respetivamente, apresentando valores muito elevados quando comparados com a

média de 30 anos que corresponde a 75,1mm em novembro e 39,6 mm em março (Fig.16).

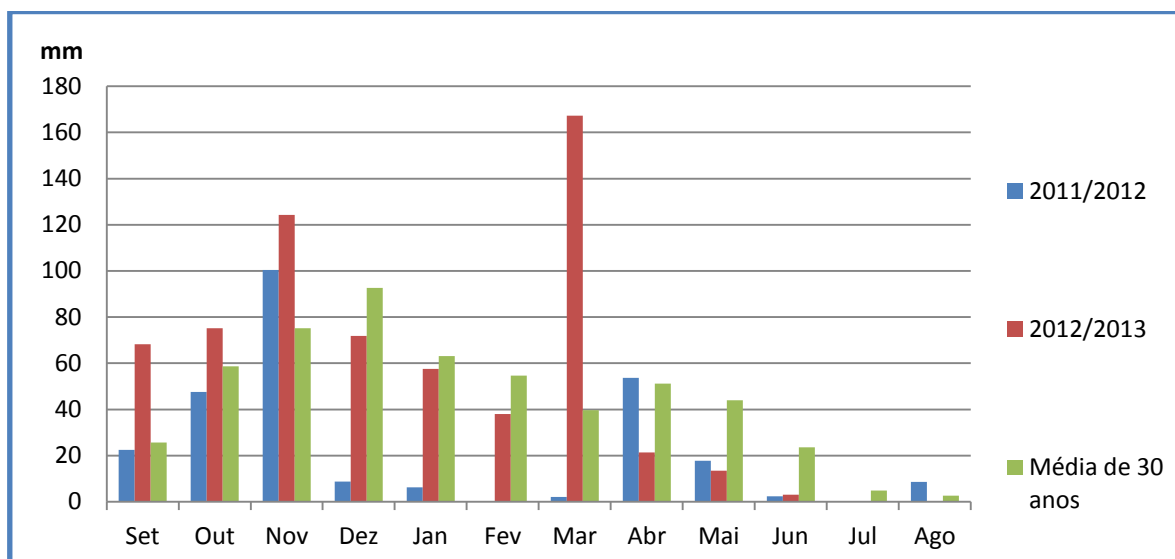


Fig. 16 – Dados de precipitação registados na Estação meteorológica de Elvas para o ano agrícola de 2011/2012, 2012/2013 e média de 30 anos

Em relação à média das temperaturas, o mês mais frio, no ano 2011/2012, foi janeiro com 8,3°C e em 2012/13 foi fevereiro com 8,8°C; o mês mais quente foi agosto, em ambos os anos, com médias de 25,7°C e 26,3°C, respetivamente (Fig. 17).

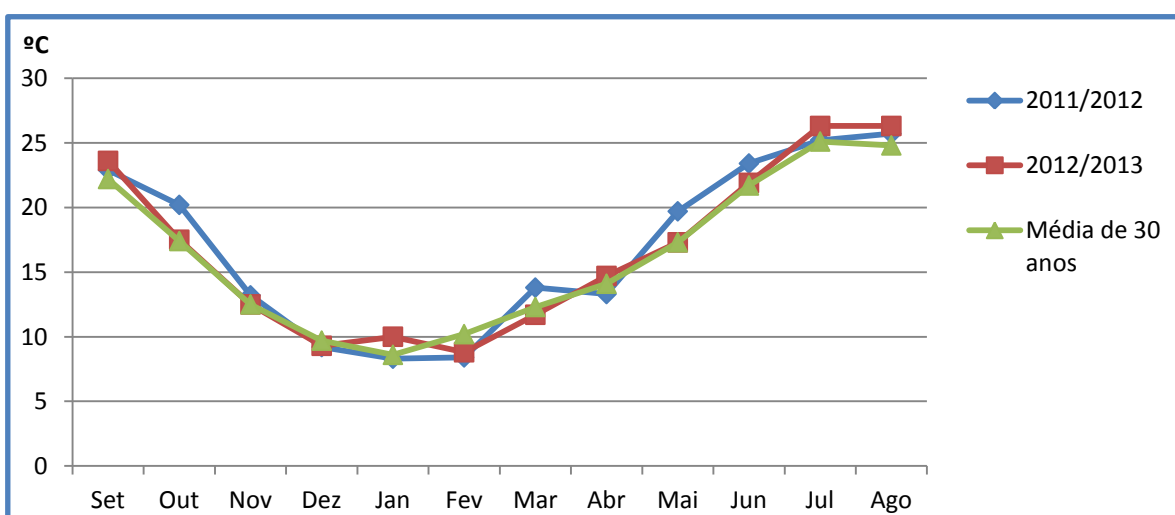


Fig. 17 – Dados de temperatura média registados na Estação Meteorológica de Elvas para o ano agrícola de 2011/2012, 2012/2013 e média de 30 anos

### 3.3. Procedimento experimental

Este estudo foi realizado nos anos agrícolas de 2011/12 e 2012/13. Os ensaios foram semeados em 29 de Novembro 2011 e em 23 de Novembro 2012. Em ambos os anos, a sementeira foi efetuada manualmente.

Os ensaios foram delineados segundo um esquema de blocos completos casualizados, com duas repetições. Cada repetição é constituída por 52 linhas, correspondendo cada linha a uma população. As linhas, com 4 metros de comprimento cada, ficaram espaçadas de 0,60 m. Em cada linha semearam-se 50 sementes (Fig. 18).

Repetição I	
Gp 2460	
Gp 2461	
Gp 2462	
Gp 2463	
Gp 2464	
Gp 3148	
Gp 3149	
Gp 3150	
Gp 3151	
Gp 3152	
Gp 3153	
Gp 3154	
Gp 3155	
Gp 3156	
Gp 3160	
Gp 3254	
Gp 3255	
Gp 3256	
Gp 3257	
Gp 3258	
Gp 3259	
Gp 3260	
Gp 3261	
Gp 3262	
Gp 3490	
Gp 3491	
Gp 3492	
Gp 3494	
Gp 3495	
Gp 3497	
Gp 3498	
Gp 3499	
Gp 3500	
Gp 3501	
Gp 3502	
Gp 3503	
Gp 3504	
Gp 3505	
Gp 3506	
Gp 3507	
Gp 3508	
Gp 4269	
Gp 4270	
Gp 4271	
Gp 4272	
Gp 4273	
Gp 5422	
Gp 5423	
Pixel	
Grisel	

Repetição II	
Gp 2464	
Gp 3491	
Gp 3505	
Gp 4270	
Gp 3152	
Gp 3498	
Pixel	
Gp 2461	
Grisel	
Gp 3148	
Gp 3258	
Gp 3154	
Gp 3261	
Gp 2463	
Gp 3259	
Gp 3255	
Gp 3263	
Gp 3507	
Gp 5423	
Gp 2460	
Gp 5422	
Gp 4273	
Gp 4272	
Gp 3499	
Gp 3150	
Gp 3501	
Gp 3503	
Gp 3504	
Gp 3151	
Gp 4269	
Gp 3256	
Gp 3508	
Gp 3262	
Gp 4271	
Gp 3260	
Gp 3156	
Gp 3500	
Gp 2462	
Gp 3497	
Gp 3160	
Gp 3502	
Gp 3155	
Gp 3492	
Gp 3254	
Gp 3495	
Gp 3257	
Gp 3494	
Gp 3153	
Gp 3149	
Gp 3506	
Gp 3493	
Gp 3490	

Fig. 18 – Esquema de campo do ensaio, para os dois anos, com duas repetições dispostas em blocos casualizados

Para o combate de infestantes, aplicou-se em pré-emergência a mistura de duas substâncias ativas: pendimetalina (330g/l) e linurão (450g/l). Em pós-emergência, utilizou-se a substância ativa bentazona (480g/l). Completou-se o controlo de infestantes com trabalhos de monda manual, quando necessário. Durante o ciclo vegetativo das plantas foram realizados vários tratamentos fitossanitários com a substância ativa deltametrina (25g/l) para impedir o ataque de insetos, especialmente *Bruchus* sp (gorgulho).

Os ensaios foram colhidos manualmente durante o mês de Maio, à medida que as plantas atingiam a maturação. Após a colheita das plantas, procedeu-se à debulha das vagens e à limpeza das amostras de sementes.

### 3.4. Observações fenológicas e morfológicas

Em cada ano de ensaio, durante o ciclo vegetativo e após a colheita foram avaliados 5 parâmetros fenológicos (quadro 5), 18 parâmetros morfológicos quantitativos (quadro 6) e 18 qualitativos (quadro 7). As características utilizadas foram selecionadas com base na informação indicada pelos descritores da UPOV (2005) para a ervilha.

Quadro 5 – Parâmetros fenológicos utilizados na avaliação das populações de ervilha

Nº	Parâmetros	Definição
1	Dias até à emergência (DEMER)	Nº de dias ocorridos desde a sementeira até ao aparecimento do 1º par de folhas em 50% das plantas
2	Dias até ao início de floração (DIFLO)	Nº de dias ocorridos desde a sementeira até que 10% das plantas apresentem a 1ª flor
3	Dias até ao final da floração (DFFLO)	Nº de dias ocorridos desde a sementeira até que 90% das plantas terminaram a floração
4	Duração da floração (DFLO)	Nº de dias ocorridos desde o início da floração até ao final da floração
5	Dias até à maturação (DMAT)	Nº de dias decorridos desde a sementeira até que 90% da parcela tenha plantas maduras para serem colhidas

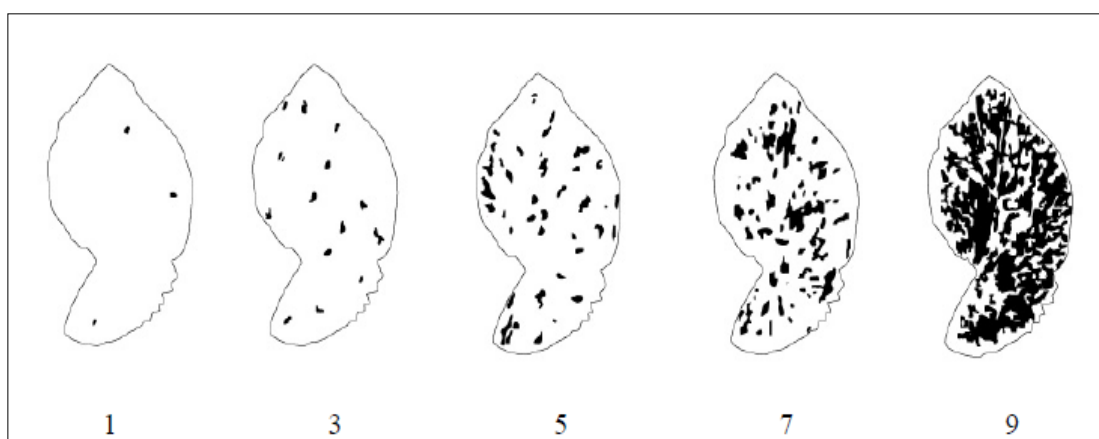
As observações realizadas ao nível da folha, da flor e da vagem foram realizadas em 10 folhas, 10 flores ou 10 vagens provenientes de 10 plantas selecionadas ao acaso em cada população (5 plantas por repetição). Estas observações foram feitas no laboratório imediatamente após a colheita do material, exceto a altura da planta e altura da 1ª vagem que foram efetuadas no campo.

Quadro 6 – Características morfológicas quantitativas avaliadas nas populações de ervilha

Nº	Característica	Nº	Característica
1	Altura da planta (cm) – Alt	10	Comprimento do pedúnculo da flor (cm) – Cped
2	Altura da 1ª vagem (cm) – Alt1vg	11	Largura do estandarte (cm) – Lest
3	Nº de folíolos - Nfol	12	Nº de óvulos por vagem – Nov/vg
4	Comprimento do folíolo (cm) - Cfol	13	Nº total de vagens por planta – Nvg/plt
5	Largura do folíolo (cm) - Lfol	14	Comprimento da vagem (cm) – Cvg
6	Comprimento da estípula (cm) - Cest	15	Largura da vagem (cm) – Lvg
7	Largura da estípula (cm) - Lest	16	Nº sementes por planta - Nsem/plt
8	Densidade de manchas nas estípulas – Dmest (1-9)	17	Peso100 sementes (g) - P100S
9	Nº de flores por nó – Nflores	18	Produção de semente por planta (g) – Psem/plt

As características mencionadas no Quadro 6 foram avaliadas de acordo com a seguinte metodologia:

- A medição da altura da planta e da altura da 1ª vagem foi efetuada no final da floração;
- A contagem do número de folíolos por folha foi realizada na 10ª folha do ramo principal;
- A medição do comprimento e largura do folíolo foi realizada na 10ª folha do ramo principal;
- A medição do comprimento e largura da estípula foi realizada na 10ª folha do ramo principal;
- A classificação da densidade de manchas nas estípulas baseou-se numa escala de 1 a 9 (Fig. 19);



Fonte: UPOV, 2005

Fig. 19 – Densidade das manchas das estípulas

- A contagem do número de flores por nó foi realizada durante a plena floração;
- O comprimento do pedúnculo da flor corresponde à distância desde a inserção da estípula até ao primeiro nó ou curvatura do pedúnculo (Fig. 20);

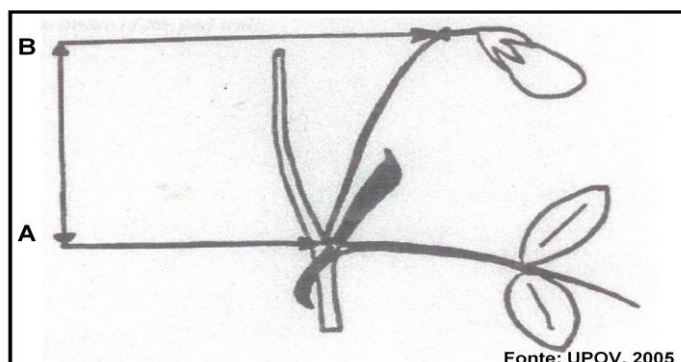


Fig. 20 – Medição do pedúnculo da flor (distância entre A-B)

- A medição da largura do estandarte foi efetuada no ponto mais largo, após este ter sido destacado da flor e espalmado numa superfície plana;
- A contagem de número de vagens por planta foi realizada após a colheita;
- A medição do comprimento e largura máxima da vagem foi efetuada em vagens fechadas;
- A contagem do número de óvulos por vagem foi realizada após a colheita;
- A contagem de sementes por planta foi efetuada após a debulha das vagens;
- O peso de 100 sementes foi calculado através da média de 2 amostras de 100 sementes.

