

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Mapeamento físico e análise evolutiva em *Phaseolus vulgaris* L. e *P. lunatus* L., utilizando hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

CÍCERO CARLOS DE SOUZA ALMEIDA

Recife, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Mapeamento físico e análise evolutiva em *Phaseolus*
vulgaris L. e *P. lunatus* L., utilizando hibridização *in*
situ fluorescente (FISH)**

Tese apresentada por Cícero Carlos de Souza Almeida ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Guerra
(Depto. de Botânica, UFPE)

Co-orientadora: Prof. Dra. Andrea Pedrosa-Harand
(Depto. de Botânica, UFPE)

Recife, 2006

ALMEIDA, Cícero Carlos de Souza

Mapeamento físico e análise evolutiva em *Phaseolus vulgaris* L. e *P. lunatus* L., utilizando hibridação in situ fluorescente (FISH) / Cícero Carlos de Souza. – Recife: O Autor, 2007.

viii, 74p.: il.

Inclui anexos

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – UFPE. CCB

1. *Phaseolus* 2. Mapeamento físico 3. Evolução I. Título

635.652

CDU (2ª. Ed.)

UFPE

635.6

CDD (22ª. Ed.)

CCB – 2007 – 143

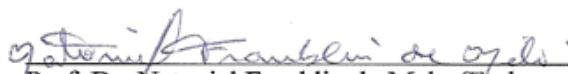
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

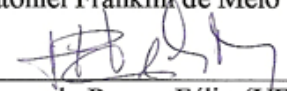
**Mapeamento físico e análise evolutiva em *Phaseolus*
vulgaris L. e *P. lunatus* L., utilizando hibridização *in*
situ fluorescente (FISH)**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Membros titulares:


Prof. Dr. Marcelo Guerra (orientador/UFPE)


Prof. Dr. Natoniel Franklin de Melo (Embrapa)


Prof. Dr. Leonardo Pessoa Félix (UFPB)


Prof. Dr^a. Ana Christina Brasileiro Vidal (UFPE)


Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho (UFRPE)

Suplentes:

Prof. Dr. Ana Maria Benko Iseppon (UFPE)

Prof. Dr. Neide Santos (UFPE)

DEDICATÓRIA

A minha mãe, padrasto (em memória), avós, irmãos
e a minha esposa Joseane

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa de Desenvolvimento Científico Regional pelo período de dois anos.

À Pró-Reitora de Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco pela bolsa de doutorado no último ano do curso.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE, pelo apoio prestado.

À orientação dos Professores Marcelo Guerra e Andrea Pedrosa-Harand.

À funcionária do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE, Adenilda, pelo apoio prestado.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Botânica da UFPE, Adriana Buarque, Ana Emília, Ana Christina, Ana Paula, Artur, Fagna, Fernando, Filipe, Gabriela (Gabi), Gustavo, Joana, Juliano, Ivan, Liliane (Lili), Maria José (Lia) e Silvana pelo convívio e apoio durante todos os momentos.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	Pág.
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	VII
2. REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1. Gênero <i>Phaseolus</i>	1
2.1.1. Importância econômica	1
2.1.2. Taxonomia	3
2.1.3. Origem e evolução	4
2.1.4. Variabilidade genética	5
2.1.5. Faseolina	6
2.1.6. Melhoramento genético	7
2.1.7. Citogenética do gênero	8
2.1.7.1. Heterocromatina	8
2.1.7.2 DNA ribossomal 5S e 45S	10
2.2. Marcadores moleculares e melhoramento genético	11
2.3. Mapeamento genético	12
2.4. Mapeamento físico	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
4. CAPÍTULO I - Extensive ribosomal DNA amplification during Andean	25

common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution

Abstract	26
Introduction	26
Materials and methods	27
Plant material	27
Chromosome preparation	27
DNA probes	27
Fluorescence in situ hybridization (FISH)	27
Data analysis	27
Results	28
Discussion	32
Mechanisms of rDNA variation	32
Differential 45S rDNA amplication in common bean	33
Acknowledgements	34
References	34

5. CAPÍTULO II – Citogenética comparada de duas espécies de *Phaseolus*:

<i>P. lunatus</i> L. e <i>P. vulgaris</i> L.	36
Resumo	38
Introdução	39
Materiais e Métodos	40
Material	40
Preparação cromossômica	41
Bandeamento C	41

Coloração CMA/DAPI	42
Sondas de DNA	42
Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	43
Análise dos dados	43
Resultados	44
Heterocromatina	44
Hibridização <i>in situ</i> de sondas de DNA	45
Discussão	46
Agradecimentos	49
Referências bibliográficas	49
 6. CAPÍTULO III - Mapa citogenético de <i>Phaseolus lunatus</i> L. usando BACs de <i>P. vulgaris</i> revela alto grau de macrossintenia	 57
Resumo	59
Introdução	60
Materiais e Métodos	61
Material	61
Preparação cromossômica	62
Sondas de BACs	62
Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	62
Análise dos dados	63
Resultados	63
Discussão	65
Agradecimentos	67

Referências bibliográficas	67
7. CONCLUSÕES	74
8. ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
REVISÃO DA LITERATURA	
Figura 1 Centros de domesticação das espécies <i>P. lunatus</i> e <i>P. vulgaris</i> .	4
 CAPÍTULO I	
Fig. 1 Localization of 5S (red) and 45S (green) rDNA probes on <i>P. vulgaris</i> chromosomes. Chromosomes 6 and 10 were numbered according to similarity to the ‘Calima’ ideogram (see Fig. 3). a ‘Pinto UI 114’. b ‘Jamapa’. c ‘Jalo EEP558’. d ‘Nuña Mani’. e ‘Pajarito’ G24423. Insert shows upper chromosome 10, with a lower contrast, with very weak green signals. f ‘Frijol de Pichon’. g ‘Pajarito’ G24404. Note that only five 45S rDNA signals are present. Arrows indicate weak signals on chromosomes other than 6 and 10. Bar in g = 2.5 µm	29
Fig. 2 Distribution of the analyzed accessions according to their number of 45S rDNA loci. Upper panel different gene pools and types, as presented in Table 1. Races are indicated as: C Chile, D Durango, J Jalisco, M Mesoamerica, N Nueva Granada, P Peru. Lower panel hybrids between both gene pools (Andean + Mesoamerica Andean accession with Mesoamerican introgression; Andean Mesoamerica cross between Andean and Mesoamerican accessions followed by	

sel.ng). Accessions that showed inter-individual variation ('Pajarito' G24404, 'Frijol de Pichon' and 'Cargamanto' G5702) have been represented twice 30

Fig. 3 Signal intensity variability of 5S (grey) and 45S (black) rDNA sites on chromosomes 6 (previously named chromosome 1) and 10 (previously named chromosome 8) of different common bean accessions. Chromosomes were identified by comparison to the 'Calima' ideogram (Pedrosa et al. 2003). Except for the standard accession 'Calima', accessions were ordered according to Table 1. Number of '+' sign represents relative intensity of signals. (+) indicates very weak signals not visible in all cells and individuals. Intra-accession variation in 'Frijol de Pichon' is depicted 31

CAPÍTULO II Pág.

- Figura 1 Bandeamento-C em metáfases de *P. lunatus* (A) e *P. vulgaris* (B). Barra em B representa 5 µm 54
- Figura 2 Metáfases de *P. lunatus* (A-C) e *P. vulgaris* (D-F) coradas com DAPI (A e D) e CMA (B e E). C e F mostram a sobreposição da dupla-coloração. Barra em F representa 5 µm 54
- Figura 3 Hibridização *in situ* em metáfases de *P. lunatus*. Sondas de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em vários cultivares: A, G26460; B, G2585; C, FA18; D, FA02; F, H e J, "vermelhinha". Observe dois sítios de DNAr 5S em volta do centrômero em F. E, G e I, mesmas células que em F, H e J hibridizadas com Bng-G (E), SJ19.92 (G) e Bng-K (I). Barra em J representa 5 µm 55

Figura 4	Idiogramas de <i>P. Lunatus</i> e <i>P. vulgaris</i> mostrando a distribuição da heterocromatina revelada com CMA, dos sítios de DNAr 5S e 45S e dos marcadores cromossômicos Bng-G, SJ91.12 e Bng-K. Os sítios de DNAr 5S e 45S em <i>P. vulgaris</i> são os descritos por Pedrosa-Harand et al., 2006).	56
----------	---	----

CAPÍTULO III		Pág.
Figura 1	Hibridização <i>in situ</i> de BACs em metáfases de <i>P. lunatus</i> . A-B, BAC 20F21 com DNA repetitivo disperso. C, BAC 53G1 com DNA pericentromérico. D, BAC 95L12 do cromossomo 3. E, BAC 221J21 do cromossomo 4. F, BAC 86I17 (verde) e o BAC 33M20, ambos do cromossomo 7. G, coquetel de BACs para o três cromossomos. Na imagem F, o sinal do BAC 86I17 é uma pseudocoloração. Barra em G representa 5 µm	72
Figura 2	Mapeamento físico de BACs de <i>P. vulgaris</i> em cromossomos de <i>P. lunatus</i> . 3, 4 e 7 representam a numeração cromossômica dos cromossomos de <i>P. vulgaris</i>	73
Figura 3	Mapa físico de <i>P. lunatus</i> construído com a hibridização <i>in situ</i> de BACs selecionados com marcadores do mapa genético de <i>P. vulgaris</i> (linha à esquerda)	73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Pág.

Table 1	Common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>) accessions analyzed in this study, grouped by gene pool, race and type of material	28
---------	--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1	Acessos de <i>Phaseolus lunatus</i> analisados com indicação dos grupos aos quais pertencem, procedência, tipo e código de acesso e número de sítios de DNAr observados	53
----------	---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1	Lista dos clones de BACs usados na hibridização <i>in situ</i> (FISH) que apresentaram seqüências de DNA repetitivo	71
Tabela 2	Lista dos clones de BACs e fagos hibridizados <i>in situ</i> em cromossomos de <i>P. lunatus</i>	71

RESUMO

Neste trabalho foram analisadas a distribuição da heterocromatina, o número de sítios de DNAr 5S e 45S nas espécies *P. lunatus* e *P. vulgaris* e foi desenvolvido um mapa citogenético de *P. lunatus* utilizando dois fagos e 30 BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) dos cromossomos 3, 4 e 7 de *P. vulgaris*. Os resultados mostraram que a heterocromatina em *P. vulgaris* e em *P. lunatus* está localizada preferencialmente na região pericentromérica da maioria dos cromossomos. Em *P. vulgaris* foi observada uma variação para o DNAr 45S, em que acessos Mesoamericanos apresentaram de três a quatro sítios e os Andinos de seis a nove sítios. O número de sítios de DNAr 5S em *P. vulgaris* foi constante com dois sítios em todos os acessos. Por outro lado, em *P. lunatus* o número de sítios de DNAr 45S não variou, revelando um sítio de DNAr. O DNAr 5S apresentou um sítio em alguns acessos e uma duplicação em apenas dois outros acessos. A hibridização *in situ* de 30 BACs e dois fagos de *P. vulgaris* em cromossomos de *P. lunatus* mostrou que sete BACs continham DNA repetitivo e não foram mapeados. Os demais BACs e fagos mostraram estar conservados, pelo fato de que as posições no mapa genético de *P. vulgaris* e no mapa citogenético de *P. lunatus* foram semelhantes. Os resultados corroboram a semelhança cariotípica das espécies, sugerindo que não ocorreram grandes rearranjos cromossômicos após a separação delas. Provavelmente a principal divergência entre essas espécies foi a amplificação diferencial de DNAr 45S e de seqüências de DNA repetitivo, pelo fato de que algumas seqüências foram detectadas nos cromossomos de *P. vulgaris*, que estão aparentemente ausentes em *P. lunatus* e outras seqüências foram detectadas nos cromossomos de *P. lunatus*, que estão aparentemente ausentes em *P. vulgaris*.

Palavras chave: *Phaseolus*, Mapeamento físico, Evolução

ABSTRACT

This work presents the analyses of the heterochromatin distribution and number of 5S and 45S rDNA sites in the species *P. lunatus* and *P. vulgaris* and the development of a cytogenetic map of *P. lunatus* based on the localization of two bacteriophages and 30 BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) of chromosomes 3, a and 7 from *P. vulgaris*. In both species, the constitutive heterochromatin was preferentially located in the pericentromeric regions of most chromosomes. A high variation in the number of 45S rDNA sites was observed in *P. vulgaris*. In this species three to four sites were observed in Mesoamerican accessions and from six to nine sites in the Andean ones. The number of 5S rDNA sites was stable with two sites being observed in all accessions. In contrast, the number of 45S rDNA sites in *P. lunatus* remained constant, with a single locus being observed, while the 5S rDNA was observed forming a single locus in many accessions, but has a duplicated in others. *In situ* hybridization of 30 BACs and two bacteriophages from *P. vulgaris* in *P. lunatus* revealed the presence of repetitive DNA in 7 BACs, while could therefore not be mapped. The remaining BACs and phages were shown to be conserved among the species, because they were mapped in similar positions in *P. vulgaris* genetic map and *P. lunatus* cytogenetic map. These results confirm the similarity between the karyotypes of both species and suggest that no major chromosomal rearrangement occurred since the time of divergence. The differential amplification of 45S rDNA and other repetitive sequences are probably the main karyotypical differences among the species, because some sequences have been detected in *P. vulgaris* but not in *P. lunatus* and others seem to be present in *P. lunatus* but are apparently absent from *P. vulgaris*.

Key Words: *Phaseolus*, Physical mapping, Evolution

1. INTRODUÇÃO

Phaseolus é um importante gênero da família *Fabaceae* por incluir espécies cultivadas como *P. vulgaris* (feijão comum) e *P. lunatus* (feijão fava). Estas espécies fazem parte da dieta de muitos países da América Latina e África (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas 2000).

Estudos utilizando marcadores morfológicos, bioquímicos e genéticos nessas espécies têm indicado uma domesticação independente em duas regiões, chamadas de Mesoamericana e Andina (Debouck et al. 1987; Gepts 1998; Lioi et al. 1998; Fofana et al. 2001).

O gênero *Phaseolus* possui alta semelhança cariotípica, apresentando $2n=22$ cromossomos com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. A heterocromatina constitutiva, analisada em algumas espécies, está preferencialmente distribuída na região pericentromérica da maioria dos cromossomos. Estudos com DNAr 5S e 45S têm permitido sugerir algumas diferenças cariotípicas no gênero, no entanto, nenhum rearranjo cromossômico foi demonstrado e não está claro se as alterações cariotípicas estariam envolvidas no processo de especiação do grupo (Mok e Mok 1976; Zheng et al. 1991; 1993; Moscone et al. 1999; Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas 2000).

Com o advento dos marcadores moleculares, vários mapas genéticos foram desenvolvidos para diversas espécies, incluindo *P. vulgaris* com o mapa de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Vallejos et al. 1992), porém, para *P. lunatus* nenhum mapa foi desenvolvido. Outros tipos de mapa podem ser desenvolvidos, como o mapa citogenético, que mostra a posição de marcadores mapeados geneticamente nos cromossomos (Cheng et al. 2001).

O mapa citogenético pode ser obtido de duas maneiras: por uso de estoques citogenéticos, como linhagens de deleção ou translocação ou através da hibridização *in situ* (*In Situ Hybridization* - ISH). Com o desenvolvimento da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (*Hybridization In Situ Fluorescent* – FISH) tornou-se mais rápido a obtenção desses mapas. Esta técnica possui limitações para detectar pequenas seqüências, como por exemplo os marcadores do tipo RFLP. Esta limitação pode ser superada utilizando clones de grandes insertos de DNA, como os clones de BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*), selecionados aleatoriamente ou com marcadores moleculares de RFLP ancorados em mapas genéticos (Cheng et al. 2001). A integração entre mapas de diferentes espécies permite construir um mapa comparativo e conhecer possíveis rearranjos cromossômicos e outras divergências genéticas e moleculares ocorridas durante a evolução.

Com o intuito de estudar a evolução cariotípica de *P. lunatus* e *P. vulgaris*, este trabalho analisou a distribuição da heterocromatina e o número de sítios de DNAr 5S e 45S em acessos Mesoamericanos e Andinos de *P. lunatus* e *P. vulgaris* e construiu um mapa citogenético comparativo entre essas espécies. A heterocromatina foi localizada por meio da técnica de bandeamento C e pela coloração com os corantes fluorescentes cromomicina A₃ (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). A localização de sítios de DNAr 5S e 45S e o mapeamento cromossômico dos BACs e fagos de *P. vulgaris* em cromossomos de *P. lunatus* foram feitos através de FISH.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gênero *Phaseolus*

2.1.1 Importância econômica

Espécies de *Phaseolus* estão entre as plantas cultivadas mais antigas do Novo Mundo, juntamente com milho e mandioca. Elas têm sido culturas dominantes em regiões de média e baixa altitude das Américas, encontradas até 3000 metros de altitude. Os feijões são extremamente diversificados quanto à sua morfologia, aos métodos de cultivo, as maneiras de consumo e a adaptação aos ambientes em que são cultivados. Espécies de *Phaseolus* são cultivadas em sistemas de monocultura, em consorciação com outras culturas ou em rotação de culturas. A consorciação é favorecida pelo uso de cultivares com crescimento determinando, diminuindo a competição com outras culturas. A rotação é empregada, usando cultivares com ciclo vegetativo curto (Broughton et al. 2003).

Nos últimos 20 anos, o cultivo dos feijões tem aumentado na escala comercial, pela comercialização tanto em mercados regionais quanto em nacionais e internacionais. Esse crescimento tem sido atribuído ao fato de que os feijões (*P. vulgaris* L. e *P. lunatus* L.) são os legumes mais importantes para o consumo direto pelo homem. Em 2003, a produção total anual mundial excedeu 23 milhões de toneladas, das quais sete milhões foram produzidas na América Latina e África (Broughton et al. 2003).

A maioria dos plantios é feita em pequenas propriedades, variando de um a 10 hectares (ha). No Brasil, aproximadamente um terço do total da área plantada é feito em propriedades com menos de 10 ha, já no México, cerca de 67 % do plantio está situado

em propriedades com menos de 5 ha. O nível de tecnologia empregado no plantio tem sido baixo. A melhor situação está na Argentina, em que o cultivo tem sido feito utilizando modernos sistemas de produção. Já no Brasil, apenas 4% da área, que corresponde a 15% da produção, é feito com sistema de irrigação. Em países do Oeste e Sul da África, o feijão também tem grande importância, com aproximadamente 4 milhões de ha. Semelhante a América Latina, o plantio é feito em pequenas propriedades, no entanto, na África não tem a disponibilidade de fertilizantes nem de cultivares melhor adaptados como na América Latina, tornando a produtividade inferior (Wortmann et al. 1998).

Os feijões são consumidos de várias maneiras: como grãos maduros e imaturos ou na forma de verduras (vagens). Este último tipo é obtido quando se utiliza cultivares precoces, podendo ser colhido com dois meses após o plantio. O consumo por pessoa tem variado entre as regiões, por exemplo, na Bolívia o consumo por pessoa é de 24 kg ano⁻¹, enquanto em regiões rurais do Quênia esse valor chega a 60 kg ano⁻¹. Em outros países da África, como Ruanda e Burundi, a média é de 40 kg ano⁻¹. No Brasil, ocorre uma variação entre as regiões. Enquanto na região Sudeste, o consumo por pessoa é de 18,2 kg ano⁻¹, na região Nordeste, este índice chega a 20,8 kg ano⁻¹ (Broughton et al. 2003).

O feijão comum tem grande importância na complementação com outros alimentos, na dieta de muitos países. Suas sementes contêm de 20 a 25% de proteínas, estocadas na maioria, como faseolina. A importância da faseolina é devida a sua qualidade e quantidade, no entanto, ela é deficiente em aminoácidos contendo enxofre como a metionina. Por outro lado, as sementes dos cereais são deficientes em outros aminoácidos como a lisina. A alimentação combinada de cereais e legumes compensam essas deficiências, quando consumidos na proporção de 2:1 (Bressani 1983).

Entre os feijões, o feijão comum (*P. vulgaris*) é o mais consumido na América Latina e África, com cerca de 500 milhões de consumidores. A produção mundial atinge 22,57 milhões de toneladas. No Brasil, ocupa uma área plantada de mais de 4,4 milhões de ha, com uma produção de 3,9 milhões de toneladas e um rendimento médio de 745 kg/ha. A segunda espécie mais importante do gênero *Phaseolus* é a fava (*P. lunatus*), que no Brasil, ocupa uma área de 37 mil ha, produzindo 13,9 mil toneladas. O rendimento de fava é quase a metade do atingido pelo feijão comum, chegando a 384 kg/ha. Além disso, o feijão comum é cultivado em todas as cinco regiões do Brasil, enquanto que a fava é cultivada, praticamente, na região Nordeste, onde se encontra cerca de 96,2% da produção nacional (IBGE 2004).

2.1.2 Taxonomia

O Gênero *Phaseolus* possui aproximadamente 50 espécies e pertence à família Fabaceae (Leguminosae), subfamília *Papilionoideae*, tribo *Phaseoleae*. Essa é uma das tribos mais importantes economicamente, por incluir além de *Phaseolus*, os gêneros *Glycine* (soja) e *Vigna* (feijões asiático e africano) (Lackey 1985). O gênero *Phaseolus* inclui cinco espécies cultivadas: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus* L., *P. polyanthus* L. e *P. acutifolius* A. Gray. Entre essas, *P. vulgaris* e *P. lunatus* são as que apresentam a maior importância econômica (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas 2000).

Estudos genéticos com dados morfológicos e moleculares têm revelado as relações filogenéticas entre espécies de *Phaseolus*. *P. microcarpus* é considerada uma espécie basal no grupo e *P. vulgaris* faz parte de um complexo de espécies, que inclui *P. acutifolius*, *P. coccineus* e *P. polyanthus*. (Delgado-Salina et al. 1999). Em outro estudo com as espécies cultivadas, *P. vulgaris*, *P. coccineus* e *P. acutifolius* ficaram em um

clado, enquanto *P. lunatus* formou, juntamente com algumas espécies silvestres, um clado a parte, sugerindo que, entre as espécies cultivadas, *P. lunatus* é a espécie mais distante (Delgado-Salinas et al. 1999). Análises filogenéticas, usando dados morfológicos, bioquímicos, moleculares têm mostrado que o gênero é monofilético (Debouck, 1999).

2.1.3 Origem e evolução

Phaseolus lunatus e *P. vulgaris* surgiram em uma região, localizada no norte do Peru e sul do Equador, entretanto, existem dois centros de domesticação, denominados de Mesoamericano e Andino (Figura 1). Além disso, evidências botânicas, arqueológicas e bioquímicas sustentam a hipótese da ocorrência de domesticação independente para *P. lunatus* e *P. vulgaris* em ambos os centros (Debouck e Smartt 1995; Fofana et al. 1999; 2001; Lioi 1996; Lioi et al.1998; 1999; Maquet et al. 1997; Nienhuis et al. 1995).



Figura 1 – Centros de domesticação das espécies *P. lunatus* e *P. vulgaris*.

Para *P. vulgaris*, a região Mesoamericana se estende do México ao norte da América do Sul e está dividida em três tipos raciais: Mesoamérica, Durango e Jalisco. A região Andina compreende a região central e o sul da América do Sul e possui três tipos raciais: Chile, Nueva Granada e Peru (revisado por Gepts 1998).

Para *P. lunatus*, o centro de domesticação Mesoamericano está distribuído na região México-Guatemala, se estendendo a algumas ilhas do Caribe e em determinadas regiões no Panamá. O grupo Andino se restringe às regiões dos Andes, que vai do norte do Peru até o Equador e em poucas regiões no Chile e na Bolívia (Debouck et al. 1987; Lioi et al. 1998; Fofana et al. 2001).

Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas (2000), revisando a evolução do gênero, sugeriram que as principais alterações envolvidas na evolução cariotípica do grupo foram inversões pericêntrica e paracêntrica, translocações e ganho ou perda de heterocromatina. Entretanto, nenhum rearranjo cromossômico foi claramente demonstrado e não está claro de que forma as alterações cariotípicas estariam envolvidas no processo de especiação do grupo.

2.1.4 Variabilidade genética

Espécies de *Phaseolus* possuem ampla variabilidade morfológica, principalmente para tipo de crescimento, tamanho das sementes, cor das sementes, precocidade e resistência a pragas e doenças.

