



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ANA RAFAELA DA SILVA OLIVEIRA

**ANÁLISES DE MACROSSINTENIA ENTRE ESPÉCIES DE *VIGNA SAVI* E DE  
*PHASEOLUS* L. MEDIANTE MAPEAMENTO CITOGENÉTICO**

Recife  
2018

ANA RAFAELA DA SILVA OLIVEIRA

**ANÁLISES DE MACROSSINTENIA ENTRE ESPÉCIES DE *VIGNA SAVI* E DE  
*PHASEOLUS L.* MEDIANTE MAPEAMENTO CITOGENÉTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Genética.

**Área de concentração:** Genética

**Orientadora:** Ana Christina Brasileiro-Vidal

**Coorientadoras:** Ana Maria Benko-Iseppon  
Andrea Pedrosa-Harand

Recife

2018

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Oliveira, Ana Rafaela da Silva

Análises de macrossintenia entre espécies de *Vigna savi* e de *Phaseolus L.* Mediante mapeamento citogenético / Ana Rafaela da Silva Oliveira - 2019.

123 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Christina Brasileiro Vidal

Coorientadoras: Ana Maria Benko Iseppon

Andrea Pedrosa Harand

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2019.

Inclui referências e anexo

1. *Vigna savi* 2. *Phaseolus L.* 3. Mapa cromossômico  
I. Vidal, Ana Christina Brasileiro (orient.) II. Iseppon, Ana Maria Benko (coorient.) III. Harand, Andrea Pedrosa (coorient.) IV. Título

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-096

ANA RAFAELA DA SILVA OLIVEIRA

**ANÁLISES DE MACROSSINTENIA ENTRE ESPÉCIES DE VIGNA SAVI E DE  
PHASEOLUS L. MEDIANTE MAPEAMENTO CITOGENÉTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em genética.

Aprovada em 27/02/2018

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Profa. Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Neide Santos (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Cibele Gomes Sotero Caio (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho (Examinador Externo)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix (Examinador Externo)  
Universidade Federal da Paraíba

## RESUMO

*Vigna* compreende espécies de grande importância econômica e social, como o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), que faz parte da base alimentar humana como fonte proteica. Baseado em estudos de evolução cariotípica e de macrossintenia dentro do gênero *Vigna* e entre *Vigna* e *Phaseolus*, o presente trabalho mapeou *in situ* sequências BACs (Cromossomos Artificiais de Bactéria) de *Phaseolus vulgaris* e de *V. unguiculata* em cromossomos de *Vigna aconitifolia*. Adicionalmente, medições do tamanho do genoma e sequências de DNA ribossomal 5S e 35S foram utilizadas para o estudo de evolução cariotípica em diferentes espécies de *Vigna*. As análises comparativas revelaram uma amplificação no número de sítios de DNAr 35S e uma correlação deste dado com o tamanho do genoma, corroborando a hipótese de que a fração repetitiva do genoma interfere no conteúdo de DNA. Mapas citogenéticos comparativos e árvores filogenéticas também foram gerados, auxiliando no entendimento da estrutura e da organização genômica, bem como em estudos de evolução cariotípica e de genômica comparativa dentro dos respectivos gêneros. Tais análises *in situ* revelaram quebras de sintenia e de colinearidade entre *V. aconitifolia* e *V. unguiculata* e entre *P. vulgaris*, sugerindo que as alterações cromossômicas observadas devem ter ocorrido na diversificação do clado *Vigna*.

Palavras-chave: BAC. DNAr. hibridização *in situ*. Macrossintenia. mapa cromossômico

## ABSTRACT

*Vigna* includes species of great economic and social importance, as the cowpea (*V. unguiculata*), which is part of the human feed base as a protein source. Based to karyotype evolution and macrosintenia studies within the genus *Vigna* and between *Vigna* and *Phaseolus*, the present work has mapped *in situ* BAC sequences (Bacterial Artificial Chromosomes) of *Phaseolus vulgaris* and *V. unguiculata* in the *V. aconitifolia* chromosomes. Additionally, genome size measurements and 5S and 35S ribosomal DNA sequences were used to karyotype evolution study in different *Vigna* species. Comparative analyzes revealed the 35S rDNA sites amplification and a correlation of this data with genome size, corroborating the hypothesis that the repetitive fraction of genome interferes in the DNA content. Comparative cytogenetic maps and phylogenetic trees were generated, assisting in the understanding to the structure and genomic organization, as well as karyotype evolution studies and comparative genomics within the respective genus. These *in situ* analyzes revealed sinteny and colinearity breaks between *V. aconitifolia* and *V. unguiculata* and among *P. vulgaris*, suggesting the observed chromosomal changes must have occurred in the diversification of the *Vigna* clade.

Keywords: BAC. rDNA. *in situ* hybridization. Macrosynteny. chromosomal map

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO 1

Fig. 1 – Fluorescent *in situ* hybridization of 14 genetically assigned BACs of *Phaseolus vulgaris* (*Pv*) in *Vigna aconitifolia* mitotic chromosomes (*Vac*) counterstained with DAPI (pseudo-colored in gray). a *V. aconitifolia* chromosomes (*Vac*1, *Vac*2, *Vac*3, *Vac*4 and *Vac*5) hybridized with rDNAs 5S and BACs from five *P. vulgaris* chromosomes (*Pv*1, *Pv*2, *Pv*3, *Pv*4 and *Pv*8). BACs were labeled with Cy3-dUTP and pseudo-colored in different colors. b BAC 177I19 (yellow; *Pv*8) and 38C24 (pink; *Pv*1) identified chromosome *Vac*1. c BACs M062M10 (yellow; *Vu*1) and M02E09 (pink; *Vu*5) identified chromosome *Vac*5. d BACs M074C16 (red; *Vu*2) and H026L23 (light blue; *Vu*2) mapped in *Vac*2. e BACs 127F19 (red; *Pv*2, arrowhead and in an unidentified second pair) and 95L13 (light blue; *Pv*3) in *Vac*3. f BAC 21N14 (light green; arrowhead; *Pv*2) hybridized on chromosome *Vac*3. g BACs 267H4 (yellow; *Pv*3) and 95L13 (light blue; *Pv*3), mapped in *Vac*3. h BACs 221J10 (yellow; *Pv*4) and 190C15 (light blue; *Pv*4) in *Vac*4. Bars in a and h represent 5 µm..... 55

Fig. 2 – Fluorescent *in situ* hybridization of 11 genetically assigned BACs of *Phaseolus vulgaris* (*Pv*) and two BACs of *Vigna unguiculata* (*Vu*) in *Vigna aconitifolia* mitotic chromosomes (*Vac*) counterstained with DAPI (pseudo-colored in gray). a *V. aconitifolia* chromosomes (*Vac*6, *Vac*7, *Vac*8, *Vac*9, *Vac*10 and *Vac*11) hybridized with rDNAs 35S and BACs of seven *P. vulgaris* chromosomes (*Pv*1, *Pv*6, *Pv*7, *Pv*8 and *Pv*11) and three *V. unguiculata* chromosomes (*Vu*9, *Vu*10 and *Vu*11). BACs were labeled with Cy3-dUTP and pseudo-colored in different colors. b BAC 18B15 (pink; *Pv*6) and rDNA 35S (green; *Pv*6) mapped in *Vac*6. c BAC 22I21 (blue; *Pv*7) and 86I17 (orange) identified in *Vac*7. d BACs 221F15 (light blue; *Pv*8) and 169G16 (red; *Pv*8), located in *Vac*8. e BAC H010M18 (blue, *Vu*9) identified in *Vac*9. f BACs H015M15 (red; *Vu*10) and H025N06 (yellow; *Vu*10) located in *Vac*10. g BACs

179N14 (dark blue; *Pv*11) and H092J22 (pink; *Vu*11) hybridized in *Vac*11. Bars in a and g represent 5  $\mu$ m..... 57

- Fig. 3 – Schematic representation of comparative cytogenetic maps of *Vigna aconitifolia* (*Vac*), *V. unguiculata* (*Vu*) and *Phaseolus vulgaris* (*Pv*) with BAC-FISH of 31 BAC clones of *P. vulgaris* and 16 BAC clones of *V. unguiculata* in *V. aconitifolia* chromosomes mapped as a single copy. \* BAC 86117 was not mapped as a single copy in *P. vulgaris* (*Pv*), but as repetitive sites. Here, it was positioned as single site, according to its genetic position and location in *P. lunatus* (Almeida and Pedrosa-Harand 2013). # Indicate BACs of *Vigna unguiculata*..... 58

- Fig. 4 – Schematic comparison of the major chromosomal rearrangements among *V. unguiculata* (Vasconcelos et al. 2015), *V. aconitifolia* (present work), *P. vulgaris* (Fonsêca et al. 2010), *P. lunatus* (Bonifácio et al. 2012), and *P. microcarpus* (Fonsêca and Pedrosa-Harand 2013), using *P. vulgaris* chromosomes as reference. The phylogenetic relationships among species are based on ITS, *trnK* and *matK* markers (Delgado-Salinas et al. 2011; Souza et al. in preparation). Blocks in black indicate BACs mapped on *Pv*1; in light blue on *Pv*2; in pink on *Pv*3; in orange on *Pv*4, and in royal blue on *Pv*8. Putative synapomorphic events for each clade are represented above each branch by the abbreviations: I (inversion), Pa (paracentric), Pe (pericentric), T (translocation), D (duplication) and numbers indicating the chromosome pair involved. # indicates BAC clones of *V. unguiculata*..... 61

## ARTIGO 2

- Figura 1 – Metáfases mitóticas de *Vigna unguiculata* subsp. *dekindtiana* (A–B), *V. nakashimae* (C–D) e *V. unguiculata* subsp. *cylindrica* (E–F) após coloração com CMA (amarelo)/DAPI (cinza) e hibridizado *in situ* com sondas de DNAr 35S (verde) e 5S (vermelho). Cabeças de seta apontam para os sítios de CMA<sup>+</sup> e DNAr 35S. Barra em F = 5  $\mu$ m ..... 84



Figura 2 – Representação esquemática dos cromossomos portadores de sítios de DNAr 35S e 5S para espécies de *Vigna* e *Phaseolus*, mapeados em uma árvore filogenética baseada na análise de inferência bayesiana, utilizando a combinação das regiões de ITS, *trnK* e *matK* para a relação entre estas leguminosas. Os blocos em verde indicam sítios de DNAr 35S e os blocos em vermelho indicam sítios de DNAr 5S. Asteriscos (\*) indicam as espécies cujos dados foram compilados da literatura: *V. radiata* (Bortoleti *et al.*, 2012); *V. subterranea* (She *et al.*, 2015); *V. trilobata* (<http://data.kew.org/cvalues/>); *V. unguiculata* (Vasconcelos *et al.*, 2015); *V. vexillata* (Choi *et al.*, 2013); *P. coccineus* (Almeida *et al.*, 2012); *P. leptostachyus* (Fonsêca *et al.*, 2016); *P. lunatus* (Bonifácio *et al.*, 2012); *P. macvaughii* e *P. micranthus* (<http://data.kew.org/cvalues/>); *P. microcarpus* (Fonsêca & Pedrosa-Harand, 2013); *P. vulgaris* (Fonsêca *et al.*, 2010); *Lablab purpureus* (She & Jiang, 2015)..... 86

Figura 3 – Reconstrução de estados cariotípicos ancestrais (tamanho do genoma e número de sítios de DNAr 5S e 35S), utilizando o programa Mesquite v.2.75 (Maddison & Maddison, 2011). (A) Estado ancestral para ‘número de sítios de DNAr 5S’, inferido usando a máxima verossimilhança sob o modelo Markov k-state one-parameter (Mk1), considerando todas as mudanças igualmente prováveis. (B) Reconstruções de caracteres ‘número de sítios de DNAr 35S’ e ‘tamanho do genoma’ codificados com contínuos, a partir do algoritmo de máxima parcimônia..... 89

Figura S1 – Metáfases mitóticas de *Vigna aconitifolia* (A–B), *V. angularis* (C–D), *V. mungo* (E–F), *V. umbellata* (G–H) e *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (I–J) após coloração com CMA (amarelo)/DAPI (cinza) e hibridizado *in situ* com sondas de DNAr 35S (verde) e 5S (vermelho). Cabeças de seta apontam para os sítios de CMA<sup>+</sup> e DNAr 35S. Barra em J = 5 µm..... 122

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 – Número e tamanho cromossômico para várias espécies de <i>Vigna</i> e referência na qual foi descrita .....	33
---	----

#### ARTIGO 1

Table 1 – List of 31 BAC clones of <i>Phaseolus vulgaris</i> , 16 BAC clones of <i>Vigna unguiculata</i> and bacteriophage, with respective chromosomes (Pv)/linkage group (LG), location of the probes after FISH in <i>V. aconitifolia</i> , <i>V. unguiculata</i> and <i>P. vulgaris</i> (use of blocking DNA - Cot-100).....	56
--	----

#### ARTIGO 2

Tabela 1 – Números de cromossomos, sítios CMA <sup>+</sup> / DAPI <sup>+</sup> , DNAr 35S e 5S e valor 1C (pg) em espécies de <i>Vigna</i> .....	76
Tabela 2 – Números de acesso do NCBI para as espécies analisadas filogeneticamente .....	82
Tabela 3 – Características das sequências <i>TrnL-TrnF</i> , <i>MatK</i> e ITS nas espécies analisadas filogeneticamente .....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E HQ	<i>8-hydroxyquinoline</i> 8-hidroxiquinoleína
a.C.	<i>Antes de Cristo</i>
AT	<i>Adenine and Timine</i> Adenina e Timina
AIC	<i>Akaike Information Criterion</i> Critério de Informação Akaike
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
AgNOR	<i>Nucleolus organizer regions stained by silver nitrate</i> Regiões organizadoras de nucléolo coradas por Nitrato de prata
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i> Cromossomo Artificial de Bactéria
BAC-FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization of Bacterial Artificial Chromosome</i> Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente de Cromossomo Artificial de Bactéria
BAC-end sequence	<i>Bacterial Artificial Chromosome – end sequence</i> Cromossomo Artificial de Bactérias-sequências terminais
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> Albumina de Soro Bovino
C	Conteúdo de DNA do complemento haploide
CIAT	<i>International Center for Tropical Agriculture</i> Centro Internacional de Agricultura Tropical
cM	centiMorgans
CMA <sub>3</sub>	<i>Chromomycin A3</i> Cromomicina A3

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
cv.	cultivar
Cy3	<i>Cyanine 3</i> Cianina 3
$C_0t$	Fração de DNA repetitivo baseada na cinética de reassociação do DNA
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> 4',6-diamidino-2-fenilindol
ddNTPs	Didesoxinucleotídeos
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	<i>Ribosomal DNA</i> DNA ribossomal
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESTs	<i>Expressed Sequence Tags</i> Etiquetas de Sequências Expressas
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> Organização para Agricultura e Alimentação
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i> Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente
FITC	<i>Fluorecein isotiocyanate</i> Fluoresceína isotiocianato
GC	<i>Guanine and Cytosine</i>

	Guanina e Citosina
GBS	<i>Genotyping by sequencing</i> Genotipagem por sequenciamento
GISH	<i>Genomic In Situ Hybridization</i> Hibridização Genômica <i>In Situ</i>
GP	<i>gene pools</i> <i>pools</i> gênicos
GPB	<i>General Purpose Buffer</i> Tampão de objetivo geral
IGS	<i>Intergenic Spacer</i> Espaçador intergênico
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
IPK	<i>Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung</i> , Instituto de Pesquisa de Genética de Plantas e Cultivo de Plantas em Leibniz
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer Regions</i> Região Espaçadora de Transcrito Interno
kb	Kilo bases
kD	Kilo Dalton
LG	<i>Linkage group</i> Grupo de Ligação
<i>Leg_marker</i>	<i>Legume marker</i> Marcas de leguminosas
LGBV	Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal
LTR	Longas Repetições Terminais <i>Long Terminal Repeats</i>
<i>matK</i>	<i>Maturase K, a plant plastid molecular marker</i> <i>Matirase K, um marcador molecular vegetal plastidial</i>

Mb	<i>Mega-base</i>
µm	Micrômetro
MYA	<i>Million years ago</i> milhões de ano
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> Centro Nacional de Informação biotecnológica
NGS	<i>New Generation Sequencing</i> Sequenciamento de Nova Geração
NordEST	Rede de dados de sequencias do feijão-caupi
NTS	<i>Non-Transcribed Spacers</i> Espaçadores não transcritos
Pb	<i>base pairs</i> Pares de bases
Pg	Picogramas
<i>Plu</i>	<i>P. lunatus</i>
<i>Pm</i>	<i>P. microcarpus</i>
<i>Pv</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RON	Região Organizadora de Nucléolo
SSC	<i>Citric acid–sodium citrate buffer</i> Tampão Citrato de Sódio-Salino
SSR	<i>Sequence Simple Repeats</i> Sequências Simples Repetidas
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
Va	<i>Vigna angularis</i>

<i>Vac</i>	<i>Vigna aconitifolia</i>
<i>Vu</i>	<i>Vigna unguiculata</i>
<i>VuLG</i>	<i>Vigna unguiculata linked group</i> Grupo de ligação de <i>Vigna unguiculata</i>
<i>YACs</i>	<i>Yeast Artificial Chromosomes</i> <i>Cromossomos Artificiais de Leveduras</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1	GÊNERO <i>VIGNA SAVI</i> .....	18
2.2	GÊNERO <i>PHASEOLUS</i> L. ....	20
2.3	RELAÇÕES FILOGENÉTICAS EM <i>VIGNA</i> E <i>PHASEOLUS</i> .....	20
2.4	<i>POOL</i> GÊNICO .....	22
2.5	IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DOS FEIJÕES .....	24
2.6	MAPAS GENÉTICOS E FÍSICOS .....	27
2.6.1	MAPAS GENÉTICOS E DE SEQUENCIAMENTO EM <i>VIGNA</i> .....	30
2.7	CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO GÊNERO <i>VIGNA SAVI</i>	31
2.7.1	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....	35
2.7.2	Hibridização genômica <i>in situ</i> (GISH) .....	37
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>4</b>	<b>ARTIGO 1 - INTEGRATIVE BAC-FISH MAP IN MOTH BEAN[<i>VIGNA ACONITIFOLIA</i> (JACQ.) MARÉCHAL] AND ITS MACROSYNTENIC RELATIONSHIP AMONG <i>VIGNA</i> AND <i>PHASEOLUS</i> SPECIES .....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO 2 - DIVERSIDADE CITO-MOLECULAR EM ESPÉCIES DE <i>VIGNA SAVI</i> (FABACEAE) EM UM CONTEXTO FILOGENÉTICO ...</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>106</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>107</b>
	<b>ANEXO A - FIGURA SUPLEMENTAR 1 DO ARTIGO 1 .....</b>	<b>123</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A família Fabaceae Lindley (= Leguminosae Juss.) compreende três subfamílias (Faboideae/Papilionoideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae). Dentre elas, Papilionoideae apresenta gêneros de grande importância econômica, como *Glycine* Willd., *Lens* Miller, *Pisum* L., *Phaseolus* L. e *Vigna* Savi, destacando-se os dois últimos por incluírem todas as espécies de feijões existentes.

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 90 espécies, com  $2n = 20$  ou  $22$  cromossomos, com o feijão comum (*P. vulgaris* L.) seu principal representante. Filogeneticamente, as espécies do gênero são divididas em dois clados principais denominados A e B, sendo neste último incluídos o feijão comum e as outras quatro espécies de interesse econômico [*P. lunatus* (fava), *P. coccineus* (feijão da Espanha), *P. polyanthus* e *P. acutifolius*].

*Vigna*, por sua vez, compreende cerca de 120 espécies, a maioria com  $2n = 22$ . Oito espécies destacam-se por sua importância econômica, sendo seis do clado *Ceratotropis*: *V. aconitifolia* (Jacq.) Maréchal (feijão-traça), *V. angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi (feijão adzuki), *V. mungo* (L.) Hepper (feijão preto da China), *V. radiata* (L.) Wilczek (feijão-mungo), *V. reflexo-pilosa* Hayata (feijão crioulo), *V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi (feijão arroz); e duas do clado *Vigna*: *V. unguiculata* L. (Walp.) (feijão-caupi) e *V. subterranea* (L.) Verdc. (feijão bambara). Dentre essas espécies, o feijão-caupi destaca-se como a principal fonte de alimento para diversas populações, principalmente da África e América Latina.

Devido à grande importância econômica destes gêneros, mapas genéticos de sequenciamento e citogenéticos têm sido gerados a fim de incrementar o entendimento sobre a organização e a evolução de seus genomas. Adicionalmente, estudos citogenômicos comparativos entre espécies de ambos gêneros e de gêneros próximos têm sido de grande importância nas análises de macrossintenia e colinearidade, que incluem a identificação da posição das sequências, detecção de alterações cromossômicas estruturais e estudo do nível de conservação da ordem dos genes nos diferentes grupos taxonômicos.

