

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Emanuelle Varão Vasconcelos

**Mapeamento citogenético de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.
mediante hibridização *in situ* de sequências de DNA de
Phaseolus vulgaris L.**

**Recife
2014**

Emanuelle Varão Vasconcelos

**Mapeamento citogenético de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.
mediante hibridização *in situ* de sequências de DNA de
Phaseolus vulgaris L.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Ana Christina Brasileiro-Vidal

Coorientadora: Prof^a Andrea Pedrosa-Harand

**Recife
2014**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Vasconcelos, Emanuelle Varão

Mapeamento citogenético de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Mediante hibridização in situ de sequências de DNA de *Phaseolus vulgaris* L. / Emanuelle Varão Vasconcelos. – Recife: O Autor, 2014.

56 folhas: il.

Orientadores: Ana Christina Brasileiro Vidal, Andrea Pedrosa Harand
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2014.

Inclui bibliografia e anexo

1. Leguminosa 2. Feijão 3. Citogenética I. Vidal, Christina Brasileiro (orient.) II. Harand, Andrea Pedrosa (coorient.) III. Título.

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-129

Emanuelle Varão Vasconcelos

**Mapeamento citogenético de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.
mediante hibridização *in situ* de sequências de DNA de
Phaseolus vulgaris L.**

Aprovado em 27/02/2014

Banca Examinadora:

**Profa. Dra. ANDREA PREDROSA-HARAND (Coorientadora)
Universidade Federal de Pernambuco**

**Profa. Dra. ANA EMÍLIA BARROS E SILVA (1º Titular)
Universidade Federal da Paraíba**

**Profa. Dra. ANA MARIA BENKO-ISEPPON (2º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco**

**Prof. Dr. REGINALDO DE CARVALHO (3º Titular)
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Recife
2014**

À pessoa responsável pela minha evolução profissional, por me fazer acreditar que sou capaz, pela confiança e dedicação. A Ana Christina Brasileiro-Vidal, dedico.

Agradecimentos

A **Deus**, por todas as maravilhas que tens feito em minha vida.

Aos meus pais, os espelhos da minha vida, **Aynoan Varão Vasconcelos** e **Sérgio B. de Andrade Vasconcelos** pelo investimento, dedicação, proteção, carinho e amor.

À minha irmã, **Jéssica Varão Vasconcelos**, a gente briga, mas a gente se ama.

Ao meu noivo, **Raphael Farias Carneiro**, por todo companheirismo, apoio e amor, por estar sempre comigo a qualquer momento e em qualquer situação.

À minha espetacular orientadora, **Profª Drª Ana Christina Brasileiro Vidal**, por toda sua amizade e carinho, pela sua compreensão e dedicação a seus alunos, por todos os ensinamentos e incentivos, por estar sempre presente, pela oportunidade e confiança.

À minha excelente Coorientadora, **Profª Drª Andrea Pedrosa-Harand**, pela qual tenho grande admiração como pessoa e como profissional, e pelo trabalho em parceria.

À **Profª Drª Ana Maria Benko Iseppon**, pela qual tenho grande admiração por tamanha inteligência e dedicação ao trabalho, pela estrutura e ensinamentos cedidos.

A **Artur F. de A. Fonsêca**, pelo trabalho em parceria, sua ajuda foi essencial para que tudo desse certo. Por toda sua disponibilidade e preocupação em ajudar, pela amizade, paciência e vibrações positivas.

Ao **Dr. Antônio Félix da Costa** e **Conceição Martiniano**, pelo trabalho em parceria e pela disponibilidade e alegria em ajudar.

Aos amigos que fizeram ou ainda fazem parte do LGBV, Ana Felix, Artur Wanderley, Bruna Piereck, Diego Sotero, Ebenézer Bernardes, Flávia Araújo, Geyner Alves, Igor Gominho, Hévila Mendes, Ísis Raphaella, João Pacífico, José Lucas, José Pedro, Karla Camila, Kyria Bortoleti, Lidiane Amorim, Luís Carlos Belarmino, Marília Gabriela, Marx Oliveira, Mitalle Matos, Nathalia Leite, Pedro Almeida, Rodrigo Oliveira, Rômulo dos Santos, Rosilda Cintra, Sheyla Lima, Silvany Araújo, Stephani Soares e Valesca Pandolfi. Aprendi muito com cada um de vocês, crescendo como pessoa e como profissional.

Em especial agradeço a **Ana Rafaela** (treinadora oficial, fazemos a dupla da máquina e o trator), **Anne Marinho** (meu maior orgulho), **Pollyana Silva** (amiga Popo, sempre juntas), **Santelmo Vasconcelos** (amigo Sam, inteligência pura) e **Vanessa Souza** (minha conselheira oficial, com as palavras certas em qualquer situação), por todo apoio, ensinamentos e confiança. As particularidades de cada um de vocês me fez uma profissional e acima de tudo, uma pessoa melhor. Obrigada por tudo!

À coordenação, professores e secretários do **Programa de Pós-Graduação em Genética**, pela oportunidade concedida.

Às agências de fomento à pesquisa **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**.

Muito obrigada.

“Ainda que eu tenha todo o conhecimento, se não tiver amor nada serei... se não tiver amor, nada disso valerá. Paulo, 1 Coríntios 13.”

Resumo

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa anual cultivada em regiões tropicais e subtropicais, importante pelo alto teor de proteínas contido em suas sementes secas, vagens verdes e folhas. Neste trabalho, um estudo citogenético comparativo entre *V. unguiculata* e *Phaseolus vulgaris* L. (feijão comum) foi realizado por BAC-FISH. Sequências mapeadas em cromossomos de *P. vulgaris* (Pv) foram utilizadas como sondas em cromossomos de *V. unguiculata* (Vu), contribuindo para as análises de macrossintenia entre estes dois legumes. Trinta e sete clones da biblioteca BAC de *P. vulgaris* 'cv. BAT93', previamente selecionados com marcadores mapeados em seus 11 grupos de ligação correspondentes, foram hibridizados *in situ* nos cromossomos metafásicos de *V. unguiculata*. Foram identificados vários rearranjos cromossômicos, tais como translocações (entre BACs de Pv1 e Pv8; Pv2 e Pv3, como também Pv2 e Pv11), duplicações visualizadas em cromossomos metafásicos e/ou paquitênicos (BAC 147K17 de Pv3), inversões paracêntricas (entre os BACs 267H4 e 147K17 de Pv3) e pericêntricas (entre os BACs 221J10 e 190C15 de Pv4). Destacam-se também os BACs 14F2 (Pv2) e 86I17 (Pv7), que em *P. vulgaris* hibridizou nas regiões terminais de quase todos os cromossomos e em Vu apresentou marcação única. Adicionalmente, 17 BACs não apresentaram sinal único nos cromossomos de *V. unguiculata*. Os resultados do presente trabalho demonstraram que apesar dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* estarem intimamente relacionados, ocorreram várias quebras de macrossintenia ou de colinearidade ao longo da evolução cariotípica destes legumes.

Palavras-chave: Cromossomo Artificial de Bactéria (BAC); Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH); *Phaseolus*; *Vigna*; macrossintenia.

Abstract

The cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] is an annual legume grown in tropical and subtropical regions, relevant for its high protein content in dried beans, green pods and leaves. In this work, a comparative cytogenetic study between *V. unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) was conducted using BAC-FISH. Sequences mapped on chromosomes of *P. vulgaris* (*Pv*) were used as probes on chromosomes of *V. unguiculata* (*Vu*), contributing to the analysis of macrosynteny between both legumes. Thirty seven clones from the *P. vulgaris* 'BAT93' BAC library, corresponding to its 11 linkage groups, were hybridized *in situ* in metaphase chromosomes of *V. unguiculata*. Several chromosomal rearrangements were identified, such as translocations (between BACs from *Pv1* and *Pv8*; *Pv2* and *Pv3*, as well *Pv2* and *Pv11*), duplications visualized in metaphase and/ or pachytene chromosomes (BAC 147K17 from *Pv3*), paracentric (between BACs 267H4 and 147K17 from *Pv3*) and pericentric inversions (between BACs 221J10 and 190C15 from *Pv4*). On the other hand, BACs 14F2 (*Pv2*) and 86I17 (*Pv7*), which hybridized at terminals regions on almost all *P. vulgaris* chromosomes, showed a single copy signal in *Vu*. Additionally, 17 BACs showed no single-copy signal in the chromosomes of *V. unguiculata*. The results of this study demonstrated the feasibility of using BAC libraries in comparative chromosomal mapping and karyotype evolution studies among species of *Phaseolus* and *Vigna*, suggesting several macrosynteny or colinearity breaks among these legumes.

Key-Words: Bacterial Artificial Chromosome (BAC); Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH); *Phaseolus*; *Vigna*; macrosynteny

Lista de Ilustrações

Figura 1. Localização *in situ* de treze BACs geneticamente mapeados em *Phaseolus vulgaris* em cromossomos mitóticos de *Vigna unguiculata* (*Vu*) contracolorados com DAPI (pseudocolorido em cinza). **(a)** Cromossomos de *V. unguiculata* (*VuA*, *VuB*, *VuG*, *VuH*, *VuI*, *VuK*) hibridizados com BACs provenientes de seis cromossomos de *P. vulgaris* (*Pv1*, *Pv2*, *Pv3*, *Pv4*, *Pv5* e *Pv6*; Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010). Os BACs marcados com Cy3-dUTP foram pseudocoloridos em diferentes cores. **(b)** 257L12 (azul escuro), 38C24 (rosa) e DNAr 45S (verde) mapeados em *VuG* e 177I19 (amarelo) em *VuC*. **(c)** BACs em *VuA*: 127F19 (vermelho), 225P10 (azul escuro) e 174E13 (azul claro). **(d)** BACs em *VuA*: 267H4 (amarelo), 174E13 (azul claro) e 147K17 (rosa). A cabeça de seta indica uma duplicação local e "D" uma duplicação no braço longo no cromossomo paquitênico *VuA*. **(e)** BACs em *VuH*: 221J10 (amarelo) e 190C15 (azul). **(f)** BACs em *VuB*: 18B15 (roxo) e DNAr 45S (verde). As inserções tracejadas em **b**, **c** e **d** mostram cromossomos de outra célula, indicando a posição relativa dos dois BACs. A barra em **a** representa 2,5 μm ; em **d** (para o cromossomo paquitênico) e **f** (para as figuras **b-f**) representam 5 μm .

Figura 2. Localização *in situ* de nove BACs e um clone bacteriófago geneticamente mapeados em *Phaseolus vulgaris* em cromossomos mitóticos de *Vigna unguiculata* (*Vu*) contracolorados com DAPI (pseudocolorido em cinza).

(a) Cromossomos de *V. unguiculata* (*VuC*, *VuD*, *VuE*, *VuF*, *VuI*) hibridizados com BACs provenientes de cinco cromossomos de *P. vulgaris* (*Pv7*, *Pv8*, *Pv9*, *Pv10* e *Pv11*; Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010). Os BACs marcados com Cy3-dUTP foram pseudocoloridos em diferentes cores. (b) BACs mapeados em *VuE*: 22I21 (laranja) e 86I17 (azul). (c) BACs mapeados em *VuK*: 221F15 (azul) e 169G16 (vermelho), e para *VuC*: 177I19 (amarelo). (d) BAC mapeado em *VuF*: 224I16 (rosa) e DNAr 45S (verde). (e) Bacteriófago mapeado em *VuD*: SJ19.10 (azul), DNAr 45S (verde) e DNAr 5S (vermelho). (f) BACs mapeados em *VuI*: 14F2 (rosa), 127J2 (roxo), 179N14 (azul), DNAr 45S (verde) e DNAr 5S (vermelho). Os insertos tracejados em **b**, **e** e **f** correspondem a um cromossomo de outra célula, indicando a posição relativa das marcas. A seta no inserto em **e** destaca o pequeno sítio extra de DNAr 45S. A barra em **a** representa 2,5 µm; em **f** representa 5 µm.

Figura 3. Representação esquemática do mapeamento comparativo de 11 cromossomos de *Vigna unguiculata* (*Vu*) hibridizados com 19 BACs e um clone bacteriófago provenientes dos 11 cromossomos de *Phaseolus vulgaris* (*Pv*) (a) e os possíveis rearranjos em relação a seis cromossomos de *P. vulgaris* encontrados por BAC-FISH (b, c, d). As marcas evidenciadas para *P. vulgaris* foram modificadas a partir de Pedrosa-Harand *et al.* (2009) e Fonsêca *et al.* (2010). Foram observados quatro tipos de rearranjos cromossômicos: (b e c) translocações (T); (c) duplicação para o BAC 147K17 (D) e inversão paracêntrica (Ipa) e (d) inversão pericêntrica (Ipe). *Os BACs 14F2 (*Bng* 57,

terminal no grupo de ligação D - Vallejos *et al.*,1992) representado em bege e 86117 (*Bng* 191, terminal no grupo de ligação A - Vallejos *et al.*,1992) representado em azul não foram mapeados como sinal único para *Pv2* e *Pv7*, respectivamente (subteloméricos repetitivos). O BAC 14F2 foi representado como um provável sinal único terminal em *Pv2* e o BAC 86117 foi posicionado como sinal único em *Pv7*, de acordo com a localização do mesmo em *P. lunatus* (Almeida e Pedrosa-Harand, 2013).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Lista de 37 clones de *Phaseolus vulgaris*, com seus respectivos cromossomos (*Pv*)/grupos de ligação (LG), marcas *Bng* e *Leg*, FISH em *P. vulgaris* e em *Vigna unguiculata* (com ou sem DNA bloqueador).

Lista de Abreviaturas

8-HQ	8-hidroxiquinoleína
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i> Cromossomo Artificial de Bactéria
<i>Bng</i>	Clone plasmídeo do genoma do feijão comum
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> Albumina de Soro Bovino
C ₀ t	C ₀ – concentração inicial de DNA de cadeia simples, em mol/ L; t – tempo em segundos de reassociação
cv.	Cultivar
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> Ácido Desoxirribonucleico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i> Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente
FITC	Fluoresceína isotiocianato
Kb	Kilo bases
GL	Grupo de Ligação
Mb	Mega bases
<i>Pl</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>
<i>Pv</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo em Comprimento de Fragmentos de Restrição
SSC	Citrato de Sódio-Salino
<i>Vu</i>	<i>Vigna unguiculata</i>

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	3
2.1. <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i>	3
2.1.1. Posição taxonômica	3
2.1.2. Origem e distribuição	5
2.1.3. Importância socioeconômica	7
2.2. Mapeamento genético	8
2.3. Bibliotecas genômicas	10
2.4. Estudos de sintonia e colinearidade em leguminosas	12
2.5. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	13
2.6. Integração de mapas genético e citogenético	15
2.7. Caracterização citogenética	16
2.7.1. <i>Vigna unguiculata</i>	16
2.7.2. <i>Phaseolus vulgaris</i>	18
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. Materiais e métodos	22
4.1. Material vegetal	22
4.2. Preparação cromossômica	22
4.3. Sondas de DNA	23
4.4. FISH	24
4.5. Análise dos dados	25
5. Resultados	28
6. Discussão	36
7. Conclusões	41
8. Referências Bibliográficas	42
9. Currículo Lattes	51

1. Introdução

A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. é conhecida popularmente como feijão-caupi, feijão-de-corda ou feijão macassar. Essa leguminosa possui importância socioeconômica por ser fonte de proteínas na alimentação principalmente nos países subdesenvolvidos e por proporcionar emprego e renda para as populações da zona rural, destacando-se as regiões do nordeste do Brasil e da África. Adicionalmente, destaca-se dentre as leguminosas por sua capacidade de crescer sob condições ambientais estressantes, por exemplo, seca e salinidade.

Devido à importância socioeconômica do feijão-caupi, alguns grupos de pesquisa têm trabalhado no mapeamento e caracterização de genótipos, mediante construção de mapas genéticos, citogenéticos e de sequenciamento, localização de genes de interesse agrônomo associado a marcadores próximos, identificação de proteínas de defesa de plantas, entre outros. Essas informações têm auxiliado na produção de cultivares mais resistentes a fatores bióticos e abióticos, mediante programas de melhoramento genético de plantas.

Estudos genômicos comparativos, incluindo análises de sintenia, têm sido realizados com sucesso entre espécies relacionadas que não possuem genoma completamente sequenciado e/ou montado, como é o caso do feijão-caupi. Estes trabalhos têm proporcionado um aumento na informação sobre a organização e evolução dos genomas. Na citogenética, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente de cromossomos artificiais de bactérias (BAC-FISH) tem sido bastante promissora para análises de macrossintenia, contribuindo para estimar o nível de conservação e ordem de sequências de DNA em diferentes espécies.

Dessa forma, a técnica BAC-FISH, utilizando sequências de DNA de *P. vulgaris* como sondas em cromossomos de *V. unguiculata*, possibilitou no presente trabalho a construção do primeiro mapa citogenético comparativo para essa espécie, colaborando com os estudos de macrossintenia entre ambas leguminosas. Este mapa contribui para o entendimento da evolução cariotípica do grupo, elucidando possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos como duplicações, inversões e translocações.

2. Revisão da literatura

2.1. *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*

2.1.1. Posição taxonômica

A família Fabaceae Lindley compreende um grupo taxonômico de distribuição cosmopolita, com espécies nativas em todos os continentes, exceto na Antártida. Ocupa o terceiro lugar em diversidade dentre as Magnoliophyta e o segundo em importância econômica, estando seus representantes distribuídos, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais (Joly, 2002; Graham e Vance, 2003). É constituída por 727 gêneros e aproximadamente 19.000 espécies (Lewis *et al.*, 2005), classificadas em três subfamílias Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae (Doyle e Luckow, 2003).