A diversidade genética para *P. vulgaris* está organizada em pool gênicos primário, secundário, terciário e quaternário. O primário compreende as populações cultivadas e silvestres em que híbridos são totalmente férteis e podem ser facilmente usados para melhoramento genético. O pool gênico secundário é formado pelas espécies

P. coccineus, *P. costaricensis* e *P. polyanthus*. Essas espécies se cruzam e não necessitam de resgate de embrião, podendo ser cruzadas com *P. vulgaris*, principalmente quando *P. vulgaris* é usado como progenitor feminino. No entanto, híbridos entre *P. vulgaris* e essas espécies podem ser parcialmente estéreis. O pool gênico terciário compreende as espécies *P. acutifolius* e *P. parvifolius*. Cruzamentos entre essas espécies produzem híbridos férteis, no entanto, quando cruzadas com *P. vulgaris* necessitam de resgate de embrião. As espécies *P. filiformis*, *P. angustissimus* e *P. lunatus* fazem parte do pool gênico quaternário. Cruzamentos dessas espécies com *P. vulgaris* não têm proporcionado híbridos férteis, entretanto, essas espécies podem ser doadoras de genes, por meio de cruzamentos indiretos (Singh et al. 1991).

2.1.5 Faseolina

A faseolina é a principal proteína estocada nas sementes das espécies de *Phaseolus*. Estudos envolvendo esta proteína têm permitido identificar acessos de *P. vulgaris* em que acessos de origem Mesoamericana possuem faseolina dos tipos S, Sb, Sd e B, sendo o tipo S o predominante, enquanto os acessos Andinos têm faseolina T, C e H, sendo o tipo T o mais comum (Gepts e Bliss 1984).

Em *P. lunatus* também é possível identificar acessos Mesoamericano e Andinos pelo padrão de faseolina. Materiais Mesoamericanos possuem faseolina do tipo M, com um grau de variação em ambas as frações HMW (*High Molecular Weight*) e LMW (*Low Molecular Weight*). As faseolinas LMW e HMW são identificadas por números de 1 a 7 e letras de A a F, respectivamente, ou seja, M1 a M7 para LMW e MA a MF para HMW. Acessos de origem Andina possuem faseolina do tipo A, possuindo uma variação indicada de 1 a 3 (Lioi 1996).

2.1.6 Melhoramento genético

Programas de melhoramento genético têm se dedicado a melhoria das cultivares atuais, com os objetivos de expandir o cultivo do feijão, elevar o rendimento da cultura, precocidade, aumentar a qualidade dos grãos, através do aumento dos níveis de proteínas, vitaminas e sais minerais, e conferir resistência a pragas e doenças. Entre os diversos fatores que influenciam o rendimento da cultura do feijão, o ataque de patógenos tem sido uma constante preocupação para melhoristas desta leguminosa (Rezende et al. 2001).

Espécies como *P. polyanthus*, *P. coccineus*, *P. costaricensis*, *P. acutifolius* possuem resistências ao vírus do mosaico dourado, antracnose, mofo da raiz, vírus do mosaico amarelo, e outras doenças causadas por bactérias (Debouck 1999). Avaliação de germoplasma silvestre e domesticado de *P. vulgaris* para resistência a pragas, doenças e outras características tem mostrado pouca eficiência, levando à hibridação com outras espécies de *Phaseolus*. Cruzamentos têm sido feitos entre *P. vulgaris* e *P. coccineus*, no entanto, o pareamento cromossômico não é perfeito e poucas variedades comerciais têm sido criadas. Cruzamentos entre *P. polyanthus* e *P. vulgaris* é mais difícil do que com *P. coccineus* (Broughton et al. 2003).

Uma espécie com grande potencial para doar genes para *P. vulgaris* é *P. lunatus*, porém, cruzamentos entre essas espécies não tem gerados híbridos férteis, confirmando a posição taxonômica delas no gênero. A principal barreira reprodutiva entre espécies do gênero *Phaseolus* ocorre pós-fertilização, especialmente durante o desenvolvimento do embrião, desta forma, a transferência de genes seria por cruzamentos indiretos (revisado por Broughton et al. 2003).

2.1.7 Citogenética do gênero

A primeira análise cromossômica em *Phaseolus* foi realizada em 1925 por Karpetschenko. Nesse estudo, foi determinado o número cromossômico $2n = 22$ para *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *P. lunatus* e *P. vulgaris* (revisado por Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas 2000). Vários estudos citogenéticos têm dado suporte ao número básico $x = 11$ para o gênero, mas o número de espécies analisadas ainda é relativamente pequeno e a maioria das análises tem estado restrita às espécies cultivadas. O baixo conhecimento do cariótipo das espécies do gênero *Phaseolus* tem sido atribuído ao reduzido tamanho dos cromossomos, o que dificulta as análises citogenéticas (Hucl e Scoles 1985; Zheng et al. 1991). Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas (1998) realizaram o estudo citogenético mais completo para o gênero até o momento, incluindo o cariótipo de 10 espécies selvagens, que representam 20% do gênero, totalizando 32 espécies. Os dados disponíveis para o gênero mostram uma predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

2.1.7.1 Heterocromatina

O genoma dos eucariontes possui grande parte do DNA constituído de seqüências que não representam genes por não codificarem proteínas. Estas seqüências estão preferencialmente em regiões específicas, que formam blocos definidos, denominados de heterocromatina, tornando-se uma fração do genoma que é mais compactada, mantendo alto nível de condensação durante o ciclo celular. Por outro lado, a parte do genoma que apresenta uma função gênica, é encontrada em regiões definidas como eucromatina. A heterocromatina é classicamente dividida em dois tipos:

constitutiva, que se mantém condensada durante o ciclo celular e a heterocromatina facultativa, que sofre descondensação e expressão gênica em algumas células. Estes blocos de DNA altamente condensados ocorrem preferencialmente em regiões próximas ao centrômero, telômeros e em regiões organizadoras de nucléolos (RON). A formação dos blocos de heterocromatina está associada a fatores epigenéticos como metilação de DNA repetitivo (que é formado por DNA satélite, transposons e retrotransposons) e modificações das histonas (acetilação e metilação). Este último mecanismo é considerado o fator secundário na formação da heterocromatina (Neves et al. 2005).

A localização da heterocromatina constitutiva em plantas tem sido feita por meio da técnica de bandeamento C, em que os cromossomos passam por processos de desnaturação e remoção da maior parte da eucromatina, enquanto a heterocromatina permanece inalterada. Quando os cromossomos são corados, a heterocromatina aparece como bandas diferencialmente coradas. Bandeamento C tem sido feito em vários organismos, por exemplo, em *Phaseolus* (Zheng et al. 1991), *Vigna* (Pignone et al. 1990) e *Cuscuta* (Guerra e García 2004).

Outra técnica que revela a heterocromatina é a dupla coloração com cromomicina A₃ (CMA) e 4'6-diamidino-2-phenilindol (DAPI). Estes fluorocromos coram preferencialmente regiões ricas em GC (CMA) e AT (DAPI), o que permite, além de localizar os blocos, também conhecer a constituição da heterocromatina (Guerra 1993; Guerra 2000).

A heterocromatina foi localizada em espécies dos gêneros *Phaseolus* e *Vigna*, utilizando a técnica de bandeamento C, (Mok e Mok 1976; Schweizer e Ambros 1979; Lavania e Lavania 1982; Pignone et al. 1990; 1995; Zheng et al. 1991; Galasso et al. 1992; 1993; Pignone et al. 1995 e Moscone et al. 1999). Os resultados mostraram que a

maioria das bandas está localizada na região pericentromérica dos cromossomos na maioria das espécies, com exceção de *P. lunatus* que possui bandas nas regiões terminais (Moscone et al. 1999).

Zheng et al. (1993) localizaram a heterocromatina por meio de dupla coloração com CMA/DAPI em espécies de *Phaseolus* e os resultados mostraram que blocos CMA⁺ coincidem com as bandas reveladas pelo bandeamento C (Zheng et al. 1991), sugerindo que a heterocromatina de *Phaseolus* é rica em GC.

2.1.7.2 DNA ribossomal 5S e 45S

Os genes de RNA ribossomal (RNAr) 5S, 5,8S, 18S e 25S são encontrados altamente repetidos em tandem nos seres vivos, variando de centenas a milhares de cópias. Nos vegetais, o gene RNAr 5S é organizado separadamente, enquanto os genes RNAr 18S, 5,8S e 25S são arranjados juntos em um gene precursor RNAr 45S (18S-5,8-25S) (Zoldos et al. 1999).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma das técnicas citomoleculares que tem permitido localizar seqüências de DNA ribossomal (DNAr) em vários organismos vegetais. Esta técnica consiste em desnaturar o DNA cromossomal e hibridiza-lo com fragmentos de DNA ou RNA marcados com moléculas fluorescentes. O número de loci de DNAr tem sido diferente, dependendo do grupo estudado, como exemplo no gênero *Quercus* (Fagaceae), foi encontrado quatro sítios de DNAr 45S e dois sítios de DNAr 5S em 11 espécies analisadas (Zoldos et al. 1999). Por outro lado, em cinco espécies de *Paeonia* (Paeoniaceae), que possuem 2n=10, o número de sítios de DNAr 18S variou de três a cinco. Algumas espécies apresentaram sítios em todo o complemento cromossômico (Hang e Sang 1999).

Em *Phaseolus*, a localização de sítios de DNAr 5S e 45S nas quatro espécies cultivadas permitiu sugerir algumas homeologias cromossômicas entre *P. vulgaris* e *P. coccineus* ou entre *P. vulgaris* e *P. acutifolius*. Entretanto esses dois marcadores não foram capazes de detectar homeologias entre *P. vulgaris* e *P. lunatus*, concordando com a distância evolutiva entre elas (Moscone et al. 1999).

A variação do número e da posição de sítios de DNAr 5S e 45S têm sido atribuída a diferentes mecanismos: a) amplificação de DNA satélite pode alterar a morfologia do cromossomo sem modificar a ordem de outras seqüências (Navratilova et al. 2003); b) rearranjos cromossômicos, como translocações e inversões (Hayashi et al. 2001); e c) a dispersão de *repeats* de DNAr, pode amplificar um sítio ou mudá-lo de posição sem alterar a ordem de outros marcadores cromossômicos. Esse último mecanismo, chamado de “dispersão-amplificação-deleção”, foi o mais simples para explicar a variação em Triticeae (Dubcovsky e Dvorak 1995). Além disso, a localização de loci de DNAr nas regiões terminais dos cromossomos tem maior grau de evolução em concerto, aumentando o número de loci e promovendo uma maior variação entre locus do que espécies com loci intersticiais. Resultados em *Avena agadiriana* (Hayasaki et al. 2001), *Aegilops speltoides* (Raskina et al. 2004), *Aloe* (Adams et al. 2000), *Paeonia* (Hang e Sang 1999) suportam essa hipótese.

2.2 Marcadores moleculares e melhoramento genético

Nos últimos anos, a introdução de marcadores moleculares, como os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSRs (*Simple Sequence Repeats*) e AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), tem permitido avaliar mais sistematicamente a diversidade genética

entre cultivares de uma espécie, construir mapas de ligação mais detalhados e selecionar marcadores associados a características morfológicas de interesse. Análises com marcadores moleculares têm contribuído tanto para estudos comparativos e evolutivos, como para programas de melhoramento de espécies cultivadas. Um exemplo é a utilização de técnicas como a seleção assistida por marcadores moleculares (MAS – *Marker-Assisted Selection*) para acelerar a obtenção de cultivares superiores. A MAS é uma ferramenta particularmente importante para a seleção de características controladas por mais de um gene (Alzate-Marin et al. 2001) ou características mais fortemente influenciadas pelo ambiente. Para eficiência e confiabilidade da seleção indireta por marcadores moleculares, é indispensável que o marcador esteja próximo ao gene e que o fenômeno da recombinação não separe a associação entre eles.

Em feijão comum, marcadores moleculares têm sido úteis na identificação de genes para resistência a antracnose (Adam-Blodon et al. 1994; Yuong e Kelly 1997), vírus do mosaico do feijão comum (Haley et al. 1994; Melotto et al. 1996; Johnson et al. 1997) e mancha bacteriana (Jung et al. 1997). Marcadores moleculares têm sido usados também para caracterizar QTLs (*Quantitative Trait Loci*), que conferem resistência a mancha bacteriana (Nodari et al. 1993; Jung et al. 1996; 1997; Yu et al. 1998) e ao vírus do mosaico dourado do feijão (Urrea et al. 1996).

2.3 Mapeamento genético

A construção de mapas genéticos ou de ligação tem sido grandemente facilitada pela disponibilidade de marcadores moleculares. Os mapas de ligação são baseados na frequência de recombinação entre os marcadores. Vários requisitos são necessários para fixar um marcador em um mapa genético: a) dois diferentes alelos para esse marcador,

b) dois diferentes alelos para um segundo marcador e c) oportunidade de recombinação meiótica (Harper e Cande 2000).

Apesar das limitações da análise genética, mapas de ligação baseados em marcadores moleculares têm sido usados em estudos evolutivos para determinação de sintenia entre os taxa, e constituem o ponto de partida para isolar genes de interesse agrônômico (Freyre et al. 1998; Paterson 2000). Mapas genéticos comparativos têm proporcionado grandes avanços no estudo de sintenia em vários organismos vegetais, por exemplo, em entre *Pinus taeda* e *Pseudotsuga menziesii* (Konstantin et al. 2004), *Helianthus petiolaris* e *H. annuus* (Burke et al. 2004) e entre *Medicago sativa* and e *Pisum sativum* (Kaló et al. 2004).

2.4 Mapeamento físico

A determinação das distâncias físicas entre os genes de interesse e os marcadores mais próximos é fundamental e, devido a isso, mapas físicos têm sido construídos para as espécies vegetais melhor estudadas como *Arabidopsis thaliana* (Mozo et al. 1999) e arroz (Tao et al. 2001), permitindo uma caracterização mais completa desses genomas. Nesses dois exemplos, os mapas físicos foram construídos através de agrupamentos de clones parcialmente superpostos (*contigs*), selecionados de bibliotecas de BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*).

Outra alternativa para a construção de mapas físicos é a localização de seqüências ao longo dos cromossomos, também conhecido como mapa cromossômico ou citogenético. Esse tipo de mapa é criado por determinações das posições de marcadores, relacionando-os com centrômero, telômero, região organizadora de nucléolo (RON) e heterocromatina. Esses mapas citogenéticos podem ser obtidos por

diferentes abordagens. A primeira é através do uso de estoques citogenéticos, como linhagens de deleção ou translocação. Este tipo de mapeamento necessita de grande número de estoques citogenéticos e a obtenção, manutenção e caracterização desses estoques são processos de muito trabalho. A segunda abordagem é a localização de seqüências diretamente nos cromossomos, utilizando FISH. Em ambos os casos, geralmente são localizadas seqüências que já tenham sido incluídas em mapas de ligação, permitindo assim a correlação entre as distâncias físicas e genéticas (Harper e Cande 2000).

Devido ao nível de sensibilidade da técnica de FISH em vegetais, as seqüências dos marcadores são geralmente muito pequenas para serem utilizadas diretamente como sonda. No entanto, a utilização de BACs, que contêm grandes inserções genômicas de DNA, pode eliminar este problema. Em *Arabidopsis*, bibliotecas de BACs foram usadas para desenvolver mapas físicos (Yu et al. 2000; Cheng et al. 2001).

Para construção de mapas cromossômicos de alta resolução, é recomendável utilizar para FISH cromossomos longos. Entretanto, muitas espécies apresentam pequenos cromossomos em metáfase mitótica. Uma alternativa é a utilização de cromossomos meióticos no estágio de paquíteno. Estes cromossomos são menos condensados em comparação com os cromossomos da metáfase mitótica, e já demonstraram ser adequados para a FISH de alta resolução. Em geral, cromossomos de plantas isolados a partir de células-mãe de grãos de pólen em fase de paquíteno são de 7 a 40 vezes mais longos que cromossomos isolados de metáfase mitótica (Sandder e Weber 2002). Além disso, cromossomos paquitênicos apresentam quatro cromátides pareadas, e por ocorrer recombinação nessa fase, é possível correlacionar diretamente a posição do gene e os pontos de recombinação meiótica.

Várias seqüências têm sido mapeadas usando FISH em cromossomos paquitênicos de tomate (Zhong et al. 1999; Manning et al. 2002), milho (Sander e Weber 2002), cevada (Serizawa et al. 2001) e triticales (Hohmann et al. 1999). Em feijão, entretanto, apenas uma correlação entre um mapa genético e os cromossomos mitóticos da espécie foi realizada até o momento (Pedrosa et al. 2003).

Mapas físicos constituem uma poderosa ferramenta, que pode ser explorada para o isolamento de genes, tanto pela técnica de *Chromosome Walking*, quanto, no caso do mapa cromossômico, por microdissecação e microclonagem. O mapeamento de seqüências nos cromossomos também permite entender como a recombinação está distribuída ao longo do genoma (Sadder e Weber 2002). A construção de mapas físicos através da FISH possibilita ainda comparar a posição e a ordem de várias seqüências nos cromossomos de espécies próximas, tornando possível revelar alterações cromossômicas ocorridas ao longo do processo de especiação. Por exemplo, no estudo entre *Pennisetum squamulatum* e *Cenchrus ciliaris*, um conjunto de BACs foi hibridizado *in situ* em cromossomos das duas espécies, permitindo construir um mapa físico comparativo e determinar a macrossintenia entre as espécies (Goel et al. 2006).

3 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam-Blodon AF, Seignac M, Dron M (1994) A genetic map of common bean to localize specific resistance genes against anthracnose. **Genome** 37:915-924
- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW, Leitch AR (2000) Ribosomal DNA evolution and phylogeny in Aloe (Asphodelaceae). **Am J Bot** 87:1578-1583
- Alzate-Marin AL, Costa MR, Sartorato A, Rava C, Barros EG, Moreira MA (2001) Use of Markers as a tool to Investigate the Presence of Disease Resistance Genes In Common Bean Cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 1:125-133
- Bressani R (1983) Research needs to upgrade the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Qual Pl Plant Foods Human Nutr** 32:101-110
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil** 252:55-128
- Burke JM, Lai Z, Salmaso M, Nakazato T, Tang S, Heesacker A, Knapp SJ, Rieseberg LH (2004) Comparative Mapping and Rapid Karyotypic Evolution in the Genus *Helianthus*. **Genetics** 167:449-457
- Cheng Z, Presting GG, Buell CR, Wing RA, Jiang J (2001) High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. **Genetics** 157:1749-1757

- Debouck DC, Linan JJH, Campana SA, dela Cruz Rojas JH (1987) Observation on the domestication of *Phaseolus lunatus* L. FAO/IBPGH. **Plant Genet Res Newslett** 70:26-32
- Debouck DG (1999) Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. **In Common Bean Improvement in the 21st Century**. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht: S R Singh, pp.25-52
- Debouck GD, Smartt J (1995) Beans. In: **Evolution of crop plants**. New York: Smartt e Simmonds, p.287-294
- Delgado-Salinas A, Turley T, Richman A, Lavin M (1999) Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). **Syst Bot** 24:438-460
- Dubcovsky J, Dvorak J (1995) Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes. **Genetics** 140:1367-1377
- Fofana B, Baudoin JP, Vekemans X, Debouck DG, Jardin P (1999) Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. **Theor Appl Genet** 98: 202-212
- Fofana B, Jardin P, Baudoin JP (2001) Genetic diversity in the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by chloroplast DNA (cpDNA) variations. **Genet Res and Crop Evol** 48:437-445
- Freyre R, Skroch PW, Geffroy V, Adam-Blondon A-F, Shirmohamadali A, Johnson WC, Llacá V, Nodari RO, Pereira PA, Tsai S-M, Tohme J, Dron M, Nienhuis J, Vallejos CE, Gepts P (1998) Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theor Appl Genet** 97:847-856

- Galasso I, Pignome D, Perrino P (1992) Cytotaxonomic studies in *Vigna*. I. General technique and *Vigna unguiculata* C-banding. **Caryologia** 45:155-161
- Galasso I, Pignome D, Perrino P (1993) Cytotaxonomic studies in *Vigna*. II. Heterochromatin characterization in *Vigna unguiculata* and three related wild species. **Caryologia** 46:275-282
- Gepts P (1998) Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. **HortScience** 33:1124-1130
- Gepts P, Bliss F A (1984) Enhanced available methionine concentration associated with higher phaseolin levels in common bean seeds. **Theor Appl Genet** 69:47-53
- Goel S, Chen Z, Akiyama Y, Conner JA, Basu M, Gualtieri G, Hanna WW, Ozias-Akins P (2006) Comparative Physical Mapping of the Apospory-Specific Genomic Region in Two Apomictic Grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. **Genetics** 173:389-400
- Guerra M (1993) Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity** 71:243-241
- Guerra M (2000) Patterns of heterochromatin in plant chromosomes. **Genet Mol Biol** 23: 1029-1041.
- Guerra M, García M (2004) Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). **Genome** 47:134-140
- Haley SD, Afanador L, Kelly JD (1994) Identification and application of a random amplified polymorphic DNA marker for the *I* gene (Potyvirus resistance) in common bean. **Phytopathology** 84:157-160

- Hang D, Sang T (1999) Physical mapping of RNA genes in peonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent in situ hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution. **Am J Bot** 86:735-740
- Harper LC, Cande WZ (2000) Mapping a new frontier; development of integrated cytogenetic maps in plants. Functional Integrative. **Genomics** 1:89-98
- Hayasaki M, Morikawa T, Leggett JM (2001) Intraspecific variation of 18S-5.8S-26S rDNA sites revealed by FISH and RFLP in wild oat, *Avena agadiriana*. **Genes Genet Syst** 76:9-14
- Hayashi M, Miyahara A, Sato S, Kato T, Yoshikawa M, Taketa M, Hayashi M, Pedrosa A, Onda R, Imaizumi-Anraku H, Bachmair A, Sandal N, Stougaard J, Murooka Y, Tabata S, Kawasaki S, Kawaguchi M, Harada K (2001) Construction of a genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* using an intraspecific F2 population. **DNA Res** 8:301-310
- Hohmann U, Zoller J, Herrmann RG, Kazman ME (1999) Physical mapping and molecular-cytogenetic analysis of substitutions and translocation involving chromosome 1D in synthetic hexaploid triticale. **Theor Appl Genet** 98:647-656
- Hucl P, Scole GJ (1985) Interespecific hybridization in the common bean: a review. **HortScience** 20:352-357
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 2004, Brasil.
- Johnson WC, Guzman P, Mandala D, Mkandawire ABC, Temple S, Gilbertson RL, Gepts P (1997) Molecular tagging of the *bc-3* gene for introgression into Andean common bean. **Crop Science** 37:248-254
- Jung G, Coyne DP, Skroch PW, Nienhuis J, Arnaud-Santana E, Bokosi J, Ariyaratne H, Steadman JR, Beaver J, Kaeppler S (1996) Molecular markers associated with

- plant architecture and resistance to common blight, web blight and rust in common beans. **J Amer Soc Hort Sci** 121:794-803
- Jung G, Skroch PH, Coyne D, Nienhuis J, Ariyaratne H, Kaeppler S, Bassett M (1997) Molecular-marker-based genetic analysis of tepary-bean-derived common bacterial blight resistance in different developmental stages of common bean. **J Amer Soc Hort Sci** 122:329-337
- Kaló P, Seres A, Taylor SA, Jakab J, Kevei Z, Kereszt A, Endre G, Ellis THN, Kiss GB (2004). Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. **Mol Gen Genomics** 272:235-246
- Konstantin V, Krutovsky KV, Troggio M, Brown GR, Jermstad KD, Neale DB (2004). Comparative Mapping in the Pinaceae. **Genetics** 168: 447-461
- Lackey JA (1985) Tribe 10. Phaseoleae DC. In: **Advances in legume systematic. Part 1**. Royal Botanic Gardens, London: Rolhill RM, Raven PH, pp.301-327
- Lavania UC, Lavania S (1982) Chromosome banding patterns in some Indian pulses. **Ann Bot** 49:235-239
- Lioi L (1996) Phaseolin diversity in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in American centres of origin. **Genet Res Crop Evol** 43:575-580
- Lioi L, Lotti C, Galasso I (1998) Isozyme diversity, RFLP of the rDNA and phylogenetic affinities among cultivated Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae). **Plant Syst Evol** 213:153-164
- Lioi L, Sparvoli F, Bollini R (1999) Variation and genomic polymorphism of lectin-related proteins in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds. **Genet Res Crop Evol** 46:175-182

- Manning M, King GJ, Thompson AJ, Jones GH, Seymour GB, Armstrong SJ (2002) Genetic analysis and FISH mapping of the colourless non-ripening locus of tomato. **Theor Appl Genet** 104:165-170
- Maquet A, Zoro Bi I, Delvaux M, Wathelet B, Baudoin JP (1997) Genetic structure of the Lima bean base collection using allozyme markers. **Theor Appl Genet** 95:980-991
- Melotto M, Afanador L, Kelly J (1996) Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. **Genome** 39:1216-1219
- Mercado-Ruaro P, Delgado-Salinas A (1998) Karyotypic studies on species *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). **Am J Bot** 85:1-9
- Mercado-Ruaro P, Delgado-Salinas A (2000) Cytogenetics studies in *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae). **Genet Mol Biol** 23:985-987
- Mok DW S, Mok MC (1976) A modified Giemsa technique for identifying bean chromosomes. **J Heredity** 67:187-188
- Moscone EA, 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** 42:1224-1233
- Mozo T, Dewar K, Dunn P, Ecker JR, Fischert S, Kloska S, Lehrach H, Marra M, Martienssen R, Meier-Ewert S, Altmann T (1999) A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. **Nature Genet** 22:271-275
- Navratilova A, Neumann P, Macas J (2003) Karyotype analysis of four *Vicia* species using in situ hybridization with repetitive sequences. **Ann Bot** 91:921-926