Uma ferramenta citogenética útil para estudos comparativos é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com uso de sondas de DNA r 35S e 5S e de cromossomos artificiais de bactérias (BAC-FISH), que tem sido utilizada em análises de

macrossintenia entre espécies relacionadas que não possuem genoma completamente sequenciado e/ou montado, como é o caso de *V. aconitifolia*. Em *Vigna*, por exemplo, as espécies apresentam predominantemente um ou dois pares proximais de sítios de DNAr 5S e uma maior variabilidade de sítios de DNAr 35S (18S-5.8S-25S), com um a sete pares localizados predominantemente em regiões terminais, mas também proximais e intersticiais. No que diz respeito às análises de macrossintenia por BAC-FISH em e entre *Phaseolus* e *Vigna*, sondas de *P. vulgaris* tem permitido a comparação entre os mapas citogenéticos de *P. vulgaris*, *P. lunatus* L., *P. microcarpus* Mart e de *V. unguiculata*, sendo observada uma conservação parcial de sintenia entre cromossomos homeólogos e algumas quebras de colinearidade (alterações na posição das sequências), apesar da distância filogenética entre as espécies dos dois gêneros. Tais estudos demonstraram que a diferenciação cromossômica entre *Phaseolus* e *Vigna* parece estar relacionada a eventos de baixa complexidade, incluindo inversões, duplicações e translocações.

Dessa forma, o presente trabalho utilizou dados de filogenia com marcadores moleculares (ITS, *matK*, *trnL-trnF*), conteúdo de DNA, coloração CMA/DAPI associado com a técnica de FISH mediante o uso de sondas de DNAr 35S e 5S, incluindo dados inéditos para *V. aconitifolia*, *V. angularis*, *V. nakashimae*, *V. unguiculata* subsp. *cylindrica*, subsp. *dekindtiana* e subsp. *sesquipedalis*, visando incrementar o entendimento da evolução cariotípica do grupo. Adicionalmente, BAC-FISH com sondas BACs de *P. vulgaris* e de *V. unguiculata* foram usadas para a construção de um mapa citogenético de *V. aconitifolia* e para a realização de análises cito-comparativas entre espécies dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus*, fornecendo informações sobre a diversidade genética intra- e intergenérica e colaborando para estudos de de macrossintenia.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 GÊNERO *VIGNA SAVI*

*Vigna Savi* é um gênero que exhibe ampla adaptação edafoclimática, o que permite seu cultivo durante todo o ano. Suas espécies são autógamas e apresentam morfologia floral que favorece a cleistogamia e a diferenciação entre espécies. Apresentam corola com cinco pétalas, sendo uma pétala maior chamada de estandarte ou vexilo, duas laterais (asas) e duas pétalas internas e inferiores que são fundidas em forma de quilha (ou carena), uma estrutura em forma de um bolso torcido que protege os órgãos reprodutivos (Ng e Maréchal, 1985; Teófilo *et al.*, 2001).

O gênero *Vigna* compreende cerca de 120 espécies aceitas (<http://www.theplantlist.org/>), com distribuição pantropical, com espécies cultivadas na África, Ásia, Américas Central e do Sul e na Austrália (Ghafoo *et al.*, 2001). Apresenta três centros de domesticação com espécies provenientes da África, Ásia e América. A idade da diversificação existente entre o clado americano e seu irmão do Velho Mundo é de aproximadamente 6-7 milhões de anos (Ng e Maréchal, 1985; Delgado-Salinas *et al.*, 2011). A maioria das espécies de *Vigna* é endêmica da África (66), sugerindo que a evolução e dispersão do gênero ocorreram a partir deste continente (Faris, 1965; Freire-Filho, 1988).

De acordo com Maréchal *et al.* (1978), o gênero se encontrava dividido em sete subgêneros: três africanos *Vigna*, *Haydonia* e *Plectotropis*; dois americanos *Lasiospron*, *Sigmoidotropis*, e dois asiáticos *Ceratotropis*, e *Macrorhynchus*. Contudo, este último foi transferido para o gênero *Wajira* Thulin e o *Sigmoidotropis* Piper foi elevado ao status de gênero (Thulin *et al.*, 2004; Timko e Singh, 2008; Delgado-Salina *et al.*, 2011). Dentre os cinco subgêneros atualmente reconhecidos, *Ceratotropis* e *Vigna* destacam-se por possuírem espécies de importância econômica, cultivadas na Ásia e na África, respectivamente (Baudoin e Maréchal *et al.*, 1988; Delgado-Salinas *et al.*, 2011).

O subgênero *Ceratotropis* tem origem na Ásia e contém 21 espécies, sendo seis delas utilizadas para consumo humano e como forragem, a exemplo das espécies *V. aconitifolia* (Jacq.) Maréchal (feijão-traça), *V. angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi (feijão adzuki) e *V. radiata* (L.) Wilczek (feijão-da-china). *Vigna aconitifolia* é

uma leguminosa resistente à seca, nativa da Índia e do Paquistão, que foi domesticada nas regiões áridas e semiáridas das planícies desérticas do oeste da Índia. É predominantemente cultivada na Índia e Tailândia, embora tenha sido introduzida nos Estados Unidos, Cuba e em outras partes da Ásia (Brink e Jansen, 2006; USDA, 2015). *Vigna angularis*, por sua vez é de clima subtropical e temperado, amplamente cultivada em países do Leste Asiático, como China, Japão, Coreia e Taiwan, enquanto, *V. radiata* é cultivada na estação quente (entre 27 e 30 °C), principalmente por pequenos agricultores da Ásia, da África, da América do Sul e da Austrália, sendo considerada tolerante ao calor e a seca (Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2010).

O subgênero *Vigna*, por sua vez, apresenta 31 espécies endêmicas da África, sendo apenas duas delas domesticadas, *V. subterranea* (L.) Verd. (amendoim bambara ou feijão bambara) e *V. unguiculata* (L.) Walp. (feijão-caupi) (Akito 2011; Dikshit *et al.*, 2012). A primeira provavelmente se originou no nordeste da Nigéria e no norte dos Camarões, onde ainda pode ser encontrada em crescimento selvagem. É cultivada em toda a África tropical e, em menor proporção, nas partes tropicais das Américas, Ásia e Austrália.

*Vigna unguiculata*, por sua vez, apresenta grande importância econômica e é constituída por 12 subespécies, como *V. unguiculata* subsp. *cylindrica* (L.) Verdc. e *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdc, que são cultivadas (Maréchal *et al.*, 1978; Lush e Evans, 1981; <http://www.theplantlist.org/>). Embora nativa do sudeste da África, *V. unguiculata* (feijão-caupi) se propagou pelo mundo e é amplamente cultivada e consumida em regiões da Ásia, América do Sul e Central, Caribe, Estados Unidos, Oriente Médio e sul da Europa (Freire-Filho, 2011). Considera-se que seu cultivo tenha se iniciado por volta de 2.300 a.C. na antiga província de Transvaal da África do Sul (Ng e Maréchal, 1985; Smartt, 1990; Padulosi e Ng, 1997). Acredita-se que, no continente americano sua introdução tenha ocorrido a partir da Europa e do oeste da África, estando relacionada com a colonização espanhola e com o tráfico de escravos durante os séculos XVI e XVII (Steele, 1976; Freire-Filho, 1988). No Brasil, *V. unguiculata*, provavelmente, foi introduzida pelos escravos nos estados de Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e São Luís, sendo em seguida levada pelos colonizadores para outros estados (Curtin, 1969).

## 2.2 GÊNERO *PHASEOLUS* L.

O gênero *Phaseolus* L. é constituído por 96 espécies (<http://www.theplantlist.org/>), das quais cinco são cultivadas: *P. acutifolius* A. Gray, *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. polyanthus* Greeman e *P. vulgaris* L.. Dentre estas, destacam-se *P. vulgaris* (feijão comum) e *P. lunatus* (fava) devido à sua grande importância econômica para o Brasil (Broughton *et al.*, 2003; Delgado-Salinas *et al.*, 2006).

*Phaseolus vulgaris* tem sua origem no novo continente e estima-se que as populações selvagens tenham uma distribuição restrita ao Equador e norte do Peru, sugerindo que essa região seria o provável centro de origem deste feijoeiro. Após a evolução e dispersão, *P. vulgaris* originou dois conjuntos gênicos distintos: o Andino, que compreende a região central e o sul da América do Sul; e o Mesoamericano, o qual se estende do México ao norte da América do Sul (Gepts, 1998).

Evidências sugerem que a espécie foi domesticada independentemente nesses dois centros principais (Chacón *et al.*, 2005). Atualmente, não existem dados disponíveis que retratem a introdução de *P. vulgaris* no Brasil, apenas há relatos de que foi domesticada há mais de 7000 anos em diversas regiões da América Latina (Rosenswig, 2015).

## 2.3 RELAÇÕES FILOGENÉTICAS EM *VIGNA* E *PHASEOLUS*

Relações filogenéticas baseadas no uso de marcadores moleculares (de DNA nuclear, de cloroplasto e mitocondrial), citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e ecogeográficos podem ser utilizadas em congruência para analisar a diversidade genética, para inferir as relações dentro e entre as espécies, e como indicadores para prever as possibilidades de cruzamento interespecífico (Maxted *et al.*, 2004; Judd, 2009).

Análises de sequências nucleares (ITS) ou plastidiais (*atpB-rbcL*, *trnL-trnF*, *matK*) foram combinadas para obter uma maior clareza sobre as relações filogenéticas entre as espécies de *Vigna* (Doi *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2002; Yano *et al.*, 2004; Tun e Yamaguchi, 2007; Saini *et al.*, 2008; Saini e Jawali 2009; Delgado-Salinas *et al.*, 2011; Javadi *et al.*, 2011; She *et al.*, 2015). De modo geral, as análises

filogenéticas mostram que *Vigna* é um grupo parafilético, constituído por um clado com um subgênero americano (*Lasiospron*), um asiático (*Ceratotropis*) e três africanos (*Vigna*, *Haydonia* e *Plectrotropis*), embora os subgêneros *Lasiospron*, *Ceratotropis* e *Vigna* sejam considerados monofiléticos (Delgado-Salina *et al.*, 2011).

*Lasiospron* é o clado mais recente, sendo formado por espécies selvagens de distribuição principalmente neotropical, que habitam as florestas úmidas tropicais americanas, como *Vigna schottii* (Benth.) A. Delgado & Verdc., e *V. lasiocarpa* (Benth.) Verdc., além de três espécies presentes em ilhas atlânticas {*Vigna juruana* (Harms) Verdc., *V. diffusa* (Scott-Elliot) A. Delgado & Verdc. e *Vigna longifolia* (Benth.) Verdc. [syn. *V. trichocarpa* (C.Wright) A.Delgado]} (Delgado-Salina *et al.*, 2011).

O subgênero *Ceratotropis* (asiático) se subdivide em três subgrupos (Angulares, Aconitifoliae e *Ceratotropis*), os quais abrangem a maioria das espécies cultivadas, como *V. angularis*, *V. reflexo-pilosa* e *V. umbellata*, que estão incluídas dentro do subgrupo Angulares; *V. aconitifolia* no subgrupo Aconitifoliae; e *V. radiata* e *V. mungo* que estão inseridas no subgrupo *Ceratotropis*. As espécies poliploides, encontradas em *Ceratotropis*, *V. glabrescens* (Roxb.) Verdc. e *V. reflexo-pilosa* var. *glabra* Maréchal estão inseridas no mesmo clado em juntamente com *V. trinervia* (B.Heyne ex Wight & Arn.) Tateishi & Maxted. Rank, o provável progenitor de *V. reflexo-pilosa* (Doi *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2002; Yano *et al.*, 2004; Tun e Yamaguchi, 2007; Saini *et al.*, 2008; Saini e Jawali 2009; Delgado-Salinas *et al.*, 2011; Javadi *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2014; Raveendar *et al.*, 2015; She *et al.*, 2015).

O subgênero *Vigna* (africano), por sua vez, está dividido em seis seções: *Catiang*, *Comosae*, *Liebrechtsia*, *Macrodontae*, *Reticulatae* e *Vigna*. Por exemplo, as espécies cultivadas *V. unguiculata* e *V. subterranea* estão separadas em diferentes ramos, correspondentes à seção *Catiang* e *Vigna*, respectivamente (Doi *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2002; Yano *et al.*, 2004; Tun e Yamaguchi, 2007; Saini *et al.*, 2008; Saini e Jawali 2009; Delgado-Salinas *et al.*, 2011; Javadi *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2014; Raveendar *et al.*, 2015; She *et al.*, 2015).

A filogenia do gênero *Phaseolus* também foi realizada mediante o uso de marcadores moleculares como as sequências nuclear de DNAr ITS/5.8S e o locus plastidial *trnK* e é congruente com dados biogeográficos e morfológicos. O gênero se revelou monofilético e dividido em dois clados denominados A e B. O clado A é constituído pelas espécies distribuídas principalmente nas regiões do México e

Panamá e está representado pelos grupos *Pauciflorus*, *Pedicellatus* e *Tuerckheimii*, além de outras espécies sem uma posição filogenética bem definida (*P. glabellus* Piper, *P. macrolepis* Piper, *P. microcarpus*, e *P. oaxacanus* Rose) (Delgado-Salinas *et al.*, 2006).

Por outro lado, o clado B inclui todas as espécies de interesse econômico, que estão amplamente distribuídas, desde o sudoeste do Canadá até a América do Sul. É constituído pelos grupos *Filiformis*, *Leptostachyus*, *Lunatus*, *Polystachios* e *Vulgaris*. O grupo *Vulgaris* compreende quatro das cinco espécies cultivadas do gênero (*P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. polyanthus* e *P. acutifolius*), enquanto que *Lunatus* inclui a quinta espécie cultivada, *P. lunatus* (Delgado-Salinas *et al.*, 2006).

## 2.4 POOL GÊNICO

Baseado no sucesso de hibridação entre e/ dentre as espécies, ou seja, na facilidade de troca de genes entre elas, três *pools* gênicos podem ser considerados: primário (GP-1), secundário (GP-2) e terciário (GP-3) (Harlan e de Wet 1971, *apud* Maxted *et al.*, 2004; Borém e Vieira, 2005). O *pool* gênico primário consiste de espécies biológicas, que quando cruzadas, são capazes de produzir híbridos vigorosos, que exibem pareamento cromossômico meiótico normal, segregação de genes e total fertilidade de sementes. A segregação dos genes na  $F_1$  é normal e a troca de genes é geralmente fácil (Maxted *et al.*, 2004). Em *Vigna*, GP-1 é composto pelas subespécies de *V. unguiculata*, seção *Catjang* (subsp. *sesquipedalis* e subsp. *cylindrica*; e pela selvagem subsp. *stenophylla*, e possivelmente pela espécie *V. subterranea* (seção *Vigna*), as quais têm origem nas regiões Norte, Oeste, e Central da África (Hepper, 1963; Smartt, 1979, 1981; Mithen, 1987; Tomooka *et al.*, 2002; Huynh *et al.*, 2013).

O *pool* gênico secundário inclui espécies pertencentes ao mesmo gênero, as quais podem ser cruzadas com GP-1, porém com dificuldade e com fertilidade apenas parcial em  $F_1$ . Em *Vigna*, GP-2 é constituído por outras subespécies selvagens, que apresentam origem das regiões leste, Sul e Sudeste da África, como *V. unguiculata* subsp. *dekindtiana* e subsp. *pubescens* (R, Wilczek) Pasquet, que apresenta uma  $F_1$  parcialmente estéril e não se hibridiza facilmente com *V. unguiculata*, apresenta esterilidade do pólen, e requer o resgate do embrião

(Fatokun e Singh, 1987). *Vigna nervosa*, embora pertencente à seção *Catiang* do subgênero *Vigna*, também foi classificada como GP-2, apesar de ter sofrido abortos após cinco dias de polinização, o que parece indicar que essas duas espécies podem não hibridizar com sucesso (Mithen, 1987).

Embora *V. unguiculata* (seção *Catiang*) seja morfológicamente semelhante às espécies *V. membranacea* A. Rich. (seções *Macrodontae*) e *V. frutescens* A. Rich. (seção *Liebrechtsia*), é improvável que a hibridização com essas espécies seja bem-sucedida por causa dos números cromossômicos diferentes,  $2n = 20$ , em oposição à  $2n = 22$  em *V. unguiculata* (Fatokun e Singh, 1987; Baudoin e Maréchal, 1991; Huynh *et al.*, 2013).

Por sua vez, o GP-3 inclui cruzamentos entre espécies pouco aparentadas de outros gêneros ou espécies pouco relacionadas do mesmo gênero. Em geral, a hibridação é muito difícil e a esterilidade e/ou anomalia do híbrido são comuns, com necessidade de resgate de embriões e enxertia, entre outras medidas (Harlan e de Wet, 1971). O GP-3 se subdivide em GP-3A que compreende as espécies que formam híbridos viáveis, mas estéreis, e GP-3B envolve as espécies que originam híbridos inviáveis. A maioria das espécies de *Vigna* está incluída em GP-3. No cruzamento de *V. marina* e *V. luteola* com *V. unguiculata*, por exemplo, não houve êxito (Smartt, 1979). Similarmente, a hibridização entre *V. vexillata* e *V. radiata* com *V. unguiculata* não foi bem-sucedida, apesar do emprego de técnicas como o resgate do embrião ter sido satisfatório, os híbridos resultantes mostraram uma alta taxa de formação de univalentes, sugerindo uma diferenciação genética entre as duas espécies parentais (Ng e Padulosi, 1988; Barone *et al.*, 1992; Gomathinayagam *et al.*, 1998).

Por sua vez, os cruzamentos interespecíficos de *V. oblongifolia* e *V. luteola*; *V. mungo* e *V. radiata*; *V. angularis* e *V. umbellata*; *V. trilobata* com *V. radiata* e *V. aconitifolia* mostraram que o fluxo de genes é possível entre essas espécies. O cruzamento de *V. trilobata* com *V. aconitifolia* produziu um anfidiplóide e os híbridos de *V. radiata* com *V. trilobata*, *V. angularis*, *V. sublobata*, *V. aconitifolia* e *V. umbellata* revelaram se pouco férteis (Bharathi *et al.*, 2006). Além disso, uma metodologia foi desenvolvida para a hibridização de *V. radiata* ( $2n = 22$ ) com *V. mungo* ( $2n = 22$ ) e *V. glabrescens* ( $2n = 44$ ) a fim de se obter linhagens derivadas férteis que permitisse a introgressão transversal de genes úteis a partir de GP-3 (Ahn e Hartmann, 1978; Smartt, 1981; Smartt, 1984; Chen *et al.*, 1989). Cruzamento



viável também foi observado entre *V. nakashimae* com *V. umbellata* e *V. angularis* e seu êxito deve-se a hibridização sem a necessidade de resgate de embriões, sendo assim *V. nakashimae* pode ser usada como uma espécie de ponte para a introgressão de genes entre essas espécies (Somta *et al.*, 2006).

## 2.5 IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DOS FEIJÕES

O gênero *Vigna* tem oito espécies cultivadas: seis de origem asiática, subgênero *Ceratotropis* (*V. aconitifolia*, *V. angularis*, *V. mungo*, *V. radiata*, *V. reflexopilosa* e *V. umbellata*), e duas de origem africana, subgênero *Vigna* (*V. unguiculata* e *V. subterranea*) (Maréchal *et al.*, 1981; Smartt, 1990).

Das espécies asiáticas de *Vigna* (*Ceratotropis*), *V. aconitifolia* (feijão-traça), pode ser consumida na forma de sementes inteiras ou divididas, cozidas, fritas ou fermentadas, secas e/ou trituradas, como vagens verdes ou brotos e ocasionalmente como forragem (FAO, 2015). É rica em proteínas (23%), pobre em gordura (1,6%) e apresenta teores de carboidratos (62%) superiores a *V. unguiculata* (60%) (USDA, 2015a). Na Índia, *V. aconitifolia* é cultivada sozinha ou em consórcio com outros cereais, como o milheto, ou como cultura de rotação com algodão, ocupando cerca de 1,5 milhões de hectares, com produção de até 0,4 milhão t/ha de sementes (FAO, 2015). *Vigna angularis*, por sua vez, também é utilizada como ingrediente de sopas, bolos e sobremesas tradicionais asiáticas devido ao seu sabor doce, bem como por possuir alto teor de proteína e amido. A farinha é usada para xampus e cremes faciais (FAO, 2007; Kang *et al.*, 2015).

Ainda no clado asiático, *V. radiata* (feijão-mungo) se destaca como amplamente cultivada entre os trópicos e é encontrada ao nível do mar até uma altitude de 1850 m nos Himalaias. Como características de espécies do gênero *Vigna* é tolerante à seca e sensível a inundação e a alta umidade. No entanto, é pouco tolerante a solos salinos. A produção de *V. radiata* é principalmente asiática (cerca de 90%), sendo a Índia o maior produtor e consumidor com mais de 50% da produção mundial. A China produz grandes quantidades de *V. radiata*, no entanto sua produção diminuiu em 20% ao ano no período de 2014/2015 (FAO, 2014; USDA, 2014).

