

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

Evolução cariotípica no gênero *Phaseolus* L.: mapeamento comparativo entre *P. microcarpus* Mart. e o feijão comum (*P. vulgaris* L.)

Recife
Fevereiro 2010

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

Evolução cariotípica no gênero *Phaseolus* L.: mapeamento
comparativo entre *P. microcarpus* Mart. e o feijão comum
(*P. vulgaris* L.)

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

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

Recife
Fevereiro 2010

Fonseca, Artur Felipe de Andrade

Evolução cariótica no gênero *Phaseolus* L.: mapeamento comparativo entre *P. microcarpus* Mart. e o feijão comum (*P. vulgaris* L.)/ Artur Felipe de Andrade Fonseca. – Recife: O Autor, 2010.

75 folhas : il., fig, tab.

Orientadora: Andrea Pedrosa-Harand.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Botanica, 2010.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Feijão 2. Vegetal- genética 3. Botanica I. Título.

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-215

ARTUR FELLIPE DE ANDRADE FONSECA

“EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA NO GÊNERO
Phaseolus: MAPEAMENTO COMPARATIVO ENTRE
Phaseolus microcarppus Mart. E O FEIJÃO COMUM
(*Phaseolus vulgaris* L)”.

BANCA EXAMINADORA:



Dra. Andrea Pedrosa Harand (Orientadora) – UFPE



Dra. Eliana Regina Forni Martins– UNICAMP



Dra. Ana Maria Benko Iseppon - UFPE

Recife- PE
2010

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

Evolução cariotípica no gênero *Phaseolus*: mapeamento comparativo entre *P. microcarpus* Mart. e o feijão comum (*P. vulgaris* L.)

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros titulares:

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

Prof^a. Dra. Ana Maria Benko Iseppon, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof^a. Dra. Eliana Regina Forni Martins, Depto. Biologia Vegetal, IB, UNICAMP

Membros suplentes:

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

Prof^o. Dr. Marccus Alves, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

*Dedico aos meus pais, Lili e Chico, e às minhas
irmãs, Danielle e Michelle, pelo amor e apoio
incondicional à minha dedicação à vida
científica.*

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais e minhas irmãs por me darem um lar repleto de amor e carinho, repleto de energias positivas que me reabastecem a cada dia. Agradeço ao mais novo membro da família que está por vir, o grande “macho alfa” Yuri, que já vem me trazendo várias alegrias. Agradeço ainda:

À minha namoradinha, Gabi Burle, por quem sou “abestaiado”, por me trazer muitas alegrias, muito carinho, e ser bastante compreensiva em relação à minha frequente falta de tempo, L .

À minha orientadora, Andrea, por ser uma pessoa forte e companheira, nos mostrando sempre os caminhos corretos e responsáveis da ciência.

À minha segunda família, Dona Dadá, Sr. Eduardo, eternamente carinhosos, e meus irmãos “Caê” e Bruno. Este em especial, demonstra a cada dia o valor da afinidade e cumplicidade entre irmãos não consanguíneos.

À minha terceira família, que reside no Laboratório de Citogenética Vegetal da UFPE, onde passo a maior parte da minha vida. Aos parceiros Gustavo, Silvo (the Kleio) e André, principais companheiros de diversões extra-laboratoriais. À minha irmã científica Joana, companheira de chope e do mais bizarro quarto que já me hospedei, huahua. Liliiii, sempre do meu lado, e apesar de ser rubro-negra, é uma ótima pessoa. Agradeço ainda, à Sandrinha (aperreio em forma de gente), Sr. Tiago (quando não tá correndo é gente boa demais), Lidiane (doidinha varrida), Leo Félix (tranquilidade em pessoa), Ana Emília (sempre presente), Aretuza (tuntz, tuntz...), Gabi (boba), Fernando (apai) e Nice (sempre prestativa). Do lab, só faltou o professor Marcelo Guerra, pela estrutura e ensinamentos para todos nós.

A todos os funcionários, alunos e professores que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal – UFPE (PPGBV).

Obrigado a todos!

Sumário

1. Apresentação	1
2. Revisão da Literatura.....	5
2.1. Citogenética em Plantas	6
2.1.1. Coloração convencional	6
2.1.2. Coloração diferencial	7
2.1.2.1. Tratamento a frio	7
2.1.2.2. Bandeamento G	7
2.1.2.3. Bandeamento C	7
2.1.2.4. Fluorocromos.....	8
2.1.3. Citogenética molecular.....	10
2.1.4. Mapas genéticos	10
2.1.5. Mapas genéticos comparados.....	11
2.1.6. Mapeamento físico	12
2.1.7. Bibliotecas genômicas.....	13
2.1.8. FISH	13
2.1.9. BAC-FISH.....	14
2.1.10. Sequências repetitivas	16
2.1.12. Sequências repetitivas em FISH.....	17
2.1.13. Filogenias	17
2.2. O gênero <i>Phaseolus</i> L.	19
2.2.1. Caracterização e filogenia	19
2.2.2. Citogenética de <i>Phaseolus</i>	20
2.2.3. Mapeamento comparativo	21
3. Referências bibliográficas	23
4. Artigo a ser submetido à revista “Chromosome Research”	34
Evolução cariotípica no gênero <i>Phaseolus</i> : mapeamento comparativo entre <i>Phaseolus microcarpus</i> Mart. e o feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	35
Resumo.....	36
Introdução.....	36

Materiais e Métodos	38
Resultados	422
Discussão.....	44
Agradecimentos.....	50
Referências bibliográficas	50
Legendas.....	58
5. Conclusões	66
6. Anexo	68

Resumo

O gênero *Phaseolus* apresenta grande importância econômica no mundo, principalmente por ser uma das principais fonte de proteínas para alimentação humana. Estudos cariotípicos no gênero têm acompanhado os avanços das técnicas citogenéticas em plantas, desde análises convencionais até estudos comparativos de mapas citogenéticos construídos através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Cromossomos artificiais de bactérias (BACs) foram utilizados como sondas em FISH na comparação entre os mapas de *P. vulgaris* ($2n = 22$), principal representante de gênero, e *P. lunatus* ($2n = 22$), uma espécie filogeneticamente próxima, revelando uma total conservação de sintonia e apenas três quebras de colinearidade. Visando estender os conhecimentos acerca da evolução do gênero, o presente estudo utilizou esses mesmos marcadores em FISH para evidenciar os principais eventos cromossômicos ocorridos entre *P. vulgaris* e *P. microcarpus* ($2n = 22$), uma espécie selvagem e distante filogeneticamente. Análises de bandeamento CMA/DAPI e localização de sítios de DNAr 5S e 45S e da sequência telomérica também foram realizadas. O estudo revelou que, apesar da distância filogenética entre as duas espécies, houve uma forte conservação de sintonia entre os homeólogos e apenas quatro quebras de colinearidade. Apenas eventos de inversão cromossômica foram propostos, justificando sua estabilidade numérica. Além disso, foram evidenciados padrões distintos de hibridização entre sequências repetitivas para uma mesma região cromossômica. Os resultados demonstraram que em *Phaseolus* a evolução cromossômica parece estar relacionada a eventos de rearranjo raros e de pouca complexidade, confirmando sua aparente estabilidade cariotípica postulada em estudos convencionais.

Palavras-chave: Feijão comum, BACs, FISH, sequências repetitivas

Abstract

The genus *Phaseolus* is economically important worldwide, mainly for being a source of proteins for the human diet. Karyological studies in the genus have accompanied the advances in the cytogenetic techniques, from classical cytogenetic studies to construction of comparative maps using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Bacterial artificial chromosomes (BACs) have been used as probes in FISH experiments to compare the physical maps of *P. vulgaris* ($2n = 22$), main representative of the genus, and *P. lunatus* ($2n = 22$), a closely related species. This analysis showed a conservation of synteny between both species and only three breakdowns in collinearity. In order to expand the knowledge about the evolutionary history of the genus, the same FISH probes were used in the present work to detect the main chromosome rearrangements that have occurred between *P. vulgaris* and *P. microcarpus* ($2n = 22$), which is a wild, distantly related species. CMA/DAPI banding and the localization of the 5S and 45S DNA sites, as well as the telomeric DNA sequence, were also performed. The results demonstrated that, in spite of the phylogenetic distance between both species, there was a strong conservation of synteny between homoeologous chromosomes and only four breakdowns in collinearity. Chromosome inversions were the only events proposed for the genus, justifying its high chromosome number stability. Moreover, different hybridization patterns for repetitive DNA sequences were observed for the same chromosome region between species. Our results have shown that chromosome evolution in *Phaseolus* seems to be related to rare and less complex chromosome rearrangements, what is in accordance to its chromosome stability, postulated by classic cytogenetic analyses.

Keywords: Common bean, BACs, FISH, repetitive sequences

1. Apresentação

1. Apresentação

O gênero *Phaseolus* constitui um dos mais importantes gêneros da família Fabaceae com cerca de 75 espécies, das quais cinco se destacam pela importância econômica: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* e *P. polyanthus* (Broughton et al., 2003). Entre essas espécies, o feijão comum (*P. vulgaris*) se destaca como a principal fonte de alimento para diversas populações, principalmente da África e América Latina (Acosta-Gallegos et al., 2007). O gênero é exclusivamente americano e sua filogenia indica uma origem monofilética a partir da qual duas linhas evolutivas foram seguidas, representadas pelos clados A e B (Delgado-Salinas et al., 2006). Todas as espécies de importância econômica pertencem ao clado B, talvez por apresentarem características em comum que lhes proporcionaram uma maior viabilidade na domesticação, como grande tolerância aos distúrbios ambientais, capacidade de habitar os mais diversos ambientes e florescimento nas mais diversas estações (Delgado-Salinas et al., 2006).

Devido à importância do gênero, um consórcio internacional envolvendo os mais variados países foi estabelecido, visando à produção de linhagens melhoradas principalmente para o feijão comum (Broughton et al., 2003). Como parte desse esforço, um mapa cromossômico foi recentemente estabelecido para a espécie utilizando sequências genômicas clonadas em cromossomos artificiais de bactérias (BACs) e selecionadas com marcadores moleculares de um mapa genético pré-estabelecido. Esses BACs foram utilizados como sondas em hibridização *in situ* fluorescente (FISH) permitindo identificar e caracterizar os 22 cromossomos do conjunto diplóide, além de relacionar as distâncias físicas e genéticas entre seus mapas (Pedrosa et al., 2009; Fonsêca et al., 2010).

O mapa cromossômico do feijão comum disponibilizou uma grande quantidade de marcadores cromossomo-específicos, posteriormente utilizados no mapeamento comparativo

com a fava, *P. lunatus* ($2n = 22$) (Almeida, 2006; Bonifácio, 2009), espécie bastante consumida no nordeste brasileiro (Oliveira et al., 2004). Embora seja a mais distante dentre as cultivadas, ambas as espécies são próximas filogeneticamente (Delgado-Salinas et al., 2006) (localizadas no clado B) e revelaram uma completa sintenia entre os cromossomos homeólogos. Apenas três quebras de colinearidade foram observadas entre os dois genomas, sendo sugeridas ao menos três inversões cromossômicas entre as duas espécies, nos cromossomos 2, 9 e 10, para explicar tais diferenças (Bonifácio, 2009). Estudos semelhantes utilizando clones de BACs cópia única já foram realizados em outras espécies vegetais. Através deles, por exemplo, foi possível revelar os principais eventos ocorridos na evolução cromossômica de espécies da família Brassicaceae, incluindo a espécie modelo *Arabidopsis thaliana* (Lysak et al., 2006; Mandáková e Lysak, 2008). Além disso, sequências repetitivas utilizadas como marcadores cromossômicos têm permitido estabelecer relações evolutivas entre espécies relacionadas (Lim et al., 2000).

No caso do feijão comum o mapeamento cromossômico revelou que cerca de 43% do seu genoma é constituído de sequências repetitivas com distribuição pericentromérica e subtelomérica (Fonsêca et al., 2010). As sequências repetitivas pericentroméricas parecem estar conservadas em todos os cromossomos de *P. lunatus*, com algumas diferenças. Ao contrário, sinais de hibridização das sequências subteloméricas isoladas de *P. vulgaris* não foram observados nessa espécie (Almeida, 2006; Bonifácio, 2009).

O presente estudo teve como objetivo expandir a análise sobre a evolução cariotípica do gênero *Phaseolus*. Para isso, BACs provenientes do mapa cromossômico do feijão comum, assim como sondas para DNAr e telômeros foram utilizados no mapeamento comparativo da espécie selvagem *P. microcarpus*, a primeira espécie do clado A analisada através da técnica. A ocorrência de rearranjos cromossômicos e alterações nos padrões de sequências repetitivas

foram analisadas em relação à distância filogenética entre o feijão comum e *P. microcarpus*. Os resultados obtidos, somados aos dados disponíveis para *P. lunatus*, propiciaram um melhor entendimento da evolução cromossômica em *Phaseolus*.

2. Revisão da Literatura

2.1. Citogenética em Plantas

2.1.1. Coloração convencional

As técnicas de coloração convencional permitem estabelecer o cariótipo de diversas espécies vegetais, caracterizando o número e morfologia dos cromossomos, e, em alguns casos, a presença da constrição secundária (Marchant, 1973; Brighton e Ferguson, 1976; Jarolimova, 1994; Mercado-Ruaro e Delgado Salinas 1996, 1998). Essas técnicas se caracterizam por evidenciar uniformemente os cromossomos, sem nenhuma preferência por tipos de cromatina, composição do DNA ou proteínas (Guerra e Souza, 2002). Colorações com hematoxilina, orceína ou Feulgen são mais adequadas para observações de cromossomos grandes por serem mais simples e permitirem uma visualização rápida e direta. Por outro lado, corantes como Giemsa ou hematoxilina, mais intensos e de melhor contraste devem ser utilizados para cromossomos pequenos (Guerra e Souza, 2002).

A similaridade cariotípica em vários grupos de espécie, entretanto, impossibilita, na maioria das vezes, a distinção dos mesmos (Lackey, 1980; Dvorak e Dadakova, 1984). Os trabalhos destinados apenas à caracterização cromossômica das espécies foram sendo substituídos muitas vezes por estudos comparativos envolvendo táxons relacionados, nos quais algumas tendências evolutivas foram sugeridas (Stedje, 1989; Dimitrova e Greilhuber, 2000). Mesmo baseando-se apenas em coloração convencional Stebbins (1971) propôs que os gêneros apresentam certos padrões cromossômicos evolutivos, embora eles não sejam universais. Segundo suas teorias, o aumento da especialização em plantas tem sido acompanhado pela redução do tamanho do genoma e pelo aumento da assimetria cariotípica, como observado em espécies pioneiras de Asteraceae.

2.1.2. Coloração diferencial

2.1.2.1. Tratamento a frio

Diversos estudos citogenéticos baseados em diferentes propriedades da cromatina foram utilizados comparativamente em espécies vegetais. Uma das mais antigas técnicas se baseia na reatividade diferencial da cromatina quando submetida à baixa temperatura. Quando utilizada em *Paris hainanensis*, por exemplo, esta técnica revelou diferenças intra-específicas nos segmentos cromossômicos associadas a regiões ricas em AT (adenina e timina). Essas diferenças foram confirmadas após a utilização de diferentes fluorocromos, evidenciando ainda um claro evento de translocação em uma das populações (Punina et al., 2001).

2.1.2.2. Bandeamento G

Outra técnica utilizada em citogenética é o bandeamento G, a qual evidencia diferenciações lineares ao longo dos cromossomos incluindo regiões ocupadas pela heterocromatina constitutiva (Vosa, 1985). Esta técnica tem sido utilizada apenas em vertebrados superiores, uma vez que as bandas G não são evidenciadas em plantas, vertebrados inferiores e insetos. Várias teorias tentam explicar a ineficácia desta técnica em plantas. Segundo Greilhuber (1977), os cromossomos de plantas são mais compactos do que os de mamíferos durante a mitose impedindo a resolução das bandas na análise microscópica. Apesar disso, alguns estudos em plantas foram realizados utilizando a técnica. Song e colaboradores (1994), por exemplo, analisaram o padrão de bandas G em seis espécies da família Poaceae adaptando o método e garantindo a estabilidade dos resultados. Embora alguns estudos semelhantes tenham sido propostos, essa técnica parece não ter obtido a confiança necessária no meio científico.

