

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

**Evolução cromossômica, disploidia e epigenética no
gênero *Phaseolus* L. (Fabaceae)**

Recife

2014

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Evolução cromossômica, disploidia e epigenética no gênero *Phaseolus* L. (Fabaceae)

Tese apresentada por Artur Fellipe de Andrade Fonsêca como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Vegetal (área de concentração em Florística e Sistemática) pelo curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFPE

Orientador: Prof^a Andrea Pedrosa-Harand
(Depto. Botânica, UFPE)

Recife

2014

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso
CRB 1728

Fonsêca, Artur Fellipe de Andrade

Evolução cromossômica, disploidia e epigenética do gênero *Phaseolus* L.
(Fabaceae)/ Artur Fellipe de Andrade Fonsêca – Recife: O Autor, 2014.

106 f.: il., fig., tab.

Orientador: Andrea Pedrosa-Harand

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Ciências Biológicas. Biologia Vegetal, 2014.

Inclui bibliografia e anexo

1. Genética vegetal 2. Feijão I. Pedrosa-Harand, Andrea (orientadora) II.
Título

581.15

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-202

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Evolução cromossômica, disploidia e epigenética no gênero *Phaseolus* L. (Fabaceae)

APROVADO EM 28/02/2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros titulares:

Prof^a. Dra. Andrea Pedrosa-Harand (orientadora), Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof^o. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof^a. Dra. Neide Santos, Depto. de Genética, CCB, UFPE

Prof^o. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida, Campus Arapiraca, UFAL

Prof^o. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral de Mello, Depto. de Biologia, UNESP

Membros suplentes:

Prof^o. Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof^o. Dr. Reginaldo de Carvalho, Depto. de Biologia/Genética, UFRPE

*Dedico à minha família pela base e suporte, à Daiana
Spíndola pelo amor e paz e ao laboratório pelo
amadurecimento científico.*

AGRADECIMENTOS

A busca pelo equilíbrio mental e sentido da vida nos traz à reflexão de que a felicidade parece não ser algo constante, ofuscada por deslizos e fragilidades em nossas rotinas diárias. A propósito, grandes males da sociedade, como a solidão, a rotina, o medo e a ansiedade devem ser combatidos passo a passo com a paciência e resignação necessárias ao nosso adiantamento moral. “Tijolos de progresso” devem ser armazenados diariamente, pouco a pouco, para a construção de um belo passado.

O longo caminho percorrido desde o início de uma graduação até o final de um doutorado em biologia (cerca de 10 anos) é certamente acompanhado de inúmeras situações (boas e ruins), expectadores e amigos responsáveis pelo aprimoramento moral e científico. Indubitavelmente, a presença da minha família e toda a nossa união e respeito, trouxe-me muita força para concentrar minhas energias em dificuldades cotidianas, felizmente não relacionadas à família.

Agradeço especialmente à Daiana Spíndola por estar ao meu lado todos os dias desde quando a conheci. Ela vem me mostrando a cada momento que a parceria, respeito e dedicação parece mesmo ser a chave para o sucesso de uma vida a dois. Veio me trazer entusiasmo e um equilíbrio para os momentos mais críticos de perturbação mental oriundos de uma rotina científica. Esta, porém, não deve ser vista como a grande vilã. Aprendi com ela e orgulhosamente cresci bastante com a família citovegetal. Hoje me sinto um pouco triste por estar dando um passo novo em minha vida, me afastando fisicamente dessa família, mas estou certo de que a ciência “limpa”, a responsabilidade e ética aprendida neste laboratório estarão comigo em qualquer lugar que eu for.

Muito obrigado à Andrea Pedrosa-Harand pela ótima convivência que temos. Pelo respeito e confiança depositados em mim durante essa jornada. Vejo em inúmeros lugares e laboratórios, queixas comuns entre alunos e seus orientadores que felizmente não cabem à minha vida. Muito obrigado também pela paciência, pois devo ter cometido muitos deslizos comuns a um aprendiz.

Agradeço muito a amizade de Silvokleio, grande irmão científico e agora de vida, que me trouxe e trará muitas alegrias.

Não posso deixar de fora Luiz Gustavo, um ótimo guia que me mostrou sempre os melhores caminhos a seguir no caminho do progresso científico. Infelizmente, nem sempre esses eram os caminhos mais fáceis. O grande coração e a cabeça relaxada me trouxeram algo que eu não

tive em muitos momentos. Passamos momentos memoráveis desde a minha graduação até este fim de doutorado e espero não perder isso de forma alguma.

Agradeço a Marcelo Guerra por me dedicar horas de conversas e dividir um pouco de sua experiência como grande pesquisador e amigo. Sinto-me lisonjeado e orgulhoso por ter tido a oportunidade de nos últimos tempos entrelaçar mais essa proveitosa convivência.

Eitcha! Agradeço muito à cambada de gente que já passou pelo lab e especialmente aos que estão presentes nesta minha reta final. À Liiii (por me apresentar Dai, principalmente kkk), Ana Emília (pra mim, ainda é do lab), Madááá (um doce de pessoa), André, Tiago Ribeiro, Lucas, “Espositão”, “Marianita”, Amanda, Brena, “Thhaallitthaa”, Dani e “Duda”, minha primeira seguidora kk.

Gostaria de deixar uma admiração especial à Sandra, pelo esforço cotidiano, pelas superações diante de inúmeras dificuldades, que enlouqueceriam muitíssimas pessoas. Obrigado pela companhia e exemplo!

Agradeço ainda à CAPES e FACEPE, pelo financiamento de bolsas sanduíche e de doutorado.

Resumo

O gênero *Phaseolus* L. tem como principal representante o feijão comum (*P. vulgaris*), mundialmente conhecido por sua importância econômica. A espécie possui 22 cromossomos pequenos (1,7 a 2,4 μm), contendo grandes blocos heterocromáticos pericentroméricos e subteloméricos. Além do feijão comum, o gênero possui outras quatro espécies de importância econômica, em um total de aproximadamente 75 espécies, todas neotropicais. Em sua maioria apresentam $2n = 22$ cromossomos, entretanto, três espécies do grupo *Leptostachyus* apresentam $2n = 20$. Com o objetivo de entender a organização da cromatina e a causa da disploidia descendente no gênero, o presente estudo utilizou imunocoloração e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em *P. vulgaris* e *P. leptostachyus*. As marcas epigenéticas para histonas modificadas e DNA revelaram que H3K4me3 e H4K5ac (trimetilação na lisina 4 da histona H3 e acetilação na lisina 5 da histona H4), em geral, foram associadas às regiões eucromáticas, enquanto H3K27me1, H3K9me2 (mono- e dimetilação das lisinas 27 e 9, respectivamente) e 5mC (5-metilcitosina) às heterocromáticas. Sítios de DNAr 45S, regiões centroméricas e a maioria dos blocos heterocromáticos terminais foram hipometilados, incluindo um associado a um *cluster* de genes de resistência à antracnose. Não foi encontrada associação entre a regulação da atividade dos genes de resistência e as modificações da cromatina ao nível cromossômico. Além disso, diferentes domínios heterocromáticos que variaram quanto ao padrão epigenético foram observados, revelando a complexidade e heterogeneidade da heterocromatina no gênero. Em outra abordagem, utilizando a FISH de BACs cópia única em *P. leptostachyus* ($2n = 20$), foi revelado que uma inserção do cromossomo 10 no centrômero do cromossomo 11, associada a uma translocação com o braço longo do cromossomo 6 foram responsáveis pela disploidia descendente em *Phaseolus*. Seis translocações, até então inéditas para o gênero, e duas novas inversões cromossômicas foram evidenciadas, aparentemente sem relação direta com essa disploidia. Apesar da estabilidade cariotípica, até então observada no gênero, esse grande número de rearranjo demonstra que a taxa de alterações cromossômicas pode ser bastante variável mesmo numa pequena escala de tempo evolutivo.

Palavras-chave: *Phaseolus* L., heterocromatina, imunocoloração, hibridização *in situ* fluorescente, disploidia

Abstract

The genus *Phaseolus* L. has the common bean (*P. vulgaris*), known worldwide for its economic importance, as its main representative. The species has 22 small chromosomes (1.7 to 2.4 μm) containing large heterochromatic pericentromeric and subtelomeric blocks. Besides the common bean, the genus has four other species of economic importance, from a total of approximately 75 Neotropical species. Most of its species have $2n = 22$ chromosomes, however, three species of the *Leptostachyus* group have $2n = 20$. In order to understand the chromatin organization and the cause of the descendant dysploidy in the genus, the present study applied immunostaining and fluorescence in situ hybridization (FISH) to *P. vulgaris* and *P. leptostachyus* chromosomes. Epigenetic marks for histone and DNA modifications revealed that H4K5ac and H3K4me3 (trimethylation of lysine 4 in histone H3 and acetylation of lysine 5 in H4) were generally associated with euchromatic regions, while H3K27me1, H3K9me2 (mono- and dimethylation of lysines 27 and 9 in H3, respectively) and 5mC (5-methylcytosine) were associated with the heterochromatin. The 45S rDNA sites, the centromeric regions and most of the heterochromatic terminals blocks were hypomethylated, including one associated with a cluster of anthracnose resistance genes. No association was found between the the resistance gene cluster regulation and the chromatin modifications at chromosomal level. Moreover, different heterochromatic domains that differed in terms of epigenetic patterns were observed, revealing the complexity and heterogeneity of the heterochromatin in the genus. In another approach, using FISH of single copy BACs in *P. leptostachyus* ($2n = 20$), it was demonstrated that an insertion of chromosome 10 at the centromere of chromosome 11, associated with a translocation of the long arm of chromosome 6, were responsible for descendant dysploidy in *Phaseolus*. Six translocations, so far unknown for the genus, and two new chromosomal inversions were observed, apparently not directly related to this dysploidy. Despite the karyotype stability of the genus, this large number of rearrangements has shown that the rate of chromosomal rearrangements can be quite variable even in a small evolutionary time scale.

Keywords: *Phaseolus* L., heterochromatin, immunostaining, fluorescent in situ hybridization, dysploidy

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Fig. 1. Immunodetection of histone H3K4me3 (a-c), H4K5ac (d-f), H3K9me2 (j-l) and H3K27me1 (m-o) in pachytene cells and H4K5ac (g-i) in root tip mitotic cell from *P. vulgaris* L. (genotype BAT93). Histone H3K4me3 was observed preferentially in euchromatic regions, with little or no labeling in the pericentromeric heterochromatin (a-c). Histone H4K5ac showed a more uniform labeling along pachytene chromosomes (d-f) and a distinct labeling in mitotic metaphase chromosomes (g-i). Histone H3K9me2 and H3K27me1 showed hypermethylation of most heterochromatic blocks (j-o). Green arrowheads indicate some marked heterochromatic regions and white arrowheads indicate unmarked ones. A large terminal block is highlighted by yellow arrowhead (j). Antibodies to histone modifications are observed red. The chromosomes were counterstained with DAPI (gray). Scale bar = 5 μm72

Fig. 2. Immunodetection of 5mC and FISH with *hipu* probe in mitotic tapetal cells (a-b) and pachytene cells (c-f) of *P. vulgaris* 'BAT93'. DNA methylation is observed green (a, d-e). Inserts in a show chromosomes with 45S rDNA sites at larger magnification and 5mC (green) or rDNA (red) signal alone. *hipu* was hybridized to the same cell (b), allowing identification of four chromosome pairs, represented by numbers. The chromosome 4 was identified by having the largest heterochromatic terminal blocks [Fonseca et al. 2010]. Pachytene chromosomes were counterstained with DAPI and shown in blue (c) or red (d). In f, *hipu* was hybridized to the same cell as in c-e. Arrows indicate heterochromatic regions marked with 5mC (blocks with *hipu* with white arrows and without *hipu* with purple arrows) and arrowheads indicate unmarked regions (centromeres in orange, the two largest terminal blocks in yellow and some other terminal blocks in white). Scale bar = 5 μm73

Fig. 3. Immunodetection of 5mC and FISH with λ B61 (resistance gene cluster) and BAC 81A17 (pericentromeric) probes on pachytene cells of *P. vulgaris* 'BAT93'. Plants were infected by the strains C531 (avirulent, a-c) and 100 (virulent, d-f) of the fungus *C. lindemuthianum*. 5mC is seen in blue (a, c, d and f), λ B61 in yellow (a, c, d and f) and 81A17 in red (a-b and d-e). Enlarged inserts show that, in both cases, the blocks in the vicinity of this resistance cluster are hypomethylated. Overlaps between 81A17 (red) and 5mC (blue) are shown in purple. Arrowheads indicate hypomethylated pericentromeric blocks. Scale bar = 5 μ m.....74

Suppl. Fig. 1. Immunodetection of 5mC (a, green) and sequential FISH with *kipu* probe (b, yellow) in mitotic tapetal cell of common bean counterstained with DAPI (gray), evidencing heteromorphism of the pericentromeric labelling, as indicated for chromosome 4. Scale bar = 5 μ m.....75

CAPÍTULO 2

Fig 1. Hibridização *in situ* em cromossomos metafásicos mitóticos de *P. leptostachyus*. Grande sítio de DNAr 45S (verde) na extremidade do braço curto do cromossomo 6, reconhecido pelo BAC 121F5 (vermelho) (A). Único sítio de DNAr 5S (amarelo), localizado no maior cromossomo do complemento, sintênico ao BAC 255F18 (vermelho; *Pvu* Cr11) (B). Além dos BACs 127J2 (vermelho) e 255F18 (amarelo) (ambos *Pvu* Cr11) (C), o BAC 63H6 (amarelo) e o fago SJ19.12 (vermelho) (ambos *Pvu* Cr 10) (D) também hibridizaram no maior par. Sinais de BACs repetitivos subteloméricos em *P. vulgaris* foram duplicados em *P. leptostachyus* (ex. 127J2 e 63H6) e evidenciados em C, D e E. BACs 127J2 (vermelho), 63H6 (azul) e 179N14 (amarelo) hibridizados numa mesma célula, evidenciando uma inserção centromérica do cromossomo 10 no cromossomo 11 (E). Translocação representada

pela sintenia entre os BAC 18B15 (*Pvu* Cr6, amarelo) e 63H6 (vermelho) (F). BAC 81A17 (vermelho), pericentromérico em todos os cromossomos do complemento e sonda do DNAr 5S (amarelo), identificando o maior cromossomo (G). Sequência telomérica de *Arabidopsis* (T₃AG₃, vermelho) sem qualquer sinal intersticial. Exceto para E, inserções apresentam os mesmos cromossomos indicados na metáfase completa, porém em maior ampliação. Cabeças de seta em C, D e E indicam o par cromossômico metacêntrico portador de *Khipu*. Barra em H, corresponde a 5 µm.....95

Fig. 2. Hibridização *in situ* em cromossomos metafásicos mitóticos de *P. leptostachyus* evidenciando diferentes rearranjos. Os BACs hibridizados são representados pelas cores da representação esquemática ao lado direito de cada foto, que demonstra o padrão de distribuição desses BACs nas espécies previamente mapeadas (*P. vulgaris*, *Pvu*; *P. lunatus*, *Plu*; *P. microcarpus*, *Pmi*) (Fonsêca *et al.*, 2010; Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). Em A, B, D, e E, BACs selecionados para um mesmo cromossomo hibridizados em cromossomos distintos, indicando translocações. Inversões paracêntrica e pericêntrica ocorridas nos cromossomos 3 e 7, respectivamente (C e D). Inserção em D evidencia o sinal duplicado do BAC 86I17 em maior contraste. Barra em E, corresponde a 5 µm.....96

Fig. 3. Análise esquemática comparativa dos três cromossomos envolvidos na inserção centromérica em *P. leptostachyus* com outras três espécies mapeadas, *P. lunatus* (Bonifácio *et al.*, 2012), *P. vulgaris* (Fonsêca *et al.*, 2010) e *P. microcarpus* (Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). A análise associada com a filogenia proposta para o gênero (modificado de Delgado-Salinas *et al.*, 2006). Eventos sinapomórficos foram representados em cima de cada clado pelas siglas Inv (inversão), Pa (paracêntrica), Pe (pericêntrica), Tr (translocação), Ins (inserção) e números indicando os pares cromossômicos envolvidos. Os eventos Inv.Pa 6 Pe 3 dependem de um grupo externo para seu posicionamento entre os clados A e B.97

Sumário

1. Introdução	15
2. Fundamentação teórica.....	18
2.1. Evolução cromossômica	18
2.1.1. Técnicas de bandeamento	19
2.1.2. FISH	20
2.1.3.1. FISH com sequências repetitivas	21
2.1.3.2. BAC-FISH com marcadores cópia-única.....	23
2.2. Cromatina e epigenética em plantas	25
2.3. O gênero <i>Phaseolus</i> L.	27
2.3.1 Distribuição geográfica e filogenia	27
2.3.2. Citogenética de <i>Phaseolus</i>	29
2.4. Referências bibliográficas	33
Capítulo 1 - Do simples ao complexo: evolução cromossômica e rearranjo inédito em leguminosas revelados por BAC-FISH no gênero <i>Phaseolus</i> L.	42
Introdução	42
Materiais e Métodos	44
Resultados	47
Discussão	49
Referências bibliográficas	55
3. Conclusões	63
4. Anexo	65
5. Apêndice.....	73

1. Introdução

O gênero *Phaseolus* L., de origem neotropical, é constituído por cerca de 75 espécies e tem como principal representante o feijão comum (*P. vulgaris* L.), que contribui para a família Fabaceae ser a segunda em importância econômica, perdendo apenas para Poaceae (Judd, 2009). Filogeneticamente, as espécies do gênero são divididas em dois clados principais denominados A e B. Este último inclui o feijão comum e as outras quatro espécies de interesse econômico (*P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. polyanthus* e *P. acutifolius*) (Delgado-Salinas et al., 2006).

Citogeneticamente, o gênero é relativamente estável, com $2n = 22$, mas um grupo do clado B denominado *Leptostachyus*, constituído pelas espécies *P. leptostachyus*, *P. macvaughii*, e *P. micranthus*, apresenta um número cromossômico distinto das demais, $2n = 20$ (Delgado-Salinas et al., 2006). Esse decréscimo do número cromossômico haploide caracteriza assim uma disploidia descendente que, em muitos casos, está relacionada a processos de fusão cêntrica ou translocação Robertsoniana. Associada à estabilidade cariotípica do gênero, a presença de um par cromossômico metacêntrico maior em *P. leptostachyus* reforçou a hipótese de que um evento de translocação recíproca desigual seguido da eliminação de um cromossomo foram os responsáveis pela disploidia descendente no gênero (Mercado-Ruaro e Delgado Salinas, 1996 e 1998).

O primeiro mapa citogenético do gênero foi construído para *P. vulgaris* utilizando a técnica de BAC-FISH (cromossomos artificiais marcados como sondas em hibridização *in situ* fluorescente). A partir dele foi possível estimar por medições cromossômicas que aproximadamente 50% do genoma no feijão comum é heterocromático (5% de DNAr, 9% de blocos subteloméricos e 34% de blocos pericentroméricos) (Fonsêca et al., 2010). Porém, a presença de sequências cópia-única na heterocromatina da espécie sugere que seu genoma é

menos compartimentalizado (Pedrosa-Harand et al., 2009). Em geral, considerando as propriedades epigenéticas conhecidas para essa fração cromossômica, a mesma é considerada pobre em genes e possui um DNA rico em 5-mC (radical metil associado a citosinas) (Sumner, 2003). Além dessa marca epigenética, modificações pós-traducionais de histonas podem estar relacionadas a essas regiões heterocromáticas, como a monometilação na lisina 27 e a dimetilação na lisina 9 (H3K27me1, H3K9me2) (Fuchs e Schubert, 2012). Porém, análises epigenéticas no gênero são escassas, restringindo-se apenas a *P. coccineus*, para a qual não houve relação direta entre a presença de heterocromatina constitutiva/sequências repetitivas e o padrão de metilação do DNA (Frediani et al., 1986). Contudo não se têm dados epigenéticos sobre a heterocromatina subterminal de *P. vulgaris* associada a genes de resistência a patógenos (Geffroy et al., 1999; 2000 e 2008), os quais parecem depender de uma regulação epigenética e de fatores de modelamento da cromatina para o controle da sua expressão (Alvarez et al., 2010).

A construção do mapa citogenético de *P. vulgaris*, utilizando BACs cópia-única, permitiu que outras espécies pudessem ser comparadas em estudos de evolução cromossômica (Bonifácio et al., 2010, Almeida e Pedrosa-Harand, 2013, Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). Esses estudos confirmaram a grande estabilidade cariotípica do gênero, apresentando uma completa conservação de sintenia e poucas quebras de colinearidade, restrita a eventos de inversões cromossômicas (Bonifácio et al., 2010, Almeida e Pedrosa-Harand, 2013, Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

O presente trabalho teve, como objetivo geral entender a organização da cromatina e a evolução cariotípica no gênero *Phaseolus*. Mais especificamente, pretendeu-se: 1) estabelecer as relações entre condensação da cromatina, marcas epigenéticas e sequências repetitivas. Para isso, a técnica de imunocoloração com as marcas H4K5ac e H3K4me3, associadas à

eucomatina em plantas (Fuchs e Schubert, 2012), além de 5-mC, H3K27me1 e H3K9me2, foi utilizada em *P. vulgaris* juntamente com hibridização *in situ* de sequências repetitivas. 2) Avaliar a influência da organização da cromatina na expressão de características de interesse. Para isso, o padrão de metilação e condensação de um bloco heterocromático terminal associado a genes de resistência à antracnose foi analisado após infecção de plantas com linhagens virulentas e avirulentas do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. 3) Desvendar os eventos cromossômicos envolvidos na disploidia descendente do gênero *Phaseolus*, mapeando BACs cópia única por FISH em *P. leptostachyus* e discutindo esses dados em conjunto com os dados previamente obtidos, numa perspectiva filogenética.

2. Fundamentação teórica

2.1. Evolução cromossômica

Estudos citogenéticos têm revelado diversas características cromossômicas que somadas à taxonomia clássica contribuem para o entendimento das relações evolutivas em plantas. A análise cromossômica comparativa entre diferentes táxons permitiu sugerir relações baseadas em características cariotípicas que foram reforçadas posteriormente por estudos filogenéticos (Guerra, 2012). Além disso, as diferentes conformações da cromatina, permanentes ou temporais, têm provocado fascínios quanto à sua constituição e funções.