Duas espécies do subgênero africano (subgênero *Vigna*) são cultivadas *V. subterranea* (feijão bambara; seção *Vigna*) e *V. unguiculata* (feijão-caupi; seção *Catjang*). Também dentro da seção *Catjang*, *V. unguiculata* subsp. *cylindrica* e subsp. *sesquipedalis* são de grande importância econômica (Lush e Evans, 1981; Kays e Dias, 1994; USDA, 2018).

*Vigna subterranea*, cultivada principalmente na África tropical, é altamente nutritiva e sua composição química é comparável à soja, uma vez que sua semente é constituída por 49% a 63,5% de carboidratos, 15% a 25% de proteína, 4,5% a 7,4% de lipídios e 5,2% a 6,4% de fibra. As sementes podem ser fervidas, assadas ou fritas. Também podem ser moídas como farinha e utilizadas no preparo de mingau, como espessante em sopas e ensopados, transformadas em pão, podem ser embebidas, processadas na forma de leite e produtos fermentados. Suas folhas também servem como forragem para porcos e aves. Além disso, no Senegal são utilizadas na medicina popular como cicatrizante. Difere das outras espécies do clado, pois enterra seus frutos no solo, protegendo-os de danos causados pelos insetos que podem devastar outras culturas, como *V. unguiculata*, cujos frutos estão expostos acima do solo (Kew, 2017; Murevanhema e Jideani, 2011).

Dentre as espécies da seção *Catjang*, *V. unguiculata* é a única que foi introduzida e cultivada no Brasil, também conhecida como feijão-da-colônia, feijão-de-praia e feijão-de-estrada (na região Norte), feijão macassar, feijão macassa, feijão-de-corda, feijão-de-moita (na maioria dos estados do Nordeste), feijão catador e feijão gurutuba (algumas cidades da Bahia e norte de Minas Gerais), feijão fradinho (região mais ao sul de Sergipe até o Rio de Janeiro) e feijão miúdo (no Sul) (Freire Filho, 2011). É uma espécie herbácea, que apresenta ciclo curto (em torno de 60 a 90 dias), baixa exigência hídrica e de fertilidade do solo, bem como é adaptada às condições de temperaturas elevadas.

*V. unguiculata* faz parte da base alimentar humana como fonte de proteína principalmente no nordeste do Brasil e em vários países da África (Freire-Filho *et al.*, 2011; Embrapa, 2015), apresentando grande importância sócio-econômica mundial, principalmente por ser uma das principais culturas de países subdesenvolvidos. Seus grãos apresentam todos os aminoácidos essenciais, sendo assim considerado uma excelente fonte de proteínas (24%), carboidratos (60%), vitaminas e sais minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas (10,7%) e baixo teor de gordura (2%) (USDA, 2015a). Pode ser consumida como grãos verdes

(hidratados), grãos secos, vagens verdes, brotos, além de algumas iniciativas com o processamento industrial para produção de farinha e produtos pré-cozidos e congelados. Também pode ser usado como forrageira e adubo verde (Guedes, 2008).

O gênero *Phaseolus*, por sua vez, apresenta cinco espécies cultivadas (*P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. dumosus*, *P. acutifolius* e *P. lunatus*). Dentre estas, destaca-se *P. vulgaris* (feijão comum) como alimento de alto valor nutritivo, sendo uma importante fonte proteica, para as populações da África e América Latina. Apresenta um conteúdo proteico que varia de 16 a 33% e tem como principal proteína a faseolina, a qual representa até 50% das proteínas presente na sua semente (Pereira e Souza, 1992). Assim como, todas as leguminosas essa cultura tem um papel importante como fixadoras de nitrogênio por meio de associação simbiótica com bactérias do solo, do gênero *Rhizobium* (Graham e Vance, 2003).

Em 2016/2017, os feijões (*P. vulgaris* e *V. unguiculata*) foram cultivados em cerca de 11,23 milhões de hectares no mundo, com produção de 23,8 milhões de toneladas. Destes, cerca de 3,4 milhões de hectares foram cultivados no Brasil, com produção de 3,4 milhões de toneladas (Conab, 2015 e 2017; SEAB, 2016), Apesar do aumento na safra, alguns estados relataram perdas na colheita em decorrência de condições climáticas adversas (escassez de chuvas e geada) e de diversos tipos de doenças e pragas.

Dentre as principais doenças que atingem as lavouras de *P. vulgaris*, destacam-se o vírus do mosaico-dourado, transmitido pela mosca branca, e o mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Já para *V. unguiculata*, dentre as principais doenças estão: o vírus do mosaico severo do feijão-caupi; o vírus do mosaico dourado do feijão-caupi; o vírus do mosaico transmitido por afídio; o crestamento, mancha ou cancro bacteriano, causado pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* (Burkholder) Dye, e a ferrugem causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger. Dentre as principais pragas estão a paquinha, a broca-do-colo ou lagarta-elasma, a vaquinha, o tripes e o pulgão (Embrapa, 2003; Conab, 2015).

## 2.6 MAPAS GENÉTICOS E FÍSICOS

O mapeamento genético, também chamado de mapa de ligação, reflete as distâncias relativas estimadas a partir da frequência de recombinação entre dois genes ou marcadores genéticos localizados no mesmo cromossomo. Esta taxa define uma distância relativa entre os *loci*, medida em centiMorgans (cM). Quanto maior a taxa de recombinação genética maior a distância relativa entre os genes e vice-versa. Contudo, a posição relativa das marcas genéticas não indica a distância física exata entre eles ou a sua posição ao longo do cromossomo (Kao *et al.*, 2006) ou de uma pseudomolécula em um mapa de sequenciamento. As distorções observadas entre os mapas ocorrem devido à presença de regiões cromossômicas com maior ou menor frequência de recombinação, decorrente de uma distribuição não aleatória dos eventos de recombinação entre os cromossomos (Sharma *et al.*, 2013).

Mais recentemente, mapas genéticos de alta densidade estão sendo construídos a partir da genotipagem por sequenciamento (GBS), o qual a identifica e genotipa simultaneamente milhares de polimorfismo do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms* - Polimorfismos de um Único Nucleotídeo), que apresentam variações na sequência de DNA no nível de bases nucleotídicas únicas, os quais permite identificar as variações genéticas de cultivares, construção de mapas genéticos, análise da diversidade genética, detecção de associações genótipo x fenótipo e seleção assistida por marcadores (Elshire *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012).

Os mapas físicos de sequenciamento em pseudomoléculas cromossômicas, por sua vez, têm sido construídos com base no sequenciamento de DNA para diversas espécies. O sequenciamento de DNA iniciou com a técnica de Maxam-Gilbert em que os fragmentos eram clivados, separados em gel de eletroforese e marcados radiotivamente, seguido pela metodologia de Sanger, mediante síntese de DNA de fita simples utilizando DNA polimerase e didesoxinucleotídeos (ddNTPs). Posteriormente, sequenciadores automáticos baseados em *Sanger* usando marcadores fluorescentes foram desenvolvidos, seguidos por sequenciamento de nova geração (NGS), como o 454; de segunda geração, como *Ion Torrent* e *Illumina*, e de terceira geração, como o Pacific Biosciences e o Oxford Nanopore. Apesar das grandes diferenças entre eles, os sequenciadores de nova geração apresentam como característica principal o processamento paralelo massivo de fragmentos de

DNA, podendo ler até bilhões de fragmentos simultaneamente (Fietto e Maciel, 2017).

Os mapas físicos citogenéticos, por sua vez, podem ser construídos de duas formas principais. A primeira utilizada principalmente para a *Triticum aestivum* L. (trigo) na década de 1990 a partir da ausência de um determinado marcador e de um fragmento cromossômico em estoques citogenéticos de translocações e deleções, permitia determinar o cromossomo (braço ou região cromossômica) onde se localizava o gene de interesse, usando séries aneuploides previamente estabelecidas (Endo e Gill, 1996; Endo, 2007). A segunda e mais amplamente utilizada se refere ao mapeamento de clones de DNA diretamente nos cromossomos mediante FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*, Hibridização *in situ* Fluorescente), onde as distâncias podem ser medidas em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). Neste segundo caso, é possível realizar a integração de mapas genético e citogenético, e mais recentemente de mapas de sequenciamento e citogenético (Peterson *et al.*, 2000; Pedrosa *et al.*, 2002; Pedrosa-Harand e Guerra, 2004; Jiang e Gill, 2006; Belarmino *et al.*, 2012).

Análises conjuntas de dados genômicos, e de citogenética molecular permitem uma maior compreensão sobre a organização e evolução dos genomas e de seus cromossomos (Belarmino *et al.*, 2012). Os mapas genéticos têm sido comumente integrados aos citogenéticos mediante a técnica de FISH, utilizando sequências genômicas clonadas em BACs previamente selecionados a partir de marcadores moleculares localizados em um mapa genético. A BAC-FISH tem possibilitado a identificação de cromossomos individuais e a observação de possíveis distorções das distâncias físicas encontradas nos mapas genéticos em diferentes espécies de plantas (Song *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001; Iwata-Otsubo *et al.*, 2016).

Em cevada, a identificação por BAC-FISH de 70 sondas de sequências únicas em regiões com recombinação reduzida ou até mesmo suprimida no cromossomo 3H, propiciou a constatação de que pequenas distâncias genéticas foram traduzidas em grandes distâncias físicas nos cromossomos (Aliyeva-Schnorr *et al.*, 2015). Por outro lado, quando foram utilizadas 16 sondas de sequências únicas para as regiões distais do mesmo cromossomo, observou-se o contrário, que longas distâncias no mapa genético são traduzidas em pequenas distâncias no mapa físico do cromossomo 3H de cevada, correspondendo a pontos quentes para recombinação

(Bustamante *et al.*, 2017). Tais estudos reforçam a importância de correlacionar os mapas genéticos e físicos.

A integração de mapas genéticos e citogenético com dados de sequenciamento, por sua vez, também tem fornecido um grande número de marcas e de informações sobre a organização e evolução dos genomas, permitindo análises de homeologias cromossômicas e de conservação da macrossintenia entre espécies. Essa estratégia tem sido usada principalmente para a diferenciação de cromossomos morfológicamente similares e para estudos cromossômico-comparativos entre espécies com genomas sequenciados e espécies relacionadas com genomas não sequenciados (Belarmino *et al.*, 2012). Em soja, BACs foram utilizados para a identificação de seus 20 pares cromossômicos bem como para um estudo comparativo entre os cromossomos/ pseudomoléculas cromossômicas de soja (*Glycine max*) e os cromossomos de *G. soja* (Findley *et al.*, 2010).

Em *P. vulgaris*, por sua vez, a BAC-FISH foi utilizada para a integração de seus mapas genético e citogenético na referida espécie bem como para análises cito-comparativas intra e inter-genéricas (*Phaseolus-Vigna*), permitindo a identificação de cromossomos, observação da macrossintenia e o entendimento da evolução cariotípica do grupo (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010; Bonifácio *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013; Fonsêca *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2015; Fonsêca *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2016).

Em Fabaceae, um importante conjunto de recursos genéticos e genômicos foi desenvolvido para as principais espécies cultivadas, incluindo marcadores moleculares, bibliotecas BACs BESs e YACs, sequenciamento de genomas completos (13 espécies) e dados de transcriptoma (Sato *et al.*, 2010; Schmutz *et al.*, 2010; Young e Bharti, 2012; Yu, 2012; Varshney *et al.*, 2012, 2013, 2017; Kang *et al.*, 2014, 2015; MGSC Consórcio, 2015; Muñoz-Amatriaín *et al.*, 2017; <https://legumeinfo.org/species>). Em *P. vulgaris* L., cerca de 80% (473 Mb do genoma 587 Mb) de seu genoma encontra-se sequenciado e 98% das sequências estão ancoradas em 11 pseudomoléculas (Schmutz *et al.*, 2014). Adicionalmente, o uso de sequências terminais de BACs (BAC-*end sequence*) oriundas de uma biblioteca construída para *P. vulgaris*, possibilitou observar a composição de sequências do genoma da espécie (Schlueter *et al.*, 2008), associar marcadores genéticos (*Bng* e *Leg\_marker*) (Hougaard *et al.*, 2008) mapeados anteriormente em mapa de ligação

(Vallejos *et al.*, 1992) e construir um mapa citogenético para *P. vulgaris* L. (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010).

### 2.6.1 MAPAS GENÉTICOS E DE SEQUENCIAMENTO EM *VIGNA*

Mapas consensos para *V. unguiculata* foram desenvolvidos com informações de 17 bibliotecas de EST de *V. unguiculata*, bem como avalia as suas relações de sintenia com *Glycine max* (L.) Merr., *Medicago truncatula* Gaertne, *P. vulgaris* e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (<http://harvest.ucr.edu>). Está disponível também um mapa físico do feijão-caupi ancorado ao mapa genético através SNPs (<http://phymap.ucdavis.edu/cowpea>). Além disso, duas bibliotecas BAC foram construídas a partir da linhagem IT97K-499-35 usando enzimas de restrição HindIII e Mbol (36.864 clones, cada uma com tamanho médio de sequência inserida no clone de 150 e 130 kb, respectivamente). Para o mapeamento físico 59.408 BACs (97,9% de HindIII e 63,2% de Mbol) foram utilizados com uma cobertura de 11 vezes o genoma haploide (Muchero *et al.*, 2009; Lucas *et al.*, 2011). O mapa físico do caupi está disponível em <http://phymap.ucdavis.edu/cowpea> e o mapa de sequenciamento em <https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/vigun.IT97K-499-35.gnm1>.

Três espécies de *Vigna* tiveram seus genomas sequenciados e montados em 11 pseudomoléculas cromossômicas, *V. radiata* (Kang *et al.*, 2014), *V. angularis* (<http://plantgenomics.snu.ac.kr>; Kang *et al.*, 2015) e *V. unguiculata* (<https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/vigun.IT97K-499-35.gnm1> - LIS – Legume Information System) com cobertura de 80% (431 Mb), 75% (612 Mb) e 90% (432Mb) do genoma, respectivamente. Seus pseudocromossomos foram comparados entre si, com espécies próximas [*Phaseolus vulgaris*, *G. max* e *M. truncatula*] e distantes [*A. thaliana*], onde foram observados grandes blocos de sintenia principalmente entre as espécies proximamente relacionadas (Kang *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2015; <https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/vigun.IT97K-499-35.gnm1>).

## 2.7 CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO GÊNERO *VIGNA* SAVI

A citogenética clássica e molecular tem desempenhado um papel importante no avanço do conhecimento da estrutura genômica e cromossômica de espécies de leguminosas (Iwata *et al.*, 2013). No gênero *Vigna*, estudos citogenéticos encontram-se descritos para a caracterização cromossômica de espécies, no que se refere à utilização de técnicas de coloração convencional (Darlington e Wylie 1955; Sen e Bhowal 1960; Frahm-Leliveld 1965; Kumar e Subramaniam, 1987; Parida *et al.*, 1990; Rao e Chandel, 1991; Rao e Raina, 2004; Adetula, 2006), bandeamento C ou com fluorocromos CMA e DAPI (Lavania e Lavania 1982; Zheng *et al.*, 1991, 1993; Galasso *et al.*, 1991, 1992, 1993, 1995; Pignone *et al.*, 1995; Bortoleti *et al.*, 2012; Alam *et al.*, 2013; Shamurailatpam *et al.*, 2015a, b), bem como FISH com sondas de DNAr (Galasso *et al.*, 1995, 1997; Zheng *et al.*, 1994; Guerra *et al.*, 1996; Bortoleti *et al.*, 2012; She *et al.*, 2015), DNA satélite (Galasso *et al.*, 1995), telomérico (Galasso *et al.*, 1995), retroelementos (Galasso *et al.*, 1997) e de Cromossomos Artificial de Bactérias (BACs) (Vasconcelos *et al.*, 2015; Iwata-Otsubo *et al.*, 2016).

Os primeiros relatos de contagem cromossômica em *Vigna* apresentaram variações significativas no número de cromossomos entre as diferentes espécies com  $2n = 20, 21, 22, 23, 24$  e  $44$  e números básicos de  $x = 9, 10, 11$  e  $12$  (Darlington e Wylie, 1955; Sen e Bhowal, 1960; Frahm-Leliveld, 1965; Kumar e Subramaniam, 1987; Parida *et al.*, 1990; Rao e Raina, 2004; Adetula, 2006). Posteriormente, os números cromossômicos para algumas espécies foram recontados e atualmente o gênero apresenta a maioria das espécies com o número diploide de  $2n = 22$  cromossomos e número básico  $x = 11$ , com uma alta homogeneidade cariomorfológica (Forni-Martins, 1986; Guerra *et al.*, 1996; Venora *et al.*, 1999; Shamurailatpam *et al.*, 2015b), com exceção de *V. heterophylla* A. Rich. (syn. *V. ambacensis* Welw. ex Baker) com  $2n = 20$  (Galasso *et al.*, 1996).

Até o momento, a poliploidia foi relatada em apenas duas espécies alopoliploides naturais, *V. glabrescens* (Roxb.) Verdc. e *V. reflexo-pilosa* var. *glabra* Maréchal, ambas com  $2n = 4x = 44$  (Kang *et al.*, 2014; Shamurailatpam *et al.*, 2015b). Os cromossomos de *Vigna* possuem uma morfologia predominantemente submetacêntrica e metacêntrica (Venora e Saccardo, 1993; Venora e Padulosi, 1997; Venora *et al.*, 1999, Adetula, 2006; Bortoleti *et al.*, 2012), apresentando variação de comprimento cromossômico entre espécies do gênero de  $0,58 - 4,4 \mu\text{m}$  (Tabela 1)



(Sen e Bhowal, 1960; Joseph e Bouwkamp, 1978; Sen *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 1991; Venora *et al.*, 1999; Bortoleti *et al.*, 2012; Alam *et al.*, 2013). Mais recentemente, foi relatado para a cultivar BARI Borboti-1 da espécie *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis*, com um heteromorfismo em relação à posição centromérica revelando a presença de um cromossomo telocêntrico (1,4  $\mu\text{m}$ ) e seu homólogo com morfologia metacêntrica (1,7  $\mu\text{m}$ ) (Alam *et al.*, 2013).

Tabela 1 – Número e tamanho cromossômico para várias espécies de *Vigna* e referência na qual foi descrita.

Subgênero	Espécie	2n	Tamanho (µm)	Referência	
<i>Vigna</i>	<i>V. adenantha</i> (G.F.Meyer) M.M.&S.	22	1,43 - 2,76	Venora <i>et al.</i> (1999)	
	<i>V. heterophylla</i> A. Rich. [Syn. <i>V. ambacensis</i> Welw. ex Baker]	20	1,02 - 1,89	Venora <i>et al.</i> (1999)	
	<i>V. filicaulis</i> Hepper		22	1,25 - 2,69	Venora <i>et al.</i> (1999)
			20	-	Sen e Bhowal (1960)
			20	-	Sen e Bhowal (1960)
	<i>V. luteola</i> (Jacq.) Benth.	22	1,17- 2,12	Venora e Saccardo (1993)	
	<i>V. oblongifolia</i> A. Rich	22	0,78 - 1,74	Venora e Saccardo (1993)	
	<i>V. racemosa</i> Hutc & Dalziel	22	1,26 - 2,4	Venora <i>et al.</i> (1999)	
	<i>V. unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i> (L.) Verdc.	22	1,6 - 2,7	Zheng <i>et al.</i> (1991)	
	<i>V. unguiculata</i> ssp. <i>dekindtiana</i> var. <i>pubescens</i>	22	1,7 - 2,56	Adetula (2006)	
	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. [Syn. <i>V. sinensis</i> (L.) Savi]		22	1,0 - 3,7	Alam <i>et al.</i> (2013)
				2,39 - 3,59	Adetula (2006)
				0,96 - 2,88	Sen e Bhowal (1960)
			2,0 - 4,0	Zheng <i>et al.</i> (1991)	
			1,05 - 1,96	Zheng <i>et al.</i> (1991)	
			1,05 - 1,96	Venora e Saccardo (1993)	
		1,25 - 2,1	Venora <i>et al.</i> (1999)		
<i>Ceratotropis</i>	<i>V. angularis</i> (Willd.) Ohwi & H. Ohashi	22	1,19 - 2,06	Joseph e Bouwkamp (1978)	
	<i>V. reflexo-pilosa</i> var. <i>glabra</i> Maréchal	44	-	Egawa e Tomooka (1991)	
	<i>V. glabrescens</i> (Roxb.) Verdc.		44	-	Chen <i>et al.</i> (1989)
				0,80 - 1,39	Joseph e Bouwkamp (1978)
				0,96 - 2,1	Joseph e Bouwkamp (1978)
				0,93 - 2,18	Venora <i>et al.</i> (1999)
	<i>V. mungo</i> (L.) Hepper		1,2 - 2,5	De e Krishnan (1966)	
	<i>V. radiata</i> (L.) Wilczek		0,8 -1,39	Joseph e Bouwkamp (1978)	
	<i>V. trilobata</i> Chiov.	22	0,58 - 1,18	Joseph e Bouwkamp (1978)	
	<i>V. umbellata</i> (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi	22	1,12 - 2,46	Joseph e Bouwkamp (1978)	
<i>Plectrotropis</i>	<i>V. kirkii</i> (Barker) Gilloet	22	1,07 - 2,22	Venora <i>et al.</i> (1999)	
	<i>V. reticulata</i> Hooker fil.	22	0,92 - 1,93	Venora <i>et al.</i> (1999)	
	<i>V. radicans</i> Baker [Syn. <i>V. wittei</i> Baker fil.]	22	0,96 - 2,04	Venora <i>et al.</i> (1999)	
	<i>V. vexillata</i> (L.) A. Rich		22	1,05 - 1,67	Venora e Saccardo, (1993)
			2,78 - 3,64	Venora <i>et al.</i> (1999)	

O padrão de bandas C foi observado em cromossomos mitóticos de 10 espécies: *V. radiata*, *V. mungo* (L.) Hepper, *V. unguiculata*, *V. luteola*, *V. oblongifolia*, *V. vexillata* (L.) A. Rich., *V. racemosa* Hutch & Dalziel, *V. marina* e *V. gracilis* (Guill. and Perr.) Hook.f. in Hook., todas com  $2n = 22$ , e *V. heterophylla* (syn. *V. ambacensis*), com  $2n = 20$  (De e Krishnan 1966; Lavania e Lavania 1982; Zheng *et al.*, 1991; Galasso *et al.*, 1992; Galasso *et al.*, 1993; Galasso *et al.*, 1995). Em *V. radiata*, *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis*, *V. unguiculata* e *V. vexillata*, as bandas estão presentes na região centromérica, em regiões intercalares e terminais, enquanto que em *V. vexillata* e *V. unguiculata* as bandas são principalmente terminais e proximais (Galasso *et al.*, 1992; Adetula *et al.*, 2005).