2.1.2.3. Bandeamento C

Uma das técnicas de bandeamento mais utilizadas em plantas é denominada bandeamento C, a qual se baseia nos padrões gerados após a remoção diferencial das frações

da cromatina, evidenciando blocos de heterocromatina constitutiva ao longo de seus braços (Schwarzacher et al., 1980). A técnica permite a identificação de rearranjos cromossômicos, cromossomos homeólogos e estabelecimento de relações entre espécies, sendo principalmente útil em estudos envolvendo cromossomos grandes. Em centeio, por exemplo, os padrões de bandas C permitiram identificar os seus cromossomos homeólogos no trigo. Além disso, a similaridade no padrão de bandas dos cromossomos A e B devem indicar similaridades básicas em estruturas e talvez em função (Gill e Kimber, 1974). Em gimnospermas, as espécies *Cycus revoluta* Thumb. ($2n = 22$), *Ginkgo biloba* L. ($2n = 44$) e *Pinus densiflora* Sieb. e Zucc ($2n = 24$), evidenciaram padrões de bandas C bastante distintos umas das outras, refletindo as suas diferenças estruturais (Tanaka e Hizume, 1980). No gênero *Zea* a análise das bandas C de quatro espécies permitiu evidenciar similaridades cariotípicas que refletem as suas classificações com dados morfológicos. *Zea nicaraguensis* é muito mais similar a *Z. luxurians*, como já era esperado, do que com *Z. diploperennis*, todas da seção *Luxuriantes*. *Zea mays* ssp., representando a outra seção, *Zea*, das subespécies cultivadas, foi a mais divergente quanto ao padrão de bandas (Ellneskog-Staam et al., 2007).

2.1.2.4. Fluorocromos

Mais recentemente, a evidenciação de blocos heterocromáticos por meio de fluorocromos tem facilitado de forma bastante significativa as análises cariotípicas em plantas. Os fluorocromos mais utilizados na atualidade são o 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que evidencia regiões heterocromáticas ricas em AT (adenina e timina), e a cromomicina A3 (CMA), que evidencia regiões ricas em GC (guanina e citosina) (Schweizer, 1976).

As análises citogenéticas com fluorocromos têm permitido, entre outras coisas, identificar os cromossomos homólogos em espécies que apresentam grandes similaridades cariotípicas. No gênero *Pinus*, por exemplo, as espécies *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. e *P.*

thunbergii Parl., ambas com $2n = 24$ e distribuídas em ambientes montanhosos e costeiros, respectivamente, podem ser cruzadas facilmente. Ambas as espécies foram submetidas ao bandeamento combinado utilizando os fluorocromos CMA e DAPI, tornando possível a identificação de todos os pares cromossômicos de cada complemento. Além disso, apesar de *P. densiflora* e *P. thunbergii* possuírem número e morfologia bastante semelhantes, ao menos seis cromossomos evidenciaram diferenças no padrão de bandas sugerindo a drástica mudança na composição de bases nas bandas proximais acompanhada de especiação em *Pinus* (Hizume et al., 1989). Um estudo semelhante foi realizado por Guerra (1993), que identificou e comparou os cromossomos homeólogos de seis espécies do gênero *Citrus*. A dupla coloração CMA/DAPI permitiu classificar os cromossomos, morfológicamente indistinguíveis, em seis tipos quanto ao padrão de bandas CMA⁺. Além disso, a técnica permitiu revelar ao menos um par heterozigoto para bandas CMA/DAPI em cada espécie confirmando a origem híbrida das mesmas devido à grande viabilidade de hibridações interespecíficas e intergenéricas em *Citrus*.

Em muitas análises citogenéticas de plantas a combinação de diferentes técnicas foi utilizada a fim de estabelecer diferenças mais refinadas no que diz respeito às análises comparativas entre táxons próximos. Sendo assim, técnicas de coloração convencional associadas ao bandeamento C e com fluorocromos puderam ser utilizadas em análises comparativas entre grupos, além de permitir inferir relações de parentesco entre os mesmos (Sheikh e Kondo, 1995; Guerra et al. 2000). Por exemplo, as sete espécies do gênero *Pyrrhocactus* (Cactaceae) puderam ser distinguidas citologicamente com a utilização de coloração convencional associada ao bandeamento CMA/DAPI. Os resultados obtidos nesse estudo permitiram sugerir que a diversificação do gênero não esteve associada a grandes rearranjos cromossômicos ou poliploidia, mas ao acúmulo de pequenas mudanças estruturais (Peñas et al., 2008).

2.1.3. Citogenética molecular

A partir dos avanços científicos e tecnológicos, novas ferramentas moleculares foram sendo desenvolvidas e incorporadas aos estudos citogenéticos, revelando de forma muito mais detalhada as relações entre o genoma e as estruturas cromossômicas das espécies vegetais. Além disso, diferentes abordagens vêm sendo destinadas ao uso dessas ferramentas, incluindo, por exemplo, o mapeamento de sequências e suas relações com a cromatina (Saunders e Houben, 2001; Islam-Faridi et al., 2002; David et al., 2009), além de análises comparativas entre diferentes táxons (Kato et al., 2004; Lim et al., 2004; Mandakova e Lysak 2008).

2.1.4. Mapas genéticos

Thomas Morgan, trabalhando com genes autosômicos em *Drosophila melanogaster*, propôs a idéia de que as variações nas proporções esperadas pela segunda lei de Mendel da progênie recombinante se deviam ao fato que estes genes se encontravam ligados no mesmo cromossomo. Com seus estudos em diversos genes ligados, ele observou que as proporções da progênie recombinante variavam consideravelmente e propôs que essa variação na frequência de recombinação devia, de alguma forma, refletir a distância entre os genes no cromossomo. Em 1913, A.H. Sturtevant, um aluno de Morgan, propôs que os genes se localizam em uma ordem linear no cromossomo, construindo o primeiro mapa genético. Além disso, Sturtevant sugeriu o uso da porcentagem de recombinantes como indicador quantitativo das distâncias gênicas num mapa genético (Griffiths et al., 1998).

O estabelecimento dos mapas genéticos, também conhecidos como mapas de ligação, tem como base as frequências de recombinação entre diferentes marcadores medidas em centiMorgans (cM), que indicam as distâncias relativas que os separam. Os primeiros mapas genéticos foram baseados em dados citológicos e morfológicos e eram limitados pela quantidade reduzida de marcadores disponíveis e pelo tempo necessário para as análises

fenotípicas (Rick e Yoder, 1988; Basset, 1991). Como a utilidade dos mapas de ligação está intimamente associada com a densidade de marcadores mapeados, quanto mais denso for o mapa, mais informações poderão ser obtidas (Harushima et al., 1998). Embora as análises com marcadores morfológicos contribuíssem de forma significativa na construção dos mapas genéticos, esses mapas foram enriquecidos pelo uso de marcadores moleculares. O uso desses marcadores moleculares, dentre os quais se destacam os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SSRs (*Simple Sequence Repeats*), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), possibilitou a construção de mapas para ilimitadas espécies de plantas em períodos relativamente curtos, comparados aos mapas baseados em dados morfológicos. Esses mapas são utilizados em análises filogenéticas e em melhoramento de plantas através da clonagem de genes, análises de sintenia e estudos envolvendo seleção assistida por marcadores (Carneiro e Vieira, 2002).

Visando estabelecer um mapa de ligação mais denso para o feijão comum, três importantes mapas de ligação (Vallejos et al., 1992; Nodari et al., 1993; Adam-Blondon et al., 1994), constituídos predominantemente de marcadores RFLPs e RAPDs, foram reunidos em um mapa consenso através do mapeamento de diversos marcadores em uma nova população de mapeamento agora baseada em linhagens endogâmicas recombinantes (Freyre et al, 1998). A mais recente extensão do mapa consenso contribuiu com a integração de 282 novos marcadores, incluindo AFLPs, EST-SSR (marcadores microssatélites desenvolvidos a partir de *Expressed Sequence Tags*) e RGA (*Resistance Gene Analogs*), os quais permitiram situar novos marcadores em alguns *gaps* existentes, relacionados a doenças como antracnose e ferrugem (Hanai et al., 2010).

2.1.5. Mapas genéticos comparados

As análises comparativas entre mapas genéticos foram importantes para o entendimento evolutivo da estrutura genômica de alguns grupos de plantas. Estudos

comparativos entre os mapas genéticos das espécies *Brassica rapa*, *B. nigra* e *B. oleraceae* permitiram evidenciar que os diferentes números cromossômicos (8, 9 e 10) refletem uma grande quantidade de rearranjos ocorridos durante a evolução. Tanto eventos de fissão como de fusão foram evidenciados entre os cariótipos observados, confirmando a estabilidade no tamanho do genoma revelada por Arumuganathan e Earle (1991). Além disso, algumas sequências únicas e duplicadas em *B. nigra* não estavam conservadas nas outras duas espécies, sugerindo que eventos independentes de perda de sequências e duplicação tenham ocorrido entre as mesmas (Lagercrantz e Lydiate, 1996). Um estudo semelhante envolvendo os mapas genéticos da berinjela (*Solanum melongena*) e do tomate (*Solanum esculentum*) revelou 28 rearranjos estruturais envolvendo os seus 12 grupos de ligação. Desses 28 rearranjos, 23 são explicados por inversões paracêntricas e cinco por eventos de translocação (Doganlar et al., 2002).

2.1.6. Mapeamento físico

Outras estratégias de mapeamento permitem a construção de mapas físicos, os quais consistem na representação em pares de bases ou em micrômetros das distâncias entre duas sequências de DNA, diferente de mapas de ligação, que refletem distâncias relativas estimadas a partir da frequência de recombinação entre dois marcadores e medidas em cM (Pedrosa-Harand e Guerra, 2004). Atualmente existem três formas de se construir um mapa físico. A primeira se baseia na correlação entre ausência de determinado marcador e ausência de um fragmento cromossômico em estoques citogenéticos de deleções e translocações. A segunda, na construção de sequências contíguas (*contigs*) de BACs (cromossomos artificiais de bactérias) ou YACs (cromossomos artificiais e levedura) abrangendo parte ou todo o genoma. E a última é através do mapeamento de clones de DNA diretamente nos cromossomos através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (Jiang e Gill, 2006).

2.1.7. Bibliotecas genômicas

Bibliotecas genômicas constituídas por clones contendo grandes insertos são importantes ferramentas utilizadas na construção de mapas físicos. Os clones obtidos por ligação entre grandes fragmentos de DNA genômico e vetores BACs (cromossomos artificiais de bactérias) ou YACs (cromossomos artificiais de levedura) são os mais utilizados por terem a capacidade de armazenar insertos contendo centenas de quilobases (Peterson et al., 2000). As bibliotecas de BACs, com insertos de aproximadamente 200kb, são muito mais utilizadas devido ao fato de apresentarem baixos níveis de quimerismo, alta eficiência de clonagem, além de fácil isolamento e manipulação dos insertos de DNA (Song et al., 2000). Devido às suas vantagens, inúmeras bibliotecas foram construídas em plantas a partir da utilização desse tipo de clone, armazenando em média insertos de aproximadamente 100 kb (Men et al., 2001, Yang et al., 2003; Wu et al., 2004).

2.1.8. FISH

As bibliotecas genômicas podem ser utilizadas como fonte de sequências de DNA na técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Nesta técnica as sequências marcadas são utilizadas como sondas, pareando com sua sequência homóloga presente no cromossomo e sendo detectada por microscopia, revelando sua localização. Dentre outras moléculas utilizadas na marcação das sondas, os fluorocromos são os mais utilizados na atualidade. Apresentam grande sensibilidade, permitem a utilização de múltiplas sondas em cores diferentes, além de não serem radioativas, como as primeiras moléculas utilizadas (Guerra, 2004).

A técnica de FISH pode ser utilizada em conjunto com diversas outras ferramentas para caracterizar mais detalhadamente o complemento cromossômico de várias espécies vegetais. Por exemplo, sondas contendo sequências de DNAr 45S foram utilizadas em FISH associadas às técnicas de coloração com nitrato de prata e bandeamento CMA/DAPI para

comparar cariotipicamente as espécies da família Pteridaceae, *Acrostichum aureum* L. e *A. danaeifolium* Langsd. & Fisch (ambas com $2n = 60$). Apesar das poucas diferenças citológicas, os resultados indicaram que a presença de bandas CMA+ e sítios de DNAr 45S foram bastante úteis para a distinção das duas espécies (Marcon et al., 2003). Um estudo semelhante ao de *Acrostichum* foi realizado em seis espécies do gênero *Spondias*, incluindo o suposto híbrido umbu-cajá e seus possíveis parentais, *Spondias monbim* e *S. tuberosa*. Embora o umbu-cajá apresente características morfológicas intermediárias entre essas duas espécies, o estudo citogenético revelou que nenhuma delas constitui o verdadeiro parental, nem mesmo as outras três espécies analisadas, sugerindo que essas características tenham surgido independentemente (Almeida et al., 2007). Diversos outros estudos vêm sendo incrementados com o uso de FISH associada com técnicas convencionais (Carvalho et al., 2005; Souza et al., 2009). Apesar disso, Hasterok e Maluszynska (2000) estudando a espécie *Brassica napus* L. destacaram a dificuldade de se distinguir os diferentes pares cromossômicos da espécie, indicando a necessidade de introdução de marcadores cromossomo-específicos para esse tipo de análise.

2.1.9. BAC-FISH

Os clones de BACs são bastante utilizados como sondas cromossomo-específicas em FISH por serem de fácil visualização devido à intensidade do sinal, mesmo quando apresentam como inserto sequências cópia-única. Esta técnica promove a identificação dos cromossomos, não exige qualidade especialmente elevada na preparação de lâminas, pode ser utilizada em diplóides e poliplóides, além de ser indicada para espécies com números cromossômicos elevados ou pequenos, desde que o tamanho do genoma não seja muito grande. Dong e colaboradores (2000) utilizaram uma biblioteca de batata contendo 23.808 clones para a seleção de clones de BACs que foram marcados como sonda e utilizados para a identificação dos 12 cromossomos do complemento. Essa caracterização disponibilizou dados

para estudos mais detalhados de cada cromossomo, além de gerar ferramentas para análises comparativas com outras espécies de Solanaceae, como o tomate, por exemplo. Os 13 pares cromossômicos de *Gossypium arboreum* puderam ser identificados em uma só FISH com a utilização de um coquetel contendo 22 sondas de BACs e de sequências contendo sítios de DNAr 5S e 45S. Além disso, a localização desses marcadores foi comparada com o mapa genético construído para a espécie (Wang et al., 2008). A correlação entre os mapas citogenético (físico) e genético podem mostrar variações nas distâncias e localizações entre marcadores (Howell et al., 2006). Um exemplo pode ser evidenciado em uma comparação entre as distâncias física e genética de marcadores mapeados no cromossomo 1 de sorgo. A proximidade de marcadores genéticos na região mediana do grupo de ligação não corresponde a distâncias equivalentes no cromossomo, indicando que a recombinação é inibida em presença da heterocromatina pericentromérica (Islam-Faridi et al., 2002).

As análises utilizando clones de BACs cromossomo-específicos também têm sido utilizadas em estudos comparativos entre espécies pertencentes a uma mesma família, como no caso das brássicas (Lysak et al., 2006). Neste estudo, um conjunto de BACs cromossomo-específicos marcados como sonda foi utilizado no mapeamento comparativo entre as seguintes espécies da família Brassicaceae: *Arabidopsis thaliana* ($n = 5$), *A. lyrata* ($n = 8$), *Capsella rubella* ($n = 8$), *Neslia paniculata* ($n = 7$), *Turritis glabra* ($n = 7$) e *Hornungia alpina* ($n = 6$). A partir do pressuposto número cromossômico ancestral ($n = 8$), foi possível elucidar os mecanismos de evolução formadores dos cariótipos de *A. thaliana* e das espécies relacionadas. O estudo revelou então que os eventos responsáveis pela diminuição do número cromossômico de *Arabidopsis thaliana* foram: a geração de cromossomos acrocêntricos a partir de inversões pericêntricas, translocação recíproca entre dois cromossomos, e ainda a eliminação de um microcromossomo proveniente dessa translocação (Lysak et al., 2006). Além disso, com a utilização da pintura cromossômica para análises de colinearidade, foi

proposto um modelo para elucidar quais os rearranjos envolvidos na formação de espécies da família Brassicaceae com $n = 7$, surgidas a partir de um único ancestral com $n = 8$. Cinco cromossomos compartilhados entre o ancestral das Brassicaceae ($n = 8$) e o ancestral Proto-Calepineae ($n = 7$) indicaram a origem comum de ambos os cariótipos. A explicação mais parcimoniosa sugere que a redução de $n = 8$ para $n = 7$ tenha surgido a partir de três eventos de translocação e dois eventos de inversão, não sendo encontrados eventos de duplicação ou deleção entres as regiões “pintadas” das diferentes espécies (Mandáková e Lysak, 2008).