O número cromossômico é o principal parâmetro citogenético e sua comparação permite inferir eventos de poliploidia e disploidia, ambas implicadas na evolução cromossômica (Guerra, 2008). Poliploidia é a posse de pelo menos três conjuntos completos de cromossomos. A disploidia é o aumento ou o decréscimo gradual no número cromossômico haploide originada de rearranjos estruturais, sendo denominada ascendente ou descendente, respectivamente. As disploidias descendentes em plantas são mais comuns que as disploidias ascendentes (Levin 2002; Guerra, 2012). Essa direção (aumento ou diminuição) pode ser melhor evidenciada a partir da análise combinada com estudos filogenéticos (Guerra, 2012). No gênero *Cardiospermum*, por exemplo, a alta diversidade cariotípica é atribuída à disploidia, sendo evidenciada de forma descendente nas espécies *C. heringeri* e *C. integerrimum* ($2n = 14$) da seção *Ceratadenia* ($2n = 20$) após integração com a filogenia. (Urdampilleta et al., 2012).

Um outro parâmetro também utilizado na citogenética comparativa é a simetria cariotípica. Um cariótipo simétrico consiste de cromossomos que apresentam um tamanho relativamente similar e os centrômeros se encontram na posição mediana ou sub-mediana, enquanto um cariótipo assimétrico possui vários cromossomos com o centrômero em posição

terminal e/ou subterminal, sendo caracterizados por grandes diferenças no tamanho cromossômico (Stebbins, 1950). Baseando-se apenas em coloração convencional, Stebbins (1971) propôs que os gêneros apresentam certos padrões cromossômicos evolutivos, embora eles não sejam universais. Segundo suas teorias, o aumento da assimetria está relacionado com a adição de novas sequências relacionadas a fatores adaptativos, aumentando o comprimento dos braços cromossômicos diferencialmente. Porém, essas teorias parecem ser meramente especulativas, uma vez que a natureza e os efeitos das sequências envolvidas são desconhecidos. Além disso, a análise de um grande número de populações seria exigida para tal suposição.

2.1.1. Técnicas de bandeamento

Estudos citogenéticos baseados em diferentes propriedades da cromatina foram utilizados em espécies vegetais. O tratamento a frio evidenciou bandas que foram relacionadas às regiões heterocromáticas em *Adoxa moschatellina* (Greilhuber, 1979), sendo posteriormente relacionadas com regiões ricas em AT (adenina e timina) (Punina *et al.*, 2001). Adaptações ao bandeamento G, também relacionado à presença de AT, foram realizadas em seis espécies de Poaceae (Song *et al.*, 1994), embora esta técnica não tenha obtido a confiança necessária em plantas. Já o bandeamento C, que detecta a heterocromatina constitutiva (Schwarzacher *et al.*, 1980), é uma das técnicas mais bem estabelecidas em plantas. A técnica permite em alguns casos a identificação de rearranjos cromossômicos, homeologia cromossômica e estabelecimento de relações entre espécies, sendo especialmente útil em estudos envolvendo cromossomos grandes, devido à reprodutibilidade e clareza dos padrões (Gill e Kimber, 1974; Tanaka e Hizume, 1980; Ellneskog-Staam *et al.*, 2007).

Técnicas de bandeamento com diferentes tipos de fluorocromos têm se mostrado muito mais eficientes no estudo dos padrões de bandas heterocromáticas. Os protocolos de

bandeamento com corantes convencionais são mais laboriosos, além de serem menos reproduzíveis e não determinarem a constituição das bandas. Os fluorocromos atualmente mais utilizados são o 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que evidencia regiões heterocromáticas ricas em AT, e a cromomicina A3 (CMA), que evidencia regiões ricas em GC (guanina e citosina) (Schweizer, 1976).

A comparação cariotípica dos padrões de bandas entre diferentes espécies e gêneros utilizando fluorocromos CMA e DAPI pode ser uma forma simples e eficiente de caracterizar espécies e sugerir relações evolutivas. A dupla coloração CMA/DAPI permitiu classificar, quanto ao padrão de bandas CMA⁺, os cromossomos morfológicamente indistinguíveis do gênero *Citrus*, estabelecendo relações evolutivas que foram comparadas entre gêneros proximamente relacionados (Guerra, 2000; Cornélio *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2007). Essa técnica, aliada ao bandeamento C, por exemplo, reforça ainda mais as relações de parentesco em diferentes grupos vegetais (Sheikh e Kondo, 1995; Guerra, 2000; Peñas *et al.*, 2008).

Apesar de úteis, estudos de número, morfologia cromossômica e bandeamento limitam as análises comparativas de evolução cromossômica porque dificultam a identificação segura dos homólogos e homeólogos.

2.1.2. FISH

Quando uma determinada sequência é marcada como sonda, esta pode parear com sua sequência homóloga presente no cromossomo, podendo ser detectada por microscopia, revelando sua localização no cariótipo. O processo de hibridização com sondas detectadas por fluorescência é denominado FISH (hibridização *in situ* fluorescente) e é uma das técnicas mais importantes na citogenética vegetal. A detecção fluorescente é a mais comumente

utilizada na atualidade e apresenta grande sensibilidade, permitindo a utilização de múltiplas sondas marcadas com fluoróforos diferentes, além de não serem radioativas, como as primeiras moléculas utilizadas (Guerra, 2004).

2.1.3.1. FISH com sequências repetitivas

As sequências repetidas centenas, milhares e até milhões de vezes no genoma, diferentemente da fração cópia-única, são pouco conservadas em sua composição, sendo a principal responsável pela variação no tamanho do genoma em plantas (Meyers *et al.*, 2001). Estas sequências são geralmente agrupadas em dois tipos: sequências repetitivas em tandem (microsatélites, minissatélites e DNA satélites) ou sequências repetitivas dispersas (em geral, elementos transponíveis) (Schweizer *et al.*, 1990).

Sequências em tandem geralmente estão associadas aos sítios de DNAr e às regiões heterocromáticas centroméricas e subteloméricas, enquanto que sequências repetitivas dispersas podem ser encontradas ao longo de todo o genoma (Jelinek e Schmid, 1982; Guerra, 2004). Sequências repetidas evoluem mais rapidamente em relação às sequências cópia única ou de baixa repetição, principalmente por não estarem sujeitas a uma forte pressão seletiva (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998).

A técnica de FISH pode ser utilizada em conjunto com outras ferramentas para caracterizar mais detalhadamente o complemento cromossômico de várias espécies vegetais. A utilização conjunta de bandeamento CMA/DAPI e FISH com sondas contendo sítios de DNAr 5S e 45S possibilitou analisar de forma mais detalhada as relações entre heterocromatina e essas sequências repetitivas em quatro espécies do gênero *Maxillaria* Ruiz & Pavón. Diferenças nos números cromossômicos das espécies foram acompanhadas de distintos padrões de bandas DAPI⁺ e CMA⁺, com heteromorfismos para esta última. Os

diferentes padrões de distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S em relação às bandas heterocromáticas em *Maxillaria* sugerem ainda que não há uma associação obrigatória destas com o DNAr (Cabral *et al.*, 2006). Metodologia semelhante foi utilizada em seis espécies do gênero *Spondias*, incluindo o suposto híbrido umbu-cajá e seus possíveis parentais, *Spondias monbim* e *S. tuberosa*, todos com mesmo número e morfologia cromossômica ($2n = 32$). Embora o umbu-cajá apresente características morfológicas intermediárias entre essas duas espécies, o estudo citogenético revelou que nenhuma delas constitui o verdadeiro parental, nem mesmo as outras três espécies analisadas, sugerindo que essas características tenham surgido independentemente (Almeida *et al.*, 2007).

Análises comparativas entre homeólogos podem indicar o quanto essas sequências estão conservadas entre espécies próximas e como elas têm evoluído (Lim *et al.*, 2000). Relações filogenéticas atreladas a distribuição de sítios de DNAr 45S foram analisadas em nove espécies do gênero *Zamia* e uma espécie proximamente relacionada, *Ceratozamia mexicana*. Além de levar em consideração os diferentes padrões biogeográficos, o estudo sugere que a ocorrência de variação numérica no gênero é resultado de fissões ou fusões cêntricas com diferenciação dos sítios de DNAr 45S (Tagashira e Kondo, 2001).

Alguns estudos têm utilizado a técnica de FISH com sondas de DNA repetitivo para identificação e caracterização cromossômica (Kato *et al.*, 2005; Fonsêca *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2011). Duas sequências repetitivas, denominadas pLc30 e pLc7, foram identificadas e analisadas detalhadamente no gênero *Lens* (fabaceae) em relação à composição de sequências e distribuição cromossômica. A combinação de sondas contendo sequência telomérica, DNAr 5S e 18S-25S, e as sequências repetitivas pLc30 e pLc7 permitiu identificar os sete pares cromossômicos de *L. culinaris ssp. culinaris* (Galasso *et al.*, 2001). Ainda nessa linha de estudo, quatro sondas contendo sequências de DNA satélites foram construídas a partir de

clones de BACs (cromossomos artificiais de bactérias) e utilizadas na identificação de todos os nove pares cromossômicos de *Beta vulgaris* (Paesold *et al.*, 2012). Dados os exemplos acima, fica evidente a valiosa eficiência do método de identificação cromossômica baseado no padrão de distribuição de sequências repetitivas a partir de uma única FISH.

2.1.3.2.. BAC-FISH com marcadores cópia-única

Os clones inseridos em BACs são bastante utilizados como sondas cromossomo-específicas em FISH. Isso porque, em comparação com outras sondas de sequências únicas (como insertos em plasmídeos ou produtos de PCR), são de fácil visualização devido ao seu tamanho (100 a 150 Kb), resultando em sinais com maior intensidade. Além disso, representam baixos níveis de quimerismo, alta eficiência de clonagem, além da facilidade de isolamento e manipulação dos insertos (Song *et al.*, 2000). Esta técnica gera resultados precisos e de ampla abrangência, como análises comparativas com mapas de ligação ou mapas citogenéticos comparativos intra- ou intergenéricos.

Um mapa cromossômico foi construído para *Oryza sativa* L. utilizando uma sequência centromérica e 24 BACs contendo sequências cromossomo-específicas ancoradas em um denso mapa de ligação para a espécie (Cheng *et al.*, 2001). Correlações entre os mapas cromossômico e genético podem mostrar variações em relação às distâncias física (em pares de bases) e genética (em cM) (Howell *et al.*, 2002). Para o cromossomo 1 do sorgo, a proximidade de marcadores genéticos na região mediana do grupo de ligação não corresponde a distâncias equivalentes no cromossomo, indicando que a recombinação é reduzida na presença da heterocromatina pericentromérica (Islam-Faridi *et al.*, 2002).

Estudos mais recentes com diferentes abordagens têm permitido identificar os diferentes pares cromossômicos de várias espécies com um número reduzido de sondas,

comparar as distâncias físicas e genéticas entre seus marcadores e caracterizar individualmente as principais sequências repetitivas pericentroméricas e subteloméricas (Fonsêca *et al.*, 2010; Paesold *et al.*, 2012). Entretanto, a grande quantidade de sequências repetitivas no genoma pode dificultar estudos semelhantes por mascararem os sinais de sequências cópia-única. Apesar de serem especialmente viáveis em espécies de genoma pequeno, como em *Arabidopsis* [157 Mpb/1C (Bennett *et al.*, 2003)], sinais cromossomo-específicos ainda foram obtidos no mapeamento de *Helianthus annuus* L. [aprox. 3.000 Mpb/1C (Arumuganathan e Earle 1991)], onde BACs foram hibridizados em presença DNA bloqueador (Feng *et al.*, 2013).

A hibridização cruzada de BACs cópia única tem permitido esclarecer importantes eventos de evolução cromossômica ocorrida entre diferentes níveis taxonômicos. Além de ter sido possível distinguir todos os 13 pares cromossômicos de *Gossypium arboreum* L. com a utilização de um coquetel de 22 sondas, duas translocações foram observadas entre essa espécie e o subgenoma A de *G. hirsutum* (Wang *et al.*, 2008). *Arabidopsis thaliana* (n = 5) e *A. lyrata* (n = 8), apesar de serem do mesmo gênero, apresentam grandes diferenças estruturais e numéricas. A partir do pressuposto número cromossômico ancestral (n = 8), *A. lyrata* e *Capsela rubella* parecem não ter sofrido qualquer rearranjo durante a evolução do grupo. O conjunto de dados incluindo outras três espécies da família Brassicaceae, *Neslia paniculata* (n = 7), *Turritis glabra* (n = 7) e *Hornungia alpina* (n = 6), permitiu elucidar os mecanismos de evolução formadores dos cariótipos de *A. thaliana* e das espécies relacionadas. O estudo revelou então que os eventos responsáveis pela diminuição e atual número cromossômico de *A. thaliana* foram: a geração de cromossomos acrocêntricos a partir de inversões pericêntricas, translocações recíprocas entre dois cromossomos, e eliminação de microcromossomos provenientes das translocações (Lysak *et al.*, 2006). Um estudo

comparativo de BAC-FISH envolvendo *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e *Citrus medica* L. revelou uma grande conservação de sintenia entre as espécies, que diferiram apenas no padrão de bandas heterocromáticas (Mendes *et al.*, 2011).

2.2. Cromatina e epigenética em plantas

Cromossomos são constituídos de sequências de DNA associadas a proteínas histonas e não-histonas, numa estrutura altamente organizada, denominada cromatina. Estados específicos da cromatina associados ao grau de condensação e tipos de sequências são capazes de permitir ou restringir a expressão gênica. A eucromatina está geralmente associada a regiões descondensadas de maior atividade gênica, com sequências únicas ou moderadamente repetitivas. A heterocromatina, por sua vez, encontra-se associada às regiões cromossômicas mais condensadas, ricas em sequências repetitivas. Embora a heterocromatina seja pobre em genes, quando comparada à eucromatina, genes transcricionalmente ativos nessas regiões podem ser observados em ao menos um dado momento do ciclo de vida das plantas (Lippman *et al.*, 2004; Nagaki *et al.*, 2004). As diferentes propriedades da cromatina referem-se a distintos níveis de modificações covalentes de histonas, metilação do DNA, e pequenos RNA interferência (RNAi) (Liu *et al.*, 2010). Estes últimos estão sendo cada vez mais estudados no que diz respeito ao seu papel como formador da heterocromatina e sua consequente associação com o silenciamento gênico em animais, plantas e protistas (Lippman e Martienssen, 2004; Carthew e Sontheimer, 2009).

O primeiro estágio de compactação da fibra do DNA chama-se nucleossomo, formado por um octâmero de histonas, cada um contendo duas moléculas de H2A, H2B, H3 e H4, onde 146pb de DNA são empacotados (Sumner, 2003). A cauda N-terminal das histonas pode ser modificada pós-traducionalmente por acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação e ADP-ribosilação (Jenuwein e Allis, 2001). Dentre as mais extensamente estudadas estão a

acetilação e a metilação das lisinas (K). Essas modificações ao nível iônico são capazes de modificar as interações entre os nucleossomos e a fibra de cromatina, formando o código de histonas que regula o comportamento do DNA na cromatina (Jenuwein e Allis, 2001).

A acetilação de histonas afeta a interações no nucleossomo (Luger *et al.*, 1997), influenciando a transcrição, ciclo celular e outras funções (Spencer e Davie, 1999). A acetilação dos resíduos de lisina das histonas H3 e H4, em particular, parecem ter um papel importante na atividade transcricional em uma variedade de organismos (Kouzarides, 2007). Em mamíferos, essas marcas são pobremente encontradas em regiões pericentroméricas e em cromossomos X inativos (Belyaev *et al.*, 1996). Em plantas, diferente dos mamíferos, os padrões das isoformas acetiladas H3 e H4 frequentemente não coincidem, mas em geral essas formas são pouco encontradas na heterocromatina (Fuchs e Schubert, 2012). Em cromossomos mitóticos de *C. spiralis* e *Eleutherine bulbosa* regiões distais, de condensação tardia, foram enriquecidas em H4K5ac (Feitoza e Guerra, 2011a). Curiosamente, regiões centroméricas DAPI+ foram enriquecidas em H4K5ac nos cromossomos paquitênicos de *Costus spiralis*, o que poderia estar relacionado à transcrição de sequências centroméricas (Feitoza e Guerra, 2011b).

Modificações nas histonas H3, mono, di e trimetiladas nas lisinas 9 e 27 (H3K9me1/2, H3K27me1/2/3), e histonas H4 metiladas na lisina 20 (H4K20me1/2/3) juntamente com a hipermetilação das citosinas do DNA têm sido, em geral, associadas ao silenciamento gênico (Dhar *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2011). Algumas exceções podem ser encontradas em diferentes estudos, nos quais H3K27me2/3 podem, por exemplo, estar associados com regiões eucromáticas, como observado em beterraba, cevada e *Arabidopsis* (Fuchs *et al.*, 2006; Zakrzewski *et al.*, 2011). Além disso, alguns trabalhos defendem a ideia de que a especificidade da H3K9me2 para regiões heterocromáticas pode variar com o tamanho do

genoma (Houben *et al.* 2003). Em *Eleutherine bulbosa* e milho, por exemplo, nenhuma associação foi observada dessa marca com regiões heterocromáticas (Shi e Dawe, 2006; Feitoza e Guerra, 2011).

Nem sempre a metilação de histonas se encontra relacionada às regiões heterocromáticas. Estudos em milho, arroz, *Arabidopsis*, beterraba e cevada, por exemplo, evidenciaram a correspondência entre H3K4 mono-, di- e trimetilada e a eucromatina (Fuchs *et al.*, 2006; Deal e Henikoff, 2011; Zakrzewski *et al.*, 2011). Houben *et al.* (2003) estudaram 24 espécies de plantas com diferentes tamanhos de genoma e encontraram uma forte associação de H3K4me2 com a eucromatina de todas as espécies analisadas.

A metilação do DNA, juntamente com algumas modificações de histonas, é uma importante modificação epigenética herdada ao longo de gerações, estando associada, na maioria dos casos, com a repressão da atividade gênica. A metilação da citosina ocorre normalmente nos dinucleotídeos CpG (citosina seguida de uma guanina), embora em plantas trinucleotídeos com a sequência CNG (N sendo qualquer base) possam também ser metilados (Sumner, 2003). Em um estudo de revisão, Jones (2012) sugere que embora a metilação esteja relacionada às ilhas CpG, a grande maioria dessas ilhas não estão metiladas nos sítios de iniciação de transcrição. Ilhas CpG metiladas no corpo do gene podem até mesmo favorecer a transcrição, parecendo estar relacionada ainda com o processamento do RNA (splicing) (Gal-Yan *et al.*, 2008).

2.3. O gênero *Phaseolus* L.

2.3.1 Distribuição geográfica e filogenia

O gênero *Phaseolus* L. é constituído por aproximadamente 75 espécies distribuídas nos neotrópicos, desde o sudeste do Canadá até o norte da Argentina, com centro de

diversidade no México, onde são encontrados cerca de 90% de seus representantes (Mercado-Ruaro *et al.* 2009). O grupo se destaca pelas espécies de importância econômica: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L, *P. acutifolius* A. Gray e *P. polyanthus* L. (Gepts, 1996), sendo feijão comum (*P. vulgaris*) o principal representante do gênero, colocando o Brasil na terceira posição da produção mundial, perdendo apenas para Índia e Mianmar (FAO-2011).

A filogenia mais recente para *Phaseolus*, baseada em marcadores nucleares (ITS/5.8 S) e plastidial (*trnK*), foi proposta por Delgado-Salinas e colaboradores (2006) (Fig. 1). Nela o gênero se mostrou monofilético e dividido em dois clados principais (A e B). O primeiro deles é constituído pelos grupos Pauciflorus, Pedicellatus e Tuerckheimii, além de outras espécies sem uma posição filogenética bem definida (*Phaseolus glabellus* Piper, *P. macrolepis* Piper, *P. microcarpus* Mart., e *P. oaxacanus* Rose). O clado B, por outro lado, agrupa todas as espécies de interesse econômico, sendo formado pelos grupos Filiformis, Vulgaris, Lunatus, Leptostachyus e Polystachios. Embora apresente algumas características morfológicas peculiares, ao menos dois grupos, Pedicellatus e Tuerckheimii, só podem ser distinguidos por meio de dados moleculares.

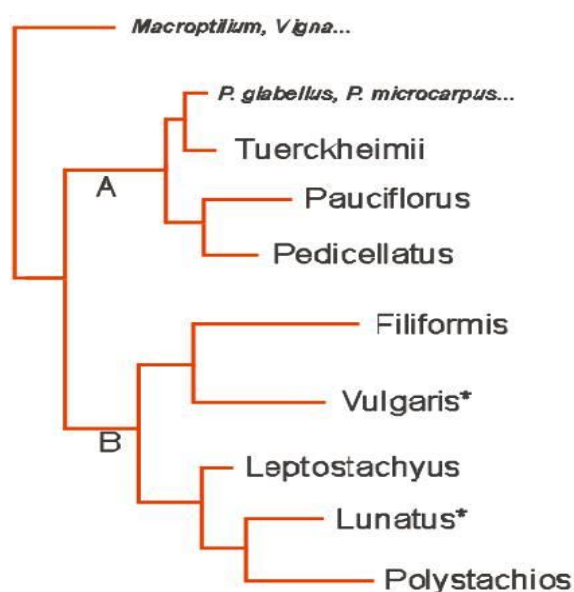


Figura 1. Modificado de Delgado-Salinas *et al.* (2006). Espécies de interesse econômico estão iseridas nos grupos com asterisco.

As relações filogenéticas no gênero são corroboradas ainda por fatores biogeográficos e morfológicos (Delgado-Salinas *et al.*, 2006). As espécies do clado A estão distribuídas principalmente nas regiões do México e Panamá, em altitudes entre 545 e 690 m, não ocorrendo em ilhas oceânicas. Florescem apenas durante as estações chuvosas (exceto *P. microcarpus*, que floresce em períodos secos ou úmidos), são sensíveis a distúrbios do habitat, e geralmente não toleram longos períodos de frio. Já as do clado B são amplamente distribuídas (desde o sudoeste do Canadá até a América do Sul) em altitudes variando de 654 a 737 m. Florescem em períodos de seca ou chuva, não sendo sensíveis a distúrbios ambientais, e algumas toleram longos períodos de frio (Delgado-Salinas *et al.*, 2006).

2.3.2. Citogenética de *Phaseolus*

2.3.2.1. Citogenética clássica

As primeiras espécies do gênero *Phaseolus* estudadas a nível cromossômico foram *P. acutifolius* A. Gray, *P. coccineus* L., *P. lunatus* L. e *P. vulgaris* L., todas com $2n = 22$ (Karpetschenko, 1925). Estudos subsequentes de contagem cromossômica foram realizados, estabelecendo-se o número cromossômico básico $x = 11$ para o gênero, com cromossomos predominantemente metacêntricos e submetacêntricos. A exceção à regra está em três espécies do grupo *Leptostachyus*, *P. leptostachyus* Benth., *P. micranthus* Hook. & Arn., e *P. macvaughii* A. Delgado (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 1996 e 1998), com $2n = 20$, que formam um grupo monofilético.