Os fluorocromos cromomicina A3/ 4',6-diamidino-2-fenilindol (CMA<sub>3</sub>/DAPI) são utilizados em análises cariotípicas por apresentarem afinidade por determinado tipo de bases nitrogenadas, o que permite caracterizar o DNA satélite quanto ao seu conteúdo GC (guanina e citosina) ou AT (adenina e timina). O CMA possui afinidade por DNA rico em GC e o DAPI em AT (Schweizer, 1976; 1990). A distribuição de bandas CMA/DAPI pode variar entre espécies e até mesmo dentro de uma mesma espécie (Bortoleti *et al.*, 2012; Alam *et al.*, 2013).

As análises em 10 {*V. aconitifolia*, *V. dalzelliana* (Kuntze) Verdc., *V. glabrescens*, *V. hainiana* Babu, Gopin. & S.K.Sharma, *V. khandalensis* (Santapau) Raghavan Wadhwa, *V. mungo*, *V. radiata*, *V. umbellata*, *V. unguiculata* [syn. *V. sinensis* (L.) Savi] e *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* Verdc. [syn. *V. sesquipedalis* Wight]} das 15 espécies/subespécies de *Vigna* estudadas revelaram bandas CMA<sup>+</sup> encontradas principalmente nas regiões terminais e bandas DAPI<sup>+</sup> nas regiões intersticiais dos cromossomos, enquanto que em *V. unguiculata* não foram observadas bandas DAPI<sup>+</sup> (Galasso *et al.*, 1993, 1996; Zheng *et al.*, 1993; Bortoleti *et al.*, 2012; Shamurailatpam *et al.*, 2015a, 2015b). Contudo, bandas pericentroméricas em todos os cromossomos e subteloméricas em quatro pares cromossômicos foram reveladas por CMA<sup>+</sup> para *V. unguiculata*. Essas bandas foram associadas às regiões organizadoras de nucléolo coradas por Nitrato de prata (AgNOR) e colocalizadas posteriormente com sondas de DNAr (DNA ribossomal) 35S (Galasso *et al.*, 1993; 1995; Bortoleti *et al.*, 2012).

Bandas CMA/DAPI também foram encontradas para em *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis*. Observou-se uma distribuição de bandas CMA<sup>+</sup> distinta para cada uma das cinco cultivares analisadas, evidenciando uma variação cariotípica dentro

da subespécie. Para essas cultivares, também foram observadas diferenças nos tamanhos dos complementos cromossômicos relacionadas a uma redução da quantidade de heterocromatina (Alam *et al.*, 2013).

### 2.7.1 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

As pesquisas utilizando citogenética molecular no gênero *Vigna* permitiram a localização de sequências repetitivas (DNAr e retrotransposons), de sequências únicas (BACs) e de DNA genômico ao longo dos cromossomos (Galasso *et al.*, 1995, 1997; Zheng *et al.*, 1993, 1994; Guerra *et al.*, 1996; Bortoleti *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; She *et al.*, 2015; Vasconcelos *et al.*, 2015).

Sítios de DNAr 5S e 35S analisados por FISH em cromossomos de 10 espécies/ subespécies de *Vigna*: *V. aconitifolia*, *V. angularis*, *V. mungo*, *V. radiata*, *V. subterranea*, *V. umbellata*, *V. unguiculata*, *V. unguiculata* subsp. *dekindtiana*, subsp. *sesquipedalis*, e *V. vexillata* mostraram uma variação de dois a seis sítios de DNAr 5S e de dois a 14 sítios de DNAr 35S (Zheng *et al.*, 1993, 1994; Galasso *et al.*, 1995, 1997; Guerra *et al.*, 1996; Bortoleti *et al.*, 2012; She *et al.*, 2015). A variação no número de sítios observada para o gênero *Vigna* provavelmente se deve a eventos de rearranjos cromossômicos por inversão e transposição de *loci* de DNAr e geralmente, é relacionada com a evolução dos cromossomos durante a especiação, indicando assim uma tendência evolutiva e fornecendo algumas pistas sobre a reorganização genômica que ocorreu durante a diferenciação das espécies do gênero (She *et al.*, 2015).

Em *V. unguiculata* foi observada a presença de quatro sítios de DNAr 5S em dois pares cromossômicos: *Vu11* (*VuLG9*), e *Vu10* (*VuLG10*); e 14 sítios de DNAr 35S em seis pares cromossômicos: *Vu1* (*VuLG4*), *Vu6* (*VuLG6*), *Vu2* (*VuLG7*), *Vu9* (*VuLG8*), *Vu11* (*VuLG9*), e *Vu10* (*VuLG10*), dois desses sítios de DNAr 35S foram observados de forma adjacente no braço longo do cromossomo *Vu10* (*VuLG10*). Estes dois últimos sítios não foram observados anteriormente por serem perceptíveis apenas em baixo grau de condensação de cromossomos, devido à sua proximidade com o maior bloco, adjacente (Galasso *et al.*, 1995; Vasconcelos *et al.*, 2015). A nomenclatura dos cromossomos para a espécie foi recentemente alterada e os cromossomos foram numerados e orientados de acordo com as pseudomoléculas de

*P. vulgaris* permitindo uma melhor correlação entre o cariótipo de ambas as espécies (Lonardi *et al.*, 2017; [https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org\\_Vunguiculata\\_er](https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Vunguiculata_er)).

FISH utilizando sonda de DNA repetitivo (*Dral*) do genoma de *V. unguiculata* com 488 nucleotídeos, rica em AT (74%), hibridizou nas regiões centroméricas de todos seus cromossomos, colocalizando com as bandas C (Galasso *et al.*, 1995). Esta sequência foi espécie-específica e não foi detectada por *Southern Blot* em outras quatro espécies de *Vigna* e de cinco Fabaceae (Galasso *et al.*, 1995).

Estudos com sondas de sequências de retrotransposons LTR do tipo Ty1-*copia*-like e Ty3-*gypsy*-like, amplificadas a partir dos genomas de *V. unguiculata* foram hibridizadas na referida espécie e em espécies próximas, como *G. max*, *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *V. unguiculata* e *V. radiata*. A FISH evidenciou a presença de sinais dispersos e pericentroméricos, utilizando ambos retroelementos, com algumas divergências espécie-específicas (Bortoleti, 2010). Tais marcações estavam em alguns casos associadas aos sítios de DNAr 5S e 35S, conforme visto por Galasso *et al.* (1997) para Ty1-*copia*-like em *V. unguiculata*, mas também mostraram marcações dispersas uniformemente em todos os cromossomos, localizadas preferencialmente em regiões heterocromáticas pericentroméricas e subterminais.

A fração repetitiva foi observada nas regiões centroméricas e pericentroméricas de feijão-caupi com dois retrotransposons LTR do tipo *Gypsy*. Uma repetição em tandem de 455 pb foi observada em sete dos seus 11 pares, hibridizando na região centromérica e flanqueando regiões pericentroméricas. Os outros quatro centrômeros apresentaram sinais de FISH muito fracos, que indicam que a repetição em tandem de 455 pb não é um componente importante dos centrômeros (Iwata-Otsubo *et al.*, 2016).

BAC-FISH com sequências de cópia única possibilitaram a construção do mapa citogenético paquitênico para os 11 pares cromossômicos de *V. unguiculata* (Iwata-Otsubo *et al.*, 2016). Adicionalmente, BACs contendo sequências de *P. vulgaris*, anteriormente mapeadas *in situ* tanto em cromossomos de *P. vulgaris* quanto de outras espécies de *Phaseolus* (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010; Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand 2013; Fonsêca *et al.*, 2016), foram hibridizadas *in situ* em cromossomos *V. unguiculata*. Este estudo possibilitou a distinção citológica dos 11 pares de cromossomos de *V. unguiculata* bem como a análise da macrossintenia entre *V. unguiculata* e *P. vulgaris*,

identificando rearranjos de baixa complexidade como translocações, inversões e duplicação entre ambos os gêneros (Vasconcelos *et al.*, 2015).

### 2.7.2 Hibridização genômica *in situ* (GISH)

A técnica de GISH foi aplicada pela primeira vez dentro do gênero para confirmar as relações genômicas entre as espécies de *Vigna* intimamente relacionadas (Choi *et al.*, 2013). Os resultados da GISH entre *V. unguiculata* e *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* e entre *V. angularis* e *V. umbellata* mostraram que as espécies são citogeneticamente relacionadas, devido à homogeneização do genoma observada no híbrido e apoiam a hipótese de que elas divergiram mais recentemente (Vijaykumar *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2013).

A GISH utilizando o DNA genômico de *V. umbellata* foi aplicada aos cromossomos de *V. umbellata*, *V. angularis*, *V. aconitifolia*, e *V. mungo* var. *mungo*. As espécies *V. umbellata* e *V. angularis* apresentaram sinais fortes nas regiões centroméricas. Por outro lado, *V. aconitifolia* apresentou sinais fracos em todas as regiões pericentroméricas, e em *V. mungo* var. *mungo* os sinais foram marcados nas regiões proximais. Adicionalmente, com a técnica de bandeamento por fluorocromos e análises moleculares utilizando marcadores ITS de DNAr 35S os resultados da GISH colaboram para as análises filogenéticas das espécies de *Vign*. Dessa forma, foi demonstrado que *V. angularis* e *V. umbellata* são parentes mais próximos, e *V. mungo* e *V. aconitifolia* são espécies intimamente relacionadas; estas espécies formam um grupo que se separou a partir de um outro grupo que compreende *V. radiata*, *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* e *V. subterranea* (She *et al.*, 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para a análise da macrossintenia de espécies dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a distribuição dos sítios de DNAr 5S e 35S em espécies de *Vigna* em um contexto filogenético, a fim de contribuir no entendimento acerca da evolução cariotípica do grupo;
2. Analisar a macrossintenia entre *V. aconitifolia*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris*, mediante FISH de BACs, contendo sequências de *P. vulgaris* ou de *V. unguiculata*, em cromossomos de *V. aconitifolia*;
3. Inferir a evolução cariotípica entre os gêneros *Vigna* e *Phaseolus*, identificando possíveis mecanismos de alterações cromossômicas.

**4 ARTIGO I - INTEGRATIVE BAC-FISH MAP IN MOTH BEAN [*VIGNA ACONITIFOLIA* (JACQ.) MARÉCHAL] AND ITS MACROSYNTENIC RELATIONSHIP AMONG *VIGNA* AND *PHASEOLUS* SPECIES**

**Ana Rafaela da S. Oliveira<sup>1</sup> · Lívia do V. Martins<sup>1</sup> · Fernanda de O. Bustamante<sup>1</sup> · María Muñoz-Amatriaín<sup>2</sup> · Antônio F. da Costa<sup>3</sup> · Ana Maria Benko-Iseppon<sup>1</sup> · Andrea Pedrosa-Harand<sup>4</sup> · Ana Christina Brasileiro-Vidal<sup>1</sup>✉**

<sup>1</sup> Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup> Department of Botany and Plant Sciences, University of California, Riverside, CA, USA

<sup>3</sup> Agronomic Institute of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>4</sup> Department of Botanic, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

**Artigo a ser submetido ao Periodico Theoretical and Applied Genetics**



**Integrative BAC-FISH map in moth bean [*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Maréchal] and its macrosyntenic relationship among *Vigna* and *Phaseolus* species**

**Ana Rafaela da S. Oliveira<sup>1</sup> · Livia do V. Martins<sup>1</sup> · Fernanda de O. Bustamante<sup>1</sup> · María Muñoz-Amatriaín<sup>2</sup> · Antônio F. da Costa<sup>3</sup> · Ana Maria Benko-Iseppon<sup>1</sup> · Andrea Pedrosa-Harand<sup>4</sup> · Ana Christina Brasileiro-Vidal<sup>1</sup>✉**

<sup>1</sup>Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup>Department of Botany and Plant Sciences, University of California, Riverside, CA, USA

<sup>3</sup>Agronomic Institute of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>4</sup>Department of Botanic, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

✉ E-mail address: brasileirovidal.ac@gmail.com, telephone numbers: +55 81 996893892; +55 81 21268569

**Key message**

*Vigna aconitifolia*, *Vigna unguiculata*, and *Phaseolus vulgaris* genomes were compared using BAC-FISH, and a high macrosyteny was observed, with some chromosomal rearrangements, involving principally inversions, but also translocations and duplications.

## Abstract

BAC-FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization of Bacterial Artificial Chromosome) maps are relevant for the analysis of closely related species genomes, with no completely sequenced and/or assembled genomes. Therefore, we reported a comparative *Vigna aconitifolia*, *V. unguiculata*, and *Phaseolus vulgaris* genome analysis, using BAC-FISH and 35S and 5S rDNA sequences, previously mapped in *V. unguiculata* and *P. vulgaris* chromosomes. Thirty-one clones from *Phaseolus vulgaris* BAC library and 14 BAC clones from *Vigna unguiculata*, corresponding to its 11 linkage groups, were hybridized *in situ*. Six out of 11 *V. aconitifolia* chromosomes showed synteny and collinearity with *V. unguiculata* chromosomes. On the other hand, two chromosomes (*Vac2* and *Vac4*) showed pericentric inversions, indicating collinearity breaks. Synteny break was only observed for the translocation *Vac1-Vac5* in relation to *Vu1-Vu5*. Considering the present work and previous BAC-FISH studies, using *P. vulgaris* as reference, four *Vigna* (1, 3, 5 and 8) and four *Phaseolus* (1, 2, 3 and 8) chromosomes are involved in the major karyotype divergences between both genera, including duplication (BAC from *Pv3*), paracentric and pericentric inversions (BACs from *Pv3*, and *Pv4*, respectively), and translocations (between *Pv1* and *Pv8*; *Pv2* and *Pv3*). Some macrosynteny breaks were observed between *Vigna* and *Phaseolus*, but not within *Phaseolus* species, suggesting that these chromosomal alterations must be occurred in *Vigna* clade diversification. The present genome legume comparison is important to elucidate macrosynteny and karyotype mechanisms involved during the evolution of this important plant group.

## Keywords

Asian *Vigna*, common bean, cowpea, karyotype evolution, legume, synteny

## Abbreviations

BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BAC-FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization of Bacterial Artificial Chromosome
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical, International Center for Tropical Agriculture
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brazilian Agricultural Research Corporation
ESTs	Expressed Sequence Tags
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco, Pernambuco Agronomic Institute
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research
ITS	Internal Transcribed Spacer
<i>matK</i>	Maturase K, a plant plastid molecular marker
MYA	Million years ago
SNPs	Simple Nucleotide Polymorphisms

## Author Contribution Statement

ARSO: performed BAC-FISH, constructed comparative maps and figures, and wrote the manuscript. LVM: performed BAC-FISH. FOB: helped to carry out the experiments, and to write the manuscript. APH: doctorate co-supervisor of ARSO, kept and multiplied BAC clones from *P. vulgaris*. MMA: kept and multiplied BAC clones from *V. unguiculata*. AMBI: doctorate co-supervisor of ARSO. AFC: performed seed multiplication. ACBV: doctorate supervisor of ARSO, designed and directed the research and the manuscript. All authors read, discussed and approved the final manuscript.

## **Acknowledgments**

The authors thank Embrapa Meio-Norte (Teresina, Brazil) and Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, Brazil) for supplying seeds, Timothy Close (University of California, Riverside, United States) for supplying BAC clones from *V. unguiculata*, Paul Gepts (University of California, Davis, United States) for the BAC clones from *P. vulgaris*, and Valérie Geffroy (Université Paris-Sud, Orsay cedex, France) for the bacteriophage SJ19.12. from *P. vulgaris*, and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Pessoal de Nível Superior), and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) for financial support and fellowships.

## Introduction

Fabaceae Lindley (= Leguminosae Juss.) family has been divided into three subfamilies: Caesalpinioideae, Mimosoideae and Papilionoideae (= Faboideae) (Klitgård and Bruneau 2003; Lewis et al. 2005). The latter one is characterized by the highest number of species (approximately 14,000 species) grouped in 478 genera (Klitgård and Lewis 2010), with emphasis on *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi. Both genera are grouped in Phaseolina clade (Cardoso et al., 2013).

*Phaseolus* genus comprises about 100 species (<http://www.theplantlist.org/>), with only five domesticated species of American origin, namely, tepary (*P. acutifolius* A.Gray), scarlet runner (*P. coccineus* L.), lima bean (*P. lunatus* L.), yearlong [*P. polyanthus* Greenm., synonym of *Phaseolus coccineus* subsp. *polyanthus* (Greenm.) Maréchal & al.], and common bean (*P. vulgaris* L.) (Broughton et al. 2003). The last one is considered the most important grain legume for direct human consumption (Gepts et al. 2008). In turn, *Vigna* genus comprises about 120 species (<http://www.theplantlist.org/>), distributed in six subgenera (Maréchal et al. 1978; Thulin et al. 2004), including several agriculturally important legumes from *Ceratotropis* subgenus [Asian group, such as adzuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi), black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper), moth bean (*V. aconitifolia* (Jacq.) Maréchal), mungbean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), and rice bean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi)] (Tomooka et al. 2002; Brink and Jansen 2006) and from *Vigna* [African subgenus, such as bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verd.), and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Maréchal et al. 1978).

*Vigna unguiculata* has Africa Southeastern region as its probable center of domestication and figures as the main important *Vigna* representative species. It is a drought tolerant legume, widespread in the semi-arid tropics, including parts of Asia, Africa, Southern Europe, Southern United States, and Central and South America (Singh 2005). It is grown mainly in subsistence farms, providing food for man and livestock. It presents great economic and social importance to poor and drought areas, due to the high protein content of its seeds (Timko and Singh 2008). On the other hand, *V. aconitifolia* has India, Pakistan, and Myanmar as its center of origin and domestication, where it is considered a *Ceratotropis* prominent (Asian group), as an important source of protein and other nutrients, either cultivated or harvested from the wild (Maréchal et al. 1978; Brink and Jansen 2006; Delgado-Salinas et al. 2011).

On a cytogenetic view, most *Vigna* species have  $2n = 22$  chromosomes (Forni-Martins 1986; Guerra et al. 1996; Venora et al. 1999; Shamurailatpam et al. 2015b), except for *Vigna heterophylla* A. Rich. (syn. *Vigna ambacensis* Welw. ex Baker), with  $2n = 20$  (Galasso et al. 1996), *V. glabrescens* (Roxb.) Verdc. and *V. reflex-pilosa* var. *glabra* Maréchal, both with  $2n = 4x = 44$  (Parida et al. 1999; Kang et al. 2014; Shamurailatpam et al. 2015a). However, they differ widely on 35 rDNA sites number, ranging from one pair in *V. aconitifolia* (She et al. 2015) to seven pairs in *V. unguiculata*, located in six chromosome pairs: *Vu1* (*VuLG4*); *Vu2* (*VuLG7*); *Vu6* (*VuLG6*); *Vu9* (*VuLG8*); *Vu10* (*VuLG10*), and *Vu11* (*VuLG9*), with *Vu10* (*VuLG10*) carrying two adjacent sites in the long arm (Vasconcelos et al. 2015). On the other hand, 5S rDNA site numbers are more stable, with one or two pair of sites, as observed for *V. aconitifolia* (She et al. 2015) and *V. unguiculata* (Vasconcelos et al. 2015), respectively. In *V. unguiculata*, 5S rDNA are observed in *Vu11* (*VuLG9*), and *Vu10* (*VuLG10*) chromosomes (Vasconcelos et al. 2015).