2.1.10. Sequências repetitivas

As sequências repetitivas são pouco conservadas e as principais responsáveis pela variação do tamanho do genoma em plantas (Meyers et al., 2001). Estas são caracterizadas por apresentarem várias cópias ao longo do genoma, sendo geralmente classificadas em: sequências repetitivas em tandem (microsatélites, minissatélites e DNA satélite) ou sequências repetitivas dispersas (elementos transponíveis) (Schweizer et al., 1990). As sequências em tandem geralmente estão associadas aos sítios de DNAr 45S e às regiões centroméricas e subteloméricas, enquanto que sequências repetitivas dispersas podem ser encontradas ao longo de todo o genoma (Jelinek e Schmid, 1982; Guerra, 2004). As taxas de evolução são mais rápidas nestas sequências em relação às sequências cópia única ou de baixa repetição, principalmente por não estarem sujeitas a uma forte pressão seletiva (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998).

Apesar de pouco se saber a respeito de suas funções, alguns estudos vêm revelando que regiões heterocromáticas, ricas em sequências repetidas, parecem inibir eventos de recombinação (Islam-Faridi et al., 2002), controlar a expressão gênica (Avramova 2002), participar de eventos como recrutamento de histonas (Cheng et al., 2002) e promover a formação e manutenção da própria heterocromatina, caso da heterocromatina pericentromérica (Bender, 2004), entre outros.

2.1.12. Sequências repetitivas em FISH

As sequências repetitivas podem ser utilizadas como sondas em estudos de identificação e caracterização cromossômica através dos seus padrões de hibridização evidenciados pela FISH. Em milho (*Zea mays*) um estudo cariotípico em 14 linhagens evidenciou através da FISH os diferentes padrões gerados por fragmentos de microssatélites utilizados como sondas. Foi possível além de identificar todos os dez pares do complemento cromossômico, comparar a distribuição dessas sequências nos cromossomos homólogos das diferentes linhagens. Este tipo de análise permite detectar aberrações cromossômicas, determinar quais cromossomos específicos estão envolvidos com rearranjos, detectar a variação de sequências repetitivas no genoma, e diversas outras aplicações relacionadas à identificação cromossômica (Kato et al., 2004). Outra análise comparativa de sequências repetitivas foi realizada entre *Solanum tuberosum* e *S. lycopersicon*, revelando a grande conservação do genoma em áreas ricas em genes, enquanto as regiões pericentroméricas se mostraram bastante divergentes (Zhu et al., 2008). O padrão de distribuição de sequências pode ser espécie-específico (Ananiev et al., 1998) e até mesmo cromossomo-específico (Langerova et al., 2004). Estudos desse tipo vêm corroborando a hipótese da evolução independente de sequências repetitivas em relação às de cópia única.

2.1.13. Filogenias

As sequências de eventos evolutivos de um grupo de organismos são obtidas através da reconstrução de suas filogenias (histórias evolutivas). Estas são construídas através de várias fontes de caracteres biológicos, incluindo caracteres estruturais (anatomia, morfologia ou atributos externos) e moleculares (constituintes bioquímicos, tais como proteínas, flavonóides e DNA) (Judd, 2009).

As técnicas moleculares são consideradas atualmente as ferramentas mais poderosas para estudos de evolução e filogenias; porém, dados morfológicos continuam sendo de grande

importância para estudos filogenéticos. Os três genomas de plantas são utilizados pelos sistematas na construção de filogenias: o do cloroplasto, o mitocondrial e o nuclear. A escolha da sequência utilizada dependerá do nível taxonômico analisado, variando entre sequências de evolução lenta (como sequências do gene *rbcL* do cloroplasto), utilizadas para delimitar grandes táxons, e sequências de rápida evolução (como as sequências espaçadoras dos genes *trnL* e *trnK*), para espécies intimamente relacionadas (Judd, 2009).

O mais recente estudo referente à filogenia de plantas foi realizado pelo *Angiosperm Phylogeny Group* (2010) que utilizou dados filogenéticos de diversos grupos de pesquisa para a construção de uma única filogenia para as Angiospermas. Além disso, diversos outros estudos filogenéticos já haviam sido realizados em plantas (Vaillancourt e Weeden, 1993; Gernandt et al., 2005; Al-Shehbaz et al., 2006; Delgado-Salinas et al., 2006), incluindo análises filogenéticas utilizando conjuntamente diferentes tipos de caracteres e gerando árvores mais robustas. As análises filogenéticas baseadas em marcadores moleculares combinadas com análises citogenéticas permitem inferir os eventos ocorridos na evolução cromossômica em distintos grupos de plantas, podendo inclusive auxiliar na caracterização das relações entre espécies próximas em um mesmo clado.

Em Araliaceae, 45 acessos representando 16 gêneros e 37 espécies foram analisados através do uso de marcadores moleculares de diferentes origens (ITS nuclear e sequências plastidiais *trnL-trnF*) e através de números cromossômicos. A análise permitiu sugerir o número básico $x = 12$ para a família. Além disso, permitiu distinguir os cladogramas nos quais determinados eventos cromossômicos como a poliploidia teriam ocorrido (Yi et al., 2004).

Dados moleculares associados à filogenia também puderam ser utilizados no subgênero *Allium*, no qual as análises de ausência/presença de sequências teloméricas de vertebrados visualizadas por hibridização em membrana e o tamanho do DNA genômico

foram bastante úteis na caracterização dos clados 1, 2 e 3, respectivamente, construídos a partir da sequência ITS nuclear (Sykorova et al., 2006).

Em outros estudos as árvores filogenéticas têm sido construídas baseadas em caracteres citogenéticos. Em *Nicotiana* foram utilizados dez tipos de sequências repetitivas como sondas em FISH para a construção de uma filogenia baseada em padrões de hibridização. Sete espécies puderam ser classificadas em clados distintos, baseados em ganho, perda e amplificação de sequências, aumento do tamanho do genoma e ocorrência de translocações. Essas análises se mostram importantes ferramentas para estudos filogenéticos, indicando, por exemplo, que os clados irmãos *Nicotiana tabacum* e *N. tomentosiformis*, e, *N. kawakamii* e *N. tomentosa* são irmãos e mais derivados em relação à *N. glutinosa*, a espécie mais primitiva (Lim et al., 2000).

2.2. O gênero *Phaseolus* L.

2.2.1. Caracterização e filogenia

O gênero *Phaseolus* L., de distribuição neotropical, é constituído por aproximadamente 75 espécies distribuídas desde o sudeste do Canadá até o norte da Argentina, com centro de diversidade no México, onde podem ser encontradas cerca de 90% das espécies (Mercado-Ruaro et al. 2009). Cinco espécies se destacam pela sua importância econômica: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* e *P. polyanthus* (Gepts, 1996). *P. vulgaris*, o feijão comum, constitui a principal representante do gênero, sendo a leguminosa mais consumida diretamente no mundo, principalmente na África e América Latina (Broughton et al., 2003).

A filogenia mais recente do gênero *Phaseolus* foi proposta por Delgado-Salinas e colaboradores (2006) utilizando as sequências de nrDNA ITS/5.8 S e o loci plastidial *trnK* como marcadores. O gênero se mostrou monofilético e dividido em dois clados principais

denominados A e B. O clado A é constituído pelos grupos *Pauciflorus*, *Pedicellatus* e *Tuerckheimii*, além de outras espécies sem uma posição filogenética bem definida (*Phaseolus glabellus*, *P. macrolepis*, *P. microcarpus*, e *P. oaxacanus*). Por outro lado, o clado B, onde estão todas as espécies de interesse econômico, é constituído pelos grupos *Filiformis*, *Vulgaris*, *Lunatus*, *Leptostachyus* e *Polystachios*. O grupo *Vulgaris* inclui quatro das cinco espécies cultivadas do gênero (*P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. polyanthus* e *P. acutifolius*). Embora cada grupo apresente algumas características morfológicas peculiares, ao menos dois grupos, *Pedicellatus* e *Tuerckheimii* só podem ser distinguidos com dados moleculares. A separação filogenética do gênero *Phaseolus* em dois clados principais é corroborada ainda por fatores biogeográficos e morfológicos (Delgado-Salinas et al., 2006).

As espécies do clado A estão distribuídas principalmente nas regiões do México e Panamá, não ocorrendo em ilhas oceânicas, em altitudes de 545 a 690 m e latitudes de 4°26' a 5°06'. Florescem apenas durante as estações chuvosas (exceto *P. microcarpus*, que floresce em períodos secos ou úmidos), são sensíveis aos distúrbios do habitat, e geralmente não toleram um longo período de frio. As espécies do clado B são amplamente distribuídas, indo desde o sudoeste do Canadá até a América do Sul, com altitudes variando de 654 a 737 m e latitudes de 6°22' a 10°21'. Florescem em períodos de seca ou chuva, em sua maioria não são sensíveis aos distúrbios ambientais, e algumas toleram longos períodos de frio (Delgado-Salinas et al., 2006).

2.2.2. Citogenética de *Phaseolus*

Estudos citogenéticos têm revelado que o gênero *Phaseolus* apresenta uma alta estabilidade cariotípica, com 22 cromossomos metacêntricos/submetacêntricos na grande maioria das espécies (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 1996 e 1998). As exceções são as três espécies do grupo *Leptostachyus* (*P. leptostachyus*, *P. macvaughii*, e *P. micranthus*), que apresentam $2n = 20$ (Delgado-Salinas et al., 2006). A ocorrência de poliplóides no gênero é

muito rara, sendo restrita a um relato de $2n=44$ para *P.sp.* (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 1998).

Muitas vezes o padrão de distribuição de eucromatina e heterocromatina apresentado pelas técnicas de bandeamento são insuficientes para distinguir de forma segura pequenos cromossomos mitóticos de plantas (Ohmido et al., 2007). Em decorrência do pequeno genoma de *P. vulgaris*, estimado em cerca 637 Mpb ou 0.66 pg/1C (Arumuganathan e Earle, 1991), com cromossomos variando de 1,5 e 3 μm (Sarbhoy, 1978), as técnicas de bandeamento C não se mostraram eficazes na diferenciação entre os cromossomos da espécie e entre espécies próximas, pois foram evidenciadas bandas fortes e semelhantes nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos (Mok e Mok, 1976; Moscone et al., 1999).

2.2.3. Mapeamento comparativo

Um mapa cromossômico foi construído para *P. vulgaris* através da FISH, utilizando clones BACs como sondas, selecionados a partir de marcadores previamente mapeados em um mapa genético pré-estabelecido para a espécie (Pedrosa-Harand et al., 2009; Fonsêca et al., 2010). Esses mesmos BACs foram utilizados como sondas em FISH nos estudos comparativos com a espécie *P. lunatus*, ambas do clado B e filogeneticamente próximas (Almeida, 2006; Bonifácio, 2009). Os estudos indicaram uma completa sintenia entre os dois cariótipos, porém com discretas perdas de colinearidade, onde foram sugeridas ao menos três inversões cromossômicas entre as duas espécies, nos cromossomos 2, 9 e 10. O cromossomo 2 de *P. vulgaris* apresenta uma morfologia submetacêntrica, enquanto que em *P. lunatus* a morfologia metacêntrica do seu homeólogo sugere a ocorrência de uma inversão cromossômica do tipo pericêntrica em uma das espécies. O BAC 163I7, com sinal único no braço longo do cromossomo 9 de *P. vulgaris* está localizado na região intersticial do braço curto em *P. lunatus*, sugerindo a ocorrência de uma inversão envolvendo a região pericentromérica. A terceira inversão, de mesma natureza, pôde ser evidenciada a partir da

localização do DNAr 5S no braço curto do cromossomo 10 de *P. lunatus*, oposto ao observado em *P. vulgaris*. Esse é o único sítio de DNAr 5S em *P. lunatus*, enquanto que em *P. vulgaris* um sítio adicional é encontrado no braço longo do cromossomo 6. Além disso, dos três sítios de DNAr 45S presentes em *P. vulgaris* (cromossomos 6, 9 e 10) apenas um sítio foi encontrado em *P. lunatus*, conservado no cromossomo 6. Apesar de conservado, esse sítio se mostrou muito maior em relação ao de *P. vulgaris* 'BAT93', alterando a morfologia subtelocêntrica do cromossomo 6, para uma morfologia metacêntrica em *P. lunatus* (Bonifácio, 2009). A conservação de sintenia observada e a detecção de apenas três rearranjos cromossômicos no gênero confirmam a estabilidade do gênero proposta em estudos prévios (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 1996 e 1998).

Cerca de 34% do genoma de *P. vulgaris* é formado pela heterocromatina pericentromérica, constituída de sequências repetitivas presentes em todos os seus cromossomos (Fonsêca et al., 2010). Esse tipo de sequência também foi encontrado em *P. lunatus* com algumas diferenças, destacando o cromossomo 2, que apresentou em *P. vulgaris* uma quantidade bastante inferior em relação ao mesmo cromossomo de *P. lunatus* (Almeida, 2006; Bonifácio, 2009). Os resultados sugerem que a essa região é heterogênea e que estas sequências podem contar diferentes histórias evolutivas dentro do gênero (Bonifácio, 2009). *P. vulgaris* apresenta ainda, cerca de 9% do seu genoma composto por sequências repetitivas do tipo subtelomérica, distribuídas nas regiões terminais de quase todos os cromossomos do complemento (Schlueter et al., 2008; David et al., 2009; Pedrosa-Harand et al., 2009; Fonsêca et al., 2010). Essas mesmas sequências não foram evidenciadas em nenhum dos cromossomos de *P. lunatus* indicando que as mesmas não estão conservadas, embora ambas as espécies estejam próximas filogeneticamente (Almeida, 2006; Bonifácio, 2009).

3. Referências bibliográficas

- Acosta-Gallegos, JA, Kelly, JD, Gepts, P (2007). Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. *Crop Sci.* 47:44–59.
- Almeida CCS (2006) Mapeamento físico e análise evolutiva em *Phaseolus vulgaris* L. e *P. lunatus* L., utilizando hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- Almeida CCS, Carvalho PCL, Guerra M (2007) Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). *Bot J Linn Soc* 155:541–547.
- Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA (2006) Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Pl Syst Evol* 259:89–120.
- Ananiev V, Phillips RL, Rines HW (1998) Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric region. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13073–13078.
- Angiosperm Phylogeny Group III (2010) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III *Bot J Linn Soc* 161:105–121.
- Arumuganathan K e Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Repr* 9:208–218.
- Avramova ZV (2002) Heterochromatin in animals and plants. similarities and differences. *Plant Physiol* 129:40–49.
- Bailey PC (1954) Differential reactivity in chromosomes as an indicator of species in *Trillium*. *Bot Gaz* 115(3):241–248.
- Basset MJ (1991) A revised linkage map of common bean. *HortScience* 26(7):834–836.

- Bender J (2004) Chromatin-based silencing mechanisms. *Current opinion in plant biology* 7:521–526
- Bonifácio EM (2009) Mapeamento comparativo entre o feijão comum e a fava. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas), Departamento de Biologia, UFRPE, pp 64.
- Brighton CA, Ferguson IK (1976) Chromosome counts in the genus *Melaleuca* (Myrtaceae). *Kew Bulletin* 31(1):27–32.
- Broughton WJ, Hernandez G, Blair M et al (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil* 252:55–128.
- Carneiro MS, Vieira MLC (2002) Mapas genéticos em plantas. *Bragantia* 61(2):89–100.
- Carvalho R, Filho WSS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M (2005) The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genome Res* 109:276–282.
- Cheng Z, Dong F, Langdon T et al (2002) Functional Rice Centromeres Are Marked by a Satellite Repeat and a Centromere-Specific Retrotransposon. *Plant Cell* 14:1691–1704.
- David P, Chen NWG, Pedrosa-Harand A et al (2009) A nomadic subtelomeric disease resistance gene cluster in common bean. *Plant Physiol* 151:1048–1065.
- Delgado-Salinas A, Bibler R, Lavin M (2006) Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): A recent diversification in an ancient landscape. *Syst Bot* 31:779–791.
- Dimitrova D, Greilhuber J (2000) Karyotype and DNA content in ten species of *Crepis* (Asteraceae) distributed in Bulgaria. *Bot J Linn Soc* 132:281–297.