As espécies do gênero são caracterizadas por apresentar genomas pequenos, cromossomos diminutos e morfológicamente semelhantes, o que restringiu durante muito tempo as análises citogenéticas apenas a contagens cromossômicas (Mercado-Ruaro and Delgado-Salinas 1996, 1998). Na maioria dos casos, o padrão de distribuição de eucromatina e heterocromatina visualizado por meio de bandeamento diferencial é insuficiente para

distinção segura de pares entre pequenos cromossomos mitóticos em plantas (Ohmido *et al.*, 2007). Em *P. vulgaris*, por exemplo, com genoma de 637 Mpb ou 0,66 pg/1C (Arumuganathan e Earle, 1991) e cromossomos variando de 1,5 e 3 μm (Sarbhoy, 1978), as técnicas de bandeamento C não se mostraram eficazes na diferenciação entre os cromossomos da espécie, pois blocos de intensidades semelhantes foram evidenciadas nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos (Mok e Mok, 1976; Zheng, 1991; Moscone *et al.*, 1999). Com o desenvolvimento da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e construção de bibliotecas genômicas de grandes insertos inseridos em vetores BACs, as espécies do gênero puderam então ser analisadas mais detalhadamente.

2.3.2.2. Modificações epigenéticas

Estudos envolvendo histonas modificadas ou metilação de DNA em plantas e mais especificamente em Fabaceae são escassos. Um estudo bastante informativo revelou dados curiosos a respeito da constituição da heterocromatina em *P. coccineus* atrelando dados de metilação do DNA, bandeamento C e hibridização *in situ* (Frediani *et al.*, 1986). Os dados demonstram que não há uma relação direta entre a presença de heterocromatina constitutiva/sequências repetitivas e o padrão de metilação do DNA. Em ao menos três cromossomos foi observado que a metilação não ocorre em todas as regiões heterocromáticas. Entretanto, certas bandas heterocromáticas que não são metiladas, são constituídas de sequências repetitivas, como observado para a banda intercalar do braço longo do cromossomo VI (Frediani *et al.*, 1986).

Situação semelhante foi observada em cromossomos mitóticos de *Vicia faba*, onde regiões metiladas em muitos casos não estão relacionadas com a heterocromatina, principalmente considerando as regiões teloméricas e subteloméricas (Frediani *et al.*, 1996). Também foi observada diferenças nos padrões de metilação entre cromossomos homólogos.

Os pares III, IV e VI, por exemplo, apresentam bandas que frequentemente estão presentes em um cromossomo, mas estão ausentes em seu homólogo. Essa diferenciação pode estar relacionada ou com a acessibilidade do anticorpo ou com o silenciamento gênico diferencial (Frediani *et al.*, 1996).

2.3.2.3. Mapeamento cromossômico comparativo

Técnicas de bandeamento associadas à FISH foram utilizadas inicialmente na identificação e caracterização cromossômica de quatro espécies do gênero *Phaseolus*, incluindo duas cultivares de *P. vulgaris* (Moscone *et al.*, 1999). Após a utilização de sondas cópia-única, Pedrosa *et al.* (2003) identificaram pela primeira vez os 11 cromossomos de *P. vulgaris* contribuindo para a construção do primeiro mapa cromossômico da espécie. Esse estudo foi o início da construção do seu mais completo mapa, no qual foram utilizados clones BACs como sondas, selecionados a partir de um mapa genético pré-estabelecido (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010). Esses mesmos BACs foram então utilizados como sondas nos estudos comparativos com as espécies *P. lunatus* (clado B e filogeneticamente próxima à *P. vulgaris*) e *P. microcarpus* (clado A), bem como em outro acesso do feijão comum (Altrock *et al.*, 2011; Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

Os estudos indicaram uma completa sintenia entre os três cariótipos, porém com discretas perdas de colinearidade, onde foram sugeridas ao menos cinco inversões cromossômicas entre as espécies, nos cromossomos 2, 3, 6, 9 e 10 (Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). A observação conjunta da morfologia cromossômica e localização dos marcadores cromossomo-específicos permitiu identificar a natureza de cada inversão, sendo quatro pericêntricas (Cr. 2, 3, 9 e 10) e uma paracêntrica (Cr. 6) (Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

Fonsêca e Pedrosa-Harand (2013) observaram um único par de DNAr 45S presente em *P. microcarpus* e em *P. lunatus*, no cromossomo 6 como em *P. vulgaris* (cultivar BAT93). Embora os cromossomos 9 e 10 dessa cultivar também sejam portadores desses sítios, dados obtidos até o presente sugerem que o sítio de DNAr 45S no cromossomo 6 provavelmente estava presente no ancestral do gênero e não foi perdido durante sua evolução. O surgimento de sítios adicionais em outros cromossomos parece ser devido a eventos restritos ao grupo Vulgaris, no qual está presente a espécie *P. coccineus*, do clado irmão ao de *P. vulgaris*, também com três sítios de DNAr 45S (Moscone *et al.*, 1999). Por outro lado, *P. accutifolius*, localizado no outro clado deste mesmo grupo, evidenciou apenas um sítio (Moscone *et al.*, 1999), provavelmente o conservado no cromossomo 6.

Sequências repetitivas pericentroméricas correspondem a cerca de 34% do genoma de *P. vulgaris* e foram mapeadas em todos os pares cromossômicos da espécie (Fonsêca *et al.*, 2010). Apesar da relativa conservação dessas sequências em *P. lunatus* e *P. microcarpus*, algumas sondas pericentroméricas não evidenciaram sinais de hibridização, sugerindo que o pericentrômero varia quanto à natureza de elementos repetitivos que o compõem a depender da espécie (Fonsêca e Pedrosa-Harand., 2013). Outro dado importante é evidenciado pelo padrão de distribuição de BACs contendo a sequência repetitiva *kipu* (David *et al.*, 2009) nas regiões subteloméricas de quase todos os cromossomos de *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010). Essa sequência parece não ser conservada no gênero, uma vez que nenhum sinal foi citogeneticamente evidenciado nas espécies *P. lunatus* e *P. microcarpus* (Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

Os eventos relacionados a inversões cromossômicas, posicionamento de sítios de DNAr 45S e análises de sequências pericentroméricas e subteloméricas permitiram propor os principais eventos durante a evolução cromossômica do gênero. Os diferentes eventos

puderam ser comparados com a filogenia estabelecida por Delgado-Salinas *et al.* (2006), possibilitando reconhecer algumas autapomorfias cariotípicas, com destaque para a predominância de eventos ocorridos na linhagem de *P. vulgaris* (Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

2.4. Referências bibliográficas

- Almeida, C. C. S., De Lemos Carvalho, P. C., & Guerra, M. (2007). Karyotype differentiation among Spondias species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). Botanical Journal of the Linnean Society, 155(4), 541-547.
- Altrock, S., Fonsêca, A., & Pedrosa-Harand, A. (2011). Chromosome identification in the Andean common bean accession G19833 (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). Genetics and molecular biology, 34(3), 459-463.
- Arumuganathan, K., & Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. Plant molecular biology reporter, 9(3), 208-218.
- Belyaev, N. D., Keohane, A. M., & Turner, B. M. (1996). Differential underacetylation of histones H2A, H3 and H4 on the inactive X chromosome in human female cells. Human genetics, 97(5), 573-578.
- Bennett, M. D., Leitch, I. J., Price, H. J., & Johnston, J. S. (2003). Comparisons with Caenorhabditis (~ 100 Mb) and Drosophila (~ 175 Mb) using flow cytometry show genome size in Arabidopsis to be ~ 157 Mb and thus ~ 25% larger than the Arabidopsis genome initiative estimate of ~ 125 Mb. Annals of Botany, 91(5), 547-557.
- Bonifácio, E. M., Fonsêca, A., Almeida, C., dos Santos, K. G., & Pedrosa-Harand, A. (2012). Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). Theoretical and Applied Genetics, 124(8), 1513-1520.

- Cabral, J. S., Felix, L. P., & Guerra, M. (2006). Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genet Mol Biol*, 29, 659-664.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655.
- Cheng, Z., Buell, C. R., Wing, R. A., Gu, M., & Jiang, J. (2001). Toward a cytological characterization of the rice genome. *Genome research*, 11(12), 2133-2141.
- Cornélio, M. T. M. N., Figueirôa, A. R. S., Santos, K. G. B., Carvalho, R., Soares Filho, W. D. S., & Guerra, M. (2003). Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Systematics and Evolution*, 240(1-4), 149-161.
- David, P., Chen, N. W., Pedrosa-Harand, A., et al. (2009). A nomadic subtelomeric disease resistance gene cluster in common bean. *Plant physiology*, 151(3), 1048-1065.
- Deal, R. B., & Henikoff, S. (2011). Histone variants and modifications in plant gene regulation. *Current opinion in plant biology*, 14(2), 116-122.
- Delgado-Salinas, A., Bibler, R., & Lavin, M. (2006). Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany*, 31(4), 779-791.
- Dhar, M. K., Fuchs, J., & Houben, A. (2009). Distribution of Eu-and heterochromatin in *Plantago ovata*. *Cytogenetic and Genome Research*, 125(3), 235-240.
- Ellneskog-Staam, P., Henry Loaisiga, C., & Merker, A. (2007). Chromosome C-banding of the teosinte *Zea nicaraguensis* and comparison to other *Zea* species. *Hereditas*, 144(3), 96-101.
- Feitoza, L., & Guerra, M. (2011a). Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. *Genetica*, 139(3), 305-314.
- Feitoza, L., & Guerra, M. (2011b). The Centromeric Heterochromatin of *Costus spiralis*: Poorly Methylated and Transiently Acetylated during Meiosis. *Cytogenetic and Genome Research*, 135(2), 160-166.

- Feng, J., Liu, Z., Cai, X., & Jan, C. C. (2013). Toward a molecular cytogenetic map for cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) by landed BAC/BIBAC clones. *G3: Genes| Genomes| Genetics*, 3(1), 31-40.
- Fonsêca, A., Ferreira, J., dos Santos, T. R. B., et al. (2010). Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Research*, 18(4), 487-502.
- Fonsêca, A., & Pedrosa-Harand, A. (2013). Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome*, 56(6), 335-343.
- Frediani, M., Tagliasacchi, A. M., Durante, M., & Avanzi, S. (1986). Distribution of 5-methylcytosine-rich regions in the polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* embryo suspensor as shown by the immunoperoxidase technique. *Experimental cell research*, 167(2), 337-342.
- Frediani, M., Giraldi, E., & Castiglione, M. R. (1996). Distribution of 5-methylcytosine-rich regions in the metaphase chromosomes of *Vicia faba*. *Chromosome Research*, 4(2), 141-146.
- Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A., & Schubert, I. (2006). Chromosomal histone modification patterns—from conservation to diversity. *Trends in plant science*, 11(4), 199-208.
- Fuchs, J., & Schubert, I. (2012). Chromosomal distribution and functional interpretation of epigenetic histone marks in plants. In *Plant cytogenetics* (pp. 231-253). Springer New York.
- Galasso, I., Schmidt, T., & Pignone, D. (2001). Identification of *Lens culinaris* ssp. *culinaris* chromosomes by physical mapping of repetitive DNA sequences. *Chromosome Research*, 9(3), 199-209.
- Gal-Yam, E. N., Egger, G., Iniguez, L., et al. (2008). Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), 12979-12984.

- Gepts, P. (1996) Origin and evolution of cultivated *Phaseolus* species In: Pickersgill B, Lock JM (editors). *Advances in Legume Systematics 8: Legumes of economic Importance*. Royal Gardens, Kew. pp. 65–74.
- Gill, B. S., & Kimber, G. (1974). The Giemsa C-banded karyotype of rye. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(4), 1247-1249.
- Greilhuber, J. (1979). C-band distribution, DNA content and base composition in *Adoxa moschatellina* (Adoxaceae), a plant with cold-sensitive chromosome segments. *Plant Systematics and Evolution*, 131(3-4), 243-259.
- Guerra, M. (2000). Chromosome number variation and evolution in monocots. In: Wilson KL e Morrison DA (eds) *Monocots - Systematics and Evolution*. CSIRO, Melbourne, p 127-136.
- Guerra, M. (2004). Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: *Conceitos e aplicações na citogenética*. Sociedade Brasileira de Genética. 1ª edição, Ribeirão Preto, p 1–32.
- Guerra, M. (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3-4), 339-350.
- Guerra, M. (2012). Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146(3), 703-710.
- Han, Y., Zhang, Z., Huang, S., & Jin, W. (2011). An integrated molecular cytogenetic map of *Cucumis sativus* L. chromosome 2. *BMC genetics*, 12(1), 18.
- Houben, A., Demidov, D., Gernand, D., Meister, A., Leach, C. R., & Schubert, I. (2003). Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *The Plant Journal*, 33(6), 967-973.
- Howell, E. C., Barker, G. C., Jones, G. H., et al. (2002). Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. *Genetics*, 161(3), 1225-1234.
- <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

- Islam-Faridi, M. N., Childs, K. L., Klein, P. E., et al. (2002). A molecular cytogenetic map of sorghum chromosome 1: fluorescence in situ hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes. *Genetics*, 161(1), 345-353.
- Jelinek, W. R., & Schmid, C. W. (1982). Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annual review of biochemistry*, 51(1), 813-844.
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074-1080.
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484-492.
- Kato, A., Vega, J. M., Han, F., Lamb, J. C., & Birchler, J. A. (2005). Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Current opinion in plant biology*, 8(2), 148-154.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705.
- Levin, D. A. (2002). The role of chromosomal change in plant evolution. *Oxford series in Ecology and Evolution*. Ed. PH Harvey & RM May. New York. 228 p.
- Lim, K. Y., Matyášek, R., Lichtenstein, C. P., & Leitch, A. R. (2000). Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma*, 109(4), 245-258.
- Lippman, Z., Gendrel, A. V., Black, M., et al. (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 430(6998), 471-476.
- Lippman, Z., & Martienssen, R. (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, 431(7006), 364-370.
- Liu, C., Lu, F., Cui, X., & Cao, X. (2010). Histone methylation in higher plants. *Annual review of plant biology*, 61, 395-420.

- Lysak, M. A., Berr, A., Pecinka, A., Schmidt, R., McBreen, K., & Schubert, I. (2006). Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 5224-5229.
- Marques, A., Fuchs, J., Ma, L., Heckmann, S., Guerra, M., & Houben, A. (2011). Characterization of eu- and heterochromatin of *Citrus* with a focus on the condensation behavior of 45S rDNA chromatin. *Cytogenetic and genome research*, 134(1), 72-82.
- Mendes, S., Moraes, A. P., Mirkov, T. E., & Pedrosa-Harand, A. (2011). Chromosome homeologies and high variation in heterochromatin distribution between *Citrus* L. and *Poncirus* Raf. as evidenced by comparative cytogenetic mapping. *Chromosome Research*, 19(4), 521-530.
- Mercado-Ruaro, P., & Delgado-Salinas, A. (1996). Karyological studies in several Mexican species of *Phaseolus* L. and *Vigna savi* (Phaseolinae, Fabaceae). *Advances in legume systematics*, 8, 83-87.
- Mercado-Ruaro, P., & Delgado-Salinas, A. (1998). Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). *American journal of botany*, 85(1), 1-1.
- Mercado-Ruaro, P., Delgado-Salinas, A., & Chiang, F. (2009). Taxonomic re-assessment of *Phaseolus dasycarpus* (Leguminosae): Systematic position, chromosome studies and re-description. *Brittonia*, 61(1), 8-13.
- Meyers, B. C., Tingey, S. V., & Morgante, M. (2001). Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Research*, 11(10), 1660-1676.
- Mok, D. W. S., & Mok, M. C. (1976). A modified Giemsa technique for identifying bean chromosomes. *Journal of Heredity*, 67(3), 187-188.
- Moraes, A. P., dos Santos Soares Filho, W., & Guerra, M. (2007). Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Research*, 15(1), 115-121.
- Moscone, E. A., Klein, F., Lambrou, M., Fuchs, J., & 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(6), 1224-1233.

- Nagaki, K., Cheng, Z., Ouyang, S., et al. (2004). Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nature genetics*, 36(2), 138-145.
- Ohmido, N., Sato, S., Tabata, S., & Fukui, K. (2007). Chromosome maps of legumes. *Chromosome Research*, 15(1), 97-103.
- Paesold, S., Borchardt, D., Schmidt, T., & Dechyeva, D. (2012). A sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reference FISH karyotype for chromosome and chromosome-arm identification, integration of genetic linkage groups and analysis of major repeat family distribution. *The Plant Journal*, 72(4), 600-611.
- Pedrosa, A., Vallejos, C., Bachmair, A., & Schweizer, D. (2003). Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(2), 205-212.
- Pedrosa-Harand, A., Kami, J., Gepts, P., Geffroy, V., & Schweizer, D. (2009). Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. *Chromosome Research*, 17(3), 405-417.
- Peñas, M. L. L., Bernardello, G., & Kiesling, R. (2008). Karyotypes and fluorescent chromosome banding in *Pyrrhocactus* (Cactaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 272(1-4), 211-222.
- Punina, E. O., Rodionov, A. V., Myakoshina, Y. A., & Grif, V. G. (2001). Nucleotide composition of the cold-sensitive heterochromatic regions in *Paris hainanensis* Merrill. *Russian Journal of Genetics*, 37(7), 776-782.
- Sarbhoy, R. K. (1978). Cytogenetical studies in the genus *Phaseolus* Linn.: 1 and 2. Somatic and meiotic studies in fifteen species of *Phaseolus*: part 1. *Cytologia*, 43(1), 161-170.
- Schmidt, T., & Heslop-Harrison, J. S. (1998). Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science*, 3(5), 195-199.
- Schwarzacher, T., Ambros, P., & Schweizer, D. (1980). Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evolution*, 134(3-4), 293-297.
- Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58(4), 307-324.

- Schweizer, D., Strehl, S., & Hagemann, S. (1990). Plant repetitive DNA elements and chromosome structure. *Chromosomes today*, 10, 33-113.
- Sheikh, S. A., & Kondo, K. (1995). Differential staining with orcein, Giemsa, CMA, and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (Droseraceae). *American journal of botany*, 1278-1286.
- Shi, J., & Dawe, R. K. (2006). Partitioning of the maize epigenome by the number of methyl groups on histone H3 lysines 9 and 27. *Genetics*, 173(3), 1571-1583.
- Song, Y. C., Liu, L. H., Ding, Y., et al. (1994). Comparisons of G-Banding patterns in six species of the Poaceae. *Hereditas*, 121(1), 31-38.
- Song, J., Dong, F., & Jiang, J. (2000). Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato molecular cytogenetics research. *Genome*, 43(1), 199-204.
- Souza, L. G. R., Crosa, O., Speranza, P., & Guerra, M. (2012). Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of botany*, 109(5), 987-999.
- Spencer, V. A., & Davie, J. R. (1999). Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*, 240(1), 1-12.
- Stebbins, G.J. 1950. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press, New York.
- Stebbins, G. L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. Reading: Addison-Wesley, 1971. 216 p.
- Sumner, A. T. (2003). *Chromosomes: organization and function*. Blackwell Publishing company, Berlin.
- Tagashira, N., & Kondo, K. (2001). Chromosome phylogeny of *Zamia* and *Ceratozamia* by means of Robertsonian changes detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) technique of rDNA. *Plant Systematics and Evolution*, 227(3-4), 145-155.
- Tanaka, R., & Hizume, M. (1980). C banding treatment for the chromosomes of some gymnosperms. *The botanical magazine= Shokubutsu-gaku-zasshi*, 93(2), 167-170.

- Urdampilleta, J. D., Coulleri, J. P., Ferrucci, M. S., & Forni-Martins, E. R. (2012). Karyotype evolution and phylogenetic analyses in the genus *Cardiospermum* L.(Paullinieae, Sapindaceae). *Plant Biology*.
- Wang, K., Guan, B., Guo, W., et al. (2008). Completely distinguishing individual A-genome chromosomes and their karyotyping analysis by multiple bacterial artificial chromosome–fluorescence in situ hybridization. *Genetics*, 178(2), 1117-1122.
- Yamamoto, M., Abkenar, A. A., Matsumoto, R., et al. (2007). CMA banding patterns of chromosomes in major *Citrus* species. *J Jpn Soc Hortic Sci* 76:36–40.
- Zakrzewski, F., Weisshaar, B., Fuchs, J., et al. (2011). Epigenetic profiling of heterochromatic satellite DNA. *Chromosoma*, 120(4), 409-422.
- Zheng, J. Y. (1991). Giemsa C-banding patterns in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. *Cytologia*, 56, 459-466.

Capítulo 1 - Do simples ao complexo: evolução cromossômica e rearranjo inédito em leguminosas revelados por BAC-FISH no gênero *Phaseolus* L.

Introdução

Em eucariotos, os cromossomos são a unidade genética hereditária transmitida por gerações após reprodução sexual ou assexual, variando em tamanho, forma e número. Em plantas podem ser encontradas espécies que variam entre $2n = 4$, como em *Brachyscome dichromosomatica* (Smith-White e Carter, 1970) e *Rhynchospora tenuis* (Vanzela *et al.*, 1996), por exemplo, a $2n = 1.400$ aproximadamente, em espécies do gênero *Ophioglossum* (Khandelwal, 1990). Embora variações numéricas possam ser causadas por haploidias, aneuploidias e cromossomos B, elas não possuem claras implicações no contexto evolutivo, pois resultam em genomas desbalanceados ou indivíduos não viáveis. Apenas as poliploidias e disploidias estão claramente implicadas na evolução cariotípica em eucariotos (Guerra, 2000).

Disploidia é o aumento ou o decréscimo gradual no número cromossômico haploide, ocasionados principalmente por processos de fissão e fusão cêntricas, respectivamente. A fissão cêntrica, por exemplo, ocorre frequentemente a partir da quebra de um par de cromossomos metacêntricos, gerando dois pares telocêntricos e um aumento do número cromossômico para $n + 1$. Já a fusão cêntrica (também chamada de translocação Robertsoniana), refere-se à translocação entre dois telocêntricos ou acrocêntricos, gerando um metacêntrico e uma redução no número cromossômico para $n - 1$, mantendo-se o número de braços (o *nombre fondamental*, NF) (Lysak e Schubert, 2013). Além disso, translocações envolvendo braços cromossômicos e inserções centroméricas, por exemplo, não podem ser descartados como participantes dos eventos reducionais (Mandakova e Lysak, 2008; Srinivasachary *et al.*, 2007; International Brachypodium Initiative, 2010). Esta última,

caracterizada pela inserção total de um cromossomo na região centromérica de outro, é principalmente observada em gramíneas (Luo *et al.*, 2009).