A subfamília Papilionoideae abrange os legumes cultivados de importância agrícola, como amendoim, ervilha, feijões, grão-de-bico e soja (Graham e Vance, 2003; Cannon *et al.*, 2009). Está dividida em dois subclados, o Galegoid (legumes essencialmente de climas temperados) e o Phaseoloid (legumes essencialmente de climas tropicais), que divergiram a cerca de 50 milhões de anos (Kajita *et al.*, 2001; Wojciechowski *et al.*, 2003). No clado Galegoid, o número cromossômico é variável entre $2n = 2x = 12, 14, \text{ ou } 16$ e o tamanho do genoma varia em torno de 450 Mb (por exemplo, para *Lotus japonicus* e *Medicago truncatula*) até cerca de 13.032 Mb (por exemplo, para feijão guandu e *Vicia faba*). Por outro lado, em Phaseoloid, os genomas são mais estáveis, e a maior parte das espécies têm tamanho do genoma semelhante, com cerca de 600 Mb e com número cromossômico $2n = 2x = 22$ (Iwata *et al.*, 2013; <http://data.kew.org/cvalues>). Dentre os gêneros, destacam-se *Vigna* Savi

e *Phaseolus* L., os quais estão inseridos na tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae (Marechal *et al.*, 1978; Judd *et al.*, 2009).

O gênero *Vigna* compreende mais de 100 espécies (Schrire, 2005), dividido em seis subgêneros (Marechal *et al.*, 1978; Thulin *et al.*, 2004). Destacam-se os subgêneros *Vigna* e *Ceratotropis* por possuírem espécies cultivadas na África e na Ásia, como *V. unguiculata* (L.) Walp. (feijão-caupi) e *Vigna radiata* L. (feijão-da-china), respectivamente (Baudoin e Marechal *et al.*, 1988; Delgado-Salinas *et al.*, 2011). *Vigna unguiculata* foi diferenciada em quatro subespécies, sendo três selvagens e uma cultivada (*unguiculata*). A subespécie *unguiculata* está dividida em quatro cultigrupos (Westphal, 1974 *apud* Ng e Marechal, 1985), dentre os quais apenas os cultigrupos *Unguiculata* e *Sesquipedalis* são cultivados no Brasil (Freire-Filho *et al.*, 2011).

O gênero *Phaseolus*, por sua vez, é constituído por aproximadamente 75 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. acutifolius* A. Gray, *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. polyanthus* Greeman e *P. vulgaris* L. Entre estas, podem-se destacar *P. vulgaris* (feijão comum) e *P. lunatus* (fava), devido à sua grande importância econômica (Broughton *et al.*, 2003; Delgado-Salinas *et al.*, 2006). Delgado-Salinas *et al.* (2006) confirmaram a origem monofilética do citado gênero, por meio de sequências DNArn ITS/5,8S e locos plastidiais *trnK*, dividindo-o em dois clados principais. O clado A seria formado pelos grupos Pauciflorus, Pedicellatus, Tuerckheimii, bem como por quatro espécies que formam um pequeno grupo mal resolvido: *P. glabellus*, *P. macrolepis*, *P. microcarpus* e *P. oaxacanus*. Por sua vez, o clado B estaria constituído pelos grupos Filiformis, Leptostachyus, Lunatus, Polystachios e Vulgaris, este último agrupando as espécies cultivadas, exceto *P.*

lunatus, a qual foi classificada no grupo Lunatus. Tal dado sugere que, dentre as espécies cultivadas, o feijão-fava pode ser considerado mais distante filogeneticamente.

2.1.2. Origem e distribuição

O feijão-caupi é uma espécie herbácea de ampla distribuição mundial, desenvolvendo-se principalmente nas regiões tropicais, devido à semelhança edafoclimática de seu provável centro de origem: a África (Rachie, 1985; Brito *et al.*, 2009). O feijão-caupi apresenta como centro primário e secundário de diversidade o oeste da África (mais precisamente a Nigéria) e a Índia, respectivamente (Faris, 1965; Pant *et al.*, 1982; Ng e Marechal, 1985). Entretanto, Padulosi *et al.* (1997) acreditam que provavelmente o Transvaal, na República da África do Sul, corresponda à sua região de especiação. Coulibaly *et al.* (2002) forneceram evidências, com base em marcadores moleculares, que a domesticação do caupi ocorreu no nordeste da África.

Recentemente, Huynh *et al.* (2013) identificaram dois *pool* gênicos nos feijões-caupi cultivados na África: (1) o pool gênico 1, constituído por raças distribuídas principalmente na África Ocidental e (2) o pool gênico 2, constituído por raças distribuídas principalmente na África Oriental. Cada conjunto de genes encontra-se proximamente relacionado com o feijão-caupi selvagem da mesma região geográfica, indicando que os processos de divergência foram os mais importantes para a domesticação e formação dos dois *pool* gênicos.

No Brasil, o feijão-caupi provavelmente foi introduzido no estado da Bahia, sendo levado pelos colonizadores para outras regiões (Freire-Filho, 1988). Por outro

lado, considerando a diversidade genética dos bancos de germoplasma da espécie no Brasil, foi sugerido que diversos eventos de introdução devam ter ocorrido nos portos do Recife, Salvador, Rio de Janeiro e São Luiz, considerando que os escravos das regiões africanas foram introduzidos em diferentes regiões e portos brasileiros (Simon *et al.*, 2007). Posteriormente, adaptou-se a regiões de clima adverso (seco e elevadas temperaturas) sendo cultivado predominantemente na região Nordeste (Costa e Castelletti, 2013).

Por sua vez, o feijão comum encontra-se distribuído por todo o mundo, sendo cultivado em zonas temperadas dos hemisférios Norte e Sul e principalmente nos trópicos (Silva e Costa, 2003). Com relação à sua origem, Kami *et al.* (1995) analisaram populações selvagens de *P. vulgaris*, notando a presença de um tipo ancestral de faseolina, importante proteína de armazenamento desta espécie, ausente nos demais acessos. Considerando que estas populações tinham uma distribuição restrita do Equador ao norte do Peru, tais autores sugeriram que essa região seria o provável centro de origem do feijoeiro.

Após surgimento e dispersão, o feijão-comum originou dois conjuntos gênicos distintos: o Mesoamericano, estendendo-se do México ao norte da América do Sul, e o Andino, compreendendo a região central e o sul da América do Sul (Gepts, 1998). Evidências indicam que a espécie foi domesticada independentemente nesses dois centros principais (Chacón *et al.*, 2005). Mais recentemente, Bitocchi *et al.* (2012) indicaram uma origem Mesoamericana do feijoeiro. Os autores sugerem que a população distribuída do norte do Peru ao Equador corresponde a uma população que apresenta apenas uma fração da diversidade genética ancestral, que migrou da região central do México em tempos antigos. Com relação à sua introdução no Brasil,

não existem dados disponíveis (Freitas, 2006), sabendo-se apenas que o feijoeiro foi domesticado há mais de 7000 anos em diversas regiões da América Latina (Vieira *et al.*, 1999).

2.1.3. Importância socioeconômica

O feijão-caupi é uma cultura multifuncional e um dos alimentos mais importantes dentre as leguminosas forrageiras dos trópicos semiáridos (Timko e Singh, 2008). O Brasil tem ocupado o segundo lugar na produção mundial de feijões (FAO, 2011), sendo cultivados cerca de 2,8 milhões de hectares (IBGE, 2013). O país é considerado o terceiro maior produtor de feijão-caupi, com destaque para as regiões Nordeste e Norte como maiores produtoras (EMBRAPA, 2011). A maior produção concentra-se na Região Nordeste, com 84% da área plantada e 68% da produção nacional, o que gerou, nos últimos cinco anos, 1,2 milhão de empregos diretos (Costa e Castelletti, 2013). Essas leguminosas podem ser facilmente cultivadas, sendo consideradas importantes componentes da dieta alimentar, especialmente em países subdesenvolvidos. Constituem a principal cultura de subsistência para a população mais carente, por seu alto valor nutritivo, devido ao alto conteúdo de proteína das sementes e pela geração de emprego e renda na zona rural (Frota *et al.*, 2008; Timko e Singh, 2008). Os feijões podem ser consumidos na forma de folhas jovens, brotos, vagens verdes e grãos (Broughton *et al.*, 2003), ou usados como adubo verde e como forrageira (Guedes, 2008).

Anualmente, grande parte da produção de feijão é comprometida pela ocorrência de diversos tipos de doenças e pragas, sendo necessária a utilização de defensivos agrícolas. A falta de recursos dos produtores, juntamente com os efeitos

tóxicos causados pelos defensivos, tem levado à comunidade científica a realizar projetos visando obter espécies mais tolerantes a diferentes tipos de estresse bióticos e/ou abióticos (Broughton *et al.*, 2003; Timko e Singh, 2008).

2.2. Mapeamento genético

Um marcador genético corresponde a qualquer característica morfológica ou molecular, localizada especificamente em um grupo de ligação, a qual pode ser utilizada como ponto de referência para análises de genomas. Os marcadores moleculares ou marcadores de DNA correspondem a polimorfismos detectados na sequência de DNA devido à ocorrência de mutações pontuais ou pequenas deleções e/ou inserções. Podem ser identificados e mapeados em grupos de ligação, utilizados na identificação e localização de locos específicos (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Weising *et al.*, 2005; Farah, 2007; Grattapaglia e Ferreira, 2009).

Os mapas genéticos, ou mapas de ligação, são construídos com base na taxa de recombinação entre marcadores localizados em um mesmo grupo de ligação. Esta frequência de recombinação pode ser definida como a distância relativa entre os marcadores, medidas em centiMorgans (cM) (Salgado *et al.*, 2011). Contudo, não indica a distância física exata entre eles, uma vez que se observa uma distribuição não aleatória dos eventos de recombinação (Kataoka *et al.*, 2012; Lou *et al.*, 2013). Os mapas genéticos têm sido empregados em programas de melhoramento, permitindo a localização de genes que controlam características de importância agrônômica e, mais recentemente, na análise comparativa ou em estudos de sintenia entre as espécies, contribuindo assim para o entendimento sobre a evolução dos

genomas vegetais (Lucas *et al.*, 2011; Ha *et al.*, 2012; Andargie *et al.*, 2013; Shirasawa *et al.*, 2013).

Para o feijão-caupi, o primeiro cruzamento intraespecífico usado para geração de um mapa genético foi desenvolvido por Menéndez *et al.* (1997), os quais usaram principalmente marcadores RAPD, RFLP e AFLP visando à saturação do mapa. As referidas marcas cobriram uma região de 972 cM, com uma distância média entre os marcadores de 6,4 cM, embora tenham formado 12 grupos de ligação ao invés dos 11 esperados. Posteriormente, Ouédraogo *et al.* (2002) geraram outro mapa, associando novas marcas, usando uma população constituída por 94 linhagens recombinantes utilizadas por Menéndez *et al.* (1997) em F9, que resultou em 11 grupos de ligação, cobrindo 2.670 cM do genoma dessa espécie, com uma distância média entre esses marcadores de 6,43 cM. Marcadores associados a várias características de resistência e/ou tolerância biológica, genes de resistência e análogos de genes de resistência também foram incluídos. Um mapa consenso para o feijão-caupi foi desenvolvido pelo grupo do Muchero e colaboradores (2009), o qual está disponível em (<http://www.harvest-web.org>). O referido mapa contém 928 SNPs e apresenta uma cobertura de 680 cM, com 11 grupos de ligação e uma distância média entre marcas de 0,73 cM. Mais recentemente, Lucas *et al.* (2011) elaboraram um novo mapa consenso, visando à saturação do mesmo e melhorando o posicionamento dos marcadores quando comparado ao mapa consenso anterior. Este contém 1.107 SNPs e fornece informações para diversas análises, incluindo identificação de loci de características quantitativas (QTLs), clonagem baseada em mapeamento e avaliação de diversidade, entre outras.

No feijão comum, três mapas genéticos foram desenvolvidos inicialmente (Vallejos *et al.*, 1992; Nodari *et al.*, 1993; Adam-Blondon *et al.*, 1994), com base principalmente em marcadores RFLP e RAPD. Posteriormente, os referidos mapas foram reunidos em um mapa consenso baseado em linhagens endogâmicas recombinantes (Freyre *et al.*, 1998). Mais tarde, 282 novos marcadores (EST-SSR, AFLP, RGA) foram integrados ao mapa consenso do feijoeiro, permitindo ancorar novas marcas em regiões de interesse, como aquelas relacionadas a QTLs de resistência a antracnose e ferrugem (Hanai *et al.*, 2010). Em seguida, Galeano *et al.* (2011) atualizaram o mapa consenso do feijão comum totalizando 1.010 marcadores mapeados com um comprimento total de 2,041 cM cobrindo os 11 grupos de ligação.

2.3. Bibliotecas genômicas

O DNA genômico de qualquer organismo pode ser fragmentado com enzimas de restrição, clonado em vetores e inserido em células hospedeiras capazes de multiplicar os referidos fragmentos, possibilitando a construção de uma biblioteca genômica. Cada classe de vetor possui uma capacidade suporte, medida em kb (mil pares de bases), visando não só à viabilidade da célula hospedeira, como também, à correta duplicação dos fragmentos inseridos a cada ciclo celular (Clark, 2005). Como principais classes de vetores, destacam-se: (1) os plasmídeos, que aceitam um inserto de fragmento de DNA com até 100 kb; (2) os vírus bacteriófagos, que permitem a inserção de até 23 kb; (3) os cosmídeos, que aceitam fragmentos de 45 kb (Clark, 2005) e, para genomas complexos, (4) os BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes* - Cromossomos Artificiais de Bactéria), os quais suportam fragmentos médios de 150 kb até um máximo de 700 kb, (Tunster *et al.*, 2011) e (5) YACs (*Yeast*

Artificial Chromosomes - Cromossomos Artificiais de Levedura), com insertos de até 2000 kb (Burke *et al.*, 1987). Contudo, o uso de YACs na construção das primeiras bibliotecas genômicas como em *Arabidopsis* e milho, não se mostrou eficiente, pois parte desses apresentou-se quimérico, instável e suscetível a rearranjos internos (Edwards *et al.*, 1992; Creusot *et al.*, 1995; Ferreira, 2003).

Clones BAC têm sido considerados mais interessantes para a construção de bibliotecas genômicas, por apresentarem estabilidade na manutenção de insertos e facilidade no cultivo e manipulação (Tunster *et al.*, 2011). As primeiras bibliotecas BAC, em vegetais, foram construídas para sorgo (Woo *et al.*, 1994), *Arabidopsis* (Choi *et al.* 1995) e arroz (Yang *et al.*, 1997). Em leguminosas, os BACs têm sido utilizados como importante ferramenta na construção de grandes bibliotecas genômicas. Duas bibliotecas BAC foram construídas para o feijão-caupi (Yu *et al.*, 2012). A primeira foi publicada em 2004 por Rajesh e colaboradores, construída para o genótipo FLIP84-92C, cobrindo 3,1x do tamanho do genoma, enquanto a segunda biblioteca BAC (genótipo IT97K-499-35) cobre 9,1x do tamanho do genoma (Ma *et al.*, 2009), ambas para fins de clonagem. Para *P. vulgaris*, até o momento existem 11 bibliotecas BAC (Yu *et al.*, 2012). A primeira biblioteca BAC foi desenvolvida por VanHouten e MacKenzie (1999) para fins de mapeamento físico. Em 2006, foram construídas mais três bibliotecas BAC para os genótipos BAT93, G21245 e G02771 visando estudos evolutivos (Kami *et al.*, 2006). A última biblioteca BAC foi construída por Liu *et al.* (2010) para o genótipo HR45 objetivando mapeamento físico e clonagem.

2.4. Estudos de sintenia e colinearidade em leguminosas

Sintenia e colinearidade podem ser definidas como conservação do conteúdo e da ordem gênica entre espécies aparentadas, respectivamente (Mudge *et al.*, 2005). Diversos estudos de sintenia têm sido realizados através de análises de sequências depositadas em bancos de dados, como também pela comparação de mapas de ligação densos em diferentes grupos taxonômicos (Kumar, 1999; Zhu *et al.*, 2005), como observado em gramíneas (Singh *et al.*, 2007), brassicáceas (Lim *et al.*, 2007), leguminosas (Lee *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2004; Shirasawa *et al.*, 2013; <http://comparative-legumes.org/>), entre outras famílias.

Ferramentas de bioinformática têm sido utilizadas em grande parte das análises de sintenia. Bancos de dados têm sido criados para diversos genomas vegetais, os quais podem ser comparados e integrados. Um estudo utilizando o genoma de *A. thaliana* como espécie âncora, permitiu a comparação dos mapas genéticos de acessos de *G. max*, *P. vulgaris*, *V. radiata* e *A. thaliana*, buscando a descrição de regiões homeólogas entre tais espécies. Os grupos de ligação B1 e H de *G. max* apresentaram sintenia com o grupo de ligação F1-J de *P. vulgaris* e o grupo de ligação Minn-5 de *V. radiata*. Contudo, estes marcadores não se mostraram colineares (Lee *et al.*, 2001). Em outra análise, tendo a espécie *Medicago truncatula* como ponto central de comparação, Choi *et al.* (2004) também observaram relações macrossintênicas entre *M. truncatula* e *Lotus japonicus*. Adicionalmente, a microestrutura genômica foi caracterizada por significativa divergência estrutural, incluindo frequentes inserções/deleções de genes individuais ou de grupo de genes bem como expansões/contrações de famílias de genes.