- Doganlar S, Frary A, Daunay M-C, Lester RN, Tanksley SD (2002) A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. *Genetics* 161:1697–1711.
- Dong F, Song J, Naess SK et al (2000) Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet* 101:1001–1007.
- Dvorak F, Dadakova B (1984) Chromosome counts and chromosome morphology of some selected species. *Folia Geobot Phytotax* 19(1):41–70.
- Ellneskog-Staam P, Loaisiga CH, Merker (2007) A Chromosome C-banding of the teosinte *Zea nicaraguensis* and comparison to other *Zea species*. *Hereditas* 144:96-101.
- Fonsêca A, Ferreira J, Santos TRB et al (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Res* 18(4):487-502.
- Gepts P (1996) Origin and evolution of cultivated *Phaseolus* species In: Pickersgill B, Lock JM (editors). *Advances in Legume Systematics 8: Legumes of economic Importance*. Royal Gardens, Kew. pp. 65–74.
- Gernandt DS, Lopez GG, Garcia SO, Liston A (2005) Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* 54(1):29–42.
- Gill B, Kimber G (1974) The giemsa C-banded karyotype of rye. *Proc Nat Acad Sci USA* 71(4):1247–1249.
- Greilhuber J (1977) Why plant chromosomes do not show g-bands. *Theor Appl Genet* 50:121–124.

- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (1998) Introdução à genética. Rio de Janeiro Guanabara, pp 856.
- Guerra M (1993) Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* 71:234–241.
- Guerra M (2000) Chromosome number variation and evolution in monocots. In: Wilson KL e Morrison DA (eds) *Monocots - Systematics and Evolution*. CSIRO, Melbourne, p 127–136.
- Guerra M, Souza MJ (2002) Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. FUNPEC. 1ª edição, Ribeirão Preto, pp 131.
- Guerra M (2004) Hibridização in situ: princípios básicos. In: Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética. 1ª edição, Ribeirão Preto, p 1–32.
- Hanai LR, Santini L, Camargo LEA et al (2010) Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. *Mol Breeding* 25:25–45.
- Harushima Y, Yano M, Shomura A et al (1998) A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. *Genetics* 148:479–494.
- Hasterok R, Moluszynska J (2000) Cytogenetic markers of *Brassia napus* L. chromosomes. *J Appl Genet* 41(1):1:9.
- Hizume M, Ohgiku A, Tanaka A (1989) Chromosome banding in the genus *Pinus* II. Interspecific variation of fluorescent banding patterns in *P. densiflora* and *P. thunbergii*. *Bot Mat Tokyo* 102: 25–36.
- Howell EC, Barker GC, Jones GH et al (2002) Integration of the Cytogenetic and Genetic Linkage Maps of *Brassica oleracea*. *Genetics* 161:1225–1234.
- Islam-Faridi MN, Childs KL, Klein PE et al (2002) A molecular cytogenetic map of sorghum

- chromosome 1: Fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes. *Genetics* 161:345–353.
- Jarolimova V (1994) Chromosome counts of some Cuban angiosperm. *Folia Geobot Phytotax* 29:101–106.
- Jelinek WR e Schmid CW (1982) Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Ann Rev Biochem* 51: 813–44.
- Jellen EN, Ladizinsky G (2000) Giemsa C-banding in *Avena insularis* ladizinsky. *Genet Resour Crop Ev* 47:227–230.
- Jiang J, e Gill BS (2006) Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057–1068.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ (2009) *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético* 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, pp 612.
- Kato A, Lamb JC, Birchler JA (2004) Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *PNAS* 101(37):13554–13559.
- Lackey JA (1980) Chromosome numbers in the Phaseoleae (Fabaceae: Faboideae) and their relation to taxonomy. *Amer J Bot* 67(4):595–602.
- Lagercrantz U, Lydiatet DJ (1996) Comparative Genome Mapping in *Brassica*. *Genetics* 144:1903–1910.
- Lengerova M, Kejnovsky E, Hobza R et al (2004) Multicolor FISH mapping of the dioecious model plant, *Silene latifolia*. *Theor Appl Genet* 108:1193–1199.
- Lim KY, Matyasek R, Lichtenstein CP, Leitch AR (2000) Molecular cytogenetic analyses and

- phylogenetic studies in the *Nicotiana* section Tomentosae. *Chromosoma* 109:245–258.
- Lim KY, Matyasek R, Kovarik A, Leitch AR (2004) Genome evolution in allotetraploid *Nicotiana*. *Bot J Linn Soc* 82:599–606.
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A et al (2006) Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *PNAS* 103:5224–5229.
- Mandáková T, Lysak MA (2008) Chromosomal Phylogeny and Karyotype Evolution in $x=7$ Crucifer Species (Brassicaceae). *Plant Cell* 20: 2559–2570.
- Marchant CJ (1973) Chromosome variation in Araceae: V. Acoreae to Lasieae. *Kew Bulletin* 8(2):199–210.
- Marcon AB, Barros ICL, Guerra M (2003) A karyotype comparison between two closely related species of *Acrostichum*. *Am Fern J* 93(3):116–125.
- Men AE, Meksem K, Kassem MA et al (2001) A bacterial chromosome library of *Lotus japonicus* constructed in an *Agrobacterium tumefaciens*-Transformable vector. *MPMI* 14(3):422–425.
- Mercado-Ruaro P, Delgado-Salinas A (1996) Karyological studies in several mexican species of *Phaseolus* L. and *Vigna savi* (Phaseolinae, Fabaceae) In: B. Pickergill and JM, Lock eds *Advances in Legumes Systematics 8: Legumes of Economic Importance* Royal Botanic Gardens, Kew. pp 83–87.
- Mercado-Ruaro P, Delgado-Salinas A (1998) Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). *Am J Bot* 85:1–9.
- Mercado-Ruaro P, Delgado-Salinas A, Chiang F (2009) Taxonomic re-assessment of *Phaseolus dasycarpus* (Leguminosae): systematic position, chromosome studies and re-description. *Brittonia* 61(1):8–13.

- Meyers BC, Tingey SV, Morgante M (2001) Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Res* 11: 1660–1676.
- Mok DWS, Mok MC (1976) A modified Giemsa technique for identifying bean chromosomes. *J Hered* 67:187–188.
- Moscone EA, Klein F, Lambrou M, Fuchs J e 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.
- Ohmido N, Sato S, Tabata S, Fukui K (2007) Chromosome maps of legumes. *Chromosome Res* 15:97–103.
- Oliveira AP, Alves EU, Alves AU et al (2004) Produção de feijão-fava em função do uso de doses de fósforo em um Neossolo Regolítico. *Hortic Bras* 22(3):543–546.
- Pedrosa-Harand A e Guerra M (2004) Contribuições da FISH para a citogenética de plantas. In Guerra M (ed) *Conceitos e aplicações na citogenética*. Sociedade Brasileira de Genética. 1ª edição, Ribeirão Preto, pp 33–59.
- Pedrosa-Harand A, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D (2009) Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. *Chromosome Res* 17:405–417.
- Peñas MLL, Bernardello G, Kiesling R (2008) Karyotypes and uorescent chromosome banding in *Pyrrhocactus* (Cactaceae). *Plant Syst Evol* 272:211–222.
- Peterson D, Tomkins JP, Frisch DA, Wing RA, Paterson AP (2000) Construction of plant bacterial artificial chromosome (BAC) libraries: an illustrated guide. *J Agric Gen* 5:1–100.

- Punina EO, Rodionov AV, Myakoshina YA, Grif VG (2001) Nucleotide composition of the cold-sensitive heterochromatic regions in *Paris hainanensis* Merrill. *Genetika* (Moscow) 37(7):939-946.
- Rick CM, Yoder JI (1988) Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. *Annu Rev Genet* 22:281–300.
- Sarbhoy RK (1978) Cytogenetical studies in genus *Phaseolus* Linn. I and II. Somatic and meiotic studies in fifteen species of *Phaseolus* (Part 2). *Cytologia* 43:171–180.
- Saunders VA, Houben A (2001) The pericentromeric heterochromatin of the grass *Zingeria biebersteiniana* ($2n = 4$) is composed of Zbcen1-type tandem repeats that are intermingled with accumulated dispersedly organized sequences. *Genome* 44:955–961.
- Schlueter JA, Goicoechea JL, Collura K et al (2008) BAC-end sequence analysis and a draft physical map of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genome. *Tropical Plant Biol* 1:40–48.
- Schmidt T, Heslop-Harrison JS (1998) Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science* 3(5) 195:199.
- Schwarzacher T, Ambros P, Schweizer D (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst Evol* 126:706–712.
- Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307–324.
- Schweizer D, Strehl S, Hagemann S (1990) Plant repetitive DNA elements and chromosome structure. *Chromosomes Today* 10:33–43.

- Sheikh SA, Kondo K (1995) Differential staining with orcein, Giemsa, CMA and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (Droseraceae). *Am J Bot* 82: 1278–1286.
- Song J, Dong F, Jiang J (2000) Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato molecular cytogenetics research. *Genome* 43:199–204.
- Song YC, Liu LH, Ding Y et al (1994) Comparisons of G-banding patterns in six species of the Poaceae. *Hereditas* 121: 31–38.
- Souza LGR, Crosa O, Winge H, Guerra M (2009) The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): A populational and cytomolecular analysis. *Genet Molec Biol* 32(1):111–116.
- Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. London. Arnold, pp 216.
- Stedje B (1989) Chromosome evolution within the *Ornithogalum tenuifolium* complex (Hyacinthaceae) with special emphasis on the evolution of bimodal karyotypes. *Plant Syst Evol* 166:79–89.
- Sykorova E, Fajkus J, Meznikova M, et al (2006) Minisatellite telomeres occur in the family Alliaceae but are lost in *Allium*. *Am J Bot* 93(6):814–823.
- Tanaka R, Hizume M (1980) C banding treatment for the chromosomes of some gymnosperms. *Bot Mag* 93:167–170.
- Vaillancourt RE, Weeden NF (1993) Chloroplast DNA phylogeny of old world *Vigna* (Leguminosae). *Syst Botany* 18(4):642–651.
- Vanhouten W, MacKenzie S (1999) Construction and characterization of a common bean bacterial artificial chromosome library. *Plant Mol Biol* 40:977–983.

- Vosa CG (1985) Chromosome banding in plants. In: Chromosome and Cell Genetics (Sharma, AK and Sharma, A eds.). Gordon and Breach Science Publishers. London pp 79–104.
- Wang K, Guan B, Guo W et al (2008) Completely distinguishing individual A-genome chromosomes and their karyotyping analysis by multiple bacterial artificial chromosome–fluorescence *in Situ* hybridization. *Genetics* 178:1117–1122.
- Wu C-C, Nimmakayala, Santos FA et al (2004) Construction and characterization of a soybean bacterial artificial chromosome library and use of multiple complementary libraries for genome physical mapping. *Theor Appl Genet* 109:1041–1050.
- Yang J, Wang Q, Deng D et al (2003) Construction and Characterization of a Bacterial Artificial Chromosome Library of Maize Inbred Line 77Ht2. *Plant Mol Biol Repr* 21:159–169.
- Yi T, Lowry II PP, Plunkett GM, Wen J (2004) Chromosomal evolution in Araliaceae and close relatives. *Taxon* 53(4):987–1005.
- Zhu W, Ouyang S, Iovene M et al (2008) Analysis of 90 Mb of the potato genome reveals conservation of gene structures and order with tomato but divergence in repetitive sequence composition. *BMC Genomics* 9:286.

4. Artigo a ser submetido à revista “Chromosome Research”

Evolução cariotípica no gênero *Phaseolus*: mapeamento comparativo entre *Phaseolus microcarpus* Mart. e o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

A. Fonsêca¹, A. Pedrosa-Harand¹

1 Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Recife, PE, Brasil

Título abreviado Mapeamento comparativo de *Phaseolus microcarpus*

Autor para correspondência:

Andrea Pedrosa-Harand

Tel. + 55 81 2126 8846

Fax + 55 81 2126 8348

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

Resumo

O gênero *Phaseolus* L., pertencente à família Fabaceae, é monofilético e apresenta suas ca. de 75 espécies distribuídas em dois clados principais denominados de A e B. Este último inclui as cinco espécies cultivadas do gênero, destacando-se *P. vulgaris*, o feijão comum. Cromossomos artificiais de bactérias (BACs) utilizados na construção do mapa citogenético do feijão comum ($2n = 22$) foram utilizados como sondas em hibridização *in situ* fluorescente (FISH) num estudo comparativo em *P. microcarpus*, ($2n = 22$), uma espécie selvagem localizada no clado A. Foram analisados ainda o padrão de bandas CMA/DAPI e a localização dos sítios de DNAr 45S e 5S e DNA telomérico. O cromossomo 6 apresentou o único sítio de DNAr 45S, conservado em seu homeólogo. Dos dois sítios de DNAr 5S evidenciados em ambas as espécies apenas o do cromossomo 10 se encontra conservado. Apesar da distância filogenética entre as espécies, todos os BACs cópia-única evidenciaram conservação de sintenia. Entretanto, foram observadas quatro quebras de colinearidade causadas provavelmente por eventos de inversão, um paracêntrico e três pericêntricos. Variações na fração repetitiva do genoma também foram evidenciadas. Assim como nos estudos com *P. lunatus*, clado B, essas raras inversões parecem ser os principais eventos evolutivos ocorridos ao longo da história do gênero.

Introdução

O gênero *Phaseolus* L. pertence à família Fabaceae, a terceira maior das Angiospermas, e está atrás apenas da família Poaceae em importância econômica (Judd, 2009). Compreende aproximadamente 75 espécies distribuídas por toda a América, seu centro de origem (Broughton et al., 2003). Delgado-Salinas et al. (2006), analisando as sequências de nrDNA ITS/5.8 S e o loci plastidial *trnK*, propuseram uma filogenia molecular na qual o gênero aparece como monofilético, com as espécies distribuídas em dois clados principais

denominados de A e B. Este último inclui o feijão comum (*P. vulgaris*) e as outras quatro espécies de interesse econômico (*P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. polyanthus* e *P. acutifolius*). A separação filogenética do gênero *Phaseolus* em dois clados é corroborada também por dados biogeográficos e morfológicos. Espécies do clado A são mais restritas ao sul dos EUA, México (em sua maioria) e Panamá, enquanto as espécies do clado B são mais amplamente distribuídas, indo desde o Canadá até a América do Sul (Delgado-Salinas *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos cariotípicos utilizando técnicas convencionais revelaram que a grande maioria das espécies do gênero apresenta 22 cromossomos pequenos, meta ou submetacêntricos (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 1996 e 1998). Em geral, esse tipo de estudo era bastante limitado e restrito à descrição numérica e morfológica dos cromossomos (Marchant, 1973; Brown e Gilmartin, 1989). Técnicas de bandeamento que contribuíram para a identificação cromossômica em diversas espécies vegetais (Schweizer, 1976; Schwarzacher *et al.*, 1980) não se mostraram muito eficazes para cromossomos pequenos como os de *Phaseolus*, por evidenciarem padrões de bandas similares entre os cromossomos do complemento (Zheng *et al.*, 1991). Com a introdução da hibridização *in situ* fluorescente, sondas para DNAr 5s e 45S foram utilizadas na comparação dos possíveis homeólogos entre quatro espécies do gênero *Phaseolus* (Moscone *et al.*, 1999). Esses e os demais cromossomos, entretanto, não puderam ser comparados em detalhe.

Os estudos citogenéticos comparativos mais detalhados em plantas foram realizados na espécie modelo *Arabidopsis thaliana* ($n = 5$) e espécies relacionadas, os quais evidenciaram, através da pintura cromossômica utilizando BACs (cromossomos artificiais de bactérias), a ocorrência de diversos rearranjos cromossômicos, como translocações e inversões, ocorridas na família Brassicaceae ($x = 8$) (Lysak *et al.*, 2006; Mandáková e Lysak, 2008). Recentemente, BACs foram mapeados no feijão comum através da FISH, sendo o mais

completo mapa cromossômico já construído para a espécie (Pedrosa-Harand et al., 2009; Fonsêca et al., 2010). Além disso, estes BACs foram utilizados em estudos comparativos com a espécie *P. lunatus*, também do clado B (Almeida, 2006; Bonifácio, 2009), indicando uma forte sintenia entre os dois cariótipos. Porém, a não conservação da ordem desses marcadores em alguns cromossomos refletiram em discretas perdas de colinearidade. Os estudos sugeriram a ocorrência de ao menos três inversões cromossômicas entre as duas espécies ao longo da evolução, nos cromossomos 2, 9 e 10 (Bonifácio, 2009).

O presente estudo teve como objetivo contribuir para o entendimento dos eventos envolvidos na evolução cromossômica no gênero *Phaseolus* através da extensão do mapeamento comparativo de sequências do feijão comum para *P. microcarpus* ($2n = 22$), uma espécie selvagem localizada no clado A. Os cromossomos homeólogos foram comparados ainda em relação a seus padrões de distribuição de sequências repetitivas, através do bandeamento CMA/DAPI e da localização de BACs pericentroméricos e subteloméricos, além de sítios de DNAr 5S e 45S. Esses dados são discutidos num contexto filogenético.