- Neves N, Delgado M, Silva M, Caperta A, Morais-Cecílio L, Viegas W (2005) Ribosomal DNA heterochromatin in plants. **Cyt Gen Res** 109:104-111
- Nienhuis J, Tivang J, Skroch P (1995) Genetic Relationships among cultivars and landraces of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **J Amer Soc Hort Sci** 120:300-306
- Nodari RO, Tsai SM, Guzmán P, Gilbertson RL, Gepts P (1993) Towards an integrated linkage map of common bean. 3. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics** 134:341-350
- Paterson AH, Bowers JE, Burrow MD, Draye X, Elvik CG, Jiang C, Katsar CS, Lan TH, Lin YR, Ming R, Wright R (2000) Comparative Genomics of Plant Chromosomes. **The Plant Cell** 12:1523-1539
- Pedrosa A, Vallejos CE, Bachmair A, Schweizer D (2003) Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. **Theo Appl Genet** 106:205-212
- Pignone D, Cifarelli S, Perrino P (1990) Chromosome identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Cowpea Genetic Resources**, in press.
- Pignone D, Galasso I, Verona G (1995) Karyomorphological and heterochromatin similarities among four *Vigna* species. **Genet Res Crop Evol** 42:57-60
- Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004) Activity of the En/Spmlike transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. **Chromosome Res** 12:153-161
- Rezende FV, Santos JB, Ramalho MAP, Ferreira DF (2001) Agronomical Characters and Rapd Markers Associated with the Resistant allele to the *Erysiphe Polygoni* in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 1:11-21

- Sadder MT, Weber G (2002) Comparison between genetic and physical maps in *Zea mays* L. of molecular markers linked to resistance against *Diatraea* spp. **Theor Appl Genet** 104:908-915
- Serizawa N, Nasuda S, Shi F, Endo TR, Prodanovic S, Schubert I, Künzel G (2001) Deletion-based physical mapping of barley chromosome 7H. **Theor Appl Genet** 103:827-834
- Schweizer D, Ambros P (1979) Analysis of nucleolus organizer regions (NORs) in mitotic and polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by silver staining and Giemsa C-banding. *Plant Syst Evol* 132:27-51
- Singh SP, Gepts P, Debouck DG (1991) Races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). **Econ Bot** 45:379-396
- Tao Q, Chang YL, Wang J, Chen H, Islam-Faridi MN, Scheuring C, Wang B, Stelly DM, Zhang HB (2001) Bacterial artificial chromosome-based physical map of the rice genome constructed by restriction fingerprint analysis. **Genetics** 158:1711-1724
- Urrea C, Miklas P, Beaver J, Riley R (1996) A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. **J Amer Soc Hort Sci** 121:1035-1039
- Vallejos CE, Sakiyama NS, Chase CD (1992) A molecular markerbased linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics** 131:733–740
- Wortmann CS, Kirkby RA, Eledu CA, Allen DJ 1998 Atlas of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Production in Africa. CIAT, Cali, Colombia.
- Young R, Kelly J (1997) RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. **Crop Science** 37:940-946

- Yu Y, Tomkins JP, Waugh R, Frisch DA, Kudrna D, Kleinhofs A, Brueggeman RS, Muehlbauer GJ, Wise RP, Wing RA (2000) A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. **Theor Appl Genet** 101:1093-1099
- Yu ZH, Stall RE, Vallejos CE (1998) Detection of genes for resistance to common bacterial blight of beans. **Crop Science** 38: 1290-1296
- Zheng J, Nakata M, Irifune K, Tanaka R, Morikawa H (1993) Fluorescent banding pattern analysis of eight taxa of *Phaseolus* and *Vigna* in relation to their phylogenetic relationships. **Theor Appl Genet** 87:38-43
- Zheng J, Nakata M, Uchiyama H, Morikawa H, Tanaka R (1991) Giemsa C-banding in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. **Cytologia** 56:459-466
- Zhong XB, Bodeau J, Fransz PF, Williamson VM, Van Kammen A, De Jong JH, Zabel P (1999) 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
- Zoldos V, Papes D, Cerbah M, Panaud O, Besendorfer V, Siljak-Yakovlev S (1999) Molecular-Cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. **Theor Appl Genet** 99:969-977

**Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean
(*Phaseolus vulgaris* L.) evolution**

Artigo publicado na revista *Theoretical and Applied Genetics*

Andrea Pedrosa-Harand · Cícero C. Souza de Almeida
Magdalena Mosiolek · Matthew W. Blair
Dieter Schweizer · Marcelo Guerra

Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution

Received: 22 July 2005 / Accepted: 30 November 2005 / Published online: 6 January 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract The extent of 5S and 45S ribosomal DNA (rDNA) variation was investigated in wild and domesticated common beans (*Phaseolus vulgaris*) chosen to represent the known genetic diversity of the species. 5S and 45S rDNA probes were localized on mitotic chromosomes of 37 accessions by fluorescent in situ hybridization (FISH). The two 5S rDNA loci were largely conserved within the species, whereas a high variation in the number of 45S rDNA loci and changes in position of loci and number of repeats per locus were observed. Domesticated accessions from the Mesoamerican gene pool frequently had three 45S rDNA loci per haploid genome, and rarely four. Domesticated accessions from Andean gene pool, particularly from the race Peru, showed six, seven, eight or nine loci, but seven loci were found in all three races of this gene pool. Between three and eight loci were observed in accessions resulting from crosses between Andean and Mesoamerican genotypes. The presence of two to eight

45S rDNA loci in wild common beans from different geographic locations indicates that the 45S rDNA amplification observed in the Andean lineage took place before domestication. Our data suggest that ectopic recombination between terminal chromosomal regions might be the mechanism responsible for this variation.

Communicated by J. S. Heslop-Harrison

A. Pedrosa-Harand (✉) · D. Schweizer
Department of Chromosome Biology, University of Vienna,
1030 Vienna, Austria
E-mail: andrea.pedrosa.harand@univie.ac.at
Tel.: +43-1-427756251
Fax: +43-1-42779562

C. C. S. de Almeida · M. Guerra
Laboratory of Plant Cytogenetics, Department of Botany,
Federal University of Pernambuco,
50670-420 Recife, PE, Brazil

M. Mosiolek
Department of Plant Cytology and Embryology,
Institute of Botany, Jagiellonian University,
31-044 Krakow, Poland

M. Mosiolek · D. Schweizer
GMI—Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology,
1010 Vienna, Austria

M. W. Blair
CIAT—International Center for Tropical Agriculture,
6713 Cali, Colombia

Common bean (*Phaseolus vulgaris*, $2n=22$) is the world's most important grain legume for direct food consumption, especially in Latin America and Africa. Although little is known about its genomic organization, the evolution and domestication history of this species have been intensively studied over the last few years. *P. vulgaris* is thought to have originated in a region encompassing Ecuador and northern Peru (Kami et al. 1995), and dispersed both northwards and southwards establishing the Mesoamerican and Andean gene pools, respectively (reviewed in Gepts 1998). Independent domestication took place in each gene pool (Becerra Velasquez and Gepts 1994). Based on morphological, agroecological and molecular data, the resulting domesticated forms have been grouped into six or seven races (Singh et al. 1991; Beebe et al. 2000).

Molecular cytogenetic analysis in common bean has been restricted to a few genotypes. Using a combination of double FISH with 5S and 45S rDNA probes, chromosome morphology and heterochromatin distribution, ideograms of two European cultivars were established (Moscone et al. 1999). Later, the chromosomal and genetic maps of common bean were integrated by means of direct hybridization of pooled RFLP clones from the University of Florida map (Vallejos et al. 1992) to the mitotic chromosomes of two cultivars of the species (Pedrosa et al. 2003). The cultivars analyzed in these previous studies revealed a high degree of variation in the number and size of the 45S rDNA loci within the species. Based on this small, random sample, it has been suggested that a higher degree of amplification and

dispersion of 45S rDNA units in Andean beans has occurred in comparison to Mesoamerican beans (Pedrosa et al. 2003). However, the origin and extent of variation remained unclear.

Variation in the number of 5S and 45S rDNA loci among plant species of the same genus has frequently been reported (Melo and Guerra 2003; Marcon et al. 2005; Vaio et al. 2005). Fewer examples of variation among different accessions of the same species exist (Frello and Heslop-Harrison 2000; Hayasaki et al. 2001; Raskina et al. 2004b). This variation has led to the hypothesis that rDNA clusters are mobile, with different mechanisms believed to be responsible for this mobility (Schubert and Wobus 1985; Dubcovsky and Dvorak 1995). The high degree of variation observed in common bean, along with its well-documented genealogy, make common bean an ideal species for studying this phenomenon.

In the present work, the 5S and 45S rRNA gene loci have been chromosomally assigned by fluorescent in situ hybridization (FISH) in 37 wild and domesticated common bean accessions from different gene pools and of different geographical origins. Amplification in the number of 45S rDNA loci was confirmed in Andean, in contrast to Mesoamerican accessions. The possible mechanisms, as well as the establishment of this variation, are discussed.

Materials and methods

Plant material

All *P. vulgaris* accessions analyzed in this study are listed in Table 1. The material was chosen to represent the wide range of diversity present in the species, including cultivars from different gene pools and races, and wild forms from different geographical locations. Seeds from all samples were obtained from the germplasm banks of the Embrapa Arroz e Feijão, Brazil, and International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Colombia.

Chromosome preparation

Root tips obtained from germinating seeds were pre-treated in 2 mM 8-hydroxyquinoline for 5 h at 16°C or for 20–24 h at 10°C, fixed in ethanol/acetic acid 3:1 (v/v) and stored in fixative at –20°C for up to several weeks. For digestion of the cell wall, root tips were macerated in 2–3% (w/v) cellulase ‘Onozuka R-10’ (Serva) plus 20–30% (v/v) pectinase (Sigma-Aldrich) in 0.01 M citric acid–sodium citrate buffer pH 4.8 for 1–1.5 h at 37°C. Digested material was transferred to a drop of 45% acetic acid and flamed before squashing. One root tip was collected per seed and used per preparation; thus, each preparation corresponded to one individual.

DNA probes

R2, a 6.5-kb fragment of a 18S-5.8S-25S rDNA repeat unit from *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck et al. 1997), and D2, a 500-bp fragment of a 5S rRNA repeat unit from *Lotus japonicus* (Pedrosa et al. 2002), were used as probes. Probes were labeled by nick translation (Roche Diagnostics, Life Technologies) with biotin-14-dATP (Life Technologies), biotin-16-dUTP (Roche), digoxigenin-11-dUTP (Roche), Cy3-dUTP (Amersham Biosciences) or SpectrumGreen-dUTP (Vysis).

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Slides were selected and pre-treated as described in Pedrosa et al. (2001). Chromosome and probe denaturation, post-hybridization washes and detection were performed according to Heslop-Harrison et al. (1991), except for the stringent wash which was performed with 0.1× SSC at 42°C. Hybridization mixes consisted of: 50% (v/v) formamide, 10% (w/v) dextran sulphate, 2× SSC and 2–5 ng/μl probe. The slides were denatured for 5 min at 75°C and hybridized for up to 2 days at 37°C. Biotin-labeled probes were detected using ExtrAvidin-FITC conjugate (Sigma-Aldrich) or mouse anti-biotin in combination with anti-mouse-TRITC (Dako) in 1% (w/v) BSA. Digoxigenin-labeled probes were detected using sheep anti-digoxigenin-FITC (Roche) and amplified with anti-sheep-FITC (Dako), also in 1% (w/v) BSA. All preparations were counter-stained and mounted with 2 μg/ml DAPI in Vectashield (Vector).

Data analysis

Photographs were taken on a Zeiss Axioplan (Carl Zeiss) equipped with a mono cool view CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA) and the IPLab spectrum software (IPLab, Fairfax, USA) or on a DMLB Leica equipped with a Cohu CCD video camera and the Leica Qfish software. Digital images were imported into Adobe Photoshop version 8 for final processing.

The number of individuals and cells analyzed per sample is indicated in Table 1. For a subset of accessions, the intensity of the 5S and 45S rDNA signals on chromosomes 6 and 10 were scored as intense (+++), intermediate (++) and weak or very weak (+). Those chromosomes are easily identified by the presence of both rDNA loci at different positions (chromosomes 1 and 8, respectively, in Pedrosa et al. 2003). Chromosomes were renamed according to the linkage group names of the core linkage map of common bean (Freyre et al. 1998).

To test whether the difference in the number of 45S rDNA loci between the Andean and Mesoamerican accessions is significant, the non-parametric

Table 1 Common bean (*Phaseolus vulgaris*) accessions analyzed in this study, grouped by gene pool, race and type of material

	Gene pool ^a	Race	Type ^b	Accession name (code) ^c	Original source	Number of 45S rDNA loci
1	Andean	Chile	L	Coscorron (CNF07768, G4474)	Chile	7 (1, 19)
2			L	Tortolas (CNF07767, G4472)	Chile	7 (2, 7)
3		Nueva Granada	C	Jalo EEP558 (CNF04947)	Brazil/Minas Gerais	7 (2, 12)
4			L	Bagajo (CNF00733)	Brazil	7 (1, 9)
5		Peru	L	Jalo (CNF00746, G21953)	Brazil	7 (1, 8)
6			L	Cargamanto (G7231)	Colombia/Antioquia	8 (2, 7)
7			L	Cargamanto (G5702)	Colombia/Antioquia	8, 7 ^d (2, 14)
8			L	Chaucha Chuga (G19833)	Peru/Amazonas	7 (1, 13)
9			L	Mortiño (G12709)	Colombia/Nariño	7 (1, 10)
10			L	Nuña Mani (G12572)	Peru/Cajamarca	9 (3, 16)
11			L	Overitos (CNF07634)	Argentina	6 (4, 22)
12	Colombian	–	W	DGD-629 (G19892)	Argentina/Salta	8 (1, 11)
13		–	W	Pajarito (G24404)	Colombia/Cundinamarca	3, 2 ^d (4, 30)
14		–	W	Pajarito (G24423)	Colombia/Cundinamarca	5 (1, 11)
15	Mesoamerican	Durango	C	Pinto UI 114 (CNF05645)	USA	3 (1, 4)
16			L	Bayo (CNF07770, G10948)	Mexico/Zacatecas	3 (1, 11)
17		Jalisco	L	Conejo (CNF07772, G22029)	Mexico	3 (1, 7)
18			L	Flor de Mayo (CNF01736, G5897)	Mexico	3 (1, 16)
19		Mesoamerica	L	Apetito (CNF01217)	Mexico	4 (2, 13)
20			C	Jamapa (G3645)	Mexico/Veracruz	4 (2, 11)
21			L	36 Sal Rico de Minas Gerais (CNF10356, G4206)	Brazil/Minas Gerais	3 (3, 32)
22			L	Porriño (CNF00491)		3 (1, 5)
23		Mesoamerica/Durango	C	BAT93 (CNF04916)	Colombia/CIAT	3 (3, 21)
24		Mesoamerica/?	C	DOR 364 (CNF06761)	Colombia/CIAT	3 (2, 5)
25	+ <i>P.c.</i> ^e	–	C	XR-235-1-1	USA	4 (3, 8)
26		–	W	JSG & MAS-262 (G24390)	Mexico/Nayarit	4 (2, 7)
27	Northern Andean	–	W	Frijol de Pichon (G23585)	Peru/Cajamarca	4, 3 ^d (4, 15)
28	Andean + Mesoamerican	–	L	Boyaca 82 (G7257)	Colombia/Boyaca	5 (1, 12)
29	Andean × Mesoamerican	–	L	Cargamanto (CNF08759, G4658)	Colombia/Huila	3 (2, 21)
30			L	Criollo (G19142B)	Colombia/Cundinamarca	3 (1, 11)
31			L	Culateño (G7229)	Colombia/Caldas	8 (3, 8)
32			L	Revoltura (G7317)	Colombia/Antioquia	8 (3, 12)
33			L	X-15943 (G7381)	Colombia/Cauca	8 (1, 14)
34			RIL	BAT93 × Jalo EEP 558 (BJ 56)	USA/UC-Davis	3 (1, 7)
35			RIL	BAT93 × Jalo EEP558 (BJ 63)	USA/UC-Davis	6 (2, 11)
36			RIL	DOR364 × G19833 (D × G-Trat 3)	Colombia/CIAT	4 (1, 9)
37			RIL	DOR364 × G19833 (D × G-Trat 4)	Colombia/CIAT	6 (2, 12)

Code in the germplasm bank, as well as country and state of origin (when available) are also indicated. The number of 45S rDNA loci observed per haploid genomes and the number of individuals and somatic metaphases analyzed per sample, in parentheses, respectively, are given

^aGene pools were designated according to Tohme et al. (1996), except that the Southern Andean gene pool is here called Andean. Andean + Mesoamerican represents Andean accessions with Mesoamerican introgression. Andean × Mesoamerican represents crosses between Andean and Mesoamerican accessions followed by selfing

^bTypes: *C* commercial variety, *L* landrace, *RIL* recombinant inbred line, *W* wild form

^cMaterial with CNF code (and G code when available) were obtained from Embrapa Arroz e Feijão, Brazil, whereas accessions with G code only, as well as Andean × Mesoamerican accessions, were obtained directly from CIAT, Colombia. *P. vulgaris* cv XR-235-1-1 was obtained from C. E. Vallejos (Vallejos et al. 1992)

^dSecond number was observed in a subset of analyzed individuals

^eMesoamerican accession with *P. coccineus* introgression

Mann–Whitney test was performed (<http://www.faculty.vassar.edu/lowry/utest.html>). ‘Cargamanto’ G5702 was considered twice (both numbers of 45S rDNA loci). ‘Frijol de Pichon’, ‘Pajarito’ G24404, ‘Pajarito’ G24423, ‘XR-235-1-1’ as well as the introgressed and hybrid accessions were excluded from this calculation.

Results

In order to evaluate the degree of variation in the number and position of the 45S rDNA loci in common bean, this gene family was first localized by FISH in

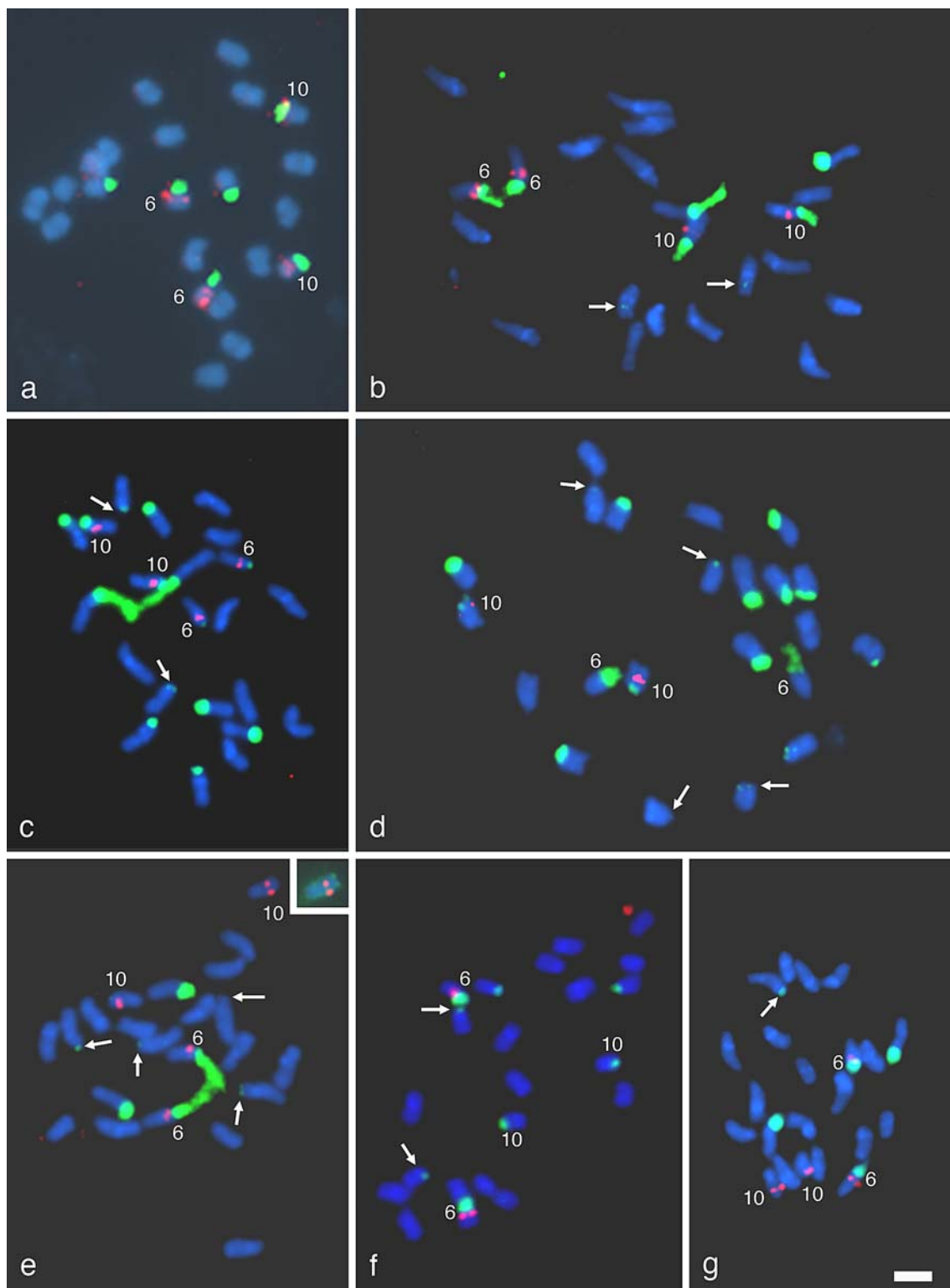


Fig. 1 Localization of 5S (red) and 45S (green) rDNA probes on *P. vulgaris* chromosomes. Chromosomes 6 and 10 were numbered according to similarity to the 'Calima' ideogram (see Fig. 3). **a** 'Pinto UI 114'. **b** 'Jamapa'. **c** 'Jalo EEP558'. **d** 'Nuña Mani'. **e** 'Pajarito' G24423. *Insert* shows upper chromosome 10, with a

lower contrast, with very weak green signals. **f** 'Frijol de Pichon'. **g** 'Pajarito' G24404. Note that only five 45S rDNA signals are present. *Arrows* indicate weak signals on chromosomes other than 6 and 10. *Bar* in **g** = 2.5 μ m

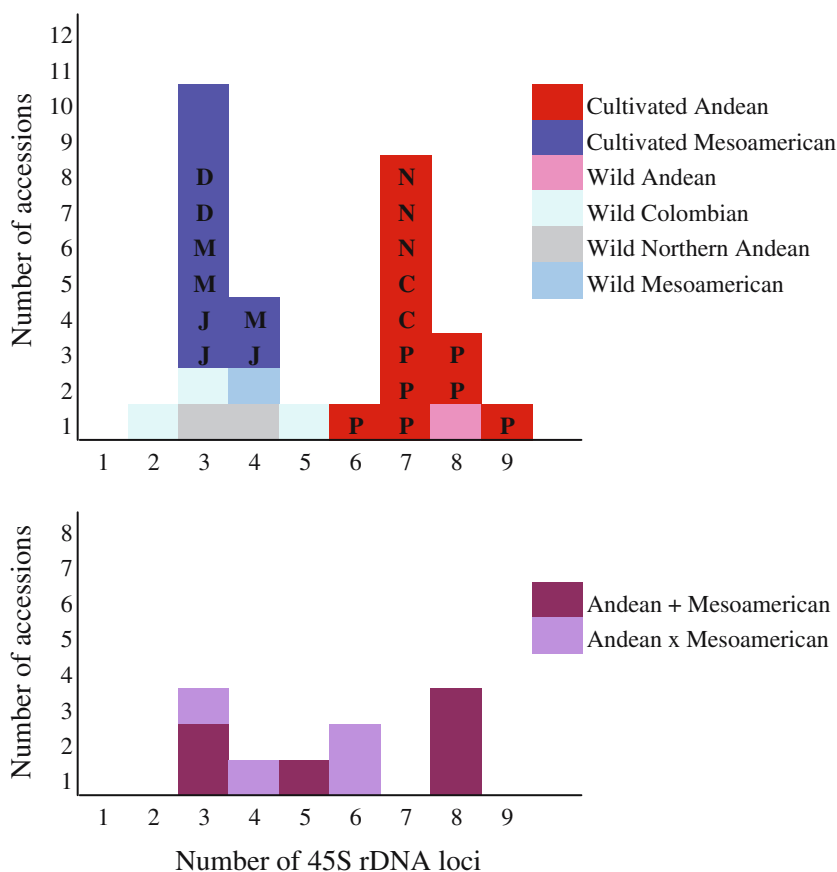
domesticated accessions of different races of each gene pool. The 5S rDNA probe was included to confirm its conserved status in a larger sample and for aiding chromosome identification. The observed number of 45S rDNA loci is summarized in Table 1, where accessions were ordered by gene pool and race and numbered for reference. In the Mesoamerican gene pool, two accessions from the race Durango, three from the race Jalisco and three from the race Mesoamerica, as well as two other cultivars from the Mesoamerican gene pool which originated from crosses of genotypes from different races, showed a low number of 45S rDNA loci, mostly three loci per haploid genome (Figs. 1a, 2; Table 1). A fourth, very weak, 45S rDNA locus was observed in two of those accessions: ‘Apetito’ (number #19 in Table 1) from the race Durango, and ‘Jamapa’ (#20) from the race Mesoamerica. ‘Jamapa’ was previously reported as bearing three 45S rDNA loci (Pedrosa et al. 2003), but an additional locus was observed in most of the analyzed cells in two individuals (Fig. 1b). Four loci were also observed in ‘XR-235-1-1’ (#25), a Mesoamerican breeding line that carries some chromosome segments from *P. coccineus* (Vallejos et al. 1992). These results suggest that three is the most common number of loci for representatives of the Mesoamerican gene pool, with one additional locus appearing, probably independently, in some accessions (Fig. 2).