Posteriormente, a sintonia entre *P. vulgaris*, *L. japonicus*, *M. truncatula* e *Arachis* foi estudada mediante análise de marcadores âncoras para leguminosas, evidenciando grandes blocos sintênicos entre os referidos táxons. Observou-se, por exemplo, extensa macrossintonia entre *L. japonicus* e *P. vulgaris*, em oito dos 11 cromossomos do feijão comum (Hougaard *et al.*, 2008). Entre *P. vulgaris* e *G. max*, locos mapeados geneticamente no feijão comum apresentaram sintonia, na maioria dos casos, com dois locos de soja. Um total de 55 blocos sintênicos foi observado entre as duas espécies (McClellan *et al.*, 2010). Os mapas genéticos de soja e *M. truncatula* ainda foram comparados ao mapa consenso de *V. unguiculata* (Muchero *et al.*, 2009). Os autores evidenciaram a existência de uma macrossintonia de 85% e 82% entre o genoma do feijão-caupi e os de soja e *M. truncatula*, respectivamente (<http://www.harvest-web.org>). Com o aprimoramento do mapa consenso de *V. unguiculata* por Lucas *et al.* (2011), foi verificado que o genoma do feijão-caupi é mais semelhante ao da soja quando comparado ao de *M. truncatula*, apesar do genoma ancestral da soja moderna ter sofrido duplicação e diversificação. Ainda, entre feijão-caupi e o feijão-asparago (*V. unguiculata* ssp. *sesquipedialis*) foi observada uma conservação do genoma em grande escala, evidenciando um grau de parentesco muito próximo entre os referidos feijões (Xu *et al.*, 2011).

2.5. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization* - Hibridização *In Situ* Fluorescente) permite a identificação e a localização de sequências de DNA ao longo dos cromossomos. A técnica consiste basicamente na desnaturação e hibridização do ácido nucleico alvo com uma sonda adequada (DNA ou RNA conhecido e

previamente marcado), permitindo a localização *in situ* de sequências de ácidos nucleicos nos cromossomos, citoplasma, organelas e tecidos. Vários tipos de sondas podem ser marcadas e utilizadas na hibridização *in situ*, como as sequências repetitivas organizadas em tandem (por exemplo, DNAr 45S e 5S), sequências repetitivas dispersas (como elementos transponíveis) e sequências de cópia única (Guerra, 2004).

Atualmente, a FISH vem sendo utilizada na hibridização de núcleos interfásicos, cromossomos mitóticos e meióticos, como também em fibras de DNA estendidas, permitindo distinguir e identificar cromossomos individuais, integrar grupos de ligação a cromossomos específicos, comparar distâncias físicas e genéticas, analisar a distribuição de DNA repetitivo ao longo do genoma, localizar genes ou sequências específicas de DNA nos cromossomos, determinar as origens de genomas de híbridos e auxiliar na taxonomia (De Jong *et al.*, 1999; Jiang e Gill, 2006; Ohmido *et al.*, 2010; Heslop-Harrison e Schwarzacher, 2011; Guerra, 2012).

Várias sondas podem ser detectadas em um mesmo cromossomo, possibilitando que seja determinada a ordem física das sequências e, conseqüentemente, permitindo a construção de mapas citogenéticos, principalmente através da técnica de BAC-FISH (Bonifácio *et al.*, 2012; Peters *et al.*, 2012; Szinay *et al.*, 2012).

A localização *in situ* de sequências cópia única ou pouco repetitivas, menores que 10 kb, em cromossomos metafásicos, foi facilitada pelo desenvolvimento de bibliotecas BAC. Clones tipo BAC contendo marcadores genéticos podem ser selecionados e multiplicados, e seus respectivos BACs podem ser extraídos, marcados e hibridizados *in situ*, permitindo a integração dos mapas genético e

citogenético (Fonsêca *et al.*, 2010). A técnica de BAC-FISH tem auxiliado na integração de mapas genéticos e cromossômicos e em análises citogenéticas comparativas, contribuindo para a estimativa do nível de conservação da ordem gênica em diferentes espécies e para fornecer um maior número de marcas, aumentando a informação sobre a organização e evolução dos genomas (Yu *et al.*, 2012). Adicionalmente, tem permitido entender de forma mais aprofundada o processo de evolução cariotípica, baseando-se na identificação de rearranjos estruturais, numéricos e evolução de sequências (Mandáková e Lysak, 2008).

2.6. Integração de mapas genético e citogenético

A integração de mapas mediante BAC-FISH tem permitido a identificação de possíveis distorções entre as distâncias genéticas e físicas. Tais distorções estão relacionadas à existência de *hotspots*, regiões-alvo de recombinação, onde a probabilidade de ocorrer *crossing-over* é alta, e regiões onde a recombinação é suprimida pela presença de heterocromatina, diminuindo a distância entre os locos, como ocorre nas regiões centroméricas e teloméricas (Saliba-Colombani *et al.*, 2000).

Um exemplo de integração de mapas em Fabaceae é descrito para *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010). Os autores construíram um mapa citogenético para a referida espécie, utilizando marcadores genéticos mapeados anteriormente em um mapa de ligação. Neste mapa, 115 marcadores *Bng* presentes no mapa de ligação de Vallejos *et al.* (1992), além de 17 *legume markers* contidos no mapa de ligação de Hougaard *et al.* (2008) foram selecionados para localização *in situ*. Contudo, apenas 45 marcas puderam ser mapeadas, observando-

se uma supressão da recombinação na região pericentromérica, como também uma maior taxa de recombinação ao longo dos braços cromossômicos.

2.7. Caracterização citogenética

2.7.1. *Vigna unguiculata*

A espécie *V. unguiculata* apresenta 613 Mb de acordo com Arumuganathan e Earle (1991) e 587 Mb de acordo com <http://data.kew.org/cvalues/>, distribuídos em $2n = 22$ cromossomos submetacêntricos e metacêntricos, relativamente pequenos (1,25 a 2,1 μm) e de difícil identificação (Bortoleti *et al.*, 2012). O sequenciamento do genoma do feijão-caupi (genótipo africano IT97K-499-35) encontra-se em andamento. O mapa físico de *V. unguiculata* reunirá um conjunto de 43.717 BACs sequenciados, cobrindo 11x o tamanho do genoma (Michael Timko, comunicação pessoal).

A coloração com os fluorocromos CMA₃/DAPI (cujo objetivo é localizar regiões de heterocromatina constitutiva) revelou a presença de bandas CMA₃⁺/DAPI⁻, nas regiões subteloméricas de quatro pares cromossômicos (2, 3, 4 e 5), sendo identificadas como AgNOR positivas (Galasso *et al.*, 1993; 1995) e colocalizadas posteriormente com sondas de DNAr 45S. Adicionalmente, a FISH revelou a presença de um sítio menor proximal no par cromossômico 10 ou 11 (Galasso *et al.*, 1995; Guerra *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2013). Os sítios de DNAr 5S foram localizados no braço longo do par cromossômico 4, portador de DNAr 45S, bem como no braço curto de outro cromossomo não identificado. Em um estudo recente, Bortoleti *et al.* (2012) identificaram os 11 pares cromossômicos (A - K) de *V. unguiculata*, classificando três padrões de bandas CMA₃/DAPI. Bandas CMA₃⁺/DAPI⁰

prevaleceram no cariótipo, estando distribuídas nas regiões pericentroméricas de todo o complemento cromossômico. Além das regiões pericentroméricas, os pares cromossômicos B e G apresentaram fortes bandas subteloméricas CMA₃⁺⁺/DAPI⁰ colocalizadas com sítios de DNAr 45S evidenciados na FISH. Adicionalmente, os cromossomos D, F e J mostraram bandas CMA₃⁺/DAPI⁻ colocalizadas com sítios de DNAr 45S menores, distribuídas nas regiões subteloméricas em D e J, e proximal, no cromossomo F. Por fim, os sítios de DNAr 5S foram localizados nas regiões terminais do braço curto dos cromossomos D e I.

Outros estudos citogenéticos encontram-se descritos para a caracterização cromossômica do feijão-caupi, como o uso de sondas de DNA satélite (Galasso *et al.*, 1995) e retroelementos (Galasso *et al.*, 1997; Bortoleti, 2010). Galasso *et al.* (1995) isolaram e caracterizaram uma sequência de DNA repetitivo (*Dral*) do genoma de *V. unguiculata*, a qual hibridizou nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos do feijão-caupi, colocalizando com as bandas C, destacadas por Galasso *et al.* (1993). A referida sequência foi espécie-específica, não sendo detectada por *Southern Blot* em outras espécies de *Vigna* e em outras leguminosas. Galasso *et al.* (1997) amplificaram os fragmentos do domínios RT (*Reverse Transcriptase*; Transcriptase Reversa) de retrotransposons Ty1-*copia*-like a partir dos genomas de *V. unguiculata*, *V. unguiculata* subsp. *dekindtiana*, *V. luteola* e *V. vexillata*, visualizando suas respectivas localizações *in situ*, estando dispersos uniformemente em todos os cromossomos, com exceção das regiões centroméricas, subteloméricas e das RONS. Ainda, Bortoleti (2010) amplificou os domínios RT de Ty1-*copia*-like e Ty3-*gypsy*-like a partir do genoma de *V. unguiculata* e hibridizados *in situ* em alguns representantes dos gêneros *Glycine* L., *Phaseolus* L. e *Vigna* SAVI.

Nos cromossomos do feijão-caupi, a FISH evidenciou a presença de sinais dispersos e pericentroméricos, utilizando ambos os retroelementos.

Embora alguns mapas genéticos tenham sido construídos para o feijão-caupi (Menéndez *et al.*, 1997; Ouédraogo *et al.*, 2002; Muchero *et al.*, 2009; Lucas *et al.*, 2011), até o momento, nenhum estudo relacionado à integração de mapas genético e citogenético foi publicado, não sendo possível associar os cromossomos a seus respectivos grupos de ligação.

2.7.2. *Phaseolus vulgaris*

O feijão comum apresenta 637 Mb de tamanho genômico de acordo com Arumuganathan e Earle (1991) e 587 Mb de acordo com <http://data.kew.org/cvalues/>, distribuídos em $2n = 22$ cromossomos relativamente pequenos (1,5 a 3 μm), havendo uma predominância de morfologias metacêntrica e submetacêntrica (Sarbhoy, 1978; Moscone *et al.*, 1999; Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 2000). Schlueter *et al.* (2008) publicaram um rascunho do mapa físico construído para o feijão-comum, contudo até o momento seu genoma não foi totalmente sequenciado.

Almeida (2006) individualizou os 11 pares cromossômicos de *P. vulgaris* através da coloração com CMA₃/DAPI e hibridização com DNAr 45S e 5S. Os cromossomos 1, 5, 7 e 11 apresentaram bandas CMA₃⁺ na região pericentromérica, apresentando-se mais extensas no braço longo. O par 10 apresentou uma banda pericentromérica e uma banda terminal no braço longo. Este mesmo par é portador de DNAr 45S e 5S no braço longo. Nos pares 6 (portador de DNAr 45S e 5S em braços opostos) e 9 (portador de DNAr 45S), a coloração com CMA₃ marcou toda a região pericentromérica e o braço curto. Os pares 2 e 3 tiveram uma banda proximal

no braço longo. Os pares 4 e 8 tiveram bandas na região pericentromérica de ambos os braços. Com relação à distribuição do DNAr, Pedrosa-Harand *et al.* (2006) avaliaram a variação de sítios de DNAr 5S e 45S em 37 acessos selvagens e domesticados do feijão comum, representantes do *pool* gênico Mesoamericano e Andino. Os dois sítios de DNAr 5S mostraram-se bastante conservados dentro da espécie, enquanto houve uma grande variação no número de locos de DNAr 45S, em sua posição e no número de repetições por loco. Observou-se a presença de 3-4 e 6-9 sítios, para os representantes Mesoamericanos e Andinos, respectivamente, sugerindo que mecanismos de recombinação ectópica entre regiões cromossômicas terminais seriam responsáveis pela gênese da variação observada.

A técnica de FISH também foi utilizada para localização de outras sequências repetitivas nos cromossomos do feijão comum. Recentemente, Richard *et al.* (2013) isolaram e caracterizaram uma sequência de DNA satélite gênero-específica (*Khipu*) presente nas regiões subteloméricas do feijoeiro, contudo distribuída de forma desigual entre cromossomos não homólogos. Esta distribuição corrobora com o fato que as regiões subteloméricas dos cromossomos são dinâmicas e possuem rápida evolução. Adicionalmente, Ribeiro *et al.* (2011) também isolaram e caracterizaram, a partir dos conjuntos gênicos Mesoamericano e Andino de *P. vulgaris*, uma nova família de DNA repetitivo, denominada PvMeso. Esta sequência possui uma localização terminal nos cromossomos do feijoeiro e parece ter sido amplificada recentemente ao longo da evolução do genoma no gênero *Phaseolus*.

Os cromossomos do feijão comum puderam ser identificados corretamente devido à integração dos mapas genético e citogenético, relacionando todos os grupos de ligação a seus respectivos cromossomos (Pedrosa-Harand, *et al.*, 2009;

Fonsêca *et al.*, 2010). Além disso, análises de sintonia interespecífica em *Phaseolus* foram recentemente realizadas mediante BAC-FISH utilizando sequências únicas de *P. vulgaris* em *P. lunatus* e *P. microcarpus* (Bonifácio *et al.*, 2012; Almeida e Pedrosa-Harand, 2013; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Realizar um estudo genômico comparativo entre *Vigna* e *Phaseolus*, mediante localização *in situ* de sequências de *P. vulgaris* em cromossomos de *V. unguiculata*, a fim de colaborar para o entendimento das relações de macrossintenia existente entre os dois gêneros.

3.2 Objetivos específicos

1. Obter um mapa citogenético para *V. unguiculata*, mediante FISH de BACs contendo fragmentos de DNA dos 11 cromossomos de *P. vulgaris*.
2. Comparar o mapa citogenético gerado para *V. unguiculata* com os existentes na literatura para *P. vulgaris*, *P. lunatus* e *P. microcarpus*, a fim de observar as relações macrossintênicas entre espécies de ambos os gêneros.

4. Materiais e métodos

4.1. Material vegetal

Sementes de *V. unguiculata* cv. BR14-mulato e *P. vulgaris* cv. BRS-Esplendor foram obtidas a partir da Embrapa Meio-Norte (Teresina, Brasil) e Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, Brasil), respectivamente, e multiplicadas pelo IPA (Instituto Agrônômico de Pernambuco, Recife, Brasil).

4.2. Preparação cromossômica

Para as preparações cromossômicas mitóticas, pontas de raízes obtidas a partir de sementes recém-germinadas foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8HQ) a 2 mM, a 18 °C por 4,5 h, fixadas em metanol: ácido acético (3:1; v/v) por 6 h a temperatura ambiente e armazenadas a -20 °C. Em seguida, foram lavadas três vezes em água destilada e digeridas em solução de celulase 2% (p/v, Onozuka, solução de R-10, Serva) e pectinase 20% (v/v, Sigma-Aldrich) durante 4 h a 37 °C. Para a preparação das lâminas seguiu-se o procedimento descrito por Carvalho e Saraiva (1993). As lâminas foram coradas com solução de DAPI (2 µg/mL): glicerol (1:1; v:v) para permitir a seleção das melhores lâminas. Posteriormente, foram descoradas em etanol: ácido acético (3:1; v:v) por 30 min, e transferidas para etanol absoluto por 1 h, ambos a temperatura ambiente. Após secagem ao ar, as melhores lâminas foram armazenadas a -20 °C para uso na FISH.

Para cromossomos paquitênicos, botões florais foram fixados em etanol: ácido acético glacial (3:1, v/v), durante 6 h à temperatura ambiente e armazenados a -20 °C. Em seguida, foram digeridos em 2% (p/v) de celulase Onozuka R-10 (Serva), 1%

(p/v) pectoliase (Sigma-Aldrich), e 1% (p/v) citohelicase (Sigma-Aldrich) durante 4 h a 37 °C, as anteras foram esmagadas em ácido acético a 45% e as lâminas congeladas em nitrogênio líquido para remoção das lamínulas. A seleção das lâminas foi realizada como descrito anteriormente.

4.3. Sondas de DNA

Clones BAC da biblioteca genômica de *P. vulgaris* 'BAT93' *Hind*III (Kami *et al.*, 2006) foram previamente selecionados em filtros de alta densidade por meio de marcadores geneticamente mapeados (*Bng*, clones plasmidiais do genoma do feijão, provenientes do mapa da Universidade da Flórida, Vallejos *et al.*, 1992) e "*legume markers*" mapeados em Hougaard *et al.* (2008), como descrito por (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010). Adicionalmente, um clone bacteriófago mapeado para um loco de resistência à antracnose também foi utilizado neste trabalho (Fonsêca *et al.*, 2010). Trinta e sete clones de *P. vulgaris* (*Pv*) contendo marcadores pertencentes aos 11 grupos de ligação (GL)/ cromossomos (H/ *Pv*1; D/ *Pv*2; C/ *Pv*3; B/ *Pv*4; E/ *Pv*5; G/ *Pv*6; A/ *Pv*7; F/ *Pv*8; K/ *Pv*9; I/ *Pv*10; J/ *Pv*11) foram utilizados para a hibridização *in situ* em cromossomos mitóticos metafásicos de *V. unguiculata* (Tabela 1). Estes clones foram selecionados por terem sido previamente localizados *in situ* em cromossomos de espécies de *Phaseolus*. Adicionalmente, R2, um fragmento de 6,5 Kb, contendo a unidade de repetição de DNAr 18S-5,8S-25S, oriunda de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Wanzenböck *et al.*, 1997) e D2, um fragmento de 400 pb contendo duas unidades de repetição de DNAr 5S, proveniente de *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (Pedrosa *et al.*, 2002), foram utilizados como sondas, o que contribuiu para a identificação dos cromossomos de *V. unguiculata*. O

DNA dos clones BACs, bacteriófago e plasmidiais foram isolados com o *Plasmid Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os clones BACs e bacteriófago selecionados, DNAr 45S e 5S foram marcados por *nick translation* com Cy3-dUTP (Jena Bioscience), digoxigenina-11-dUTP (Roche) e biotina-11-dUTP (Roche), respectivamente.