Para as características morfológicas qualitativas foram atribuídos códigos numéricos de acordo com os descritores da UPOV (2005).

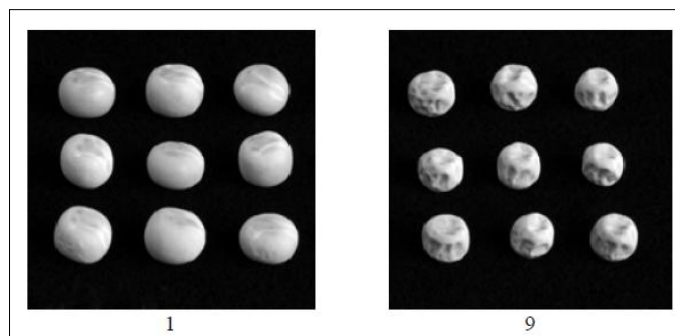
Quadro 7 – Características morfológicas qualitativas avaliadas nas populações de ervilha

Nº	Característica	Nº	Característica
1	Cor dos cotilédones	10	Estípulas em forma de orelhas de coelho
2	Enrugamento dos cotilédones	11	Folíolos
3	Cor do tegumento*	12	Dentição do bordo do folíolo
4	Marmoreado do tegumento	13	Pigmentação antociânica da asa*
5	Manchas violetas ou rosa no tegumento*	14	Cor do estandarte
6	Cor negra do hilo	15	Forma da base do estandarte
7	Fasciação	16	Cor da vagem
8	Antocianinas no ponto de inserção das estípulas*	17	Forma da parte distal da vagem
9	Tipo de pigmentação antociânica no ponto de inserção das estípulas*	18	Tipo de curvatura da vagem

\* apenas nas variedades com antocianinas

As características qualitativas foram avaliadas de acordo com a seguinte metodologia:

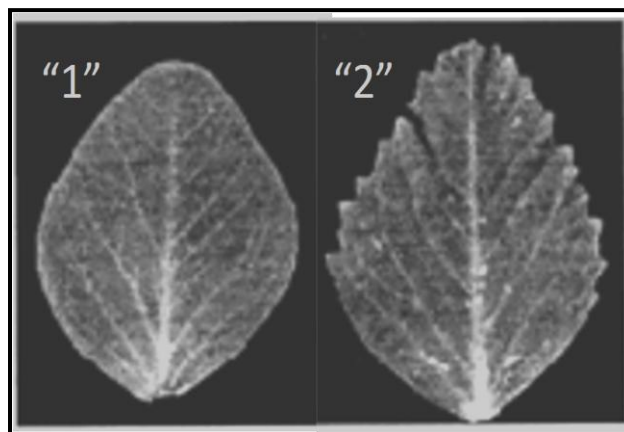
- A cor dos cotilédones foi classificada numericamente com “1” para a cor verde e “2” para a cor amarela;
- O enrugamento dos cotilédones foi classificado numericamente sendo atribuído “1” para ausente e “9” para presente (Fig. 21);



Fonte: UPOV, 2005

Fig. 21 – Tipo de enrugamento dos cotilédones; (1) ausente; (2) presente

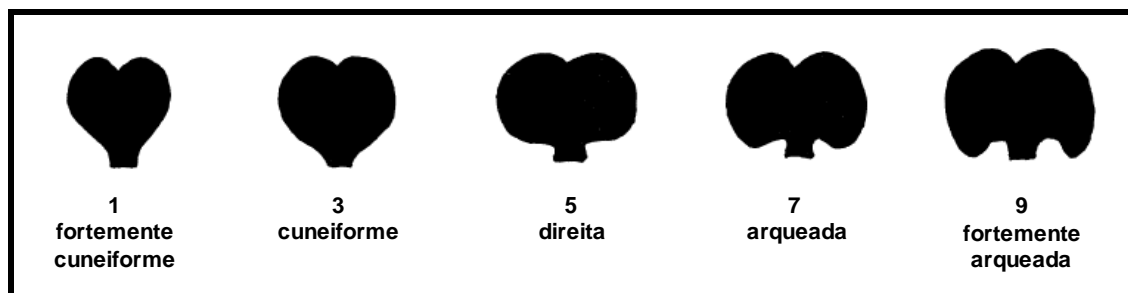
- A cor do tegumento foi classificada numericamente sendo “1” atribuído para a cor castanha e “2” para a cor castanha esverdeado;
- A presença do marmoreado do tegumento foi classificada numericamente sendo “1” ausente e “2” presente;
- A presença de manchas violetas ou rosa no tegumento foi classificada numericamente sendo atribuído “1” para ausente, “2” para fraca, “3” para forte;
- A presença de cor negra do hilo foi classificada numericamente sendo atribuído “1” para ausente e “2” para presente;
- A presença de antocianinas no ponto de inserção das estípulas foi classificada numericamente sendo atribuído “1” para ausente e “2” para presente;
- A presença de folíolos foi classificada numericamente sendo atribuído “1” para ausente e “2” para presente;
- A presença de dentição do bordo do folíolo foi classificado numericamente sendo atribuído “1” para ausente e “2” para presente (Fig. 22);



Fonte: UPOV, 2005

Fig. 22 – Dentição do bordo do folíolo:  
(1) ausência; (2) presença

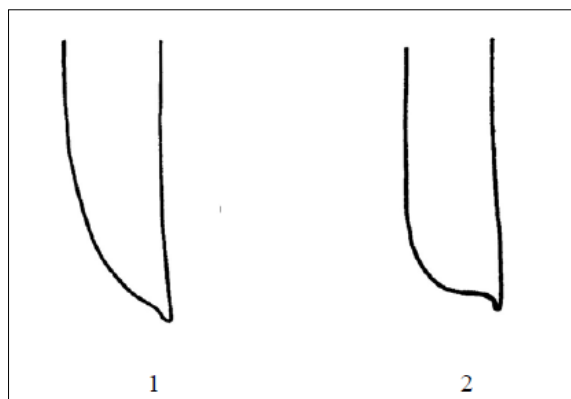
- A pigmentação antociânica da asa foi classificada numericamente de 1 a 3, sendo “1” para rosa pálido, “2” para rosa e “3” para púrpura;
- A cor do estandarte foi classificada numericamente sendo “1” para branco e “2” para creme;
- A forma da base do estandarte baseou-se em valores numéricos entre 1 e 9, como pode ser observado na Fig. 23;



Fonte: UPOV, 2005

Fig. 23 – Classificação da forma da base do estandarte

- A cor da vagem foi classificada numericamente sendo “1” amarelo e “2” verde;
- A forma da parte distal da vagem foi classificada numericamente sendo “1” para pontiagudo e “2” para embotado (Fig. 24);



Fonte: UPOV, 2005

Fig. 24 – Forma da parte distal da vagem

- O tipo de curvatura foi classificada numericamente sendo “1” para côncavo e “2” para convexo.

### 3.5. Análises bromatológicas

As sementes foram analisadas para a determinação da humidade, proteína bruta, fibra bruta e gordura bruta.

A humidade foi quantificada seguindo o procedimento descrito na norma NP875 (1994).

A proteína bruta foi quantificada seguindo o procedimento descrito na norma NP 1996 (2000). O teor de proteína foi calculado multiplicando o teor de azoto da amostra, determinado pelo método de Kjeldahl, pelo fator 6,25.

O teor de fibra bruta e de gordura bruta foram obtidos seguindo o procedimento descrito na norma NP 2029 (1994) e na norma NP 876 (2000), respetivamente.

### 3.6. Análises moleculares

#### 3.6.1. Extração e quantificação de ADN

O ADN foi extraído das folhas de plantas com 2 a 4 pares de folhas. De cada população colheu-se material vegetal de 10 plantas. Após a colheita das folhas,

estas foram maceradas em azoto líquido até se obter um pó muito fino. Para extração do ADN utilizou-se o “Plant Genomic DNA Kit” da Favorgen.

A quantificação e a pureza do ADN extraído foram determinadas pela comparação visual de cada amostra com padrões conhecidos de ADN em concentração de gel de agarose a 1% e por espectrofotometria, por leitura da absorvância a 260nm (Sambrook *et al.*, 1987).

As amostras de ADN de trabalho foram obtidas por diluição com água destilada até se obter a concentração final de 20ng/μl.

### 3.6.2. Marcadores RAPDs

A técnica de RAPD permite a amplificação de fragmentos de ADN a partir de um único “primer” com sequência de nucleótidos arbitrária, constituído por 10 bases (Williams *et al.*, 1990).

Nas amplificações de ADN utilizou-se o kit “Dream Taq PCR master Mix 2x” da Thermo Scientific. Cada reação de amplificação foi efetuada num volume de 25 μl contendo 12,5μl de “DreamTaq PCR”, 1μl de “primer”, 10,5μl de água destilada e 1μl de cada amostra de ADN. As reações de amplificação foram realizadas num termociclador Biometra UNO II. As condições de amplificação encontram-se no Quadro 8.

Quadro 8 – Programa de amplificação das amostras de ADN

Nº de Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	90”
35	94°C	30”
	36°C	60”
	72°C	120”
	72°C	10’

Os produtos de amplificação RAPD foram separados em gel de agarose a 2%, em solução tampão de TBE 0,5%. Os produtos amplificados foram previamente misturados com 5 µl de bromofenol e por cada amostra utilizou-se 15 µl de volume. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta. Para se determinar o tamanho das bandas de ADN amplificadas utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 bases (Gene Ruler DNA ladder, MBI, Fermentas).

Neste estudo foram testados cinco “primers” cujas sequências se encontram no Quadro 9.

Quadro 9 – Sequências nucleotídicas dos "primers" utilizados na análise de RAPD

“Primer”	Sequência (5' → 3')
OPA 13	CAGCACCCAC
OPN02	ACCAGGGGCA
OPN03	GGTACTCCCC
OPN04	GACCGACCCA
OPN05	ACTGAACGCC

### 3.7. Tratamento estatístico

Os dados morfológicos quantitativos e moleculares foram tratados pelas técnicas de taxonomia numérica, utilizando o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.0 (Rohlf, 1997).

Os dados morfológicos qualitativos são apresentados sob a forma de gráficos de distribuição de frequências usando o programa Excel.

#### 3.7.1. Dados morfológicos

A partir dos dados morfológicos quantitativos obtidos no estudo de caracterização, construiu-se uma matriz de dados originais com 24 colunas (3 características fenológicas, 18 morfológicas quantitativas e 3 bromatológicas) e 52 linhas (populações). Utilizaram-se os valores médios de cada parâmetro por população.

Como as características estudadas estão expressas em unidades diferentes, procedeu-se à sua standardização.

Com base na matriz standardizada, calculou-se a matriz de distâncias através do coeficiente de distância euclidiana e procedeu-se à análise de grupos, utilizando o método de aglomeração UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average). Os resultados obtidos foram expressos sob a forma de dendrograma.

Para visualizar a distribuição das populações no espaço multidimensional, recorreu-se ao método de ordenação designado por análise dos componentes principais.

### **3.7.2. Dados moleculares**

A partir da leitura dos géis de agarose construiu-se uma matriz binária, em que a ausência de um marcador molecular foi codificada com o algarismo “0” e a presença de um marcador foi codificada com o algarismo “1”.

Com base na matriz binária, calculou-se a matriz de distâncias genéticas através do coeficiente de Jaccard.

Os resultados obtidos foram expressos sob a forma de dendrograma tendo-se utilizado o método de agrupamento UPGMA.

## Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização morfológica

A maioria das populações em estudo apresenta plantas com coloração antociânica e flores coloridas, ou seja, pertencem à variedade *arvense*. Apenas 22 populações são constituídas por plantas sem coloração antociânica e com flores brancas, pertencendo à variedade *sativum*.

#### 4.1.1. Características qualitativas

##### 4.1.1.1. Semente

Na Fig. 25, pode-se observar a distribuição das populações de ervilha em 3 grupos de acordo com a cor dos cotilédones. Verifica-se que a maioria das populações apresenta sementes com cotilédones amarelos. Apenas 9 populações possuem sementes com cotilédones verdes e 5 populações apresentam sementes com cotilédones de ambas as cores.

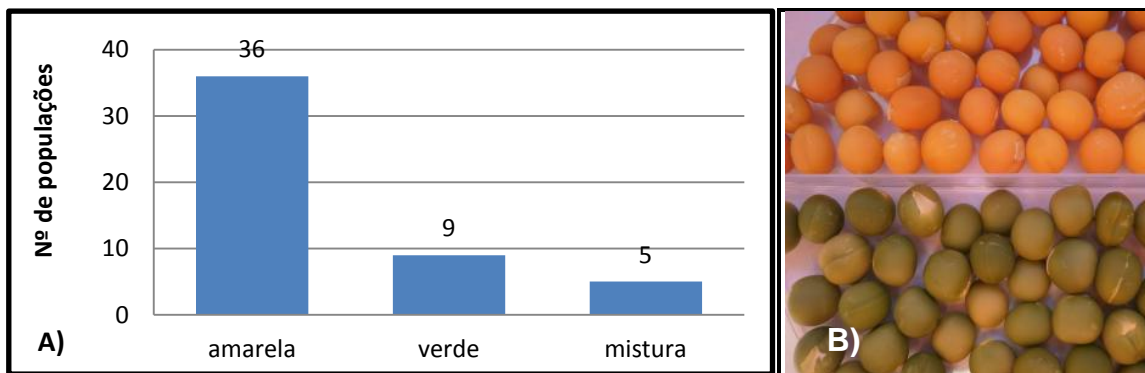


Fig. 25 – Distribuição das 52 populações de ervilha quanto à cor dos cotilédones (A); Pormenor da coloração dos cotilédones (B)

Em relação ao tipo de enrugamento dos cotilédones (Fig. 26), 31 populações têm sementes com cotilédones enrugados e 20 populações têm sementes com cotilédones lisos. Apenas uma população é constituída por sementes que apresentam ambos os tipos de enrugamento.