Among the samples from the Andean gene pool, three accessions from the race Nueva Granada, six from

the race Peru and two from the race Chile exhibited six, seven, eight or nine 45S rDNA loci, seven being the most common number (Figs. 1c, 2). Eight loci were present in two accessions of race Peru, although only seven loci were observed in a second individual of one of those accessions (‘Cargamanto’ G5702, #7). Nine loci were observed in one nuña or popping bean accession of Peru (‘Nuña Mani’, #10, Fig. 1d) and in one previously analyzed accession of the race Nueva Granada (‘Calima’). Each of these 45S rDNA loci was located on a different chromosome, except for the nine loci observed in ‘Calima’, which were distributed over eight chromosomes (Pedrosa et al. 2003). Six loci were found in a single accession from the race Peru (‘Overitos’, #11). Since little information is available on this accession, it is necessary to consider the possibility that it is not a pure race Peru accession.

Indeed, five accessions we studied from Colombia were previously considered to belong to the Andean gene pool but were recently demonstrated to be Andean accessions with Mesoamerican introgressions based on molecular and morphological attributes (Amirul Islam et al. 2004). These accessions are indicated in Table 1 as Andean + Mesoamerican, as is one of the samples of ‘Cargamanto’ (G4658, #29), which is considered to contain Mesoamerican introgression based on morphological seed characters. It should be noted that ‘Cargamanto’ G4658 only has three 45S rDNA loci, while two other samples of ‘Cargamanto’ (G7231 and

Fig. 2 Distribution of the analyzed accessions according to their number of 45S rDNA loci. *Upper panel* different gene pools and types, as presented in Table 1. Races are indicated as: C Chile, D Durango, J Jalisco, M Mesoamerica, N Nueva Granada, P Peru. *Lower panel* hybrids between both gene pools (*Andean* + *Mesoamerica* Andean accession with Mesoamerican introgression; *Andean* × *Mesoamerica* cross between Andean and Mesoamerican accessions followed by selfing). Accessions that showed inter-individual variation (‘Pajarito’ G24404, ‘Frijol de Pichon’ and ‘Cargamanto’ G5702) have been represented twice



G5702, #6 and #7, respectively) have eight loci. The other introgressed Andean + Mesoamerican accessions included in this study revealed three, five or eight 45S rDNA loci, possibly due to different degrees of introgression (Fig. 2). ‘Criollo’ (#30, three loci) and ‘Boyaca 82’ (#28, five loci) have smaller and darker seeds (more common in Mesoamerican beans) than ‘Culateño’, ‘Revoltura’ and ‘X-15943’, which bear eight loci each (#31, #32 and #33, respectively).

To test the possible correlation between the high degree of Mesoamerican introgression and a lower number of 45S rDNA loci, we analyzed recombinant inbred lines from two different crosses between Mesoamerican (three loci) and Andean (seven loci) accessions: ‘BAT93’ (#23) × ‘Jalo EEP558’ (#3) and ‘DOR 364’

(#24) × ‘Chaucha Chuga’ G19833 (#8). For the four lines analyzed, we observed three and four loci in two lines (#34 and #36, respectively) and six loci in two other lines (#35 and #37), numbers that are intermediate between the numbers of loci of the parental accessions (Fig. 2). No general correlation between a lower number of 45S rDNA loci and a higher proportion of Mesoamerican alleles at microsatellite loci (Blair et al. 2003) was observed. Nevertheless, there is apparently no strong bias towards having more or less 45S rDNA loci in the genome.

To find out whether the variation in the number of 45S rDNA loci between Mesoamerican and Andean accessions occurred before or after the domestication process, five wild common bean accessions were also

Fig. 3 Signal intensity variability of 5S (grey) and 45S (black) rDNA sites on chromosomes 6 (previously named chromosome 1) and 10 (previously named chromosome 8) of different common bean accessions. Chromosomes were identified by comparison to the ‘Calima’ ideogram (Pedrosa et al. 2003). Except for the standard accession ‘Calima’, accessions were ordered according to Table 1. Number of ‘+’ sign represents relative intensity of signals. (+) indicates very weak signals not visible in all cells and individuals. Intra-accession variation in ‘Frijol de Pichon’ is depicted

Accession name (code)	Chromosome	
	6	10
Calima	(1) 	(8) 
Coscorron (CNF07768)	++ / ++	++ / +
Mortiño (G12709)	+ / ++	++ / +
Nuña Mani (G12572)	+ / ++	++ / +
DGD-629 (G19892)	+ / ++	++ / +
Pajarito (G24404)	++ / +++	++ /
Pajarito (G24423)	++ / +++	++ / (+)
Pinto UI 114 (CNF 05645)	++ / ++	++ / ++
Bayo (CNF07770)	++ / ++	+ / ++
Flor de Mayo (CNF01736)	++ / ++	+ / ++
Jamapa (G3645)	++ / ++	++ / ++
36 Sal Rico de Minas Gerais (CNF10356)	++ / ++	++ / ++
BAT93 (CNF 04916)	++ / (+)	++ / +++
XR-235-1-1	++ / +	++ / +++
JSG & MAS-262 (G24390)	++ / +++	++ / ++
Frijol de Pichon (G23585)	+++ / +++	+ / ++
	+++ / +	+ / ++

analyzed, one of them ('Frijol de Pichon', #27) being considered an ancestral-like accession, because it has the ancestral I phaseolin type (Kami et al. 1995; Chácon et al. 2005). A Mexican wild bean ('JSG & MAS-262', #26) had four 45S rDNA loci. One Colombian accession ('Pajarito' G24404, #13) had two or three loci, whereas another ('Pajarito' G24423, #14) had five, with one weak and two very weak sites (Fig. 1e). The Colombian wild beans used to be placed in the Mesoamerican gene pool (Koenig and Gepts 1989; Becerra Velasquez and Gepts 1994) but they were shown to be genetically distant from the other Mesoamerican wild beans and may represent an independent gene pool (Tohme et al. 1996). An Andean Argentinean accession ('DGD-629', #12) showed eight loci, one of them being very weak and not always detectable. In the Peruvian accession ('Frijol de Pichon', #27), the putative ancestral-like type belonging to the Northern Andean gene pool, three or four loci were detected (Fig. 1f). It is interesting to note that out of the three wild accessions with two or more individuals analyzed, two accessions showed variation in the number of loci between individuals. Also surprising was the presence of an apparently heterozygous individual in one of the two samples of 'Pajarito' (G24404, #13), with five chromosomes bearing 45S rDNA signals in the diploid complement (Fig. 1g). Common bean is considered to be a predominantly self-pollinating species, although gene flow involving wild populations has been reported (Tohme et al. 1996; Papa and Gepts 2003). This heterozygosity strongly indicates that individuals with four and six loci in the diploid complement occur within the same 'Pajarito' G24404 wild population. Altogether, this data set indicates a high degree of variation among wild bean forms, supporting the hypothesis of amplification in the number of loci in the Andean lineage prior to domestication.

Besides the difference in the number of 45S rDNA loci among accessions, the intensity or size of the signals also seemed to vary. In order to confirm this observation, chromosomes 6 and 10, which can easily be identified by the additional presence of a 5S rDNA locus, were analyzed in more detail in a subset of the accessions (Fig. 3). Differences in the relative intensity of signals were only indicated when they could be consistently observed. It is possible to state that the same locus may have a different number of repeats in different accessions (compare, for example, the signal intensity for chromosome 10 in Figs. 1a, d, e, 3), or even in different individuals of the same accession, as observed in chromosome 6 of 'Frijol de Pichon' (#27, Fig. 3). Accessions with a similar number of loci may also vary in terms of the number of repeats in a locus. The number of 45S rDNA loci in the chromosomes of 'BAT93' (#23) and '36 Sal Rico de Minas Gerais' (#21), for example, was always three, but the intensity of the signals in chromosomes 6 and 10 was very distinct (Fig. 3). Variation in the position of a locus along the chromosome was only observed in 'Jamapa' (#20), which had a weak interstitial signal on one chromosome pair (Fig. 1b). All

other 45S rDNA loci were observed at terminal positions (see Fig. 1).

In contrast to the 45S rDNA, two 5S rDNA loci at proximal and interstitial positions on chromosomes 6 and 10, respectively, were observed in all accessions analyzed. Variation in the relative intensity of signals was, however, observed in at least five accessions of Andean and Mesoamerican origin, as well as in the ancestor-like wild accession, 'Frijol de Pichon' (#27, see Figs. 1f, 3).

Discussion

The localization of the 5S and 45S rRNA genes in 37 accessions of common bean confirmed the high degree of variation observed for the 45S rDNA (from two to nine 45S rDNA-bearing chromosomes) and the conserved status of the 5S rDNA previously detected in a few cultivars of the species (Moscone et al. 1999; Pedrosa et al. 2003). A major, highly-significant ($P < 0.0001$) difference in the number of 45S rDNA loci was observed between the Andean and the Mesoamerican gene pools, with Andean beans having usually seven, sometimes eight, and rarely six or nine loci, and Mesoamerican accessions having three, or rarely four 45S rDNA clusters. Changes in the 45S rDNA independent of similar changes in the 5S rDNA loci have previously been observed in other plant groups, suggesting that each tandemly-repeated sequence has its own evolutionary fate (Hanson et al. 1996; Adams et al. 2000). Although intraspecific variation in the number of 45S rDNA loci seems not to be rare in plants (Schubert and Wobus 1985; Shishido et al. 2000; Hayasaki et al. 2001; Raskina et al. 2004b), we are not aware of any example of more than a fourfold variation in the number of 45S rDNA loci within a species, as we observed in common bean. Moreover, variation in the number of 45S rDNA loci was sometimes observed among individuals of the same accession.

Mechanisms of rDNA variation

The inter- and intraspecific variation in the position of 5S and 45S rDNA loci has been attributed to at least three different mechanisms: (1) amplification of satellite DNA may differentially alter chromosome morphology without changing the order of other sequences (Navratilova et al. 2003); (2) structural chromosomal rearrangements, such as translocations, were demonstrated to apparently change the position of rDNA loci in *Lotus japonicus* (Hayashi et al. 2001); (3) dispersion of rDNA repeats, amplification of the new minor loci and deletion of original major loci is believed to be the mechanism by which rDNA loci repeatedly changed position during radiation of Triticeae species, without changing the colinearity of other markers (Dubcovsky and Dvorak 1995). How exactly the dispersion step would occur is not clear, but this mechanism could also

explain the change in number of rDNA loci and the dispersion of other heterochromatic sequences through a genome. Dubcovsky and Dvorak (1995) seem to favor the hypothesis of intrachromosomal recombination and insertion of a circular intermediate into a new locus, but recent studies in *Aegilops* suggest that the movement of rDNA may be mediated by *En/Spm*-like transposons (Raskina et al. 2004a, b).

Although the ‘dispersion-amplification-deletion’ model has been suggested to be the single mechanism for explaining variation in the number of rDNA loci (Dubcovsky and Dvorak 1995), this variation may also be explained by ectopic (interlocus) recombination. Interlocus unequal crossing over has been proposed to play a role in concerted evolution, especially among terminal 45S rDNA loci (Arnheim et al. 1980; Wendel et al. 1995). Furthermore, it has been argued that it could account for changes in sizes of 45S rDNA loci and that species with terminal 45S rDNA sites would show a greater degree of concerted evolution, a higher number of loci, and more variability in locus number and size between and within species than species with interstitial loci (Hanson et al. 1996). Results from *Avena agadiriana* (Hayasaka et al. 2001), *Aegilops speltoides* (Raskina et al. 2004b), *Aloe* (Adams et al. 2000), *Paeonia* (Zhang and Sang 1999), as well as our present data, agree with these predictions, further supporting the role of interlocus unequal crossing over in terminal rDNA variability.

The terminal position of the rDNA loci is an important condition in this model because it allows frequent rearrangement to occur, without disrupting other gene linkages in the cell (Hanson et al. 1996). Studies in Asparagales have suggested that lack of the *Arabidopsis*-type telomeric sequence was also an important factor (Pich et al. 1996; Adams et al. 2000), but the extremely high degree of variation observed in common bean, despite the presence of the *Arabidopsis*-type telomeric sequence (Guerra and Kenton 1996), demonstrate that this is not necessary. Instead, what may be necessary but possibly not sufficient, is the presence of other classes of repetitive sequences, such as satellite DNA, in the chromosome ends involved. The presence of such sequences would enable homologous recombination to take place between these non-allelic sites, in a similar way as proposed for concerted evolution. If this ectopic recombination occurs between a chromosome end that bears a distal rDNA site and another end that does not have one, a new rDNA locus could be generated. Subtelomeric repeats were detected in most common bean chromosome arms (Sonnante et al. 1994; A. Pedrosa-Harand, unpublished results) and several other plant species (Sharma and Raina 2005).

Differential 45S rDNA amplification in common bean

The detailed analysis of the variation in the 45S rDNA locus in common bean has revealed how this variation has developed during the evolutionary history of this

species. In agreement with the low number of loci (1–3) observed in the closely-related *Phaseolus* species (Zheng et al. 1994; Guerra et al. 1996; Moscone et al. 1999), the ancestral-like wild bean accession investigated here showed three or four 45S rDNA sites. It is likely, therefore, that three was the ancestral number of 45S rDNA loci in this species and that these loci were homologous to the three loci observed in *P. coccineus*, the closest related species to common bean (Delgado-Salinas et al. 1999; Moscone et al. 1999). The synteny of 5S and 45S rDNA loci in two of these three chromosomes (chromosomes 6 and 10) in both species further reinforces these chromosome homeologies. Wild common bean dispersion towards north and south from its putative center of origin in Peru/Ecuador seems to have been accompanied by amplification of 45S rDNA sites mainly in the Andean gene pool.

It is clear, however, that the variation in the number of 45S rDNA loci is a result of various independent amplifications, as indicated by rare occurrence of a higher number of loci in single accessions of different races, both in the Andean and Mesoamerican gene pools (Jalisco, Mesoamerica, Nueva Granada and Peru). Similarly, variation in the number of loci among individuals of the same accession indicates that increase, but possibly also reduction, in the number of loci is still taking place. Reduction in the number of repeats and probably the total elimination of a locus are likely to have occurred, at least for chromosome 10 of ‘Pajarito’ G24404. Nevertheless, the most parsimonious hypothesis still predicts that a major amplification event happened in the Andean lineage after its separation from the Mesoamerican lineage, in agreement with the evolutionary model proposed for the species (Kami et al. 1995; Tohme et al. 1996). High variation among wild bean forms, especially the presence of eight loci in the Andean wild accession ‘DGD-629’, from the southern end of its distribution where domestication has been postulated to have had occurred (Beebe et al. 2001; Chácon et al. 2005), suggests that amplification happened before domestication.

The process of domestication in common bean is still a matter of debate, although it is generally accepted that independent domestications took place in the Andean and Mesoamerican gene pools (Becerra Velasquez and Gepts 1994). Some pieces of evidence support single domestication events, while others support multiple domestications in each gene pool. A recent study comprising a large number of accessions from both gene pools indicates that Mesoamerican landraces are the result of multiple domestications or single domestication followed by hybridization to wild populations, while Andean landraces were derived from a single event (Chácon et al. 2005). The small number of wild bean samples investigated in the present study does not allow us to support any specific scenario. It is interesting to note, however, that the Mexican wild accession investigated has four 45S rDNA loci, while the majority of cultivars of the Mesoamerican gene pool only have three

sites. In the Andean gene pool, variation in the number of 45S rDNA loci was observed even within a race, but seven loci were present in accessions of all races, suggesting that this is possibly the number of loci present in the wild common bean that was domesticated in this region. Considering the gradual amplification hypothesis and the high degree of variation in the number of loci observed among wild common bean accessions in the present day, it is possible that the whole range of variation would be detected among Andean wild beans if more samples were to be analyzed. If this were true, an additional indication of the place where Andean domestication took place could be obtained. However, we cannot exclude the possibility that present-day wild beans have not maintained the number of 45S rDNA loci that was present at the time of domestication.

The most intriguing point in the variation observed in common bean, is that it is very pronounced in Andean lineages of the species, but relatively limited in the Mesoamerican gene pool. This does not correlate with a general higher genetic variability in the Andean lineage, since the Andean gene pool is postulated to have a narrower genetic base than the Mesoamerican gene pool (Koenig and Gepts 1989; Beebe et al. 2000; Beebe et al. 2001). If we consider that both elimination and amplification are probably the result of the same mechanism discussed above, the accumulation of rDNA repeats in the Andean lineage may have occurred either due to genetic drift or natural selection, which shifted the equilibrium towards accumulation of repeats exclusively in this group.

Acknowledgements A.P.-H. was partially supported by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, and by the Hertha-Firnberg program from the Austrian Science Fund (FWF) on behalf of the Federal Ministry for Education, Science and Culture (BMBWK), Austria. C.C.S.A. was supported by a grant from CNPq, Brazil. The work was partially supported by a grant to D.S. from the Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology (GMI), Austria.

References

- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW, Leitch AR (2000) Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *Am J Bot* 87:1578–1583
- Amirul Islam FM, Beebe S, Munoz M, Tohme J, Redden RJ, Basford KE (2004) Using molecular markers to assess the effect of introgression on quantitative attributes of common bean in the Andean gene pool. *Theor Appl Genet* 108:243–252
- Arnheim N, Krystal M, Schmickel R, Wilson G, Ryder O, Zimmer E (1980) Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non-homologous chromosomes in man and apes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7323–7327
- Becerra Velasquez VL, Gepts P (1994) RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. *Genome* 37:256–263
- Beebe S, Skroch PW, Tohme J, Duque MC, Pedraza F, Nienhuis J (2000) Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Sci* 40:264–273
- Beebe S, Rengifo J, Gaitán E, Duque MC, Tohme J (2001) Diversity and origin of Andean landraces of common bean. *Crop Sci* 41:854–862
- Blair MW, Pedraza F, Buendia HF, Gaitán-Solis E, Beebe SE, Gepts P, Tohme J (2003) Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 107:1362–1374
- Chácon MI, Pickersgill SB, Debouck DG (2005) Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theor Appl Genet* 110:432–444
- Delgado-Salinas A, Turley T, Richman A, Lavin M (1999) Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Syst Bot* 24:438–460
- Dubcovsky J, Dvorak J (1995) Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes. *Genetics* 140:1367–1377
- Frello S, Heslop-Harrison JS (2000) Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (Iridaceae) investigated by in situ hybridization of rDNA and tandemly repeated sequence. *Ann Bot* 86:317–322
- Freyre R, Skroch PW, Geffroy V, Adam-Blondon A-F, Shirmohamadi A, Johnson WC, Llaca V, Nodari RO, Pereira PA, Tsai S-M, Tohme J, Dron M, Nienhuis J, Vallejos CE, Gepts P (1998) Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theor Appl Genet* 97:847–856
- Gepts P (1998) Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *HortScience* 33:1124–1130
- Guerra M, Kenton A (1996) Distribution of telomere DNA in mitotic and polytene nuclei of the anther tapetum of a tetraploid hybrid bean *Phaseolus vulgaris* × *P. acutifolius*. *Brazil J Genet* 19:313–318
- Guerra M, Kenton A, Bennett M (1996) rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by in situ hybridization. *Ann Bot* 78:157–161
- Hanson RE, Islam-Faridi MN, Percival EA, Crane CF, Ji Y, McKnight TD, Stelly DM, Price HJ (1996) Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105:55–61
- Hayasaki M, Morikawa T, Leggett JM (2001) Intraspecific variation of 18S-5.8S-26S rDNA sites revealed by FISH and RFLP in wild oat, *Avena agadiriana*. *Genes Genet Syst* 76:9–14
- Hayashi M, Miyahara A, Sato S, Kato T, Yoshikawa M, Taketa M, Hayashi M, Pedrosa A, Onda R, Imaizumi-Anraku H, Bachmair A, Sandal N, Stougaard J, Murooka Y, Tabata S, Kawasaki S, Kawaguchi M, Harada K (2001) Construction of a genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* using an intraspecific F2 population. *DNA Res* 8:301–310
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Anamthawat-Jónsson K, Leitch AR, Shi M, Leitch IJ (1991) In situ hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3:109–115
- Kami J, Becerra Velasquez V, Debouck DG, Gepts P (1995) Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1101–1104
- Koenig R, Gepts P (1989) Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theor Appl Genet* 78:809–817
- Marcon AB, Barros IC, Guerra M (2005) Variation in chromosome numbers, CMA bands and 45S rDNA sites in species of *Selaginella* (Pteridophyta). *Ann Bot* 95:271–276
- Melo NF, Guerra M (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Ann Bot* 92:309–316
- Moscone EA, 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* 42:1224–1233

- Navratilova A, Neumann P, Macas J (2003) Karyotype analysis of four *Vicia* species using in situ hybridization with repetitive sequences. *Ann Bot* 91:921–926
- Papa R, Gepts P (2003) Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theor Appl Genet* 106:239–250
- Pedrosa A, Jantsch MF, Moscone EA, Ambros PF, Schweizer D (2001) Characterisation of pericentromeric and sticky intercalary heterochromatin in *Ornithogalum longibracteatum* (Hyacinthaceae). *Chromosoma* 110:203–213
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661–1672
- Pedrosa A, Vallejos CE, Bachmair A, Schweizer D (2003) Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Theor Appl Genet* 106:205–212
- Pich U, Fuchs J, Schubert I (1996) How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Res* 4:207–213
- Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004a) Activity of the *En/Spm*-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. *Chromosome Res* 12:153–161
- Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004b) Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14818–14823
- Schubert I, Wobus U (1985) In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92:143–148
- Sharma S, Raina SN (2005) Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 109:15–26
- Shishido R, Sano Y, Fukui K (2000) Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. *Mol Gen Genet* 263:586–591
- Singh SP, Gepts P, Debouck DG (1991) Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ Bot* 45:379–396
- Sonnante G, Stockton T, Nodari RO, Becerra Velásquez VL, Gepts P (1994) Evolution of genetic diversity during the domestication of common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 89:629–635
- Tohme J, González DO, Beebe S, Duque MC (1996) AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sci* 36:1375–1384
- Vaio M, Speranza P, Valls JF, Guerra M, Mazzella C (2005) Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Ann Bot*. DOI 10.1093/aob/mci168
- Vallejos CE, Sakiyama NS, Chase CD (1992) A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131:733–740
- 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*. *Plant J* 11:1007–1016
- Wendel JF, Schnabel A, Seelanan T (1995) Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc Natl Acad Sci USA* 92:280–284
- Zhang D, Sang T (1999) Physical mapping of ribosomal RNA genes in the peonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent in situ hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution. *Am J Bot* 86:735–740
- Zheng J, Irifune K, Hirai K, Nakata M, Tanaka R, Morikawa H (1994) In situ hybridization to metaphase chromosomes in six species of *Phaseolus* and *Vigna* using ribosomal DNA as the probe. *J Plant Res* 107:365–369

Citogenética comparada de duas espécies de *Phaseolus*:

***P. lunatus* L. e *P. vulgaris* L.**

Artigo a ser submetido à revista *Theoretical and Applied Genetics*

Citogenética comparada de duas espécies de *Phaseolus*: *P. lunatus* L. e *P. vulgaris* L.