4.4. FISH

Os pré-tratamentos da FISH e as lavagens pós-hibridização foram baseados em Pedrosa *et al.* (2009), no qual a lavagem de estringência (77%) foi realizada em 0,1× SSC a 42 °C. A desnaturação dos cromossomos e das sondas foram efetuados de acordo com Heslop-Harrison *et al.* (1991). Para BACs com resultado de ausência de sinal, também foram testadas as estringências de 52% e 65%. As misturas de hibridização consistiram de formamida 50% (v/v), sulfato de dextran 10% (p/v), 20× SSC e 1-5 ng/μL de sonda e foram desnaturadas a 75 °C durante 10 min. Para alguns clones, a fração C_0t-100 de *P. vulgaris* foi adicionada em proporções de 5×, 20×, 30× ou 50× concentrada com o intuito de bloquear sequências repetitivas (Tabela 1). A obtenção da referida fração foi realizada segundo o protocolo de Zwick *et al.* (1997). Cada lâmina recebeu 10 μL da mistura de hibridização e foi hibridizada durante pelo menos 24 h a 37 °C. As sondas marcadas com digoxigenina e biotina foram detectadas usando antidigoxigenina conjugada com rodamina (Roche) e estreptavidina conjugada com *Alexa Fluor* (Invitrogen), respectivamente, em BSA 1% (p/v). Todas as preparações foram montadas com 2 μg/mL de DAPI em Vectashield (1:1, v/v) (Vector). Rehibridizações sequenciais de lâminas para localização de

sequências de DNA diferentes na mesma célula foram realizadas em até três vezes, de acordo com Heslop-Harrison *et al.* (1992).

4.5. Análise dos dados

Imagens das melhores células foram obtidas utilizando microscópio de epifluorescência Leica DMLB, câmera Leica DFC 340FX e software CW 4000 da Leica. As imagens foram pseudocoloridas e otimizadas para melhor brilho e contraste com o Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated).

A construção do idiograma dos cromossomos de *V. unguiculata* (*Vu*) foi realizada de acordo com Pedrosa-Harand *et al.* (2009) e Fonsêca *et al.* (2010), utilizando ferramentas do programa Image tool 3.0. Após identificação dos cromossomos por FISH, o tamanho relativo dos cromossomos e a razão dos braços foram calculados com base em medições do comprimento total dos cromossomos e dos braços cromossômicos de cinco metáfases mitóticas após coloração com DAPI. A distância entre o telômero do braço curto e o centro do sinal e o comprimento total das cromátides também foram medidas. Em seguida, a posição relativa do sinal ao longo das cromátides foi determinada como um resultado da relação entre a primeira e a segunda medição. A parte superior do braço curto convencionalmente foi determinada como 0 (zero) e a parte inferior do braço longo foi convencionalmente determinada como 1 (um). O valor final foi composto por uma média de medições realizadas em 10 cromátides de células selecionadas. Os cromossomos de *V. unguiculata* foram classificados de acordo com seu tamanho (em ordem decrescente) e identificados por letras, de acordo Bortoleti *et al.* (2012).

Tabela 1. Lista de 37 clones de *Phaseolus vulgaris*, com seus respectivos cromossomos (Pv)/grupos de ligação (LG), marcas Bng e Leg, FISH em *P. vulgaris* e em *Vigna unguiculata* (com ou sem DNA bloqueador).

Cromossomo/ LG/	Marcador Molecular	BAC/ Localização <i>in situ</i> em <i>P. vulgaris</i> (com ou sem adição da fração C ₀ t-100)	Localização <i>in situ</i> em <i>V. unguiculata</i> (com ou sem adição da fração C ₀ t-100)
Pv1/ B1 ¹ ,H ²	Bng41 ³	221F15/ Proximal curto (20x)	Proximal curto (5x), VuK ⁷
	Bng171 ³	38C24/ Terminal longo (0x)	Terminal longo (50x), VuG
	Bng173 ³	257L12/ Terminal longo (0x)	Terminal longo (0x), VuG
Pv2/ B2,D	Bng 45 ³	225P10/ Terminal longo (0x)	Terminal curto (0x), VuA
	Bng 57 ³	14F2/ Subtelomérico (100x)	Intersticial curto (0x), VuI
	L188 ⁴	127F19/ Intersticial longo (0x)	Terminal curto (50x), VuA
	L224 ⁴	17P14/ Subtelomérico (0x)	Ausência de sinal único (0x)
	4-Gm ⁴	21N14/ Intersticial longo (80x)	Ausência de sinal único (0x)
Pv3/ B3,C	Bng16 ⁵	267H4/ Intersticial curto (50x)	Intersticial curto (50x), VuA
	Bng33 ⁵	174E13/ Terminal longo (0x)	Intersticial longo (0x), VuA
	Bng106 ⁵	147K17/ Intersticial curto (0x)	Proximal curto e longo (0x), VuA
Pv4/ B4,B	Bng151 ⁵	221J10/ Intersticial curto (50x)	Terminal curto (50x), VuH
	Bng184 ⁵	190C15/ Intersticial longo (50x)	Terminal curto (20x), VuH
Pv5/ B5,E	Bng 49 ³	36H21/ Intersticial longo (70x)	Ausência de sinal único (0x)
	Bng 133 ³	230M2/ Pericentromérico (0x)	Ausência de sinal único (0x)
	Bng 152 ³	193O2/ Pericentromérico (0x)	Ausência de sinal único (0x)
Pv6/ B6,G	Bng 95 ³	121F15/ Intersticial longo (0x)	Ausência de sinal único (0x)
	Bng 202 ³	18B15/ Terminal longo (0x)	Terminal curto (0x), VuB
Pv7/ B7,A	Bng 28 ⁵	12M3/ Pericentromérico (0x)	Ausência de sinal único (0x)
	Bng 28 ⁵	22121/ Intersticial longo (50x)	Terminal curto (0x), VuE
	Bng 42 ⁵	193F10/ Terminal curto (5x)	Ausência de sinal único (0x)
	Bng 47 ⁵	267K20/ Terminal longo (0x)	Ausência de sinal único (0x)
	Bng 191 ⁵	86117/ Subtelomérico (50x)	Terminal longo (0x), VuE
Pv8/ B8,F	Bng58 ³	169G16/ Terminal longo (50x)	Terminal longo (50x), VuK
	Bng138 ³	177I19/ Intersticial curto (0x)	Terminal longo (0x), VuC
Pv9/ B9,K	Bng 2 ³	224I16/ Terminal longo (50x)	Terminal curto (50x), VuF
	L159 ⁴	123O22/Pericentromérico (50x)	Ausência de sinal único (0x)
	L207 ⁴	163I7/ Intersticial longo (20x)	Ausência de sinal único (0x)

Continuação Tabela 1...

<i>Pv10/ B10,I</i>	<i>Bng 200</i> ³	173P6/ Intersticial longo (20x)	Ausência de sinal único (0x)
Bacteriófago ⁶	<i>Bng 200</i> ³	SJ19.12 ⁵ / Intersticial longo (0x)	Intersticial longo (30x), <i>VuD</i>
	<i>Bng 218</i> ³	63H06/ Subtelomérico (0x)	Ausência de sinal único (0x)
	<i>Bng 218</i> ³	81A17/ Pericentromérico (0x)	Ausência de sinal único (0x)
	L177 ⁴	119E19/ Subtelomérico (0x)	Ausência de sinal único (0x)
<i>Pv11/ B11,J</i>	<i>Bng 1</i> ³	25D1/ Intersticial longo (60x)	Ausência de sinal único (0x)
	<i>Bng 112</i> ³	179N14/ Terminal curto (0x)	Terminal longo (0x), <i>Vul</i>
	<i>Bng 25</i> ³	255F18/ Intersticial curto (0x)	Ausência de sinal único (0x)
	L220 ⁴	127J2/ Terminal longo (0x)	Terminal curto (0x), <i>Vul</i>

¹ Grupos de ligação (LG) definidos por Freyre *et al.* (1998) para *P. vulgaris*.

² Grupos de ligação descritos por Vallejos *et al.* (1992) para *P. vulgaris*.

³ Marcas mapeadas em Fonsêca *et al.* (2010) para *P. vulgaris*.

⁴ *Legume markers* mapeados em Hougaard *et al.* (2008) e Fonsêca *et al.* (2010) para *P. vulgaris*.

⁵ Marcas mapeadas em Pedrosa-Harand *et al.* (2009) para *P. vulgaris*.

⁶ Clone bacteriófago mapeado em Fonsêca *et al.* (2010) para *P. vulgaris*.

⁷ Cromossomos classificados de acordo com Bortoleti *et al.* (2012) para *V. unguiculata*.

5. Resultados

Trinta e sete clones mapeados previamente nos cromossomos de *P. vulgaris* (*Pv*) (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010) foram hibridizados *in situ* em cromossomos metafásicos de *V. unguiculata* (*Vu*, $2n = 22$, morfologia metacêntrica e submetacêntrica) (Tabela 1; Figuras 1, 2 e 3). Dos 37 clones, 20 apresentaram marcação única localizadas em dez cromossomos de *V. unguiculata* de forma satisfatória e 17 não apresentaram sinal único, revelando marcações dispersas muito fracas. Para BACs com ausência de sinal único foram realizadas FISH a 52% e 65% de estringência, contudo nenhum sinal único foi visualizado. Adicionalmente, para os BACs 17P14 (*Pv2*), 121F5 (*Pv6*) e 25D1 (*Pv11*) foram observadas fortes marcações dispersas principalmente nas regiões terminais sob a estringência de 52%. É importante ressaltar que todas as sondas hibridizadas foram testadas previamente em lâminas de *P. vulgaris* como controle positivo para confirmação da presença de sinal único. Para nove clones [38C24 e 221F15 (*Pv1*), 127F19 (*Pv2*), 267H4 (*Pv3*), 190C15 e 221J10 (*Pv4*), 169G16 (*Pv8*), 224I16 (*Pv9*) e SJ19.12 (*Pv10*)], o DNA bloqueador (fração C_0t-100) em excesso de 5x, 20x, 30x ou 50x foi adicionado à mistura de hibridização (ver Tabela 1), uma vez que, em *P. vulgaris*, a maioria destes clones apresentaram marcações dispersas ao longo dos cromossomos na ausência da fração C_0t (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010).

Três BACs pertencentes a *Pv1* (Fonsêca *et al.*, 2010) foram hibridizados *in situ* em dois cromossomos de *V. unguiculata* (*Vu*) (Tabela 1; Figura 1a, b; Figura 3a). O BAC 257L12 (terminal, braço longo de *Pv1*) apresentou marcação terminal no braço longo de um par de *V. unguiculata* portador de DNAr 45S no braço curto

(VuG). O BAC 38C24 (terminal, braço longo de Pv1) foi localizado adjacente ao BAC 257L12, em posição mais proximal que este, também em VuG (Figuras 1a, b; 3a). O terceiro BAC de Pv1 (221F15, proximal, braço curto), por sua vez, apresentou um sinal único proximal no braço curto de outro pequeno par cromossômico (VuK), juntamente com o BAC 169G16 (terminal, braço longo de Pv8), que hibridizou na região terminal do braço longo de VuK (Figuras 2a, c; 3a). A presença de dois BACs de cromossomos diferentes (Pv1 e Pv8) (Fonsêca *et al.*, 2010) em VuK sugere a ocorrência de um evento de translocação na divergência dos cromossomos dos dois gêneros (Figura 2c; 3a-b). O BAC 177I19 (intersticial, braço curto de Pv8), por sua vez, foi hibridizado em região terminal do braço longo de um terceiro par de *V. unguiculata* (VuC) (Figuras 1b; 2a, c; 3a-b).

Dois BACs pertencentes a Pv2 foram hibridizados *in situ* no maior par cromossômico de *V. unguiculata* (VuA), não portador de DNAr (Tabela 1; Figuras 1a, c; 3a). O BAC 127F19 (intersticial, braço longo de Pv2) apresentou marcação terminal no braço curto de VuA, enquanto o BAC 225P10 (terminal, braço longo de Pv2) apresentou sinal único terminal, sendo localizado anteriormente ao 127F19 (dados de *P. vulgaris* baseados em Fonsêca *et al.*, 2010). Ainda de Pv2, foi hibridizado o BAC 14F2 (subtelomérico repetitivo em Pv, 100xC₀t). Este clone (portador da marca *Bng 57*, localizado na região terminal do grupo de ligação D, em Pv2, Tabela 1) apresentou sinal único intersticial no par cromossômico Vul (Figuras 1a; 2f; 3a). Dois BACs de Pv11 também foram localizados em Vul. O clone 127J2 (terminal, braço longo de Pv11) foi hibridizado na região terminal do braço curto de Vul, enquanto que o BAC 179N14 (terminal, braço curto de Pv11) foi localizado na região terminal do braço longo (Figuras 2a, f; 3a). Com base nisso, sugere-se a

ocorrência de um evento de translocação, envolvendo os cromossomos *Pv2* e *Pv11* ou *VuA* e *VuI*, ao longo da evolução (Figura 2f; 3a-c). Após reibridização com DNAr 45S e 5S, foi observado que *VuI* é portador de um pequeno sítio extra terminal de DNAr 45S em seu braço curto, não descrito anteriormente na literatura (Galasso *et al.*, 1995; Guerra *et al.*, 1996; Bortoleti *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013). Este mesmo cromossomo também é portador de DNAr 5S proximal no braço curto.

Três BACs de *Pv3* também foram hibridizados no maior par (*VuA*) (Tabela 1; Figuras 1a, c, d; 3a). Isto indica, ao longo da evolução cariotípica, a ocorrência de uma translocação envolvendo os cromossomos *Pv2* e *Pv3* em *P. vulgaris* ou envolvendo *VuA* e um segundo cromossomo em *V. unguiculata* (Figuras 1c, d; 3a-b). O BAC 267H4 (intersticial, braço curto de *Pv3*) (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009) apresentou sinal único em região intersticial no braço curto de *VuA*. O BAC 174E13 (terminal, braço longo de *Pv3*) apresentou marcação intersticial no braço longo também de *VuA*. Contudo, o BAC 147K17 (intersticial, braço curto de *Pv3*) mostrou marcação duplicada em regiões proximais do referido cromossomo. Um sítio foi localizado no braço curto de forma proximal e adjacente a 267H4 e o outro no braço longo, também proximal adjacente ao sítio 174E13. A posição relativa entre 147K17 e 267H4 foi definida em BAC-FISH de cromossomos paquitênicos, onde aparentemente ambos os marcadores flanqueiam a heterocromatina pericentromérica. Em paquíteno, também foi evidenciada uma duplicação local para o sítio do BAC 147K17 adjacente a 267H4 (Figuras 1d). Em *P. vulgaris* (*Pv3*) (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009), diferentemente, a posição de 267H4 foi proximal em relação 147K17, indicando uma inversão paracêntrica para essas duas marcas em relação à *V. unguiculata*, com ausência de duplicação (Figura 1d; 3a-b). Com relação

ao BAC 174E13 (também *Pv3*), este se mostrou intersticial no braço longo em *VuA* ao invés de terminal, como observado em *Pv3* (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009).

Dois BACs (221J10 e 190C15) localizados em regiões intersticiais dos braços curto e longo de *Pv4*, respectivamente (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009), foram hibridizados em *VuH*, ambos em região terminal do braço curto (Figuras 1a, e; 3a). O resultado sugere a ocorrência de um evento de inversão pericêntrica entre as duas espécies (Figura 1e; 3a-c). Do cromossomo *Pv6*, foi mapeado um BAC em *VuB*. O BAC 18B15 (terminal, braço longo de *Pv6*) apresentou sinal único na região terminal do braço curto do segundo maior par cromossômico, portador de um grande bloco de DNAr 45S, terminal, em seu braço longo (Tabela 1; Figuras 1a, f; 3a). De *Pv7*, dois BACs foram hibridizados. O BAC 22I21 (intersticial, braço longo de *Pv7*) apresentou marcação na região terminal do braço curto, enquanto o BAC 86I17 (subtelomérico repetitivo em *Pv7*) foi localizado terminalmente no braço longo em *VuE* (Tabela 1; Figuras 2a, b; 3a). De *Pv9*, o BAC 224I16 (terminal, braço longo de *Pv9*) apresentou marcações dispersas que dificultaram a visualização da marcação BAC como sinal único. Após a adição da fração *C₀t-100*, em excesso de 50x, foi possível mapear esta marca na região terminal do braço curto em *VuF* (Tabela 1; Figuras 2a, d; 3a). Este cromossomo é portador de um pequeno sítio proximal de DNAr 45S nem sempre perceptível, localizado no braço longo.