Genetic maps based on different molecular markers have been developed for *P. vulgaris* (Vallejos et al. 1992; Nodari et al. 1993; Adam-Blondon et al. 1994; Freyre et al. 1998) and some *Vigna* species (Menéndez et al. 1997; Ouédraogo et al. 2002; Muchero et al. 2009; Lucas et al. 2011; Muñoz-Amatriaín et al. 2017). For *V. unguiculata*, available at <http://harvest.ucr.edu> (HarvEST: Cowpea). This database includes a consensus genetic map containing approximately 40 thousand SNPs (Simple Nucleotide Polymorphisms), gene content information for more than four thousand BACs (Bacterial Artificial Chromosomes), and more than 180 thousand ESTs (Expressed Sequence Tags), from 17 EST libraries (Muñoz-Amatriaín et al. 2017). HarvEST: Cowpea also presents synteny relationships with *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Glycine max* (L.) Merr., *Medicago truncatula* Gaertner and *P. vulgaris*. Another database available for cowpea is NordEST (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/vigna/>), which has 12 EST libraries under different stress conditions, with more than 500 million transcripts generated and analyzed, including over 450 million RNAseq sequences generated and assembled. This database has a set of tools that integrate data and allows annotation of several important genes for the culture genetic improvement (Benko-Iseppon 2013).

Genetic and cytogenetic maps of *V. unguiculata* were integrated using BAC-FISH in pachytene chromosomes (Iwata-Otsubo et al. 2016) and showed discrepancy between the maps with respect to the orientation of linkage groups and

chromosome arms on chromosomes 6, 9 and 10. Thus, references to the long and short arms of these chromosomes were based on cytological identification. Recently, sequences of cowpea genome are available in the 60× genome coverage, assembled as pseudomolecules, with synteny compared to several legume genomes (<https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/vigun.IT97K-499-35>).

Genome assemblies are also available for *V. radiata* (L.) R. Wilczek (mungbean) (Kang et al. 2014) and *V. angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi (adzuki bean) (Kang et al. 2015) (<https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/vigun.IT97K-499-35>), covering 80% (431 Mb) and 75% (612 Mb) of the genomes, respectively (Kang et al. 2014; 2015). These genomes were compared to each other, to other legumes, such as *G. max*, *M. truncatula* and *P. vulgaris*, and to more distant species, such as *A. thaliana*, with large blocks of synteny observed, mainly between closely related species (Kang et al. 2014; 2015).

However, for other *Vigna* species, genetic/genomic comparisons are restricted to genetic map information, such as observed to *Vigna marina* (Burm.) Merrill (beach cowpea; Chankaew et al. 2014); *Vigna mungo* (L.) Hepper (black gram; Chaitieng et al. 2006; Gupta et al. 2008), *Vigna subterranea* (L.) Verdc. (bambara groundnut; Ho et al. 2017); *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & H.Ohashi (rice bean; Isemura et al. 2010); *V. unguiculata* subsp. *sesquipedialis* (L.) Verdc. (asparagus bean; Xu et al. 2011); and *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. (tuber cowpea; Marubodee et al. 2015). Thus, it is desirable to expand the genome comparison data of well-annotated genome legume species to other *Vigna* species without assembled genome sequence or genetic map available, such as *V. aconitifolia*, for a better understanding of the chromosome evolution in the group.

BAC-FISH technique has been very useful for the analysis of genomes of closely related species, with no completely sequenced and/or assembled genome for one or both species under study. Macrosynteny studies by BAC-FISH in *Phaseolus* have demonstrated that their evolution seems to be mostly related to chromosomal rearrangements of little complexity in species with  $2n = 22$  (Fonsêca et al. 2010; Bonifácio et al. 2012; Fonsêca and Pedrosa-Harand 2013). Few inversions revealed breaks in collinearity between *P. vulgaris* and *P. lunatus* L. (Bonifácio et al. 2012) and *P. microcarpus* Mart (Fonsêca and Pedrosa-Harand 2013), except for *P. leptostachyus* Benth, one of the three species with  $2n = 20$ . BAC-FISH revealed the cause of the descending dysploidy, by nested chromosome fusion, as well as several

additional translocations and inversions not previously reported for the genus (Fonsêca et al. 2016).

On the other hand, in intergeneric comparison between *P. vulgaris* and *V. unguiculata*, by FISH with BACs of *P. vulgaris* on mitotic chromosomes of *V. unguiculata*, a partial conservation of macrosynteny was observed (Vasconcelos et al. 2015). It was possible to identify translocations, inversions and duplications involving five chromosomes of *V. unguiculata*. However, the authors could not infer about the origin of diversification, due to the presence of only one *Vigna* member in the cytogenetic comparison.

In order to contribute to cytogenetic research advancement and provide support for a better understanding of the chromosome evolution mechanisms and genomic organization among the genera *Vigna* and *Phaseolus*, we performed a comparative analysis of the genomes of *V. aconitifolia*, *V. unguiculata*, and *P. vulgaris*, using BAC and 35S and 5S rDNA, previously mapped in *V. unguiculata* and *P. vulgaris* chromosomes.

## Materials and methods

### Plant material

*Vigna aconitifolia* accession VIG 1609 (Indian), *V. unguiculata* cv. BR14-Mulato, *P. vulgaris* Mesoamerican breeding line BAT93 and *P. vulgaris* cv. BRS Esplendor seeds were provided by IPK (Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany), Embrapa Meio-Norte (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Meio-Norte, Brazilian Agricultural Research Corporation Mid-North, Teresina, Brazil), CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, International Center for Tropical Agriculture, Cali, Colombia) and Embrapa Arroz e Feijão (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Arroz e Feijão, Brazilian Agricultural Research Corporation Rice & Beans, Santo Antônio de Goiás, Brazil), respectively. All seeds were multiplied at IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco, Pernambuco Agronomic Institute, Recife, Brazil).

### Chromosome preparation



After seed germination, root tips were collected and pre-treated with 8-hydroxyquinoline (8-HQ) 2 mM for 4.5 h at 18 °C. Subsequently, root tips were fixed in methanol: acetic acid (3: 1, v/v) from 4 to 24 h at room temperature and stored at -20 °C until moment of use. For enzymatic digestion, meristems were washed and digested for 4 h at 37 °C in enzymatic solution of 2% (w/v) cellulase 'Onozuka R-10' (Serva)/ 20% (v/v) pectinase (Sigma). Slides were prepared according to the procedure described by Carvalho and Saraiva (1993), with some modifications. Best slides were selected after staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (2 µg/mL): glycerol (1:1, v/v) solution and stored at -20 °C until FISH performance.

### **Selection of BACs and probe labeling**

Thirty-one BAC clones from *P. vulgaris* (Kami et al. 2006), previously selected using genetically mapped markers (common bean genomic plasmid *Bng* clones, from the Florida University map, Vallejos et al. 1992) and legume markers from the map described by Hougaard et al. (2008), and the bacteriophage SJ19.12, related to anthracnose resistance, described by Pedrosa-Harand et al. (2009) and Fonsêca et al. (2010), were used in the *V. aconitifolia* genome comparative BAC-FISH map (Table 1).

Additionally, 16 BAC clones from *V. unguiculata*, which present single-copy DNA sequences, provided by Prof. Dr. Timothy Close (University of California, Riverside, United States) were used (Table 1). They were previously mapped *in situ* in *V. unguiculata* chromosomes (Iwata-Otsubo et al. 2016) and/or contain SNPs previously located on the consensus map of *V. unguiculata* and anchored *in silico* in *P. vulgaris* pseudomolecules (Muñoz-Amatriaín et al. 2017). Moreover, for the identification of the *V. aconitifolia* chromosomes, the R2 probe, a 6.5 kb fragment containing the 18S-5.8S-25S rDNA replication unit originating from *A. thaliana* (Wanzenböck et al. 1997) and the D2 sequence, a 400 bp fragment containing two replication units of 5S rDNA, originating from *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (Pedrosa et al. 2002) were used.

Extraction of plasmid DNA and BACs followed the Qiagen Plasmid Mini Kit protocol (Qiagen Plasmid Mini Kit). All probes were labeled by nick translation, where the BACs, R2 probe and the D2 sequence were labeled with Cy3-dUTP (Amersham,

GE), digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics) and biotin-16-dUTP (Sigma), respectively.

### **Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH)**

FISH technique followed the procedures described by Heslop-Harrison et al. (1991) and Pedrosa et al. (2001) with modifications. All hybridized probes were first tested on *P. vulgaris* or *V. unguiculata* slides to confirm the presence of a single signal in chromosomes of origin species, as a positive control. The hybridization mixture comprised 50% formamide (v/v), 10% dextran sulfate (w/v), 2× saline sodium citrate (SSC) and 2 - 5 ng/μL of probe, and was denatured for 10 min at 75 °C. The *Cot*-100 fraction of *P. vulgaris* was isolated according to Zwick et al. (1997) and added to the hybridization mix to block repetitive sequences for BACs that showed disperse signals (Table 1).

Slides were denatured at 75 °C for 7 min and hybridized with at least 10 μL of hybridization mixture for two days in a humid chamber at 37 °C. The stringency wash (77%) was performed in 0.1× SSC at 42 °C. For BACs that did not show any signal, 40% stringency was tested (For details, see Schwarzacher and Heslop-Harrison 2000). Biotin-labeled probes were detected with the avidin-rhodamine antibody (Vector Laboratories) in 1% (w/v) BSA and the digoxigenin-labeled probes were detected using sheep antidigoxigenin primary antibody conjugated with fluorochrome FITC (fluorescein Isothiocyanate; Roche), also diluted in 1% (w/v) BSA. All preparations were counterstained and mounted with 8 μL of DAPI (1 μg/mL) in Vectashield (Vector), in the 1:1 ratio. Slide rehybridization was performed for the detection of different DNA sequences (Heslop-Harrison et al. 1992).

### **Data analysis**

Images of the best mitotic metaphases were acquired using a Leica DMLB epifluorescence microscope and a Leica DFC 340FX camera with the Leica CW4000 software. Images were pseudocolored and optimized for brightness and contrast with the Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated) software.

For chromosome measurements, as well as position of the hybridization signals, five mitotic metaphases were selected and MicroMeasure v3.3 software was used (available at <http://rydberg.biology.colostate.edu/MicroMeasure/>, Colorado State University). The positions of BACs were classified in: terminal (= subtelomeric),

subterminal, interstitial, and proximal. Twenty chromatids, identified with a BAC chromosome-specific marker, were measured for size, arm ratio and BAC position. Chromosomes were named according to the initials of *V. aconitifolia* (*Vac*), and numbered and oriented in correspondence to the homeolog chromosomes of *V. unguiculata* (*Vu*) based on <https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/vigun.IT97K-499-35>. Subsequently, a comparative ideogram *V. aconitifolia* / *V. unguiculata* / *P. vulgaris* was generated with the help of the Adobe Flash CS4 Professional program from the Adobe Master Collection CS4 collection. Ideograms of *P. vulgaris* and *V. unguiculata* were assembled based on Vasconcelos et al. (2015).

A comparison of the major chromosomal changes among *Vigna* and *Phaseolus* species was performed based on the present work and on literature data (*P. vulgaris*: Pedrosa-Harand et al. 2009; Fonsêca et al. 2010 - *P. lunatus*: Bonifácio et al. 2012; Almeida and Pedrosa-Harand 2013 - *P. microcarpus*: Fonsêca and Pedrosa-Harand 2013 - *V. unguiculata*: Vasconcelos et al. 2015). Besides, a comparison of the major chromosomal changes among *Vigna* and *Phaseolus* species is showed at the schematic representation based on the phylogenetic tree for ITS, *trnK* and *matK* sequences (Souza et al. *in preparation*; Fig. 4).

**Table 1** - List of 31 BAC clones of *Phaseolus vulgaris*, 16 BAC clones of *Vigna unguiculata* and bacteriophage, with respective chromosomes (Pv)/linkage group (LG), location of the probes after FISH in *V. aconitifolia*, *V. unguiculata* and *P. vulgaris* (use of blocking DNA - C<sub>0</sub>t-100).

Chromosome/ LG <sup>a</sup> , LG <sup>b</sup> LG <sup>c</sup>	Marker <sup>d</sup>	BAC	Position/ arm in <i>V.aconitifolia</i> <sup>e</sup> , (C <sub>0</sub> t-100 fraction), Vac	Position/ arm in <i>V.unguiculata</i> <sup>f</sup> , (C <sub>0</sub> t-100 fraction), Vu	Position/ arm in <i>P. vulgaris</i> <sup>g</sup> (C <sub>0</sub> t-100 fraction)
Pv1/ B1,H	<i>Bng</i> 41	221F15	Interstitial/ long (0×), Vac8	Proximal/ short (5×), Vu8	Proximal/ short (20×)
	<i>Bng</i> 171	38C24	Terminal/ long (0×), Vac1	Terminal/ long (50×), Vu1	Terminal/ long (0×)
	<i>Bng</i> 173	257L12	No signal (0x)	Terminal/ long (0×), Vu1	Terminal/ long (0×)
Pv2/ B2,D	<i>Bng</i> 45	225P10	Terminal/ short (0×), Vac3	Terminal/ short (0×), Vu3	Terminal/ long (0×)
	L188	127F19	Subterminal/ short, Vac3 and terminal/ short (0×), Subterminal/ short	Terminal/ short (50×), Vu3	Interstitial/ long (0×)
	4-Gm	21N14	Vac3 and subterminal/ short (0×)	No signal (0x)	Interstitial/ long (80×)
Pv3/ B3,C	<i>Bng</i> 16	267H4	Proximal/ short (0×), Vac3	Interstitial/ short (50×), Vu3	Interstitial/ short (50×)
	<i>Bng</i> 33	174E13 /95L13	Interstitial/ long (0×), Vac3	Interstitial/ long (0×), Vu3	Terminal/ long (0×)
	<i>Bng</i> 106	147K17	Proximal/ long (0×), Vac3	Proximal/ short and long (0×), Vu3	Interstitial/ short (0×)
Pv4/ B4,B	<i>Bng</i> 151	221J10	Terminal/ short (0×), Vac4	Terminal/ short (50×), Vu4	Interstitial/ short (50×)
	<i>Bng</i> 184	190C15	Subterminal/ long (0×), Vac4	Terminal/ short (20×), Vu4	Interstitial/ long (50×)
	APA	86K9	No signal (0x)	Not analyzed	Terminal/long
Pv5/ B5,E	<i>Bng</i> 49	36H21	No signal (0x)	No signal (0x)	Interstitial/ long (70×)
	<i>Bng</i> 133	230M2	No signal (0x)	No signal (0x)	Pericentromeric (0×)
	<i>Bng</i> 152	193O2	No signal (0x)	No signal (0x)	Pericentromeric (0×)
Pv6/ B6,G	<i>Bng</i> 95	121F5	Interstitial/ long (0×), Vac6	No signal (0x) (0×)	Interstitial/ long (0×)
	<i>Bng</i> 202	18B15	Terminal/ long (0×), Vac6	Terminal/ short (0×), Vu6	Terminal/ long (0×)
Pv7/ B7,A	<i>Bng</i> 28	22I21	Terminal/ short (0×), Vac7	Terminal/ short (0×), Vu7	Interstitial/ long (50×)
	<i>Bng</i> 191	86I17	Terminal/ long (0×), Vac7	Terminal/ long (0×), Vu7	Terminal/ short (50×)
Pv8/ B8,F	<i>Bng</i> 58	169G16	Interstitial/ short (0×), Vac8	Terminal/ long (50×), Vu8	Terminal/ long (50×)
	<i>Bng</i> 138	177I19	Interstitial/ short (0×), Vac1	Terminal/ long (0×), Vu5	Interstitial/ short (0×)
Pv9/ B9,K	<i>Bng</i> 2	224I16	No signal (0x)	Terminal/ short (50×), Vu9	Terminal/ long (50×)

	L159	123O22	Disperse/ pericentromeric (0x)	No signal (0x)	Pericentromeric (50x)
	L207	163I7	No signal (0x)	No signal (0x)	Interstitial/ long (20x)
<i>Pv10/ B10,I</i>	<i>Bng</i> 200	173P6	Disperse/ proximal (0x)	No signal (0x)	Interstitial/ long (20x)
Bacteriophage	-	SJ19.12	No signal (0x)	Interstitial/ long (30x), <i>Vu10</i>	Interstitial/ long (0x)
	<i>Bng</i> 218	63H6	No signal (0x)	No signal (0x)	Terminal/short (0x)
	<i>Bng</i> 218	81A17	No signal (0x)	No signal (0x)	Pericentromeric (0x)
	L177	119E19	No signal (0x)	No signal (0x)	Terminal (0x)
<i>Pv11/ B11,J</i>	<i>Bng</i> 1	25D1	No signal (0x)	No signal (0x)	Interstitial/ long (60x)
	<i>Bng</i> 112	179N14	Terminal long (50x), <i>Vac11</i>	Terminal/ long (0x), <i>Vu11</i>	Terminal/ short (0x)
	L220	127J2	No signal (0x)	Terminal/ short (0x), <i>Vu11</i>	Terminal/ long (0x)
<i>Vu1/ VuGL4*</i>	1_0973	M062M10#	Terminal/ short (0x), <i>Vac5</i>	Interstitial/ short (0x), <i>Vu1</i>	Not analyzed
<i>Vu2/ VuGL7*</i>	1_0559	M026L23#	Terminal/ long (0x), <i>Vac2</i>	Terminal/ long (0x), <i>Vu2</i>	Terminal/ short (0x)
	-	H029P08	Disperse/ pericentromeric (0x)	Disperse/ short (0x)	Not analyzed
	-	H088H07	No signal (0x)	Disperse / pericentromeric	Not analyzed
	1_1141	H074C16#	Proximal/ short (20x), <i>Vac2</i>	Interstitial/ long (20x), <i>Vu2</i>	Not analyzed
<i>Vu5/ VuGL1*</i>	1_1278	M002E09#	Proximal/ long (0x), <i>Vac5</i>	Terminal/ short (0x), <i>Vu5</i>	Not analyzed
<i>Vu9/ VuGL8*</i>	1_0558	H086N19#	Not analyzed	Interstitial/ short (0x), <i>Vu9</i>	Not analyzed
	1_1503	H010M18#	Terminal/ long (0x); <i>Vac9</i>	Terminal/ long (0x), <i>Vu9</i>	Terminal/ short (0x)
	-	H074C18	Disperse/ short (0x)	Disperse / pericentromeric (0x)	Not analyzed
<i>Vu10/ VuGL10*</i>	1_0282	H025N06#	Proximal/ short (0x), <i>Vac10</i>	Interstitial/ short (0x), <i>Vu10</i>	Proximal/ long (0x)
	1_1120	H015M15#	Terminal/ long (0x), <i>Vac10</i>	Subterminal/ short (0x), <i>Vu10</i>	Interstitial/ short (0x)
	-	H090M18	No signal (0x)	Disperse	Not analyzed
<i>Vu11/ VuGL9*</i>	1_0651	M045J08#	Disperse/ pericentromeric (0x)	Interstitial/ long (100x); <i>Vu11</i>	No signal (0x)*
	-	H043O18	No signal (0x)	Disperse	No signal (0x)*
	-	H092J22	Interstitial/ short (0x), <i>Vac11</i>	Terminal/ short (0x); <i>Vu11</i>	Terminal/ long (0x)
	1_0257	M054N15#	Not analyzed	Interstitial/ short (0x); <i>Vu11</i>	No signal (0x)*

? Unidentified chromosome.

<sup>a</sup> Linkage groups (LG) defined by Freyre et al. (1998) for *P. vulgaris*.

<sup>b</sup> Linkage groups defined by Vallejos et al. (1992) for *P. vulgaris*.

<sup>c</sup> Chromosomes are enumerated according to linkage groups defined by Muchero et al. (2009) for *V. unguiculata*.

<sup>d</sup> Bng and Leg markers were mapped by Vallejos et al. (1992), Freyre et al. (1998) and Hougaard et al. (2008) for *P. vulgaris* or SNP markers were mapped by Muchero et al. (2009) and Lucas et al. (2011).

<sup>e</sup> Markers hybridized *in situ* in the present work for *V. aconitifolia*.