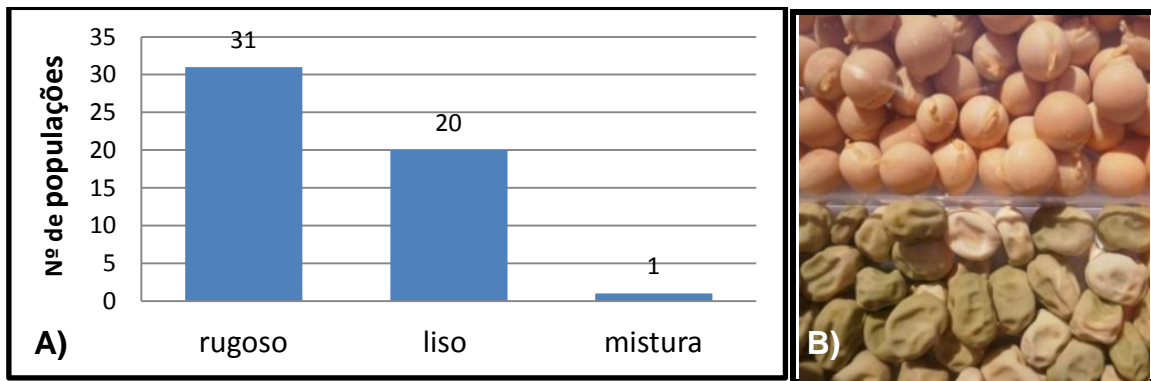


Fig. 26 – Distribuição das 52 populações de ervilha de acordo com o tipo de enrugamento dos cotilédones (A); Pormenor do tipo de enrugamento (B)

A cor e o marmoreado do tegumento assim como a intensidade das manchas violetas foram observados apenas nas 30 populações que apresentam plantas com coloração antociânica. Nesta coleção de ervilha, as sementes possuem tegumento castanho ou castanho esverdeado (Fig. 27). Em relação ao marmoreado do tegumento, 24 populações possuem esta característica (Fig. 28).

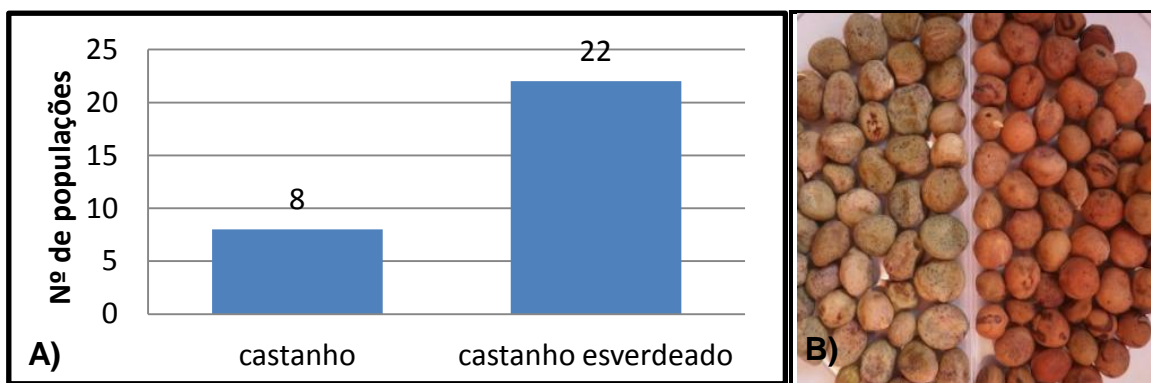


Fig. 27 – Distribuição das 30 populações de ervilha quanto à cor do tegumento (A); Pormenor da coloração (B)

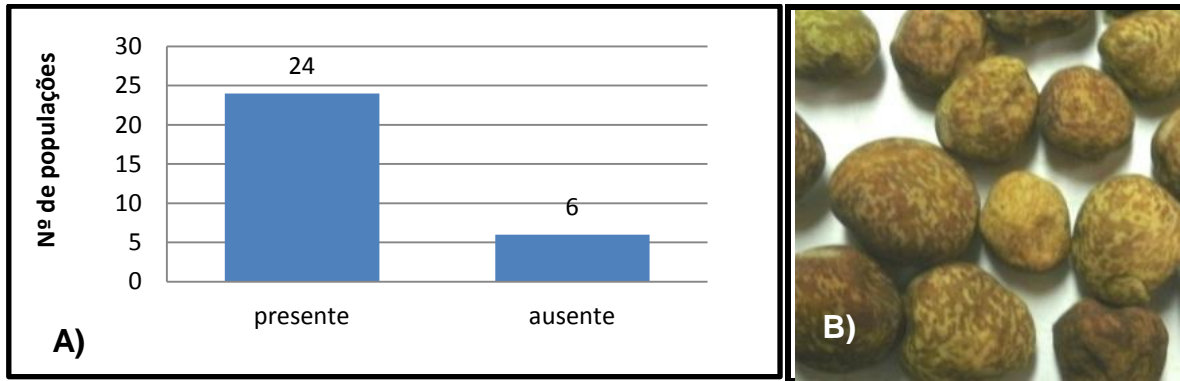


Fig. 28 – Distribuição das 30 populações de ervilha quanto ao marmoreado do tegumento (A); Pormenor do marmoreado nas sementes (B)

Na Fig. 29, pode-se observar a distribuição das populações em 3 grupos de acordo com a intensidade das manchas violetas presentes no tegumento. Das 30 populações em estudo, 17 apresentam intensidade fraca, 8 intensidade forte e 5 populações são constituídas por sementes com vários graus de intensidade das manchas violetas.

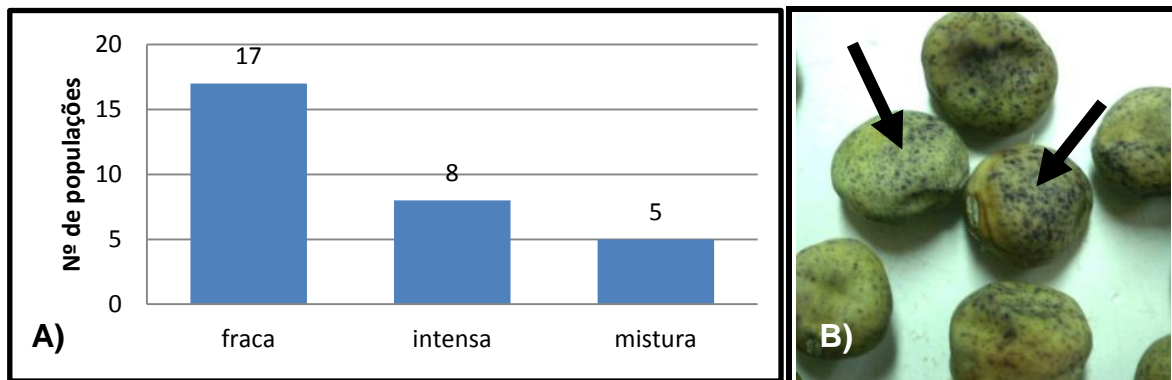


Fig. 29 – Distribuição das 30 populações de ervilha em relação à intensidade das manchas violetas no tegumento (A); Pormenor das manchas violetas nas sementes (B)

A maioria das populações não apresenta semente com hilo de cor negra (Fig. 30). Apenas 9 populações apresentam sementes com esta característica.

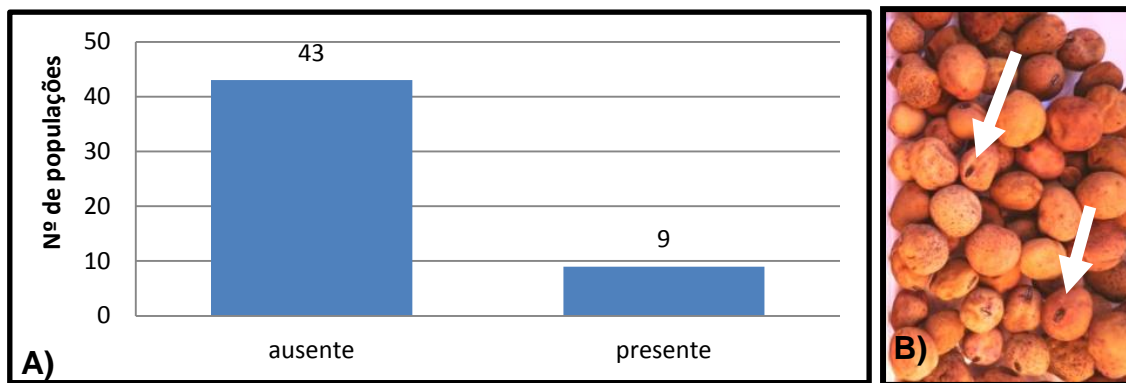


Fig. 30 – Distribuição das 52 populações de ervilha de acordo com a presença da cor negra do hilo na semente (A); Pormenor da presença da cor negra do hilo (B)

#### 4.1.1.2. Folha

Na Fig. 31, pode-se observar a distribuição das populações em função da presença ou ausência de folíolos nas folhas. Esta característica permite classificar o tipo de folha apresentado pelas plantas. As populações podem ser constituídas por plantas que apresentam folíolos na folha (folha normal) ou por plantas sem folíolos na folha (folha semi-áfila). Nesta coleção, 45 populações possuem folha normal, 4 populações têm folhas semi-áfilas e 3 populações são constituídas por plantas que apresentam os dois tipos de folha.

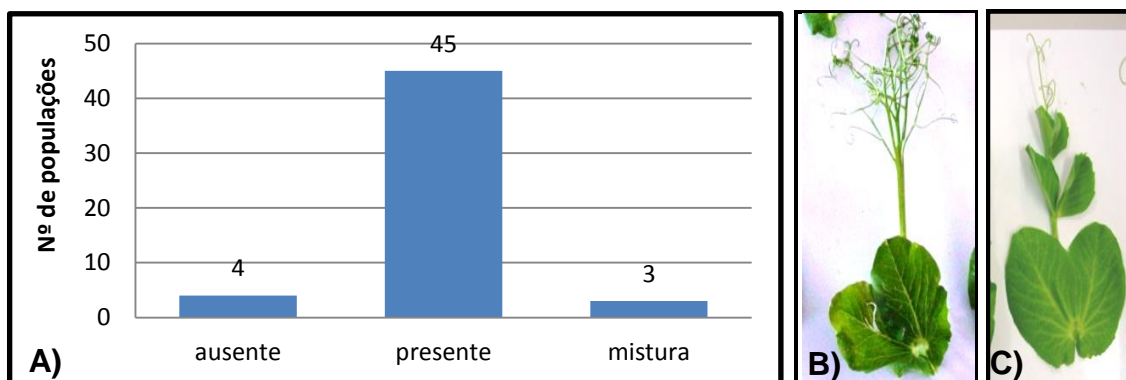


Fig. 31 – Distribuição das 52 populações de ervilha de acordo com a presença de folíolos nas folhas (A); folha semi-áfila (B); folha normal (C)

A coloração antocianica no ponto de inserção das estípulas foi observada apenas nas 30 populações que pertencem à variedade *arvensis*. As restantes 22

populações, que pertencem à variedade *sativum*, não apresentam esta característica (Fig. 32).

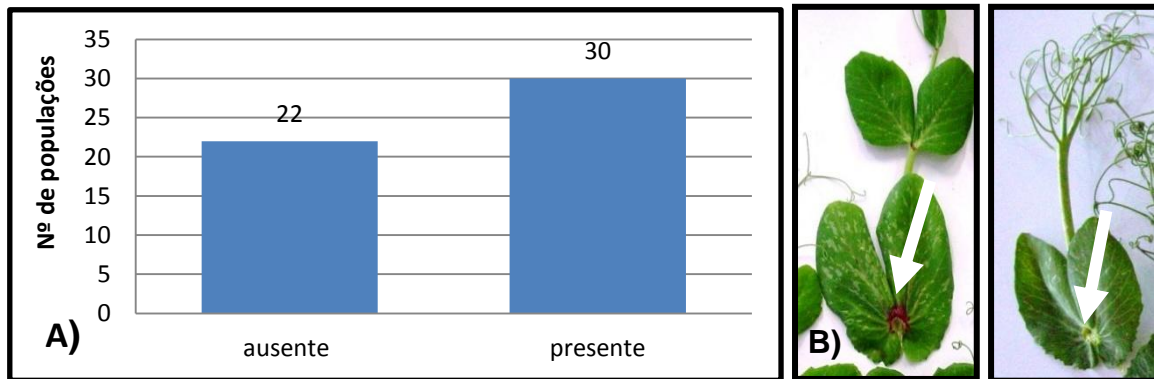


Fig. 32 – Distribuição das 52 populações de ervilha quanto à presença da coloração antociânica no ponto de inserção das estípulas (A); As setas indicam a presença ou ausência desta característica (B)

Em relação à denteção do bordo do folíolo, verifica-se que a maioria das populações apresentam o bordo do folíolo dentado e 4 apresentam liso. Ainda 10 populações apresentam simultaneamente plantas com o bordo do folíolo dentado e liso (Fig. 33).

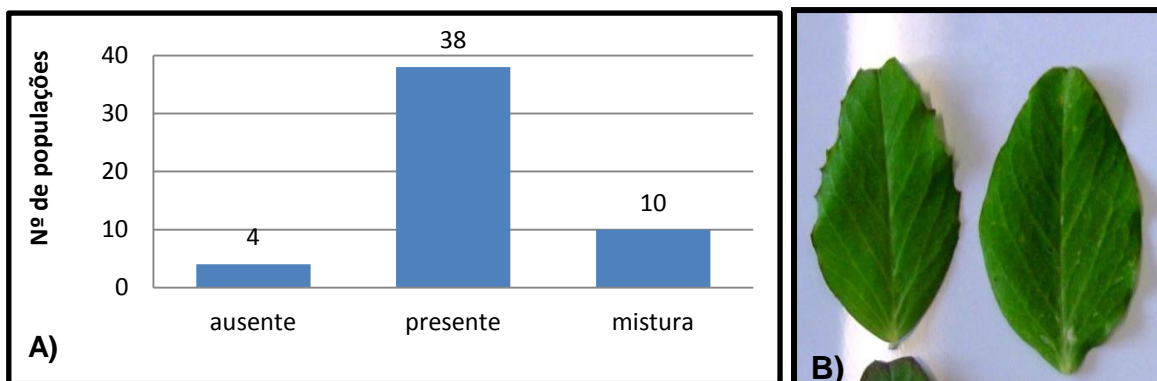


Fig. 33 – Distribuição das 52 populações de ervilha em relação à denteção do bordo do folíolo (A); Pormenor de folíolo dentado e liso (B)

#### 4.1.1.3. Flor

As 22 populações que pertencem à variedade *sativum* apresentam o estandarte e a asa de cor branca. Nas restantes 30 populações, que pertencem à variedade *arvense*, o estandarte e asa são de cor púrpura.