Cícero Carlos de Souza Almeida¹, Valérie Geffroy², Marcelo Guerra³, Andrea Pedrosa-Harand³

¹Campus Arapiraca-Viçosa, Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, Brasil

²Institut de Biotechnologie des Plantes, Université Paris Sud, Orsay, França

³Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

Para correspondência: Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, Rua Nelson Chaves s/n, 50670-420. Tel 55 812126-8846. Fax 55 812126-8348. E-mail: adcpedrosa@uol.com.br

Resumo

A heterocromatina do gênero *Phaseolus* está distribuída na região pericentromérica dos cromossomos, no entanto, para *P. lunatus* não está claro qual a sua distribuição. Além disso, *Phaseolus vulgaris* possui dois sítios de DNAr 5S, situados nos cromossomos 6 e 10. Para o DNAr 45S, três sítios é o menor número encontrado, situados nos cromossomos 6, 9 e 10. Por outro lado, *P. lunatus* possui apenas um sítio de DNAr 5S e um de DNAr 45S em cromossomos diferentes. O objetivo deste trabalho foi localizar a heterocromatina em *P. lunatus* e analisar a homeologia entre os cromossomos de *P. lunatus* e *P. vulgaris* que contêm sítios de DNAr 5S e 45S. A heterocromatina foi localizada na região pericentromérica dos cromossomos de *P. lunatus*. O cromossomo de *P. lunatus* com sítio de DNAr 45S é homeólogo ao cromossomo 6 de *P. vulgaris*. Para o cromossomo com sítio de DNAr 5S, o cromossomo 10 é o homeólogo entre as espécies. Os resultados sugerem que os sítios de DNAr 5S no cromossomo 10 e de DNAr 45S no cromossomo 6 sejam ancestrais no grupo. O sítio de DNAr 5S do cromossomo 10 de *P. vulgaris* está localizado no braço longo, enquanto que em *P. lunatus* está presente no braço curto, sugerindo a ocorrência de uma inversão pericêntrica.

Palavras-chave: *Phaseolus*, heterocromatina, DNAr, FISH, evolução

Introdução

Phaseolus vulgaris L. (feijão comum) e *P. lunatus* L. (fava) são as espécies de maior importância econômica do gênero *Phaseolus*, devido ao elevado conteúdo protéico de seus grãos e por serem componentes básicos da dieta de países da América Latina e da África (Maquet et al. 1997).

A origem, evolução e distribuição de *P. lunatus* têm sido estudadas através de marcadores morfológicos, bioquímicos e genéticos (Fofana et al. 1999; 2001; Lioi et al. 1999; 2002; Maquet et al. 1997; Nienhuis et al. 1995). Estes trabalhos têm indicado que a domesticação da espécie ocorreu independentemente em duas regiões: Mesoamericana e Andina. A região Mesoamericana compreende uma área que vai do México a Guatemala, se estendendo por algumas ilhas do Caribe e algumas localidades no Panamá. Acessos desse grupo são também encontrados na Colômbia, Brasil e norte da Argentina. O grupo Andino se restringe às regiões dos Andes, ocorrendo do norte do Peru até o Equador e em algumas regiões do Chile e Bolívia (Debouck et al. 1987; Lioi et al. 1998; Fofana et al. 2001). Este padrão de domesticação em duas regiões independentes coincide com o padrão descrito para *P. vulgaris* (revisado por Gepts 1998).

Estudos citogenéticos em *Phaseolus* têm revelado uma alta similaridade cariotípica entre as espécies, apresentando número cromossômico $2n=22$ com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. A heterocromatina constitutiva, analisada através de bandeamento C em *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. calcaratus* e *P. angulares*, está preferencialmente localizada nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos, parecendo ser essa uma distribuição característica do gênero (Mok e Mok 1976; Schweizer e Ambros 1976; Zheng et al. 1991; Moscone et al. 1999). Contudo, em *P. lunatus* existe relato de que os blocos de

banda C estão localizados nas regiões teloméricas dos cromossomos (Moscone et al. 1999), não estando claro qual o padrão da heterocromatina em *P. lunatus*. Zheng et al. (1993) observaram, através da coloração com CMA/DAPI em cinco espécies de *Phaseolus* (*P. angularis*, *P. aureus*, *P. coccineus*, *P. calacratius* e *P. vulgaris*), que os blocos CMA⁺ co-localizavam com as bandas C, sugerindo que a heterocromatina dessas espécies é rica em GC.

Apesar desta aparente estabilidade cariotípica, a análise da distribuição dos sítios de DNAr 45S em vários acessos de *P. vulgaris* revelou uma ampla variação entre acessos (Moscone et al. 1999; Pedrosa et al. 2003; 2006). Nos acessos Andinos, foram observados de seis a nove sítios de DNAr 45S, enquanto nos Mesoamericanos foram encontradas de três a quatro sítios. Os sítios de DNAr 45S localizados nos cromossomos 6, 9 e 10 foram considerados como os prováveis sítios originais dessa espécie, por estarem presentes na maioria dos acessos (Pedrosa-Harand et al. 2006). Neste mesmo trabalho, o número de sítios de DNAr 5S observado foi constante, estando presente dois sítios, nos cromossomos 6 e 10. Por outro lado, análise de um acesso de *P. lunatus*, observou apenas um par de sítios de DNAr 5S e um par de DNAr 45S (Moscone et al. 1999).

No presente trabalho, foi investigada a distribuição da heterocromatina e a variabilidade no número de sítios de DNAr 5S e 45S em 17 acessos de *P. lunatus* pertencentes a diferentes centros de domesticação. Esses resultados foram comparados com dados similares para *P. vulgaris*.

Material e Métodos

Material vegetal

Os 17 acessos de *P. lunatus* analisados com sondas de DNAr 5S e 45S estão listados na Tabela 1. Os acessos foram escolhidos de modo a representar a diversidade conhecida da espécie, incluindo cultivares de diferentes regiões e grupos gênicos. As sementes foram obtidas dos bancos de germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão (Brasil), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brasil) e do Centro Internacional para Agricultura Tropical – CIAT- (Colômbia). A única cultivar de *P. vulgaris* investigada, ‘Bat 93’, foi procedente do banco de germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão (Brasil).

As cultivares ‘Vermelhinha’ de *P. lunatus*, e ‘Bat 93’ de *P. vulgaris*, foram utilizadas no estudo comparativo da heterocromatina e da homeologia dos cromossomos contendo sítios de DNAr 5S e 45S.

Preparação cromossômica

Pontas de raízes obtidas da germinação de sementes foram pré-tratadas com 2 mM de 8-hidroxiquinoleína por 18 h a 12° C, fixadas em etanol/ácido acético 3:1 (v/v) e estocadas a -20° C. Para preparação das lâminas o material foi digerido em uma solução de 2% (p/v) celulase ‘Onozuka R-10’ (Serva) e 20% (v/v) pectinase (Sigma-Aldrich) em 0,01 M tampão citrato pH 4,8 por 1,5 h a 37°C. O material digerido foi lavado em água destilada e mantido nesse meio por toda a noite a 4°C. Em seguida, foi transferido para uma gota de ácido acético 45%, coberto com uma lamínula e esmagado. A lamínula foi removida por congelamento em nitrogênio líquido.

Bandeamento C

O bandejamento C foi feito como descrito por Schwarzacher et al. (1980). Brevemente, as lâminas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente,

imersas em ácido acético 45% a 60° C por 10 min, tratadas com 5% de hidróxido de bário à temperatura ambiente por 10 min, renaturadas em 2x SSC a 60° C por 80 min, coradas com Giemsa 2% e montadas em Entellan.

Coloração com CMA/DAPI

A coloração com CMA/DAPI foi feita conforme Schweizer e Ambros (1994). As lâminas envelhecidas por três dias foram coradas com 0,5 mg/ml de CMA (Sigma) por 1 h e com 2 µg/ml de DAPI (Sigma) por 30 min. Em seguida foram montadas em tampão McIlvaine (pH 7,0)/glicerol 1:1 (v/v) e mantidas no escuro à temperatura ambiente por três dias antes de serem analisadas.

Sondas de DNA

Um fragmento de 6,5 kb de DNAr 18S-5,8S-25S (R2) proveniente de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck et al., 1997) e um clone de 500 pb de DNAr 5S de (D2) *Lotus japonicus* (Pedrosa et al., 2002) foram usados como sondas para localizar os sítios de DNAr 45S e 5S, respectivamente. Três sondas de seqüências de cópia simples que identificam os cromossomos portadores dos sítios de DNAr em *P. vulgaris* [Bng-G (cromossomo 6), Bng-K (cromossomo 9) e o clone SJ19.12 (cromossomo 10)] foram utilizadas para reconhecer seus cromossomos homeólogos em *P. lunatus*. As sondas Bng são conjuntos de marcadores RFLP mapeados geneticamente nos grupos de ligação G e K de *P. vulgaris* (Vallejos et al. 1992; Pedrosa et al. 2003). A sonda do cromossomo 10 (SJ19.12) é um fago contendo uma seqüência de DNA do cromossomo 10 de *P. vulgaris*. As sondas foram marcadas por *nick translation* (Roche Diagnostics, Life Technologies) com Cy3-dUTP (Amersham Biosciences) ou com digoxigenina-11-dUTP (Roche).

Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

O protocolo de hibridização foi baseado em Pedrosa et al. (2002) com modificações. As lâminas foram inicialmente montadas em 2 µg/ml DAPI/glicerol 1:1 (v/v) para seleção das que apresentavam melhores células. Essas foram descoradas em etanol/ácido acético 3:1 (v/v), desidratadas em etanol absoluto por 2-18 h, desnaturadas em 70% de formamida em 2x SSC por 1,5 min a 75° C e desidratadas em série alcoólica. A mistura de hibridização consistiu de 50% (p/v) de formamida, 10% (w/v) de dextran sulfato, 2x SSC e 2-5 ng/µl de sonda. A mistura foi adicionada na lâmina e hibridizada por 18 a 36 horas a 37° C. As lavagens pós-hibridização foram realizadas em 2x SSC, 0,1x SSC, 2x SSC. Todas as lavagens foram feitas por 5 min a 42° C. As sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP foram detectadas usando “*sheep anti-digoxigenin-FITC*” (Roche) e “*anti-sheep-FITC*” (Dako) em 1% (p/v) BSA. As lâminas foram montadas em Vectashield (Vector) contendo 2 µg/ml de DAPI. Após serem analisadas, as lâminas foram descoradas em etanol/ácido acético 3:1 (v/v), desidratadas em etanol absoluto por 2-18h e reibridizadas com diferentes sondas.

Análise dos dados

As células foram analisadas em microscópio Leica DMLB e as imagens capturadas com câmera de vídeo Cohu CCD, usando o *software* QFISH da Leica. As imagens foram processadas usando o Adobe Photoshop 7.0. Os idiogramas foram construídos utilizando o *software* Macromedia Flash MX 2004 e os cromossomos foram nomeados seguindo a nomenclatura dos grupos de ligação do mapa consenso de *P. vulgaris* (Freyre et al. 1998, Pedrosa-Harand et al. 2006).

Resultados

Os cromossomos de *P. lunatus* e *P. vulgaris* apresentaram tamanhos similares quando corados com DAPI, sendo observados nove metacêntricos e dois submetacêntricos em *P. lunatus* e três metacêntricos, cinco submetacêntricos e três acrocêntricos em *P. vulgaris*. Em *P. lunatus*, a constrição primária foi claramente visualizada em todos os cromossomos, enquanto em *P. vulgaris* nem sempre foi identificada e quando observada foi sempre menor do que em *P. lunatus* (Figura 2 A e D).

Heterocromatina

O bandeamento C revelou bandas pericentroméricas na maioria dos cromossomos de *P. lunatus* e *P. vulgaris*. Esse padrão de bandas foi semelhante ao observado com CMA/DAPI nas duas espécies (compare Figuras 1 e 2). Como a análise de bandas com fluorocromos é mais rápida e as bandas são mais contrastadas, esta técnica foi mais adequada para observar a heterocromatina nessas espécies.

Após a coloração com CMA/DAPI todos os cromossomos de *P. lunatus* revelaram bandas CMA⁺/DAPI⁻ localizadas na região organizadora de nucléolo (RON) e nas regiões pericentroméricas (Figura 2 A-C). Em *P. vulgaris* as bandas CMA⁺ tiveram distribuição semelhante, mas foram neutras para DAPI (Figura 2 D-E). Nenhuma banda DAPI⁺ foi observada em ambas as espécies.

Embora os cariótipos dessas espécies sejam muito simétricos, o padrão de bandas CMA combinado com a pequena variação de tamanho cromossômico permitiu a diferenciação de alguns pares cromossômicos. Em *P. lunatus* (Figura 2 C), foi possível reconhecer um par de tamanho médio com um grande bloco CMA⁺ na região pericentromérica, maior no braço longo que no braço curto (par cromossômico 7); um

par relativamente grande, submetacêntrico, com uma pequena banda CMA⁺ na região do centrômero (par cromossômico 3); e um pequeno par apresentando a região organizadora de nucléolo como uma banda CMA⁺ grande terminal (par cromossômico 6). Os demais cromossomos apresentaram tamanhos, morfologias e bandas CMA⁺ similares (Figura 2 C).

Em *P. vulgaris* (Figura 2 F), quatro pares cromossômicos (1, 5, 7 e 11) submetacêntricos apresentaram bandas CMA⁺ na região pericentromérica, sendo que estas bandas foram mais extensas no braço longo. Um par cromossômico (10) revelou uma banda pericentromérica e uma banda terminal no braço longo. Dois pares de cromossomos (6 e 9) mostraram ser acrocêntricos e a coloração com CMA marcou toda a região pericentromérica e o braço curto. Um par de cromossomos acrocêntricos (2) e um par submetacêntrico (3) tiveram uma banda proximal no braço curto. Dois pares metacêntricos, sendo um de tamanho maior (8) e um outro de tamanho menor (4), tiveram bandas na região pericentromérica.

Hibridização *in situ* de sondas de DNA

Para avaliar o grau de variação do número de sítios de DNAr 5S e 45S em *P. lunatus*, 17 acessos, sendo quatro silvestres e 13 cultivados, foram analisados por FISH. O número de sítios de DNAr está listado na Tabela 1, onde os acessos foram ordenados por grupo gênico e região de origem. O DNAr 45S foi observado em um sítio terminal no braço curto de um par cromossômico (Figura 3 A-D), não sendo observada variação em nenhum dos acessos analisados. O DNAr 5S foi localizado proximalmente no braço curto de um outro par cromossômico em todos os acessos Mesoamericanos, Andinos e de origem desconhecida (Figura 3 A-D). Contudo, em quatro acessos coletados em

Quixeramobim (Brasil), de origem desconhecida, apresentaram um segundo sítio de DNAr 5S na região proximal do braço longo do mesmo cromossomo (Figura 3 D).

Como *P. vulgaris* possui vários cromossomos portadores de sítios de DNAr 45S fica a dúvida sobre qual desses cromossomos seria o homeólogo do par encontrado em todos os acessos de *P. lunatus*. Para esclarecer isso, cromossomos de *P. lunatus* foram hibridizados com sondas de cópia única marcadoras dos cromossomos 6 (Bng-G), 9 (Bng-K) e 10 (SJ19.12) de *P. vulgaris*, que são os supostos cromossomos ancestrais portadores de sítios de DNAr 45S. Posteriormente, as lâminas foram reibridizadas com sondas de DNAr 45S. Na reibridização, foi também utilizada a sonda de DNAr 5S que em *P. vulgaris* marca os mesmos cromossomos 6 e 10. A Figura 3 E-F mostra que a sonda Bng-G hibridizou no cromossomo que contém o sítio de DNAr 45S, o clone SJ19.12 marcou o cromossomo que contém o sítio de DNAr 5S (Figura 3 G-H) e o marcador Bng-K hibridizou em um cromossomo que não possui nenhum sítio de DNAr.

Portanto, os cromossomos de *P. lunatus* que apresentaram sítios de DNAr 45S e 5S são homeólogos aos cromossomos 6 e 10 de *P. vulgaris*, respectivamente. Contudo, o sítio de DNAr 5S foi localizado no braço longo no cromossomo de *P. vulgaris* e no braço curto no cromossomo de *P. lunatus*. A Figura 4 apresenta os idiogramas de *P. lunatus* e *P. vulgaris*, resumindo a morfologia dos cromossomos, a posição das bandas CMA e dos sítios de DNAr 5S e 45S. Os cromossomos de *P. lunatus* foram identificados com base no idiograma de *P. vulgaris* estabelecido por Pedrosa-Harand et al. (2006).

Discussão

A coloração com CMA/DAPI e o bandeamento C revelaram bandas pericentroméricas nos cromossomos de *P. lunatus* e *P. vulgaris*, em acordo com dados

de outros autores (Mok e Mok 1976, Schweizer e Ambros 1976, Zheng et al. 1991, Moscone et al. 1999). Contudo, Moscone et al. (1999) relataram heterocromatina na região distal dos cromossomos de *P. lunatus*, que não foram observados com nenhuma das duas técnicas. Outras espécies analisadas do gênero *Phaseolus*, bem como espécies de *Vigna*, um gênero proximalmente relacionado, também apresentam heterocromatina preferencialmente na região pericentromérica (Mok e Mok 1976; Schweizer e Ambros 1976; Zheng et al. 1991; Moscone et al. 1999; Lavania e Lavania 1982; Pignone et al. 1990; Pignone et al. 1995). Portanto, o padrão observado em *P. lunatus* está de acordo com a distribuição de heterocromatina do grupo.

A localização dos genes de RNAr 5S e 45S em 17 acessos de *P. lunatus* mostrou uma única variante: uma duplicação do sítio de DNAr 5S, restrita a quatro acessos provenientes de um único município do Brasil. Moscone et al. (1999) também observaram apenas um sítio de DNAr 5S e um sítio de DNAr 45S em uma cultivar dessa espécie. Esses dados sugerem que esses sítios se encontram praticamente estável dentro desse cariótipo, diferentemente do que foi observado em *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand et al., 2006).

Vários estudos bioquímicos (Lioi 1996; Lioi et al. 1998; 1999) e moleculares (Fofana et al. 2001) em *P. lunatus* têm sugerido a existência de dois centros de domesticação: o Mesoamericano e o Andino, igualmente para *P. vulgaris*. A localização de sítios de DNAr 45S na amostra examinada neste trabalho não revelou nenhuma variação entre esses centros de diversidade. Ao contrário de *P. vulgaris* em que uma análise com DNAr 45S revelou um alto grau de variação entre acessos dos centros Mesoamericano e Andino (Pedrosa-Harand et al. 2006).

O principal sítio de DNAr 5S de *P. lunatus* está no braço curto do cromossomo 10 e em *P. vulgaris* este sítio está no braço longo do cromossomo homeólogo. Os

resultados deste trabalho não permitem estabelecer qual a posição ancestral do sítio, no entanto, alguns acessos de *P. lunatus* apresentaram uma duplicação do sítio no braço longo do mesmo cromossomo, sugerindo uma maior mobilidade do sítio de DNAr 5S nessa espécie. Além disso, foi encontrada uma duplicação do 5S, no mesmo cromossomo, em alguns acessos. O modelo de “dispersão-amplificação-deleção” (Dubcovsky e Dvorak 1995), usado para explicar a mudança de posição de sítios de DNAr intercalares em cereais, poderia explicar a duplicação do sítio de DNAr 5S em *P. lunatus*. Um modelo alternativo para explicar a duplicação do sítio de DNAr 5S no mesmo cromossomo de *P. lunatus* seria a ocorrência de uma inversão pericêntrica, em que a quebra no cromossomo ocorreria no meio do sítio de DNAr, levando parte das cópias do DNAr 5S, resultando na duplicação do sítio. Esse modelo foi usado para explicar a duplicação de sítios de DNAr 45S em *Glycine* (Krishnan et al. 2001). A utilização de marcadores poderá esclarecer melhor o mecanismo envolvido na mudança da posição do sítio de DNAr 5S em *P. lunatus* e *P. vulgaris*.

A semelhança na história evolutiva de *P. vulgaris* e *P. lunatus* e o relato de heterocromatina terminal em *P. lunatus* (Moscone et al. 1999) sugeriam, a princípio, que o mesmo mecanismo de amplificação de DNAr 45S observado em *P. vulgaris* poderia ter ocorrido em *P. lunatus*. Entretanto, a presença de heterocromatina terminal em *P. lunatus* não foi confirmada neste trabalho e nenhuma variabilidade em relação ao DNAr 45S foi encontrada. A hipótese para explicar o alto grau de variação dos sítios de DNAr 45S em *P. vulgaris* seria por recombinação ectópica (interlocos), favorecida pela localização terminal dos sítios de DNAr 45S (Pedrosa-Harand et al. 2006). Em outros organismos, sítios de DNAr 45S nas regiões terminais dos cromossomos têm mostrado ser mais favoráveis a uma amplificação no genoma, por exemplo em *Triticeae* (Dubcovsky e Dvorak 1995) e em *Aloe* (Adams et al. 2000). Supostamente, a presença

de seqüências de DNA repetidas terminais favoreceria essa recombinação. De fato, seqüências de DNA repetitivo subteloméricas foram detectadas em muitos cromossomos de *P. vulgaris*, no entanto, estas mesmas seqüências estão aparentemente ausentes nos cromossomos de *P. lunatus* (resultados não publicados).

Agradecimentos: Envio das sementes pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brasil) e pelo Centro Internacional para Agricultura Tropical – CIAT- (Colômbia). Cícero Carlos de Souza Almeida foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Andrea Pedrosa-Harand foi parcialmente financiada pelo Federal Ministry for Education, Science and Culture (BMBWK), Austria.

Referências Bibliográficas

- Adams S, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW, Leitch AR (2000) Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *Am. J Bot* 87:1578–1583.
- Debouck DG, Linan Jará JH, Campana SA, de la Cruz Rojas JH (1987) Observation on the domestication of *Phaseolus lunatus* L. *FAO/IPGRI Plant Genets Res Newsl* 70:26-62
- Dubcovsky J, Dvorak J (1995) Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes. *Genetics* 140:1367-1377
- Fofana B, Baudoin JP, Vekemans X, Debouck DG, Jardin P (1999) Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. *Theor Appl Genet* 98: 202-212

- Fofana B, Jardin P, Baudion JP (2001) Genetic diversity in the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by chloroplast DNA (cpDNA) variations. *Genet Res Crop Evol* 48:437-445
- Freyre R, Skroch PW, Geffroy V, Adan-Blondon AF, Shirmohamadali A, Johnson WC, Llaca V, Nodari RO, Pereira PA, Tais SM, Thome J, Dron M, Nienhuis J, Vallejos CE, Gepts P (1998) Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theor Appl Genet* 97:847-856
- Gepts P (1998) Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *HortScience* 33:1124-1130
- Krishnan P, Sapra VT, Soliman KM, Zipf A (2001). FISH mapping of the 5S and 18S-28S rDNA loci in different species of *Glycine*. *J Heredity* 92:295-300
- Lavania UC, Lavania S (1982) Chromosome banding patterns in some Indian pulses. *Ann Bot* 49:235-239
- Lioi L (1996) Phaseolin diversity in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in American centres of origin. *Genet Res Crop Evol* 43:575-580
- Lioi L, Galasso I (2002) Oligonucleotide DNA fingerprinting revealing polymorphism in *Phaseolus lunatus* L. *Genet Res Crop Evol* 49:53-58
- Lioi L, Lotti C, Galasso I (1998) Isozyme diversity, RFLP of the rDNA and phylogenetic affinities among cultivated Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae). *Plant Syst Evol* 213:153-164
- Lioi L, Sparvoli F, Bollini R (1999) Variation and genomic polymorphism of lectin-related proteins in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds. *Genet Res Crop Evol* 46:175-182

- Maquet A, Zoro Bi I, Delvaux M, Wathelet B, Baudoin JP (1997) Genetic structure of the Lima bean base collection using allozyme markers. *Theor Appl Genet* 95:980-991.
- Mok DW S, Mok MC (1976) A modified Giemsa technique for identifying bean chromosomes. *J Heredity* 67:187-188
- Moscone EA, 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* 42:1224-1233
- Nienhuis J, Tivang J, Skroch P (1995) Genetic Relationships among cultivars and landraces of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. *J Amer Soc Hort Sci* 120:300-306
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661-1672
- Pedrosa A, Vallejos CE, Bachmair A, Schweizer D (2003) Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Theor Appl Genet* 106:205-212
- Pedrosa-Harand A, Almeida CCS, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 112:924-933
- Pignone D, Cifarelli S, Perrino P (1990) Chromosome identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Cowpea Genetic Resources*, in press.
- Pignone D, Galasso I, Verona G (1995) Karyomorphological and heterochromatin similarities among four *Vigna* species. *Genet Res Crop Evol* 42:57-60
- Schwarzacher T, Ambros P, Schweizer D. (1980). Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst Evol* 126:706-712

- Schweizer D, Ambros P (1976) Analysis of nucleolus organizer regions (NORs) in mitotic and polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by silver staining and Giemsa C-banding. *Plant Syst Evol* 132:27-51
- Schweizer D, Ambros PF (1994) Chromosome banding. In: *Methods in molecular biology*, vol. 29, Chromosome analysis protocols (ed JR Gosden). Humana Press. Totowam p. 97-113.
- Vallejos CE, Sakiyama NS, Chase CD (1992) A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131:733-740
- 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*. *Plant Journal* 11:1007-1016
- Zheng J, Nakata M, Irifune K, Tanaka R, Morikawa H (1993) Fluorescent banding pattern analysis of eight taxa of *Phaseolus* and *Vigna* in relation to their phylogenetic relationships. *Theo Appl Genet* 87:38-43
- Zheng J, Nakata M, Uchiyama H, Morikawa H, Tanaka R (1991) Giemsa C-banding in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. *Cytologia* 56:459-466

Tabela 1 – Acessos de *Phaseolus lunatus* analisados com indicação dos grupos gênico aos quais pertencem, procedência, tipo e código de acesso e número de sítios de DNAr observados

	Grupo gênico	Procedência	Tipo ^a	Nome do acesso (código) ^b	DNAr 5S ^c	DNAr 45S ^c	n ^d
1	Andino	Celedin e Chachapoyas, Cajamarca, Peru	L	(G25832)	1	1	12
2		Loja, Loja, Equador	W	(G26460)	1	1	14
3	Mesoamericano	Chago, Argentina	W	(G26404)	1	1	5
4		Cienaga, Magdalena, Colômbia	W	(G25819)	1	1	5
5		Esquitla, Escuintla, Guatemala	W	(G25850)	1	1	10
6	Não determinado	Capina Grande, Paraíba, Brasil	C	(FA25)	1	1	9
7		Gravatá, Pernambuco, Brasil	C	(FA17)	1	1	7
8		Gravatá, Pernambuco, Brasil	C	(FA18)	1	1	15
9		Inhumas, Goiás, Brasil	C	Branca Achatada (GL0194)	1	1	11
10		Itapuranga, Goiás, Brasil Itaporanga	C	Vermelha (GL0188)	1	1	4
11		Nebraska, EUA		(G25269A)	1	1	9
12		Rio Pardo de Minas, Minas Gerais, Brasil	C	Rosa (GL131)	1	1	6
13		Salinas, Minas Gerais, Brasil	C	Vermelhinha (GL0135)	1	1	11
14		Quixeramobin, Ceará, Brasil	C	(FA02)	2	1	10
15		Quixeramobin, Ceará, Brasil	C	(FA14)	2	1	8
16		Quixeramobin, Ceará, Brasil	C	(FA08)	2	1	9
17		Quixeramobin, Ceará, Brasil	C	Alva (FA15)	2	1	7

^aTipos: C – Cultivado, L – Landrace, W – silvestre.