<sup>f</sup> Markers hybridized *in situ* in Vasconcelos et al. (2015) for *V. unguiculata*.

<sup>g</sup> Markers hybridized *in situ* by Pedrosa-Harand et al. (2009) and Fonsêca et al. (2010) for *P. vulgaris*.

\* Markers hybridized *in situ* in the present work for *V. unguiculata* and *P. vulgaris*.

# Markers hybridized *in situ* in Iwata et al. 2016 and used in the present work.

## Results

To perform an intra and intergeneric comparison, 14 BAC clones of *V. unguiculata* (*Vu*), 31 BAC clones from *P. vulgaris* (*Pv*), and the bacteriophage SJ19.12 also from *Pv* were hybridized *in situ* on the 11 mitotic chromosomes of *V. aconitifolia* (*Vac*,  $2n = 22$ , meta and submetacentric morphology), with at least two probes per chromosome. Sequences of 35S and 5S rDNAs were also used to aid the identification of chromosomes (Fig. 1, 2, 3 and 4). Data of the present work and previously reported for *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand et al. 2009; Fonsêca et al. 2010) and *V. unguiculata* (Vasconcelos et al. 2015) were also shown at a comparative ideogram (Fig. 3).

SJ19.12 bacteriophage, 12 BAC clones of *P. vulgaris* (257L12, 86K9, 36H21, 230M2, 193O2, 224I16, 163I7, 63H6, 81A17, 119E19, 25D1 and 127J2) and three BAC clones of *V. unguiculata* (H088H07, H043O18 and H090M18) showed no signals on *V. aconitifolia* chromosomes. On the other hand, five BAC clones (123O22, 173P6, H029P08, H074C18 and M045J08) showed disperse pericentromeric signals. For two of them (H029P08, H074C18), blocking DNA (100×  $C_0t$ -100 fraction) were added, but the dispersed signals persisted.

Fourteen clones of *P. vulgaris* (221F15, 38C24, 225P10, 267H4, 174E13/95L13, 147K17, 221J10, 190C15, 121F5, 18B15, 22I21, 86I17, 169G16 and 177I19) and eight clones of *V. unguiculata* (M02E09, M062M10, M026L23, H074C16, H010M18, H025N06, H015M15 and H092J22) showed single signals located on *V. aconitifolia* chromosomes. Additionally, three BAC clones of *P. vulgaris* (179N14, 127F19 and 21N14) showed initially disperse signals, but after the addition of

blocking DNA (50× C<sub>0</sub>t-100 fraction), a single pair (179N14, *Pv11*) or two pair of signals (127F19 and 21N14, *Pv2*) were detected for each BAC, suggesting a duplication event for the last two markers (Table 1).

BACs 179N14 (*Pv11*), 127F19 and 21N14 (*Pv2*) showed initially disperse hybridization signals (data not shown). After the addition of blocking DNA (50× C<sub>0</sub>t-100 fraction), a single pair (179N14, *Pv11*) or two pair of signals (127F19 and 21N14, *Pv2*) were detected for each BAC, suggesting a duplication event for the last two markers (Table 1, Fig. 1).

*Vigna aconitifolia* chromosome 1 (*Vac1*) showed BAC 177I19 (interstitial, short arm of *Pv8*) in the interstitial region of the short arm and BAC 38C24 (terminal, long arm of *Pv1*) in the terminal region of the long arm (Table 1, Fig. 1b; 3). On the other hand, *Vac5*, the smallest chromosome pair, was mapped with BAC M062M10 (interstitial, short arm of *Vu1*) in the terminal region of short arm, with BAC M02E09 (terminal, short arm of *Vu5*) in the proximal region of the long arm, and with 5S rDNA probe in the proximal region of the long arm, suggesting a reciprocal translocation between *Vu1* and *Vu5* (Fig. 1b, c; 3) and a translocation event between 177I19 of *Pv1* and 38C24 of *Pv8* chromosomes. For 5S rDNA, only this pair of sites was observed in *V. aconitifolia* (*Vac5*) (Fig. 1a; 3), which was not found in the homeologous *Vu* chromosome. On the other hand, no sites were observed in *Vac10* and *Vac11* as observed for *Vu10* and *Vu11*, as observed in the present work and as previously reported by Vasconcelos et al. (2015).

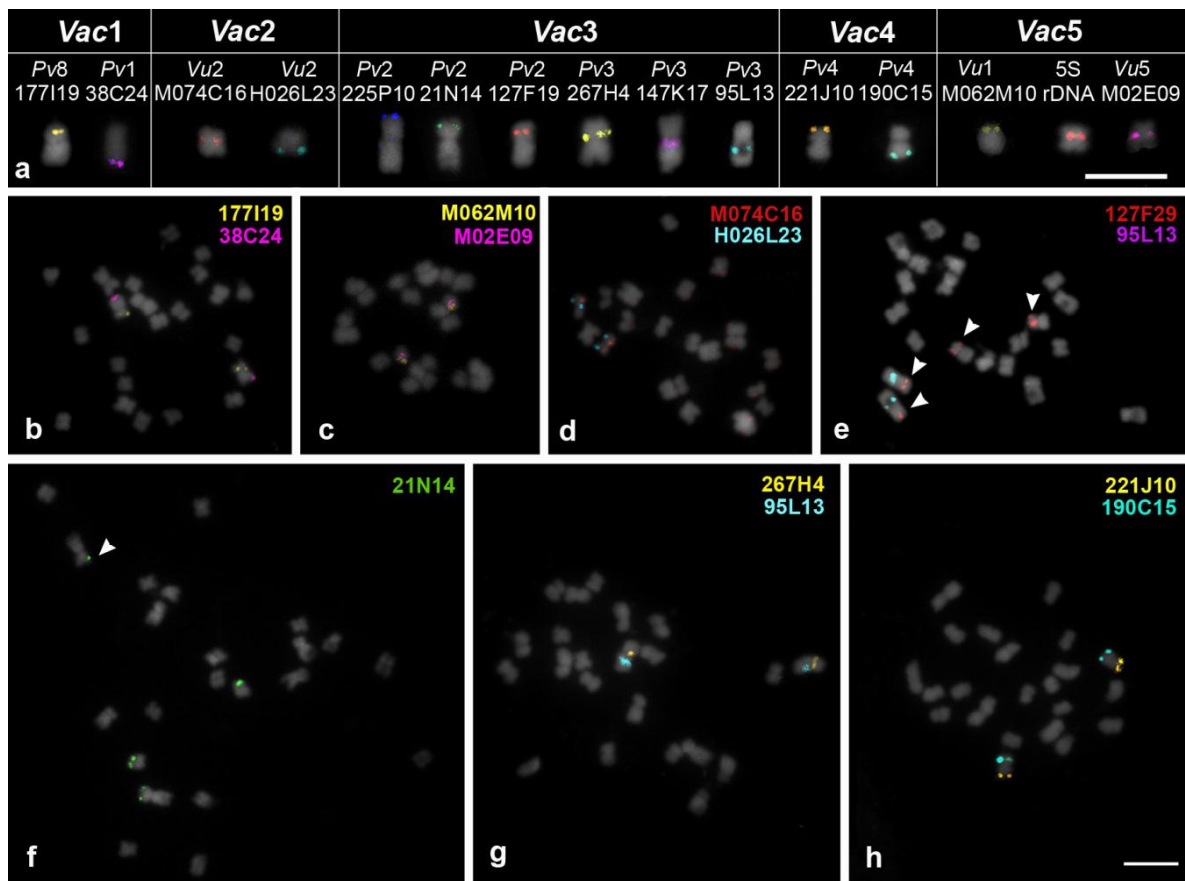
In *Vac2*, clones BAC H074C16 and M026L23 (interstitial and terminal, respectively, long arm of *Vu2*) were located in the proximal of the short arm and terminal end of the long arm (Table 1, Fig. 1a, c; 3), indicating a pericentric inversion (Fig. 3).

The largest pair of *V. aconitifolia* (*Vac3*) chromosomes presented signals from six BACs, from two different *P. vulgaris* chromosomes (*Pv2* and *Pv3*). From *Pv2*, BAC 225P10 (subterminal, long arm of *Pv2*) was observed in the terminal of the short arm adjacent to BACs 21N14 and 127F19 (both interstitials, long arm of *Pv2*). In addition, clones 21N14 and 127F19 hybridized together in a pair of smaller chromosomes in the short arm region (unidentified chromosome), suggesting a duplication (Table 1, Fig. 1a, e, f; 3).

On the other hand, from *Pv3*, BAC 267H4 (interstitial, short arm of *Pv3*) hybridized in the proximal region of the short arm (Table 1, Figure 1a, g), and BAC

147K17 (interstitial, short arm of *Pv3*) showed a single copy signal in the proximal region of the long arm (Fig. 1a; 3). Additionally, BAC 95L13 (corresponding to the same *Bng* clone as 174E13, subterminal region of the *Pv3* long arm) was hybridized in the interstitial region of the *Vac3* long arm. These BAC-FISH for *Vac3* indicates the occurrence of a translocation involving *Pv2* and *Pv3* (Fig. 1a, e, g; 3) and a pericentric inversion involving BACs 147K17 and 267H4 (short arm of *Pv3*).

For *Vac4*, BAC 221J10 (interstitial, short arm of *Pv4*) was located in the terminal region of the short arm and BAC 190C15 (subterminal, long arm of *Pv4*) was located in the long arm, subterminal region (Table 1, Fig. 1a, h; 3).



**Fig. 1** – Fluorescent *in situ* hybridization of 14 genetically assigned BACs of *Phaseolus vulgaris* (*Pv*) in *Vigna aconitifolia* mitotic chromosomes (*Vac*) counterstained with DAPI (pseudo-colored in gray). **a** *V. aconitifolia* chromosomes (*Vac1*, *Vac2*, *Vac3*, *Vac4* and *Vac5*) hybridized with rDNAs 5S and BACs from five *P. vulgaris* chromosomes (*Pv1*, *Pv2*, *Pv3*, *Pv4* and *Pv8*). BACs were labeled with Cy3-dUTP and pseudo-colored in different colors. **b** BAC 177I19 (yellow; *Pv8*) and 38C24 (pink; *Pv1*) identified chromosome *Vac1*. **c** BACs M062M10 (yellow; *Vu1*) and M02E09 (pink; *Vu5*) identified chromosome *Vac5*. **d** BACs M074C16 (red; *Vu2*) and H026L23 (light blue; *Vu2*) mapped in *Vac2*. **e** BACs 127F19 (red; *Pv2*, arrowhead and in an unidentified second pair) and 95L13 (light blue; *Pv3*) in *Vac3*. **f** BAC 21N14 (light green; arrowhead; *Pv2*) hybridized on chromosome *Vac3*. **g** BACs 267H4 (yellow; *Pv3*) and 95L13 (light blue; *Pv3*), mapped in *Vac3*. **h** BACs 221J10 (yellow; *Pv4*) and 190C15 (light blue; *Pv4*) in *Vac4*. Bars in **a** and **h** represent 5  $\mu$ m.



In *Vac6*, which carried 35S rDNA site in the short arm terminal region, clones 121F5 and 18B15 (interstitial and subterminal region of the long arm of *Pv6*, respectively) were mapped in the interstitial and terminal regions of the long arm, respectively (Table 1, Fig. 2a, b; 3). Regarding the 35 rDNA, *V. aconitifolia* has one this pair of sites (*Vac6*) (Fig. 2, b; 3), corroborating previous data (She et al. 2015; Souza et al. in preparation), and which was syntenic to *Vu6* (*VuLG6*) and *Pv6* (Vasconcelos et al. 2015; Fonsêca et al. 2010). However, other six pairs of 35S rDNA sites found for five *V. unguiculata* chromosomes [*Vu1* (*VuLG4*), *Vu2* (*VuLG7*), *Vu9* (*VuLG8*), *Vu10* (*VuLG10*) and *Vu11* (*VuLG9*)] in the present work and according to Vasconcelos et al. (2015) were not observed in the corresponding *V. aconitifolia* chromosomes (Fig. 3).

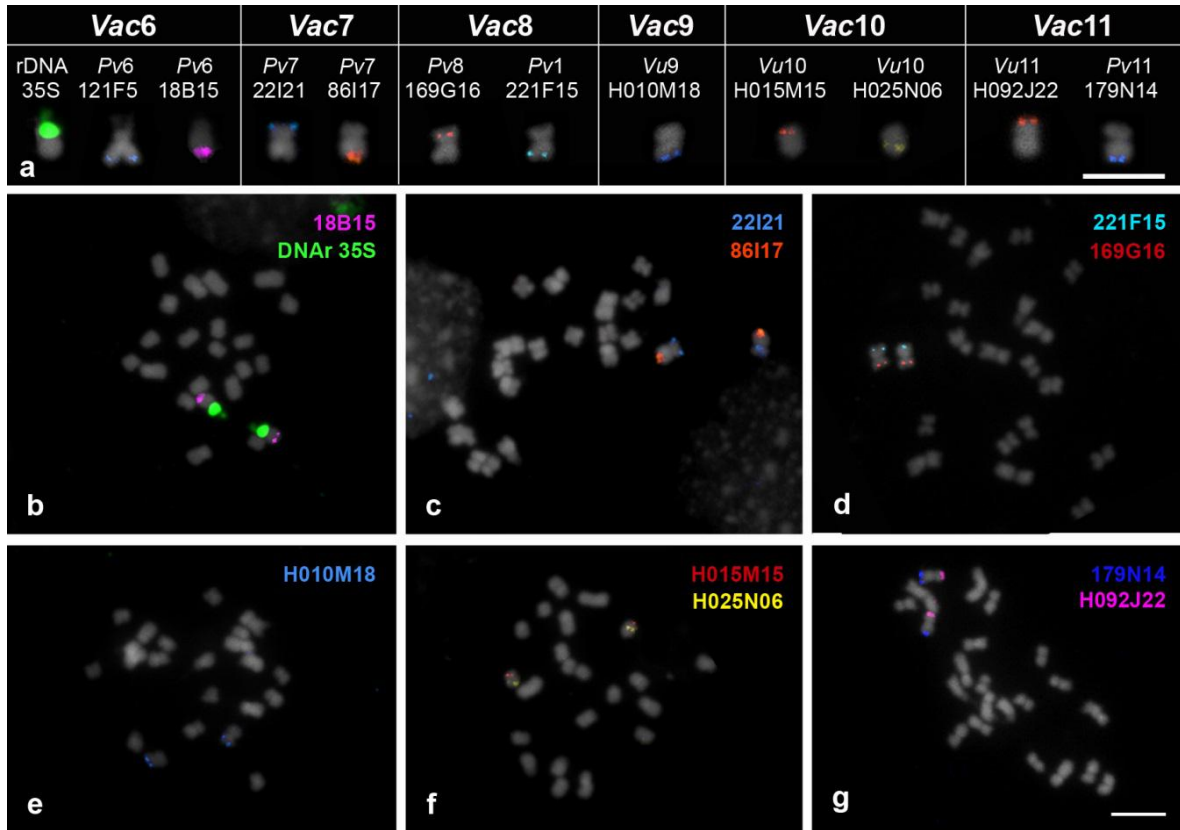
Two BACs were located in *Vac7*: BAC 22I21 (interstitial, long arm of *Pv7*), mapped in the terminal end of the short arm, and BAC 86I17 (subterminal, short arm of *Pv7*, with repetitive in several *Pv* chromosomes), located in the terminal region of the long arm of this chromosome (Table 1, Fig. 2a, c; 3).

*Vac8* was mapped with BACs 169G16 (terminal, long arm of *Pv8*) in the interstitial region of the short arm, and 221F15 (proximal, short arm of *Pv1*) in the interstitial region of the long arm, evidencing that the translocation between *Pv1* and *Pv8* was reciprocal (Table 1, Fig. 2a, d; 3).

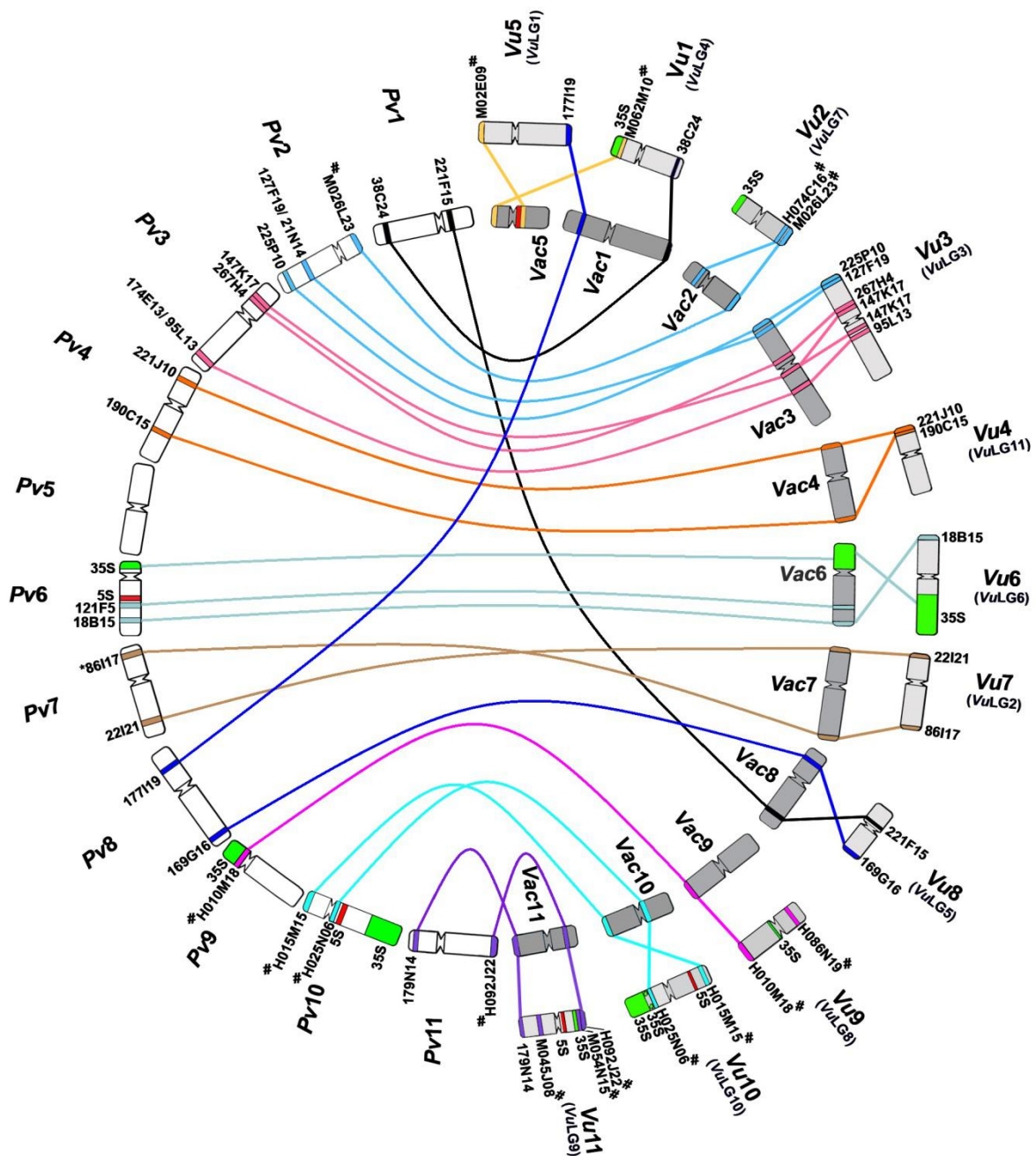
*Vac9* chromosome was hybridized with BAC clone H010M18 (terminal, long arm of *Vu9*) at the long arm terminal region (Table 1, Fig. 2a, e; 3).

*Vac10* chromosome was identified by the BAC H025N06 (interstitial, short arm of *Vu10*) site located in the proximal region of the long arm and BAC H015M15 (subterminal, short arm of *Vu10*) in the terminal region of the long arm (Table 1, Fig. 2a, f; 3).

For *Vac11*, BAC 179N14 (subterminal, short arm of *Pv11*) was mapped in the terminal region of the long arm, and H092J22 (interstitial and terminal short arm, respectively, *Vu11*) was mapped in the interstitial region of short arm (Table 1, Fig. 2a, g; 3).