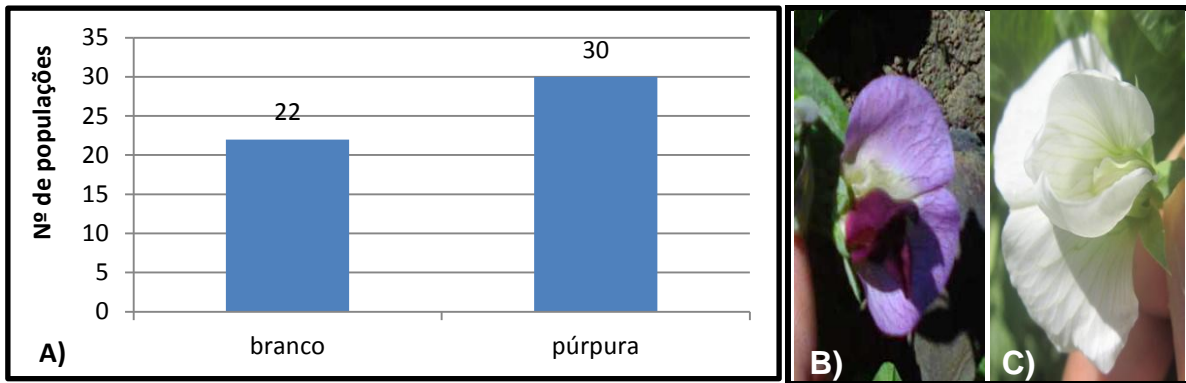


Fig. 34 – Distribuição das 52 populações de ervilha quanto à cor do estandarte e da asa (A); Flor de cor púrpura (B); Flor de cor branca (C)

Em relação à forma da base do estandarte, as populações distribuem-se por cinco grupos (Fig. 35). Das 52 populações em estudo, 15 apresentam estandarte com forma da base cuneiforme, 11 com forma da base fortemente cuneiforme e arqueada, 9 com forma da base direita e 6 com forma da base fortemente arqueada (Fig. 36).

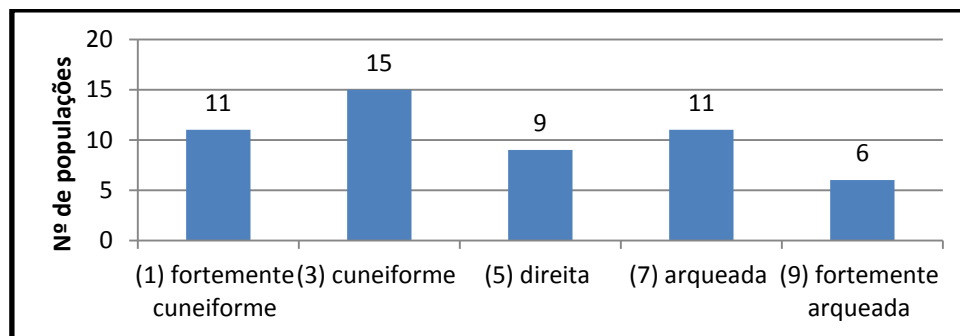


Fig. 35 – Distribuição das 52 populações de ervilha quanto à forma da base do estandarte



Fig. 36 – Formas da base do estandarte da flor observadas nas populações em estudo

#### 4.1.1.4. Vagem

Na vagem, registou-se a cor, a forma da parte distal e o tipo de curvatura. Na fase de maturação, todas as populações apresentam vagens de cor amarela e com curvatura côncava. Nesta coleção observou-se que 33 populações possuem vagens com a forma da parte distal embotoada, 15 populações têm a forma da parte distal pontiaguda e 4 populações apresentam vagens com ambos os tipos (Fig. 37).

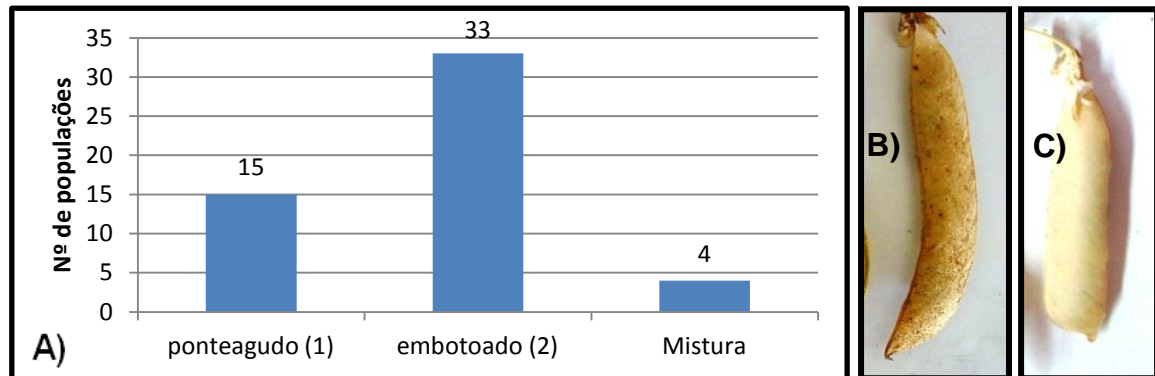


Fig. 37 – Distribuição das 52 populações de ervilha de acordo com a forma da parte distal da vagem (A); pontiaguda (B); embotoada (C)

#### 4.1.2. Características quantitativas

##### 4.1.2.1. Características gerais das populações

Nos quadros 10 e 11 podem-se observar os limites de variação e os coeficientes de variação das características avaliadas, nos ensaios realizados em 2011/12 e 2012/13, respetivamente.

As características quantitativas que apresentam maior variabilidade em ambos os anos são o número de vagens e sementes por planta, a altura da primeira vagem, comprimento do pedúnculo e densidade de manchas na estípula. O número de dias até à maturação é a característica que apresenta menor variabilidade nesta coleção. De um modo geral, os valores do coeficiente de variação são mais elevados no ensaio do ano 2012/2013.

Quadro 10 – Limites de variação observados nas 24 características avaliadas no ensaio de 2011/2012

Característica	Mínimo	Máximo	Média	CV (%)
Nº de dias até à floração	102,00	140,00	114,75	7,61
Duração da floração	11,00	58,00	29,15	36,66
Nº de dias até à maturação	159,00	182,00	173,00	3,51
Altura da Planta (cm)	21,40	108,40	61,34	37,00
Altura da 1ª vagem (cm)	9,60	95,40	42,56	46,65
Nº de folíolos	2,00	4,20	3,22	18,06
Comprimento do folíolo (cm)	2,73	4,65	3,80	12,29
Largura do folíolo (cm)	1,43	3,54	2,46	18,25
Comprimento da estípula (cm)	3,97	7,13	5,63	11,80
Largura da estípula (cm)	1,76	3,71	3,00	13,62
Densidade manchas na estípula (1-9)	1,00	6,00	2,86	40,28
Nº de flores por nó	1,00	2,10	1,52	23,73
Comprimento do pedúnculo (cm)	0,99	7,90	2,65	44,58
Largura do estandarte (cm)	2,35	3,53	2,91	9,65
Nº de óvulos por vagem	4,66	8,73	6,60	13,26
Comprimento da vagem (cm)	5,80	11,08	7,93	15,40
Largura da vagem (cm)	0,91	2,02	1,38	19,37
Nº de vagens por planta	2,30	28,14	9,79	44,76
Nº de sementes por planta	11,27	100,39	39,05	36,46
Peso de 100 sementes (g)	11,70	35,00	24,14	19,29
Produção de semente por planta (g)	2,64	15,81	9,02	29,50
Proteína (%)	18,22	28,39	22,43	8,72
Gordura (%)	0,89	2,34	1,47	23,41
Fibra (%)	5,21	7,95	6,59	9,94

No material em estudo, verificou-se que, no 1º ano do ensaio, o tempo ocorrido entre a sementeira e a entrada em floração das populações foi em média 114 dias e no 2º ano foi em média 111 dias. As populações mais precoces à entrada em floração em 2011/12 e 2012/13 necessitaram de 102 dias e 77 dias, respetivamente. As populações mais tardias necessitaram de 140 dias (2011/12) e 151 dias (2012/13) para atingirem este estado fenológico.

A duração do período de floração variou de 11 dias a 58 dias no 1º ano do ensaio e de 10 dias a 64 dias no 2º ano do ensaio. As condições ambientais (temperatura e precipitação) no 2º ano foram mais favoráveis ao desenvolvimento floral, permitindo que as populações apresentassem períodos de floração mais longos.

Quadro 11 – Limites de variação observadas nas 24 características avaliadas no ensaio de 2012/2013

Característica	Mínimo	Máximo	Média	CV (%)
Nº de dias até à floração	77,00	151,00	111,60	14,40
Duração da floração	10,00	64,00	36,40	32,13
Nº de dias até à maturação	155,00	181,00	168,73	4,04
Altura da Planta (cm)	21,40	124,40	66,06	36,33
Altura da 1ª vagem (cm)	9,60	87,60	42,31	42,98
Nº de folíolos	2,00	4,40	3,11	27,38
Comprimento do folíolo (cm)	2,95	5,90	4,26	15,77
Largura do folíolo (cm)	2,02	4,26	3,18	18,30
Comprimento da estípula (cm)	4,04	8,84	6,40	18,59
Largura da estípula (cm)	2,24	4,75	3,53	18,96
Densidade manchas na estípula (1-9)	1,60	6,40	2,86	33,87
Nº de flores por nó	1,00	3,00	1,70	29,17
Comprimento do pedúnculo (cm)	1,16	12,18	5,49	41,93
Largura do estandarte (cm)	2,99	4,98	3,96	12,76
Nº de óvulos por vagem	3,90	8,10	6,25	11,71
Comprimento da vagem (cm)	6,12	11,55	8,20	14,16
Largura da vagem (cm)	1,01	1,74	1,36	14,55
Nº de vagens por planta	1,18	23,00	8,36	50,63
Nº de sementes por planta	4,60	70,00	31,30	47,75
Peso de 100 sementes (g)	15,52	36,40	26,13	14,17
Produção de semente por planta (g)	1,30	19,47	7,91	44,62
Proteína (%)	-	-	-	-
Gordura (%)	-	-	-	-
Fibra (%)	-	-	-	-

Quanto à duração do ciclo vegetativo, observou-se que no 1º ano do ensaio, as plantas necessitaram de um maior número de dias para atingirem a maturação. Em

média, o tempo decorrido desde a sementeira até à maturação foi de 173 dias no 1º ano enquanto no 2º ano foi de 168 dias.

A altura da planta e a altura da 1ª vagem são duas características importantes para a seleção de plantas adaptadas à colheita mecânica. As plantas não devem ultrapassar 60 - 80cm de altura (Tavares-de-Sousa, 1999). Plantas mais altas têm maior tendência para acamar originando quebras de produção elevadas devido às perdas de semente que ocorrem durante a colheita. As vagens devem estar situadas no terço superior da planta de modo a possibilitarem a colheita mecânica (Duarte *et al.*, 2011).

Nesta coleção, as plantas mais baixas apresentam valores de 21,40 cm de altura e as plantas mais altas apresentavam 108,40 cm. A altura mínima e máxima da inserção da 1ª vagem foi de 9,60 cm e 95,40 cm, respetivamente.

Em relação ao calibre da semente, no primeiro ano o peso de 100 sementes está compreendido entre 11,70g e 35g e no segundo ano a variação foi entre 15,52g e 36,40g, isto é, no ensaio do 2º ano obtiveram sementes com maiores calibres.

O número de sementes por planta é uma das características que apresenta maior variabilidade. No 1º ano, a variação foi entre 11 e 100 sementes por planta e no 2º ano foi entre 4 e 70 sementes por planta.

Quanto à composição bromatológica, as populações apresentaram, em média, teores de proteína de 22,43%, teores de gordura de 1,47% e teores de fibra de 6,59%. A variação da percentagem de proteína observada nesta coleção está compreendida entre 18,2% e 28,4%, estando este intervalo de acordo com o referido por Monti e Grilo (1997).

#### **4.1.2.2. Método de aglomeração**

A Fig. 38 apresenta o resultado da análise multivariada aglomerada baseada nos valores médios das 24 características quantitativas avaliadas durante dois anos. Da

análise do dendrograma obtido, podemos concluir que as populações associam-se em função da cor da flor, ou seja, as populações tendem a agrupar-se mais de acordo com a variedade botânica a que pertencem (*arvense* ou *sativum*) do que em relação à sua origem geográfica, tal como foi observado por Amurrio *et al.* (1995).