De *Pv10* foi hibridizado o clone bacteriófago SJ19.12 (intersticial, braço longo de *Pv10*) correspondente a um loco de resistência à antracnose. Esse clone foi localizado, muito fracamente, na região intersticial do braço longo de *VuD*, após uso da fração *C₀t-100* em excesso de 30x (Tabela 1; Figuras 2a, e; 3a). Este par cromossômico é portador de DNAr 45S (terminal, braço longo) e 5S (intersticial,

braço curto), em braços opostos. Este par possui um pequeno sítio adicional de DNAr 45S, adjacente ao grande bloco terminal no braço longo, não perceptível em alto grau de condensação por sua junção com o bloco maior adjacente. Este pequeno sítio não foi descrito anteriormente na literatura.

Com relação aos sítios de DNAr, *V. unguiculata* apresentou quatro e 14 sítios de DNAr 5S e 45S, em quatro e 12 cromossomos, respectivamente. Enquanto, *P. vulgaris* cv. BRS Esplendor (*pool* gênico Mesoamericano) apresentou quatro e seis sítios de DNAr 5S e 45S, respectivamente. Os pares cromossômicos *VuB*, *VuD* e *VuF* apresentaram sítios de DNAr, da mesma forma que o observado para seus respectivos cromossomos homeólogos em *Phaseolus* (*Pv6*, *Pv10* e *Pv9*), com algumas modificações (Fonsêca *et al.*, 2010; Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca e Pedros-Harand, 2013). Por outro lado, os sítios em *VuG* e *VuI* não foram presentes em seus prováveis homeólogos (*Pv1* e *Pv11*, respectivamente). Adicionalmente, os sítios extras que não haviam sido reportados anteriormente na literatura para *V. unguiculata*, observados em *VuD* e *VuI*, podem ser decorrentes do uso de uma sonda mais eficiente, como consequência de um aumento na quantidade de DNA polimerase durante a marcação da sonda por *nick translation*.

De forma geral, além de translocações, inversões e duplicações, outros rearranjos cromossômicos parecem ter ocorrido ao longo da evolução cariotípica desses legumes, uma vez que os clones BACs 127F19 e 225P10 (*Pv2-VuA*), 147K17 e 174E13 (*Pv3-VuA*), 190C15 e 221J10 (*Pv4-VuH*), 18B15 (*Pv6-VuB*), 22I21 (*Pv7-VuE*), 177I19 (*Pv8-VuC*), 224I16 (*Pv9-VuF*), 127J2 e 179N14 (*Pv11-VuI*) foram hibridizados em posições ou cromossomos morfologicamente diferentes quando comparado a *Pv* (Tabela 1; Figura 3a).

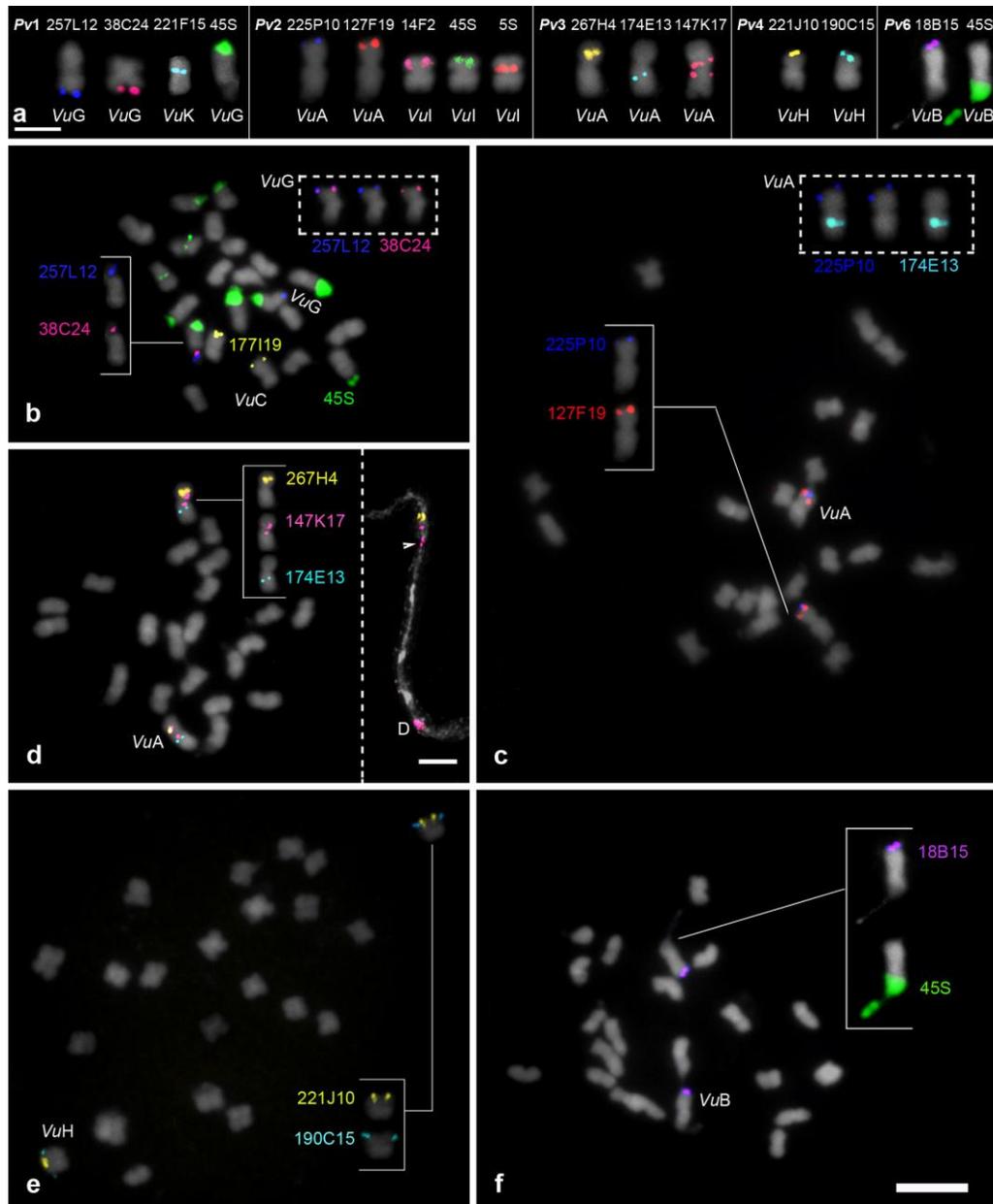


Figura 1. Localização *in situ* de treze BACs geneticamente mapeados em *Phaseolus vulgaris* em cromossomos mitóticos de *Vigna unguiculata* (*Vu*) contracolorados com DAPI (pseudocolorido em cinza). (a) Cromossomos de *V. unguiculata* (*VuA*, *VuB*, *VuG*, *VuH*, *VuL*, *VuK*) hibridizados com BACs provenientes de seis cromossomos de *P. vulgaris* (*Pv1*, *Pv2*, *Pv3*, *Pv4*, *Pv5* e *Pv6*; Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010). Os BACs marcados com Cy3-dUTP foram pseudocoloridos em diferentes cores. (b) 257L12 (azul escuro), 38C24 (rosa) e DNAr 45S (verde) mapeados em *VuG* e 177119 (amarelo) em *VuC*. (c) BACs em *VuA*: 127F19 (vermelho), 225P10 (azul escuro) e 174E13 (azul claro). (d) BACs em *VuA*: 267H4 (amarelo), 174E13 (azul claro) e 147K17 (rosa). A cabeça de seta indica uma duplicação local e "D" uma duplicação no braço longo no cromossomo paquitênico *VuA*. (e) BACs em *VuH*: 221J10 (amarelo) e 190C15 (azul). (f) BACs em *VuB*: 18B15 (roxo) e DNAr 45S (verde). As inserções tracejadas em b, c e d mostram um cromossomo de outra célula, indicando a posição relativa dos dois BACs. A barra em a representa 2,5 μ m; em d (para o cromossomo paquitênico) e f (para as figuras b-f) representam 5 μ m.

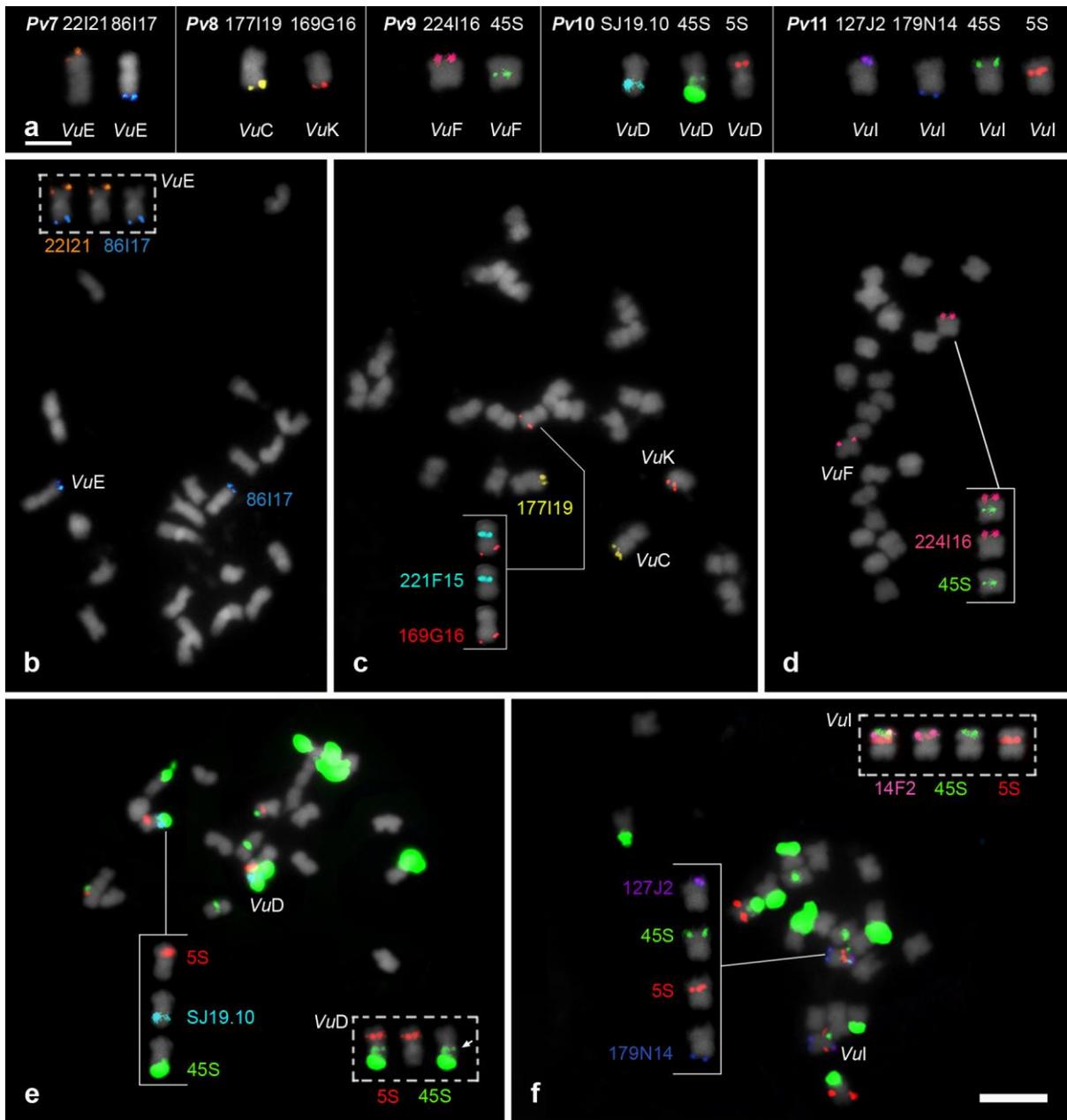


Figura 2. Localização *in situ* de nove BACs e um clone bacteriófago geneticamente mapeados em *Phaseolus vulgaris* em cromossomos mitóticos de *Vigna unguiculata* (*Vu*) contrainformados com DAPI (pseudocolorido em cinza). (a) Cromossomos de *V. unguiculata* (*Vu*C, *Vu*D, *Vu*E, *Vu*F, *Vu*I) hibridizados com BACs provenientes de cinco cromossomos de *P. vulgaris* (*Pv*7, *Pv*8, *Pv*9, *Pv*10 e *Pv*11; Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010). Os BACs marcados com Cy3-dUTP foram pseudocoloridos em diferentes cores. (b) BACs mapeados em *Vu*E: 22I21 (laranja) e 86I17 (azul). (c) BACs mapeados em *Vu*K: 221F15 (azul) e 169G16 (vermelho), e para *Vu*C: 177I19 (amarelo). (d) BAC mapeado em *Vu*F: 224I16 (rosa) e DNAr 45S (verde). (e) Bacteriófago mapeado em *Vu*D: SJ19.10 (azul), DNAr 45S (verde) e DNAr 5S (vermelho). (f) BACs mapeados em *Vu*I: 14F2 (rosa), 127J2 (roxo), 179N14 (azul), DNAr 45S (verde) e DNAr 5S (vermelho). Os insertos tracejados em b, e e f correspondem a um cromossomo de outra célula, indicando a posição relativa das marcas. A seta no inserto em e destaca o pequeno sítio extra de DNAr 45S. A barra em a representa 2,5 μ m; em f representa 5 μ m.

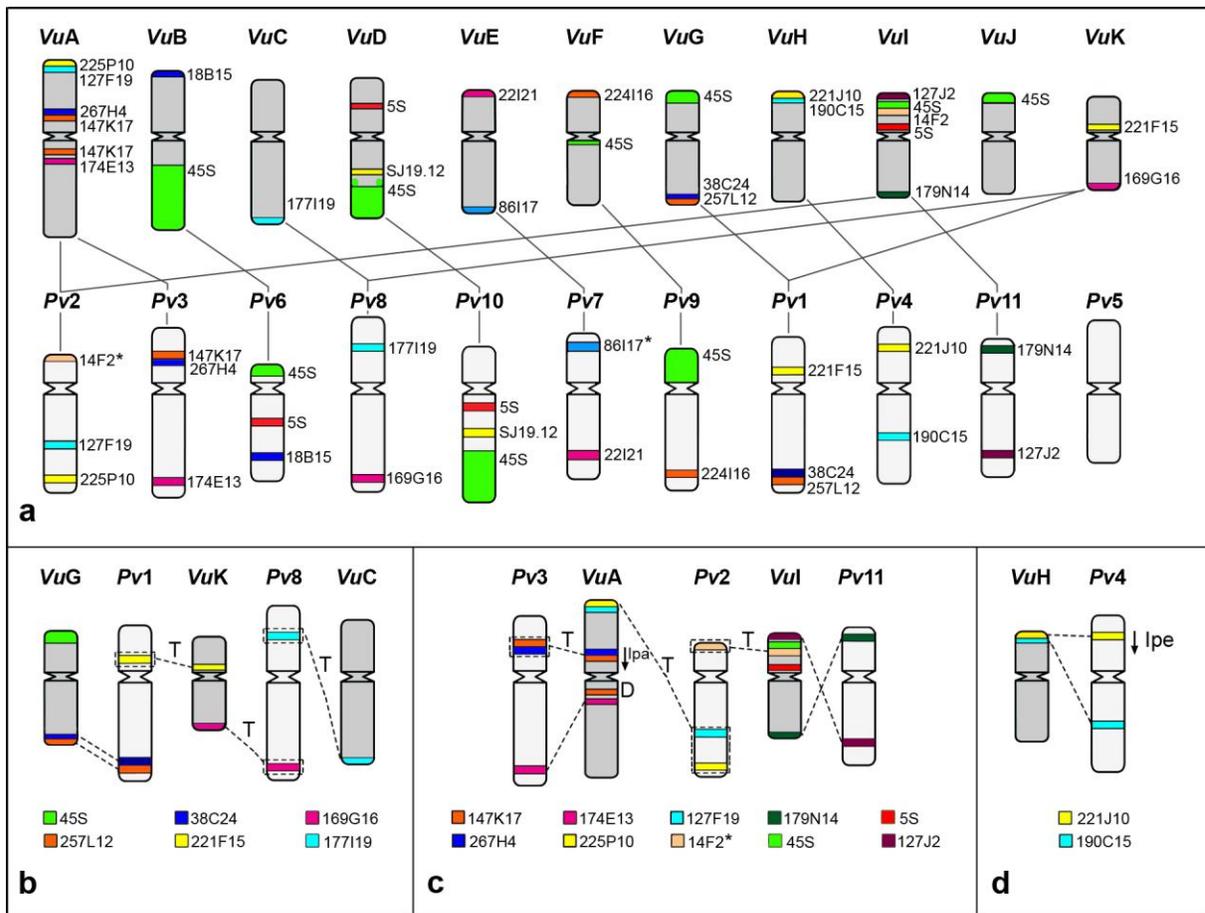


Figura 3. Representação esquemática do mapeamento comparativo de 11 cromossomos de *Vigna unguiculata* (*Vu*) hibridizados com 19 BACs e um clone bacteriófago provenientes dos 11 cromossomos de *Phaseolus vulgaris* (*Pv*) (a) e os possíveis rearranjos em relação a seis cromossomos de *P. vulgaris* encontrados por BAC-FISH (b, c, d). As marcas evidenciadas para *P. vulgaris* foram modificadas a partir de Pedrosa-Harand *et al.* (2009) e Fonsêca *et al.* (2010). Foram observados quatro tipos de rearranjos cromossômicos: (b e c) translocações (T); (c) duplicação para o BAC 147K17 (D) e inversão paracêntrica (Ipa) e (d) inversão pericêntrica (Ipe). *Os BACs 14F2 (*Bng* 57, terminal no grupo de ligação D - Vallejos *et al.*,1992) representado em bege e 86117 (*Bng* 191, terminal no grupo de ligação A - Vallejos *et al.*,1992) representado em azul não foram mapeados como sinal único para *Pv2* e *Pv7*, respectivamente (subteloméricos repetitivos). O BAC 14F2 foi representado como um provável sinal único terminal em *Pv2* e o BAC 86117 foi posicionado como sinal único em *Pv7*, de acordo com a localização do mesmo em *P. lunatus* (Almeida e Pedrosa-Harand, 2013).