^bMateriais com código G foram obtidos diretamente do CIAT, Colômbia; GL, da Embrapa Arroz e Feijão, Brasil; FA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Brasil.

^cNúmero de sítios de DNAr por genoma haplóide

^dNúmero de células analisadas

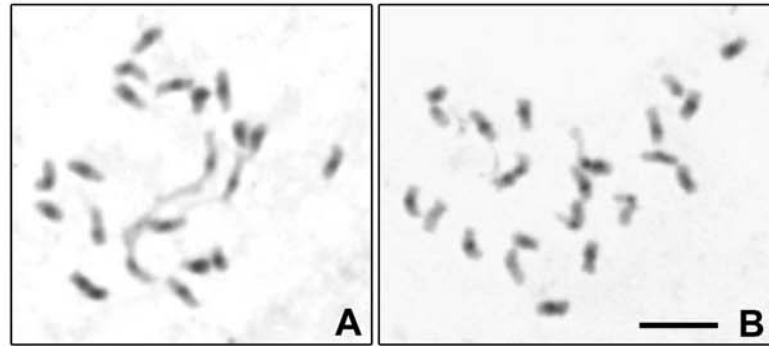


Figura 1. Bandeamento C em metáfases de *P. lunatus* (A) e *P. vulgaris* (B). Barra em B representa 5 μ m

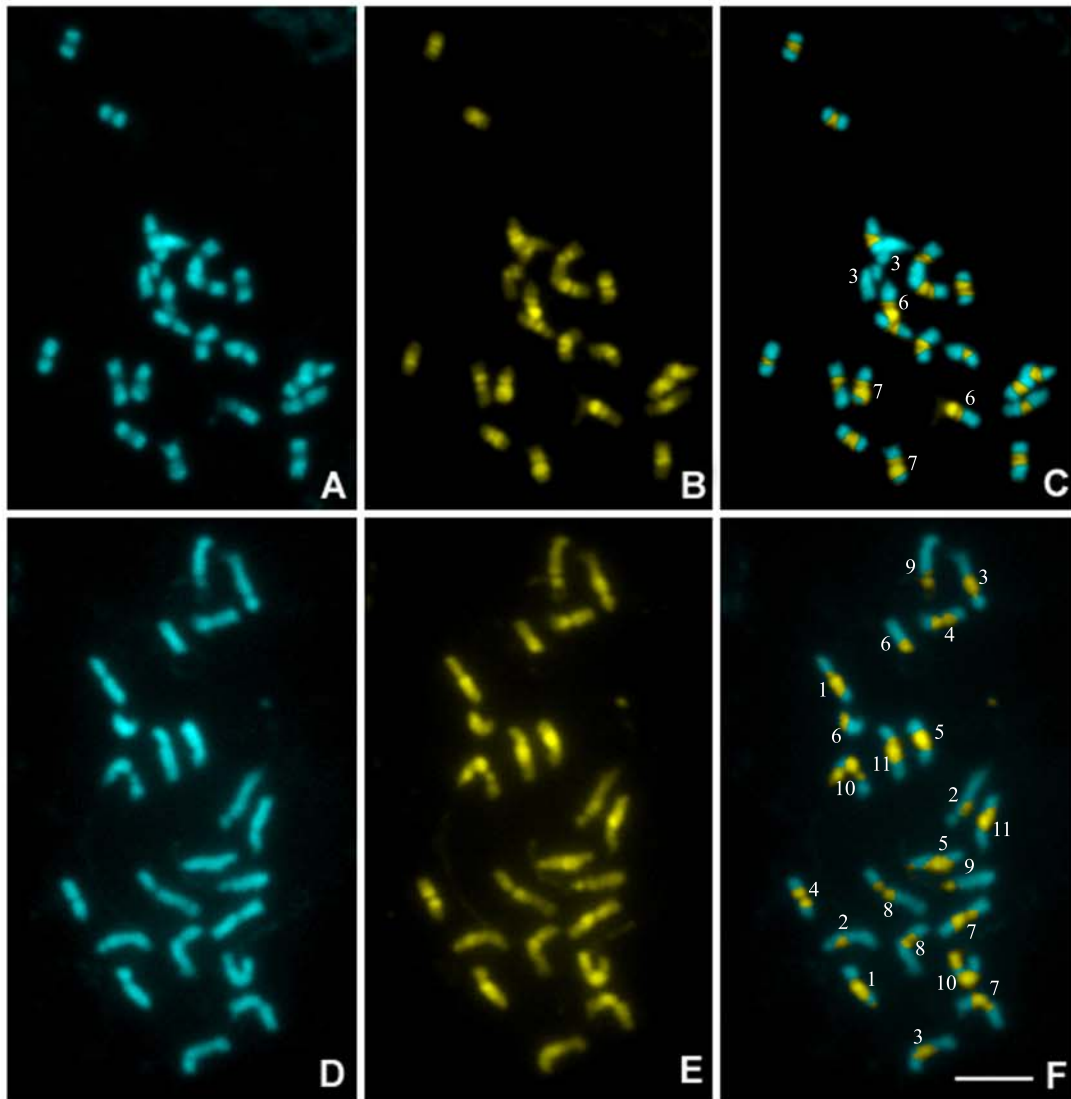


Figura 2. Metáfases de *P. lunatus* (A-C) e *P. vulgaris* (D-F) coradas com DAPI (A e D) e CMA (B e E). C e F mostram a sobreposição da dupla-coloração. Barra em F representa 5 μ m

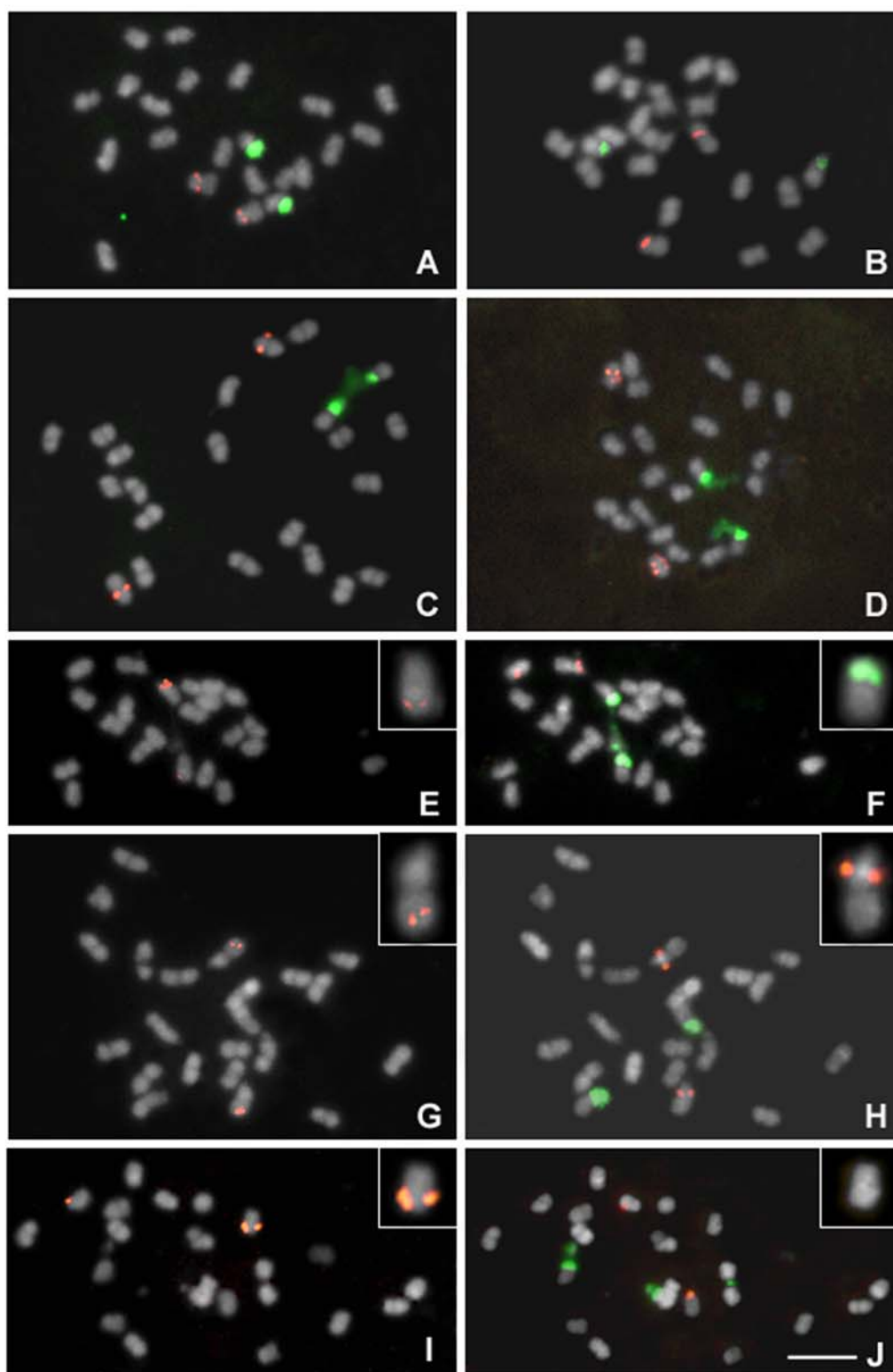


Figura 3 – Hibridização *in situ* em metáfases de *P. lunatus*. Sondas de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em vários cultivares: A, G26460; B, G2585; C, FA18; D, FA02; F, H e J, 'vermelhinha'. Observe dois sítios de DNAr 5S em volta do centrômero em D. As células em E, G e I foram hibridizadas com Bng-G (E), SJ19.92 (G) e Bng-K (I). Barra em J representa 5 μ m

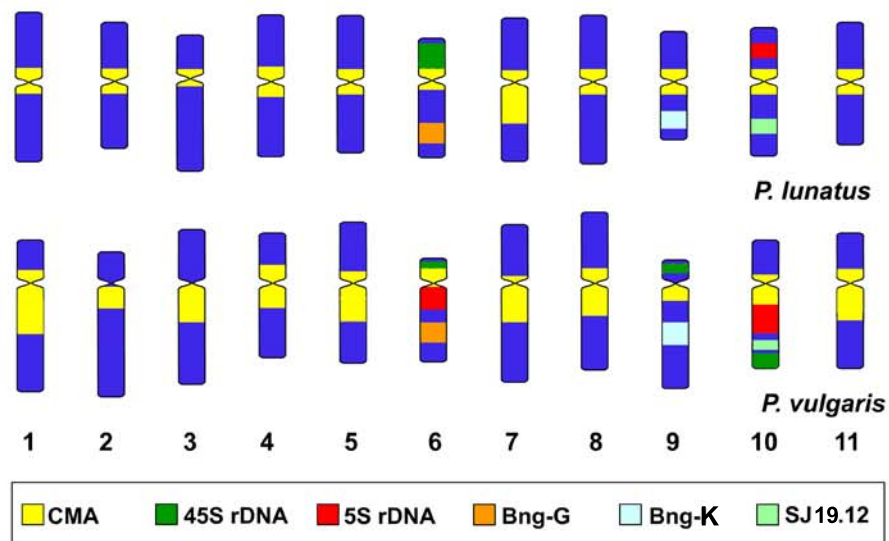


Figura 4. Idiogramas de *P. lunatus* e *P. vulgaris* mostrando a distribuição da heterocromatina revelada com CMA, dos sítios de DNAr 5S e 45S e dos marcadores cromossômicos Bng-G, SJ19.12 e Bng-K. Os sítios de DNAr 5S e 45S em *P. vulgaris* são os descritos por Pedrosa-Harand et al. 2006)

**Mapa citogenético de *Phaseolus lunatus* L. usando BACs de *P. vulgaris* L.
revela alto grau de macrossintenia**

Artigo a ser submetido à revista *Genetics*

Mapa citogenético de *Phaseolus lunatus* L. usando BACs de *P. vulgaris* L. revela alto grau de macrossintenia

Cícero Carlos de Souza Almeida¹, Jim Kami², Paul Gepts², Valérie Geffroy³, Marcelo Guerra⁴ e Andrea Pedrosa-Harand⁴

¹Campus Arapiraca-Viçosa, Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, Brasil

²Department of Agronomy and Range Science, University of California, Davis, CA, EUA.

³Institut de Biotechnologie des Plantes, Université Paris Sud, Orsay, França

⁴Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

Para correspondência: Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, Rua Nelson Chaves s/n, 50670-420. Tel 55 812126-8846. Fax 55 812126-8348. Email: adcpedrosa@uol.com.br

Resumo

O gênero *Phaseolus* possui cinco espécies cultivadas, sendo o feijão comum (*P. vulgaris*) e a fava (*P. lunatus*) as mais importantes. Estas espécies possuem o mesmo número cromossômico ($2n=22$) e uma alta similaridade cromossômica. Diferenças cariotípicas entre *P. lunatus* e *P. vulgaris* sugerem que ocorreram rearranjos durante a evolução dessas espécies. O mapeamento comparativo entre *P. vulgaris* e *P. lunatus* permitirá detectar esses rearranjos. Desta forma, a fim de construir um mapa físico e analisar o nível de macrosintenia e co-linearidade entre os cromossomos dessas espécies, foram hibridizados *in situ*, em cromossomos de *P. lunatus*, dois fagos e trinta BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*), selecionados de uma biblioteca genômica de *P. vulgaris*, para os cromossomos 3, 4 e 7. Sete BACs continham DNA repetitivo e não foram mapeados. Os demais BACs mostraram uma localização cromossômica conservada. Os resultados obtidos para os cromossomos 3, 4 e 7 sugerem que grandes rearranjos cromossômicos não ocorreram durante a evolução dessas espécies. O BAC 86I17 apresentou uma heterocromatina terminal na maioria dos cromossomos de *P. vulgaris*, que está aparentemente ausente em *P. lunatus* e os BACs 26B20 e 267K20 foram repetitivos dispersos em *P. lunatus* e únicos em *P. vulgaris*. A detecção de uma heterocromatina revela que a principal divergência entre essas espécies foi a amplificação diferencial de seqüências de DNA repetitivo.

Palavras-chave: Mapa físico, *Phaseolus*, BACs, evolução, FISH

Introdução

O gênero *Phaseolus* possui cinco espécies cultivadas (*P. vulgaris* L., *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. polyanthus* L. e *P. acutifolius* var. *latifolius* A. Gray). Entre essas espécies, o feijão comum (*P. vulgaris*) e o feijão fava (*P. lunatus*) são as que apresentam a maior importância econômica (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 2000). Análises filogenéticas incluindo dados morfológicos e moleculares agruparam *P. vulgaris*, *P. coccineus* e *P. acutifolius* em um clado, enquanto *P. lunatus* formou, juntamente com algumas espécies silvestres, um clado a parte (Delgado-Salinas *et al.*, 1999). Essas duas espécies possuem dois centros de domesticação: Mesoamericano e Andino. Acessos do grupo Mesoamericano possuem maior distribuição, enquanto o grupo Andino tem uma distribuição mais restrita (Gepts, 1998; Debouck *et al.*, 1987; Lioi *et al.*, 1998; Fofana *et al.*, 2001).

Análises cromossômicas em *Phaseolus* têm revelado uma alta semelhança cariotípica, apresentando $2n=22$ cromossomos (revisado por Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 2000). A localização da heterocromatina tem corroborado com a similaridade cariotípica no gênero, apresentando blocos nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos (Mok e Mok, 1976; Zheng *et al.*, 1991; 1993), exceto para *P. lunatus*, em que Moscone *et al.* (1999) localizaram blocos nas regiões terminais dos cromossomos. A localização dos genes para RNAr 5S e 45S em quatro espécies cultivadas permitiu uma comparação um pouco mais detalhada entre esses cariótipos. Algumas homeologias cromossômicas puderam ser sugeridas entre *P. vulgaris* e *P. coccineus* ou entre *P. vulgaris* e *P. acutifolius*. Entretanto esses dois marcadores não foram capazes de detectar homeologias entre *P. vulgaris* e *P. lunatus*, as espécies cultivadas mais distantes (Moscone *et al.*, 1999). Embora tenha sido sugerido que rearranjos como inversões, duplicações e translocações tenham ocorrido, porém, não está claro se estas

alterações estariam envolvidas no processo de especiação do grupo (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 2000).

Mapeamento comparativo estabelece os relacionamentos sintênicos entre genomas de diferentes espécies, ou seja, revela a ordem e o conteúdo dos genes, detectando possíveis rearranjos ocorridos na evolução (Kaló *et al.*, 2004). Estudos têm mostrado que dependendo da distância taxonômica entre as espécies, elas possuem mais ou menos regiões conservadas (Paterson *et al.*, 2000). Análise comparativa em vegetais tem sido baseada na comparação de mapas genéticos, por exemplo, entre *Pinus taeda* e *Pseudotsuga menziesii* (Konstantin *et al.*, 2004), *Helianthus petiolaris* e *H. petiolaris* (Burke *et al.*, 2004) e entre *Medicago sativa* and *Pisum sativum* (Kaló *et al.*, 2004). No entanto, FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) também pode contribuir para o estudo comparativo na construção de mapas físicos (Harper e Cande, 2000), por exemplo, no estudo entre *Pennisetum squamulatum* e *Cenchrus ciliaris*, um conjunto de BACs foram hibridizados *in situ* em cromossomos das duas espécies, permitindo construir um mapa físico comparativo (Goel *et al.*, 2006).

O objetivo deste trabalho foi analisar a macrossintenia entre *P. lunatus* e *P. vulgaris*. Para isso, clones de BACs selecionados a partir de marcadores moleculares RFLP pertencentes ao mapa genético de *P. vulgaris* foram hibridizados *in situ* em cromossomos mitóticos de *P. lunatus*.

Materiais e Métodos

Material vegetal

A cultivar “Vermelhinha” (GL0135) de *P. lunatus* foi utilizada para o mapeamento. As sementes foram obtidas do banco de germoplasma da Embrapa Arroz

e Feijão, Brasil. O material foi mantido em cultivo no jardim experimental do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Preparação cromossômica

Pontas de raízes obtidas da germinação de sementes foram pré-tratadas com 2 mM de 8-hidroxiquinoleína por 18 h a 12° C, fixadas em etanol/ácido acético 3:1 (v/v) e estocadas a -20° C. Em uma lâmina, as pontas de raízes foram digeridas em uma solução de 2% (p/v) celulase ‘Onozuka R-10’ (Serva) e 20% (v/v) pectinase (Sigma-Aldrich) em 0,01 M tampão citrato pH 4,8 por 1,5 h a 37°C. O material digerido foi lavado em água destilada, mantido a 4° C por toda a noite, transferido para uma gota de ácido acético 45%, coberto com uma lamínula e depois esmagado. A lamínula foi removida com resfriamento em nitrogênio líquido.

Sondas de BACs

Trinta BACs de *P. vulgaris* foram selecionados utilizando marcadores RFLPs pertencentes aos grupos de ligação C/B3 (cromossomo 3), B/B4 (cromossomo 4) e A/B7 (cromossomo 7) de *P. vulgaris* (Vallejos et al. 1992) (Tabela 1 e 2). Além disso, foram utilizados, dois fagos (B35 e B62) pertencentes ao cromossomo 4 de *P. vulgaris*. Os DNAs dos BACs e dos fagos foram marcados por *nick translation* (Roch Diagnostics, Life Technologies) com Cy3-dUTP (Amersham Biosciences).

Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

O protocolo de hibridização foi baseado em Pedrosa *et al.* (2002) com modificações. As melhores lâminas foram selecionadas com 2 µg/ml DAPI/glicerol 1:1 (v/v). Essas foram descoradas em etanol/ácido acético 3:1 (v/v), desidratadas em etanol

absoluto por 2-18h e diretamente desnaturadas em 70% de formamida em 2x SSC por 1,5 min a 75° C e desidratadas em série alcoólica. A mistura de hibridização consistiu de 50% (w/v) de formamida, 10% (w/v) de dextran sulfato, 2x SSC, 2-5 ng/μl de sonda, de 20x a 100x da fração de C₀t-100 de *P. vulgaris* (dependendo do BAC) e foi desnaturada por 10 min a 75° C. A mistura foi adicionada à lâmina, lutada e hibridizadas por 18 a 36 horas a 37° C. As lavagens pós-hibridização foram realizadas em 2x SSC, 0,1x SSC, 2x SSC. Todas as lavagens foram feitas por 5 min a 42° C. As lâminas foram montadas em Vectashield (Vector) contendo 2 μg/ml de DAPI. Após serem analisadas, as lâminas que apresentam BACs com sinais únicos, foram descoradas em etanol/ácido acético 3:1 (v/v), desidratadas em etanol absoluto por 2-18h e reibridizadas com um segundo BAC de cópia simples.

Análise dos dados

As células foram analisadas em microscópio Leica DMLB e as melhores imagens capturadas com câmera de vídeo Cohu CCD, usando o software Leica QFISH. As imagens foram processadas usando o software Adobe Photoshop 7.0. Os idiogramas foram construídos utilizando os softwares Image Tool e Macromedia Flash MX 2004 e os cromossomos nomeados de acordo com os nomes dos grupos de ligação do mapa consenso de *P. vulgaris* (Freyre *et al.*, 1998).

Resultados

Trinta BACs, correspondendo a 28 marcadores genéticos, e dois fagos foram hibridizados em cromossomos mitóticos de *P. lunatus*. Embora tenha sido usado de 20x a 100x C₀t-100 como bloqueio, sete BACs hibridizaram em todos os cromossomos, apresentando sinais dispersos ao longo do comprimento dos mesmos (Figura 1 A-B) e

dois BACs revelaram sinais na região pericentromérica de todos os cromossomos (Figura 1 C e Tabela 1). Vinte e um BACs e os dois fagos apresentaram sinais únicos (Figura 1 D-G) e puderam ser mapeados. A posição relativa dos BACs e fagos pode ser visualizada na Tabela 2.

O cromossomo 3 é de tamanho grande, submetacêntrico e que após a FISH foi observada uma banda DAPI⁺ na região proximal do braço longo. Para este cromossomo, nove BACs foram localizados (Figura 2), dos quais três hibridizaram no braço curto e seis no braço longo. As distâncias entre eles foram suficientes para posicioná-los individualmente no mapa estabelecido (Figura 3). Dois BACs (95L13 e 174E13) foram selecionados utilizando o mesmo RFLP e os sinais de hibridização mostraram que esses foram localizados na mesma região do cromossomo, confirmando a acurácia do mapeamento de BACs por FISH (Tabela 1). Desta forma, apenas um BAC (95L13) foi incluído no mapa citogenético.