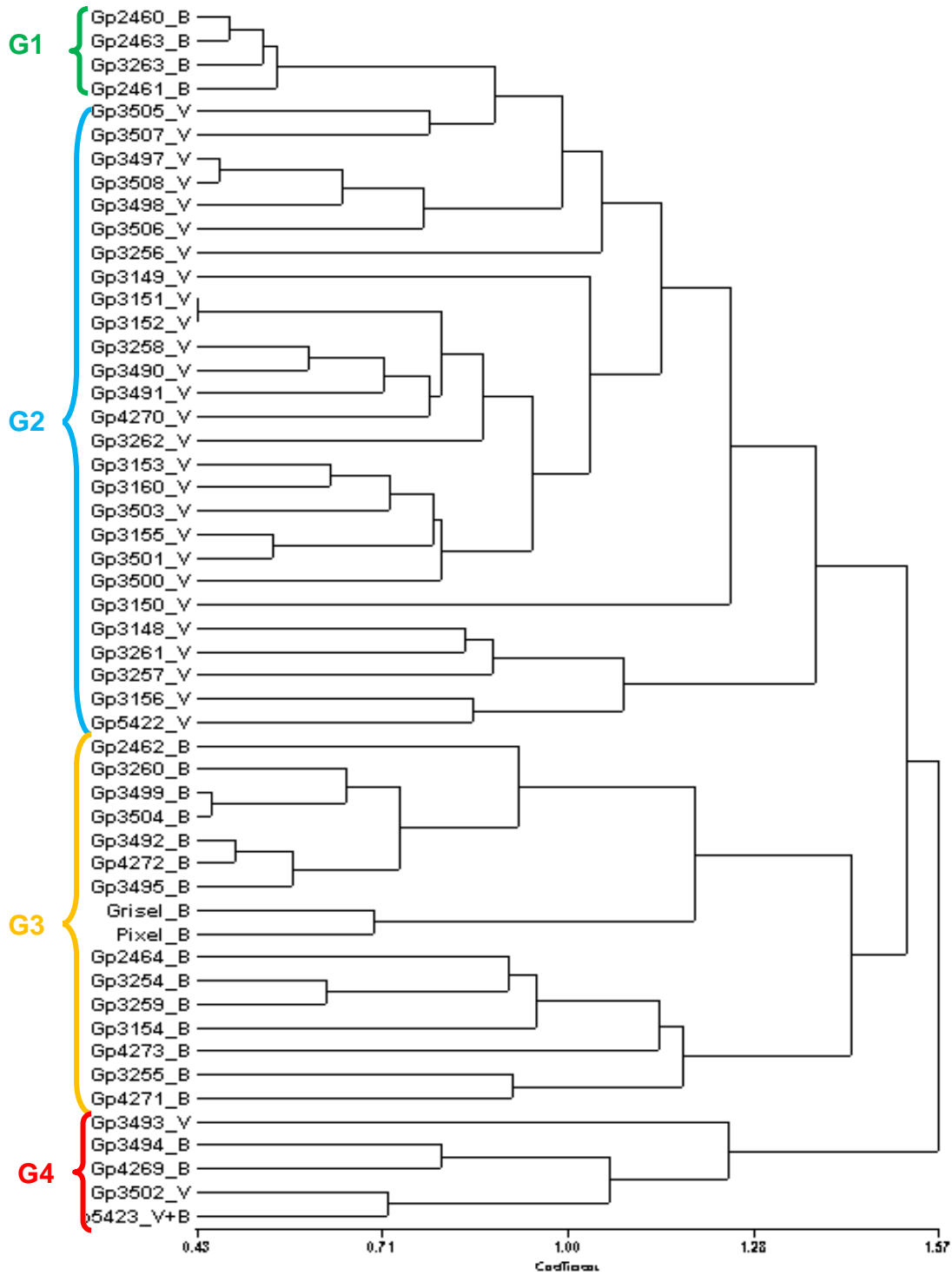


Fig. 38 – Dendrograma baseado na análise dos valores médios obtidos nos 2 anos de avaliação (B-populações de flor branca, V-populações com flor violeta)

O dendrograma obtido sugere que as populações de ervilha podem ser separadas em quatro grupos:

- O grupo G1 que é constituído por 4 populações que apresentam plantas com flor de cor branca e são originárias do Algarve. São as populações Gp2460, Gp2463, Gp3263, Gp2461 e todas pertencem à variedade *sativum*.

- O grupo G2 que engloba 27 populações, todas pertencentes à variedade *arvense*, ou seja, todas constituídas por plantas com flores de cor violeta. São as populações Gp3505\_V, Gp3507\_V, Gp3497\_V, Gp3508\_V, Gp3498\_V, Gp3506\_V, Gp3256\_V, Gp3149\_V, Gp3151\_V, Gp3152\_V, Gp3258\_V, Gp3490\_V, Gp3491\_V, Gp4270\_V, Gp3262\_V, Gp3153\_V, Gp3160\_V, Gp3503\_V, Gp3155\_V, Gp3501\_V, Gp3500\_V, Gp3150\_V, Gp3148\_V, Gp3261\_V, Gp3257\_V, Gp3156\_V e Gp5422\_V. A origem geográfica destas populações é maioritariamente da zona de Trás os Montes. Neste grupo, as populações Gp3151\_V e Gp3152\_V são as que apresentam maior semelhança entre si e provêm do mesmo local de origem, zona de Valpaços seguido das populações Gp3497\_V e Gp3508\_V ambas originárias da zona de transição entre o Minho e Trás-os-Montes.

- O grupo G3, onde se incluem as duas testemunhas Pixel e Grisel, é constituído por 16 populações que apresentam plantas com flor de cor branca e pertencem à variedade *sativum*. São as populações Gp2462\_B, Gp3260\_B, Gp3499\_B, Gp3504\_B, Gp3492\_B, Gp4272\_B, Gp3495\_B, Grisel, Pixel, 2464\_B, Gp3254\_B, Gp3259\_B, Gp3154\_B, Gp4273\_B, Gp3255\_B e Gp4271\_B. Este grupo engloba populações que são originárias da zona do litoral do país e do interior norte. As populações Gp3499\_B e Gp 3504\_B são as mais semelhantes entre si e ambas são originárias da zona de transição entre o Minho e Trás-os-Montes.

- O grupo G4 é o grupo mais heterogéneo. É constituído por 5 populações que diferem entre si na cor da flor, ou seja, este grupo engloba populações que pertencem à variedade *arvense* e à variedade *sativum*. A origem destas populações também é heterogénea sendo que Gp3493\_V, Gp3494\_B e Gp3502\_V provêm do

Minho, a população Gp4269\_B de Trás os Montes e Gp5422\_V+B é originária do Litoral Alentejano.

#### 4.1.2.3. Método de ordenação

No Quadro 12, encontra-se a percentagem de variação explicada pelas 3 primeiras componentes e a correlação entre as 24 características e estas componentes. Verifica-se que o primeiro eixo é responsável por 31,80% da variabilidade total, o segundo por 21,70% e o terceiro por 13,57%.

Quadro 12 – Correlação entre as características originais e as três primeiras componentes

Característica	1	2	3
Nº de dias até à floração	0,470	<b>0,741</b>	0,104
Duração da floração	-0,527	-0,197	0,112
Nº de dias até à maturação	0,338	<b>0,792</b>	0,228
Altura da Planta (cm)	<b>0,655</b>	0,574	0,113
Altura da 1ª vagem (cm)	0,654	<b>0,634</b>	0,061
Comprimento do folíolo (cm)	<b>0,723</b>	0,223	-0,520
Largura do folíolo (cm)	<b>0,765</b>	0,067	-0,357
Comprimento da estípula (cm)	0,629	0,083	-0,582
Largura da estípula (cm)	0,680	0,008	-0,420
Densidade manchas na estípula (1-9)	<b>0,797</b>	-0,176	0,078
Nº de flores por nó	-0,414	<b>0,623</b>	-0,276
Largura do estandarte (cm)	<b>0,696</b>	0,240	0,039
Comprimento do pedúnculo (cm)	-0,079	<b>0,714</b>	0,136
Comprimento da vagem (cm)	<b>0,801</b>	-0,207	0,315
Largura da vagem (cm)	<b>0,718</b>	-0,469	0,029
Nº de óvulos por vagem	<b>0,735</b>	0,041	0,280
Nº de vagens por planta	-0,544	<b>0,644</b>	-0,208
Nº de sementes por planta	-0,477	<b>0,706</b>	-0,147
Peso de 100 sementes (g)	0,222	-0,571	-0,459
Produção de semente por planta (g)	-0,407	0,514	-0,523
Proteína (%)	0,346	0,185	<b>0,714</b>
Gordura (%)	-0,153	0,365	<b>0,682</b>
Fibra (%)	0,021	-0,246	<b>0,557</b>
Variação (%)	31,80	21,70	13,57
Variação cumulativa (%)	31,80	53,50	67,07



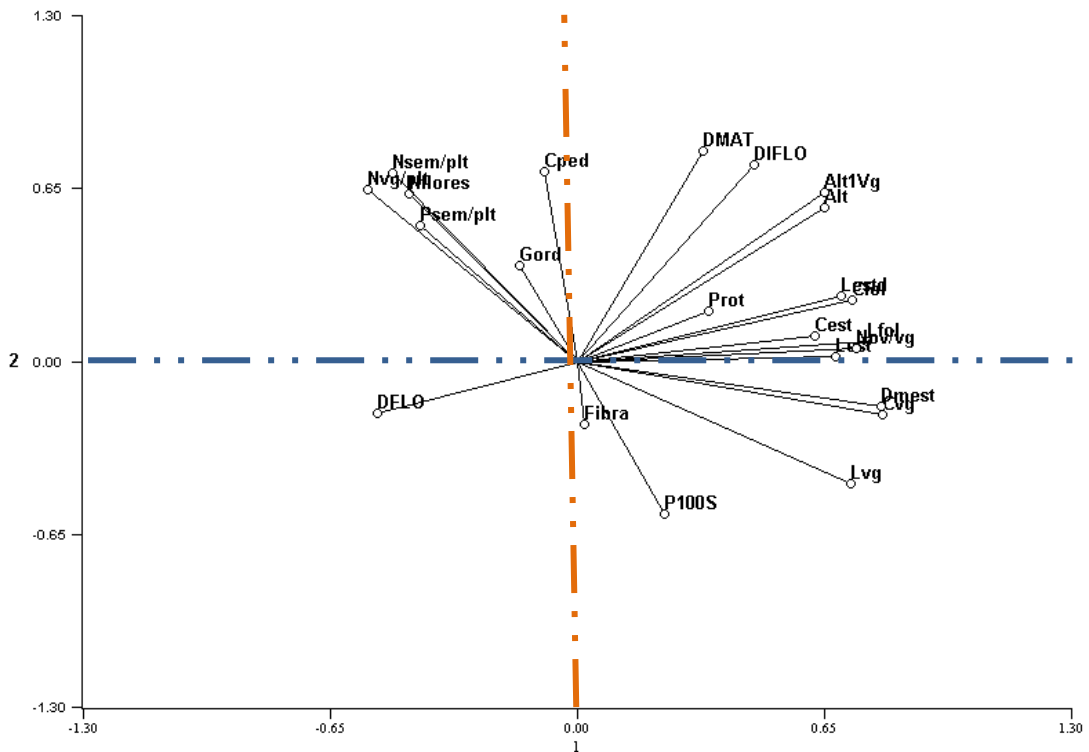


Fig. 40 – Projeção das 24 características no plano definido pelas componentes 1 e 2

Neste eixo, as populações **Gp3151\_V**; **Gp3152\_V**, **Gp4270\_V**, e **Gp3491\_V** pertencentes à variedade *arvense*, e situadas na posição mais à direita da Fig. 38 são aquelas que apresentam plantas com flores de cor violeta, folhas e vagens de maiores dimensões. São plantas de folha normal, com folíolos grandes que produzem maior quantidade de matéria verde, menor número de grãos e apresentam períodos de floração mais curtos. Estas populações poderão ser as mais adequadas para a produção de ervilha forrageira em consociação com cereais ou em cultura extreme. Segundo Cousin *et al.* (1985) a superfície foliar encontra-se correlacionada negativamente com a produção de semente, isto é, as plantas com maior desenvolvimento vegetativo tendem a produzir menor número de sementes, devido à competição pela repartição dos assimilados que se verifica entre a parte vegetativa e a parte reprodutiva das plantas. No extremo oposto, situam-se populações de flor branca, como sejam **Gp4272\_B** e **Gp2462\_B**, originárias do litoral do país e **Gp3495\_B** e **Gp3499\_B**, de Terras de Bouro. Estas populações apresentam flores, folhas e vagens de menor dimensão assim como períodos de floração mais longos. Nas populações **Gp3499\_B** e **Gp3260\_B** todas as plantas apresentam folhas semi-áfila. Este tipo de folha permite que as plantas se apoiem

umas às outras através das gavinhas e mantenham a posição vertical até ao fim do ciclo vegetativo. Segundo Cousin (1997), as variedades semi-áfílas são mais resistentes à acama, permitem a realização de colheita mecânica e proporcionam acréscimos de rendimento em relação a génotipos de folha normal.

As características que mais contribuem na componente 2 são: o número de dias até à maturação (DMAT), o número de dias até à floração (DIFLO), o comprimento do pedúnculo (Cped), o número de flores por nó (Nflores), o número de sementes por planta (Nsem/plt), o número de vagens por planta (Nvg/plt) e a altura de inserção da 1ª vagem (Alt1Vg) (Quadro 12). Esta componente separa as populações em função da duração do ciclo vegetativo das plantas e da capacidade produtiva das plantas, estando estas características correlacionadas positivamente entre si (Quadro 12). As populações que necessitam de um maior número de dias para atingir a floração também necessitam de um maior número de dias para atingir a maturação, tal como foi observado por Amurrio *et al.*, (1993).

No eixo 2, as populações que se situam no quadrante superior direito da Fig. 39, como sejam **Gp5422\_V** originária de Portalegre, **Gp3257\_V** de Piodão, **Gp3497\_V** de Terras de Bouro e **Gp3261\_V** e **Gp3150\_V** originárias de Trás os Montes necessitam, de um modo geral, de maior número de dias para iniciarem a floração (DIFLO) e para atingirem a maturação (DMAT). São por isso os génotipos mais tardios. Neste quadrante, encontram-se também as populações que possuem altura total superior a 70 cm e a primeira vagem no último terço superior da planta.

No quadrante inferior esquerdo da Fig. 39, encontram-se populações com altura de inserção da 1ª vagem próxima do solo, abaixo de 15 cm de altura, como sejam os génotipos **Gp2464\_B** originária de Aljezur, **Gp3154\_B** de Vila Pouca de Aguiar, **Gp3254\_B** de Coimbra e **Gp3259\_B** de Piódão. São também estas as populações que necessitam de um menor número de dias para atingir o início da floração e da maturação. São os génotipos mais precoces e com menor capacidade de produção. Estas populações poderão ser interessantes apenas para integrar esquemas de cruzamentos artificiais que têm como principal objetivo a redução da altura total apresentada por plantas que, embora com boa capacidade produtiva, têm tendência

para acamar devido a possuírem entre-nós longos (Pereira, 2006). Estas populações também podem ser progenitores interessantes para transferir a característica de precocidade para obtenção de variedades semi-precoces.

As populações que se situam no quadrante superior esquerdo da Fig. 39 apresentam maior número de flores por nó, maior número de vagens e sementes por planta. Neste grupo estão as populações **Gp3260\_B** originária de Coimbra, **Gp3494\_B e Gp3493\_V** ambas de Terras de Bouro, **Gp4269\_B** de Murça e as duas variedades testemunhas **Pixel e Grisel**. São também estas as populações que apresentam menor peso de 100 sementes, maior capacidade de produção, menor desenvolvimento vegetativo e as folhas são constituídas por folíolos mais pequenos podendo mesmo estes não existirem (plantas semi-áfilas). Estas populações, com características semelhantes às testemunhas **Pixel e Grisel**, poderão ser interessantes para serem incluídas nas linhas avançadas do programa de melhoramento de ervilha cujo objetivo é a seleção de variedades com produções unitárias elevadas para alimentação animal. Segundo Tavares-de-Sousa (1999), sempre que a produção de grãos de leguminosas se destina à alimentação animal é conveniente a escolha de variedades com alta produtividade e semente pequena. Assim o custo de aquisição da semente para instalação da cultura é menor.