Materiais e Métodos

Material vegetal e preparações citogenéticas

As sementes de *P. microcarpus* (BRA179698) foram obtidas do banco de germoplasma mantido pela EMBRAPA Arroz e Feijão (Stº. Antônio de Goiás, Goiás) e multiplicadas no Jardim Experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Botânica da UFPE.

Pontas de raízes obtidas das sementes germinadas em placas de Petri a temperatura ambiente foram pré-tratadas em 2 mM 8-hidroxiquinoleína por 18 horas a 10°C e fixadas em etanol/ácido acético 3:1 (v/v), sendo mantidas posteriormente a -20°C. As pontas das raízes foram lavadas em água destilada antes de serem digeridas em 2 % (w/v) celulase 'Onozuka R-

10' (Serva) e 20% (v/v) pectinase (Sigma-Aldrich), em tampão ácido cítrico-citrato de sódio a 37°C por 1,5 hora. O material foi fragmentado em uma gota de ácido acético 45 % e esmagado entre lâmina e lamínula. As lâminas foram secas por no mínimo 30 min e analisadas com 1 µg/ml 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) em 1:1 tampão (v/v) McIlvaine pH 7.0 e glicerol. As melhores lâminas foram descoradas a temperatura ambiente em etanol/ácido acético 3:1 por 30 min, transferidas para etanol absoluto por 60 min, secas e estocadas a -20°C até o uso.

Coloração CMA/DAPI

Para o bandeamento com CMA e DAPI, as lâminas foram envelhecidas por três dias, coradas com cromomicina A3 (CMA) 0,1 mg/ml por 60 min, contracoradas com DAPI 1 µg/ml por 30 min, montadas em tampão McIlvaine pH 7.0 com 2.5 mM MgCl₂ – glicerol 1:1 (v/v) e estocadas por mais três dias no escuro à temperatura ambiente. As melhores metáfases foram capturadas como descrito a seguir. As lâminas foram descoradas novamente e estocadas a -20 °C para posterior hibridização *in situ*.

Sondas

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

Os BACs mapeados pertencem a uma biblioteca genômica de *P. vulgaris* 'BAT93' (Kami et al., 2006) e foram previamente selecionados e utilizados no mapeamento citogenético da espécie através da FISH. Ao menos dois BACs localizados em braços

distintos de cada cromossomo de *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand et al., 2009; Fonsêca et al., 2010) foram selecionados para o mapeamento. O bacteriófago B61, relacionado a um complexo de genes de resistência (Geffroy et al. 2008, 2009) foi selecionado como descrito em Ferrier-Cana et al. (2003). Para a marcação das sondas, o DNA dos BACs e dos plasmídios foi isolado através da técnica de mini-prep utilizando o Qiagen Mini Plasmid Kit (QIAGEN), enquanto o DNA Nucleobond AX columns (Macherey-Nagel) foi utilizado para o isolamento do bacteriófago, ambos seguindo as recomendações do fabricante. As sondas foram marcadas com Cy3-dUTP (GE) ou digoxigenina-11-dUTP (Roche) através de *nick translation* (Roche ou Invitrogen).

Hibridização in situ fluorescente (FISH)

Para o procedimento de hibridização *in situ* foi utilizado o protocolo de Fonsêca et al. (2010). As preparações foram secas a 60 °C por 30 min, pré-tratadas com RNase 100 µg/ml (Invitrogen) em 2 × SSC por 1 h a 37 °C, pepsina 10 µg/ml (Boehringer Mannheim), em HCl 0,01 N, por 20 min a 37 °C e fixadas em formaldeído 3,7 % (Merck), em PBS, por 10 min a temperatura ambiente. Três lavagens com 2 × SSC, 5 min cada, foram feitas entre os tratamentos. As lâminas foram em seguida desidratadas em séries alcoólicas e secas ao ar livre, por no mínimo 1h, a temperatura ambiente. A desnaturação do cromossomo e da sonda, as lavagens pós-hibridização e as detecções foram feitas de acordo com Heslop-Harrison et al. (1991), com pequenas modificações.

As misturas de hibridização consistiram de: formamida 50 % (v/v), sulfato de dextran 10 % (w/v), 2 × SSC e 2-5 ng/µl de sonda. A fração C_0t -100 de *P. vulgaris*, isolada de acordo com Zwick et al. (1997), foi adicionada em excesso de 20 a 300 vezes na mistura de hibridização, para o bloqueio de sequências repetitivas, quando necessário. As preparações foram desnaturadas por 5 min a 75 °C, seladas com esmalte e hibridizadas por até três dias a 37 °C. Após a incubação, as lamínulas foram removidas e as lavagens pós-hibridização foram

realizadas por 5 min cada a 42 °C: duas vezes em 2Í SSC e 0.1Í SSC, seguidas de duas lavagens adicionais em 2Í SSC, sendo a segunda em temperatura ambiente. As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas com 0,4 µl anti-digoxigenina produzida em ovelha e conjugada com FITC (anticorpo primário, Roche) e 0,7 µl de anti-ovelha ou anti-cabra produzidas em burro e conjugadas com FITC (anticorpo secundário, Serotec) em 3 % BSA em PBS para um volume final de 20 µl cada. As preparações cromossômicas foram pré-tratadas com 100 µl de 3 % BSA em PBS a 37 °C por 1 h, incubadas a 37 °C por 1 h com anticorpo primário e depois com anticorpo secundário, com três lavagens em 1 Í PBS/Tween 20 0.1 % por 5 min depois de cada detecção.

As preparações foram contra-coradas e montadas com 2 µg/ml de DAPI em Vectashield (Vector). As re-hibridizações das lâminas, para a localização de diferentes sequências de DNA em uma mesma célula, foi realizada de acordo com Heslop-Harrison et al. (1992), por até quatro vezes. Quando uma hibridização prévia com sonda repetitiva foi realizada, a re-hibridização das lâminas foi seguida da desnaturação do DNA cromossômico com 100 µl de formamida 50% em 2Í SSC a 75 °C por 5 min, da desidratação em série alcoólica gelada e da secagem das mesmas ao ar por pelo menos 1 h.

Análise de dados

As imagens foram capturadas por microscopia de epifluorescência Leica DMLB equipada com câmera Cohu utilizando o software Leica QFISH. Para o processamento final, as imagens foram sobrepostas e coloridas artificialmente através do software Adobe Photoshop versão 10.0 e ajustadas apenas em brilho e contraste. O idiograma baseado em Fonsêca et al. (2010) para o feijão comum foi comparado à representação esquemática proposta para a espécie *P. microcarpus*. A numeração de cada cromossomo seguiu a nomenclatura estabelecida para o feijão comum (Pedrosa-Harand et al., 2008).

Resultados

Phaseolus microcarpus apresentou um cariótipo simétrico constituído por 22 cromossomos aparentemente metacêntricos (Fig. 1 e 2). De um total de 322 indivíduos analisados, foram evidenciados cinco indivíduos tetraplóides (aprox. 1,5%), todos com $2n = 44$ (dados não mostrados). A dupla coloração com fluorocromos CMA/DAPI revelou bandas CMA⁺ fracas situadas na região pericentromérica de vários pares cromossômicos, além de uma banda forte na extremidade descondensada do único par distinguido através dessa técnica (Fig. 1A). Por meio da FISH com sequências de DNAr 5S e 45S foi possível evidenciar três pares cromossômicos. O primeiro par apresentou um grande sítio de DNAr 45S em sua extremidade, co-localizado com a banda CMA⁺ terminal (Fig. 1B). Os outros dois pares apresentaram sítios de DNAr 5S com sinais de diferentes intensidades (fraco e muito forte) situados na região proximal de um de seus braços (Fig. 1B). Dentre seis indivíduos analisados quanto à presença de DNAr 5S, dois apresentaram no par cromossômico portador do sítio mais forte um sinal duplicado no braço oposto, porém de menor intensidade (Fig. 3).

A sequência telomérica de *Arabidopsis* (TTTAGGG) foi visualizada na extremidade de todos os braços cromossômicos. Além disso, sequências teloméricas intersticiais (ITS) foram observadas no cromossomo 3 (Fig. 1C). A identificação deste cromossomo como sendo o par 3 só foi possível após a re-hibridização com o BAC marcador 174E13, sendo este observado entre o ITS e a sequência telomérica terminal do mesmo braço (Fig. 1D).

Vinte e quatro dos 30 BACs utilizados evidenciaram sinais únicos e puderam ser mapeados (Tabela 1). Pelo menos um BAC cópia única para cada braço dos 11 pares cromossômicos de *P. vulgaris* foram utilizados na tentativa de identificar a presença de possíveis rearranjos (Fig. 2 A-J, 3 e 4). As únicas exceções ocorreram para os cromossomos 6, acrocêntrico, e 5, no qual o BAC 36H21, o único mapeado neste cromossomo em *P. vulgaris*, apresentou um padrão repetitivo pericentromérico em todos os cromossomos do

complemento, mesmo após a utilização do DNA bloqueador C₀t-100. Dentre os demais cromossomos, apenas o par 3 apresentou sinais em um único braço, pois os quatro BACs mapeados, originalmente dois de cada braço, marcaram todos o mesmo braço cromossômico. Para o restante dos cromossomos, ao menos um BAC foi hibridizado para cada braço. Os cromossomos portadores dos sítios de DNAr 5S foram identificados como sendo os pares 4 (sinal fraco) e 10 (sinal forte), ambos nas regiões proximais dos braços longos (Fig. 3). O cromossomo 6 foi identificado como o portador do sítio de DNAr 45S (Fig. 2E e 3). Exceto pela localização de sítios de DNAr 5S em diferentes cromossomos, os resultados indicaram a ocorrência de uma forte sintenia entre os genomas das duas espécies (Fig. 4).

Os BACs 103P12, 143N10 e 81A17 (Fig. 1E), que apresentaram sinais com padrão repetitivo do tipo pericentromérico em todos os cromossomos de *P. vulgaris*, também apresentaram o mesmo padrão quando hibridizados em *P. microcarpus*. Esses BACs evidenciaram sinais com diferentes intensidades, porém muito mais fortes que os observados para as bandas CMA⁺ nessa mesma região (Fig. 1A e E). Além dos três BACs citados, os BACs 260H1 e 12M3, que também apresentaram padrão pericentromérico em *P. vulgaris*, não apresentaram qualquer sinal em *P. microcarpus* (dados não mostrados). Além disso, o BAC 147K17, mapeado no cromossomo 3 de *P. vulgaris*, evidenciou, além do sítio no cromossomo 3, a presença de um sinal duplicado mais fraco no mesmo braço do sítio de DNAr 45S do cromossomo 6 (Fig. 1F).

Os BACs 17P14, 86I17 e 63H6, selecionados para os cromossomos 2, 7, e 10, respectivamente, apresentaram em *P. vulgaris* padrões de hibridização típicos de sequências repetitivas, situadas nas regiões subteloméricas de quase todos os seus cromossomos. Já em *P. microcarpus*, estes BACs apresentaram sinais únicos nos braços curtos dos três cromossomos para os quais haviam sido selecionados inicialmente (Figs. 2, 3 e 4).

Quatro quebras de colinearidade ocasionadas provavelmente por eventos de inversões cromossômicas foram evidenciadas na comparação dos dois genomas (Fig. 4). A primeira é sugerida pela diferença de morfologia observada para o cromossomo 2 de *P. microcarpus* (metacêntrico) em relação a *P. vulgaris* (submetacêntrico). Como os três BACs mapeados nesse cromossomo não tiveram suas posições alteradas, é provável que tenha havido uma inversão envolvendo a região pericentromérica em um dos homeólogos (Figs. 2B, 3 e 4). Os BACs 147K17 e 267H4, mapeados no braço curto do cromossomo 3 de *P. vulgaris*, foram observados na região proximal do braço oposto em *P. microcarpus*, junto aos BACs 174E13 e 91K16, indicando a ocorrência de uma segunda inversão pericêntrica (Figs. 2C, 3 e 4). A terceira inversão foi detectada pela marcação do BAC 163I7, mapeado na região intersticial do braço longo do cromossomo 9 de *P. vulgaris*, na região proximal do braço curto do mesmo cromossomo de *P. microcarpus* (Figs. 2H, 3 e 4). A quarta inversão cromossômica, esta de natureza paracêntrica, foi evidenciada no braço longo do cromossomo 6 a partir do mapeamento dos BACs 18B15 e 121F5 nas regiões intersticial e terminal, respectivamente (Fig. 3), contrárias às posições encontradas anteriormente em *P. vulgaris* (Fig. 4). Uma representação esquemática dos cromossomos envolvidos com rearranjos entre três espécies do gênero foi associada à filogenia para uma abordagem evolutiva (Fig. 5).

Discussão

No presente estudo foi analisada comparativamente a distribuição de 33 sequências ao longo dos 11 pares de cromossomos homeólogos de *P. vulgaris* e *P. microcarpus*. Em conjunto com dados disponíveis para *P. lunatus* (Almeida, 2006; Bonifácio, 2009), esses resultados permitiram estimar a natureza dos principais eventos de evolução cromossômica e de sequências no gênero. Por exemplo, um único sítio de DNAr 45S está presente em *P. microcarpus* e em *P. lunatus* e este se encontra conservado em *P. vulgaris*, no cromossomo 6. Embora esse sítio esteja conservado nas três espécies, nenhum dos outros dois sítios

adicionais, nos cromossomos 9 e 10 de *P. vulgaris* (cultivar BAT93), foram evidenciados em *P. linaus* ou *P. microcarpus*. Curiosamente, grandes variações na distribuição dos sítios de DNAr 45S foram encontradas entre cultivares de *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand et al., 2006). Os dados obtidos até o presente sugerem que o sítio de DNAr 45S no cromossomo 6 provavelmente estava presente no ancestral do gênero e não foi perdido durante sua evolução. O surgimento de sítios adicionais em outros cromossomos parece ser devido a eventos restritos ao grupo Vulgaris, no qual está presente a espécie *P. coccineus*, do clado irmão ao de *P. vulgaris*, também com três sítios de DNAr 45S (Moscone et al., 1999). Por outro lado, *P. acutifolius*, localizado no outro clado deste mesmo grupo, evidenciou apenas um sítio (Moscone et al., 1999), provavelmente o conservado no cromossomo 6. Eventos de transposição, amplificação de pequenos sítios e deleção de sequências ao longo da evolução podem estar envolvidos com essas variações nesse pequeno grupo de espécies do gênero. Esses eventos parecem ter ocorrido várias vezes durante a radiação das espécies de Triticeae, por exemplo, sem modificar a colinearidade de outros marcadores (Dubcovsky e Dvorak, 1995).

Apesar de serem cariotipicamente semelhantes, *P. microcarpus* evidenciou um padrão de bandas CMA⁺ distinto de *P. vulgaris* e *P. lunatus*. A quase ausência de bandas CMA⁺ nas regiões pericentroméricas de *P. microcarpus*, em contraposição às bandas evidentes compartilhadas entre as outras duas espécies, indicam que diferentes tipos de sequências repetitivas estão presentes nessas regiões. Esse fato foi reforçado pela aparente falta de hibridização dos BACs 12M3 e 260H1, com padrões pericentroméricos em *P. vulgaris* e *P. lunatus*, em *P. microcarpus*. Embora as sequências repetitivas presentes nesses BACs estejam ausentes ou em baixa quantidade em *P. microcarpus*, BACs como o 36H21, 103P12, 143N10 e 81A17 indicam que suas regiões pericentroméricas são constituídas de sequências repetitivas, porém de natureza parcialmente distinta. Outro fato interessante é evidenciado

pelos BACs 17P14, 86I17 e 63H6, os quais mostraram um padrão de distribuição repetitivo nas regiões subteloméricas de quase todos os cromossomos de *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand et al., 2009; Fonsêca et al., 2010). Esses apresentaram, além das sequências cópias-únicas selecionadas pelos marcadores do mapa genético de *P. vulgaris*, uma família de sequência satélite de 528pb (sequência consenso), denominada *hipu* (David et al., 2009; KGB dos Santos, comunicação pessoal). Sondas de *hipu* foram utilizadas em experimentos de *Southern blot*, sendo detectadas apenas nas dez espécies de *Phaseolus* analisadas, incluindo *P. microcarpus* e *P. lunatus*, esta última evidenciando um dos mais baixos números de cópias (David et al., 2009). Como os BACs 17P14, 86I17 e 63H6 também não mostram padrão subtelomérico nem em *P. microcarpus* nem em *P. lunatus*, a quantidade dessas sequências em ambas as espécies parece ser insuficiente para evidenciar sinais após a FISH. Esses BACs apresentaram como consequência sinais cromossomo-específicos em *P. microcarpus* e *P. lunatus* nas posições sugeridas pelos marcadores nos grupos de ligação de *P. vulgaris* dos quais foram selecionados. Esses resultados confirmam a utilidade da BAC-FISH com sonda heteróloga para o mapeamento de BACs que contêm sequências repetitivas e não podem ser mapeados na própria espécie. A estratégia oposta, com a utilização de BACs sem sequências repetidas de sorgo, foi utilizada para o mapeamento citogenético em milho, difícil de ser mapeado com BACs próprios devido a grande quantidade de sequências repetidas dispersas em seu genoma (Koumbaris e Bass 2003).