6. Discussão

A técnica BAC-FISH utilizando sequências de DNA de *P. vulgaris* previamente selecionadas e mapeadas (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010) e utilizadas como sondas em cromossomos de *V. unguiculata* possibilitou o reconhecimento dos 11 pares cromossômicos de *V. unguiculata*, os quais são difíceis de serem identificados por apresentarem tamanho e morfologia semelhantes (Bortoleti *et al.*, 2012). Este é o primeiro mapa físico do caupi construído por BAC-FISH. Como o genoma montado de *V. unguiculata* ainda não está disponível, a FISH de sequências de *P. vulgaris* pode ser considerada alternativa eficaz para a análise da macrossintenia entre os cromossomos das duas espécies, colaborando para estudos de sintenia e para o entendimento da evolução cariotípica do grupo.

As leguminosas têm sido objeto de extensas pesquisas genômicas, incluindo sequenciamento completo, construção de bibliotecas BAC, uso de marcadores moleculares e análises de transcriptoma, o que tem colaborado para o entendimento de suas relações interespecíficas e intergenéricas (Diouf, 2011; Young e Bharti, 2012; Ferreira-Neto *et al.*, 2013; Iwata *et al.*, 2013; Varshney *et al.*, 2013). Diversos estudos têm mostrado uma macrossintenia entre as leguminosas, com poucos rearranjos cromossômicos entre espécies do mesmo gênero, como observado, por exemplo, para *Glycine max* (*Gm*) e *G. soja*, (Findley *et al.*, 2010) e para *P. vulgaris* e *P. lunatus* em estudos citocomparativos (Bonifácio *et al.*, 2012; Almeida e Pedrosa-Harand, 2013). Mesmo entre *P. vulgaris* e *P. microcarpus* (espécie filogeneticamente mais distante, Delgado-Salinas *et al.*, 2006) foi observada uma forte sintenia com apenas três quebras de colinearidade (Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

Em leguminosas de gêneros distintos, uma sintenia parcial dos genomas vem sendo descrita em estudos envolvendo espécies com níveis de ploidia, tempos de divergência, números cromossômicos e tamanhos do genoma distintos (Arumuganathan e Earle *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2004; Stefanovic *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2010; Bordat *et al.*, 2011; Shirasawa *et al.*, 2013; <http://comparative-legumes.org/>). Por exemplo, comparando mapas genéticos de espécies pertencentes ao clado Phaseoloids, foi observada uma extensa macrossintenia entre *P. vulgaris* e *G. max* (McClellan *et al.*, 2010), bem como entre *V. unguiculata* e *G. max* (Muchero *et al.*, 2009; Lucas *et al.*, 2011).

Contudo, análises de sintenia semelhantes às descritas acima ainda não estão disponíveis na literatura para os genomas de *P. vulgaris* e *V. unguiculata*. As comparações em relação à *P. vulgaris* se restringem à *V. radiata* (*Vr*) (Boutin *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2004), uma espécie localizada em posição basal em relação a *V. unguiculata* no gênero *Vigna* (Simon *et al.*, 2007; Delgado-Salinas *et al.*, 2011). Na comparação entre os cromossomos *Pv1* e *Pv8* de *P. vulgaris* e *Vr2* e *Vr6* de *V. radiata*, por exemplo, uma translocação recíproca entre os cromossomos *Pv1* e *Pv8* também foi sugerida por Choi *et al.* (2004) de modo semelhante ao observado no presente trabalho para *Pv1* e *Pv8* em relação à *VuK* de *V. unguiculata*. Uma diferença em relação a *V. radiata* é que, em *V. unguiculata*, outras alterações devem ter ocorrido envolvendo um terceiro cromossomo (*VuC*) na divergência em relação a *P. vulgaris*. Os referidos eventos de translocação devem ser posteriores à divergência de *Phaseolus* e *Vigna*, e, caso tenham ocorrido na linhagem que deu origem a *Phaseolus*, teriam que ter ocorrido no início da diversificação do gênero, uma vez que as marcas são colineares em *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009;

Fonsêca *et al.*, 2010), *P. lunatus* (Bonifácio *et al.*, 2012; Almeida e Pedrosa-Harand, 2013) e *P. microcarpus* (Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). O mesmo é verdadeiro para as demais translocações observadas neste trabalho, envolvendo os cromossomos *Pv2* e *Pv3* em relação a *VuA* e entre *Pv2* e *Pv11*, em relação a *VuI*, bem como as inversões paracêntricas e pericêntricas, observadas em *VuA* (com BACs de *Pv3*) e em *VuH* (com BACs de *Pv4*), respectivamente, que não foram relatadas na literatura.

Com base no estudo de Boutin *et al.* (1995), o *Bng106* (BAC 147K17), envolvido em uma duplicação em *V. unguiculata* (*VuA*), parece não estar duplicado em *V. radiata*, mas aparentemente fora de ordem em relação às demais marcas do bloco conservado do grupo de ligação C (*Pv3*) associado ao LG1 de *V. radiata*. Nesse caso, o evento de duplicação em *V. unguiculata* seria aparentemente posterior à divergência das duas espécies de *Vigna*. Em *Phaseolus*, *P. vulgaris* e *P. lunatus* mostram apenas uma cópia única do referido BAC (Bonifácio *et al.*, 2012; Almeida e Pedrosa-Harand, 2013). Por outro lado, *P. microcarpus* (espécie selvagem mais distante filogeneticamente) evidencia uma inversão pericêntrica em relação às duas espécies de *Phaseolus* bem como uma duplicação e transposição para 147K17, porém em par cromossômico diferente (*Pm6*, em adição ao *Pm3*) (Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). As duplicações em ambas as espécies parecem ter ocorrido de forma independente, embora essa região pareça ser um sítio quente para duplicações.

No cromossomo *VuA*, por exemplo, as marcas duplicadas flanqueiam uma região de heterocromatina pericentromérica, caracterizada anteriormente por FISH pela presença de DNA satélite (*Dral*), microssatélites e retroelementos (Galasso *et*

al., 1995; Bortoleti, 2010). Estas sequências apresentam uma habilidade de serem modificadas, amplificadas e/ou eliminadas em um intervalo de tempo evolutivo rápido, por diferentes mecanismos como crossing-over desigual, conversão gênica, *slippage* da maquinaria de replicação (DNA polimerase), replicação saltatória e amplificação em círculo rolante (Eickbush e Eickbush, 2007; Bhargava e Fuentes, 2009; Cohen e Segal, 2009). Dessa forma, as sequências flaqueadoras dessa região poderiam sofrer modificações tais como duplicações e/ou deleções.

Sequências repetitivas também foram observadas para o BAC 86117 (*Pv7*, repetitivo subtelomérico), que contém, além do clone *Bng*, uma sequência repetitiva distribuída em vários terminais cromossômicos de *P. vulgaris*. Este DNA repetitivo foi classificado como uma família de sequência satélite com 528 pb (sequência consenso), denominada *khipu* (David *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2013). Entretanto, essa sequência não foi encontrada por FISH em *V. unguiculata*, observando-se o BAC 86117 como sinal único (em *VuC*), similarmente ao observado para *P. microcarpus* (Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

De um modo geral, os BACs que não apresentaram sinais únicos em cromossomos de *Vu* são portadores de DNA repetitivo, uma vez que não puderam ser mapeados como cópia única em *Phaseolus* (Fonsêca *et al.*, 2010; Bonifácio *et al.*, 2012; Almeida e Pedrosa-Harand, 2013; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013) como, por exemplo, a sequência de DNA repetitivo do BAC 255F18 (*Pv11*) espécie-específica de *P. vulgaris* denominada *PvMeso* (Ribeiro *et al.*, 2011). Dessa forma, a ausência de marcas para os BACs contendo DNA repetitivo pode ter ocorrido devido à presença de sequências repetitivas espécie-específicas ou gênero-específicas ocupando a maior parte dos insertos dos BACs, associada à presença parcial da

marca genética de interesse. Assim, a marca genética não apresentaria tamanho suficiente para ser detectada por FISH nos cromossomos mitóticos metafásicos em *V. unguiculata*. Outra explicação seria a maior divergência de sequência para as referidas marcas entre *P. vulgaris* e *V. unguiculata*.

As sequências repetitivas constituem uma grande parte da maioria dos genomas de plantas, que podem dar origem a variações no tamanho do genoma e no conteúdo de DNA entre espécies proximamente relacionadas (Iwata *et al.*, 2013). Para *P. vulgaris* e *V. unguiculata*, por exemplo, foi observada uma pequena diferença entre seus respectivos conteúdos de DNA (Arumuganathan e Earle, 1991), provavelmente devido à presença de DNAs repetitivos espécie-específicos de *P. vulgaris* e/ou gênero-específicos de *Phaseolus*, observada mediante BAC-FISH (Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). Além da expansão/redução de sequências de DNA repetitivo, os cromossomos evoluem estruturalmente mediante rearranjos que envolvem danos ao DNA (Schubert, 2007; Heslop-Harrison e Schwarzacher, 2011; Lisch, 2013). No presente trabalho, foram visualizadas ao menos três translocações, uma duplicação e duas inversões que ocorreram ao longo da evolução cariotípica dos referidos feijões. Dessa forma, apesar de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* estarem intimamente relacionadas, apresentarem mesmo número cromossômico e tamanho do genoma similares, diversas quebras de macrossintenia foram observadas para as 20 marcas localizadas *in situ* nos dez cromossomos analisados.

7. Conclusões

1. A técnica de BAC-FISH é eficiente para estudos de evolução cariotípica a nível intergenérico no clado phaseoloids, uma vez que 19 BACs e um bacteriófago contendo sequências únicas de *P. vulgaris* puderam ser mapeados em *V. unguiculata*.
2. *Vigna unguiculata* apresenta conservação parcial da macrossintenia quando comparada a espécies do gênero *Phaseolus*, observando-se rearranjos cromossômicos tais como translocações, duplicações e inversões paracêntricas e pericêntricas.

8. Referências Bibliográficas

- Adam-Blondon AF, Sévignac M, Dron M and Bannerot H (1994) A genetic map of common bean to localize specific resistance genes against anthracnose. *Genome* 37:915-924.
- Almeida CCS (2006) Mapeamento físico e análise evolutiva em *Phaseolus vulgaris* L. e *P. lunatus* L., utilizando hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 104 p.
- Almeida CCS and Pedrosa-Harand A (2013) High macro-collinearity between lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.) as revealed by comparative cytogenetic mapping. *Theor Appl Genet* 126:1909-1916.
- Andargie M, Pasquet RS, Muluvi GM and Timko MP (2013) Quantitative trait loci analysis of flowering time related traits identified in recombinant inbred lines of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Genome* 56:289-294.
- Arumuganathan K and Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9:208-218.
- Baudoin JP and Maréchal R (1988) Taxonomy and Evolution of the genus *Vigna*. In: Proceeding of the Second International Mungbean Symposium. Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan, p. 2-12.
- Bennett MD and Leitch IJ (2012) Plant DNA C-values database (release 6.0, Dec. 2012) <http://www.kew.org/cvalues/>
- Bertioli DJ, Moretzsohn MC, Madsen LH, Sandal N, Leal-bertioli SCM *et al.*, (2009) An analysis of synteny of *Arachis* with *Lotus* and *Medicago* sheds new light on the structure, stability and evolution of legume genomes. *BMC Med Genomics* 10:45.
- Bitocchia E, Nannia L, Belluccia E, Rossia M, Giardinia A *et al.*, (2012) Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *PNAS* 109:E788-E796.
- Bonifácio EM, Fonsêca A, Almeida C, Santos KGB and Pedrosa-Harand A (2012) Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 124:1513-1520.
- Bortoleti KCA (2010) Mapeamento cromossômico comparativo em *Glycine* Willd, *Phaseolus* L. e *Vigna* Savi. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 153 p.
- Bortoleti KCA, Benko-Iseppon AM, Melo NF and Brasileiro-Vidal AC (2012) Chromatin differentiation between *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek and *V. unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae). *Plant Syst Evol* 298:689-693.
- Boutin SR, Young ND, Olson TC, Yu Z-H, Shoemaker RC and Vallejos CE (1995) Genome conservation among three legume genera detected with DNA markers. *Genome* 38:928-937.
- Brito MMP, Muraoka T and Silva EC (2009) Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de ¹⁵N. *Ciência do solo* 33:895-905.
- Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts PE and Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil* 252:55-128.

- Burke DT, Carle CF and Olson MV (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236:806-812.
- Cannon SB, May GD and Jackson SA (2009) Three sequenced legume genomes and many crop species: Rich opportunities for translational genomics. *Plant Physiol* 151:970-977.
- Carvalho CR and Saraiva LS (1993) An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotech Histochem* 68:142-145.
- Castelletti CHM and Costa AF (2013) Feijão-caupi: alternativa sustentável para os sistemas produtivos. *Pesq agropec pernamb*, Recife, 18:1-2.
- Chacón SMI, Pickersgill B and Debouck DG (2005) Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics* 110:432-444.
- Choi H-K, Mun J-H, Kim D-J, Zhu H, Baek J-M *et al.*, (2004) Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Agric Sci* 101:15289-15294.
- Choi HW, Kim M-Y, Lee S-H, Sultana S and Bang J-W (2013) Molecular cytogenetic analysis of the *Vigna* species distributed in Korea. *Genes Genom* 35:257-264.
- Choi S, Creelman RA, Mullet JE and Wing RA (1995) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 13:124-128.
- Clark D (2005) *Molecular Biology*. Elsevier, 784p.
- Coulibaly S, Pasquet RS, Papa R and Gepts P (2002) AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. *Theor Appl Genet* 104:358-366.
- Creusot F, Fouilloux E, Dron M, Lafleuriel J, Picard G *et al.*, (1995) The CIC library: a large insert YAC library for genome mapping in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 8:763-770.
- David P, Chen NWG, Pedrosa-Harand A, Thareau V, Sévignac M *et al.*, (2009) A nomadic subtelomeric disease resistance gene cluster in common bean. *Plant Physiol* 151:1048-1065.
- De Jong H, Fransz P and Zabel P (1999) High resolution FISH in plants: Techniques and applications. *Trends Plant Sci* 4:258-263.
- Delgado-Salinas A, Bibler R and Lavin M (2006) Phylogeny of the Genus *Phaseolus* (Leguminosae): A Recent Diversification in an Ancient Landscape. *Syst Bot* 31:779-791.
- Delgado-Salinas A, Thulin M, Pasquet R, Weeden N and Lavin M (2011) *Vigna* (Leguminosae) sensu lato: the names and identities of the American segregate genera. *Am J Bot* 98:1694-1715.
- Diouf D (2011) Recent advances in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] “omics” research for genetic improvement. *African Journal of Biotechnology* 10:2803-2810.
- Dolezel J, Binarova P and Lucretti S (1989) Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum* 31:113-120.
- Doyle JJ and Luckow MA (2003) The Rest of the Iceberg. *Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context Plant Physiol* 131:900-910.
- Edwards KJ, Thompson H, Edwards D, Saizieu A, Sparks C *et al.*, (1992) Construction and characterisation of a yeast artificial chromosome library

- containing three haploid maize genome equivalents. *Plant Molecular Biology* 19:299-308.
- EMBRAPA (2011) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Meio Norte. Feijão-Caupi no Brasil. Produção, Melhoramento Genético, Avanços e Desafios. Teresina-PI, 84 p.
- FAO (2011) Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT - FAO Statistics Division. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org/>>. Acesso em: 20/03/13.
- Faris DG (1965) The origin and evolution of the cultivated forms of *Vigna sinensis*. *Can J Genet Cytol* 7:433-452.
- Ferreira ME (2003) Melhoramento genético de arroz: impactos da genômica. In: Melhoramento genômico. Eds. Borém A, Giudice M, Sedyama T. Universidade Federal de Viçosa, p. 73-129.
- Ferreira ME and Grattapalia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. EMBRAPA-CENARGEN: Brasília, 220 p.
- Ferreira-Neto JRCF, Pandolfi V, Guimaraes FCM, Benko-Iseppon AM, Romero C *et al.*, (2013) Early Transcriptional Response of Soybean Contrasting Accessions to Root Dehydration. *Plos one* 8-e83466.
- Findley SD, Cannon S, Varala K, Du J, Ma J *et al.*, (2010) Fluorescence *in situ* hybridization system for karyotyping soybean. *Genetics* 185:727-744.
- Fonsêca AFA, Ferreira J, Santos TRB, Mosiolek M, Bellucci E *et al.*, (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Res* 18:487-502.
- Fonsêca AFA and Pedrosa-Harand (2013) Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome* 56:335-343.
- Freire-Filho FR (1988) Origem, evolução e domesticação do caupi. In: Araújo JP de, Watt EE (Org.). O caupi no Brasil. Brasília, DF: IITA: EMBRAPA, p. 26-46.
- Freire-Filho FR, Ribeiro VQ, Cardoso MJ, Azevedo JN, Ramos SRR *et al.*, (2011) Coleção ativa de germoplasma de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e de outras espécies do gênero *Vigna*, da Embrapa Meio-Norte, no período de 1976 a 2003 -Teresina : Embrapa Meio-Norte, 125 p. Documento 209 / Embrapa Meio-Norte.
- Freitas FO (2006) Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. *Pesq agropec bras*, Brasília, 41:1199-1203.
- Freyre R, Skroch PW, Geffroy V, Adam-Blondon A-F, Shirmohamadali A *et al.*, (1998) Towards an integrated linkage map of common bean: 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theor Appl Genet* 97:847-856.
- Frota KDG, Soares RAM and Areas JAG (2008) Chemical composition of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), BRS-Milenio cultivar. *Ciencia Tecnol Alimentos* 28:470-6.
- Galasso I, Harrison GE, Pignone D, Brandes A and Heslop-Harrison JS (1997) The distribution and organization of *Ty1-copia*-like retrotransposable elements in the genome of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Cowpea) and its relatives. *Ann Bot* 80: 327-333.