O cromossomo 4 é metacêntrico de tamanho pequeno. Neste cromossomo, seis BACs foram mapeados, três no braço longo e três no braço curto. Além disso, dois fagos foram localizados no braço curto deste cromossomo (Figura 2). Os BACs (221J10 e 78L24) foram selecionados com RFLPs mapeados no mesmo lugar, e como esperado, esses BACs hibridizaram na mesma região no cromossomo (Figura 3). Semelhante ao cromossomo 3, dois BACs (94F8 e 78L24) selecionados com o mesmo RFLP hibridizaram no mesmo lugar, sendo incluído no mapa apenas o BAC 78L24. No braço longo, três BACs (190C15, 162K15 e 86K9) foram mapeados.

O cromossomo 7 é metacêntrico de tamanho médio e 12 BACs foram hibridizados *in situ*, desses, seis apresentaram seqüências de DNA repetitivo (Tabela 1) e seis cópia única (Figura 3 e Tabela 2). Os BACs mapeados nos cromossomo 3, 4 e 7

de *P. lunatus* demonstraram que a ordem desses BACs são as mesmas observadas no mapa genético de *P. vulgaris* (Figura 3).

A morfologia dos três cromossomos permite uma indicação que eles sejam distintos, no entanto, para certificar que os BACs hibridizaram em diferentes cromossomos, um conjunto de BACs, contendo sondas dos três cromossomos, foram hibridizados em uma lâmina e os resultados confirmaram que os BACs estão em cromossomos distintos (Figura 1 G).

Discussão

A localização *in situ* de BACs de uma biblioteca genômica de *P. vulgaris*, em cromossomos mitóticos de *P. lunatus* mostrou-se adequada. Análises comparativas semelhantes também foram adotadas em outros organismos, como por exemplo, em *Pennisetum squamulatum* e *Cenchrus ciliaris* (Goel *et al.*, 2006)

Os BACs utilizados neste trabalho foram mapeados em três cromossomos de *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand *et al* em publicação), e os resultados revelaram que os BACs estavam na mesma ordem em *P. vulgaris* e em *P. lunatus*, sugerindo que não ocorreram grandes rearranjos cromossômicos durante a evolução dessas espécies, conservando a macrossintenia. Alto grau de conservação da macrossintenia entre espécies, inclusive entre espécie de gêneros distintos, tem sido detectado em muitos organismos, por exemplo, em *Pinus taeda* e *Pseudotsuga menziesii* (Krutovsky *et al.*, 2004), *Medicago sativa* and *Pisum sativum* (Kaló *et al.*, 2004) e *Pennisetum squamulatum* e *Cenchrus ciliaris* (Goel *et al.*, 2006). Por outro lado, mapeamento comparativo entre as espécies do mesmo gênero, *Helianthus petiolaris* e *H. annuus*, revelou baixa sintenia, em que diversas translocações e inversões ocorreram desde a separação dessas espécies (Burke

et al., 2004). Paterson *et al.* (2000), revisando a evolução comparativa de cromossomos de plantas, constataram que o grau de sintenia entre espécies é proporcional a distância taxonômica entre elas.

Pelo fato de grandes clones genômicos possuírem seqüências repetitivas, o uso do DNA C_0t-100 de *P. vulgaris* nem sempre foi eficiente para bloquear essas seqüências, revelando DNA repetitivo disperso ou em tandem após a FISH. Essa situação tem sido encontrada em vários organismos de plantas com a hibridização de BACs em cromossomos (Chung-Ju *et al.*, 2006; Islam-Faridi *et al.*, 2001).

Diversos BACs usados neste trabalho revelaram seqüência de DNA repetitivo em *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand *et al.*, em preparação), no entanto, algumas seqüências de DNA repetitivo tiveram comportamentos diferentes nas espécies. Por exemplo, os BACs 26B20 (cromossomo 4) e o 267K20 (cromossomo 7) apresentaram sinais únicos em *P. vulgaris*, mas sinais múltiplos em *P. lunatus*, mesmo utilizando uma elevada quantidade de DNA C_0t-100 como bloqueador. O BAC 86I17, que foi repetitivo em *P. vulgaris* e único em *P. lunatus*, revelou uma heterocromatina terminal na maioria dos cromossomos de *P. vulgaris*. Esta heterocromatina está aparentemente ausente em *P. lunatus*, uma vez que nessa espécie o mesmo BAC revelou um único sinal no braço curto do par cromossômico 7. De fato, Pedrosa-Harand *et al.* (2006) detectaram um elevado número (6 a 18) de sítios de DNAr 45S na região terminal dos cromossomos de vários acessos de *P. vulgaris*, podendo esta seqüência de DNA repetitivo está envolvida no processo de amplificação de DNAr 45S.

Amplificação diferencial de DNA repetitivo foi demonstrada por Zhang *et al.* (2006) em trigo, em que vários BACs revelaram seqüências de DNA repetitivo específicas para os genomas que compõem o trigo. Os resultados deste trabalho, sugerem que a amplificação diferencial de DNAr repetitivo parece ser o principal

mecanismo de diferenciação entre *P. vulgaris* e *P. lunatus* e que existe uma conservação da macrossintenia entre essas espécies.

Agradecimentos: Envio das sementes pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Cícero Carlos de Souza Almeida foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Andrea Pedrosa-Harand foi parcialmente financiada pelo Federal Ministry for Education, Science and Culture (BMBWK), Austria.

Referências bibliográficas

- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* 252:55–128
- Burke JM, Lai Z, Salmaso M, Nakazato T, Tang S, Heesacker A, Knapp SJ, Rieseberg LH (2004) Comparative Mapping and Rapid Karyotypic Evolution in the Genus *Helianthus*. *Genetics* 167:449–457
- Cheng Z, Presting GG, Buell CR, Wing RA e Jiang J (2001). High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics* 157:1749-1757
- Chung-Ju RW, Harper L, Cande, WZ (2006) High-resolution single-copy gene fluorescence in situ hybridization and its use in the construction of a cytogenetic map of maize chromosome 9. *The Plant Cell* 18:529-544

- Debouck DC, Linan JJH, Campana SA, dela Cruz Rojas JH (1987) Observation on the domestication of *Phaseolus lunatus* L. FAO/IBPGH. Plant Genet Res Newslet 70:26-32
- Delgado-Salinas A, Turley T, Richman A, Lavin M (1999) Pylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). Systematic Botany 24:438-460
- Fofana B, Jardin P, Baudion JP (2001) Genetic diversity in the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by chloroplast DNA (cpDNA) variations. Genet Res and Crop Evol 48:437-445
- Freyre R, Skroch PW, Geffroy V, Adam-Blondon A-F, Shirmohamadali A, Johnson WC, Llaca V, Nodari RO, Pereira PA, Tsai S-M, Tohme J, Dron M, Nienhuis J, Vallejos CE, Gepts P (1998) Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. Theor Appl Genet 97:847–856
- Gepts P (1998) Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. HortScience 33:1124–1130
- Goel S, Chen Z, Akiyama Y, Conner JA, Basu M, Gualtieri G, Hanna WW, Ozias-Akins P (2006) Comparative Physical Mapping of the Apospory-Specific Genomic Region in Two Apomictic Grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliari*. Genetics 173:389–400
- Harper LC, Cande WZ (2000) Mapping a new frontier; development of integrated cytogenetic maps in plants. Functional Integrative Genomics 1:89-98
- Islam-Faridi MN, Childs KL, Klein PE, Hodnett G, Menz MA, Klein RR, Rooney WL, Mullet JE, Stelly DM, Price HJ (2001) A molecular cytogenetic map of sorghum chromosome 1: Fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosome. Genetics 161:345-353

- Kaló P, Seres A, Taylor SA, Jakab J, Kevei Z, Kereszt A, Endre G, Ellis THN, Kiss GB (2004). Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Mol Gen Genomics* 272:235-246
- Konstantin V, Krutovsky KV, Troggio M, Brown GR, Jermstad KD, Neale DB (2004). Comparative Mapping in the Pinaceae. *Genetics* 168: 447–461
- Lioi L, Lotti C, Galasso I (1998) Isozyme diversity, RFLP of the rDNA and phylogenetic affinities among cultivated Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae). *Plant Syst Evol* 213:153-164
- Manning M, King GJ, Thompson AJ, Jones GH, Seymour GB, Armstrong SJ (2002) Genetic analysis and FISH mapping of the colourless non-ripening locus of tomato. *Theor Appl Genet* 104:165-170
- Mercado-Ruaro P, Delgado-Salinas A (2000) Cytogenetics studies in *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae). *Genet Mol Biol* 23:985-987
- Mok DWS, Mok MC (1976) A modified Giemsa technique for identifying bean chromosomes. *The J of Heredity* 67:187-188
- Moscone EA, 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* 42:1224-1233
- Paterson AH, Bowers JE, Burrow MD, Draye X, Elvik CG, Jiang C, Katsar CS, Lan TH, Lin YR, Ming R, Wright R (2000) Comparative Genomics of Plant Chromosomes. *The Plant Cell* 12:1523-1539
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661-1672

- Pedrosa-Harand A, Almeida CCS, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 112:924-933
- Vallejos CE, Sakiyama NS, Chase CD (1992) A molecular markerbased linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131:733–740
- Zhang P, Wanlong L, Fellers J, Friebe B, Gill BS (2006) BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma* 112:288-299
- Zheng J, Nakata M, Irifune K, Tanaka R, Morikawa H. (1993) Fluorescent banding pattern analysis of eight taxa of *Phaseolus* and *Vigna* in relation to their phylogenetic relationships. *Theor Appl Genet* 87: 38-43
- Zheng J, Nakata M, Uchiyama H, Morikawa H, Tanaka R. (1991) Giemsa C-banding in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. *Cytologia* 56:459-466

Tabela 1 - Lista dos clones de BACs de *P. vulgaris* usados na hibridização *in situ* (FISH) em *P. lunatus* que apresentaram seqüências de DNA repetitivo.

Grupo de ligação	Marcador Molecular	Clones de BACs	Localização das seqüências
B/B4	Bng 55	BAC 92B6	Dispersa
	Bng 13	BAC 26B20	Dispersa
	Bng 55	BAC 53G1	Pericentromérica
A/B7	Bng 28	BAC 12M3	Pericentromérica
	Bng 47	BAC 267K20	Dispersa
	Bng 204	BAC 111O19	Dispersa
	Bng 204	BAC 125P11	Dispersa
	Bng 23	BAC 20F21	Dispersa
	Phs	BAC 105O5	Dispersa

Tabela 2 – Lista dos clones de BACs de e fagos de *P. vulgaris* hibridizados *in situ* em cromossomos de *P. lunatus*

Cromossomo	Marcador Molecular	Clones de grandes insertos	C ₀ t-100	Posição das marcas nos mapas		
				Citogenético (Relativo)	Genético (Relativo)	Genético (cM)
3	Bng 106	BAC 147K17	20x	0,149 ± 0,01	0,28	26,6
	Bng 12	BAC 142D9	20x	0,172 ± 0,03	0,28	26,6
	Bng 16	BAC 267H4	20x	0,187 ± 0,02	0,30	28,1
	Bng 75	BAC 199D13	20x	0,481 ± 0,03	0,36	34,4
	Bng 114	BAC 116H6	20x	0,562 ± 0,04	0,41	39,0
	Bng 3	BAC 77J14	50x	0,606 ± 0,03	0,44	42,0
	Bng 33	BAC 95L13	20x	0,875 ± 0,03	0,78	74,0
		BAC 174E13	20x	0,878 ± 0,02	0,78	74,0
4	Bng 124	BAC 91K16	20x	0,931 ± 0,03	0,85	80,0
	Bng 151	BAC 221J10	20x	0,151 ± 0,02	0,00	0,00
		Fago B35		0,171 ± 0,02	---	---
		Fago B62		0,156 ± 0,02	---	---
	Bng 160	BAC 94F8	20x	0,163 ± 0,02	0,00	0,00
		BAC 78L24	50x	0,168 ± 0,01	0,00	0,00
	Bng 184	BAC 190C15	50x	0,841 ± 0,01	0,69	72,0
	Bng 103	BAC 162K15	20x	0,850 ± 0,03	0,70	73,5
7	APA	BAC 86K9	20x	0,910 ± 0,03	0,94	97,6
	Bng 191	BAC 86I17	10x	0,092 ± 0,01	0,00	0,00
	Bng 42	BAC 193F10	20x	0,147 ± 0,02	0,20	20,8
	Bng 60	BAC 144D16	50x	0,182 ± 0,03	0,31	31,8
	Bng 204	BAC 122D11	100x	0,749 ± 0,02	0,44	45,9
	Bng 23	BAC 33M20	40x	0,771 ± 0,02	0,57	59,9
	Bng 47	BAC 22I21	20x	0,877 ± 0,05	0,97	101,6

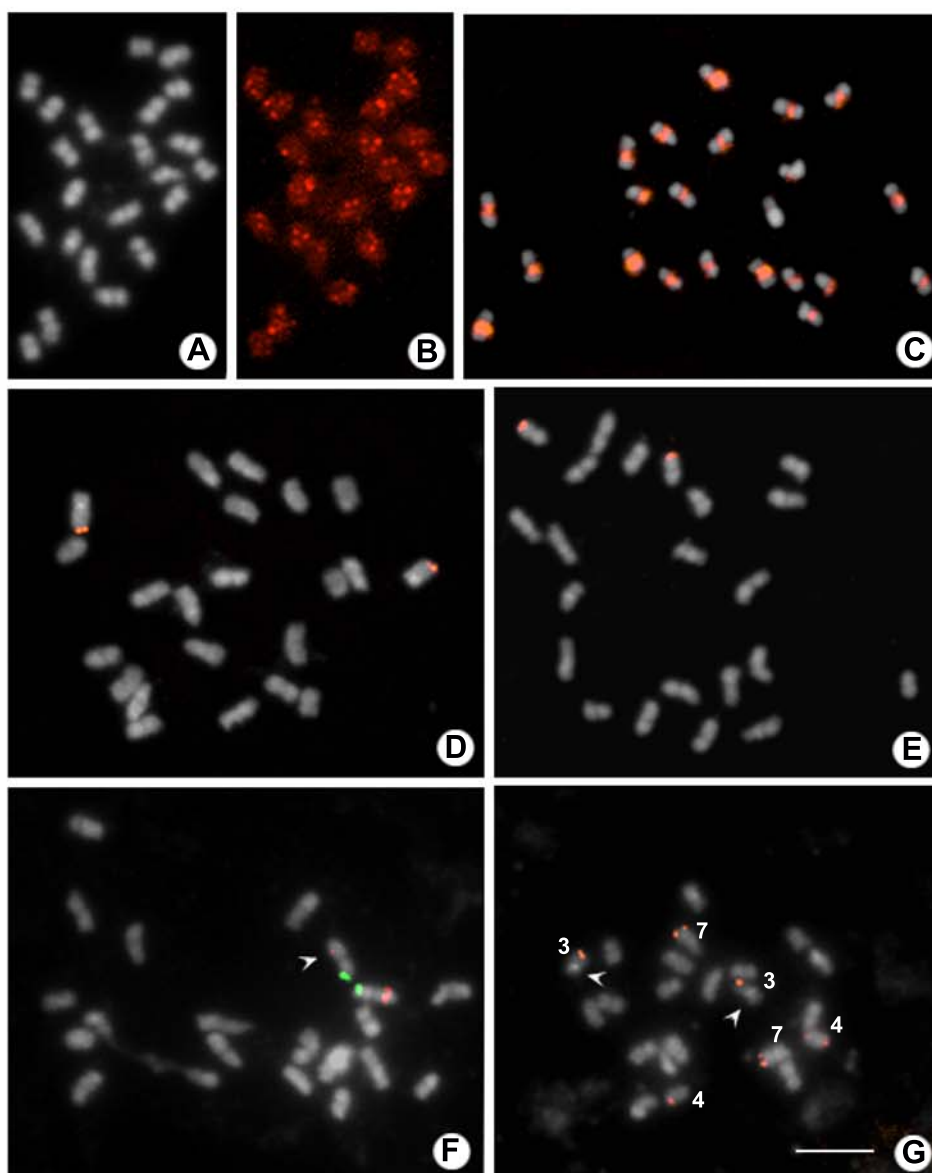


Figura 1 – Hibridização *in situ* de BACs em metáfases de *P. lunatus*. A-B, BAC 20F21 com DNA repetitivo disperso. C, BAC 53G1 com DNA pericentromérico. D, BAC 95L12 do cromossomo 3. E, BAC 221J21 do cromossomo 4. F, BAC 86I17 (verde) e o BAC 33M20 (vermelho), ambos do cromossomo 7. G, coquetel de BACs para o três cromossomos. Na imagem F, o sinal do BAC 86I17 é uma pseudocoloração. Barra em G representa 5 μ m.

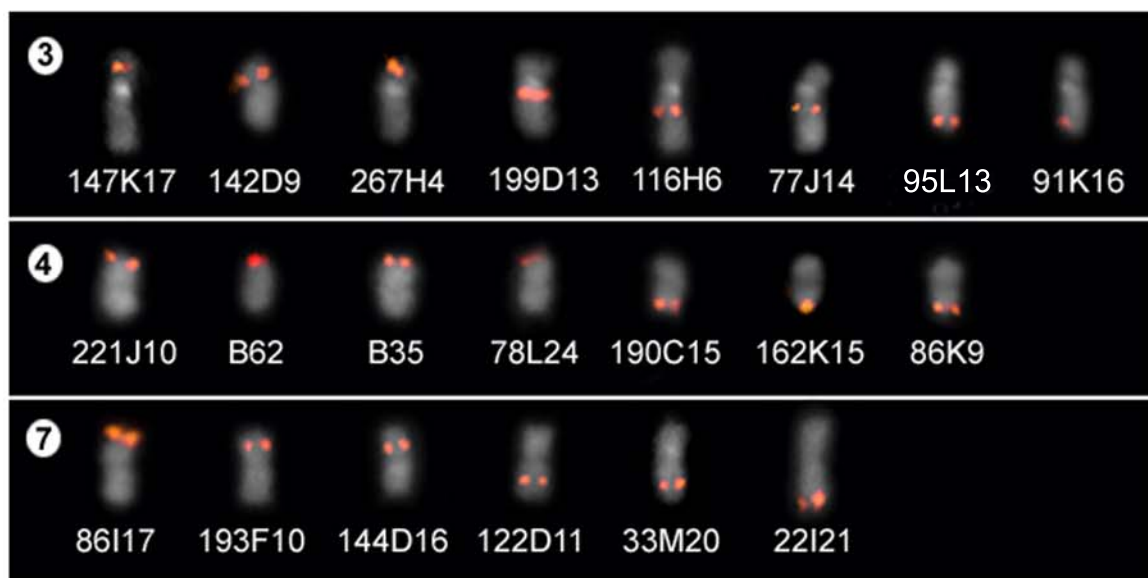


Figura 2 – Mapeamento físico de BACs de *P. vulgaris* em cromossomos de *P. lunatus*. 3, 4 e 7 representam a numeração cromossômica dos cromossomos de *P. vulgaris*.

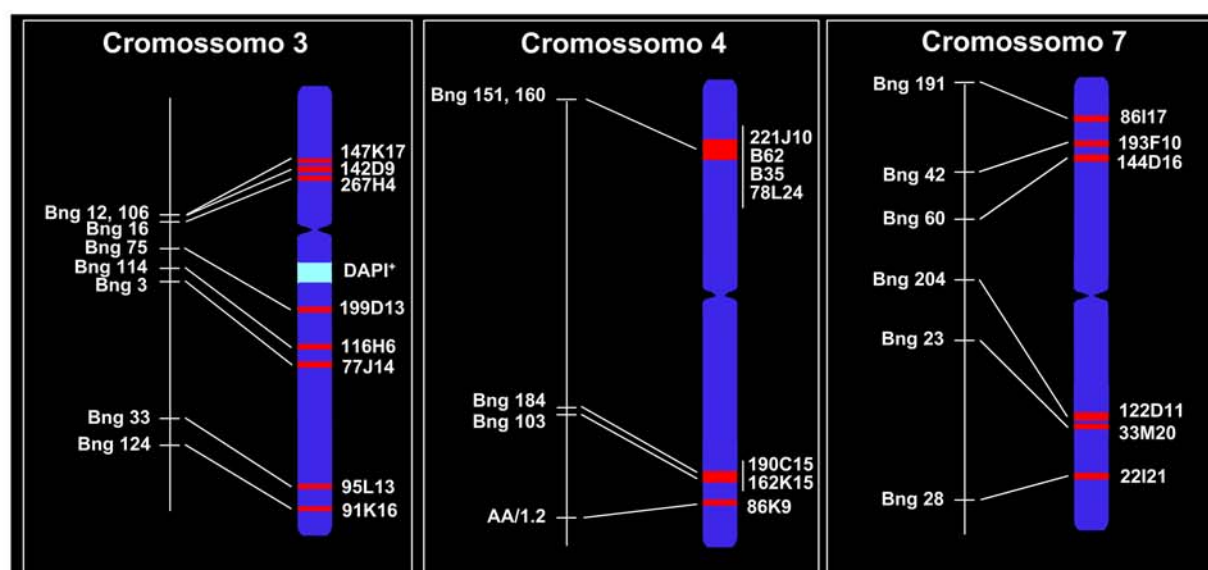


Figura 3 – Mapa físico de *P. lunatus* construído com a hibridização in situ de BACs selecionados com marcadores do mapa genético de *P. vulgaris* (linha à esquerda)

Primeiro Artigo

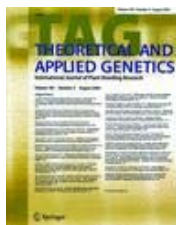
1. Acessos andinos de *P. vulgaris* mostraram elevado número de sítios de DNAr 45S, enquanto os acesso de origem Mesoamericana tiveram menor número
2. O número de sítios de DNAr 5S se manteve constante em acessos Andinos e Mesoamericanos de *P. vulgaris*
3. A posição terminal dos sítios de DNAr 45S favorece amplificação de sítios DNAr 45S em *P. vulgaris*

Segundo Artigo

4. A heterocromatina de *P. lunatus* está preferencialmente na região pericentromérica da maioria dos cromossomos
5. *Phaseolus lunatus* apresentou uma duplicação do sítio de DNAr 5S, já para o DNAr 45S não mostrou variação em acessos Andinos e Mesoamericanos
6. O cromossomo 6 de *P. vulgaris*, contendo sítio de DNAr 45S, é o homeólogo ao cromossomo de *P. lunatus* que contém o sítio de DNAr 45S
7. O cromossomo 10 de *P. vulgaris*, que possui um sítio de DNAr 5S, é o homeólogo ao cromossomo de *P. lunatus* que apresenta um sítio de DNAr 5S

Terceiro Artigo

8. *Phaseolus lunatus* e *P. vulgaris* possui uma conservação da macrossintenia cromossômica para os cromossomos 3, 4 e 7
9. O principal mecanismo de evolução entre *P. vulgaris* e *P. lunatus* parece ser a amplificação diferencial de DNA repetitivo



Theoretical and Applied Genetics

International Journal of Plant Breeding Research

Chief Editor: A.E. Melchinger

ISSN: 0040-5752 (print version)

ISSN: 1432-2242 (electronic version)

Journal no. 122

Springer Berlin Heidelberg

[Online version available](#)

[Online First articles available](#)

[Description](#) | [Editorial Board](#) | [Most viewed articles](#)

Instructions to authors

[Submission of manuscripts](#)

[Editorial office](#)

[Minimum requirements for experimental studies](#)

[Legal requirements](#)

[Open Choice](#)

[Manuscript preparation](#)

[Figures and tables](#)

[References](#)

[Electronic supplementary material](#)

[Further technical instructions](#)

[Excess charges](#)

[Proofreading](#)

[Online First](#)

[Offprints](#)

Submission of manuscripts

Authors are urged to submit their manuscripts to Theoretical and Applied Genetics online to facilitate quick and efficient processing. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times.

Theoretical and Applied Genetics has one central Editorial Office, which deals with all manuscripts. After submission, manuscripts are allocated to one of the Editors.

Manuscripts already rejected by Theoretical and Applied Genetics will not be considered for publication if they are resubmitted without major changes in issues raised by the communicating editor, which had caused its rejection after the first submission.

Please use the link below to log directly onto the site and upload your manuscript following the on-screen instructions.

[Submit online](#)

Editorial office

Albrecht E. Melchinger (Editor-in-Chief)

Eva Bauer (Managing Editor)

Jochen Reif (Managing Editor)

University of Hohenheim, Stuttgart (Germany)

E-Mail: tagedit@uni-hohenheim.de

Minimum requirements for experimental studies

-- QTL studies with segregating populations will be considered for publication only if the numbers of genotypes, test environments, and replications are appropriate for the complexity and environmental sensitivity of the trait and/or the study population.

- Studies based on field experiments need to be conducted in at least three test environments.