A sequência telomérica de *Arabidopsis* (TTTAGGG), frequentemente encontrada nas extremidades cromossômicas da maioria das plantas, foi utilizada como sonda em FISH na espécie *P. vulgaris*, indicando a presença de sinais nas extremidades de todos os braços cromossômicos do complemento (A. Pedrosa-Harand, dados não publicados). Vários estudos têm relacionado a presença de sequências teloméricas intersticiais (ITS) com eventos de recombinação e fragilidade cromossômicas em animais (Day et al., 1998; Ruiz-Herrera et al.,

2002; Camats et al., 2006). Embora essas associações não tenham sido frequentemente demonstradas em plantas, a presença de ITS também parece estar relacionada com rearranjos cromossômicos (Fuchs et al., 1995). No genoma de *Brassica nigra*, por exemplo, a localização de ITS está quase exclusivamente associada aos pontos de quebras entre blocos conservados (Lagercrantz, 1998). Sendo assim, a primeira evidência de rearranjo cromossômico entre *P. vulgaris* e *P. microcarpus* foi obtida pela presença de ITS próximo aos BACs 174E13 e 91K16 no cromossomo 3 dessa espécie. Esses foram localizados no braço longo, como em *P. vulgaris*. Porém, a ordem dos BACs 147K17 e 267H4 e suas localizações na região proximal deste mesmo braço sugerem que todo o braço curto e parte do braço longo deste cromossomo esteja envolvida com um evento de inversão pericêntrica. A presença de ITS pode estar relacionada com esses tipos de eventos (Fuchs et al., 1995), e parece ser justificada pela conservação das antigas sequências teloméricas presentes no braço curto ancestral. Como a telomerase tem a função de cicatrizar os pontos de quebras com a adição de novas sequências teloméricas (Shippen e Macknight, 1998), isso parece explicar a formação do novo telômero na extremidade do braço curto após a inversão.

Embora os dois sítios de DNAr 5S estejam conservados entre diferentes acessos de *P. vulgaris* nos cromossomos 6 e 10 (Pedrosa-Harand et al., 2006), essa conservação parece não se estender para outras espécies do gênero. *P. lunatus* apresenta apenas um único sítio dessa sequência, localizado no cromossomo 10 no braço oposto ao encontrado em *P. vulgaris* (Almeida, 2006, Bonifácio, 2009). Em *P. microcarpus* esse sítio se encontra conservado na mesma posição e no mesmo cromossomo em relação a *P. vulgaris*, porém com sinal muito mais forte. Em alguns indivíduos foram observados sinais duplicados mais fracos no braço curto deste mesmo cromossomo. Além disso, um sinal adicional, mais fraco, no braço longo do cromossomo 4 foi encontrado na espécie. Uma duplicação do sítio de DNAr 5S semelhante à encontrada em alguns indivíduos de *P. microcarpus* foi observada em quatro acessos de *P.*

lunatus, o qual apresentou um sinal adicional na região proximal do braço longo (Almeida, 2006). Os sítios adicionais de DNAr 5S podem ter sido gerados a partir da transferência dessas sequências junto a elementos transponíveis, como observado na espécie *Aegilops speltoides* (Raskina et al., 2004), embora outras hipóteses não possam ser descartadas. Sinais duplicados também foram identificados através de BACs hibridizados em *P. vulgaris* e *P. microcarpus*. A presença de sinal adicional mais fraco do BAC 147K17 no cromossomo 6 de *P. microcarpus* sugere que parte das sequências presentes no BAC pode ter sido duplicada e transposta para esse cromossomo, permitindo sua visualização através da sonda desse BAC. Já o sinal extra do BAC 255F18 no cromossomo 7, observado em *P. vulgaris*, não foi observado em *P. microcarpus*,

A construção de mapas de ligação bastante densos, utilizados nas primeiras análises comparativas de sintenia e colinearidade, necessitava de técnicas bastante laboriosas que eram restritas a espécies de importância econômica (Tanksley et al., 1992; Ahn e Tanksley, 1993). A utilização de sondas de BACs contendo sequências cópia-única em FISH demonstrou que a facilidade e a eficácia da técnica viabilizam os estudos em espécies selvagens, como *P. microcapus*, revelando mais detalhadamente as relações intragenéricas. Uma forte sintenia foi observada entre os genomas de *P. microcarpus* e *P. vulgaris*, refletindo a estabilidade cariotípica aparente do gênero. Apesar da distância filogenética entre *P. microcarpus* (clado A) e *P. vulgaris* (clado B), apenas quatro quebras de colinearidade foram observadas nesse estudo. Possivelmente, três eventos de inversão pericêntrica (cromossomos 2, 3 e 9) e um evento de inversão paracêntrica (cromossomo 6) podem ter sido as causas dessas alterações. Uma explicação alternativa é a transposição de BACs como a causa das alterações observadas. De fato, os BACs utilizados, com tamanho médio de 125 kb, podem ter sido deletados e reinseridos em outra região cromossômica sem alterar a colinearidade das sequências restantes. Um fato semelhante ocorreu no cromossomo 6 de *Oryza punctata*, no

qual uma região de cerca de 400 kb foi localizada a cerca de 15 Mb da sua posição original no seu homeólogo de *O. sativa*, em decorrência de uma transposição (Kim et al., 2007). Entretanto, duas transposições teriam que ter ocorrido nos cromossomos 3 e 6, além de serem complementadas pela alteração das posições centroméricas nos cromossomos 2 e 9, o que seria pouco provável. Os estudos comparativos entre *P. lunatus* e *P. vulgaris*, ambas do clado B, indicou que as inversões nos cromossomos 2 e 9 foram os principais eventos de evolução cromossômica estrutural ocorridos entre essas espécies (Bonifácio, 2009). A comparação entre *P. microcarpus* e *P. vulgaris* indica uma maior quantidade de alterações cariotípicas entre essas espécies, quando comparadas às alterações observadas entre espécies do clado B. Diferentes composições das sequências repetitivas pericentroméricas, além das inversões cromossômicas adicionais nos pares 3 e 6 justificam essa afirmação. Assim, as distâncias filogenéticas parecem refletir o grau de divergências evolutivas em nível cromossômico no gênero, embora o grupo *Vulgaris* pareça acumular um número maior de alterações que os demais (ver Fig. 5).

Os dados relativos à evolução cromossômica do gênero *Phaseolus* sugerem que a conservação de sintenia e o pequeno número de rearranjos cromossômicos estejam relacionados com sua estabilidade numérica, uma vez que esses rearranjos ocorreram por meio de inversões. Estudos relacionados parecem indicar que espécies de um mesmo gênero apresentam uma relativa estabilidade quanto à ocorrência de rearranjos cromossômicos, e que esses são mais comumente representados por inversões cromossômicas. Por exemplo, apenas uma inversão cromossômica no par 8 foi observada na comparação entre os mapas físicos dos 12 cromossomos da espécie cultivada, *Oryza sativa* e da selvagem, *O. punctata* (Kim et al., 2007). Outro estudo intragenérico, envolvendo o mapa genético altamente denso de tomate e o mapa de batata, ambas com $2n = 24$, sugeriu que cinco eventos de inversão, nos cromossomos 5, 9, 10 e 11, foram os responsáveis pela quebra de colinearidade dos dois

genomas (Tanksley et al., 1992). Além disso, uma forte sintenia foi observada na comparação entre os mapas genéticos de *Medicago truncatula* e *M. sativa*, onde nenhum rearranjo cromossômico foi observado (Choi et al., 2004). Sendo assim, o grande número de rearranjos cromossômicos intragenéricos da família Brassicaceae envolvendo inversões, fusões e translocações ocorridas entre *Arabidopsis thaliana* ($2n = 10$) e *A. lyrata* ($2n = 8$) (Lysak et al., 2006), e entre *Brassica nigra* ($2n = 16$), *B. oleracea* ($2n = 18$) e *B. rapa* ($2n = 20$) (Lagercrantz e Lidiate, 1996), parecem ser uma exceção em Brassicaceae. Alternativamente esse grande número de rearranjos pode ser característico de grupos que apresentam alterações cromossômicas numéricas. A expansão dos estudos comparativos para outras espécies possibilitará uma visão mais abrangente sobre o papel das alterações cromossômicas na evolução dos gêneros vegetais.

Agradecimentos

Agradecemos à EMBRAPA Arroz e Feijão (Stº. Antônio de Goiás, Goiás) pelo envio das sementes de *P. microcarpus*, a Paul Gepts, do Department of Plant Sciences/MS1, Section of Crop and Ecosystem Sciences, University of California, Davis, EUA, por nos ceder os BACs, à Valérie Geffroy, do Institut de Biotechnologie des Plantes, Université Paris-Sud, Orsay cedex, France, pelo bacteriófago B61, à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro concedido para A.F e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Referências bibliográficas

Ahn S e Tanksley SD (1993) Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Genetics* 90:7980–7984.

- Almeida CCS (2006) Mapeamento físico e análise evolutiva em *Phaseolus vulgaris* L. e *P. lunatus* L., utilizando hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- Bonifácio EM (2009) Mapeamento comparativo entre o feijão comum e a fava. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas), Departamento de Biologia, UFRPE. pp. 64.
- Broughton WJ, Hernandez G, Blair M et al (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil* 252:55–128.
- Brown GK, Gilmartin AJ (1989) Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Amer J Bot* 76(5):657–665.
- Camats N, Ruiz-Herrera A, Parrilla JJ et al (2006) Genomic instability in rat: Breakpoints induced by ionising radiation and interstitial telomeric-like sequences. *Mutat Res* 595:156–166.
- Choi H-K, Kim D, Uhm T et al (2004) A Sequence-Based Genetic Map of *Medicago truncatula* and Comparison of Marker Colinearity with *M. sativa*. *Genetics* 166: 1463–1502.
- David P, Chen NWG, Pedrosa-Harand A et al (2009) A nomadic subtelomeric disease resistance gene cluster in common bean. *Plant Physiology* 151:1048–1065.
- Day JP, Limoli CL, Morgan WF (1998) Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells, *Carcinogenesis* 19(2):259–265.
- Delgado-Salinas A, Bibler R, Lavin M (2006) Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): A recent diversification in an ancient landscape. *Syst Bot* 31:779–791.

- Dubcovsky J, Dvorak J (1995) Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes. *Genetics* 140:1367–1377.
- Ferrier-Cana E, Geffroy V, Macadre C et al (2003) Characterization of expressed NBS-LRR resistance gene candidates from common bean. *Theor Appl Genet* 106: 251–261.
- Fonsêca A, Ferreira J, Santos TRB et al (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Res* DOI 10.1007/s10577-010-9129-8.
- Fuchs J, Brandes A, Schubert I (1995) Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *P1 Syst Evol* 196:227–241.
- Geffroy V, Macadré C, David P et al (2009) Molecular analysis of a large subtelomeric NBS-LRR family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 181: 405–419.
- Geffroy V, Seignac M, De Oliveira JCF et al (2008) Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 287–296.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Ananthawat-Jónsson K et al (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3: 109–115.
- Heslop-Harrison JS, Harrison GE, Leitch IJ (1992) Reprobing of DNA:DNA *in situ* hybridization preparations. *TIG* 8: 372–373.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ (2009) *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético* 3 ed. Porto Alegre: Artmed, pp 612.

- Kami J, Poncet V, Geffroy V, Gepts P (2006) Development of four phylogenetically-arrayed BAC libraries and sequence of the APA locus in *Phaseolus vulgaris*. *Theor Appl Genet* 112: 987–998.
- Kim H, Miguel PS, Nelson W et al (2007) Comparative physical mapping between *Oryza sativa* (AA genome type) and *O. punctata* (BB genome type). *Genetics* 176:379–390.
- Koumbaris GL, Bass HW (2003) A new single-locus cytogenetic mapping system for maize (*Zea mays* L.): overcoming FISH detection limits with marker-selected sorghum (*S. propinquum* L.) BAC clones. *Plant J* 35:647–659.
- Lagercrantz U (1998) Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that Brassica genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. *Genetics* 150:1217–1228.
- Lagercrantz U, Lydiatet DJ (1996) Comparative genome mapping in Brassica. *Genetics* 144:1903–1910.
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A et al (2006) Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *PNAS* 103:5224–5229.
- Mandáková T, Lysak MA (2008) Chromosomal Phylogeny and Karyotype Evolution in $x=7$ Crucifer Species (Brassicaceae). *Plant Cell* 20: 2559–2570.
- Marchant CJ (1973) Chromosome variation in Araceae: V. Acoreae to Lasieae. *Kew Bulletin* 8(2):199–210.
- Mercado-Ruaro P, Delgado-Salinas A (1996) Karyological studies in several mexican species of *Phaseolus* L. and *Vigna savi* (Phseolinae, Fabaceae) In: B. Pickergill and JM, Lock eds *Advances in Legumes Systematics 8: Legumes of Economic Importance* Royal

Botanic Gardens, Kew. pp 83–87.

Mercado-Ruaro P, Delgado-Salinas A (1998) Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). *Am J Bot* 85:1–9.

Moscone EA, Klein F, Lambrou M, Fuchs J e 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.

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, de Almeida CCS, Mosiolek M et al. (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor Appl Genet* 112: 924–933.

Pedrosa-Harand A, Porch T, Gepts P (2008) Standard nomenclature for common bean chromosomes and linkage groups. *Annu Rep Bean Improv Coop* 51:106–107.

Pedrosa-Harand A, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D (2009) Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. *Chromosome Res* 17:405–417.

Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004) Quantum speciation in *Aegilops*: Molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. *PNAS* 101(41):14818–14823.

Richards EJ, Ausubel FM (1988) Isolation of a Higher Eukaryotic Telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53:127–136.

Ruiz-Herrera A, García F, Azzalin C, Giulotto E, Egozcue J, Ponsà M, Garcia M (2002) Distribution of intrachromosomal telomeric sequences (ITS) on *Macaca fascicularis*

- (Primates) chromosomes and their implication for chromosome evolution. *Hum Genet* 110:578–586.
- Schwarzacher T, Ambros P, Schweizer D (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst Evol* 126:706–712.
- Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307–324.
- Shippen DE, Mcnight TD (1998) Telomeres, telomerase, and plant development. *Trends Plant Sci* 3(4):126–130.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP et al (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato. *Genetics* 132:1141–1160.
- 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.
- Zheng J, Nakata M, Uchiyama H, Morikawa H, Tanaka R (1991) Giemsa C-banding patterns in several species of *Phaseolus* l. and *Vigna* savi, Fabaceae. *Cytologia* 56:459–466.
- Zwick MS, Hanson RE, McKnight TD et al. (1997) A rapid procedure for isolation of *C₀t*-1 DNA from plants. *Genome* 40:138–142.

Tabela 1. Lista de clones utilizados como sondas para análises comparativas através de FISH entre *P. vulgaris* (*P.v.*) e *P. microcarpus* (*P.m.*) e sua distribuição e localização em ambas as espécies.