A utilização da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando clones BACs (cromossomos artificiais de bactérias) como sondas tem sido bastante útil para estabelecer homeologias cromossômicas e desvendar em maior detalhe os complexos eventos causadores da disploidia descendente entre espécies da família Brassicaceae. A partir do pressuposto número cromossômico ancestral ($n = 8$) foi possível elucidar os mecanismos formadores dos cariótipos de *Arabidopsis thaliana* ($n = 5$), *Neslia paniculata* ($n = 7$), *Turritis glabra* ($n = 7$) e *Hornungia alpina* ($n = 6$). O estudo revelou que os eventos responsáveis pela diminuição do número cromossômico de *A. thaliana* foram: a geração de cromossomos acrocêntricos a partir de inversões pericêntricas, translocação recíproca entre dois cromossomos, e ainda a eliminação de um microcromossomo proveniente dessa translocação (Lysak *et al.*, 2006). Estas ferramentas também foram utilizadas para detectar duas inserções centroméricas exclusivas de *Brachypodium distachyon* ($2n = 10$) quando comparada a outras seis espécies do gênero ($2n = 16$ a 18), na qual os cromossomos 1 e 2 foram formados por inserções em suas regiões centroméricas dos cromossomos correspondentes aos 6 e 5 de *Oryza sativa* (Wolny *et al.*, 2011).

A disploidia também foi proposta na evolução cariotípica do gênero *Phaseolus* L., que pertence à família Fabaceae, a terceira maior das Angiospermas, compreendendo aproximadamente 75 espécies distribuídas por toda a América, seu centro de origem (Broughton *et al.*, 2003). Delgado-Salinas *et al.* (2006), a partir da análise das sequências de nrDNA ITS/5.8 S e do loco plastidial *trnK*, propuseram uma filogenia molecular na qual o gênero aparece como monofilético, com as espécies distribuídas em dois clados principais denominados de A e B. Este último inclui o feijão comum (*P. vulgaris*) e as outras quatro

espécies de interesse econômico (*P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. polyanthus* e *P. acutifolius*). No clado B também está inserido o grupo *Leptostachyus*, para o qual a disploidia é proposta.

Estudos cariotípicos utilizando técnicas convencionais revelaram que a grande maioria das espécies do gênero apresenta 22 cromossomos pequenos (1,7 a 2,4 μm), meta ou submetacêntricos (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 1996 e 1998). As exceções três espécies do clado B constituintes do grupo *Leptostachyus* (*P. leptostachyus*, *P. macvaughii*, e *P. micranthus*), que por disploidia descendente apresentam $2n = 20$ (Delgado-Salinas *et al.*, 2006). Recentemente, BACs mapeados no feijão comum através de FISH foram utilizados em estudos comparativos com as espécies *P. lunatus*, também do clado B (Bonifácio *et al.*, 2012; Almeida e Pedrosa-Harand, 2013) e *P. microcarpus*, uma espécie selvagem do clado A (Fonsêca e Pedrosa-Harand., 2013), indicando uma forte sintenia com poucas perdas de colinearidade entre os três cariótipos. A grande estabilidade cariotípica observada dentre as espécies estudadas do gênero levou à hipótese que um evento simples haveria resultado na disploidia descendente do grupo *Leptostachyus*.

O presente estudo teve como objetivo, portanto, identificar os principais eventos responsáveis pela variação cromossômica estrutural e numérica ocorridos na formação de *P. leptostachyus* ($2n = 20$) através de FISH utilizando como sonda DNAr 45S e 5S, a sequência telomérica típica de *Arabidopsis* e BACs contendo sequência cópia-única de *P. vulgaris*. Além disso, foi possível testar a hipótese mais parcimoniosa, se a disploidia foi causada por uma simples fusão cêntrica, bem como identificar quais cromossomos estiveram envolvidos nessa redução.

Materiais e Métodos

Material vegetal e preparações citogenéticas

As sementes de *P. leptostachyus* (179671.00) foram obtidas do banco de germoplasma mantido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen (Brasília, DF) e multiplicadas no Jardim Experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Botânica da UFPE.

Pontas de raízes obtidas das sementes germinadas em placas de Petri à temperatura ambiente foram pré-tratadas em 2 mM 8-hidroxiquinoleína por 18 horas a 10 °C e fixadas em metanol/ácido acético 3:1 (v/v), sendo mantidas posteriormente a -20 °C. As pontas das raízes foram lavadas em água destilada antes de serem digeridas em 2 % (m/v) celulase ‘Onozuka R-10’ (Serva) e 20% (v/v) pectinase (Sigma-Aldrich), em tampão ácido cítrico-citrato de sódio a 37 °C por 90 min. O material foi fragmentado em uma gota de ácido acético 45 % e esmagado entre lâmina e lamínula. As lâminas foram secas por no mínimo 30 min. A seleção de lâminas e descoramento para FISH foram realizados de acordo com Cabral *et al.* (2006).

Preparação das Sondas

Os sítios de DNAr 5S e 45S foram localizados com as sondas D2, um fragmento de 500 pb contendo o DNAr 5S de *Lotus japonicus* (Pedrosa *et al.*, 2002), e R2, um fragmento de 6,5 kb da unidade de repetição 18S-5,8S-25S de *A. thaliana* (Wanzenböck *et al.*, 1997). A sonda telomérica utilizada, pLT11, representa um inserto com 400 pb da sequência pAtT4 de *Arabidopsis* (Richards e Ausubel, 1988) subclonado no vetor pUC19.

Os BACs mapeados pertencem a uma biblioteca genômica de *P. vulgaris* ‘BAT93’ (Kami *et al.*, 2006) e foram previamente selecionados e utilizados no mapeamento citogenético da espécie através da FISH (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). Ao menos dois BACs localizados em braços distintos de cada cromossomo de *P. vulgaris* foram selecionados, exceto para o cromossomo 5, para o qual apenas 1 BAC

estava disponível. Os DNAs foram obtidos usando o Qiagen Mini Plasmid Kit (QIAGEN) ou DNA Nucleobond AX columns (Macherey-Nagel) seguindo as recomendações do fabricante. Para a marcação das sondas foram utilizados Cy3-dUTP (GE) ou digoxigenina-11-dUTP (Roche) através de *nick translation* (Roche ou Invitrogen).

Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Os procedimentos aplicados aos cromossomos mitóticos foram essencialmente os mesmos descritos em Fonsêca *et al.* (2010). As misturas de hibridização consistiram de: formamida 50 % (v/v), sulfato de dextran 10 % (m/v), $2\times$ SSC e 2-5 ng/ μ l de sonda. As preparações foram desnaturadas por 5 min a 75 °C, seladas com esmalte e hibridizadas por até três dias a 37 °C. A estringência final foi de 76 %. A fração C_{0t} -100 de *P. vulgaris* foi adicionada em excesso de 20 a 80 vezes na mistura de hibridização quando necessário bloqueio. As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas com 0,4 μ l anti-digoxigenina produzida em ovelha e conjugada com FITC (Roche) e amplificados com 0,7 μ l de anti-ovelha produzidas em burro e conjugadas com FITC (Serotec) em 1 % BSA em PBS. As re-hibridizações das lâminas, para a localização de diferentes sequências de DNA em uma mesma célula foram realizadas de acordo com Heslop-Harrison *et al.* (1992).

Análise de dados

As imagens foram capturadas por microscópio de epifluorescência Leica DMLB equipado com câmera Cohu utilizando o software Leica QFISH. Para o processamento final, as imagens foram sobrepostas e coloridas artificialmente através do software Adobe Photoshop versão 10.0 e ajustadas apenas em brilho e contraste. O tamanho do maior par cromossômico e razão de braços foram obtidos a partir das medições de ao menos cinco

metáfases mitóticas por meio da ferramenta "Ruler Tool" do Adobe Photoshop. O centrômero foi determinado pela presença da constrição primária após coloração DAPI.

Resultados

As sequências de DNAr 5S e 45S, a sonda telomérica de *Arabidopsis* (Richards e Ausubel, 1988) e 25 clones previamente mapeados em *P. vulgaris* (*Pvu*, Fonsêca *et al.*, 2010) foram utilizados com o intuito de desvendar os principais eventos responsáveis pela dispoloidia em *P. leptostachyus*. A espécie apresentou um único e grande sítio de DNAr 45S na extremidade do braço curto do cromossomo denominado 6, identificado após hibridização do BAC 121F5 (*Pvu* Cr6) na região proximal do braço longo (Fig. 1A). O maior par cromossômico do complemento apresentou o único sítio de DNAr 5S observado, localizado na região proximal do braço curto, oposto ao BAC 255F18 (*Pvu* Cr11) (Fig. 1B).

O maior par apresenta um comprimento de 2,55µm e morfologia metacêntrica ($q/p = 1,03$), baseada na classificação de dos Santos Guerra (1986) e pode na maioria das vezes ser distinguido após coloração convencional. O BAC 127J2 (*Pvu* Cr11) que apresentou uma marcação fraca subtelomérica em vários pares adicionais de *P. vulgaris* (Fonseca *et al.*, 2010), evidenciou um sinal duplicado em *P. leptostachyus*. Um foi localizado na região subterminal do braço curto do maior par cromossômico e o outro, nessa mesma região de um par metacêntrico (Fig. 1C), colocalizado com o sinal extra do BAC 63H6 (*Pvu* Cr10), também subtelomérico em *P. vulgaris*. Curiosamente o outro sinal evidenciado por este BAC também foi localizado no maior cromossomo, na região subterminal do braço curto, oposto ao bacteriófago SJ19.12 (*Pvu* Cr10) e ao BAC 179N14 (*Pvu* Cr11), localizados na região intersticial e subterminal do braço longo, respectivamente (Fig. 1 D e E, respectivamente). Além disso, o BAC 18B15 (*Pvu* Cr6) foi localizado na extremidade deste mesmo braço (Fig. 1F), indicando que o maior par cromossômico é formado pela inserção centromérica do

cromossomo 10 no cromossomo 11, além de uma translocação envolvendo pelo menos a extremidade do braço longo do cromossomo 6.

Duas sequências repetitivas foram utilizadas para melhor esclarecer esses complexos eventos. O BAC 81A17, com padrão pericentromérico em todos os cromossomos de *P. vulgaris* (Fonsêca *et al.*, 2010), foi utilizado em *P. leptostachyus* evidenciando o mesmo padrão de hibridização. Apenas um único sinal forte foi observado na região pericentromérica do maior par (Cr 6:10:11), não sendo observado quaisquer resquícios de sequências pericentroméricas do cromossomo 11 ancestral (Fig. 1G). Além disso, a sequência telomérica de *Arabidopsis* (T₃AG₃) foi utilizada na tentativa de evidenciar sinais teloméricos intersticiais (ITS) no par 6:10:11. Entretanto, todos os sinais foram localizados nas extremidades cromossômicas e nenhuma evidência de ITS foi observada (Fig. 1H).

Dentre os BACs cópia-única disponíveis, ao menos um para cada braço foi selecionado para o restante dos cromossomos de *P. leptostachyus* para investigar a ocorrência de possíveis rearranjos adicionais. BACs mapeados em outras espécies foram representados esquematicamente ao lado de cada foto (Fig. 2A-E). Além do cromossomo 6, outros seis pares cromossômicos (Cr. 1, 2, 3, 7, 8 e 9) apresentaram quebras de sentença, com sinais em cromossomos distintos, caracterizando eventos de translocação (ex. Fig. 2 A, B, D e E). Além disso, ao menos duas quebras de colinearidade foram observadas para os pares 3 e 7, causadas provavelmente por eventos de inversão cromossômica. A primeira, do tipo paracêntrica, é sugerida pela localização do BAC 174E13 na região proximal do braço longo do cromossomo 3, enquanto em *P. vulgaris* ele se encontra na região subterminal deste mesmo braço (Fig. 2 C). A segunda inversão, do tipo pericêntrica, provavelmente ocorreu após a translocação de parte do braço curto do cromossomo 7, evidenciado em outro par cromossômico. Os BACs

33M20 e 22I21 adjacentes na região distal do braço longo em *P. vulgaris*, foram localizados em braços opostos em *P. leptostachyus*, caracterizando essa inversão (Fig. 2 D).

Dados referentes ao mapeamento das espécies *P. vulgaris* (Fonsêca *et al.*, 2010), *P. lunatus* (Bonifácio *et al.*, 2012) e *P. microcarpus* (Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013), juntamente com os dados para *P. leptostachyus* do presente trabalho foram associados à filogenia estabelecida para o gênero (Delgado-Salinas *et al.*, 2006) para uma abordagem evolutiva (Fig. 3). Enquanto as demais linhagens apresentaram aparentemente um ou dois eventos de inversão, apenas, ao menos duas inversões, seis translocações e uma inserção centromérica foram detectados em *P. leptostachyus*, evidenciando a causa da dispoloidia observada e uma série de rearranjos complexos adicionais.

Discussão

Para elucidar os eventos que deram origem ao número cromossômico $2n = 20$ de *P. leptostachyus* foram utilizados 28 marcadores, incluindo BACs de *P. vulgaris* ($2n = 22$) e sequências repetitivas (Fonsêca *et al.*, 2010). As 24 sequências cópia única utilizadas permitiram investigar se existe ou não conservação de sintenia e colinearidade entre *P. leptostachyus* e as espécies previamente mapeadas no grupo: *P. vulgaris*, *P. lunatus* e *P. microcarpus* (Fonsêca *et al.*, 2010; Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). Inicialmente, a presença de um único sítio de DNAr 45S no cromossomo 6 corroborou os dados obtidos que propõem a conservação desse sítio no cromossomo 6 como ancestral do gênero, uma vez que o mesmo é compartilhado entre espécies selvagens e cultivadas (Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). O único sítio de DNAr 5S de *P. leptostachyus* também foi conservado no cromossomo 10 (Pedrosa *et al.*, 2006; Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca e

Pedrosa-Harand, 2013). Entretanto, este cromossomo em *P. leptostachyus* foi claramente o maior do complemento, resultante do rearranjo causador da disploidia (ver discussão abaixo).

Este maior par cromossômico de *P. leptostachyus* é caracterizado por apresentar uma morfologia metacêntrica e por ser reconhecido após simples coloração convencional. Medições apontaram um tamanho médio de 2,55 μm , que corroboraram com o primeiro dado de medição para a espécie, estimando-o em 2,54 μm (Maréchal, 1970). A origem desse grande par metacêntrico por uma translocação Robertsoniana foi proposta posteriormente, e teria envolvido a ocorrência de eventos de translocações recíprocas desiguais seguidas da eliminação de um cromossomo sem genes importantes (Mercado-Ruaro e Delgado Salinas, 1996 e 1998). Porém, esta hipótese foi refutada no presente trabalho após a utilização de sete marcadores selecionados para os cromossomos 6, 10 e 11, que revelaram a constituição e os eventos responsáveis pela formação deste grande cromossomo. Segundo o modelo proposto por Schubert e Lysak (2011), possivelmente as regiões subteloméricas do cromossomo 10 foram translocadas com a região centromérica do cromossomo 11, gerando um pequeno cromossomo que foi perdido durante a evolução. Isso parece justificar a presença de apenas um bloco de heterocromatina pericentromérica, semelhante à descrita para o cromossomo 10 de *P. lunatus* (Bontifácio *et al.*, 2012), a espécie mapeada mais próxima filogeneticamente de *P. leptostachyus* (Delgado-Salinas *et al.*, 2006). Além disso, uma translocação envolvendo a extremidade do braço longo do cromossomo 6 parece explicar a presença do BAC 18B15 na extremidade do braço longo deste grande par. Este tipo de inserção centromérica é um evento inédito em leguminosas, sendo anteriormente observado em Brassicaceae (Lysak *et al.*, 2006) e principalmente em gramíneas (International Brachypodium Initiative, 2010). Estudos revelaram que a redução do número cromossômico ancestral de $n = 12$ para $n = 5$ em *Brachypodium* e $n = 10$ em sorgo e milho foi devido a uma série de inserções de um

cromossomo na região centromérica de outro cromossomo, seguidas de inativação e perda centromérica. Estas inserções devem ter sido causadas por recombinação ilegítima não-homóloga baseada na translocação recíproca entre *repeats* centroméricos/teloméricos (Murat *et al.*, 2010) e parecem ser o mecanismo dominante responsável pela redução do número básico cromossômico no grupo (International Brachypodium Initiative, 2010; Luo *et al.*, 2009).

Considerando que o cromossomo 10 ancestral do grupo *Leptostachyus* não possuía um sítio de DNAr 45S, a semelhança de *P. lunantus* (Bonifácio *et al.*, 2012), e supondo que a região de quebra do braço longo do cromossomo 6 tenha sido adjacente ao BAC 18B15, é possível calcular aproximadamente a quantidade de cromatina perdida na formação do par 6:10:11 de *P. leptostachyus*. A soma dos cromossomos 11 (58 Mpb), 10 (43,4 Mpb, sem o DNAr 45S) e parte do 6 (6,8 Mpb) equivaleria a 108,2 Mpb (dados obtidos de Fonsêca *et al.*, 2010). Baseado no tamanho do par 6:10:11, é possível que cerca de 39 Mpb de cromatina tenha sido perdida durante a evolução, associada principalmente ao pequeno cromossomo perdido após as translocações envolvendo os subtelômeros do cromossomo 10 e o centrômero do cromossomo 11.

Em *P. vulgaris*, a região subterminal da maioria dos cromossomos contém uma sequência satélite, denominada *kipu* (David *et al.*, 2009), presente em vários BACs repetitivos subteloméricos mapeados na espécie (Fonsêca *et al.*, 2010). Quando utilizados como sondas em *P. leptostachyus*, esses BACs evidenciaram marcação dupla, com um dos sinais localizado no cromossomo para o qual foi selecionado e o outro terminal sempre num mesmo par metacêntrico. Os resultados indicam que a sequência *kipu* encontra-se conservada na espécie ao menos em um bloco subtelomérico.

Sequências teloméricas intersticiais (ITS) parecem estar relacionadas com eventos de recombinação, rearranjos e fragilidade cromossômica em diferentes espécies (Fuchs *et al.*, 1995; Camats *et al.*, 2006; Bolzán, 2012). No genoma de *Brassica nigra*, por exemplo, a localização de ITS é quase exclusivamente associada aos pontos de quebras entre blocos conservados (Lagercrantz, 1998). Em *P. microcarpus*, a presença de ITS no braço longo do cromossomo 3 sugeriu um evento de inversão cromossômica em relação a *P. vulgaris* que foi posteriormente confirmada e caracterizada como pericêntrica (Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). A sequência telomérica de *Arabidopsis* (TTTAGGG) foi utilizada como sonda em *P. leptostachyus* com o objetivo de evidenciar resquícios dos telômeros do cromossomo 10 inserido, porém foram encontradas apenas sequências associadas às extremidades cromossômicas. O resultado reforça o envolvimento e perda das extremidades deste cromossomo numa translocação com o cromossomo 11. Porém, se essas sequências tivessem sido mantidas após a inserção, é possível que elas tenham sido misturadas ao genoma, tornando-se dispersas devido às elevadas taxas de recombinação da região intersticial na qual está inserida (Murat *et al.*, 2010).

Além de uma origem complexa para o maior par cromossômico, envolvendo provavelmente cinco quebras nos cromossomos 6, 10 e 11, translocações foram evidenciadas para outros seis pares cromossômicos de *P. leptostachyus*, confirmadas pela localização em cromossomos distintos de BACs mapeados em um único par nas três espécies previamente investigadas. Curiosamente, apenas duas inversões cromossômicas inéditas, do tipo paracêntrica (Cr. 3) e pericêntrica (Cr. 7), foram evidenciadas. Estudos anteriores demonstraram a grande estabilidade do gênero *Phaseolus*, com conservação de sintonia e poucas quebras de colinearidade, causadas principalmente por eventos de inversões cromossômicas (Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). Esses dados

cariotípicos foram somados aos dados do presente trabalho e associados à filogenia estabelecida para o gênero (Delgado-Salinas *et al.*, 2006), possibilitando detectar um ou dois rearranjos exclusivos de cada linhagem, propostos como eventos sinapomórficos. A disploidia descendente de *P. leptostachyus*, no entanto, foi associada a uma série de eventos cromossômicos, inclusive rearranjos inéditos no gênero, como translocações. Ao menos sete translocações, duas inversões e uma inserção centromérica estiveram envolvidas.

Estudos filogenéticos relacionados a dados cariotípicos permitiram direcionar a disploidia do gênero *Zamia* (Zamiaceae) ($2n = 16$ a 28) como sendo ascendente provocada principalmente por eventos de fissão cromossômica (Olson e Gorelick, 2011). No gênero *Anemone* (Ranunculaceae), dados cariotípicos e filogenéticos indicam que houve redução do número cromossômico $2n = 8$ do subgênero *Anemone*, para $2n = 7$, do subgênero *Anemonidium*, possivelmente causado por fusões/translocações (Mlinarec *et al.*, 2012). Além disso, a associação entre citogenética e filogenia em Solanaceae, incluindo tomate, batata, berinjela, pimenta e tabaco, permitiu reconstruir cariótipos ancestrais e identificar que embora modestas mudanças tenham ocorrido, inversões estiveram em maior número em relação à translocações (Wu e Tanksley, 2010). Embora esses estudos tenham direcionado a disploidia como ascendente ou descendente, o esclarecimento dos rearranjos cromossômicos envolvidos estiveram restritos a Brassicaceae e Poaceae. Por exemplo, a partir do pressuposto número cromossômico ancestral ($n = 8$) foi possível elucidar os mecanismos formadores dos cariótipos de *Arabidopsis thaliana* ($n = 5$) e de cinco espécies relacionadas (variando entre $n = 6$ e $n = 8$). A diminuição do número cromossômico de *A. thaliana* foi decorrente da geração de cromossomos acrocêntricos a partir de inversões pericêntricas, translocação recíproca entre dois cromossomos, e ainda a eliminação de um cromossomo resultante dessa translocação (Lysak *et al.*, 2006). Para as espécies da família Brassicaceae com $n = 7$, a explicação mais

parcimoniosa sugere que a redução de $n = 8$ para $n = 7$ tenha surgido a partir de três eventos de translocação e dois eventos de inversão, não sendo encontrados eventos de duplicação ou deleção (Mandáková e Lysak, 2008).

Devido ao exclusivo número cromossômico ($2n = 20$) compartilhado pelas três espécies do grupo *Leptostachyus*, é sugerido que os rearranjos cromossômicos envolvidos nesta disloidia descendente tenham ocorrido na espécie ancestral deste clado. Levando em consideração que o México é o centro de diversificação do gênero, sua geologia deve ser levada em conta no processo de especiação. A divergência desse grupo, calculada em aproximadamente 2 Ma, ocorreu provavelmente após as atividades tectônicas nessa região (6 Ma). A formação de montanhas, como a Cintura Vulcânica Trans-Mexicana, parece ter facilitado sua posterior diversificação em novos ambientes (Delgado-Salinas *et al.*, 2006). É possível que o isolamento reprodutivo das populações do grupo *Leptostachyus* tenha favorecido a fixação de inúmeros rearranjos cromossômicos. Uma hipótese alternativa propõe que rearranjos podem ser os causadores de especiação por supressão de recombinação, na qual genes situados na região envolvida podem se diferenciar, ao contrário dos genes normalmente recombinados fora dessas regiões (Rieseberg, 2001). Porém, para que esse tipo de especiação seja comprovada, deve-se evidenciar o exclusivo rearranjo em relação a outros taxa e a supressão de recombinação associada aos efeitos no isolamento reprodutivo (Faria e Navarro, 2011).