- Galasso I, Pignone D and Perrino P (1993) Cytotaxonomic studies in *Vigna*. II. Heterochromatin characterization in *Vigna unguiculata* and three related wild species. *Caryologia* 46:275-282.
- Galasso I, Schmidt T, Pignone D and Heslop-Harrison JS (1995) The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and characterization of 18S-5.8S-25S rRNA genes, 5S rRNA genes, telomere-like sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences. *Theor Appl Genet* 91:928-935.
- Gepts P (1998) Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *Horticultural Science* 33:1124-1130.
- Graham PH and Vance CP (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131: 872-877.
- Grattapaglia D and Ferreira ME (2009) Mapeamento físico e clonagem posicional. In: Borém A, Caixeta ET (Eds.). *Marcadores moleculares*. Viçosa, 2:275-326.
- Guedes RE (2008) Bases para o Cultivo Orgânico de Feijão-Caupi [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)] no Estado do Rio de Janeiro. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 68 p.
- Guerra M (2004) Hibridização *in situ*: Princípios Básicos. In: Guerra M (ed). *FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p. 1-32.
- Guerra M (2012) Cytotaxonomy: The end of childhood, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana* 146:703-710.
- Guerra M, Kenton A and Bennett MD (1996) rDNA Sites in Mitotic and Polytene Chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp and *Phaseolus coccineus* L. revealed by Fluorescent *in situ* Hybridization. *Ann Bot* 78:157-161.
- Ha J, Abernathy B, Nelson W, Grant D, Wu X *et al.*, (2012) Integration of the Draft Sequence and Physical Map as a Framework for Genomic Research in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and Wild Soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.). *G3* 2:321-329.
- Hanai RI, Santini L, Camargo LEA, Fungaro MHP, Gepts P *et al.*, (2010) Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. *Molecular Breeding* 25:25-45.
- Heslop-Harrison JS and Schwarzacher T (2011) Organisation of the plant genome in chromosomes. *Plant J* 66:18-33.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Ananthawat-Jónsson K, Leitch AR and Shi M (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome desnaturation. *Technique* 3:109-115.
- Heslop-Harrison, J.S., Harrison, G.E., and Leitch, I.J. 1992. Reprobing of DNA: DNA *in situ* hybridization preparations. *Trends Genet.* 8:372-373.
- Hougaard BK, Madsen LH, Sandal N, Moretzsohn MC, Fredslund J *et al.*, (2008) Legume anchor markers link syntenic regions between *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* and *Arachis*. *Genetics* 179:2299-2312.
- Huynh BI, Close TJ, Roberts PA, Hu Z, Wanamaker S *et al.*, (2013) Gene Pools and the Genetic Architecture of Domesticated Cowpea. *The plant genome* 6:2.
- Iwata A, Greenland CM and Jackson SA (2013) Cytogenetics of Legumes in the Phaseoloid Clade. *The plant genome* 6:X.

- Jiang JM and Gill BS (2006) Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057-1068.
- Joly AB (2002) *Introdução à Taxonomia Vegetal*. Editora Nacional, São Paulo, Brasil. 777 p.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF and Donoghue MJ (2009) *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. Artmed, Porto Alegre.
- Kajita T, Ohashi H, Tateishi Y, Bailey CD and Doyle JJ (2001) rbcL and Legume Phylogeny, with Particular Reference to Phaseoleae, Millettieae, and Allies. *Systematic Botany* 26:515-536.
- Kami J, Becerra-Velásquez VL, Debouck DG and Gepts P (1995) Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:1101-1104.
- Kami J, Poncet V, Geffroy Ve and Gepts P (2006) Development of four phylogenetically-arrayed BAC libraries and sequence of the APA locus in *Phaseolus vulgaris*. *Theor Appl Genet* 112:987-998.
- Kao F-I, Cheng Y-Y, Chow T-Y, Chen H-H, Liu S-M, Cheng C-H and Chung M-C (2006) An integrated map of *Oryza sativa* L. chromosome 5. *Theoretical and Applied Genetics* 112:891-902.
- Kataoka R, Hara M, Kato S, Isobe S, Sato S, Tabata S and Ohmido N (2012) Integration of Linkage and Chromosome Maps of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) *Cytogenet Genome Res* 137:60-69.
- Kato A, Albert Ps, Vega JM and Birchler JA (2006) Sensitive fluorescence in situ hybridization signal detection in maize using directly labeled probes produced by high concentration DNA polymerase nick translation. *Biotech Histochem* 81:71-78.
- Kim JS, Islam-Faridi MN, Klein PE, Stelly DM, Price HJ, Klein RR and Mullet JE (2005) Comprehensive molecular cytogenetic analysis of sorghum genome architecture: Distribution of euchromatin, heterochromatin, genes and recombination in comparison to rice. *Genetics* 171:1963-1976.
- Kumar A and Bennetzen JL (1999) Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics* 33:479-532.
- Lee JM, Grant D, Vallejos CE and Shoemaker RC (2001) Genome organization in dicots. II. Arabidopsis as a 'bridging species' to resolve genome evolution events among legumes. *Theoretical and Applied Genetics* 103:765-773.
- Lewis G, Schirer B, Mackinder B and Lock M (2005) *Legumes of the world*, 1st edn. London: Kew.
- Lim GAC, Jewell EG, Li X, Erwin TA, Love C *et al.*, (2007) A comparative map viewer integrating genetic maps for *Brassica* and *Arabidopsis*. *BiomedCentral Plant Biology* 7:40.
- Lisch D (2013) How important are transposons for plant evolution? *Genetics* 14:49-61
- Liu SY, Yu K, Huffner M, Park SJ, Banik M, Pauls KP and Crosby W (2010) Construction of a BAC library and a physical map of a major QTL for CBB resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genetica* 138:709-716.
- Lou Q, He Y, Cheng C, Zhang Z, Li J, Huang S and Chen J (2013) Integration of High-Resolution Physical and Genetic Map Reveals Differential Recombination Frequency between Chromosomes and the Genome Assembling Quality in Cucumber. *PLoS ONE* 8:e62676.

- Lucas MR, Diop N-N, Wanamaker S, Ehlers JD, Roberts PA and Close TJ (2011) Cowpea-soybean synteny clarified through an improved genetic map. *Plant Genome* 4:218-225.
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, Mcbreen K and Schubert I (2006) Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *BMC Plant Biol* 103:13.
- Ma Y (2009) Genomic resources of cowpea (*Vigna unguiculata*). In Proceedings of the 17th Plant and Animal Genome Conference, p. 393.
- Mandáková T and Lysak MA (2008) Chromosomal Phylogeny and Karyotype Evolution in $x=7$ *Crucifer* Species (Brassicaceae). *The Plant Cell* 20:2559-2570.
- Marechal R, Mascherpa JM and Stainier F (1978) Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28:1-273.
- Mcclean PE, Mamidi S, Mcconnell M, Chikara S and Lee R (2010) Synteny mapping between common bean and soybean reveals extensive blocks of shared loci. *BiomedCentral Genomics* 11:184.
- Menéndez CM, Hall AE and Gepts P (1997) A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theoretical and Applied Genetics* 95:1210-1217.
- Mercado-Ruaro P and Delgado-Salinas A (2000) Cytogenetics studies in *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae). *Genet Mol Biol* 23:985-987.
- Moscone EA, Klein F, Lambrou M, Fuchs J and Schweizer D (1999) Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* 42:1224-1233.
- Muchero W, Diopb NN, Bhat PR, Fenton RD, Wanamaker S *et al.*, (2009) A consensus genetic map of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] and synteny based on EST-derived SNPs. *Agric Sci* 106:43.
- Mudge J, Cannon SB, Kalo P, Oldroyd G, Roe BA, Town CD and Young ND (2005) Highly syntenic regions in the genomes of soybean, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana*. *BiomedCentral Plant Biology* 5:1-16.
- Ng NQ e Maréchal R (1985) Cowpea taxonomy, origin germ plasm. In: Sinch SR, Rachie KO, eds. Cowpea research, production end utilization. Cheichecter, John Wiley, p.11-21.
- Nodari RO, Tsai SM, Guzmán P, Gilbertson RI and Gepts P (1993) Towards an integrated linkage map of common bean 3. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics* 134:341-350.
- Ohmido N, Fukui K and Kinoshita T (2010) Recent advances in rice genome and chromosome structure research by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci* 86:103-116.
- Ouédraogo JT, Gowda BS, Jean M, Close TJ, Ehlers JD *et al.*, (2002) An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. *Genome* 45:175-188.

- Padulosi S, Ng QN and Perrino P (1997) Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* L. Walp. In: eds. SINGH BB e RAJ M. Advances in Cowpea Research.
- Pant K, Chandel K and Joshi B (1982) Analysis of diversity in Indian cowpea genetic resources. SABRAO J 14:103-111.
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D and Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. Genetics 161:1661-1672.
- Pedrosa-Harand A, Almeida CCS, Moiselek M, Blair MW, Schweizer D and Guerra M (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. Theor Appl Genet 112:924-933.
- Pedrosa-Harand A, Kami J, Geffroy V, Gepts P and Schweizer D (2009) Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. Chromosome Res 17:405-417.
- Peters SA, Bargsten JW, Szinay D, Van De Belt J, Visser RG, Bai Y and De Jong H (2012) Structural homology in the Solanaceae: Analysis of genomic regions in support of synteny studies in tomato, potato and pepper. Plant J 71:602-614.
- Piegu B, Guyot R, Picault N, Roulin A, Saniyal A *et al.*, (2006) Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. Genome Res 16:1262-1269.
- Rachie, K. O. - eds. Cowpea research, production end utilization. Cheichecter, John Wiley, p.11-21, 1985.
- Rajesh PN, Coyne C, Meksem K, Sharma KD, Gupta V and Muehlbauer FJ (2004) Construction of a HindIII Bacterial Artificial Chromosome library and its use in identification of clones associated with disease resistance in chickpea. Theoretical and Applied Genetics 108:663-669.
- Ribeiro T, Santos KGB, Fonsêca AFA and Pedrosa-Harand A (2011) Isolation and characterization of a new repetitive DNA family recently amplified in the Mesoamerican gene pool of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) Genetica 139:1135-42.
- Richard MMS, Chen NG, Hareau V, Pflieger S, Blanchet S *et al.*, (2013) The subtelomeric *hipu* satellite repeat from *Phaseolus vulgaris*: lessons learned from the genome analysis of the Andean genotype G19833. Plant Genetics and Genomics 4:109.
- Salgado CC, Cruz CD, Nascimento M and Barrera CF (2011) O uso da variância como metodologia alternativa para integração de mapas genéticos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 46:66-73.
- Saliba-Colombani V, Causse M, Gervais L and Philouze J (2000) Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. Genome 43:29-40.
- Sarbhoj RK (1978a) Citogenetical studies in genus *Phaseolus* L. I and II. Somatic and meiotic studies in fifteen species of *Phaseolus* (Part I). Cytologia 43:161-170.
- Sarbhoj RK (1978b) Citogenetical studies in genus *Phaseolus* L. I and II. Somatic and meiotic studies in fifteen species of *Phaseolus* (Part II). Cytologia 43:171-180.

- Schlueter JA, Goicoechea JL, Collura K, Gill N, Lin J-Y *et al.*, (2008) BAC-end sequence analysis and draft physical map of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genome. *Tropical Plant Biol* 1:40-48.
- Schrire BD (2005) Tribe Phaseoleae. In: Lewis GP, Schrire B, Mackinder B e Lock M (eds.). *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, p. 393-431.
- Schubert I (2007) Chromosome evolution. *Curr Opin Plant Biol* 10:109-115.
- Shirasawa K, Bertoli DJ, Varshney RK, Moretzsohn MC, Leal-Bertoli SCM *et al.*, (2013) Integrated Consensus Map of Cultivated Peanut and Wild Relatives Reveals Structures of the A and B Genomes of *Arachis* and Divergence of the Legume Genomes. *DNA Research* 20:173-184.
- Silva HT and Costa AO (2003) *Caracterização Botânica de Espécies Silvestres do Gênero Phaseolus L. (Leguminosae)*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 40 p.
- Simon MV, Benko-Iseppon AM, Resende LV, Winter P and Kahl G (2007) Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna* Savi germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting. *Genome* 50:538-547.
- Singh NK, Dalal V, Batra K, Singh BK and Chitra G (2007) Single-copy genes define a conserved order between rice and wheat for understanding differences caused by duplication, deletion, and transposition of genes. *Funct Integr Genomics* 7:17-35.
- Soares-Cavalcanti NM, Pandolfi V, Kido EA, Belarmino LC, Houllou-Kido LM and Benko-Iseppon AM (2010) Perfil geral de expressão associado à tolerância à salinidade e seca em feijão caupi (*Vigna unguiculata*). In: *Trabalhos Apresentados no Simpósio sobre Tolerância à Deficiência Hídrica em Plantas: Adaptando as Culturas ao Clima do Futuro*, ISSN 1678-9644, 148 pp. Goiania, Brasil. *Embrapa Documentos* 265:65-75.
- Szinay D, Wijnker E, Van Den Berg R, Visser RG, De Jong H and Bai Y (2012) Chromosome evolution in *Solanum* traced by crossspecies BAC-FISH. *New Phytol* 195:688-98.
- Thulin M, Lavin M, Pasquet R and Delgado-Salinas A (2004) Phylogeny and biogeography of Wajira (Leguminosae): A monophyletic segregate of *Vigna* centered in the Horn of Africa region. *Syst Bot* 29:903-920.
- Timko MP and Singh BB (2008) Cowpea, a multifunctional legume. In: Moore PH and Ming R (eds), *Genomics of Tropical Crop Plants*, Springer Science Business Media, LLC, New York , NY . p. 227-258.
- Tunster SJ, Pette MVD and John RM (2011) BACs as Tools for the Study of Genomic Imprinting. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011:10.
- Vallejos CE, Sakiyama NS and Chase CD (1992) A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131:733-740.
- Vanhouten W and Mackenzie S (1999) Construction and characterization of a common bean bacterial artificial chromosome library. *Plant Molecular Biology* 40:977-983.
- Varshney RK, Chen W, Li Y, Bharti AK, Saxena RK *et al.*, (2012) Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. *Nature biotechnology* 30:83-89.
- Vieira C, Borem A and Ramalho MAP (1999) Melhoramento do feijão. In: Borem, A. (ed.) *Melhoramento de Espécies Cultivadas*, Viçosa, p. 273-349.

- Wanderley-Nogueira AC, Soares-Cavalcanti NM, Belarmino LC, Barbosa-Silva A, Kido EA *et al.*, (2010) In Silico Screening for Pathogenesis Related-2 Gene Candidates in *Vigna unguiculata* Transcriptome. Lecture Notes in Computer Science 6160:70-81.
- Wanzenböck EM, Schöfer C, Schweizer D and Bachmair A (1997) Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 11:1007-1016.
- Weising K, Nybom H, Wolff K and Andkahl G (2005) DNA Fingerprinting in plants, principles, methods, and applications. 2. ed. CRC Press, Boca Raton, 444 p.
- Westphal E (1974) Pulses in Ethiopia: their taxonomy and agriculture significance. Agricultural research report 815. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.
- Wojciechowski MF (2003) Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): Woo S-S, Jiang J, Gill BS, Paterson AH and Wing RA (1994) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. Nucleic Acids Research. 22:4922-4931.
- Xu P, Wu X, Wang B, Liu Y and Ehlers JD *et al.*, (2011) A SNP and SSR Based Genetic Map of Asparagus Bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedialis*) and Comparison with the Broader Species. PLoS ONE 6:15952-15952.
- Yang D, Parco A, Nandi S, Subudhi P, Zhu Y, Wang G and Huang N (1997) Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and identification of overlapping BAC clones with chromosome 4-specific RFLP markers in rice. Theoretical and Applied Genetics 95:1147-1154.
- Young ND and Bharti AK (2012) Genome-enabled insights into legume biology. Annu Rev Plant Biol 63:14.1-14.23.
- Yu K (2012) Bacterial Artificial Chromosome Libraries of Pulse Crops: Characteristics and Applications. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2012:8 p.
- Zwick MS, Hanson RR, Mcknight TD, Islam-Faridi MN, Stelly DM, Wing RA and Price HJ (1997) A rapid procedure for the isolation of C₀t-1 DNA from plants. Genome 40:138-142.

9. Currículo Lattes

Emanuelle Varão Vasconcelos

Curriculum Vitae

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Mapeamento citogenético de *Vigna unguiculata* mediante hibridização in situ de sequências de DNA de *Phaseolus vulgaris*.
Orientador: Ana Christina Brasileiro Vidal
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2007 - 2011** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Mapeamento citogenético de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. mediante hibridização in situ de sequências de DNA de *Phaseolus vulgaris* L.
Orientador: Ana Christina Brasileiro-Vidal.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Hibridização in situ fluorescente de BACs.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

- 2010 - 2011** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Monitoria, Carga horária: 10, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitora na Disciplina de graduação: Citogenética.