**Fig. 2** – Fluorescent *in situ* hybridization of 11 genetically assigned BACs of *Phaseolus vulgaris* (*Pv*) and two BACs of *Vigna unguiculata* (*Vu*) in *Vigna aconitifolia* mitotic chromosomes (*Vac*) counterstained with DAPI (pseudo-colored in gray). **a** *V. aconitifolia* chromosomes (*Vac6*, *Vac7*, *Vac8*, *Vac9*, *Vac10* and *Vac11*) hybridized with rDNAs 35S and BACs of seven *P. vulgaris* chromosomes (*Pv1*, *Pv6*, *Pv7*, *Pv8* and *Pv11*) and three *V. unguiculata* chromosomes (*Vu9*, *Vu10* and *Vu11*). BACs were labeled with Cy3-dUTP and pseudo-colored in different colors. **b** BAC 18B15 (pink; *Pv6*) and rDNA 35S (green; *Pv6*) mapped in *Vac6*. **c** BAC 22121 (blue; *Pv7*) and 86117 (orange) identified in *Vac7*. **d** BACs 221F15 (light blue; *Pv8*) and 169G16 (red; *Pv8*), located in *Vac8*. **e** BAC H010M18 (blue, *Vu9*) identified in *Vac9*. **f** BACs H015M15 (red; *Vu10*) and H025N06 (yellow; *Vu10*) located in *Vac10*. **g** BACs 179N14 (dark blue; *Pv11*) and H092J22 (pink; *Vu11*) hybridized in *Vac11*. Bars in **a** and **g** represent 5  $\mu$ m.



**Fig. 3** – Schematic representation of comparative cytogenetic maps of *Vigna aconitifolia* (Vac), *V. unguiculata* (Vu) and *Phaseolus vulgaris* (Pv) with BAC-FISH of 31 BAC clones of *P. vulgaris* and 16 BAC clones of *V. unguiculata* in *V. aconitifolia* chromosomes mapped as a single copy. \* BAC 86117 was not mapped as a single copy in *P. vulgaris* (Pv), but as repetitive sites. Here, it was positioned as single site, according to its genetic position and location in *P. lunatus* (Almeida and Pedrosa-Harand 2013). # Indicate BACs of *Vigna unguiculata*.

## Discussion

We described the first *V. aconitifolia* BAC-FISH map, constructed with 48 markers, including BACs from *P. vulgaris* and *V. unguiculata*, and the bacteriophage SJ19.12 from *Pv* and rDNA probes. It was possible to map the 11 chromosome pairs of *V. aconitifolia* with at least two markers per chromosome, except for *Vac9*, with one site. Markers were associated to *V. unguiculata* and *P. vulgaris* BAC-FISH chromosomes, and to previously reported data for *V. unguiculata* (Vasconcelos et al. 2015), *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand et al. 2009; Fonsêca et al. 2010), *P. lunatus* (Bonifácio et al. 2012; Almeida and Pedrosa-Harand 2013), and *P. microcarpus* (Fonsêca and Pedrosa-Harand 2013) (see Fig. 4, a schematic representation based on the phylogenetic tree for ITS, *trnK* and *matK* sequences described by Delgado-Salinas et al. 2011; Souza et al. *in preparation*). Additionally, data were compared to genomic data from *V. unguiculata* related to *V. angularis*, *V. radiata* and *P. vulgaris* genomes were used in a wide comparison (<https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/vigun.IT97K-499-35>).

Seven of 11 *V. aconitifolia* chromosomes (*Vac3*, *Vac6*, *Vac7*, *Vac8*, *Vac9*, *Vac10* and *Vac11*) showed synteny and collinearity with *V. unguiculata* chromosomes. However, it can be highlighted that BAC 147K17 (mapped in *Vac3*) did not show the duplication previously described for *V. unguiculata* (*Vu3*, *VuLG3* short arm, Vasconcelos et al. 2015), and *Vac6* and *Vac8* showed a visible different in size arms. Differences found for *Vac6* and *Vac10* are probably related to differences in of 35S rDNA block size or to its absence, respectively, while for *Vac8*, maybe a BAC-FISH non-detectable chromosome rearrangement or variations on repetitive fractions are involved. In *Nicotiana* species, for instance, distinct karyotypes in morphology and size were explained based on sequence dispersal, and locus gain, amplification and loss of repetitive sequences and translocation events (Lim et al. 2000). Additionally, two *V. aconitifolia* chromosomes (*Vac2* and *Vac4*) showed pericentric inversions, indicating collinearity breaks. However, synteny break was only observed for the translocation *Vac1-Vac5* in relation to *Vu1-Vu5*.

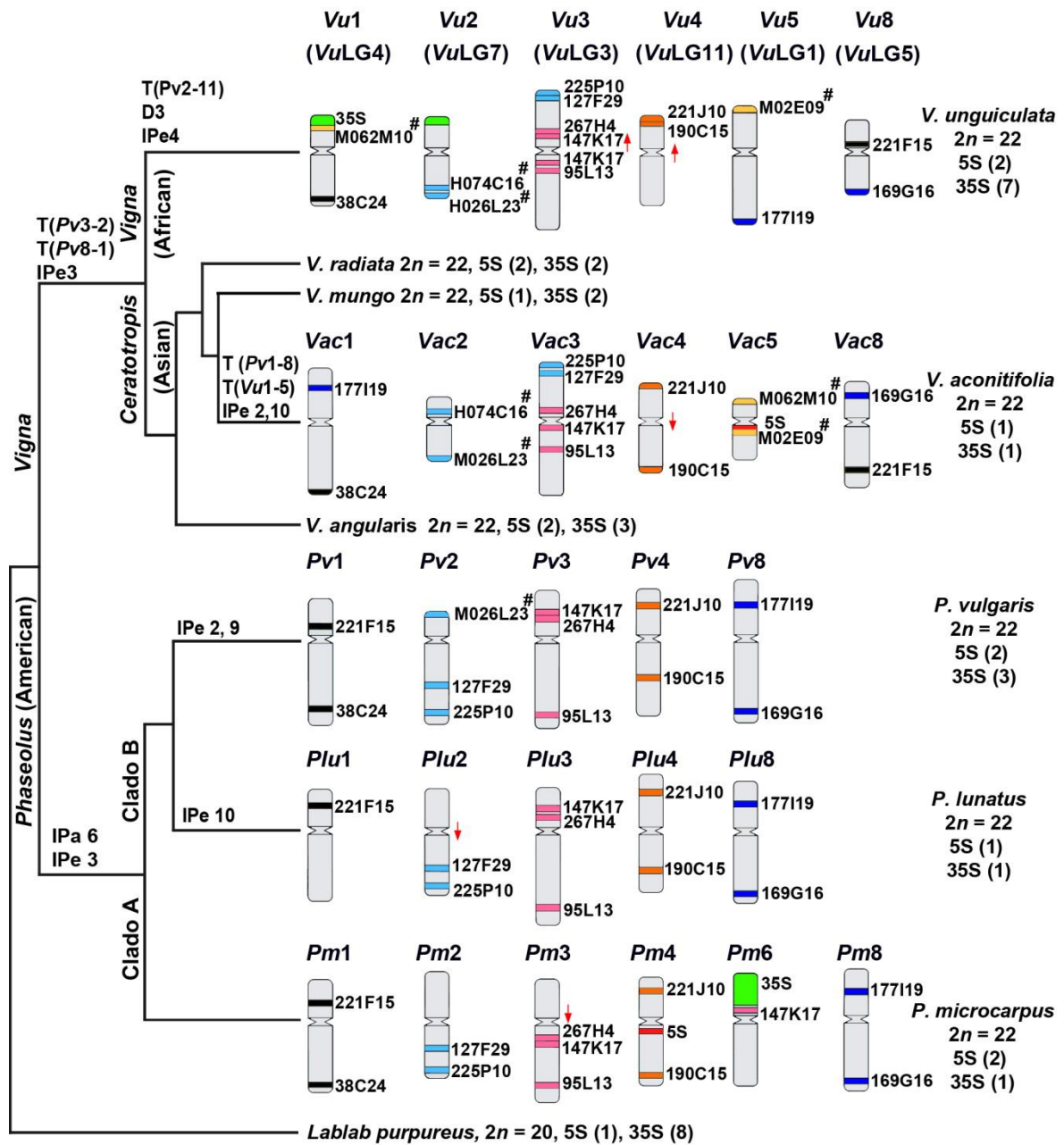
Genetic linkage groups or sequenced pseudochromosomes of Asian *Vigna* species (subgenus *Ceratotropis*) from the same *V. aconitifolia* clade (*V. radiata* and *V. mungo*) or from sister clade (*V. angularis* and *V. umbellata*) were previously

compared by several authors. These studies showed high collinearity for the studied markers, with some inversions and deletions, and few translocations (Chaitieng et al. 2006; Gupta et al. 2008; Isemura et al. 2010). Only one translocation was detected between *V. mungo* and *V. angularis* linkage groups (Chaitieng et al. 2006).

On the other hand, for *V. angularis* and *V. radiata* comparison, using *V. angularis* as reference, five chromosomes of *V. angularis* (*Va*) are composed by syntenic major blocks with two *V. radiata* chromosomes, while *Va2* is syntenic with major blocks from three *V. radiata* chromosomes, indicating several translocation events between the two species (<https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/Va3.0>). Comparing *V. aconitifolia* data (present work), *V. radiata* and *V. angularis* genomes, based on *V. unguiculata* and *V. angularis* genome data (<https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/>), four chromosomes or pseudochromosomes (*Vac6/Vr10/Va3*; *Vac7/Vr8/Va6*; *Vac8/Vr6/Va1* and *Vac10/Vr9/Va8*) are highly syntenic among Asian species, while the remaining chromosomes are involved in translocation events among the three species.

*Vigna subterranea* (African species, subgenus *Vigna*), also showed conserved syntenic blocks (corresponding to its linkage groups) with *V. angularis* and *V. radiata* genomes (both Asian group, subgenus *Ceratotropis*), but with several breaks of synteny (Ho et al. 2017). Similarly, *V. vexillata* (subgenus *Plectrotropis*) showed several translocations compared to both *V. unguiculata* and *V. radiata* chromosomes (Marubodee et al. 2015).

A *Vigna* and *Phaseolus* karyotype comparison of the major chromosomal changes is performed below and represented in the Fig. 4, using the present data and previously reported for *V. unguiculata* (Vasconcelos et al. 2015; <https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/vigun.IT97K-499-35>), *P. microcarpus* (Fonsêca and Pedrosa-Harand 2013), *P. lunatus* (Bonifácio et al. 2012), and *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand et al. 2009; Fonsêca et al. 2010; Muñoz-Amatriaín et al. 2017). According to Muñoz-Amatriaín et al. (2017), six *V. unguiculata* linkage groups [*Vu4*(*VuLG11*); *Vu6*(*VuLG6*); *Vu7*(*VuLG2*); *Vu9*(*VuLG8*); *Vu10*(*VuLG10*), and *Vu11*(*VuLG9*)] based on SNP map were largely collinear with six *P. vulgaris* pseudomolecules (*Pv4*, *Pv6*, *Pv7*, *Pv9*, *Pv10* and *Pv11*, respectively), except for the pericentric inversion observed for *Vu4* (*VuLG11*) as indicated by Vasconcelos et al. (2015). However, this inversion seems to be occurred into *Vigna* genus and *Vigna* subgenus, since it was not observed for *Vac4* nor for other *Phaseolus* species.



**Fig. 4** – Schematic comparison of the major chromosomal rearrangements among *V. unguiculata* (Vasconcelos et al. 2015), *V. aconitifolia* (present work), *P. vulgaris* (Fonsêca et al. 2010), *P. lunatus* (Bonifácio et al. 2012), and *P. microcarpus* (Fonsêca and Pedrosa-Harand 2013), using *P. vulgaris* chromosomes as reference. The phylogenetic relationships among species are based on ITS, *trnK* and *matK* markers (Delgado-Salinas et al. 2011; Souza et al. in preparation). Blocks in black indicate BACs mapped on Pv1; in light blue on Pv2; in pink on Pv3; in orange on Pv4, and in royal blue on Pv8. Putative synapomorphic events for each clade are represented above each branch by the abbreviations: I (inversion), Pa (paracentric), Pe (pericentric), T (translocation), D (duplication) and numbers indicating the chromosome pair involved. # indicates BAC clones of *V. unguiculata*.

Considering these BAC-FISH studies, using *P. vulgaris* as a reference, four *Vigna* (1, 3, 5 and 8) and four *Phaseolus* (1, 2, 3 and 8) chromosomes are involved in the major karyotype divergences between both genera. Chromosome 1 and Chr8 are

syntenic among *Phaseolus* species. However, between genera, Chr1 and Chr8 are involved in at least two translocation events. In *V. aconitifolia*, they are involved in a reciprocal translocation *Vac1-Vac8*, while in *V. unguiculata*, they are involved in a more complex translocation with *Vu1(VuLG4) - Vu5(VuLG1) - Vu8(VuLG5)* (Vasconcelos et al. 2015). Considering *P. vulgaris* as reference, it seems that first a translocation involving Chr1 and Chr8 occurred, generating Chr1 and Chr8 *Vigna* chromosomes, and afterwards, a second translocation event seems to be happened involving *Vu5* and *Vu1* in *V. unguiculata* species.

Chromosome 2 and Chr3 in *Phaseolus* species are also syntenic, with pericentric inversion for *P. lunatus* in *Plu2*, and for *P. microcarpus* in *Pm3* (BACs 267H4 and 147K17), in addition to a duplication for BAC 147K17 (*Pm3*) in *Pm6*. However, between genera and into *Vigna*, Chr2 and Chr3 are involved in several chromosome rearrangements. The chromosome region carrying BACs 267H4 and 147K17 (Chr3), for instance, seems to be a hot spot for alterations also between genera, highlighting a paracentric inversion for both markers and a duplication for 147K17 in *Vu3*, besides a pericentric inversion between both markers without duplication in *Vac3*. These chromosome rearrangements found for *Vigna* species can be occurred independently or first a pericentric inversion occurred in the ancestor of both species, followed by a duplication of BAC 147K17 in *V. unguiculata* species in *Vu3* short arm. Additionally, Chr2 and Chr3 of *Phaseolus* are involved in at least one translocation event related to *Vac3* and *Vu3 - Vac2* and *Vu2* chromosomes.

Considering *Phaseolus* clade, excepted for *P. leptostachyus*, one of the three *Phaseolus* species with  $2n = 20$  (Leptostachyus clade; Fonsêca et al. 2016), three cytogenetically analyzed species (*P. vulgaris*, *P. microcarpus* and *P. lunatus*) showed more conserved sequences among each other, with only inversions for five chromosomes (Fonsêca et al. 2010; Bonifácio et al. 2012; Fonsêca and Pedrosa-Harand. 2013, Fig. 4), when compared with *Vigna* karyotypes as describe above. Synteny breaks between *Vigna* and *Phaseolus* (divergence ca. 9.1 million years ago - MYA) and within *Vigna* (divergence ca. 4.5 MYA), but not within *Phaseolus* (oldest point age ca. 5.1 MYA) species suggest that the referred translocations must be occurred in *Vigna* clade diversification (see Delgado-Salinas et al. 2011 for divergence age). Karyotype variability found inside *Vigna* can be related to an expression of genome instability induced by environmental stress factors, as suggested for *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) collected on four islands of

the Maritime Antarctic (Amosova et al. 2015). In case of *V. aconitifolia* and *V. unguiculata*, stress factors can be related to its growing condition, mostly at hot and/or semi-arid regions (Singh 2005; Brink and Jansen 2006).

In the genome comparison of *Vigna* with *Glycine* or with *Cajanus*, both belonging to the Millettoids clade together with *Phaseolus* (Cardoso et al. 2013), macrosynteny blocks are well-conserved, although they are highly dispersed among different chromosomes, suggesting several rearrangements of high complexity in their genomes (Kang et al. 2014), including nested chromosome fusions and synteny break points related to centromeric and/or telomeric recombination (Lucas et al. 2011). Each *V. unguiculata* and *P. vulgaris* chromosomes is formed by major blocks from at least four *Glycine max* ( $2n = 40$ ) chromosomes (<https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/vigun.IT97K-499-35>). The higher complexity of rearrangements in comparison to *G. max* is also related to its polyploidy history, confirmed by mapping of each locus from both species to more than one homeologous loci in *G. max*, in nearly every case (McClellan et al. 2010; Lucas et al. 2011).

On the other hand, there is greater divergence between *Vigna* and *Cajanus* (modal age of 31 million years ago -MYA) than *Vigna* and *Glycine* (modal age of 28 MYA) (Kang et al. 2014). Approximately, 85% of *V. unguiculata* (Lucas et al. 2011) and 79% of *V. radiata* genes had synteny with *G. max*, while approximately 64.5% were syntenic with *Cajanus cajan* (L.) Millsp. genes (Kang et al. 2014), in accordance with phylogenetic distances.

## Conclusion

We presented the first physical map for *V. aconitifolia* (no sequenced genome) and allowed its comparison with other *Vigna* and *Phaseolus* species maps. Macrosynteny analyses demonstrated highly syntenic relationship between *V. aconitifolia*, *V. unguiculata* and *P. vulgaris*, with two collinearity breaks (pericentric inversions) and one reciprocal translocation. Between *V. aconitifolia* and *P. vulgaris*, at least three translocation events can be detected. This new *V. aconitifolia* map complements *Vigna* genome analyses, being important to elucidate karyotype mechanisms involved during the evolution of this important plant group.

## Compliance with ethical standards



## Conflict of interest

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

## References

- Adam-Blondon AF, Sévignac M, Dron M, Bannerot H (1994) A genetic map of common bean to localize specific resistance genes against anthracnose. *Genome* 37:915–924. <https://doi.org/10.1139/g94-131>
- Almeida C, Pedrosa-Harand A (2013) High macro-collinearity between lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.) as revealed by comparative cytogenetic mapping. *Theor Appl Genet* 126:1909–1916. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2106-9>
- Amosova AV, Bolsheva NL, Samatadze TE, Twardovska MO, Zoshchuk SA, Andreev IO, Badaeva ED, Kunakh VA, Muravenko OV (2015) Molecular Cytogenetic Analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic. *Plos One* 10(9):1–17. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0138878>
- Benko-Iseppon AM (2013) Brazilian Cowpea Genome Consortium: understanding responses against biotic and abiotic stresses. In: Annual Meeting of the West African Cowpea Consortium (WACC). Lomé, Togo, pp 12
- Bonifácio EM, Fonsêca A, Almeida C, Santos KGB, Pedrosa-Harand A (2012) Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 124:1513–1520. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1806-x>
- Brink M, Jansen PCM (2006) *Vigna aconitifolia* (Jacq.) Maréchal. In: Brink M, Belay G (eds). PROTA 1: Cereals and pulses/Céréales et légumes secs. Wageningen, Netherlands, pp 1–5
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant Soil* 252:55–128. <https://doi.org/10.1023/A:1024146710611>
- Cardoso D, Pennington RT, De Queiroz LP, Boatwright JS, Van Wyk BE, Wojciechowski MF, Lavin M (2013). Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. *South African Journal of Botany* 89: 58–75. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.05.001>
- Carvalho CR, Saraiva LS (1993) An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotech Histochem* 68:142–145
- Chaitieng B, Kaga A, Tomooka N, Isemura T, Kuroda Y, Vaughan DA (2006) Development of a black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] linkage map and its comparison with an azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi] linkage map. *Theor Appl Genet* 113:1261–1269. doi: 10.1007/s00122-006-0380-5
- Chankaew S, Isemura T, Naito K, Ogiso-Tanaka E, Tomooka N, Somta P, Kaga A, Vaughan DA, Srinives P (2014) QTL mapping for salt tolerance and domestication-related traits in *Vigna marina* subsp. *oblonga*, a halophytic species. *Theor Appl Genet* 127:691–702. doi: 10.1007/s00122-013-2251-1

- Delgado-Salinas A, Thulin M, Pasquet R, Weeden N and Lavin M (2011) *Vigna* (Leguminosae) *sensu lato*: the names and identities of the American segregate genera. *Am J Bot* 98:1694–1715. doi:10.3732/ajb.1100069
- Fonsêca AFA, Ferraz ME, Pedrosa-Harand A (2016) Speeding up chromosome evolution in *Phaseolus*: multiple rearrangements associated with a one-step descending dysploidy. *Chromosoma*. 125:413–421. doi: 10.1007/s00412-015-0548-3
- Fonsêca AFA, Ferreira J, Santos TRB, Mosiolek M, Bellucci E, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D, Santos KGB, Pedrosa-Harand A (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Res* 18:487–502. doi: 10.1007/s10577-010-9129-8
- Fonsêca AFA, Pedrosa-Harand A (2013) Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome* 56:335–343. <https://doi.org/10.1139/gen-2013-0025>
- Freyre R, Skroch PW, Geffroy V et al (1998) Towards an integrated linkage map of common bean 4: development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theor Appl Genet* 97:847–856. <https://doi.org/10.1007/s001220050964>
- Gepts P, Aragão FJL, Barros E et al (2008) Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: Moore PH, Ming R (eds) *Genomics of Tropical Crop Plants*, v 1. Springer, New York, pp.113-143.
- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005) Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiology* 137:1228–1235. doi:10.1104/pp.105.060871
- Gupta SK, Souframanien J, Gopalakrishna T (2008) Construction of a genetic linkage map of black gram, *Vigna mungo* (L.) Hepper, based on molecular markers and comparative studies. *Genome* 51:628–637. doi:10.1139/G08-050
- Heslop-Harrison JS, Harrison GE, Leitch IJ (1992) Reprobing of DNA: DNA *in situ* hybridization preparations. *Trends Genet* 8:372–373. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(92\)90287-E](https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90287-E)
- Heslop-Harrison JS, Schwazarcher T, Anamthawat-Jónsson K, Leitch AR, Shi M (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3:109–115
- Ho WK, Chai HH, Kendabie P, Ahmad NS, Jani J, Massawe F, Kilian A, Mayes S (2017) Integrating genetic maps in bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L) Verdc.] and their syntenic relationships among closely related legumes. *BMC Genomics*, 18:192–200. doi: 10.1186/s12864-016-3393-8
- Hougaard BK, Madsen LH, Sandal N, Moretzsohn MC, Fredslund J, Schauser L, Nielsen AM, Rohde T, Sato S, Tabata S, Bertoli DJ, Stougaard J (2008) Legume anchor markers link syntenic regions between *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* and *Arachis*. *Genetics* 179:2299–2312. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.090084>
- <http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/vigna/>. Accessed 12 December 2017
- <http://harvest.ucr.edu>. Accessed 12 December 2017
- <https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/vigun.IT97K-499-35>. Accessed 12 December 2017
- <http://rydberg.biology.colostate.edu/MicroMeasure/>. Accessed 12 December 2017
- <http://www.theplantlist.org/>. Accessed 12 December 2017
- Isemura T, Kaga A, Tomooka N, Shimizu T, Vaughan DA (2010) The genetics of domestication of rice bean, *Vigna umbellata*. *Ann Bot* 106:927–944. doi:10.1093/aob/mcq188