No quadrante inferior direito da Fig. 39, situam-se as populações que apresentam maior peso de 100 sementes, isto é, sementes de maior calibre, menor número de flores por nó, conseqüentemente menor número de vagens e sementes por planta. Tal como foi verificado por Javaid *et al.* (2002), existe uma correlação negativa entre o peso de 100 sementes e os componentes de produção. Neste grupo estão incluídas as populações **Gp3256\_V** originária de Piódão, **Gp3155\_V** de Mirandela, **Gp2461\_B e Gp2460\_B** ambas do Algarve. Estas populações poderão ser interessantes para integrarem um programa de melhoramento de ervilha hortícola uma vez que, neste caso, o calibre da semente é um critério importante na seleção de variedades para atender às exigências do consumidor.

As Fig. 41 e 42 representam as projeções das 52 populações e das 24 características estudadas nos planos definidos pelas componentes 1-3. As

características que mais contribuem para a definição da componente 3 são o teor de proteína, de gordura e de fibra (Quadro 12). Esta componente separa as populações em função da composição bromatológica da semente que é um dado importante a considerar quando o grão se destina à alimentação animal.

Na nossa coleção, as populações que se situam na parte superior do eixo da Fig. 41 apresentam os valores mais elevados de proteína bruta, superiores a 23% e semente de calibre pequeno. Neste grupo estão incluídas as populações **Gp3261\_V**, **Gp 3148\_V** e **Gp3156\_V**, originárias de Trás os Montes e **Gp3257\_B** da Beira Litoral, cujos teores de proteína são superiores a 25%. Estas populações poderão ser interessantes para integrarem programas de melhoramento que visam a obtenção de variedades com teores elevados de proteína na semente adequadas para alimentação animal. Os níveis mais baixos de proteína, abaixo de 21%, foram encontrados nas populações **Gp3495\_B** e **Gp3499\_B** originárias do Minho, **Gp3260\_B** da Beira Litoral e também nas variedades testemunha **Pixel** e **Grisel**. Embora estas variedades apresentem teores mais baixos de proteína têm produções unitárias mais elevadas relativamente às outras populações em estudo. Deste modo, as variedades comerciais **Pixel** e **Grisel** permitem obter maior quantidade de proteína por área.

Cousin (1983) não encontrou correlação entre a quantidade de proteína e a quantidade de semente produzida por planta. No nosso estudo, como se pode observar na Fig. 42, o teor de proteína está correlacionado negativamente com a produção de semente, tal como referem vários autores (Al-Karaki e Ereifej, 1997; Burstin *et al.*, 2011).

As populações que apresentam maiores teores de fibra e gordura também se situam na parte superior do eixo da Fig. 41. Neste grupo estão incluídas as populações **Gp3154\_B** de Vila Pouca de Aguiar, **Gp3254\_B** de Coimbra, **Gp3258\_V** de Piódão, **Gp3493\_V** de Terras de Bouro e **Gp4271\_B** de Santiago do Cacém com teores de fibra superiores a 7%.

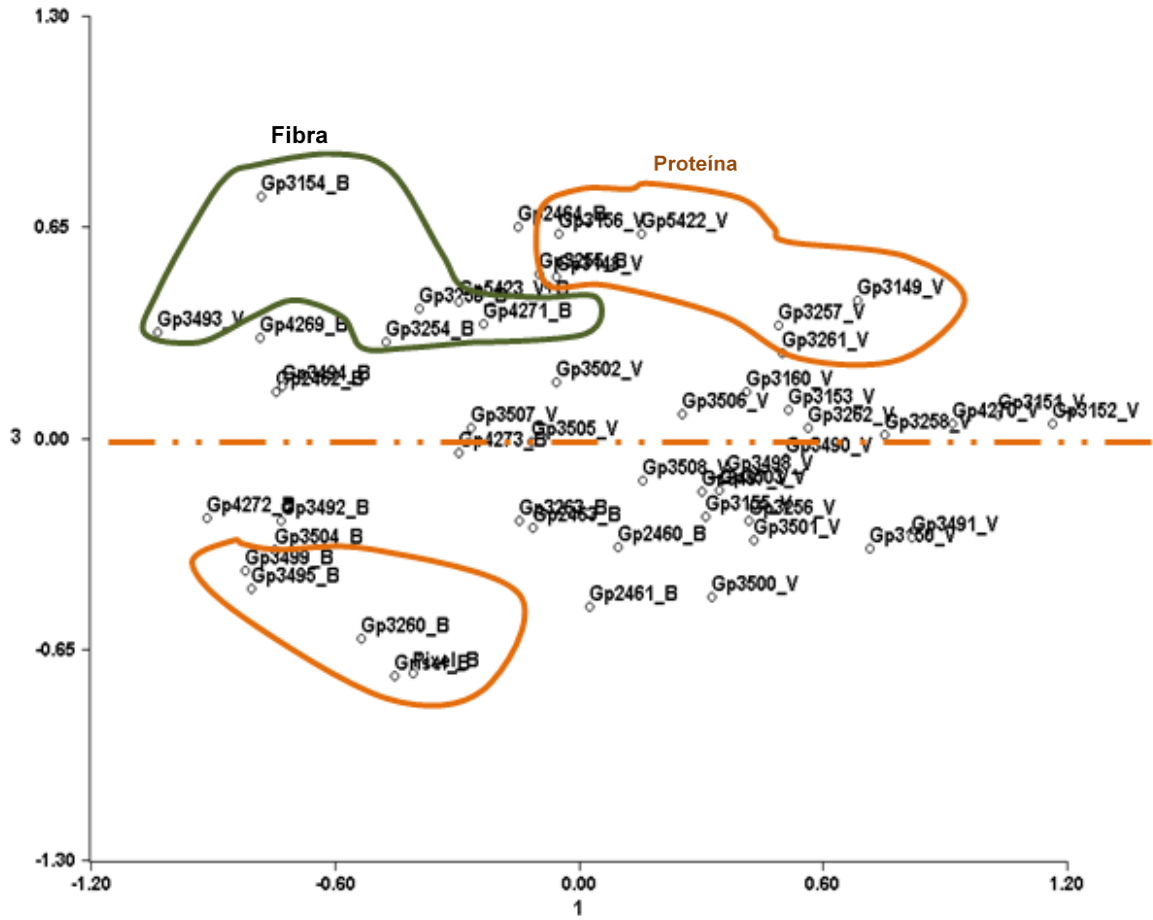


Fig. 41 – Projeção das 52 populações no plano definido pelas componentes 1 e 3

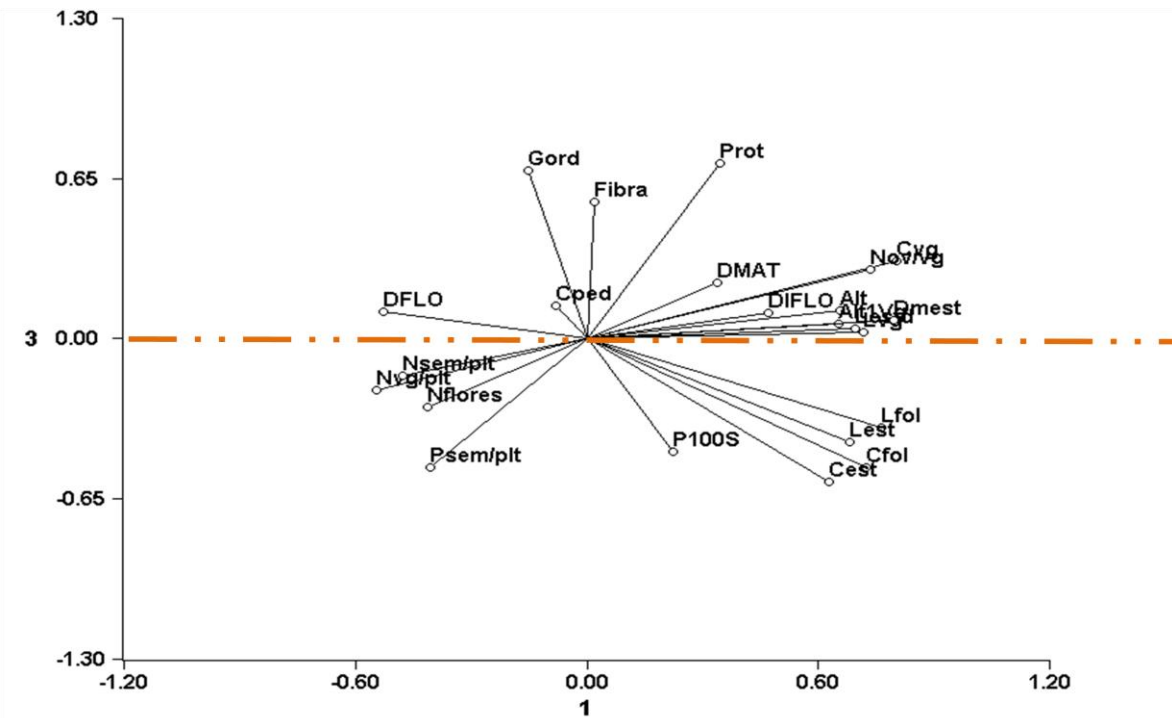


Fig. 42 – Projeção das 24 caraterísticas no plano definido pelas componentes 1 e 3

## 4.2. Caracterização molecular

Os marcadores moleculares em combinação com os marcadores morfológicos complementam a caracterização das coleções de germoplasma. Na ervilha, a técnica RAPD tem sido utilizada com bons resultados em estudos de diversidade genética (Simioniuc *et al.*, 2003; Baranger *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2006).

Neste estudo preliminar, foram testados apenas cinco “primers” nas populações que constituem a coleção em estudo. Duas populações, Gp5422 e Gp5423\_V+B, não foram avaliadas devido a problemas de extração de ADN e por isso foram eliminados da análise de dados. Os “primers” analisados originaram 32 produtos de amplificação com tamanhos compreendidos entre 500 e 3000 pares de bases (Fig. 43). O número total de bandas obtido por “primer” variou entre 2 e 10 (Quadro 13). Em média, cada “primer” originou 6,4 fragmentos. Do total de fragmentos obtidos, apenas sete revelaram ser polimórficos. O “primer” OPN05 foi aquele que deu origem a uma maior percentagem de fragmentos polimórficos. Apenas o “primer” OPN03 não originou fragmentos polimórficos.

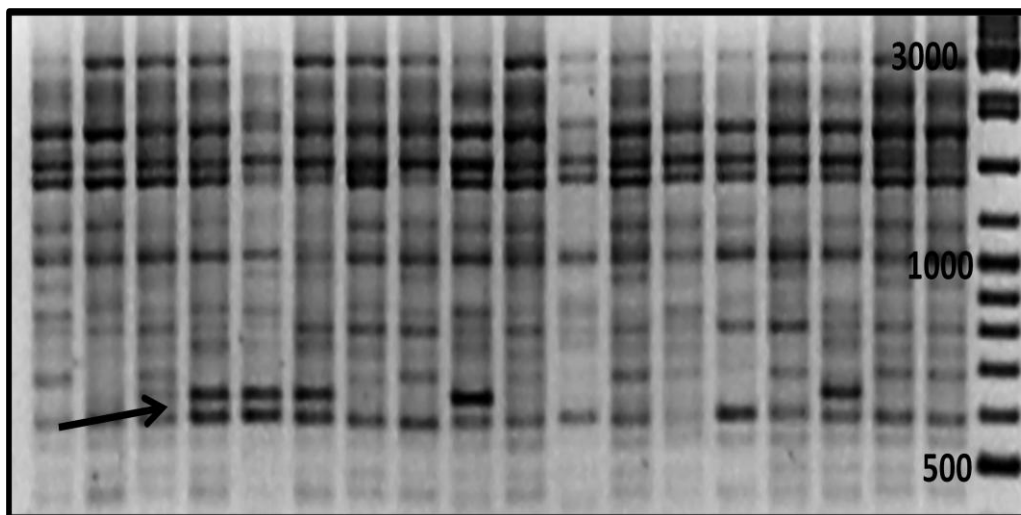


Fig. 43 – Padrão de amplificação gerado pelo “primer” OPN04. A seta indica um marcador polimórfico observado

Quadro 13 – Número total de fragmentos e número de fragmentos polimórficos obtidos por cada "primer"

"Primer"	Sequência (5'→3')	Nº total de fragmentos	Nº de fragmentos polimórficos	% de fragmentos polimórficos
OPA 13	CAGCACCCAC	8	1	12,5
OPN02	ACCAGGGGCA	5	1	20,0
OPN03	GGTACTCCCC	2	0	0,0
OPN04	GACCGACCCA	10	1	10,0
OPN05	ACTGAACGCC	7	4	57,1

O dendrograma obtido a partir da análise dos dados moleculares pode ser observado na Fig. 44. Verifica-se uma elevada similaridade genética entre as populações devido provavelmente ao número reduzido de marcadores analisados. Com efeito, os marcadores utilizados não foram suficientes para permitir a diferenciação de todas as populações em estudo.

No dendrograma, observa-se que as populações podem ser divididas em 4 grupos. O grupo A engloba 15 populações que apresentam plantas com flor branca assim como plantas com flor violeta. O grupo B é constituído por 10 populações que na maioria apresentam flores de cor violeta. Neste grupo encontram-se as duas variedades comerciais, Grisel e Pixel, de flor branca. No grupo C, com exceção da população Gp4271\_B, todas as outras possuem flores de cor violeta. O grupo D engloba 12 populações que têm como característica comum, com exceção da população Gp3148\_V, a cor da flor branca.

Na caracterização molecular continuou-se a verificar que as populações não se agrupam em relação à sua origem geográfica confirmando os resultados da caracterização morfológica. Tal como foi verificado por Costa *et al.*, (2007), as populações agrupam-se em relação à sua origem botânica, isto é, em relação à variedade *arvense* ou *sativum*.