- Investigations based on molecular markers and/or biotechnology tools must provide sufficient information (e.g., primer sequences) for verification of the work by other researchers, unless these tools serve merely as an example for illustrating principles/approaches of broader interest beyond the specific trait/crop/process studied.

- Studies on EST or SSR development as well as BAC library construction and validation will be considered for publication only if they present clearly the applications of the particular technology for a topic related to theoretical and applied genetics in its genuine sense (i.e., they must have a clear genetic component and significant impact on plant breeding). Manuscripts focusing mainly on technical aspects of the aforementioned technologies are out of the scope of the journal.

- In accordance with the policy of the International Advisory Committee (IAC), nucleotide or amino acid sequence information described in manuscripts must be submitted in electronic form to one of the International Nucleotide Sequence Databases (DDBJ/EMBL/GenBank; see also <http://www.insdc.org/>) or to appropriate protein databases for release no later than the date of publication of the corresponding article in TAG. Please include proper accession numbers in the manuscript at the end of the Material and Methods section and refer to this in the letter of submission. Microarray gene expression data should comply with the minimum

information about microarray experiments standard (MIAME; www.mged.org/miame).

- For publication in TAG, research on plant genetic resources (PGR) must provide a highly significant new contribution to theoretical and/or applied aspects of PGR management and utilization. The work has to be of interest to a broader scientific community, i.e. not only of specific interest to PGR specialists.

Exceptions from minimum requirements will be accepted if they are followed by an explicit and sound justification by the author(s).

Legal requirements

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract, or as part of a published lecture, or thesis); that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

The "Copyright Transfer Statement" (CTS) will be attached to the proofs (see below), which will be provided by the publisher shortly after the manuscript has been accepted for publication. The CTS has to be signed and faxed back to the publisher together with the corrected proofs.

Open Choice

In addition to the traditional publication process, Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice (Springer's open access model). A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular article, but in addition is made freely available through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice upon acceptance of your manuscript, please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before free access publication.

[Order Open Choice](#)

Manuscript preparation

Manuscripts must be written in English. Accepted manuscript files will be edited on-screen, therefore, files need to be submitted as DOC or RTF files. Manuscripts should be written with 1.5-fold line spacing and should have numbered lines and 3cm-margins.

- Title page
 - A concise and informative title
 - The name(s) of the author(s).
 - The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
 - The e-mail address, telephone and fax numbers of the communicating author
- Abstract

The Abstract should not have more than 250 words and contains the rationale, objectives, methods, results, and their meaning or scope of application. Be specific. Do not cite references.
- Introduction

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature.
- Materials and methods

The Materials and methods section has to provide enough information to permit repetition of the experimental work. If the knowledge of primer, marker or gene sequences are an essential part of the results and needed to repeat the work, these sequences must be disclosed.
- Results

The Results section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible.
- Discussion

The Discussion should be an interpretation of the results and their significance with reference to work by other authors.
- Acknowledgements

The Acknowledgements should be as brief as possible. The names of funding organizations should be written in full.

Figures and tables

All Figures and Tables should be cited in the text, and each numbered consecutively throughout.

Color figures will always be published in color in the online version. In print, however, they will only appear in color if the author agrees to make a contribution of Euro 950/US \$ 1,150 (plus VAT) per article. Otherwise the figures will be printed in black and white.

- Figure parts should be identified by lower-case Roman letters.
- Inscriptions should be clearly legible.
- Magnifications should be indicated by scale bars.
- Figure legends must be brief, self-sufficient explanations of the illustrations. The legends should be placed at the end of the text.
- Tables should have a title explaining any abbreviation used in that table.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values).

References

References should only include works that have been published print and online. Papers

References should only include works that have been published print and online. Papers which have been accepted for publication should be included in the list of references with the name of the journal and "in press". Personal communications should only be mentioned in the text.

How to cite references:

Journals:

Kraft T, Hansen M, Nilsson N-O (2000) Linkage disequilibrium and fingerprinting in sugar beet. *Theor Appl Genet* 101:323–326

Journals should be abbreviated in accordance with international standards.

Books:

Larcher W (1995) *Physiological plant ecology*, 3rd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 87–109

Multiauthor books:

Hovind HJ (1986) Traumatic birth injuries. In: Raimondi AJ, Choux M, Di Rocco C (eds) *Head injuries in the newborn and infant. (Principles of pediatric neurosurgery)* Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 87–109

Web pages:

1. Article by DOI (with page numbers):

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 78:74–80. doi: 10.1007/s001090000086

2. Article by DOI (before issue publication with page numbers):

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). doi: 10.1007/s001090000086

3. Article in electronic journal by DOI (no paginated version):

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. doi: 10.1007/s001090000086

4. Online document:

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 1999

5. Online database:

Healthwise Knowledgebase (1998) US Pharmacopeia, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998

6. Supplementary material/private homepage:

Doe J (2000) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000

7. University site:

Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999

8. FTP site Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999

9. Organization site:

ISSN International Centre (1999) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

Electronic supplementary material

Electronic Supplementary Material (ESM) for a paper will be published in the electronic edition of this journal provided the material is:

- submitted in electronic form together with the manuscript
- accepted after peer review

ESM may consist of:

- information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use QuickTime, .avi, .mpeg, animated GIFs, or any other common file format)
- information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.
- large quantities of original data that relate to the paper, e.g. additional tables, large numbers of illustrations (color and black and white), etc.

Legends must be brief, self-sufficient explanations of the ESM. ESM is to be numbered and referred to as S1, S2, etc.

After acceptance for publication, ESM will be published as received from the author in the online version only. Reference will be given in the printed version.

Further technical instructions

Layout guidelines

- Use a normal, plain font (e.g., Times Roman) for text.
- Other style options:
 - for textual emphasis use italic types.
 - for special purposes, such as for mathematical vectors, use boldface type.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- For indents use tab stops or other commands, not the space bar.
- Use the table functions of your word processing program, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor of your word processing program or MathType for equations.
- Place any figure legends or tables at the end of the manuscript.

- Submit all figures as separate files and do not integrate them within the text.

Figures

The preferred figure formats are EPS for vector graphics exported from a drawing program and TIFF for halftone illustrations. EPS files must always contain a preview in TIFF of the figure. The file name (one file for each figure) should include the figure number. Figure legends should be included in the text and not in the figure file.

- Scan resolution: Scanned line drawings should be digitized with a minimum resolution of 800 dpi relative to the final figure size. For digital halftones, 300 dpi is usually sufficient.
- Color illustrations: Store color illustrations as RGB (8 bits per channel) in TIFF format.
- Vector graphics: Fonts used in the vector graphics must be included. Please do not draw with hairlines. The minimum line width is 0.2 mm (i.e. 0.567 pt) relative to the final size.

Data formats

Save your text file in RTF (Rich Text Format) or Microsoft Word compatible formats.

Excess charges

The first seven printed pages of each article will be published free of charge. Authors will be charged € 250 or US \$ 302, plus 16% VAT for each printed page exceeding this limit.

As of 5 July 2006

The first eight printed pages of each article will be published free of charge. However, authors will be charged € 250 or US \$ 302, plus 16% VAT for each printed page exceeding this limit.

Page estimate: 2.5 manuscript pages typed double-spaced in 12 pt font equal approximately one printed page (this includes figures and tables).

Proofreading

Authors are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the PDF file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content, e.g. new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the Editorial Office before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can only be made in exceptional cases and in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the paper.

Online First

Papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can already be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Offprints

One complimentary copy is supplied. Offprints are available at cost price and can be ordered by returning the order form with the corrected proofs

Instructions for Contributors

GENETICS publishes contributions that present the results of original research in genetics and related scientific disciplines. Although GENETICS is an official publication of the Genetics Society of America, contributors are not required to be members of the Society: publication in the journal is open to members and nonmembers alike. These instructions describe how to correctly format a manuscript for submission to GENETICS

SUBMITTING TO GENETICS

Do not submit manuscript directly to a member of the Editorial Board. You must upload your manuscript online at <http://submit.genetics.org>. Please ensure that your manuscript conforms to the proper format, described below. When you upload your manuscript, please provide the names of at least two associate editors. If not, we will assign one according to subject matter expertise. If you have trouble submitting your paper electronically, please contact the Editorial Office at

genetics-gsa@andrew.cmu.edu

(412) 268-1812 (phone)

(412) 268-1813 (fax)

or write

Managing Editor

GENETICS

Mellon Institute, Box I

4400 Fifth Avenue

Pittsburgh, Pennsylvania 15213-2683

Preparation of Research Articles

Manuscripts must be

- written in English with American spelling and correct grammar and punctuation
- in double-spaced, 12-point type throughout, including the Literature Cited section, appendices, tables, and legends
- printed on a single side of letter-sized paper with 1-inch margins
- held together with clips, not staples
- marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

Do not number lines in the margins.

Start each of the following numbered elements on a new page

1. **The title page** must contain

- a concise and informative title that includes the organism under study
- the authors' names
- the authors' institutional affiliations, including department; institution; and city, state or province, country if outside the United States, and postal code. **Do not** include districts or street addresses.

Indicate different affiliations with the superscript symbols *, dagger, double dagger, §

, **, dagger dagger, double dagger double dagger, §§

Indicate an author's present address with a numbered footnote.

Indicate a dedicatory footnote (if desired) with boldfaced type.

List sequence accession numbers in an unnumbered footnote on page 1 using the following wording:

Sequence data from this article have been deposited with the EMBL/GenBank Data Libraries under accession nos. XXXXXX-XXXXXX.

A paper otherwise found acceptable will not be published until accession numbers are provided. See the section below, **Sequences**, for more information on obtaining accession numbers.

2. **Page 2** must contain

- a short running head of about 35 characters, including spaces,
- up to five key words or phrases, and
- the corresponding author's name, mailing address including street name and number, phone and fax numbers, and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, ordering offprints, and arranging for the payment of page and author alteration charges.

3. **The Abstract** must be a single paragraph that

- does not exceed 200 words and
- does not contain references.

4. **The text** must be as succinct as possible. Present and discuss results just once, not in both the Results and Discussion sections. Discuss a possible explanation only if the results presented make a difference by allowing a resolution or posing a conundrum or paradox; ideas should not be discussed solely for the sake of completeness.

Manuscripts should conform to the style in recent issues of GENETICS, with particular attention to genetic symbols, in-text references, and the Literature Cited section. Differentiate between letters and numbers where they might be easily misrepresented, as with the typed letter l and the number 1 or the letter O and the number 0, by making penciled notations in the margins.

Text citations: In citations with two authors, include both names. In citations with three or more authors, name the first author and use "*et al.*" Cite only articles that are published or in press. When citing personal communications or unpublished results, list all contributors by initials and last name; do not use "*et al.*"

Numbers: In the text, write out numbers nine or less except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numbers for those larger than nine, except as the first word of a sentence; however, try to avoid starting a sentence with such a number.

Abbreviations: : Use abbreviations of the customary units of measurement only when they are preceded by a number: "3 min" but "several minutes." Write "percent" as one word, except when used with a number: "several percent" but "75%." To indicate temperature in centigrade, use ° (for example, 37°); include a letter after the degree symbol only when some other scale is intended (for example, 45°K).

Binomial names: Italicize names of organisms only when the species is indicated: *Neurospora*, but *Neurospora crassa* or *N. crassa*. Italicize the first three letters of the names of restriction sites, as in *HindIII*. Write the names of strains in roman except when incorporating specific genotypic designations.

Genotypes: Italicize genotype names and symbols, including all components of alleles, but not "+" indicating wild type

and not when the name of a gene is the same as the name of an enzyme. Carefully distinguish between genotype and phenotype in both the writing and the symbolism.

Headings: To divide text into sections, use only these levels of headings:

- Level 1: Centered, all capital letters

Example:

DISCUSSION

Use this level only for major sections of text, such as Materials and Methods and the Discussion.

- Level 2: Freestanding flush-left boldface

Example:

Background and Analysis

Use this level only to group two or more closely related level 3 headings in long articles.

- Level 3: Paragraph-initiating boldface, followed by a colon

Example:

Text: Manuscripts must be as succinct as....

This is the most frequently used subheading.

- Level 4: Paragraph-initiating italic

Example:

*Binomial names:*Italicize names of organisms...

Only level 4 headings may be numbered, but *only* when the numbers must be cited in the text.

5. **The acknowledgments**(optional)must be a single paragraph that

- immediately follows the discussion
- includes all references to grant support and institutional publication codes
- includes the full names (not abbreviations) of all granting agencies (example: National Institutes of Health).

6. **The Literature Cited** section lists only articles that are published or in press.

- Format citations as in a recent issue of GENETICS; cite parenthetical references in text chronologically
- Insert a space between an author's initials.
- Order citations alphabetically by first author.
- For multiple citations with the same first author, first list single-author entries by year using 1996a, 1996b, etc., as needed. Then list two-author entries alphabetically by second author. Finally, list entries by three or more authors (cited in the text as "FIRST *et al.* 1996") only by year and without regard to number of authors or alphabetical rank of authors beyond the first.
- For articles with more than five authors, list the first five names and then "*et al.*"

Sample journal article citation:

Bridges, C. B., and E. G. Anderson, 1925 Crossing over in the X chromosomes of triploid females of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **10**: 418–441.

(Note spaces between authors' initials and after the boldface colon.)

Sample book citation:

Sturtevant, A. H., and G. W. Beadle, 1939 *An Introduction to Genetics*. W. B. Saunders, Philadelphia.

Sample chapter-in-book citation:

Beadle, G. W., 1957 The role of the nucleus in heredity, pp. 3–22 in *The Chemical Basis of Heredity*, edited by W. D. McElroy and B. Glass. Johns Hopkins Press, Baltimore.

7. **Appendices** should be reserved for large bodies of data or arcane mathematical derivations that would disrupt the main text. Do not use appendices for briefer items requiring, for example, fewer than two typed pages.

8. **The tables** must each start on a new page.

- Give each a concise title.
- Double space all parts.
- Number each consecutively using Arabic numerals. Do not number consecutive tables 1A, 1B, etc., although interior parts of a table can be labeled A, B, etc., if necessary for easy reference in the text (but avoid this whenever possible).
- Define the boxhead and the bottom of the table with horizontal rules. Use shorter horizontal rules within the boxhead to indicate unambiguously which subheadings are subordinate to a higher-level heading. Use no vertical or diagonal rules. Use no horizontal rules between the boxhead and the closing rule. Give each column a title in the boxhead. Except in unusual circumstances, each boxhead entry should refer to material beneath it and not to material to the right.
- A table legend, if any, should precede footnotes. This legend should be separate from the table title.
- Indicate footnotes, typed directly below the table, with lowercase, superscript italic letters. Use *, **, and *** to indicate conventional levels of statistical significance, explained below the table.
- Do not include shading, color type, line drawings, graphics, or other illustrations within tables. Instead, prepare a separate, numbered figure to accompany the table.
- Table files must be Word documents and not in Picture Format.

9. **The figure legends** must each begin with a brief title leading into text. All conventional symbols used to indicate figure data points are available for typesetting; unconventional symbols should not be used.

10. **The figures** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Provide reproduction-quality figures as well as figures on disk.

- Size and proportion each to be reproduced or reduced to 3.25 or 7 inches wide.
- Lightly write the name of the first author and the figure number on a back corner of each.
- Indicate "up" with an arrow on the back of each.
- Do not number consecutive figures 1A, 1B, etc. Parts of a figure can be labeled A, B, etc., if necessary for easy reference in the text.
- If a figure is submitted in unattached parts, include a sketch of how these should be arranged in the printed version.
- Indicate important aspects of photographs with arrows or numbers.
- Halftones should be high-contrast, glossy prints with sharp detail, because some loss of detail and contrast is inevitable in the printing process. Good contrast is particularly important for chromatographs, such as gel separations.
- Make the size and proportion of each group of figures suitable for reproduction at, or reduction to, 3¼ or 7 inches wide.
- Drawings, graphs, mating-type charts, complex chemical formulas, and other sketches should be treated as numbered figures.

- Histograms should not be used to present data that can be captured easily in text or small tables, as they take up much more space
- When using symbols that are normally italicized, such as genotypes, use italic rather than underlined Roman characters.
- Italicize all mathematical variables.
- Do not use boldface labels.
- Be sure to distinguish between similar characters, such as the letter l and the number 1 or the letter O and the number 0.
- Be sure that the axes of graphs are exactly perpendicular and that all lines are of equal density.
- The size of numbers and letters in a figure should be suitable for reduction to no greater than 10 points and no less than 6 points. Use similar size lettering throughout a figure and in similar figures.
- Some figures, like genetic maps based on DNA polymorphisms, summarize large data sets of interest to other investigators. The data sets supporting such figures should be placed on the journal's web site (<http://www.genetics.org>) so that future researchers can build upon these studies.

11. **Sequences** may appear in text or in figures.

- For regions that have never been sequenced, DNA must be sequenced on both strands.
- New nucleotide data must be submitted and deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank databases and an accession number obtained before the paper can be accepted for publication. Submission into any one of the three collaborating databanks ensures data entry in all. Sequence data may be submitted on the World Wide Web:

DDBJ via SAKURA at <http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/>

EMBL via WEBIN at <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html>

GenBank via BankIt at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>

Or via Sequin at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>

- DNA, RNA, or protein sequences corresponding to equal or greater than 50 nucleotides must be entered into an appropriate data bank and the accession number must be provided before an article will be published. If a proof is found to lack an accession number, the article will be held back from publication until the number is provided.
- Long sequences, such as those requiring more than about two pages to reproduce, will not be published unless the reviewers and the Associate Editor agree that publication is necessary. An author wishing to include a long sequence not recommended for publication must agree to pay increased (unsubsidized) page charges for the extra pages.
- Complete mtDNA sequences will no longer be published in GENETICS. Relevant comparisons will be published if an accession number for the sequence in question is supplied.
- Authors must indicate that an unpublished sequence will be made available on disk or as hard copy to anyone requesting it.

Submission of Other Articles

Resubmission of Rejected Manuscripts is permitted a single time, unless repeat submission is encouraged by the Associate Editor. When submitting a previously rejected paper to a new Associate Editor, authors must fully disclose the paper's history with the journal. Authors are expected to use the reviewer's comments to revise rejected papers before submitting them anew.

Perspectives contributions are encouraged, but since these articles are scheduled many months in advance and must meet stringent copy deadlines, a Perspectives editor should be consulted well ahead of time. Perspectives articles may not be uploaded electronically. Authors receive free offprints and page charges are waived. The editors are

James F. Crow, Genetics Department
William F. Dove, McArdle Laboratory
University of Wisconsin
Madison, Wisconsin 53706

Genetics Education articles provide a scholarly forum for persons who have created new teaching instruments in their roles as educators. Authors are invited to submit articles that focus on effective ways for students at all levels to learn principles of genetics and to appreciate the implications of research in genetics. Genetics Education articles should be uploaded electronically. The editor is

Patricia J. Pukkila
Department of Biology
University of North Carolina
Chapel Hill, North Carolina 27599-3280

Notes are intended for the presentation of brief observations that do not warrant full-length articles. Submit Notes as you would a full-length article (including electronically); they will receive the same review. They are not considered preliminary communications but should complete the study.

- Each Note must have an abstract of 50 or fewer words.
- Do not use section headings in the body of the Note; report introduction, results, and discussion in a single section. Level 3 headings are permissible.
- The text should be kept to a minimum and if possible should not exceed 1000 words; the number of figures and tables should also be kept to a minimum.
- Materials and methods should be described in the figure legends or table footnotes.
- Place acknowledgments at the end without a heading.
- The Literature Cited section is identical to that of full-length articles.

Letters to the Editor dealing with research and theory in basic genetics or with social issues of particular interest to geneticists are welcomed. Letters to the Editor should be uploaded electronically. Constructive comments on the subjects of articles from recent issues of GENETICS are appropriate. Figures, complex tables, and complex mathematical formulas should be avoided. The Editorial Board will choose to publish those letters it considers most pertinent to the interests of the readers.

EDITORIAL REVIEW AND ACCEPTANCE

Articles will be examined by one or more reviewers selected for their competence in the subject matter of the article. Acceptance will be based on scientific merit, clarity of expression, objectivity of writing, and suitability for GENETICS. An article may be accepted in its original form or subject to revision by the author. The reviewers' comments will be provided to the author. Reviewers will not be identified except at their own request.

Manuscripts will not be returned to authors unless requested by the corresponding author at the time of submission.

Each published article will show the date that the original manuscript was received and the date that the final version was accepted at the GENETICS Editorial Office.

Upon acceptance, authors are required to upload accepted manuscript and figure source files to the Genetics online manuscript processing system, BenchPress. Until these files are received, your paper is not considered in production. Detailed instructions are found in the acceptance letter emailed by the associate editor handling your manuscript.

When uploading accepted manuscripts, Microsoft Word, TEX, and LaTeX files are acceptable. RTF format and PDF are not acceptable.

.

Electronic images must be provided, separate from the text. Art files must conform to the following minimum resolution specifications: • grayscale and color images: 300 dpi • combination grayscale and color images: 500–900 dpi • line art (Bitmap) images: 900–1200 dpi.

Suggestions for Preventing the Return of a Manuscript

While manuscripts with perfect format are unprecedented and many errors can easily be corrected by the Copyeditor, the following suggestions are likely to prevent a manuscript from being returned to the author for correction after it has passed scientific review but before it can be sent to the printer:

- Use double spacing everywhere to provide space for the copyeditor to write typesetting instructions. This is particularly important in the Literature Cited section and the tables. "One-and-a half" spacing is inadequate.
- Type long tables on several pages. Use wide paper or several standard-size sheets joined together for wide tables.
- Distinguish between phenotype and genotype for the reader not well versed in the subject. Italicize genotypes in the text, tables, legend, and figures. Because figures are reproduced photographically, genotypes in figures must be presented in italics. The genotype consists of gene names and allele designations; chromosome numbers or names need not be in italic type. Strain names should be presented in roman unless the strain designation is the same as the genotype.

Providing Unique Research Materials

Because the discoveries of science require continual verification, and progress in science depends so strongly upon prior investigations, it is crucial that key research materials developed by one scientist be made readily available to others. By publishing in GENETICS, authors describing unique research materials agree to provide them at reasonable cost to colleagues who request them. Examples of unique research materials are strains, gene clones, antibodies (including cell lines producing monoclonal antibodies), and computer programs. A colleague is any active investigator, whether or not in training. The donor may require the recipient to agree neither to use such materials for commercial purposes nor to transfer them to a third party without the consent of the donor.

Supplemental Data

Authors are invited to deposit large data sets and other supplements to published articles on our website at <http://www.genetics.org/supplemental>. The supplement will be cited in the published article. Access to supplements is provided to all readers, not just subscribers. For more information, please contact the Editorial Office.

Proofs

- The corresponding author will receive page proofs, the offprint order form, and proofreading instructions electronically as a PDF, via email.
- Proofs must be printed (single, not double, sided), corrected, and mailed to the printer within 2 days after receipt using a trackable express service.
- The article number must accompany all correspondence and appear on page 1 of the proof.
- The article may be delayed to a later issue if the corrected proofs are not returned promptly.
- The entire article should be proofread carefully, with extra attention to equations and symbols.
- All corrections must be sent together, simultaneously; additional corrections may cause extra charges and delay in publication.
- The original manuscript or figures can be returned to the author after publication, but such a request must be made before the manuscript has appeared in print.
- "Notes added in proof" require editorial approval. A copy should be sent to the Editor at the same time that proofs are returned to the printer to avoid postponing the article to a later issue.

Charges to the Author

- Page charges are \$65 per printed page. While no article will be refused because of an author's inability to pay page charges, authors citing grant support are assumed to have the resources. Authors who lack the requisite funds should explain their situation when submitting a manuscript.
- Members of the Genetics Society of America will pay \$100 for each color figure in an article, while nonmembers will be charged \$400 for the first color figure and \$250 for each subsequent color figure in an article.
- Authors are expected to pay all the extra costs of printing and handling an article that are made necessary by author alterations—changes in galley proof not due to printer's error—or by changes made necessary because the printer could not interpret the author's intention owing to poorly prepared copy, incorrect file formatting, extra rounds of corrections, or inadequately organized tables. Such charges will not be waived.
- Offprint order blanks will be sent to the author with the proofs. A price schedule is included on the order blank; it

is also available from the GENETICS Editorial Office

- All charges will be billed on one invoice soon after the article has been printed.

Correspondence Regarding Manuscripts

Manuscripts must be uploaded electronically at <http://submit.genetics.org> or submitted to the Editorial Office:

Tracey DePellegrin Connelly
Managing Editor
Email: td2p@andrew.cmu.edu
Genetics Editorial Office
Mellon Institute, Box I
4400 Fifth Avenue
Pittsburgh, PA 15213-2683
Telephone: (412) 268-1812
Fax: (412) 268-1813
E-mail: genetics-gsa@andrew.cmu.edu

Correspondence regarding manuscripts may be sent directly to an appropriate member of the [Editorial Board](#)