Cromossomo	Clones hibridizados	Distribuição		Localização			
		<i>P. v.</i>	<i>P. m.</i>	Braço		Posição	
				<i>P. v.</i>	<i>P. m.</i>	<i>P. v.</i>	<i>P. m.</i>
1	221F15	Único ^a	Único ^b	Curto	Curto	Proximal	Proximal
	38C24	Único	Único	Longo	Longo	Terminal	Terminal
2	17P14	Repetitivo	Único	-	Curto	Subtelomérico	Intersticial
	127F19	Único	Único	Longo	Longo	Intersticial	Intersticial
	225P10	Único	Único	Longo	Longo	Terminal	Terminal
3	147K17 ^C	Único	Único ^c	Curto	Longo	Intersticial	Intersticial
	267H4	Único ^a	Único ^a	Curto	Longo	Intersticial	Intersticial
	174E13	Único	Único	Longo	Longo	Terminal	Terminal
	91K16	Único	Único	Longo	Longo	Terminal	Terminal
4	221J10	Único ^a	Único ^b	Curto	Curto	Intersticial	Intersticial
	B61	Único	Único	Curto	Curto	Intersticial	Intersticial
	DNAr 5S	0	Repetitivo	0	Longo	0	Proximal
	190C15	Único ^a	Único ^b	Longo	Longo	Intersticial	Intersticial
5	36H21	Único	Repetitivo ^b	Longo	-	Intersticial	Pericentromérico
	103P12	Repetitivo	Repetitivo	-	-	Pericentromérico	Pericentromérico
6	DNAr 45S	Repetitivo	Repetitivo	Curto	Curto	Terminal	Terminal
	147K17	0	Único	0	Curto	0	Proximal
	121F5	Único	Único	Longo	Longo	Intersticial	Terminal
	18B15	Único	Único	Longo	Longo	Terminal	Intersticial
	143N10	Repetitivo	Repetitivo	-	-	Pericentromérico	Pericentromérico
	260H1	Repetitivo	0	-	0	Pericentromérico	0
7	86I17	Repetitivo	Único	-	Curto	Subtelomérico	Intersticial
	22I21	Único ^a	Único ^b	Longo	Longo	Intersticial	Intersticial
	12M3	Repetitivo	0	-	0	Pericentromérico	0

8	177I19	Único	Único	Curto	Curto	Intersticial	Intersticial
	169G16	Único ^a	Único ^b	Longo	Longo	Terminal	Terminal
9	163I7	Único ^a	Único ^b	Longo	Curto	Intersticial	Proximal
	224I16	Único ^a	Único ^b	Longo	Longo	Terminal	Terminal
10	63H6	Repetitivo	Único	-	Curto	Subtelomérico	Terminal
	DNAr 5S	Repetitivo	Repetitivo	Longo	Longo	Intersticial	Proximal
	173P6	Único ^a	Único ^b	Longo	Longo	Intersticial	Terminal
	81A17	Repetitivo	Repetitivo	-	-	Pericentromérico	Pericentromérico
11	179N14	Único	Único	Curto	Curto	Terminal	Terminal
	255F18	Único	Único	Curto	Curto	Intersticial	Intersticial
	25D1	Único ^a	Único ^b	Longo	Longo	Intersticial	Intersticial

^a com uso de C_0t -100; disperso quando sem bloqueio.

^b com uso de C_0t -100; padrão sem bloqueio desconhecido.

^c BAC do cromossomo 3 com sinal extra, mais fraco, no cromossomo 6.

- Sinais repetitivos não específicos para um dos braços.

0 Sinal não evidenciado após hibridização.

Legendas

Figura 1. Sequências repetitivas visualizadas em cromossomos metafásicos mitóticos de *P. microcarpus*. A, padrão de bandas CMA⁺. Bandas mais fortes na extremidade de um par cromossômico, indicado pelas cabeças de seta, e bandas fracas nas regiões pericentroméricas de alguns cromossomos, indicado pelas setas. B, mesma célula hibridizada *in situ* com sondas de DNAr 5S (laranja), e 45S (verde). C, Sequência telomérica de *Arabidopsis* (TTTAGGG) (laranja). As setas indicam a presença de sequências teloméricas intersticiais (ITS) em um par cromossômico. D, mesma célula hibridizada *in situ* com o BAC 174E13 (vermelho), localizado no mesmo braço do sítio de ITS, no cromossomo 3. E, BAC 81A17 (vermelho) apresentando padrão pericentromérico em todos os cromossomos do complemento. F, BAC 147K17 (rosa), selecionado para o cromossomo 3, evidenciou um sítio duplicado mais fraco, indicado por um par de setas, no mesmo braço da única constrição secundária evidenciada em *P. microcarpus*. Inserções em B e E apresentam os mesmos cromossomos indicados na metáfase completa, porém em maior ampliação e contraste. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI e visualizados em cinza, exceto em C. Barra em F, corresponde a 5 µm.

Figura 2. Hibridização *in situ* em cromossomos metafásicos mitóticos de *P. microcarpus* com clones selecionados a partir do mapa cromossômico de *P. vulgaris*. Os clones 221F15 (A, cromossomo 1), 225P10 (B, 2), 174E13 (C, 3), B61 (D, 4), 18B15 (E, 6), 86I17 (F, 7), 177I19 (G, 8), 224I16 (H, 9), 173P6 (I, 10) e 179N14 (J, 11) estão representados em amarelo. Já os clones 38C24 (A), 17P14 (B), 267H4 (C), 190C15 (D), 221I21 (F), 169G16 (G), 163I7 (H), 63H6 (I) e 255F18 (J) estão representados em vermelho. Em E, sítio de DNAr 45S (verde) no cromossomo 6. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI e visualizados em cinza. Barra em J, corresponde a 5 µm.

Figura 3. Localização física dos clones de BACs previamente mapeados em *P. vulgaris* na espécie *P. microcarpus*, contra-corados com DAPI. Clones únicos (vermelho, rosa, amarelo e azul) estão ordenados de acordo com as suas distribuições ao longo dos braços (do curto para o longo). Sítios de DNAr 5S e 45S são representados em laranja e verde, respectivamente. As principais sobreposições são representadas nas últimas colunas, onde cada BAC é mostrado na mesma cor que nas colunas anteriores. Apenas para o cromossomo 10, a penúltima coluna evidencia a presença do sinal duplicado de DNAr 5S no braço curto, detectado em alguns indivíduos. Barra no topo corresponde a 5 μ m.

Figura 4. Representação esquemática do complemento cromossômico de *P. microcarpus* em comparação com o idiograma de *P. vulgaris* (modificado de Fonsêca et al., 2010), mostrando apenas os clones hibridizados nas duas espécies. Blocos em vermelho indicam os BACs envolvidos nos rearranjos e as setas as mudanças de posição dos mesmos. O quadrado em preto indica a conservação do BAC 147K17 no cromossomo 3, não sendo evidenciado o segundo sinal, no cromossomo 6, como em *P. microcarpus*. O quadrado em vermelho indica a conservação do BAC 255F18 no braço curto do cromossomo 11, não sendo evidenciado o segundo sinal, no cromossomo 7, como em *P. vulgaris*. Círculos em marrom indicam a localização das sequências teloméricas.

Figura 5. Análise esquemática comparativa dos cinco cromossomos de *P. microcarpus* (clado A) e *P. lunatus* (clado B, modificado de Bonifácio, 2009) envolvidos em eventos de rearranjo em relação à *P. vulgaris* (clado B, modificado de Fonsêca et al., 2010) considerando-se a filogenia proposta para o gênero (modificado de Delgado-Salinas et al., 2006). Blocos em vermelho indicam os BACs envolvidos em rearranjos e as setas, mudanças de posição dos mesmos ou dos centrômeros em relação à *P. vulgaris*. Letras de a-j sugerem possíveis eventos

sinapomórficos (indicados pelos colchetes) para cada clado representado, exceto para b e c, que dependem de um grupo externo para seu posicionamento entre os clados A e B.

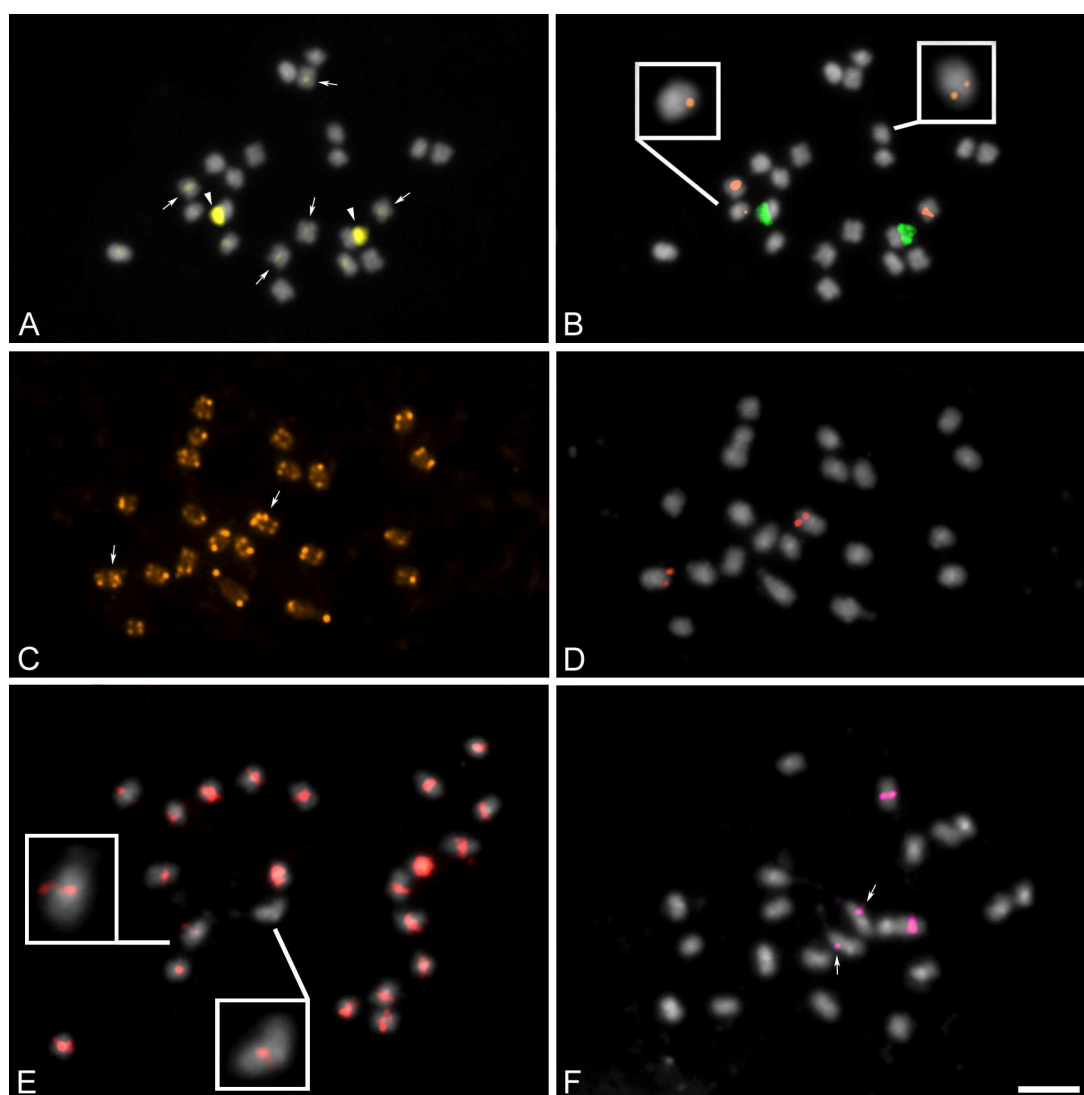


Figura 1.

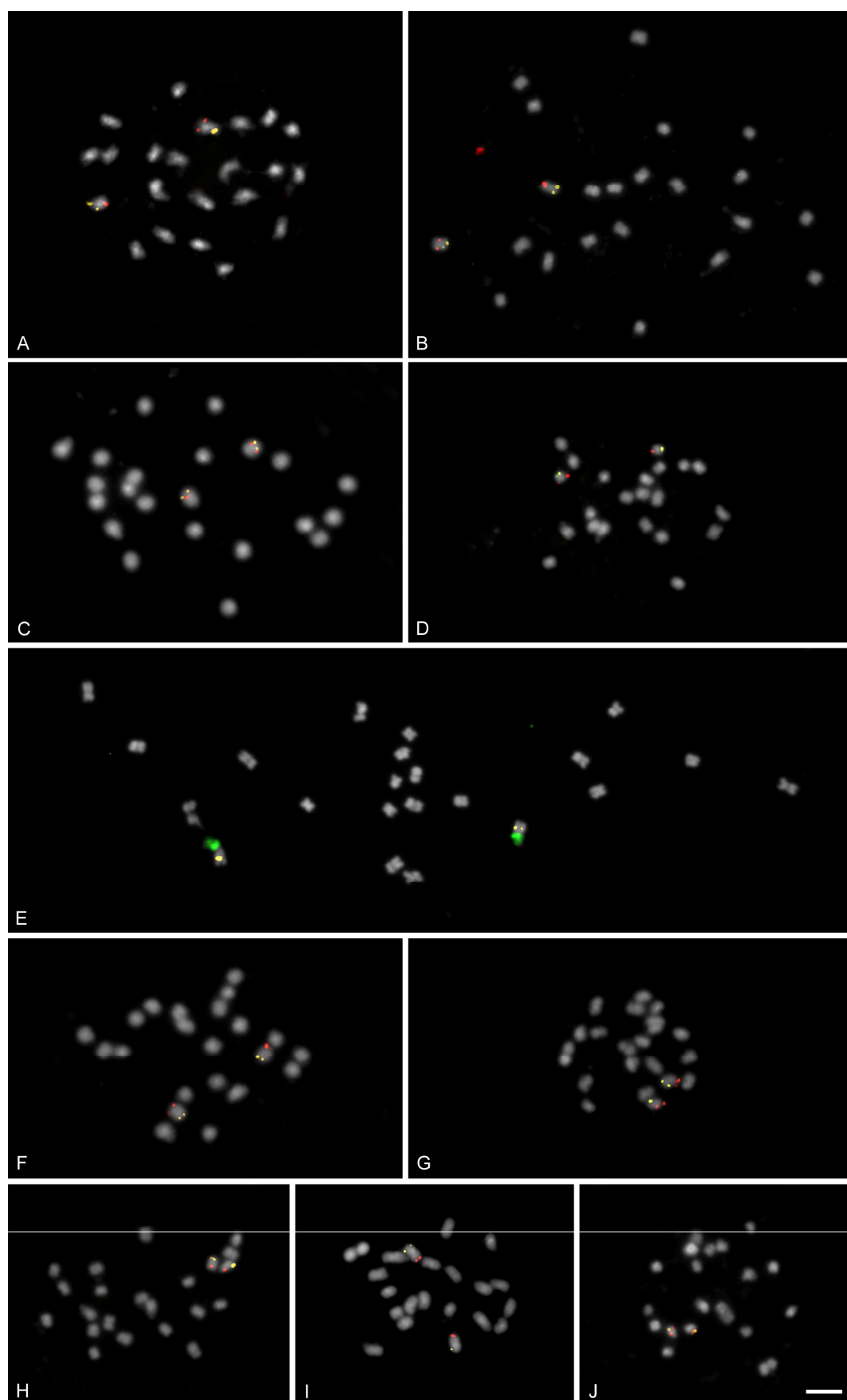


Figura 2.