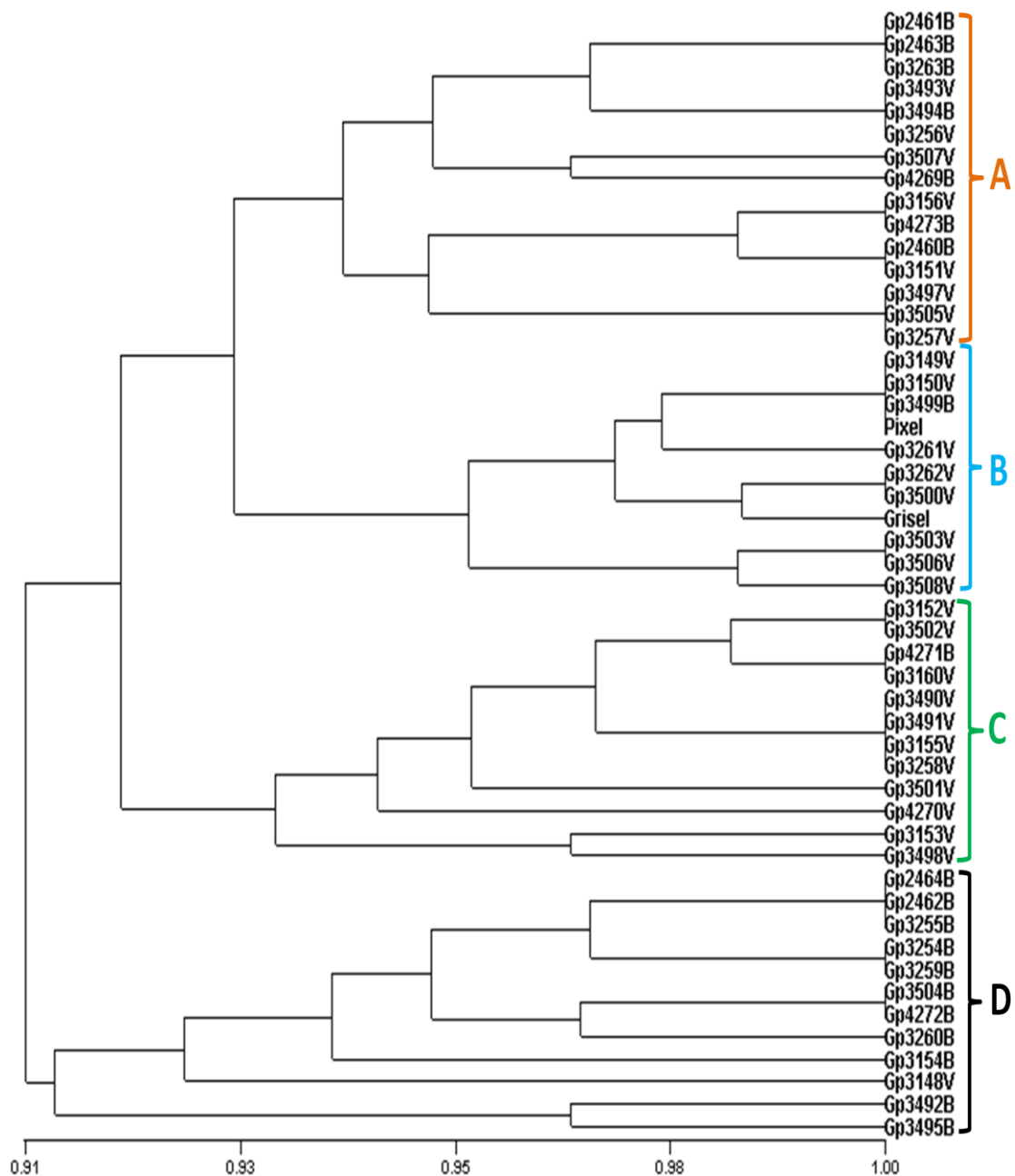


Fig. 44 – Dendrograma obtido com base na matriz de similaridade genética calculada a partir dos marcadores RAPDs (B – populações da variedade *sativum*, V – populações da variedade *arvense*)

Foi observado também que as populações que se manifestaram muito semelhantes na caracterização morfológica são diferentes a nível molecular. Por exemplo, as populações Gp3151\_V e Gp3152\_V, que no dendrograma baseado nas características morfológicas se localizavam muito próximas no grupo G2 e

apresentavam um grau elevado de similaridade, nesta análise situam-se em grupos distintos (A e D) assim como as populações Gp3499\_B e 3504\_B que na Fig. 38 estão localizadas muito próximas no grupo G3, na Fig. 44 situam-se também em grupos distintos (B e D).

Estes resultados revelam que a caracterização molecular é uma ferramenta importante para diferenciar indivíduos que morfologicamente são idênticos ou muito semelhantes entre si.



## 5. Conclusões

O estudo de caracterização morfológica da coleção de ervilha existente no INIAV-Elvas revelou que a maioria das populações portuguesas pertence à variedade *arvense*.

Na caracterização morfológica e molecular, as populações de ervilha agruparam-se em função da variedade botânica a que pertencem e não em função da origem geográfica. Assim não foi possível definir um conjunto de características próprias para cada região, mas confirma-se a distinção efetuada pelos Botânicos.

Os marcadores morfológicos selecionados foram apropriados para a avaliação da diversidade fenotípica da coleção em estudo dado que permitiram discriminar todas as populações. A maioria das características avaliadas apresenta elevada variabilidade podendo esta ser explorada nos trabalhos de melhoramento.

As projeções das populações e das características morfológicas nas 3 primeiras componentes permitiram definir os grupos onde se encontram as populações com características mais interessantes e que poderão ser selecionadas para serem incluídas nos programas de melhoramento. Assim, de acordo com o objetivo final do programa foram identificadas populações com características adequadas para a alimentação humana e outras para alimentação animal. Também foram identificadas populações para serem integradas nos esquemas de cruzamentos artificiais do programa de melhoramento de ervilha a decorrer no INIAV.

Destacamos as populações Gp2460\_B, Gp2461\_B, Gp3155\_V e Gp3256\_V, que apresentam sementes de calibre elevado e poderão integrar um programa de melhoramento cujo objetivo é a produção de grãos destinados à alimentação humana (variedades com características hortícolas). As populações Gp3493\_V e Gp4269\_B, que possuem sementes de menor calibre e boa capacidade de produção são interessantes para integrarem um programa de melhoramento, cujo objetivo é a

produção de grãos para alimentação animal. As populações Gp3261\_V e Gp3150\_V, constituídas por plantas com baixa capacidade produtiva mas cujas sementes apresentam teores elevados de proteína e as populações Gp3154\_B e Gp2464\_B, de ciclo curto e de baixa estatura são progenitores interessantes para integrarem esquemas de cruzamentos artificiais que têm como objetivo reduzir a altura das plantas, aumentar o teor de proteína e a precocidade.

Os marcadores moleculares são úteis nos estudos de diversidade genética de coleções. No entanto, neste trabalho preliminar não foi possível discriminar todas as populações devido ao número reduzido de marcadores RAPD analisados. Este estudo ainda se encontra a decorrer no INIAV-Elvas no âmbito projeto PA 18646.

As populações que apresentaram maior capacidade produtiva vão ser integradas em ensaios comparativos de adaptação para apreciação da produtividade, regularidade de produção e estabilidade fenotípica (altura, porte, calibre da semente). No final desta etapa, será eleita uma ou duas populações mais promissoras para candidatura ao Catálogo Nacional de Variedades.

Este estudo, além de contribuir para a conservação da espécie, contribuirá também para a valorização da diversidade genética em programas de melhoramento, permitindo melhor organização e exploração da variabilidade genética disponível nas populações nacionais, colocando-as ao serviço dos agricultores e dos consumidores.

## 6. Referências Bibliográficas

- Al-Karaki, G. N., & Ereifej, K. I. (1997). Chemical Composition of Pea Seeds as Related to Seed Yield under Arid and Semiarid Mediterranean Environments. *J Agronomy & Crop Science*, 178, pp. 97–102.
- Amurrio, J. M., De Ron, A. M., & Escribano, M. R. (1993). Evaluation of *Pisum sativum* landraces from the Northwest of the Iberian Peninsula and their breeding value. *Euphytica*, 66, pp. 1–10.
- Amurrio, J. M., De Ron, A. M., & Zeven, A. C. (1995). Numerical taxonomy of Iberian pea landraces based on quantitative and qualitative characters. *Euphytica*, 82, pp. 195-205.
- Baranger, A., Aubert, G., Arnau, G., Lainé, A., Deniot, G., Potier, J., et al. (2004). Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein and PCR-based markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 108, pp. 1309-1321.
- Barata, A. M., Rocha, F., Reis, A., & Lopes, V. R. (2011). O Banco Português de Germoplasma Vegetal e a conservação dos recursos genéticos em Portugal. In INRB (Ed.), *Agrorrural Contributos Científicos* (pp. 964-974). INCM.
- Barik, D. P., Acharyab, L., Mukherjee, A. K., & Chand, P. K. (2007). Analysis of Genetic Diversity among Selected Grasspea (*Lathyrus sativus* L.) Genotypes Using RAPD Markers. *Genetic Diversity in Grasspea Genotypes*, 62C, pp. 869-874.
- Barroso, M. R., Magalhães, M. J., Carnide, V., Martins, S., Vegas, C. A., & Cachón, M. R. (2007). *Caracterização e Avaliação de Diferentes Espécies de Leguminosas Grão na Região de Trás-os-Montes*.
- Boyeldieu, J. (1991). *Produire des grains oléagineux et protéagineux*. Paris: Lavoisier Tec&Doc.
- Bressani, R., & Elías, L. G. (1988). Seed quality and nutritional goals in pea, lentil, faba, bean and chickpea breeding. In R. J. Summerfield (Ed.), *World crops: cool season food legumes* (pp. 381-404). Publisher Kluwer Academic.

- Burstin, J., Gallardo, K., Mir, R. R., Varshney, R. K., & Duc, G. (2011). Improving protein content and nutrition quality. In A. Pratap, & J. Kumar (Edits.), *Biology and Breeding of Food Legumes* (pp. 314-328). Wallingford, UK: CAB International.
- Carrera, A., Tranquilli, G., & Helguera, M. (2004). Aplicaciones de los marcadores moleculares. In V. E. Rubinstein (Ed.), *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal* (pp. 149-160). Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología.
- Cheghamirza, K., Koveza, O., Konovalov, F., & Gostimsky, S. (2002). Identification of RAPD markers and their use for molecular mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7, pp. 649-655.
- Costa, R. (2008). *Evaluación de la diversidad genética de una colección de Dactylis glomerata L. con perspectivas a la mejora*. Tese de Doutoramento, Dpto. de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra; Univ. Extremadura, Badajoz.
- Costa, R., Pereira, G., Vicente, C., & Tavares-de-Sousa, M. (2007). Characterization of a Portuguese collection of *Pisum sativum* L.: II. RAPD and ISSR markers. *6th European Conference grain legumes*, (p. 129). Lisboa.
- Cousin, R. (1974). Le pois. Etude génétique des caractères, classification, caractéristiques variétales portant sur les variétés inscrites au catalogue officiel français. In M. Pitrat, & C. Foury, *Histoires de légumes des origines au XXI e siècle* (p. 111). Paris: INRA.
- Cousin, R. (1983). Breeding for yield and for protein content in pea. In R. Thompson, & R. Casey (Edits.), *Perspectives for peas and lupin as protein crops* (pp. 146-164). Martinus Nijhoff Publishers. The Hague.
- Cousin, R. (1992). Le Pois, amélioration des espèces végétales cultivées. (INRA, Ed.) pp. 173-189.
- Cousin, R. (1996). Le pois, variabilité, objectifs de sélection. *Sauf qui peut*, 8, pp. 13-17.
- Cousin, R. (1997). Peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research*, 53, pp. 111-130.
- Cousin, R., Messenger, A., & Vingere, A. (1985). Breeding for yield in combining peas. In H. Dawkins (Ed.), *Pea Crop. A basis for improvement* (pp. 115-129). London.

- de Candolle, A. (1883). *L'origine des plantas cultivées*. Paris, França.
- Dixon, R. A., & Summer, L. W. (2003). Legume natural products: understanding and manipulating pathways for human and animal health. *Plant Physiology* , pp. 131:878-885.
- Dordio, A. (1990). O comportamento de algumas cultivares de ervilha proteaginosas em várias regiões do País. *XI Reunião de primavera da SPPF, Pastagens e Forragens 11(2)*, pp. 131-16. Bragança.
- Duarte, I., Pereira, G., Carita, T., & Tavares-de-Sousa, M. (2011). Melhoramento de leguminosas para grão em Portugal. *Agrorrural Contributos científicos* , pp. 1025-1034.
- Duke, J. (1981). *Hand book of legumes of world economic importance*. Plenum Press.
- FAO. (2013). *www.fao.org*. Obtido em 3 de dezembro de 2013 de <http://www.fao.org/>
- Farias, R. M. (1999). Banco Português de Germoplasma Vegetal - Testemunho Vivo da Biodeversidade em Portugal. *I Conferência Técnica sobre Recursos Genéticos Vegetais*, (pp. 23-29). Braga.
- Ferrão, J. E., Caixinhas, M. L., & Liberato, M. C. (2008). A ecologia, as plantas e a interculturalidade. In M. F. Lages, A. T. Matos, & ACIME (Ed.), *Portugal: Percursos de Interculturalidade* (Vols. I - Raízes e Estruturas, pp. 232-223). Lisboa.
- Franco, J. A. (1971). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Lisboa.
- Gomez, A. (1983). Los granos de leguminosas como componentes proteicos para la alimentacion animal. In J. I. Cubero, & M. Moreno (Edits.), *Leguminosas de grano* (pp. 249-262). Ediciones Mundi-Prensa.
- Gritton, E. T. (1986). Pea breeding. In M. Bassett (Ed.), *Breeding Vegetable Crops* (pp. 283-319).
- Guerreiro, J. (2014). A dieta mediterrânica, um desafio de qualidade. *A Dieta Mediterrânica em Portugal: Cultura, Alimentação e Saúde*, (pp. 19-22). Faro.
- Haider, A. S., Fouad, W. M., Soliman, M. A., & Badaw, M. A. (2013). Variability of morphological characters, protein patterns and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in some *Pisum* genotypes. *African Journal of Agricultural Research* , 8(17), pp. 1608-1616.