O presente estudo demonstrou que, apesar da forte estabilidade cariotípica observada no gênero *Phaseolus*, quebrada por raras inversões cromossômicas, uma série de eventos, incluindo inserção centromérica e translocações, até então inéditos no gênero, estão aparentemente envolvidos na disloidia descendente de *P. leptostachyus*. A hipótese de uma simples fusão Robertsoniana foi refutada. Estudos futuros em outras espécies do clado

Leptostachyus permitirá esclarecer se esse aumento na frequência de rearranjos em relação às demais espécies do gênero aconteceu de forma pontual, estando diretamente envolvido no evento de disploidia, ou se gradualmente tem diferenciado *P. leptostachyus* das demais espécies. Outros gêneros diplóides e numericamente estáveis, com raros eventos de disploidia, devem ser investigados utilizando ferramentas semelhantes, de modo a testar se *Phaseolus* representa uma exceção ou se eventos de disploidia estão em geral associados a reestruturações genômicas mais complexas mesmo em espécies que não passaram por eventos de poliploidia.

Referências bibliográficas

- Almeida, C., & 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 1-8.
- Bolzán, A. D. (2012). Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis*, 27(1), 1-15.
- Bonifácio, E. M., Fonsêca, A., Almeida, C., dos Santos, K. G., & Pedrosa-Harand, A. (2012). Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 124(8), 1513-1520.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and soil*, 252(1), 55-128.
- Cabral, J. S., Felix, L. P., & Guerra, M. (2006). Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genet Mol Biol*, 29, 659-664.
- Camats, N., Ruiz-Herrera, A., Parrilla, J. J., et al. (2006). Genomic instability in rat: breakpoints induced by ionising radiation and interstitial telomeric-like sequences.

- Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 595(1), 156-166.
- David, P., Chen, N. W., Pedrosa-Harand, A., et al. (2009). A nomadic subtelomeric disease resistance gene cluster in common bean. *Plant physiology*, 151(3), 1048-1065.
- Delgado-Salinas, A., Bibler, R., & Lavin, M. (2006). Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany*, 31(4), 779-791.
- dos Santos, G. M. (1986). Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Rev Bras Genet* 9:741– 743.
- Faria, R., & Navarro, A. (2010). Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends in ecology & evolution*, 25(11), 660-669.
- Fonsêca, A., Ferreira, J., dos Santos, T. R. B., et al. (2010). Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Research*, 18(4), 487-502.
- Fonsêca, A., & Pedrosa-Harand, A. (2013). Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome*, 56(6), 335-343.
- Fonsêca, A., Ferreira, J., dos Santos, T. R. B., et al. (2010). Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Research*, 18(4), 487-502.
- Fuchs, J., Brandes, A., & Schubert, I. (1995). Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Plant Systematics and Evolution*, 196(3-4), 227-241.
- Guerra, M. (2000). Chromosome number variation and evolution in monocots. *Monocots: systematics and evolution*. Collingwood, Australia: CSIRO, 127-136.
- Heslop-Harrison, J. S., Harrison, G. E., & Leitch, I. J. (1992). Reprobing of DNA: DNA in situ hybridization preparations. *Trends in Genetics*, 8(11), 372-373.
- International Brachypodium Initiative. (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463: 763–768.
- Kami, J., Poncet, V., Geffroy, V., & Gepts, P. (2006). Development of four phylogenetically-

- arrayed BAC libraries and sequence of the APA locus in *Phaseolus vulgaris*. Theoretical and Applied Genetics, 112(6), 987-998.
- Khandelwal, S. (1990). Chromosome evolution in the genus *Ophioglossum* L. Botanical journal of the Linnean Society, 102(3), 205-217.
- Lagercrantz, U. (1998). Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that Brassica genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. Genetics, 150(3), 1217-1228.
- Luo, M. C., Deal, K. R., Akhunov, E. D., et al. (2009). Genome comparisons reveal a dominant mechanism of chromosome number reduction in grasses and accelerated genome evolution in Triticeae. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(37), 15780-15785.
- Lysak, M. A., Berr, A., Pecinka, A., Schmidt, R., McBreen, K., & Schubert, I. (2006). Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(13), 5224-5229.
- Lysak, M. A., & Schubert, I. (2013). Mechanisms of chromosome rearrangements. In Plant Genome Diversity Volume 2 (pp. 137-147). Springer Vienna.
- Lysak, M. A., Berr, A., Pecinka, A., Schmidt, R., McBreen, K., & Schubert, I. (2006). Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(13), 5224-5229.
- Mandáková, T., & Lysak, M. A. (2008). Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in $x=7$ crucifer species (Brassicaceae). The Plant Cell Online, 20(10), 2559-2570.
- Maréchal, R. (1970). Données cytologiques sur les espèces de la sous-tribu des Papilionaceae-Phaseoleae-Phaseolinae. Deuxième série. Bulletin du Jardin botanique national de Belgique/Bulletin van de National Plantentuin van België, 40(4), 307-348.

- Mercado-Ruaro, P., & Delgado-Salinas, A. (1996). Karyological studies in several Mexican species of *Phaseolus* L. and *Vigna savi* (Phaseolinae, Fabaceae). *Advances in legume systematics*, 8, 83-87.
- Mercado-Ruaro, P., & Delgado-Salinas, A. (1998). Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). *American journal of botany*, 85(1), 1-1.
- Mlinarec, J., Šatović, Z., Mihelj, D., Malenica, N., & Besendorfer, V. (2012). Cytogenetic and phylogenetic studies of diploid and polyploid members of Tribe Anemoninae (Ranunculaceae). *Plant biology*, 14(3), 525-536.
- Murat, F., Xu, J. H., Tannier, E., et al (2010). Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. *Genome research*, 20(11), 1545-1557.
- Olson, K., & Gorelick, R. (2011). Chromosomal fission accounts for small-scale radiations in *Zamia* (Zamiaceae; Cycadales). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165(2), 168-185.
- Pedrosa-Harand, A., Kami, J., Gepts, P., Geffroy, V., & Schweizer, D. (2009). Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. *Chromosome Research*, 17(3), 405-417.
- Pedrosa, A., Sandal, N., Stougaard, J., Schweizer, D., & Bachmair, A. (2002). Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics*, 161(4), 1661-1672.
- Pedrosa-Harand, A., de Almeida, C. C. S., Mosiolek, M., Blair, M. W., Schweizer, D., & Guerra, M. (2006). Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(5), 924-933.
- Rieseberg, L. H. (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(7), 351-358.
- Richards, E. J., & Ausubel, F. M. (1988). Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 53(1), 127-136.
- Schubert, I., & Lysak, M. A. (2011). Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, 27(6), 207-216.

- Smith-White, S., & Carter, C. R. (1970). The cytology of *Brachycome lineariloba*. *Chromosoma*, 30(2), 129-153.
- Srinivasachary, D., & MM, G. MD, and Devos, KM (2007). Comparative analyses reveal high levels of conserved colinearity between the finger millet and rice genomes. *Theor. Appl. Genet*, 115, 489-499.
- Vanzela, A. L., Guerra, M., & Luceno, M. (1996). *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes. *Cytobios*, 88(355), 219-228.
- Wanzenböck, E. M., Schöfer, C., Schweizer, D., & 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*. *The Plant Journal*, 11(5), 1007-1016.
- Wolny, E., Lesniewska, K., Hasterok, R., & Langdon, T. (2011). Compact genomes and complex evolution in the genus *Brachypodium*. *Chromosoma*, 120(2), 199-212.
- Wu, F., & Tanksley, S. (2010). Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *BMC genomics*, 11(1), 182.

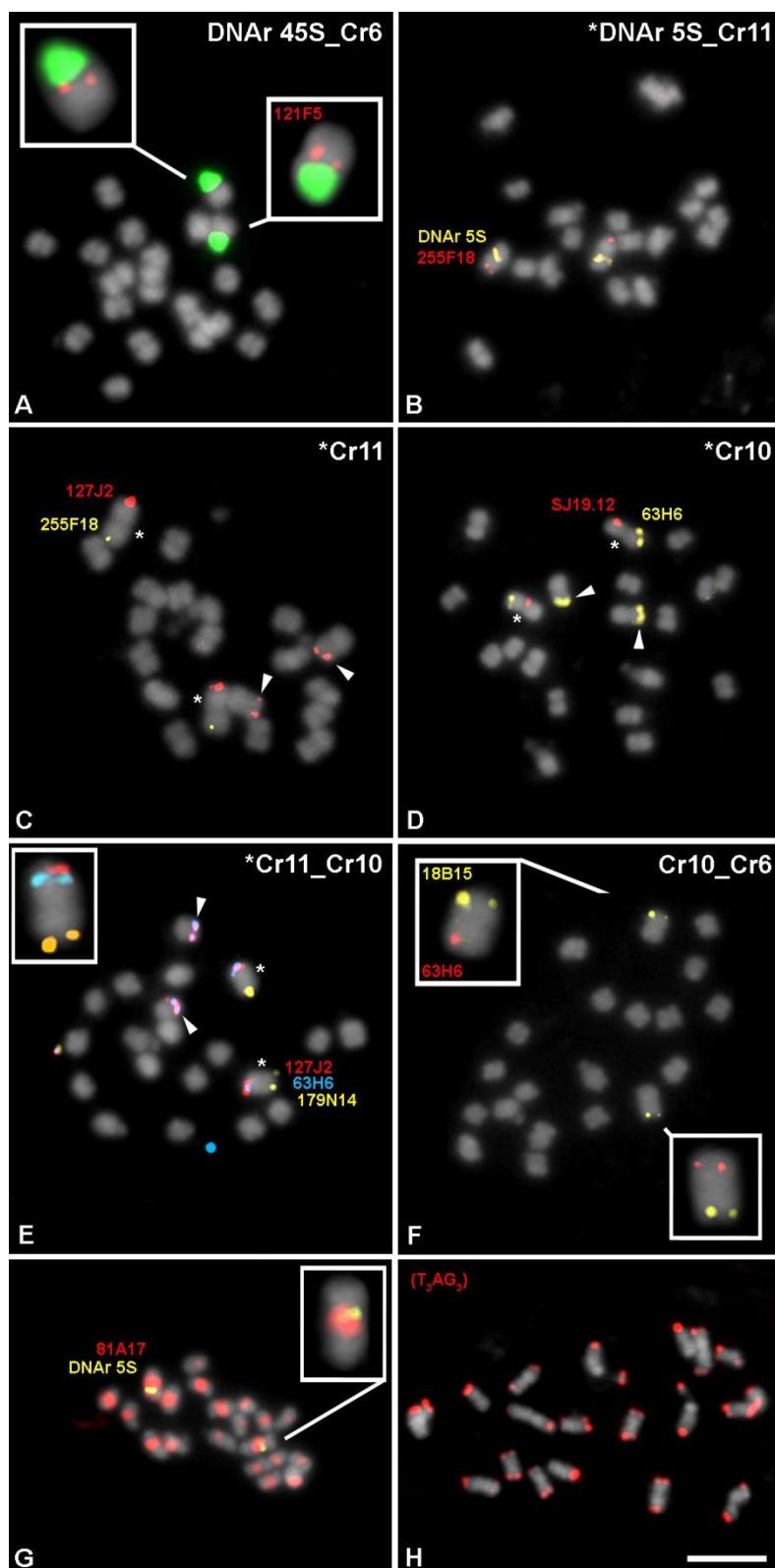


Fig 1. Hibridização *in situ* em cromossomos metafásicos mitóticos de *P. leptostachyus*. Grande sítio de DNAr 45S (verde) na extremidade do braço curto do cromossomo 6, reconhecido pelo BAC 121F5 (vermelho) (A). Único sítio de DNAr 5S (amarelo), localizado no maior cromossomo do complemento, sintênico ao BAC 255F18 (vermelho; *Pvu* Cr11) (B). Além dos BACs 127J2 (vermelho) e 255F18 (amarelo) (ambos *Pvu* Cr11) (C), o BAC 63H6 (amarelo) e o fago SJ19.12 (vermelho) (ambos *Pvu* Cr 10) (D) também hibridizaram no maior par. Sinais de BACs repetitivos subteloméricos em *P. vulgaris* foram duplicados em *P. leptostachyus* (ex. 127J2 e 63H6) e evidenciados em C, D e E. BACs 127J2 (vermelho), 63H6 (azul) e 179N14 (amarelo) hibridizados numa mesma célula, evidenciando uma inserção centromérica do cromossomo 10 no cromossomo 11 (E). Translocação representada pela sintenia entre os BAC 18B15 (*Pvu* Cr6, amarelo) e 63H6 (vermelho) (F). BAC 81A17 (vermelho), pericentromérico em todos os cromossomos do complemento e sonda do DNAr 5S (amarelo), identificando o maior cromossomo (G). Sequência telomérica de *Arabidopsis* (T_3AG_3 , vermelho) sem qualquer sinal intersticial. Exceto para E, inserções apresentam os mesmos cromossomos indicados na metáfase completa, porém em maior ampliação. Cabeças de seta em C, D e E indicam o par cromossômico metacêntrico portador de *Khipu*. Barra em H, corresponde a 5 μ m.

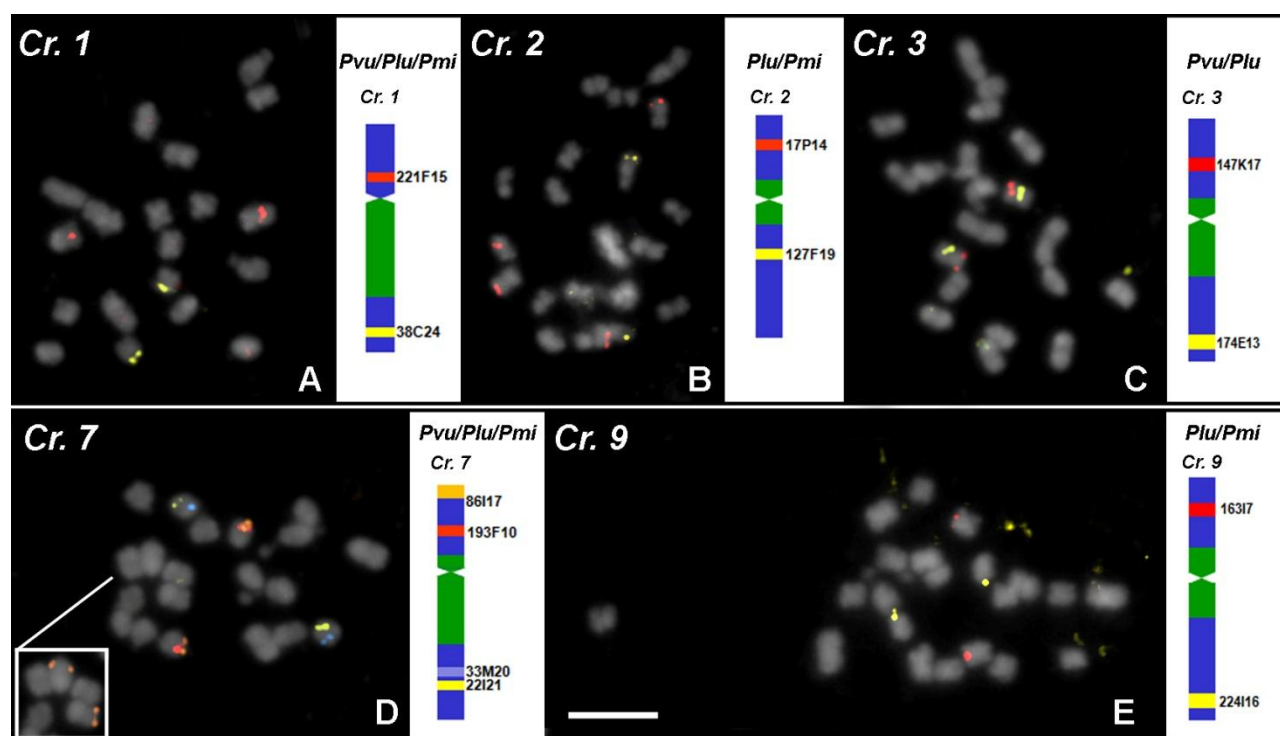


Fig 2. Hibridização *in situ* em cromossomos metafásicos mitóticos de *P. leptostachyus* evidenciando diferentes rearranjos. Os BACs hibridizados são representados pelas cores da representação esquemática ao lado direito de cada foto, que demonstra o padrão de distribuição desses BACs nas espécies previamente mapeadas (*P. vulgaris*, *Pvu*; *P. lunatus*, *Plu*; *P. microcarpus*, *Pmi*) (Fonsêca *et al.*, 2010; Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). Em **A**, **B**, **D**, e **E**, BACs selecionados para um mesmo cromossomo hibridizados em cromossomos distintos, indicando translocações. Inversões paracêntrica e pericêntrica ocorridas nos cromossomos 3 e 7, respectivamente (**C** e **D**). Inserção em **D** evidencia o sinal duplicado do BAC 86I17 em maior contraste. Barra em **E**, corresponde a 5 μ m.

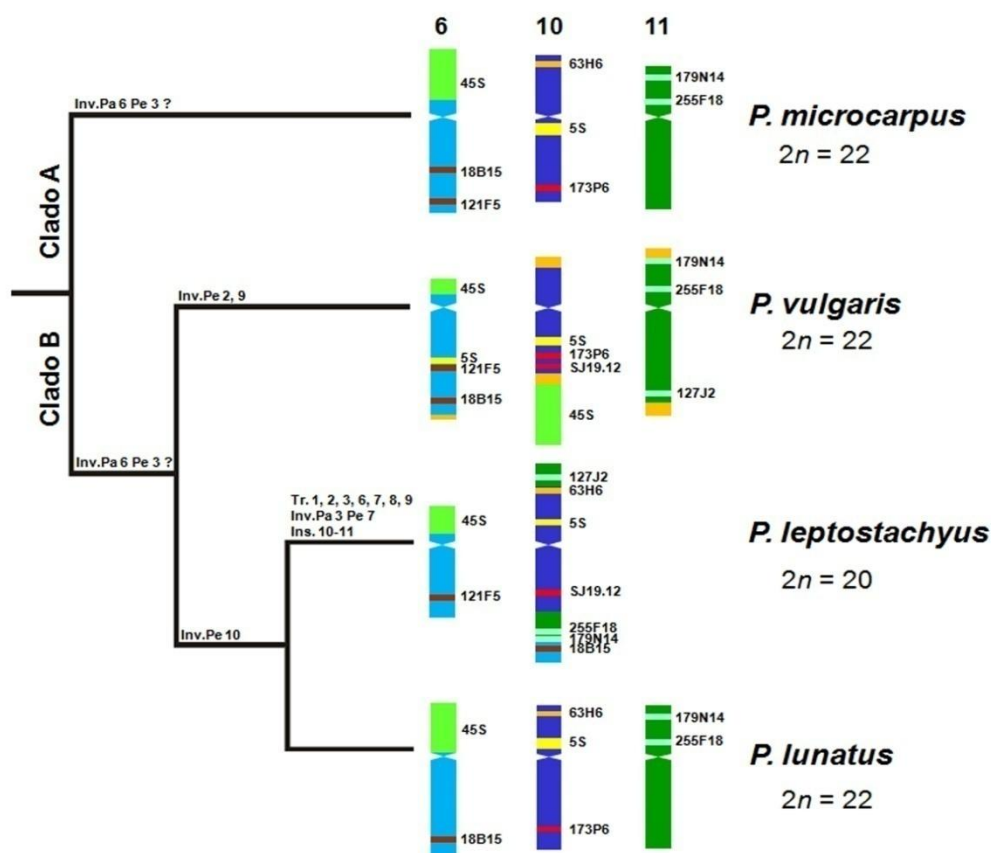


Fig 3. Análise esquemática comparativa dos três cromossomos envolvidos na inserção centromérica em *P. leptostachyus* com outras três espécies mapeadas, *P. lunatus* (Bonifácio *et al.*, 2012), *P. vulgaris* (Fonsêca *et al.*, 2010) e *P. microcarpus* (Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). A análise associada com a filogenia proposta para o gênero (modificado de Delgado-Salinas *et al.*, 2006). Eventos sinapomórficos foram representados em cima de cada clado pelas siglas Inv (inversão), Pa (paracêntrica), Pe (pericêntrica), Tr (translocação), Ins (inserção) e números indicando os pares cromossômicos envolvidos. Os eventos Inv.Pa 6 Pe 3 dependem de um grupo externo para seu posicionamento entre os clados A e B.

3. Conclusões

- Os resultados de imunocoloração de importantes modificações de histonas para o feijão comum revelou, de modo geral, o mesmo padrão de associação à heterocromatina (H3K27me1 e H3K9me2) ou à eucromatina (H3K4me3 e H4K5ac) previamente obtido em espécies modelo.
- A alta resolução obtida pela imunocoloração em paquíteno permitiu inferir que existe variabilidade de atividades em blocos heterocromáticos relacionadas a padrões epigenéticos ligados ao DNA e proteínas histonas.
- Embora o DNA da heterocromatina pericentromérica se mostre em geral hipermetilado, essa associação não é observada para a heterocromatina terminal nem para a região centromérica, revelando a heterogeneidade da heterocromatina na espécie.
- As análises com anti-5mC também indicam que regiões heterocromáticas pericentroméricas podem apresentar diferenças entre homólogos, que podem estar relacionadas ou com a acessibilidade do anticorpo ou com o silenciamento gênico diferencial
- A atividade gênica das RONS parece requerer a hipometilação nos sítios de DNAr 45S.
- A hipometilação do maior bloco heterocromático terminal, associado a genes de resistência à antracnose, mostrou-se estável, independente da presença de estresse biótico. Esse resultado pode estar relacionado com uma alta atividade gênica nesta região, mesmo em uma situação sem estresse, ou com um controle da expressão não

dependente de metilação, ou com uma alteração no grau de metilação a nível gênico, não detectável a nível citológico.

- A presença de sítios de DNAr 45S e 5S nos cromossomos 6 e 10 de *P. leptostachyus*, respectivamente, corrobora essas localizações como plesiomórficas no gênero *Phaseolus*.
- A disploidia descendente do gênero *Phaseolus* foi ocasionada por uma inserção centromérica associada a uma translocação, mantidas provavelmente pelo isolamento reprodutivo ou foram fatores ativos de especiação.
- A grande estabilidade cariotípica do gênero contrasta com a rápida reestruturação do complemento cromossômico observada no grupo *Leptostachyus*. Seis translocações, até então inéditas para o gênero, e duas inversões cromossômicas foram evidenciadas em *P. leptostachyus*, aparentemente sem relação direta com a disploidia.

Normas da revista *Cytogenetic and Genome Research*

Introduction

'Cytogenetic and Genome Research' publishes high quality original reports and reviews covering all aspects of chromosomes, genes and genomes in man, animals and plants.