Atividades

- 03/2009 - Atual** Estágio, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Genética
Estágio:
*Projeto de Iniciação Científica em Desenvolvimento: Mapeamento físico de *Vigna unguiculata*, mediante hibridização in situ de sequências de DNA dos cromossomos 8 e 10 de *Phaseolus vulgaris*. Orientadora: Ana Christina Brasileiro-Vidal.*

Áreas de atuação

1. Citogenética
2. Genética Vegetal
3. Genética

Projetos

- 2010 - 2011** Mapeamento cromossômico de retroelementos nos gêneros *Gycine* L., *Phaseolus* L. e *Vigna* Savi.

Descrição: As leguminosas representam a segunda principal família de plantas cultivadas, responsáveis por, aproximadamente, 27% da produção cultivada mundial (Graham e Vance, 2003), sendo a soja, em 2007, a quinta commodity em termos de produção no mundo e a mais

importante do Brasil (<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>). A grande relevância econômica e social do cultivo dessa e de outras leguminosas (como os feijões) tem gerado o interesse sobre o conhecimento da organização genômica e cariotípica desse grupo de espécies. Recentemente, esforços em conjunto de diversos pesquisadores têm sido feitos com o intuito de gerar um sistema de informação genômica unificada para legume, a fim de contribuir para um melhor entendimento de seus aspectos fisiológicos e fitossanitários bem como para um maior detalhamento da sintenia e da genômica comparativa em legumes. Nesse sentido, métodos cito-moleculares são poderosas ferramentas para análises da estrutura, da organização e da evolução genômica. Uma análise comparada da distribuição (localização e quantidade) de retroelementos em cinco leguminosas associada aos dados disponíveis na base de dados da soja (SoyTEdb) ajudará na análise genômica comparativa e no entendimento da evolução cariotípica do grupo.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (3);

Integrantes: Emanuelle Varão Vasconcelos; Ana Christina Brasileiro-Vidal (Responsável); Kyria Bortoleti

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

2008 - 2011 Genosoja - Consórcio Nacional para Estudos do Genoma da Soja

Descrição: O projeto GENOSOJA propõe o estudo do genoma da soja sob diferentes níveis, desde sua organização em nível estrutural, buscando identificar e sequenciar regiões genômicas importantes, contribuindo assim com a construção do mapa físico de *Glycine max*, até a identificação em nível transcricional e protéico de genes envolvidos nas respostas a diferentes estresses bióticos e abióticos que acometem a cultura. Ainda, o projeto busca estudar não somente se um gene é expresso ou não, mas também determinar os níveis em que é expresso, as interações com outros genes, sua localização física e seus produtos. A obtenção destas informações, com foco em plantas de soja submetidas aos principais estresses que acometem a cultura no Brasil, permitirá a identificação de genes e de rotas metabólicas importantes, crucias para o desenvolvimento e estudo de plantas tolerantes a situações de desafio. O projeto está estruturado em seis Projetos Componentes (PC), visando abordar diferentes aspectos do genoma da soja. No PC1 serão executadas as atividades de gestão do projeto. No PC2 (Genômica Estrutural), estão incluídas atividades de pesquisa relacionadas com estudos do genoma físico e estrutural, onde o sequenciamento de regiões ricas em genes de um cultivar nacional será priorizado. Estudos de sintenia e requenciamento de algumas regiões em diferentes genótipos também serão conduzidos neste PC, o que permitirá identificar polimorfismos em nível de uma base (SNPs). No PC3 (Transcriptoma), serão utilizadas várias estratégias para acessar a informação dos genes diferencialmente expressos sob diferentes estresses bióticos (Ferrugem Asiática e nematóides) e abióticos (seca e fixação de nitrogênio). Os mesmos experimentos para obtenção de material biológico no PC3 serão utilizados para obtenção de material biológico nos estudos de Proteoma no PC4. Esta estreita relação garantirá uma complementaridade e redução da variabilidade experimental, permitindo uma melhor eficiência da utilização dest

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Emanuelle Varão Vasconcelos; Ana Christina Brasileiro-Vidal; Ana Maria Benko-Iseppon; Ricardo Vilela Abdelnoor (Responsável); Elizeu Binneck

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

2007 - Atual Análise da macrossintenia entre espécies de *Vigna Savi* e de *Phaseolus L.*, mediante mapeamento cromossômico comparativo

Descrição: As leguminosas representam a segunda principal família de plantas cultivadas. Esses vegetais, especialmente os gêneros *Vigna Savi* e *Phaseolus L.*, apresentam grande importância na dieta alimentar humana decorrente do elevado conteúdo protéico, assim como, são bem utilizados como fonte de nitrogênio em diferentes ecossistemas, devido a sua capacidade de fixação desta substância em simbiose. A grande relevância econômica e social do cultivo dos feijões no Brasil e no mundo gerou o interesse no desenvolvimento de programas de melhoramento genético,

visando à obtenção de cultivares com alta qualidade de grãos, resistência a doenças e pragas e com elevada produtividade. O desenvolvimento de técnicas moleculares, que permitem a construção de mapas genéticos e físicos, auxilia o entendimento da estrutura e da organização genômica, fornecendo informações úteis para esses programas de melhoramento envolvendo hibridização e manipulação genética. Dentre essas técnicas, podemos citar a hibridização fluorescente in situ (FISH), que permite a localização física de seqüências de DNA repetitivo e de genes ao longo dos cromossomos, possibilitando a caracterização de diferentes espécies vegetais proximamente relacionadas, como é o caso das espécies pertencentes ao gênero *Vigna* e *Phaseolus*. O presente trabalho utilizará a técnica de FISH usando BACs de *P. vulgaris*, oligonucleotídeos com padrões de microssatélites e DNAr 5S e 45S como sondas, a fim de construir um mapa cromossômico para *V. unguiculata* e de auxiliar na comparação com mapas existentes de *P. vulgaris* e *P. lunatus*. Uma análise comparada desses mapas facilitará o uso de recursos genômicos, auxiliará no entendimento da evolução cariotípica do grupo e contribuirá, especialmente, para estimar o nível de macrossintenia entre essas espécies de plantas.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (2);

Integrantes: Emanuelle Varão Vasconcelos; Ana Christina Brasileiro-Vidal (Responsável); Kyria Bortoleti; Andrea Pedrosa-Harand; Ana Maria Benko-Iseppon; Artur Fellipe de Andrade Fonsêca

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Prêmios e títulos

2013 Premiação de melhor trabalho oral na área de Citogenética Vegetal, 3º RBC - Reunião Brasileira de Citogenética e IV SLACE - Simpósio Latino Americano de Citogenética.

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **VASCONCELOS, E. V.**, Brasileiro-Vidal, A. C.

Mapeamento físico de *Vigna unguiculata*, mediante hibridização in situ de seqüências de DNA dos cromossomos 8 e 10 de *Phaseolus vulgaris* In: 14ª Jornada da FACEPE, 2010, Recife.

Joaquim Nambuco., 2010.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Apresentação de trabalho e palestra

1. **VASCONCELOS, E. V.**

Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). Bonifácio et al., 2012, 2013. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Departamento de Genética; Cidade: Recife; Evento: Ciclo de Seminários do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal; Inst.promotora/financiadora: UFPE

2. **VASCONCELOS, E. V.**, Pedrosa-Harand, A., FONSECA, A. F. A., OLIVEIRA, A. R. S., Benko-Iseppon, A. M., Brasileiro-Vidal, A. C.

Comparative cytogenetics between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus vulgaris* L. by BAC-FISH, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Guarujá; Cidade: São Paulo; Evento: 3º RBC - Reunião Brasileira de Citogenética e IV SLACE - Simpósio Latino Americano de Citogenética e Evolução; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Genética

3. **VASCONCELOS, E. V.**

'Copy number variation in potato – an asexually propagated autotetraploid species '. Iovene et al 2013., 2013. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Departamento de Genética; Cidade: Recife; Evento: Ciclo de Seminários do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal; Inst.promotora/financiadora: UFPE

4. **VASCONCELOS, E. V.**

Fluorescence In Situ Hybridization Applications for Super-Resolution 3D Structured

- Illumination Microscopy. Markaki et al. 2013, 2013.** (Seminário,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Departamento de Genética; Cidade: Recife; Evento: Ciclo de Seminários do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal; Inst.promotora/financiadora: UFPE
5. **VASCONCELOS, E. V.,** Pedrosa-Harand, A., Benko-Iseppon, A. M., Brasileiro-Vidal, A. C.
Mapeamento Citogenético de Vigna unguiculata (L.) Walp. mediante hibridização in situ de sequências de DNA de Phaseolus vulgaris L., 2012. (Outra,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Centro de Ciências Biológicas - UFPE; Cidade: Recife; Evento: II Jornada de Pós-Graduação em Genética; Inst.promotora/financiadora: UFPE - PPGG
6. **VASCONCELOS, E. V.**
torres et al 2011Organization and Evolution of Subtelomeric Satellite Repeats in the Potato Genome, 2012. (Seminário,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Departamento de Genética; Cidade: Recife; Evento: Ciclo de Seminários do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal; Inst.promotora/financiadora: UFPE
7. **VASCONCELOS, E. V.**
An integrated molecular cytogenetic map of Cucumis sativus L. Han et al., 2011., 2011. (Seminário,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Departamento de Genética; Cidade: Recife; Evento: Ciclo de Seminários do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal; Inst.promotora/financiadora: UFPE
8. **VASCONCELOS, E. V.,** FONSECA, A. F. A., Pedrosa-Harand, A., Bortoleti, K., Benko-Iseppon, A. M., Brasileiro-Vidal, A. C.
ANÁLISE DA MACROSSINTENIA ENTRE Vigna unguiculata (L.) Walp. E Phaseolus vulgaris L., 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Áreas do conhecimento : Citogenética
Referências adicionais : Argentina/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura Universidad Nacional del Nordeste; Cidade: Corrientes; Evento: XL Congreso Argentino de Genética, III Simpósio Latinoamericano de Citogenética Y Evolución, I Jornadas Regionales SAG-NEA
9. Bortoleti, K., Brasileiro-Vidal, A. C., **VASCONCELOS, E. V.,** AMORIM, L., Pandolfi, V., Benko-Iseppon, A. M.
DISTRIBUIÇÃO CROMOSSÔMICA DE RETROELEMENTO Ty3-gypsy-LIKE EM ESPÉCIES DE Glycine WILLD., Phaseolus L. E Vigna SAVI, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Áreas do conhecimento : Citogenética,Genética molecular
Referências adicionais : Argentina/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura Universidad Nacional del Nordeste; Cidade: Corrientes; Evento: XL Congreso Argentino de Genética, III Simpósio Latinoamericano de Citogenética Y Evolución, I Jornadas Regionales SAG-NEA
10. Silva, P., Benko-Iseppon, A. M., **VASCONCELOS, E. V.,** Brasileiro-Vidal, A. C.
DISTRIBUIÇÃO DE MICROSSATÉLITES EM Glycine soya Sieb. & Zucc. E G. tomentella Hayata, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Argentina/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura Universidad Nacional del Nordeste; Cidade: Corrientes; Evento: XL Congreso Argentino de Genética, III Simpósio Latinoamericano de Citogenética Y Evolución, I Jornadas Regionales SAG-NEA
11. **VASCONCELOS, E. V.,** Brasileiro-Vidal, A. C., Bortoleti, K.
Mapeamento citogenético de Vigna unguiculata mediante hibridização in situ de sequencias de DNA de Phaseolus vulgaris., 2011. (Outra,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso
Trabalho de conclusão do Curso de Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado, Universidade Federal de Pernambuco.
12. **VASCONCELOS, E. V.,** Bortoleti, K., Brasileiro-Vidal, A. C.
Mapeamento Cromossômico de Retroelementos nos Gêneros Glycine Willd., Phaseolus L. e Vigna Savi, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Áreas do conhecimento : Citogenética
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: Centro de Tecnologia e Geociências; Cidade: Recife; Evento: Congresso de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Pernambuco
13. **VASCONCELOS, E. V.**
Park et al. (2011) Comparative analysis of pepper and tomato reveals euchromatin expansion of pepper genome caused by differential accumulation of Ty3/Gypsy-like elements., 2011.

(Seminário, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Departamento de Genética; Cidade: Recife; Evento: Ciclo de Seminários do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal; Inst.promotora/financiadora: UFPE

14. Filipe Barbosa, Alessandra Maciel, **VASCONCELOS, E. V.**, Kalyne Oliveira, André Lira
INFLUÊNCIA DE GALHAS NO DESENVOLVIMENTO DO OITIZEIRO *Licania tomentosa* (Benth), 2010. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Ecologia Aplicada

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-UFPE; Cidade: Recife; Evento: III Simpósio de Inovação em Ciências Biológicas; Inst.promotora/financiadora: PPGCB- Programa de Pós Graduação de Ciências Biológicas-UFPE

15. Bortoleti, K., Brasileiro-Vidal, A. C., AMORIM, L., **VASCONCELOS, E. V.**, Benko-Iseppon, A. M.
Ocorrência e distribuição cromossômica de retroelemento Ty1-copia-like em espécies dos gêneros *Vigna Savi* e *Phaseolus L.* mediante hibridização in situ fluorescente, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Guarujá; Cidade: São Paulo; Evento: 56º Congresso Brasileiro de Genética; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Genética

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. Brasileiro-Vidal, A. C., **VASCONCELOS, E. V.**, Vasconcelos, S., Silva, P.

I curso prático de Citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais., 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Áreas do conhecimento : Genética Vegetal, Citogenética

Referências adicionais : Brasil/Português. 105 horas. Meio de divulgação: Vários

Educação e Popularização de C&T

Apresentação de trabalho e palestra

1. **VASCONCELOS, E. V.**

Pedrosa-Harand et al. (2009) Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species., 2010. (Seminário, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Departamento de Genética; Cidade: Recife; Evento: Ciclo de Seminários do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal; Inst.promotora/financiadora: UFPE

Participação em eventos, congressos, exposições, feiras e olimpíadas

1. Apresentação Oral no(a) **3º RBC - Reunião Brasileira de Citogenética e IV SLACE - Simpósio Latino Americano de Citogenética e Evolução**, 2013. (Congresso)

Comparative cytogenetics between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus vulgaris* L. by BAC-FISH.

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III Congresso Nacional do Feijão-caupi**, 2013. (Congresso)

ANCORAGEM DE MARCADOR MOLECULAR DO CROMOSSOMO 3 DE *Phaseolus vulgaris* EM *Vigna unguiculata* E *V. radiata* MEDIANTE BAC-FISH.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **3º RBC - Reunião Brasileira de Citogenética e IV SLACE - Simpósio Latino Americano de Citogenética e Evolução**, 2013. (Congresso)

Chromosome distribution of microsatellites in *Glycine soja* Sieb. et Zucc. and *G. tomentella* Hayata.

3. Apresentação Oral no(a) **3º RBC - Reunião Brasileira de Citogenética e IV SLACE - Simpósio**

- Latino Americano de Citogenética e Evolução**, 2013. (Congresso)
Comparative cytogenetics between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus vulgaris* L. by BAC-FISH.
4. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **3º RBC - Reunião Brasileira de Citogenética e IV SLACE - Simpósio Latino Americano de Citogenética e Evolução**, 2013. (Congresso)
Heterochromatin and 5S and 45S rDNA in different species of *Jatropha* L..
5. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **3º RBC - Reunião Brasileira de Citogenética e IV SLACE - Simpósio Latino Americano de Citogenética e Evolução**, 2013. (Congresso)
RIBOSOMAL DNA VARIATIONS IN *Vigna* SAVI SPECIES.
6. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **II Jornada de Pós graduação em Genética**, 2012. (Outra)
Mapeamento Citogenético de *Vigna unguiculata* mediante hibridização in situ de sequências de DNA de *Phaseolus vulgaris*.
7. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XL Congresso Argentino de Genética, III Simpósio Latinoamericano de Citogenética Y Evolución, I Jornadas Regionales SAG-NEA**, 2011. (Congresso)
Análise da macrossintenia entre *Vigna unguiculata* (L.) Walp e *Phaseolus vulgaris* L..
8. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **III Simpósio de Inovação em Ciências Biológicas e mini-curso em Bioinformática**, 2010. (Simpósio)
INFLUÊNCIA DE GALHAS NO DESENVOLVIMENTO DO OITIZEIRO *Licania tomentosa* (Benth).
9. Apresentação Oral no(a) **14ª Jornada da FACEPE**, 2010. (Outra)
Mapeamento físico de *Vigna unguiculata*, mediante hibridização in situ de sequências de DNA dos cromossomos 8 e 10 de *Phaseolus vulgaris*..
10. **1st Brazilian-German Meeting of Plant Systems Biology and Bioenergy**, 2010. (Outra)
11. **II encontro nordestino de entomologia forense**, 2009. (Encontro)
12. **I Workshop Pernambucano de Bioinformática**, 2009. (Outra)
13. **I Internacional Workshop on Biotechnology, III Alfa-Valnatura Meeting, III Scientific Journey of LIKA**, 2008. (Outra)
14. **I Simposio Nordestino de Mamíferos Aquáticos e mini-curso: Manejo e conservação de peixe-boi**, 2007. (Simpósio)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos.....	1
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	6
Apresentações de trabalhos (Seminário).....	7
Apresentações de trabalhos (Simpósio).....	1
Apresentações de trabalhos (Outra).....	2

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (extensão).....	1
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	6
Participações em eventos (simpósio).....	2
Participações em eventos (encontro).....	1
Participações em eventos (outra).....	5