- Hancock, J. (2004). Plant evolution and the origin of crop species. *CABI Publishing* , p. 313.
- Hartmann, H., Kofranek, A. M., Rubatzky, V., & Flocker, W. (1988). *Plant science: Growth, development and utilization of cultivated plants* (2n ed.). Prentice Hall Career and Technology, Englewood Cliffs, NJ.
- Hausling, M. (2011). *Relatório sobre o déficit de proteínas na UE: que solução para um problema antigo?* Obtido em 10 de Outubro de 2013, de <http://www.europarl.europa.eu/>
- Hoey, B. K., Crowe, K. R., Jones, V. M., & Polans, N. (1996). A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* , pp. 92-100.
- INE. (2013). [www.ine.pt](http://www.ine.pt). Obtido em 3 de Dezembro de 2013, de [http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_base\\_dados](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_base_dados).
- IPGRI. (1994). *Normas para Bancos de Genes Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos*. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Jaramillo, S., & Baena, M. (2000). *Material de apoyo a la capacitación en conservación ex situ de recursos fitogenéticos*. Cali, Colombia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos.
- Javaid, A., Ghafoor, A., & Anwar, R. (2002). Evaluation of local and exotic Pea (*Pisum sativum* L.) germplasm for vegetable and dry grain traits. *4*, pp. 419-427.
- Jeuffroy, M., Duthion, C., Meynard, J., & Pigeaire, A. (1990). Effect of a short period of high day temperatures during flowering on the seed number per pod of pea (*Pisum sativum* L.). *Agronomie* , *2*, pp. 139-145.
- Knott, C. M. (1987). A key stages of development of the pea (*Pisum sativum* L.). In *Annals of applied biology* (Vol. 111, pp. 233-244).
- Koveza, O., Kokaevaz, G., Konovalov, F. A., & Gostimsky, S. A. (2005). Identification and Mapping of Polymorphic RAPD Markers of Pea (*Pisum sativum* L.) Genome. *Russian Journal of Genetics* , *41*, pp. 262–268.
- Ladizinsky, G., & Adler, A. (1976). The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. *Euphytica* , pp. 25: 211-217.

- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., & Lock, J. (2005). *Legumes of the World*. Kew: Royal Botanic Garden.
- Mahmood, Z., Athar, Z., Khan, M., Ali, M., Saima, S., & Dasti, A. (2011). Analysis of genetic diversity in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology* , 10 (2), pp. 140-145.
- Milach, S. (1998). Marcadores de DNA. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* , 5, pp. 14-17.
- Monti, L. M., & Grillo, S. (1983). Legume seed improvement for protein content and quality. *Plant Foods for Human Nutrition* , 32, 253-266.
- Morais, F. C. (2010). *Genética Molecular Comparativa e Tecnológica*. Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Muehlbauer, F. J. (1992). Use of introduced germplasm in cool-season food legume cultivar development. In Shands, & Weisner (Edits.), *Use of plant introductions in cultivar development Part 2* (pp. 49-73). CSSA Special Publications nº20 USA.
- Newman, C. W., Newman, R. K., & Lockerman, R. H. (1988). Utilization of food legumes in human nutrition. In R. Summerfield (Ed.), *World Crops: Cool Season Food Legumes* (pp. 405-411). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ney, B. (1994). Modélisation de la croissance aérienne d'un peuplement de pois. In B. Ney, E. Duchêne, B. Carrouée, & F. Angevin, *Agrophysiologie du Pois Protéagineux. Applications à la Production Agricole* (pp. 39-48). UNIP, INRA, ITCF, Paris.
- Nisar, M., & Ghafoor, A. (2011). Linkage of a RAPD Marker with Powdery Mildew Resistance er 1 gene in *Pisum sativum* L. *Russian Journal of Genetics* , 47, pp. 300–304.
- NP1996. (2000). Cereais e leguminosas. *Determinação do teor de azoto e cálculo do teor de proteína bruta. Método de Kjeldhal* . , 6pp. Lisboa: IPQ.
- NP2029. (1994). Alimentos para animais. *Determinação do teor da celulose bruta* , 3pp. Lisboa: IPQ.
- NP875. (1994). Alimentos para animais. *Determinação do teor de Humidade* , 5. Lisboa : IPQ.

- NP876. (2000). Alimentos para animais. *Determinação do teor de matéria gorda* , 4. Lisboa: IPQ.
- Pereira, G. (2006). *Identificação de marcadores moleculares ligados a um gene mutado de resistência ao oídio (Erysiphe pisi Syd.) em ervilha (Pisum sativum L.)*. Tese de doutoramento, Universidade do Algarve, Faro.
- Pereira, G., Marques, C., Ribeiro, R., Formiga, S., Dâmaso, M., Tavares-de-Sousa, M., et al. (2010). Identification of DNA markers linked to an induced mutated gene conferring resistance to powdery mildew in pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* , 171, pp. 327–335.
- Pereira, G., Mihov, M., Atanassova, D., Costa, R., Stoilova, T., & Tavares-de-Sousa, M. M. (2006). Study of plant variability in a pea collection. *Melhoramento* , 40, pp. 38-46.
- Pita-Villamil, J. M., & Martinez-Laborde, J. B. (2001). Banco de semillas. In F. Gonzalez-Andrés, & J. M. Pita Villamil (Edits.), *Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos*. Valladolid, Espanha: INEA.
- Plucknett, D. L., Smith, N. J., Williams, J. T., & Anishetty, N. M. (1987). *Genebanks and the World's Food*. Princeton: Princeton University Press.
- Reis, C., & Rodrigues, P. (2010). Estudo do comportamento agronómico de cultivares de ervilha proteagínosa (*Pisum sativum* L.) na região de Castelo Branco. *Agroforum nº 25* , pp. 5-11.
- Reis, M., & Gonçalves, M. (1987). Caracterização climática da Região Agrícola do Alentejo. In *O Clima de Portugal* (p. 226). Instituto de Meteorologia, Lisboa.
- Rohlf, F. (1997). *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. New York: Exeter Publishing, LTD.
- Sachs, M. M. (2009). Cereal germplasm resources. *Plant Physiology* , 149, pp. 148-151.
- Salgueiro, T. A. (1986). Requisitos de solos e de clima de proteagínosas e medidas de fomento da CEE. In SPPF, *Pastagens e Forragens* (Vol. 8 (1), pp. 9-17).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1987). *Molecular Cloning: laboratory manuals* (2 ed.).

- Samec, P., & Nasinec, V. (1996). The use of RAPD technique for the identification and classification of *Pisum sativum* L. genotypes. *Euphytica* , 89, pp. 229-234.
- Simioniuc, D., Uptmoor, R., Friedt, W., & Ordon, F. (2003). Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breeding* 121 , pp. 429–435.
- Smýkal, P., Aubert, G., Burstin, J., Coyne, C. J., Ellis, N., Flavell, A., et al. (2012). Pea (*Pisum sativum* L.) in the genomic era. *Agronomy* 2 , pp. 74–115.
- Sprague, G. F. (1980). Germoplasm resources of plants: their preservation and use. *Rev. Phytopathol* , 18:147-165.
- Tar'an, B., Zhang, C., Warkentin, T., Tullu, A., & Vandenberg, A. (2005). Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome* , 48(2), pp. 257-272.
- Tavares-de-Sousa, M. M. (1999). *MEPRO: Programa de Melhoramento de Proteaginosas*. Dissertação apresentada para concurso a investigador coordenador do INIA., ENMP, Elvas.
- UPOV. (2005). International Union for the Protection Of New Varieties of Plants. *Pea: Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability* , 51.
- Vavilov, N. (1949.). The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chron. Bot.* , pp. 13:1-54.
- Wani, G. A., Mir, B. A., & Shah, M. A. (2013). Evaluation of diversity in pea (*Pisum sativum* L.) genotypes using agro-morphological characters and RAPD analysis. *International Journal of Current Research and Review* , 5 (10), pp. 17-25.
- Weder, J. K. (2002). Identification of Food and Feed Legumes by RAPD-PCR. *Elsevier Science Ltd* , 35, pp. 504–511.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* , 18, pp. 6531-6535.
- Zohary, D., & Hopf, M. (1993). *Domestication of plants in the old world*. Oxford: Clarendon Press.

Zohary, D., & Hopf, M. (1998). *Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe and the Nile Valley*. Oxford University Press USA.

Zohary, D., & Hopf, M. (1973). Domestication of pulses in the Old World. *Science* , 182, pp. 887-894.

## **ANEXOS**

Altitude: 219m a.s.l.

Longitude (W):7° 08'42"

Latitude(N):38° 53' 15"

Month	10 –day values Total (T) or Mean (M)	Rainfall (mm)		Number of days 1,0 mm or more rainfall		Temperature °C			
		This year	Normal (over 30 years)	This year	Normal (over 30 years)	This Year Average Minimun	This Year Average Maximun	Mean Daily Temperature Normal	
								This year	(over 30 years)
IX	1	22,5		2		14,6	30,1	22,4	
	2	0,0		0		15,6	32,4	24,0	
	3	0,0		0		14,4	30,4	22,4	
	T/M	22,5	25,6	2	3	14,9	31,0	22,9	22,2
X	1	0,0		0		14,2	31,2	22,7	
	2	0,0		0		11,4	30,4	20,9	
	3	47,5		5		11,3	22,5	16,9	
	T/M	47,5	58,6	5	7	12,3	28,0	20,2	17,4
XI	1	67,6		5		10,5	17,7	14,1	
	2	31,1		4		9,5	18,1	13,8	
	3	1,7		1		6,2	17,1	11,7	
	T/M	100,4	75,1	10	8	8,7	17,6	13,2	12,5
XII	1	3,8		2		5,8	13,8	9,8	
	2	4,6		2		5,1	14,6	9,9	
	3	0,4		0		1,4	14,2	7,8	
	T/M	8,8	92,6	4	9	4,1	14,2	9,2	9,7
I	1	0,5		0		1,2	14,5	7,9	
	2	4,2		1		2,7	14,4	8,6	
	3	1,5		1		1,4	15,3	8,4	
	T/M	6,2	63,1	2	8	1,8	14,7	8,3	8,6
II	1	0,0		0		-0,1	14,4	7,2	
	2	0,0		0		0,0	15,4	7,7	
	3	0,0		0		0,3	20,0	10,2	
	T/M	0,0	54,6	0	7	0,1	16,6	8,4	10,2
III	1	0,0		0		4,6	20,1	12,4	
	2	0,0		0		6,0	21,5	13,8	
	3	2,1		1		8,2	22,4	15,3	
	T/M	2,1	39,6	1	6	6,3	21,3	13,8	12,3
IV	1	27,0		4		6,9	19,3	13,1	
	2	0,3		0		8,3	18,9	13,6	
	3	26,3		3		8,2	18,3	13,3	
	T/M	53,6	51,2	7	7	7,8	18,8	13,3	14,1
V	1	17,6		3		10,3	23,1	16,7	
	2	0,1		0		14,4	30,2	22,3	
	3	0,0		0		11,2	29,2	20,2	
	T/M	17,7	44,0	3	6	12,0	27,5	19,7	17,3
VI	1	2,3		1		15,7	30,0	22,8	
	2	0,0		0		13,8	29,6	21,7	
	3	0,0		0		16,7	34,9	25,8	
	T/M	2,3	23,6	1	3	15,4	31,5	23,4	21,7
VII	1	0,0		0		13,7	31,8	22,8	
	2	0,0		0		16,1	36,7	26,4	
	3	0,0		0		16,9	35,7	26,3	
	T/M	0,0	4,8	0	1	15,6	34,7	25,2	25,1
VIII	1	0,0		0		16,0	35,9	26,0	
	2	0,0		0		17,5	34,6	26,1	
	3	8,6		1		16,3	33,6	25,0	
	T/M	8,6	2,6	1	1	16,6	34,7	25,7	24,8

Altitude: 219m a.s.l.

Longitude (W):7° 08'42"

Latitude (N):38° 53' 15"

Month	10 –day values Total (T) or Mean (M)	Rainfall (mm)		Number of days 1,0 mm or more rainfall		Temperature °C			
		This year	Normal (over 30 years)	This year	Normal (over 30 years)	This Year Average Minimum	This Year Average Maximum	Mean Daily Temperature Normal	
								This year	(over 30 years)
IX	1	0,0		0		17,8	33,2	25,5	
	2	0,0		0		16,9	33,9	25,4	
	3	68,2		6		15,0	24,7	19,9	
	T/M	68,2	25,6	6	3	16,6	30,6	23,6	22,2
X	1	0,0		0		13,0	29,0	21,0	
	2	31,0		3		10,4	21,9	16,2	
	3	44,2		6		10,6	20,2	15,4	
	T/M	75,2	58,6	9	7	11,3	23,7	17,5	17,4
XI	1	80,8		5		9,0	17,8	13,4	
	2	39,0		3		8,2	17,8	13,0	
	3	4,4		1		6,9	15,3	11,1	
	T/M	124,2	75,1	9	8	8,0	17,0	12,5	12,5
XII	1	19,4		2		3,6	13,7	8,7	
	2	27,5		3		7,1	14,3	10,7	
	3	24,9		3		3,5	13,7	8,6	
	T/M	71,8	92,6	8	9	4,7	13,9	9,3	9,7
I	1	3,0		2		3,8	14,1	9,0	
	2	29,5		3		7,6	14,1	10,8	
	3	25,1		4		5,5	14,9	10,2	
	T/M	57,6	63,1	9	8	5,6	14,4	10,0	8,6
II	1	0,1		0		1,2	14,8	8,0	
	2	18,8		4		5,0	15,2	10,1	
	3	19,1		4		2,8	13,9	8,4	
	T/M	38,0	54,6	8	7	3,0	14,6	8,8	10,2
III	1	64,2		8		7,4	15,1	11,3	
	2	25,2		5		5,4	15,5	10,5	
	3	77,9		8		9,3	13,9	13,3	
	T/M	167,3	39,6	21	6	7,4	16,0	11,7	12,3
IV	1	13,5		4		7,3	17,4	12,4	
	2	0,9		0		8,5	24,3	16,4	
	3	7,0		1		8,3	22,2	15,3	
	T/M	21,4	51,2	5	7	8,0	21,3	14,7	14,1
V	1	0,0		0		10,4	26,2	18,3	
	2	10,9		5		8,5	22,8	15,7	
	3	2,6		1		9,5	26,3	17,9	
	T/M	13,5	44,0	6	6	9,5	25,1	17,3	17,3
VI	1	3,0		1		10,5	27,4	19,0	
	2	0,0		0		11,2	30,5	20,8	
	3	0,0		0		16,2	35,5	25,9	
	T/M	3,0	23,6	1	3	12,6	31,1	21,9	21,7
VII	1	0,0		0		18,9	39,0	29,0	
	2	0,0		0		16,0	35,5	25,8	
	3	0,0		0		14,7	33,5	24,1	
	T/M	0,0	4,8	0	1	16,5	36,0	26,3	25,1
VIII	1	0,0		0		14,4	35,3	24,9	
	2	0,0		0		17,3	38,4	27,9	
	3	0,0		0		16,8	35,2	26,0	
	T/M	0,0	2,6	0	1	16,2	36,3	26,3	24,8