Categories of Manuscripts for Conventional Issues

Original Articles are reports on

- Human, Animal and Plant Cytogenetics
- Cancer Cytogenetics
- Molecular Cytogenetics
- Gene Mapping, Cloning and Sequencing
- Gene Characterization
- Comparative Gene Mapping
- Somatic Cell Genetics
- Genes and Diseases
- Developmental Genetics
- Epigenetics.

Other categories closely related to the above topics could be considered by contacting the Editors.

Reviews covering a timely topic by experts in the field are either invited by the Editors or may be submitted for consideration.

Short Reports must present results of sufficient importance to justify accelerated acceptance. They should not be longer than 4 printed pages, including figures, tables and references.

Human Cytogenetics Case Reports are for de novo observations, particularly such which apply the use of HGMP (Human Genome Mapping Project) resources to the detailed characterization of chromosome rearrangements thereby further highlighting the nature of the abnormalities being described.

Cytogenetics of Rare or Endangered Species with straightforward karyotype descriptions of animals or plants should not be longer than 3 printed pages, including figures, tables and references.

Chromosome and Gene Workshops or Reports compile data that have been collected for single chromosomes, genes or genomes, hereditary diseases and gene-phenotype correlations in man, animals and plants. Illustrations and tables may be included.

Collaborative and Interactive Research Projects are contributions from investigators who are in need of research materials, or need the assistance of colleagues with specialized expertise, or who have data that is inadequate for a full report but which could be published when combined with data of others.

Commentaries are a forum for observations, opinions, and comments outside the realm of conventional scientific papers. Original data, illustrations and tables may be included.



Single Topic Issues

The journal has a tradition in publishing a series of themed issues. For these publications we are soliciting the assistance of one or more expert investigators to act as Guest Editors in an area that is particularly interesting and/or one in which there is a need for a thorough overview. The Guest Editors invite top researchers to contribute original research reports or reviews of a topic that is in their main area of interest. These manuscripts are peer reviewed the same way as the papers received for the conventional issues. Proposals clearly outlining a theme and nominating potential Guest Editors are welcome.



Submission

Manuscripts should be submitted online

Online Manuscript Submission

Should you experience any problems with your submission, please contact the editorial office:

claus.steinlein@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Claus Steinlein
Department of Human Genetics
University of Würzburg
Biozentrum, Am Hubland
D-97074 Würzburg (Germany)
Tel. (+49) 931 31-88091
Fax (+49) 931 31-84058

Authors should indicate which of the **Executive or Associate Editors** they feel would be most appropriate for their report.

All manuscripts are subject to editorial review. The editors reserve the right to improve style and, if necessary, return the manuscript for rewriting to the authors. The editorial office reserves rights to reject manuscripts based on priorities and space availability in the journal.



Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation.

If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).



Arrangement

Manuscripts must be prepared strictly in accordance with the style of this journal.

Title page: The first page should give the full names of the authors and their affiliations, the full postal address, telephone and fax numbers, as well as the e-mail address of the corresponding author.

Abstracts should be provided for all Original Articles, Reviews, Human Cytogenetics Case Reports, and Cytogenetics of Rare or Endangered Species.

Figures: Digital illustrations should be sharp with good contrast and color rendition. Resolution for all graphics should be at least 300 dots per inch. We request that all illustrations be in a common format such as .jpg (.jpeg, .jpe), .tif (.tiff), .eps or .ppt.

Tables must be in Word format. Please use MS WORD Table > Insert > Table command from the menu

bar to make tables.



Literature Cited

References should be quoted in the text as follows:

Single author: Jones (1999)

Two authors: Jones and Smith (2000)

More than two authors: Jones *et al.* (2001)

The reference list should be arranged alphabetically according to the first author's surname. Titles should be given in full.

Papers published in electronic format should list authors, title and journal as above followed by the journal's URL, eg:

Chinnappan D, Zhang Y, Ravid K:

AIM-1 Transgenic mice with a curly tail phenotype and its chromosome location.

Cytogenet Genome Res 98:231A (2002)

<http://karger.com/doi/10.1159/000069799>

Book references must include the book title, editor(s), publisher, and city of publication.

Recent issues of the journal should be carefully consulted for reference list style.

Agreement between text citations and the reference list should be checked carefully, and the latter checked for accuracy. If many errors are found, the manuscript will be returned for corrections which may cause considerable publication delay.



Gene Symbols

Human gene symbols: Only official gene symbols of the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) are accepted. Authors must obtain or verify the official gene symbol of the gene(s) mapped and indicate that they have done so in the manuscript submitted. This can be accomplished for human genes by contacting

HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)

European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)

Wellcome Trust Genome Campus

Hinxton, Cambridgeshire

CB10 1SA, UK

Fax +44 (0)1223 494 468

E-Mail hgnc@genenames.org

Website: www.genenames.org

Guidelines set forth by the HUGO Gene Nomenclature Committee are available at <http://www.genenames.org/guidelines.html>.

New symbols and names for genes can be requested electronically through the online gene symbol request form at http://www.genenames.org/cgi-bin/hgnc_request.pl.

Animal gene symbols: Authors submitting material on mouse and rat genetics should obtain correct genetic nomenclature before publication. Contact

Dr. Lois Maltais

MGD Nomenclature Coordinator

The Jackson Laboratory
600 Main Street
Bar Harbour ME 04609 (USA)
Tel. +1 (207) 288 6429
Fax +1 (207) 288 6132
E-mail nomen@informatics.jax.org
MGD home page: www.informatics.jax.org

Guidelines set forth by the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice are available at www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/table.shtml

New symbols and names for genes can be requested electronically through the online symbol registry form at www.informatics.jax.org/mgihome/nomen

Gene mapping data for the mouse should also be submitted to the Mouse Genome Database (MGD) following the guidelines at www.informatics.jax.org/mgihome/submissions/submit.shtml.

The assigned MDG accession numbers should be included in the manuscript for publication. Assistance with submissions can be obtained by by sending an e-mail to submissions@informatics.jax.org.



Guidelines for the Use of Cell Lines in Cancer Research

Guidelines published by the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research may be downloaded from the NCRN website: <http://www.ncrn.org.uk/csg/publications.htm>.



Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional data that are not necessary for the scientific integrity and conclusions of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for Web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. All figures and tables should have titles and legends and all files should be supplied separately and named clearly. Acceptable files and formats are: Word or PDF files, Excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a PDF file), and video files (.mov, .avi, .mpeg).



Author's Choice™

Karger's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.Karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits your manuscript on your behalf to PubMed Central (PMC) immediately upon publication. It usually receives a PMCID within approximately a month and will

appear in PMC after 12 months. For those selecting our premium **Author's Choice**[™] service, the usual embargo will be overridden, accelerating the accessibility of your work. More details on NIH's Public Access Policy are available [here](#).

Self-Archiving

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-refereeing) or post-prints (i.e. final draft post-refereeing) on their personal or institution's servers, provided the following conditions are met: Articles may not be used for commercial purposes, must be linked to the publisher's version, and must acknowledge the publisher's copyright. Authors selecting Karger's **Author's Choice**[™] feature, however, are also permitted to archive the final, published version of their article, which includes copyediting and design improvements as well as citation links.



Page Charges, Color Reproductions

The journal will defray the costs of the first eight printed pages (a total of about 8,000 words minus any tables or figures). Any additional pages will be defrayed on a cost-sharing basis by the authors at the rate of CHF 325.00 per page.

There are no charges for illustrations and color reproductions.



Electronic Proofs

Unless otherwise indicated, proofs are e-mailed to the corresponding author.



Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional data that are not necessary for the scientific integrity and conclusions of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for Web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. All figures and tables should have titles and legends and all files should be supplied separately and named clearly. Acceptable files and formats are: Word or PDF files, Excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a PDF file), and video files (.mov, .avi, .mpeg).



Reprints

Reprints are available against payment.

Order forms listing prices are provided with the proofs. If no reprints are desired this should be indicated on the form.

Orders submitted after the issue has gone to press are subject to considerably higher prices.



Requirements for Gene Mapping Reports

1. The gene must not have been previously mapped by any technique.

Authors should check the above listed databases to determine if this is true. This means that mapping confirmations will not be accepted. Relocations of genes incorrectly mapped within a major chromosome band, i.e., to a different subband, will not be accepted. However, genes that are relocated a significant distance from the one to which it had been assigned, or to another chromosome, will be accepted. The evidence for the new assignment must be obtained with two different methods.

2. Well-described flanking markers must be given for all mapping assignments.

The relative location of the flanking markers can be established by standard radiation hybrid or mouse backcross panels. For mapping by fluorescence in situ hybridization (FISH), the markers must be within 5 cM or 5 Mb of the gene or genes that have been mapped.

3. The results from DNA sequence database searches must be given for the mapped gene(s).

The entire sequences should not be given, just the size, degree of the matches and their significance. If several sequences are involved, this should be presented in a concise table listing the standardized gene names as established by the HUGO Gene Nomenclature Committee (see above) and accession numbers of the matching sequences. The human chromosome reference sequences nucleotide position of mapped genes should also be given as they become available.

The following categories must be collected into a single publication if submitted from one group of investigators:

- (a) All cDNAs representing a single multigene family
- (b) Genes located within a single chromosome band
- (c) A series of orthologous genes when the results of comparative mapping studies in the mouse (or some other species) and human genes are reported.

Authors of both accepted and not accepted papers are encouraged to submit their data to mapping databases. The mirror sites of the Genome Database (www.gdb.org) are prepared to accept the data if presented in the short report format.

Epigenetic analyses and the distribution of repetitive DNA and resistance genes reveal the complexity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) heterochromatin

Artur Fonsêca¹, Manon M.S. Richard², Valérie Geffroy^{2,3}, Andrea Pedrosa-Harand¹

¹Laboratory of Plant Cytogenetics and Evolution, Department of Botany, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Nelson Chaves s/n, Recife, PE 50670-420 Brazil,

²Institut de Biologie des Plantes (IBP), Université Paris Sud, Saclay Plant Sciences, Batiment 630, 91405 Orsay Cedex, France,

³Unité Mixte de Recherche de Génétique Végétale, Institut National de la Recherche Agronomique, IDEEV, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Corresponding author:

Andrea Pedrosa-Harand

Departamento de Botânica

Universidade Federal de Pernambuco

Rua Nelson Chaves s/n, 50670-420

Recife, PE, Brazil

Phone number: 55 812126-8846

Fax number: 55 812126-8348

E-mail: andrea.pedrosaharand@pesquisador.cnpq.br

Artigo publicado na “Cytogenetic and Genome Research”

Abstract

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the main representative of its genus and one of most important sources of proteins in African and Latin American countries. Although it is a species with small genome, its pericentromeric and subtelomeric heterochromatin fractions are interspersed with single-copy sequences and active genes, suggesting a less compartmentalized genome organization. The present study characterized its chromatin fractions, associating the distribution of repetitive sequences and resistance genes with histone and DNA epigenetic modifications, with and without biotic stress. Immunostaining with H3K4me3 and H4K5ac were generally associated with euchromatic regions, whereas H3K9me2, H3K27me1, and 5mC preferentially labelled the pericentromeric heterochromatin. The 45S rDNA and centromeric DNA sequences were hypomethylated, as were most terminal heterochromatic blocks. The largest of them, which is associated with resistance genes, were also hypomethylated after the plants were infected with virulent and avirulent strains of the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, suggesting no correlation with control of resistance gene expression. The results highlighted the differences between subtelomeric and pericentromeric heterochromatin, as well as variation within the pericentromeric heterochromatin.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, heterochromatin, immunostaining, fluorescent in situ hybridization

Introduction

Since its definition by Emil Heitz in 1928, heterochromatin has been the subject of debates regarding its structure, constitution and function, even concerning the precision of the

concept itself. In general, heterochromatin is characterized by its condensed status throughout most of the cell cycle, as well as by the fact that it is poor in genes and rich in repetitive sequences, in an opposite situation to that observed in euchromatin. Different heterochromatin fractions can be distinguished cytologically by using different banding techniques; for instance, Giemsa C-banding and CMA/DAPI fluorescent banding (CMA - chromomycin A3 and DAPI – 4'-6-diamidino-2-phenylindole) that can vary intra- and interspecifically [Schwarzacher *et al.*, 1980; Schweizer, 1976; Guerra, 2000]. It is now known that the different compaction states of chromatin and their transcriptional activities are associated with histone modifications (i.e. methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination, etc.), the presence or absence of specific proteins, and the methylation of cytosines in the DNA [Kouzarides, 2007; Finnegan, 2010].

Histones and DNA modifications affect chromatin organization differentially. Some of the most studied histone modifications are the acetylation of lysine 5 in the histone H4 (H4K5ac) and three modifications of histone H3: the trimethylation of lysine 4, the monomethylation of lysine 27, and the dimethylation of lysine 9 (H3K4me3, H3K27me1, and H3K9me2 respectively). In general, the H4K5ac and H3K4me3 modifications are associated with euchromatin in plants, whereas H3K27me1 and H3K9me2 are typical of condensed and transcriptionally inactive chromatin [Fuchs and Schubert, 2012]. In terms of DNA methylation in plants, the cytosines may be methylated in CG, CHG and even CHH configurations (where H is A, C or T) [Henderson and Jacobsen, 2007], generally functioning as defence mechanisms against the activation of transposable elements and as gene silencers [Zhang *et al.*, 2006; Downen *et al.*, 2012; Jones, 2012]. Different functions related to gene expression, chromosome condensation, as well as telomere and centromere formation, have been attributed to different histone modifications [Talbert and Henikoff, 2010]. Modifications

of histones are, however, quite complex, and the same types of modifications may be associated with different types of chromatin in different species of plants. For example, H3K27me2 is associated with the heterochromatin of *Arabidopsis*, but restricted to the euchromatin of *Hordeum vulgare* [Fuchs *et al.*, 2006]. Additionally, DAPI⁺ (AT-rich) heterochromatic bands located in the centromeric regions of *Costus spiralis* were enriched in H4K5ac, generally associated with euchromatin in plants [Feitoza and Guerra, 2011b]. This shows that chromatin organization and control varies between species and is not yet fully understood.

Although heterochromatin is mainly composed of repetitive tandem sequences or retroelements, active genes are also commonly found in these regions [Nagaki *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2012]. It is known that the pericentromeric heterochromatin of tomato has large numbers of genes, as well as retroelements, in spite of the fact that these regions have from 10 to 100 times fewer active genes than euchromatic regions [Wang *et al.*, 2006]. The active *FER* genes related to iron absorption, and *Aps-1* (Acid phosphatase 1), for example, were mapped in the pericentromeric heterochromatin of the long arm on chromosome 6 of tomato [Zhong *et al.*, 1999; Guyot *et al.*, 2005], and the gene determining resistance to the root-knot nematode (*Mi-1*) was located on the short arm of this same chromosome at the border between the pericentromeric heterochromatin and the euchromatin [Zhong *et al.*, 1999].

The genus *Phaseolus* L. belongs to the family Fabaceae, the third-largest family of angiosperms [Judd *et al.*, 2009]. *Phaseolus vulgaris* (the common bean) is the most important crop species of the genus and has an enormous importance as a food resource for many human populations, especially in Africa and South America. In addition to its economic and nutritional importance, common bean has been the focus of a number of chromosome

evolution studies, making the genus an important model for plants with small genomes and high karyotypic stability [Altrock *et al.*, 2011; Bonifácio *et al.*, 2012; Almeida and Pedrosa-Harand, 2013; Fonseca and Pedrosa-Harand., 2013]. This species was also used as a model for studying plant-pathogen interactions, especially in the evolution of resistance to anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* [Geffroy *et al.*, 1999; 2000; 2008; 2009; David *et al.* 2008; 2009].

It is estimated that approximately 50% of the genome of *P. vulgaris* is composed of repetitive sequences, based on the proportions of 45S DNAr (approximately 5% of the genome), subtelomeric blocks (~9%), and pericentromeric blocks (~34%) [Fonsêca *et al.*, 2010]. Repetitive sequences at subtelomeres and pericentromeres were frequently interspersed with single-copy sequences, indicating a less compartmentalized genome compared to other small-genome plants that have been studied to date [Pedrosa-Harand *et al.*, 2009]. A similar amount of repetitive sequences (49.2%) in *P. vulgaris* genome was proposed in an independent study based on BAC-end sequence analyses [Schlueter *et al.*, 2008]. This contrasts with previous studies of C banding [Zheng *et al.*, 1991; Moscone *et al.*, 1999], where heterochromatin amount of only 10% and 20% were described. This heterochromatin is primarily located in pericentromeric blocks composed of different types of sequences that appear to have evolved independently in the genus [Fonsêca and Pedrosa-Harand, 2013]. In addition, satellite sequences CentPv1 and CentPv2 are located at centromeres and associated with centromeric function [Iwata *et al.*, 2013].

A smaller proportion of the heterochromatin of common bean is located in subterminal regions containing the satellite sequence *hipu* [David *et al.*, 2009], as well as 45S rDNA. These subtelomeric regions are rarely associated with positive C-bands, the classical indicators of constitutive heterochromatin. Furthermore, heterochromatin is associated with

different clusters of resistance genes against pathogens [Geffroy *et al.*, 1999; 2000 and 2008]. One of these resistance clusters (the *B4* cluster) was found to be associated with two heterochromatic blocks at the end of the short arm of chromosome 4 [Geffroy *et al.*, 2009; David *et al.* 2009]. Subterminal regions are known to be highly recombinant compared to centromeric and pericentromeric regions [Gore *et al.* 2009; Schmutz *et al.* 2010] and are considered hotspots of recombination between non-homologous chromosomes [Brown *et al.* 2010; David *et al.* 2009]. However, it is not clear if there is any direct relationship between the control of the expression of these genes and epigenetic control of the subtelomeric heterochromatin in which these genes are embedded. There is some evidence that the control of resistance genes depends on epigenetic regulation and chromatin remodelling factors [Alvarez *et al.*, 2010], as chromatin decondensation in *Arabidopsis*, for example, is directly related to infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 [Pavet *et al.*, 2006].

The present study investigates the low compartmentalization of the pericentromeric heterochromatin of *P. vulgaris*, using epigenetic and sequence-based approaches, and their differences with subtelomeric heterochromatin. We also examine the epigenetic behaviour of the *B4* resistance cluster after infection by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* and relate it to chromatin condensation and gene expression.

Materials and Methods

Plant material and cytogenetic preparations

Seeds of *P. vulgaris* breeding line BAT93 were obtained from the germplasm bank of the International Center for Tropical Agriculture (CIAT; Cali, Colombia). The material was multiplied in the greenhouse of the Institut de Biologie des Plantes (IBP), Orsay, France.

Immunostaining with 5-methylcytosine and fluorescence in situ hybridization (FISH)

Anthers were fixed in ethanol / acetic acid 3:1 (v/v) and kept at -20 °C. The anthers were rinsed in distilled water before digestion in 2% (w/v) cellulase Onozuka R-10 (Serva) and 20% (v/v) pectinase (Sigma–Aldrich) for 90 min at 37 °C, dissected in 45% (v/v) aqueous acetic acid, squashed under a cover slip (subsequently removed by freezing in liquid nitrogen), and air-dried for at least 30 min. Slides were pre-treated as described in Fonsêca *et al.* [2010]. Shortly, slides were dried at 60 °C for 30 min, pre-treated with 100 µg/ml RNase (Invitrogen) in $2 \times$ SSC for 1 h at 37°C, 10 µg/ml pepsin (Boehringer Mannheim), in 0.01N HCL, for 20 min at 37°C and fixed in 3.7% formaldehyde (Merck), in PBS, for 10 min at room temperature. Slides were then dehydrated in alcohol series, and air dried for at least 1 hour at room temperature.

Clones containing *kipu* [David *et al.*, 2009], the bacteriophage λB61, containing genes for resistance to anthracnose of the *B4* cluster [Geffroy *et al.*, 2009] and the BAC 81A17 that reveals the pericentromeric distribution pattern [Fonseca *et al.*, 2010] were used as probes in FISH. The first two were labelled with Cy3-dUTP (GE) and the last one labelled with Cy5-dUTP (GE) by nick translation (Roche). Hybridization mixtures consisted of 50% (v/v) formamide, 10% (w/v) dextran sulfate, $2 \times$ SSC, and 2–5 ng/L probe. The preparations were denatured for 3 min at 73 °C hybridized for up to 2 days at 37 °C. The final stringency was 76%.

For immunostaining with 5-mC, slides stored at -20°C or previously used in FISH were blocked with 1% BSA diluted in PBS and incubated with anti-5-mC primary antibody (Eurogentec, BI MECY-0100) produced in mouse, diluted 1:100 in PBS for 90 min at 37 °C .

The slides were then washed with PBST (1% BSA, 0,05% Tween 20) and incubated with secondary antibody FITC-conjugated AffiniPure donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) diluted 1:50 in PBST for 90 min at 37 °C. Finally, the slides were washed in PBST and mounted with DAPI/Vectashield.

Immunostaining of modified histones

Immunostaining followed the protocol described by Guerra *et al.* [2006] with modifications of Feitoza and Guerra [2011a]. Root tips and anthers were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde, washed in PBS solution, digested in 2% cellulase Onozuka R-10 (Serva)-20% pectinase (Sigma) at 37 °C for 90 min and squashed in PBS.

After coverslip removal in liquid nitrogen, slides were incubated in 3% BSA (w/v) containing 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min. Primary antibodies (rabbit polyclonal IgG, Upstate Biotechnology, USA), anti- H3K27me1, anti-H4K5ac, anti-H3K4me3 (1:300) and anti- H3K9me2 (1:50), were diluted in PBS containing 3% BSA. Slides were incubated overnight at 4 °C and detected with rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure donkey anti-goat IgG (Jackson Immuno Research) diluted 1:50 in a blocking solution for 3 h at room temperature. After washes in 1× PBS, preparations were mounted and counterstained with 2 mg/mL DAPI in Vectashield.

Pathogen infection

For the experiments with *Colletotrichum lindemuthianum*, BAT93 seeds were germinated in vermiculite and grown for seven days in a 14h photoperiod at 23 °C. After this period, the plants were transferred to a chamber at 19 °C with relative humidity of 90%. From the earliest evidence of the formation of flower buds, the plants were sprayed with strains 100

(virulent) and C531 (avirulent) of the fungus *C. lindemuthianum* according Geffroy *et al.* [1999]. Fourteen days after inoculation, the flower buds were collected for cytological preparations at pachytene and fixed with ethanol/acetic acid 3:1 (v/v) or 4% paraformaldehyde.

Data analysis

The images were captured by the epifluorescence microscopes Leica DMLB or Leica DMI6000B, equipped with the cameras Cohu and Hamamatsu ER and using the software Leica QFISH and LAS AF Lite version 2.02, respectively. For final processing, the images were superimposed and artificially coloured through Adobe Photoshop software version 10.0 and adjusted only for brightness and contrast.