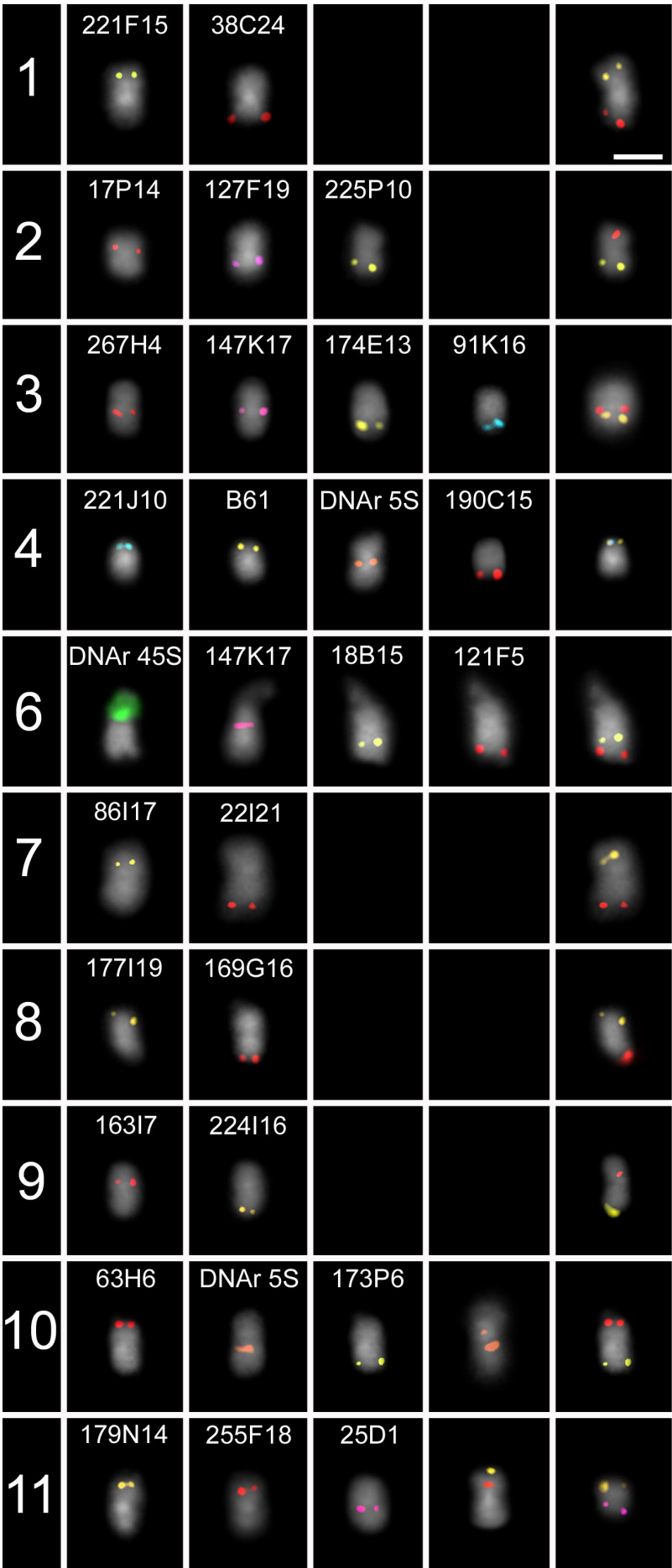
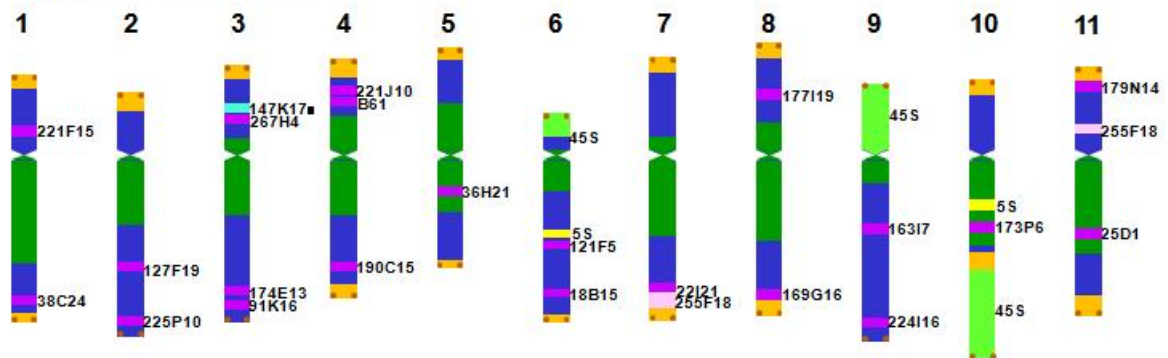
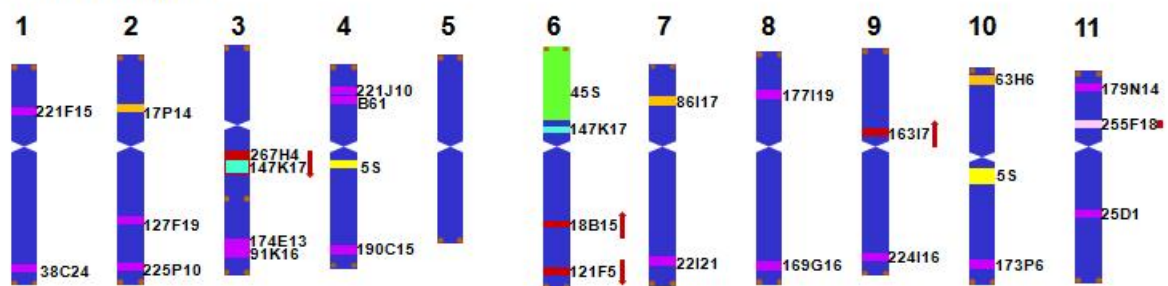


Figura 3.

P. vulgaris* cv. Bat93**P. microcarpus***

■ BACs cópia simples

■ Sítios do BAC 147K17

■ BACs subteloméricos em *P. vulgaris* e únicos em *P. microcarpus* (BACs 17P14, 63H6, 86I17)

■ Sítios do BAC 255F18

■ DNAr 5S ■ DNAr 45S

■ BAC pericentromérico em *P. vulgaris* e ausentes em *P. microcarpus* (BAC 12M3)

Figura 4.

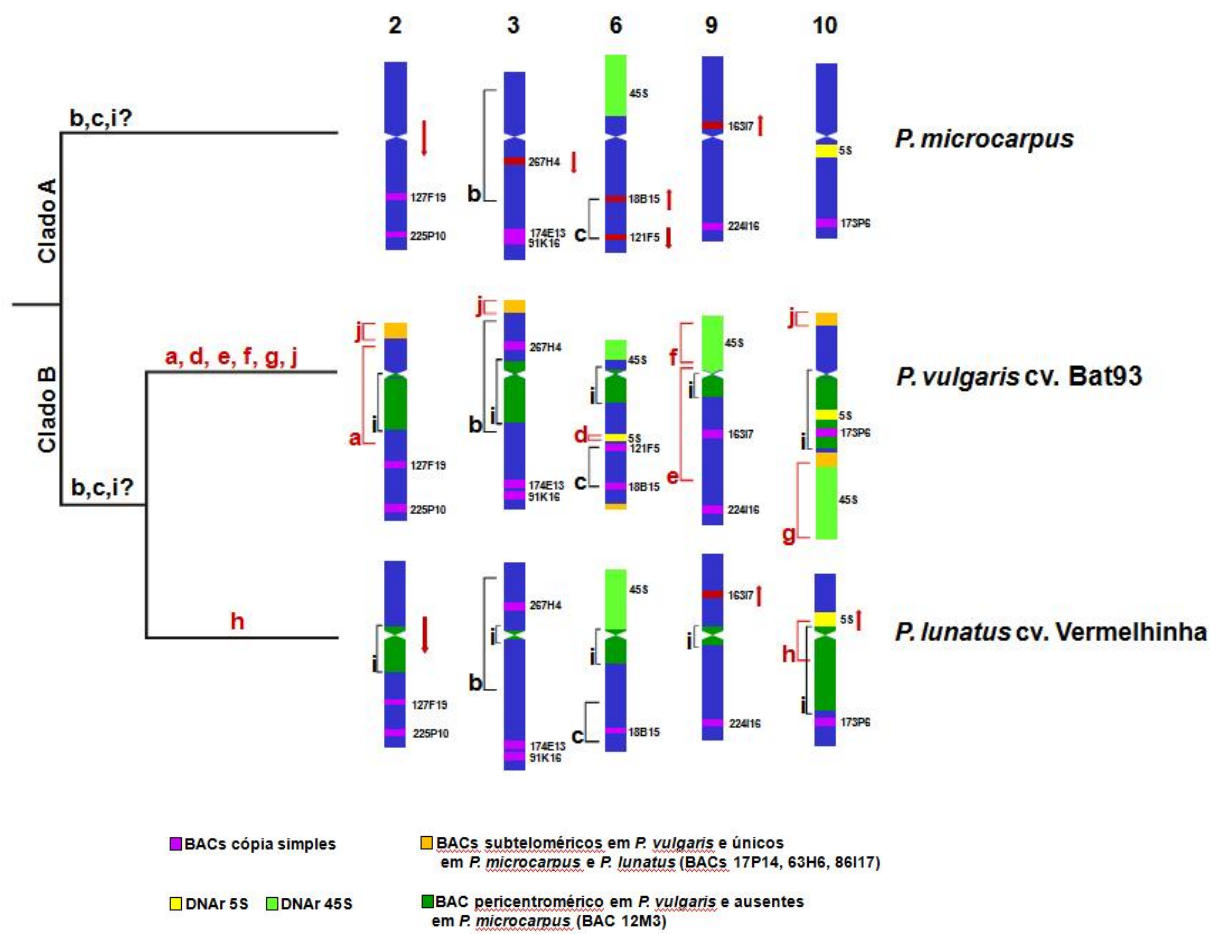


Figura 5.

5. Conclusões

- A técnica de BAC-FISH confirmou a sua eficiência em estudos de evolução cariotípica a nível genérico, uma vez que BACs cópia única de *P. vulgaris* puderam ser mapeados em *P. microcarpus*, espécie filogeneticamente distante no gênero.
- Diferenças na composição de sequências repetitivas pericentroméricas foram evidenciadas após a utilização das técnicas de bandeamento e FISH de BACs, indicando que esse tipo de sequência parece evoluir de forma independente em relação a outras sequências repetitivas e às sequências cópia única no gênero.
- Variações no número de sítios de DNAr 45S em *Phaseolus* parecem ser restritas ao clado que engloba o grupo Vulgaris e seu grupo irmão. Eventos de transposição, amplificação de pequenos sítios e deleção de sequências devem ter ocorrido a partir de um único sítio no cromossomo 6 ancestral.
- Sequências duplicadas em diferentes regiões cromossômicas de *P. microcarpus*, como sítios de DNAr 5S e BACs, podem ter surgido a partir de eventos de duplicação e transposição.
- A quantidade de alterações cariotípicas refletiu a distância filogenética entre as espécies analisadas.
- As inversões são aparentemente o mecanismo responsável pelas poucas quebras de colinearidade em *Phaseolus*, sendo o mecanismo mais importante na evolução cariotípica estrutural do gênero.

Normas da revista Chromosome Research

Chromosome Research

Instructions for authors

Manuscript Submission

There are no page charges or charges for the publication of colour illustrations or administration charges for papers published in Chromosome Research.

It is understood that papers submitted for publication have not been published previously and are not simultaneously offered to any other journal. Before submission, the submitting author must ensure that the manuscript has been seen and approved by all other named authors.

How to Submit your Manuscript

Authors should submit their manuscripts online. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right of the Chromosome Research web page, or follow this link:

<http://www.editorialmanager.com/chromres/>

Upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen. A decision with regard to acceptance for publication will normally be given within 21 days of receipt of the manuscript.

When submitting your manuscript, please choose one of the Associate Editors as your preferred handling editor. If you do not have a preference, or leave this option open, your submission will be handled by the Editor-in-Chief.

Editor in Chief:

Professor Herbert Macgregor

School of Biosciences

Geoffrey Pope Building

University of Exeter, UK

Associate Editors:

Professor Wendy Bickmore

MRC Human Genetics Unit

Western General Hospital NHS Trust

Edinburgh, Scotland, UK

Dr. Mary E. Delany

2131D Meyer Hall
Department of Animal Science
University of California
Davis, CA USA

Professor. J.S. (Pat) Heslop Harrison
Department of Biology
University of Leicester
Leicester, UK

Dr. Dean Jackson
Faculty of Life Sciences
The University of Manchester
Manchester, UK

Dr. Jiming Jiang
Department of Horticulture
University of Wisconsin-Madison
Madison, WI, USA

Dr. Hans de Jong
Laboratory of Genetics
Wageningen Universiteit
Wageningen, the Netherlands

Professor Hans J. Lipps
Institut für Zellbiologie
Universität Witten/Herdecke
Witten, Germany

Dr. Nobuo Takagi
Hokusei Gakuen University
Atsubetsu ku
Sapporo, Japan

Dr. Walther Traut
Institut fuer Biologie
Universitaet Luebeck
Luebeck, Germany

Dr. Fengtang Yang
The Wellcome Trust Sanger Institute
Wellcome Trust Genome Campus
Hinxton, Cambridge, UK

Style and Presentation

The manuscript should be typed with double spacing throughout, allowing for ample margins. The title page should show the paper title, names and addresses of all authors, a short running title, and fax and telephone numbers and the e mail address for the corresponding author. The text of the paper should be arranged in the following sequence: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. Informative legends should be provided for all illustrations and should be grouped together at the end of the paper, along with all tables. Subheadings may be inserted in the main text, but should not be numbered or lettered. Manuscripts should be written in clear, grammatical, idiomatic English. Spelling should conform to Webster's International Dictionary or The Concise Oxford English Dictionary and data should be presented simply and concisely, using Systeme International (SI) units.

Abbreviations

All abbreviations not obvious to the general reader should be defined the first time they are used. A complete alphabetically arranged list of all abbreviations used, including the definitions, should be included in the manuscript.

References

References should be cited in the text using the Harvard (name date) system. Where there are three or more authors, only the first author's name should appear, followed by et al. Where

several references are cited at the same point in the text, these should be arranged in chronological order. The reference list should be typed with double spacing and arranged in alphabetical order. References should include: names and initials of all authors (unless there are more than six authors, when only the first three authors should be given, followed by et al.); year of publication; full title of the article; source using abbreviations for journals as shown in Index Medicus; volume number; and first and last page numbers. Abstracts should be identified as such. For citations from books, the chapter title should be followed by the names and initials of all editors, the title of the book, edition, place of publication, publisher and first and last page numbers.

Examples:

Thomas HM, Harper JA, Morgan WG (2001) Gross chromosome rearrangements are occurring in an accession of the grass *Lolium rigidum*. *Chromosome Res* 9: 585–590.

Ohno S (2001) The one to four rule and paralogues of sex determining genes. In: Scherer G, Schmid M, eds. *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*. Birkhauser Verlag, pp 1–10.

Engel E, Antonarakis SE (2002) *Genomic Imprinting and Uniparental Disomy in Medicine*. New York: Wiley-Liss.

Only accepted papers should be referenced; all other material should be referred to in the text as 'in preparation', 'personal communication', 'unpublished observations' and should not be included in the reference list.

Citing Internet References

World Wide Web: All references should include the same information that would be provided for a printed source (or as much of that information as possible). The Web information is then placed at the end of the reference. It is important to use "Retrieved from" and the date because documents on the Web may change in content, move, or be removed from a site altogether. To cite a Web site in text (but not a specific document), it is sufficient to give the address (e.g., <http://www.apa.org>) there and no reference entry is needed. However, when citing a particular web page a citation in the text (e.g. Gaten 2000) and an entry in the reference list will be required.

For example:

Gaten E. (2000) Internet references. Retrieved from

<http://www.le.ac.uk/biology/teach/mod300/ecitations.html> 19/9/2000

E mail: E mail communications from individuals should be cited as personal communications. The format in the text (personal communications are not cited in the reference list) is as follows:

(E. Gaten personal communication, March 28, 2001).

It is possible to send an e mail note disguised as someone else. Authors—not journal editors or copy editors—are responsible for the accuracy of all references, which includes verifying the source of e mail communications before citing them as personal communications in manuscripts.

One of the most comprehensive guides to citing internet references is provided by the American Psychological Association: <http://www.apastyle.org/electref.html>

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes. Key words should be chosen carefully, they are essential to electronic search tools.

Tables and Illustrations

All tables and illustrations should be referred to in the text, with appropriate locations indicated in the text margin. Tables should present new information and not duplicate data included in the text. Every table should have a descriptive title and, if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Line drawings should be supplied in a form suitable for high quality reproduction. Axes should be labelled clearly; other lettering should be kept to a minimum. Avoid the use of fine tints, especially as background to text.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel) TIFF. Photographs and photomicrographs should be cropped as close as possible to the area of interest and should be submitted as high resolution (>300dpi) as electronic files together with the manuscript. All photomicrographs must be accompanied by a scale bar with the equivalent measurement stated in the figure legend.

Colour figures

There are no charges for the publication of colour illustrations, either in the online or in the printed version of *Chromosome Research*.

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 and accepted after peer review. Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting. 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.

ESM may consist of:

- Information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use PDF, QuickTime, .avi, .mpeg, animated GIFs, or any other common file format) Submit your text or presentation material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term storage.
- 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 (colour and black & white), etc.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables (e.g., ". . . as shown in supplement S3").

Legends

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

Permission and Copyright It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures or tables from unpublished or copyrighted material. Copyright in articles published in this journal is the property of Springer to the extent transferable. Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources. There are no page charges or administration charges for papers published in this journal.

Open access publishing: Springer Open Choice™

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice™. A Springer Open Choice™ article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly (free of charge) through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice™, upon acceptance please visit www.springer.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice™ cannot be ordered for published articles.

Please note that funding agencies with mandatory open access or public access (i.e. USA NIH and the UK Wellcome Trust) and several other institutes (The Max Planck in Germany, the Dutch UKB and others) have special arrangements for Open Access publishing with Springer. Please consult your funding agency's representative for specific details.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by email. Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours.

Off-prints

Fifty free off-prints of each paper are provided. Authors may order additional off-prints on the form which accompanies the proofs.

Additional Information

Max Haring

Publishing editor, Chromosome Research

Springer

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

E-mail: Max.Haring@springer.com

<http://www.springer.com/journal/10577> <http://www.springer.com/journal/10577>