Results

Detection of modified histones

Four antibodies related to post-translational histone modifications were used to establish the epigenetic patterns of the eu- and heterochromatin of *P. vulgaris*. Pachytene cells were analysed for better resolution of the heterochromatic regions, which are more densely condensed, and consequently more brightly stained with DAPI, than the euchromatin at this stage. Immunodetection of the histone H3K4me3 showed various proximal and terminal hypomethylated heterochromatic blocks (Fig. 1A-C). A more homogeneous labelling was seen throughout the entire pachytene chromosomes with H4K5ac, proportionally more intense in the euchromatin, as it is less condensed than in heterochromatin (Fig. 1D-F). In root-tip mitotic chromosomes, where eu- and heterochromatin are equally condensed, a clear

differentiation was observed between the distal euchromatic blocks, that were hyperacetylated in H4K5 in various chromosomes, and the heterochromatic blocks in the pericentromeric region that were generally hypoacetylated in H4K5 (Fig. 1G-I). Immunodetections of the histones H3K9me2 and H3K27me1 indicated preferential staining in heterochromatic regions. However, this relation was not absolute (Fig. 1J-O), because some heterochromatic blocks, including a large terminal block in H3K9me2, did not show any labelling (Fig. 1J).

Immunodetection of 5-methylcytosine

DNA methylation in metaphase mitotic chromosomes from tapetum cells and in pachytene chromosomes of *P. vulgaris* (Fig. 2) was concentrated in the pericentromeric heterochromatic regions, with varying intensities depending on the chromosome pair (Fig. 2A). Variation in the 5mC pattern was observed between homologs in different tapetum cells (Suppl. Fig. 1). Labelling of some terminal chromosomal regions was observed, but not in all pairs (Fig. 2A). The same cells were subsequently hybridized with the *hipu* probe [David *et al.*, 2009], allowing the identification of some of the chromosome pairs based on the hybridization pattern of the BAC 63H6 (which contain *hipu* and show the same pattern) mapped in Fonsêca *et al.* [2010] (Fig. 2B). In general, there was little or no DNA methylation on the terminal heterochromatin, and no direct relationship was observed between the size of the terminal block of *hipu* and the intensity of the DNA methylation. For example, chromosome 4 showed the largest heterochromatic block of the complement in the short arm and a second largest terminal *hipu* block in the opposite arm, being both hypomethylated. At least the two largest clusters of 45S rDNA sites located on chromosomes 9 and 10 in genotype BAT93 were hypomethylated in all the cells analysed. This situation can be observed in the largest site, situated on the extremity of the long arm of chromosome 10 (Fig 2A). The third

45S rDNA cluster, located on chromosome 6, is very small and adjacent to the pericentromeric heterochromatin, making it difficult to determine its methylation status.

Immunostaining of pachytene cells with 5mC antibody showed hypermethylation especially in pericentromeric heterochromatic regions. Interestingly, some highly condensed regions demonstrated little or no labelling, including the centromeric heterochromatin and some terminal blocks (Fig. 2C-F). The *kipu* sequence [David *et al.*, 2009] was used as a probe in sequential FISH, and demonstrated that the terminal blocks were generally hypomethylated, as for example the two terminal and subterminal blocks on the short arm of chromosome 4 (Fig. 2 C, E and F).

DNA methylation in infected plants

The infection of BAT93 with *C. lindemuthianum* strains 100 (virulent) and C531 (avirulent) led to the expected reactions: typical anthracnose symptoms for the 100 strain and no visible symptom for the C531 inoculation. Pachytene cells of the infected plants were immunodetected with 5mC and hybridized with the bacteriophage λ B61 probe specific to the anthracnose resistance gene cluster referred to as the *B4* cluster (Fig. 3A and B) [David *et al.*, 2009; Geffroy *et al.*, 2009]. This cluster is located on the terminal region of the short arm of chromosome 4, where the major and minor knobs are visible in pachytene cells. These blocks were not labelled by either H3K9me2 or 5mC. Additionally, this locus was hypomethylated in both susceptible (strain100) and resistant (strain C531) plants. In both cases, the hybridization of BAC 81A17, which was pericentromeric on all chromosomes of the complement [Fonsêca *et al.*, 2010], confirmed the strong relationship of this heterochromatic region with the observed methylation patterns (Fig. 3A-F). Nevertheless, the fine resolution provided by pachytene cells allowed the visualization of few hypomethylated blocks in the

pericentromeric regions as well. Altogether, no epigenetic effect on these regions was observed in meiotic cells in response to infection by the fungus *C. lindemuthianum*.

Discussion

Studies on epigenetic modifications of chromatin in plants have demonstrated the existence of relatively conserved modifications in the epigenetic code, such as the association of H3K9me2 and H3K27me1 with heterochromatic regions and H4K5ac and H3K4me3 with euchromatin [Tariq and Paszkowski, 2004; Fuchs *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010; Feitoza and Guerra, 2011a]. The distribution of H3K4me3 was uniform throughout the chromosomes in the common bean, except in the heterochromatic blocks that showed little or no staining. These blocks were poorly marked due to the low affinity of H3K4me3 for the closed heterochromatic organization, particularly at the pericentromeric region [Li *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009], which is replete with repetitive sequences in common bean [Fonsêca *et al.*, 2010], as well as in other plant species [Kulikova *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006]. The pattern observed was in agreement with the highly conserved nature of these marks in eukaryotes, being intimately associated with euchromatin and gene expression [Fuchs *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009; He *et al.*, 2010]. In *Oryza sativa*, for example, transposons showed no methylation in H3K4, whereas most of the highly active, protein-coding genes were trimethylated in H3K4 [Li *et al.*, 2008].

Histone acetylation has important functions in nuclear processes such as DNA replication, transcription and recombination [Crane-Robinson *et al.* 1999; Krebs *et al.* 1999; Lusser *et al.* 2001; Clayton *et al.* 2006]. In general, H4K5ac shows uniform distribution along plant chromosomes, with decrease in intensity in heterochromatic regions [Fuchs and

Schubert, 2012], similar to that observed with H3K4me3. Common bean metaphase chromosomes demonstrated clear differences between marked and unmarked regions by H4K5ac (with the pericentromeric heterochromatin being remarkably hypoacetylated), whereas labelling was more uniform at pachytene, revealing only small differences in the proportions of acetylation between eu- and heterochromatin. This clear differentiation in root tip metaphase mitotic chromosomes between eu- and heterochromatin seems to be conserved in species with small chromosomes and semi- or acentric nuclei, as observed in *Costus* and *Eleutherine*, for example [Feitoza and Guerra, 2011a]. Additionally, changes in the epigenetic patterns of H4 acetylation during different phases of the cell cycle have been observed in *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*, showing a gradual hyperacetylation during the S phase of the cell cycle [Jasencakova *et al.*, 2000 and 2001]. The centromeric regions of *Costus spiralis* were observed to be rich in H4K5ac only at pachytene, but not at zygotene or diplotene [Feitoza and Guerra, 2011b]. Although we observed slight differences between the H4K5ac patterns in root tip mitotic metaphase and meiotic pachytene, increased acetylation of the centromeric region as seen in *Costus* was not observed in pachytene cells of common bean, confirming species-specific differences in the epigenetic code [Fuchs and Schubert, 2012].

The epigenetic modifications of heterochromatin, particularly the dimethylation of lysine 9 of H3, are more variable among species than the euchromatic modifications. This mark is observed in the heterochromatin of plants with small genomes, but is dispersed in species having larger genomes [Houben *et al.*, 2003; Fuchs and Schubert, 2012]. In *Arabidopsis*, for example, this mark was observed predominantly in the pericentromeric region associated with repetitive sequences, retroelements, and methylated regions in CHG [Bernatavichute *et al.*, 2008]. In *Phaseolus vulgaris*, with a genome of approximately 640

Mpb/1C [Arumuganathan and Earle, 1991], H3K9me2 is preferentially observed in heterochromatic regions. This result is therefore in agreement with the general pattern observed in species with small genomes, even though the bean genome is slightly above the 500 Mbp/1C limit proposed for species with H3K9me2 in the heterochromatin [Fuchs and Schubert, 2012]. Nevertheless, the association of H3K9me2 and H3K27me1 with the heterochromatin in *P. vulgaris* was apparently incomplete. Indeed, some highly condensed regions in pachytene, therefore considered heterochromatic, were not marked.

High concentrations of methylated DNA sequences were found in the pericentromeric regions of almost all chromosomes of *P. vulgaris*. Pericentromeric regions were identified by C banding as an important fraction of the heterochromatin of the common bean [Moscone *et al.*, 1999]. Recent studies have characterized this region as having distinct repetitive sequences that evolved independently in the genus, occupying approximately 34% of the genome of that species [Fonsêca *et al.*, 2010; Fonsêca and Perdosa-Harand, 2013]. Nonetheless, four single-copy BACs were mapped in this region [Fonsêca *et al.*, 2010], suggesting the presence of putative active genes immersed in this hypermethylated chromosomal domain. The hypermethylated pericentromeric regions of tomato, which are rich in repetitive sequences [Chang *et al.*, 2008], also contain many active genes that do not encode transposons, which reinforces the viability of transcriptional activity in these regions [Wang *et al.*, 2006]. This methylation pattern may be associated with silencing of transposons around active genes [Feng and Jacobsen, 2011], or with body-methylated genes. In this last situation, these genes could be highly transcribed and constitutively expressed by contrast to genes with methylated promoter [Zhang *et al.*, 2006; Zilberman *et al.*, 2006]. Furthermore, some condensed, pericentromeric blocks in common bean demonstrated hypomethylated DNA, similar to the situation observed for the histones H3K9me2 and H3K27me1.

Heterochromatic blocks, such as those seen in the pericentromeric region of chromosome 2, lacked methylation in *P. coccineus*, indicating that not all DNA sequences located in the pericentromeric heterochromatin are methylated at an observable cytological level [Frediani *et al.*, 1986].

It was possible to observe distinct levels of methylation in the pericentromeric region of the homologous chromosomes at least in the most easily identified chromosomes, such as chromosome 4, in mitotic cells from the tapetum. Variations of the methylation patterns between homologs has been reported in a number of plant species also for non-tapetum cells, including *Allium cepa* [Ruffini Castiglione *et al.*, 1995], *Vicia faba* [Frediani *et al.*, 1996], Triticale [Castilho *et al.*, 1999], *Zingeria biebersteiniana* [Cremonini *et al.*, 2003], and barley [Ruffini Castiglione *et al.*, 2008]. It is not clear, however, whether these differences were caused by variations in the accessibility of the antibody to the DNA or by differences in the methylation status, and possibly transcriptional states of these chromosomal regions, among the homologs [Ruffini Castiglione *et al.*, 2002; Cremonini *et al.*, 2003].

DNA methylation was mainly observed in pericentromeric heterochromatin, but not necessarily in subtelomeric regions, as seen in the terminal blocks at pachytene. This was clearly evident for chromosome 4, where the largest subtelomeric block of the species was practically without methylation. Additionally, the discrete methylated fractions of the subterminal tapetal mitotic chromosomes occur in lower numbers than do C bands in the species [Moscone *et al.*, 1999]. These fractions likewise were not necessarily related to *hipu*, the subtelomeric repeated sequence present in large quantities in almost all common bean chromosomes [Fonsêca *et al.*, 2010]. The terminal blocks of 5mC in both of the long arms of *Haplopappus gracilis* likewise did not correspond to C bands [Ruffini Castiglione *et al.*, 2008].

Three of the terminal blocks observed on chromosomes 6, 9 and 10 in *P. vulgaris* ‘BAT93’ are composed of 45S rDNA [Fonsêca *et al.*, 2010]. These terminal blocks appear to be remarkably hypomethylated, what can be most clearly demonstrated for the two largest sites, located on chromosomes 9 and 10. Other 45S DNAr sites, however, are not consistently observed as being hypomethylated in plants. The largest 45S DNAr site in *Zyngeria bierbersteiniana*, for example, was hypermethylated, while the smallest was hypomethylated [Cremonini *et al.*, 2003]. In another example, the levels of methylation in 45S DNAr sites were directly related to the condensation states observed in different species of the genus *Citrus*, and uncondensed and hypomethylated sites were found to be related to active genes [Marques *et al.*, 2011]. Different lineages of *Arabidopsis suecica*, however, demonstrated large variation in methylated 45S rDNA sites [Pikaard, 2002]. These variations were later found to be associated with nucleolar dominance, with the de-acetylation of histones and DNA methylation being directly related to silencing rRNA [Lawrence *et al.*, 2004]. Therefore, it is probable that the hypomethylated pattern observed for the 45S rDNA of *P. vulgaris* reflected the activity of its NORs (nucleolus organizer regions).

Most of the terminal heterochromatic blocks seen in the common bean are composed of *hipu* satellite DNA [David *et al.*, 2009]. The immunostaining of 5mC in pachytene chromosomes showed that, although some terminal blocks were methylated, most of the terminal blocks rich in *hipu* (including that on chromosome 4) were hypomethylated – indicating a low correlation between this sequence and DNA methylation. Consequently, although condensed and rich in satellite DNA, the terminal blocks constitute a significant fraction of the heterochromatin with relatively hypomethylated DNA. This is in sharp contrast with the pericentromeric fraction that is predominantly hypermethylated. Satellite sequences may demonstrate different methylation patterns depending of the sequence context. The

satellite DNA pEV of beets, rich in CG and CHG sites, is hypomethylated in intercalary region of all chromosome arms. However, pBV, rich in CHH, is hypomethylated in pericentromeric/centromeric regions [Zakrzewski *et al.*, 2011]. Similarly, the hypomethylation of DNA in the centromeric region as compared to the pericentromeric (hypermethylated) in *Arabidopsis* also seems to be related to the distribution of CG and CHG sites in the 178 bp satellite DNA repeats [Zhang *et al.*, 2008]. Maize centromeres of active and inactive B chromosomes composed of the same sequences differ in terms of their activation by the presence of CENH3, which appears to inhibit the methylation of the cytosines in those regions [Koo *et al.*, 2011]. A similar pattern of methylation was observed in the centromeric heterochromatin of *P. vulgaris*, which was hypomethylated and surrounded by pericentromeric heterochromatin rich in 5mC. The association with common bean centromere-specific histone H3 (PvCENH3) or maybe the absence of specific CG, CHG, CHH sites in the centromeric satellite sequences CentPv1 and CentPv2 [Iwata *et al.*, 2013] may be responsible for this hypomethylation.

The terminal region of the short arm of *P. vulgaris* chromosome 4 has two heterochromatic blocks composed of *kipu*; the larger is adjacent to, while the smaller is intercalated within one the largest common bean disease resistance gene clusters, called *B4* [Geffroy *et al.*, 2009]. The specific resistance gene *Co-9*, effective against strain C531 of the fungus *C. lindemuthianum* mapped at one end of linkage group B4 [Geffroy *et al.* 1999], in the complex *B4* resistance cluster containing NBS-LRR encoding genes and *kipu* sequences [Geffroy *et al.* 2009; David *et al.* 2009]. *Co-9* is effective in all aerial parts of the plant. Pachytene cells of plants infected by non-virulent and virulent strains were used to investigate if there were modifications of the epigenetic patterns in the region containing the *B4* R gene cluster, as well as in other heterochromatic regions, that could be induced by biotic stress. The

two heterochromatic blocks remained hypomethylated after both treatments (virulent and avirulent strains), and consequently no large epigenetic modifications were observed in infected plants compared to non-infected plants. These results could be related to high gene activity in this region, even in non-stress situations, or to the fact that modification in DNA methylation at the gene level may not be detectable at a cytological level. Alternatively, the control of expression of this gene may not depend on DNA methylation, although it is known that decreases in 5mC levels affect the expression of resistance genes [Akimoto *et al.*, 2007]. Therefore, the association of resistance gene clusters with the terminal heterochromatin in common bean is probably not related to an epigenetic control of expression of these genes at the chromosomal level. Nevertheless, the decrease in the levels of 5mC elevate ectopic pairing with its related repeats [Peng and Karpen, 2008; Weber and Schübeler, 2007], contributing to their evolution [McHale *et al.*, 2006; Meyers *et al.*, 2003]. It is possible that the presence of these resistance genes in this subterminal, hypomethylated location and their clustered organization [McHale *et al.*, 2006; Meyers *et al.*, 2003] could be a strategic niche for frequent exchanges and thus the generation of novel resistance specificities at a sufficient rate to cope with an ever changing array of pathogens [David *et al.* 2009].

The epigenetic characterization of *P. vulgaris* presented here, combining post-translational modifications of histones and DNA methylation with the distribution of repetitive sequences and resistance genes, demonstrates the complexity of its heterochromatin. Therefore, a better understanding of the structure, function and evolution of this genomic fraction will only be possible if its complexity and diversity within the genome are taken into consideration in future studies.

Acknowledgements

We thank the International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Cali, Colombia, for providing the seeds. A.F. was supported by a grant from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. A.P.-H. and the project were supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. V.G. and the project were supported by Institut National de la Recherche Agronomique BAP, France. This work has benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit of the Gif campus (www.imagif.cnrs.fr), which is supported by the Conseil Général de l'Essonne. We wish to thank in particular M. N. Soler for her help in data acquisition.

References

- Akimoto K, Katakami H, Kim HJ, Ogawa E, Sano CM, et al: Epigenetic inheritance in rice plants. *Ann bot* 100:205–217 (2007).
- Almeida C, Pedrosa-Harand, A: 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* 1–8 (2013).
- Altrock S, Fonsêca A, Pedrosa-Harand, A: Chromosome identification in the Andean common bean accession G19833 (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Genet Mol Biol* 34:459–463 (2011).
- Alvarez ME, Nota F, Cambiagno DA: Epigenetic control of plant immunity. *Mol Plant Pathol* 11: 563–576 (2010).

- Arumuganathan K, Earle ED: Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9(3), 208–218 (1991).
- Bernatavichute YV, Zhang X, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen SE: Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 3:e3156 (2008).
- Bonifácio EM, Fonsêca A, Almeida C, dos Santos KG, Pedrosa-Harand A: Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 124:1513–1520 (2012).
- Brown CA, Murray AW, Verstrepen KJ: Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeasts. *Curr Biol* 20:895–903 (2010).
- Castilho A, Neves N, Rufini Castiglione M, Viegas W, Heslop-Harrison JS: 5-Methylcytosine distribution and genome organization in triticales before and after treatment with 5-azacytidine. *J Cell Sci* 112:4397–4404 (1999).
- Chang SB, Yang TJ, Datema E, van Vugt J, Vosman B, et al: FISH mapping and molecular organization of the major repetitive sequences of tomato. *Chromosome Res* 16:919–933 (2008).
- Clayton AL, Hazzalin CA, Mahadevan LC: Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol cell* 23:289–296 (2006).
- Crane-Robinson C, Myers FA, Hebbes TR, Clayton AL, Thorne AW: Chromatin immunoprecipitation assays in acetylation mapping of higher eukaryotes. *Meth Enzymol* 304:533–547 (1999).

- Cremonini R, Rufini Castiglione M, Grif VG, Kotseruba VV, Punina EO, et al: Chromosome banding and DNA methylation patterns, chromatin organisation and nuclear DNA content in *Zingeria biebersteiniana*. *Biol Plant* 46:543–550 (2003).
- David P, Sévignac M, Thareau V, Catillon Y, Kami J, et al: BAC end sequences corresponding to the B4 resistance gene cluster in common bean: a resource for markers and synteny analyses. *Mol Genet Genomics* 280:521-533 (2008).
- David P, Chen NW, Pedrosa-Harand A, Thareau V, Sévignac M, et al: A nomadic subtelomeric disease resistance gene cluster in common bean. *Plant Physiol* 151:1048–1065 (2009).
- Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Downen, et al: Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E2183–E2191 (2012).
- Feitoza L, Guerra M: Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. *Genetica* 139:305–314 (2011a).
- Feitoza L, Guerra M: The Centromeric Heterochromatin of *Costus spiralis*: Poorly Methylated and Transiently Acetylated during Meiosis. *Cytogenet Genome Res* 135:160–166 (2011b).
- Feng S, Jacobsen SE: Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. *Curr Opin Plant Biology* 14:179–186 (2011).
- Finnegan EJ: DNA methylation: a dynamic regulator of genome organization and gene expression in plants, in Pau EC, Davey MR (eds): *Plant Developmental Biology- Biotechnological Perspectives*, pp 295–323 (Springer, Heidelberg 2010).

- Fonsêca A, Ferreira J, dos Santos, TRB, Mosiolek M, Bellucci E, et al: Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Res* 18:487–502 (2010).
- Fonsêca A, Pedrosa-Harand A: Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome* 56:1–9 (2013).
- Frediani M, Tagliasacchi AM, Durante M, Avanzi S: Distribution of 5-methylcytosine-rich regions in the polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* embryo suspensor as shown by the immunoperoxidase technique. *Exp Cell Res* 167:337–342 (1986).
- Frediani M, Giraldi E, Rufini Castiglione M: Distribution of 5-methylcytosine-rich regions in the metaphase chromosomes of *Vicia faba*. *Chromosome Res* 4:141–146 (1996).
- Fuchs J, Demidov D, Houben A, Schubert I: Chromosomal histone modification patterns—from conservation to diversity. *Trends Plant Sci* 11:199–208 (2006).
- Fuchs J, Schubert I: Chromosomal distribution and functional interpretation of epigenetic histone marks in plants, in Bass H, Birchler JA (eds): *Plant Cytogenetics*, vol 4: *Genome Structure and Chromosome Function*, pp 231–253 (Springer-Verlag, New York 2012).
- Geffroy V, Sicard D, de Oliveira JC, Sévignac M, Cohen S, et al: Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *MPMI* 12:774–784 (1999).
- Geffroy V, Sévignac M, De Oliveira JC, Fouilloux G, Skroch P, et al: Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-

- localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *MPMI* 13:287–296 (2000).
- Geffroy V, Sévignac M, Billant P, Dron M, Langin T: Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. *Theor Appl Genet* 116:407–415 (2008).
- Geffroy V, Macadré C, David P, Pedrosa-Harand A, Sévignac M, et al: Molecular analysis of a large subtelomeric nucleotide-binding-site–leucine-rich-repeat family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 181:405–419 (2009).
- Gong Z, Wu Y, Koblížková A, Torres GA, Wang K, et al: Repeatless and repeat-based centromeres in potato: implications for centromere evolution. *Plant Cell* 24:3559–3574 (2012).
- Gore MA, Chia JM, Elshire RJ, Sun Q, Ersoz ES, et al: A first-generation haplotype map of maize. *Science* 326:1115–1117 (2009).
- Guerra M: Chromosome number variation and evolution in monocots. *Monocots: systematics and evolution*. Collingwood, Australia: CSIRO 127–136 (2000).
- Guerra M, Brasileiro-Vidal AC, Arana P, Puertas MJ: Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). *Genetica* 126:33–41 (2006).
- Guyot R, Cheng X, Su Y, Cheng Z, Schlagenhauf E, et al: Complex organization and evolution of the tomato pericentromeric region at the FER gene locus. *Plant Physiol* 138:1205–1215 (2005).

- He G, Zhu X, Elling AA, Chen L, Wang X, et al: Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. *Plant Cell* 22:17–33 (2010).
- Henderson IR, Jacobsen SE: Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447:418–424 (2007).
- Houben A, Demidov D, Gernand D, Meister A, Leach CR, Schubert I: Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant J* 33:967–973 (2003).
- Iwata A, Tek AL, Richard M, Abernathy B, Fonsêca A, et al: Identification and characterization of functional centromeres of the common bean. *Plant J* 76:47–60 (2013).
- Jasencakova Z, Meister A, Walter J, Turner BM, Schubert I: Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. *Plant Cell* 12:2087–2100 (2000).
- Jasencakova Z, Meister A, Schubert I: Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. *Chromosoma* 110:83–92 (2001).
- Jones PA: Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13:484–492 (2012).
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ: *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*, ed 3, pp 612 (Artmed, Porto Alegre 2009).
- Kim JS, Islam-Faridi MN, Klein PE, Stelly DM, Price HJ, et al: Comprehensive molecular cytogenetic analysis of sorghum genome architecture: distribution of euchromatin,

- heterochromatin, genes and recombination in comparison to rice. *Genetics* 171:1963–1976 (2005).
- Koo DH, Han F, Birchler JA, Jiang J: Distinct DNA methylation patterns associated with active and inactive centromeres of the maize B chromosome. *Genome Res* 21:908–914 (2011).
- Kouzarides T: Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705 (2007).
- Krebs JE, Kuo MH, Allis CD, Peterson CL: Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Gene Dev* 13:1412–1421 (1999).
- Kulikova O, Gualtieri G, Geurts R, Kim DJ, Cook, et al: Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. *Plant J* 27:49–58(2001).
- Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, et al: A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol cell* 13:599–609 (2004).
- Li X, Wang X, He K, Ma Y, Su N, et al: High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between DNA methylation, histone methylation, and gene expression. *Plant Cell* 20:259–276 (2008).
- Liu C, Lu F, Cui X, Cao X: Histone methylation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 61:395–420 (2010).
- Lusser A, Kölle D, Loidl P: Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. *Trends Plant Sci* 6:59–65 (2001).

- Marques A, Fuchs J, Ma L, Heckmann S, Guerra M, Houben A: Characterization of eu- and heterochromatin of *Citrus* with a focus on the condensation behavior of 45S rDNA chromatin. *Cytogenet Genome Res* 134:72–82 (2011).
- McHale L, Tan X, Koehl P, Michelmore RW: Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol* 7:212 (2006).
- Meyers BC., Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW: Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:809–834 (2003).
- Moscone EA, Klein F, Lambrou M, Fuchs J, Schweizer D: Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* 42:1224–1233 (1999).
- Nagaki K, Cheng Z, Ouyang S, Talbert PB, Kim M, et al: Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nat Genet* 36:138–145 (2004).
- Pavet V, Quintero C, Cecchini NM, Rosa AL, Alvarez ME *Arabidopsis* displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *MPMI* 19:577–587 (2006).
- Pedrosa-Harand A, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. *Chromosome Res* 17:405–417 (2009).
- Peng JC, Karpen GH: Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Curr Opin Genet Dev* 18:204-211(2008).
- Pikaard CS: Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. *Arabidopsis Book* (2002).

- Ruffini Castiglione MR, Giraldi E, Frediani M: The dna methylation pattern of *Allium cepa* metaphase chromosomes. Biol Zent Bl 114:57–66 (1995).
- Ruffini Castiglione M, Cremonini R, Frediani M: DNA methylation patterns on plant chromosomes. Caryologica 55:275–282 (2002).
- Ruffini Castiglione M, Frediani M, Venora G, Cremonini R: Cytological investigation of *Haplopappus gracilis* (Nutt.) Gray: 5-methylcytosine-rich regions, fluorochrome banding and chromatin sensitivity to DNase I digestion. Protoplasma 233:107–113 (2008).
- Schlueter JA, Goicoechea JL, Collura K, Gill N, Lin JY, et al: BAC-end sequence analysis and a draft physical map of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genome. Trop Plant Biol 1:40–48 (2008).
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, et al: Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. Nature 463:178–183 (2010).
- Schwarzacher T, Ambros P, Schweizer D: Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. Plant Syst Evol 134:293–297 (1980).
- Schweizer D: Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. Chromosoma 58:307–324 (1976).
- Talbert PB, Henikoff S: Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome. Nature Reviews Mol Cell Biol 11:264–275 (2010).
- Tariq M, Paszkowski J: DNA and histone methylation in plants. Trends Genet 20:244–251 (2004).

- Wang Y, Tang X, Cheng Z, Mueller L, Giovannoni J, Tanksley SD: Euchromatin and pericentromeric heterochromatin: comparative composition in the tomato genome. *Genetics* 172:2529–2540 (2006).
- Weber M, Schübeler D: Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr Opin Cell Biol* 19:273–280 (2007).
- Yan H, Talbert PB, Lee HR, Jett J, Henikoff S, Chen F, et al: Intergenic locations of rice centromeric chromatin. *PLoS Biol* 6:e286 (2008).
- Zakrzewski F, Weisshaar B, Fuchs J, Bannack E, Minoche AE, Dohm JC, et al: Epigenetic profiling of heterochromatic satellite DNA. *Chromosoma* 120:409–422 (2011).
- Zhang W, Lee HR, Koo DH, Jiang J: Epigenetic modification of centromeric chromatin: hypomethylation of DNA sequences in the CENH3-associated chromatin in *Arabidopsis thaliana* and maize. *Plant Cell* 20:25–34 (2008).
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SWL, et al: Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126:1189–1201 (2006).
- Zhang X, Bernatavichute YV, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen SE: Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol* 10: R62 (2009).
- Zheng J, Nakata M, Uchiyama H, Tanaka R: Giemsa C-banding patterns in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. *Cytologia* 56:459–466 (1991).
- Zhong XB, Bodeau J, Fransz PF, Williamson VM, van Kammen AD, et al: FISH to meiotic pachytene chromosomes of tomato locates the root-knot nematode resistance gene *Mi-*

1 and the acid phosphatase gene *Aps-1* near the junction of euchromatin and pericentromeric heterochromatin of chromosome arms 6S and 6L, respectively. *Theor Appl Genet* 98:365–370 (1999).

Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S: Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genet* 39:61–69 (2006).

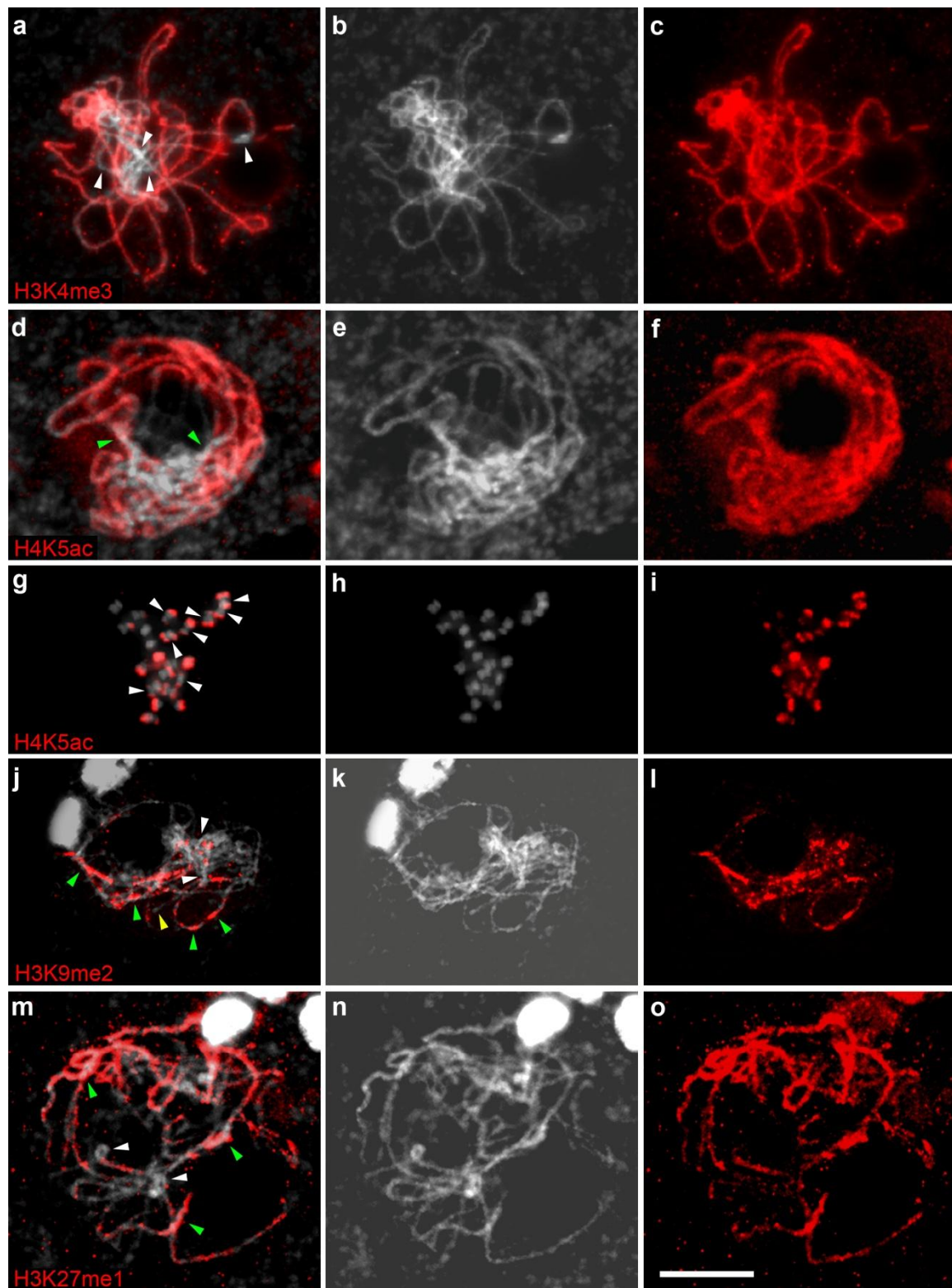


Fig. 1. Immunodetection of histone H3K4me3 (a-c), H4K5ac (d-f), H3K9me2 (j-l) and H3K27me1 (m-o) in pachytene cells and H4K5ac (g-i) in root tip mitotic cell from *P. vulgaris* L. (genotype BAT93). Histone H3K4me3 was observed preferentially in euchromatic regions, with little or no labeling in the pericentromeric heterochromatin (a-c). Histone H4K5ac showed a more uniform labeling along pachytene chromosomes (d-f) and a distinct labeling in mitotic metaphase chromosomes (g-i). Histone H3K9me2 and H3K27me1 showed hypermethylation of most heterochromatic blocks (j-o). Green arrowheads indicate some marked heterochromatic regions and white arrowheads indicate unmarked ones. A large terminal block is highlighted by yellow arrowhead (j). Antibodies to histone modifications are observed red. The chromosomes were counterstained with DAPI (gray). Scale bar = 5 μ m.

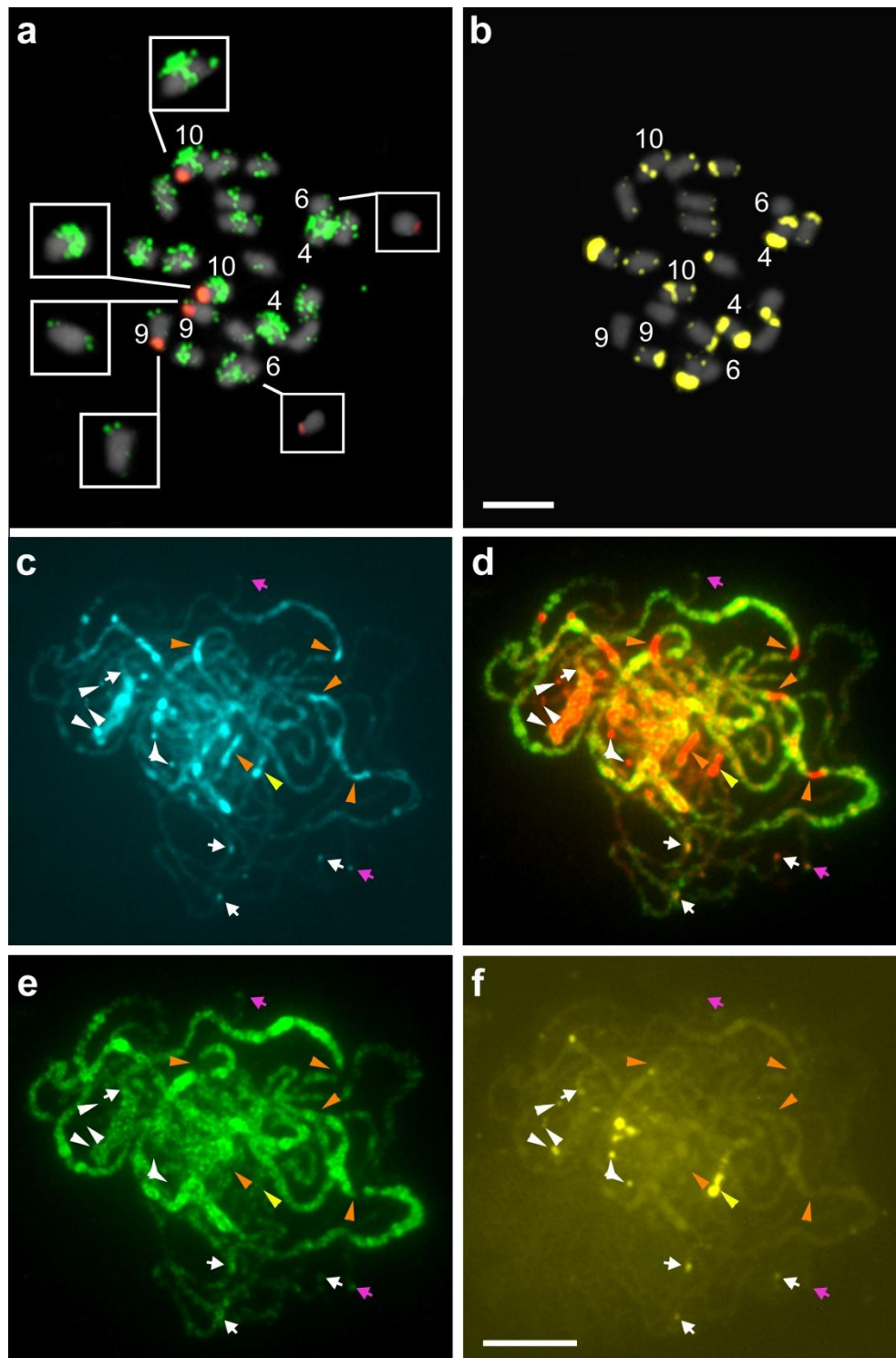


Fig. 2. Immunodetection of 5mC and FISH with *khipu* probe in mitotic tapetal cells (a-b) and pachytene cells (c-f) of *P. vulgaris* 'BAT93'. DNA methylation is observed green (a, d-e). Inserts in a show chromosomes with 45S rDNA sites at larger magnification and 5mC (green) or rDNA (red) signal alone. *khipu* was hybridized to the same cell (b), allowing identification of four chromosome pairs, represented by numbers. The chromosome 4 was identified by having the largest heterochromatic terminal blocks [Fonseca et al. 2010]. Pachytene chromosomes were counterstained with DAPI and shown in blue (c) or red (d). In f, *khipu* was hybridized to the same cell as in c-e. Arrows indicate heterochromatic regions marked with 5mC (blocks with *khipu* with white arrows and without *khipu* with purple arrows) and arrowheads indicate unmarked regions (centromeres in orange, the two largest terminal blocks in yellow and some other terminal blocks in white). Scale bar = 5 μ m.

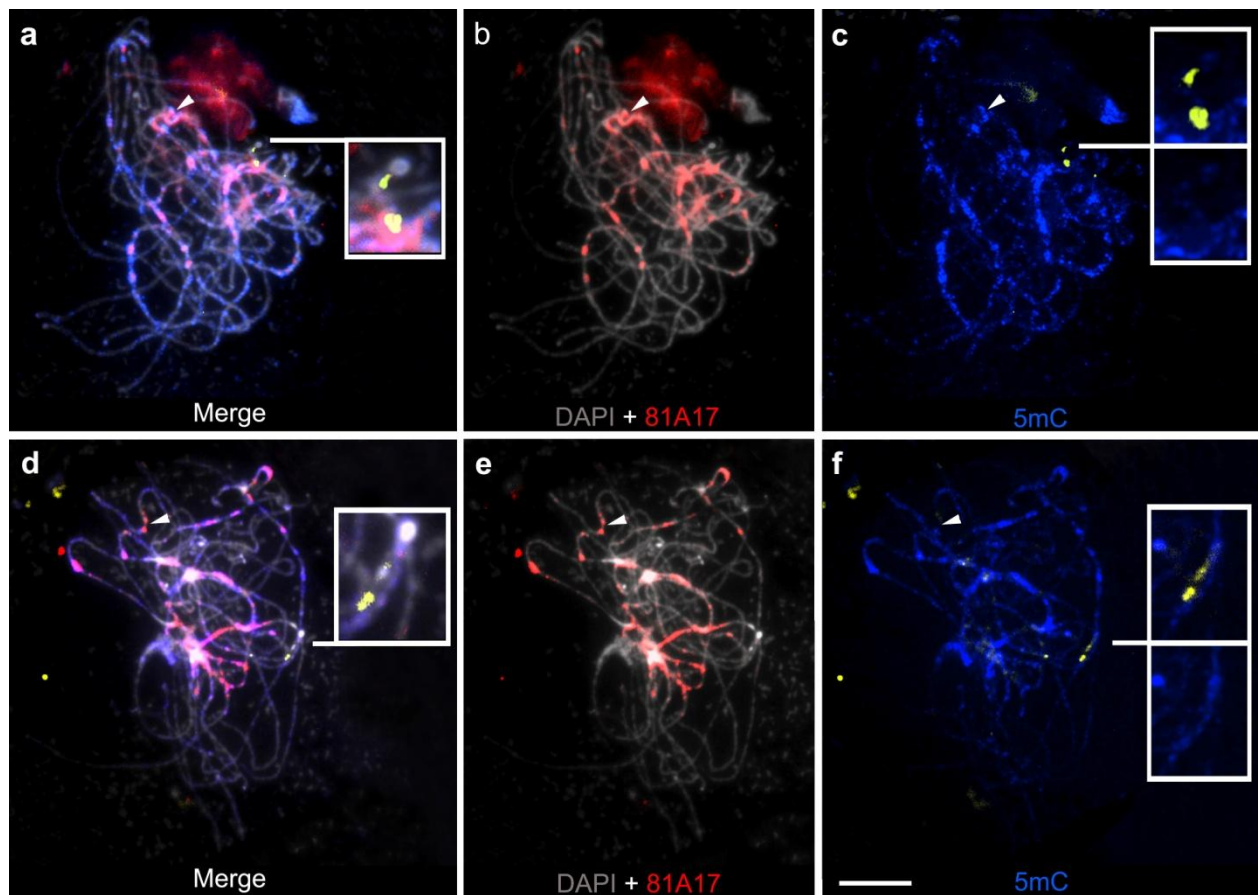
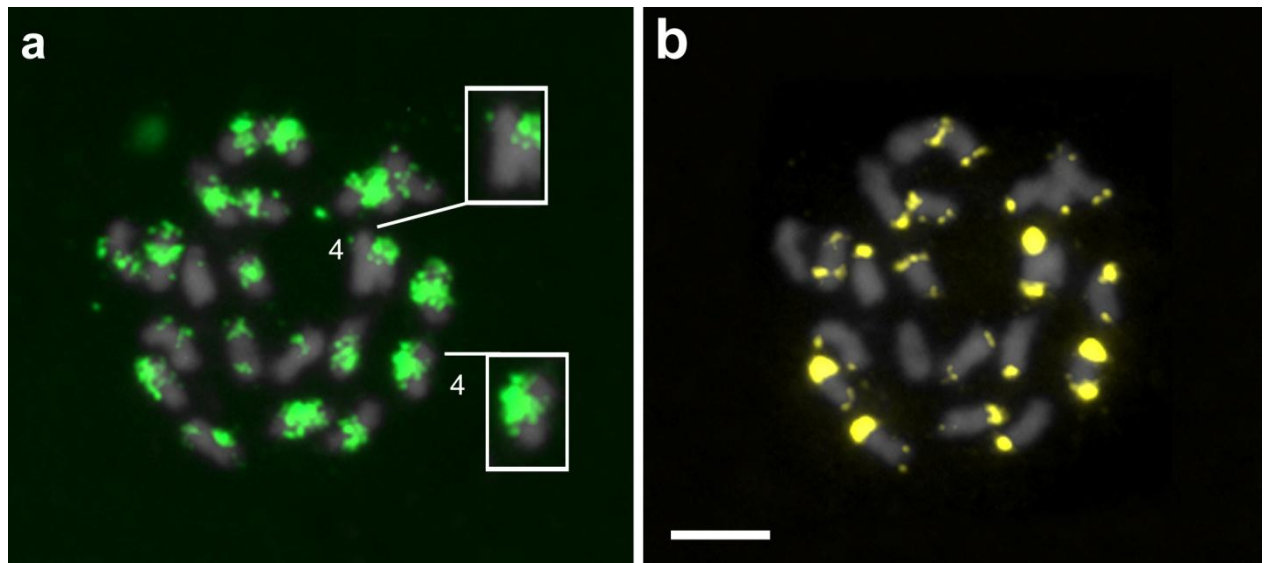


Fig. 3. Immunodetection of 5mC and FISH with λ B61 (resistance gene cluster) and BAC 81A17 (pericentromeric) probes on pachytene cells of *P. vulgaris* 'BAT93'. Plants were infected by the strains C531 (avirulent, a-c) and 100 (virulent, d-f) of the fungus *C. lindemuthianum*. 5mC is seen in blue (a, c, d and f), λ B61 in yellow (a, c, d and f) and 81A17 in red (a-b and d-e). Enlarged inserts show that, in both cases, the blocks in the vicinity of this resistance cluster are hypomethylated. Overlaps between 81A17 (red) and 5mC (blue) are shown in purple. Arrowheads indicate hypomethylated pericentromeric blocks. Scale bar = 5 μ m.



Suppl. Fig. 1. Immunodetection of 5mC (**a**, green) and sequential FISH with *khipu* probe (**b**, yellow) in mitotic tapetal cell of common bean counterstained with DAPI (gray), evidencing heteromorphism of the pericentromeric labelling, as indicated for chromosome 4. Scale bar = 5 μ m.