- Iwata-Otsubo A, Jer-Young L, Gill N, Jackson SA (2016) Highly distinct chromosomal structures in cowpea (*Vigna unguiculata*), as revealed by molecular cytogenetic analysis. *Chromosome Res* 24:197–216. doi: 10.1007/s10577-015-9515-3
- 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. doi: 10.1007/s00122-005-0201-2
- Kang YJ, Kim SK, Kim MY et al (2014) Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species. *Nat Commun* 5:5443–5452. doi: 10.1038/ncomms6443
- Kang YJ, Satyawon D, Shim S, Lee T, Lee J, Hwang WJ, Kim SK, Lestari P, Laosatit K, Kim KH, Ha, TJ, Chitikineni A, Kim MY, Ko, JM, Gwag JG, Moon JK, Lee YH, Park BS, Varshney RK, Lee SH (2015) Draft genome sequence of adzuki bean, *Vigna angularis*. *Sci Rep* 5:8069–8077. doi: 10.1038/srep08069
- Klitgård BB, Lewis GP (2010) Neotropical Leguminosae (Papilionoideae). In: Milliken W, Klitgård B, Baracat A. (2009 onwards), Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics. <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Leguminosae> (Papilionoideae).htm. Accessed 12 December 2017
- Klitgård BB, Bruneau A (2003) Advances in Legume Systematics, part 10. Higher Level Systematics. Royal Botanic Gardens, Kew
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M (2005) Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew
- Lim KY, Matyasek R, Lichtenstein CP, Leitch AR (2000) Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section Tomentosae. *Chromosoma* 109:245–258
- Lucas MR, Diop NN, Wanamaker S, Ehlers JD, Roberts PA, Close TJ (2011) Cowpea-soybean synteny clarified through an improved genetic map. *Plant Genome* 4:218–225. doi: 10.3835/plantgenome2011.06.0019
- Maréchal R, Mascherpa JM, Stainier F (1978) Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Conservatoire et jardin botaniques, Genève. Boissiera* 28: 1-273.
- Marubodee R, Ogiso-Tanaka E, Isemura T, Chankaew S, Kaga A, Naito K, Ehara H, Tomooka N (2015) Construction of an SSR and RAD-marker based molecular linkage map of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. *Plos One* 10:e0138942. doi:10.1371/journal.pone.0138942
- McClellan PE, Mamidi S, McConnell M, Chikara S, Lee R (2010) Synteny mapping between common bean and soybean reveals extensive blocks of shared loci. *BMC Genomics* 11:184–194
- Menéndez CM, Hall AE, Gepts P (1997) A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theor Appl Genet* 95:1210–1217
- Mercado-Ruaro P, Delgado-Salinas A (1996) Karyological studies in several Mexican species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi (Phaseolinae, Fabaceae). *Adv Legume Syst* 8:83–87
- Mercado-Ruaro P, Delgado-Salinas A (1998) Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). *Am J Bot* 85:1–9
- Muchero W, Diop NN, Bhat PR et al (2009) A consensus genetic map of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] and synteny based on EST-derived SNPs. *PNAS* 106:18159–18164. doi: 10.1073/pnas.0905886106

- Muñoz-Amatriaín M, Mirebrahim H, Xu P et al (2017) Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food security. *Plant J* 89,1042–1054. doi: 10.1111/tbj.13404
- Nodari RO, Tsai SM, Gilbertson RL, Gepts P (1993) Towards an integrated linkage map of common bean: II development of an RFLP-based linkage map. *Theor Appl Genet* 85:513–520
- Ouédraogo JT, Gowda BS, Jean M et al (2002) An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. *Genome* 45:175–188
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, and Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics*, 161:1661–1672
- Pedrosa A, Vallejos CE, Bachmair, Schweizer D (2003) Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Theor Appl Genet* 106:205-212. doi: 10.1007/s00122-002-1138-3
- Pedrosa-Harand A, Kami J, Geffroy V, Gepts P, Schweizer D (2009) Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. *Chromos Res* 17:405–417. doi: 10.1007/s10577-009-9031-4
- Schwarzacher T, Heslop-Harrison P (2000) Practical *in situ* hybridization, 1st ed. BIOS Scientific, Oxford
- She CW, Jiang XH, Ou LJ, Liu J, Long KL, Zhang LH, Duan WT, Zhao W, Hu JC (2015) Molecular cytogenetic characterisation and phylogenetic analysis of the seven cultivated *Vigna* species (Fabaceae) *Plant Biology* 17:268–280. doi:10.1111/plb.12174
- Singh BB (2005) Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: Singh RJ, Jauhar PP (eds) Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement. CRC Press, Boca Raton, pp 117–162
- Timko MP, Singh BB (2008) Cowpea, a multifunctional legume. In: Moore PH, Ming R (eds), Genomics of Tropical Crop Plants, Springer Science Business Media. LLC, New York, pp 227–258
- Tomooka N, Vaughan DA, Moss H, Maxted N. (2002) The Asian *Vigna*: genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* genetic resources. Dordrecht: Kluwe Pp. 1–270. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Vallejos CE, Sakiyama NS, Chase CD (1992) A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131:733–740
- Vasconcelos EV, Fonsêca AFA, Pedrosa-Harand A, Bortoleti KCA, Benko-Iseppon AM, Costa AF, Brasileiro-Vidal AC (2015) Intra- and interchromosomal rearrangements between cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by BAC-FISH. *Chromosome Res* 23:253–266. doi: 10.1007/s10577-014-9464-2
- Wanzenböck EM, 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
- Xu P, Wu X, Wang B et al (2011) A SNP and SSR based genetic map of asparagus bean (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*) and comparison with the broader species. *Plos One* 6:e15952. doi:10.1371/journal.pone.0015952
- Zwick MS, Hanson RR, Mcknight TD et al (1997) A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. *Genome* 40:138–142

## **5 ARTIGO II - DIVERSIDADE CITO-MOLECULAR EM ESPÉCIES DE VIGNA SAVI (FABACEAE) EM UM CONTEXTO FILOGENÉTICO**

ROSILDA CINTRA SOUZA†<sup>1</sup>, EMANUELLE VARÃO VASCONCELOS†<sup>2</sup>, ANA RAFAELA OLIVEIRA<sup>2</sup>, GUSTAVO SOUZA<sup>3</sup>, SANTELMO VASCONCELOS<sup>4</sup>, ANTÔNIO FÉLIX DA COSTA<sup>5</sup>, ANA MARIA BENKO-ISEPPON<sup>2</sup>, ANA CHRISTINA BRASILEIRO-VIDAL<sup>2\*</sup>

*<sup>1</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brasil*

*<sup>2</sup>Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brasil*

*<sup>3</sup>Departamento de Botânica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brasil*

*<sup>4</sup>Instituto Tecnológico Vale, Desenvolvimento Sustentável, 66055-090, Belém, PA, Brasil*

*<sup>5</sup>Instituto Agrônomo de Pernambuco, 50761-000, Recife, PE, Brasil*

**†Estes autores contribuíram igualmente.**

**\*Autor para correspondência:** [brasileirovidal.ac@gmail.com](mailto:brasileirovidal.ac@gmail.com)

Título curto: Diversidade cariotípica e tamanho de genoma em *Vigna Savi*

**Artigo a ser submetido ao Periódico Botanical Journal of the Linnean Society**

(Fator de impacto 2.523, Qualis B1, Ciências biológicas I )

**Diversidade cito-molecular em espécies de *Vigna* Savi (Fabaceae) em um contexto filogenético**

ROSILDA CINTRA SOUZA†<sup>1</sup>, EMANUELLE VARÃO VASCONCELOS†<sup>2</sup>, ANA RAFAELA OLIVEIRA<sup>2</sup>, GUSTAVO SOUZA<sup>3</sup>, SANTELMO VASCONCELOS<sup>4</sup>, ANTÔNIO F. DA COSTA<sup>5</sup>, ANA MARIA BENKO-ISEPPON<sup>2</sup>, ANA CHRISTINA BRASILEIRO-VIDAL<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brasil*

<sup>2</sup>*Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brasil*

<sup>3</sup>*Departamento de Botânica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brasil*

<sup>4</sup>*Instituto Tecnológico Vale, Desenvolvimento Sustentável, 66055-090, Belém, PA, Brasil*

<sup>5</sup>*Instituto Agrônomo de Pernambuco, 50761-000, Recife, PE, Brasil*

**†Estes autores contribuíram igualmente.**

**\*Autor para correspondência:** [brasileirovidal.ac@gmail.com](mailto:brasileirovidal.ac@gmail.com)

**Título curto:** Diversidade cito-molecular em *Vigna*

## RESUMO

O presente trabalho apresenta uma integração de dados citogenéticos e filogenéticos para espécies do gênero *Vigna*, buscando interpretar dados cariotípicos (bandas CMA/DAPI, sítios DNAr 5S e 35S e tamanho do genoma) em um contexto filogenético, incluindo resultados inéditos para *V. aconitifolia*, *V. angularis*, *V. nakashimae*, *V. unguiculata* subsp. *cylindrica*, *V. unguiculata* subsp. *dekindtiana* e *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis*. O tamanho do genoma foi relativamente conservado dentro do gênero, variando de  $1C = 0,43$  pg em *V. oblongifolia*, a  $1C = 0,70$  pg em *V. unguiculata*, ambas do subgênero *Vigna*. Diferenças no número e posição (terminal a proximal) de sítios de DNAr 35S foi observada, variando de um (*V. aconitifolia*, subgênero *Ceratotropis*) a sete pares (*V. unguiculata*, subgênero *Vigna*). Por outro lado, o número de sítios de DNAr 5S se mostrou mais estável (um ou dois pares), com exceção de *V. radiata* (*Ceratotropis*), que apresentou um terceiro par. A análise de reconstrução de caracteres ancestrais revelou uma amplificação no número de sítios de DNAr 5S no clado *Vigna+Plectrotropis*. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre número de sítios de DNAr 35S e tamanho do genoma, o que apoia a hipótese de que a fração repetitiva do genoma impacta nas variações no conteúdo de DNA. A evolução cariotípica do gênero *Vigna* e sua relação com cultivo intenso em áreas quentes e semiáridas, especialmente para a espécie africana *V. unguiculata*, são discutidas em um contexto filogenético e temporal.

**PALAVRAS-CHAVES ADICIONAIS:** análise comparativa – citogenética – conteúdo de DNA – evolução cariotípica – FISH – hibridização *in situ* fluorescente – sintenia

## INTRODUÇÃO

Dentro da família Fabaceae Lindley, a subfamília Papilionoideae inclui leguminosas de importância na agricultura mundial, destacando-se *Phaseolus vulgaris* L. (feijão comum) e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (feijão-caupi), ambas pertencentes ao clado Phaseolinae (Cardoso *et al.*, 2013). As espécies pertencentes aos gêneros *Phaseolus* L. e *Vigna* Savi se caracterizam por apresentar em geral genomas pequenos com tamanhos similares (ca. 600 Mb) e número cromossômico, em sua maioria,  $2n = 2x = 22$  (Iwata *et al.*, 2013).

O gênero *Vigna* possui cerca de 120 espécies (<http://www.theplantlist.org/>), subdivididas em cinco subgêneros: três africanos (*Vigna*, *Haydonia* e *Plectrotropis*), o americano (*Lasiospron*) e o asiático *Ceratotropis* (Delgado-Salinas *et al.*, 2011). Os subgêneros *Ceratotropis* e *Vigna* destacam-se por possuírem espécies de importância econômica, como *V. radiata* L. (feijão-da-china) e *V. unguiculata* (L.) Walp. (feijão-caupi), de origem asiática e africana, respectivamente (Baudoin & Maréchal *et al.*, 1988; Delgado-Salinas *et al.*, 2011). Adicionalmente, são reconhecidas 12 subespécies para *V. unguiculata* [<http://www.theplantlist.org/>: subsp. *aduensis* Pasquet; subsp. *alba* (G.Don) Pasquet; subsp. *baoulensis* (A.Chev.) Pasquet; subsp. *burundensis* Pasquet; subsp. *cylindrica* (L.) Verdc.; subsp. *dekintiana* (Harms) Verdc.; subsp. *letouzeyi* Pasquet; subsp. *pawekiae* Pasquet; subsp. *pubescens* (R.Wilczek) Pasquet; subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.; subsp. *stenophylla* (Harv.) Maréchal & al.; subsp. *tenuis* (E.Mey.) Maréchal & al.], sendo duas delas cultivadas (subsp. *cylindrica* e subsp. *sesquipedalis*).

Devido à importância econômica desses legumes, pesquisas têm sido realizadas a fim de se obter um maior entendimento sobre a organização e evolução de seus genomas (Young & Bharti, 2012; Iwata *et al.*, 2013). Do ponto de vista citogenético, sondas de DNAr vêm sendo consideradas excelentes marcadores cromossômicos, amplamente utilizados na descrição de cariótipos, na realização de análises comparativas e em estudos de evolução cariotípica entre táxons filogeneticamente relacionados (Roa & Guerra, 2012; Van-Lume *et al.* 2017). Em Fabaceae, grandes variações no número e na localização de sítios de DNAr foram observadas, como em *Arachis* L. (Seijo *et al.*, 2004), *Glycine* Willd. (Krishnan *et al.*, 2001), *Caesalpinia* L. (Van-Lume *et al.* 2017), *Lathyrus* L. (Ali *et al.*, 2000), *Lens* Mill. (Galasso, 2003), *Medicago* L. (Falistocco, 2000), *Phaseolus* L. (Pedrosa *et al.*, 2006;



Almeida & Pedrosa-Harand, 2011), *Pisum* L. (Fuchs *et al.*, 1998), *Trifolium* L. (Ansari *et al.*, 1999) e *Vicia* L. (Raina *et al.*, 2001). Também foi verificada uma tendência para a localização, variando de proximal a intersticial para sítios de DNAr 35S, e proximal para DNAr 5S, quando analisadas aproximadamente 100 espécies da família Fabaceae. Contudo, alguns gêneros apresentaram variação, como *Phaseolus*, por exemplo, cuja localização dos sítios de DNAr 35S foi predominantemente terminal (Roa & Guerra, 2012; 2015).

Em *Vigna*, sítios de DNAr 5S e 35S foram analisados por FISH em cromossomos de 10 taxa apresentaram uma variação de um a três pares de sítios de DNAr 5S e de um a sete pares de DNAr 35S (Zheng *et al.*, 1993, 1994; Galasso *et al.*, 1995, 1997; Guerra *et al.*, 1996; Bortoleti *et al.*, 2012; She *et al.*, 2015).. Por outro lado, conteúdo de DNA está disponível para 16 espécies, variando nas espécies diploides de  $1C = 0,43$  pg, em *V. oblongifolia* (syn. *V. lancifolia* A. Rich., Parida *et al.*, 1990, com valores  $1C$  recalibrados por Bennett & Leitch, 1995) a  $0,60$  pg em *V. unguiculata* subsp. *cylindrica* (Parida *et al.*, 1990, recalibrados por Bennett & Leitch, 1995).

Dados de sequenciamento montados em pseudomoléculas cromossômicas e suas relações de sintenia com espécies próximas estão atualmente disponíveis para três espécies de *Vigna*: *V. angularis*, *V. radiata* e *V. unguiculata* (Kang *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2015; <https://legumeinfo.org/genomes/>). A integração de mapa genético e citogenético foi realizada para *V. unguiculata* mediante BAC-FISH em cromossomos paquitênicos, mostrando discrepância entre mapas relacionada à orientação dos braços para os cromossomos 6, 9 e 10 (Iwata-Otsubo *et al.*, 2016). Por outro lado, relações de sintenia entre *V. aconitifolia*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris* foram mostradas por FISH com BACs de *P. vulgaris* e/ou de *V. unguiculata* em cromossomos mitóticos revelando uma conservação parcial da sintenia, evidenciando translocações, inversões e duplicação entre os genomas de ambos os gêneros (Vasconcelos *et al.*, 2015; Oliveira, em preparação).

Dados citogenéticos e de sequenciamento associados a informações de conteúdo de DNA e filogenéticas têm sido essenciais para a compreensão da organização dos genomas de plantas na comparação de espécies proximamente relacionadas (Totta *et al.*, 2016; Moraes *et al.*, 2017). Dessa forma, o presente trabalho reúne dados de CMA/DAPI, DNAr 5S e 35S e de conteúdo de DNA para o gênero *Vigna*. Dados cito-moleculares e de tamanho do genoma da literatura foram

compilados, além disso, dados inéditos foram gerados para *V. aconitifolia*, *V. angularis*, *V. nakashimae*, *V. unguiculata* subsp. *cylindrica*, *V. unguiculata* subsp. *dekindtiana* e *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis*. Adicionalmente, uma contextualização filogenética, associada aos dados de macrossintenia disponíveis para o gênero, é apresentada, a fim de incrementar o entendimento a respeito da evolução cariotípica do grupo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### ANÁLISE CARIOTÍPICA

Oito espécies/ subespécies de *Vigna* foram analisadas no presente trabalho quanto à coloração CMA/ DAPI e à distribuição dos sítios de DNAr 5S e 35S. Adicionalmente, dados da literatura foram revisitados para 22 espécies/ subespécies do referido gênero: 12 pertencentes ao subgênero *Vigna*, nove pertencentes à *Ceratotropis* e uma pertencente à *Plectrotropis*, totalizando 24 espécies/ subespécies (considerando apenas as espécies aceitas em <http://www.theplantlist.org>). As espécies e as procedências de suas respectivas sementes estão apresentadas na Tabela 1.

Para as preparações de cromossomos mitóticos metafásicos, pontas de raízes de sementes recém germinadas foram pré-tradadas com 8-hidroxiquinoleína 2 mM a 18 °C por 4 h, fixadas em metanol absoluto: ácido acético glacial (3:1, v/v) por 6 h em temperatura ambiente, e estocadas a – 20 °C. Em seguida, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada e digeridas em uma solução de celulase 2% (p/v, Obozuka R-10, Serva) e pectinase 20% (v/v, Sigma-Aldrich) por 4 h a 37 °C.

A preparação das lâminas seguiu Carvalho & Saraiva (1993), com pequenas modificações, as lâminas foram secas com uma bomba de ar e colocadas em estufa a 37 °C durante 10 a 20 min. Para seleção, as lâminas foram coradas com solução de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (2 µg/mL<sup>-1</sup>):glicerol (1:1, v/v). Posteriormente, as lâminas foram descoradas em etanol:ácido acético glacial (3:1, v/v) por 30 min e transferidas para etanol absoluto por 1 h, ambos em temperatura ambiente. Após secagem ao ar, as melhores lâminas foram estocadas a -20 °C até realização dos experimentos.

Para a coloração CMA/DAPI, as lâminas foram envelhecidas por três dias a temperatura ambiente e, em seguida, coradas com cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) (0,5 mg

mL<sup>-1</sup>, 1 h) e DAPI (2 µg mL<sup>-1</sup>, 30 min), montadas em tampão McIlvaine's (pH 7,0/glicerol (1:1, v/v) e estocados por outros três dias (Schweizer & Ambros, 1994). Após a captura de imagem das células, as lâminas foram descoradas como descrito acima e estocadas a - 20 °C até realização da FISH.

Para realização da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), foram utilizadas as seguintes sondas: DNAr 35S proveniente de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (R2, um fragmento de 6,5 kb, da unidade de repetição 18S–5,8S–25S) (Wanzenböck *et al.*, 1997) e DNAr 5S proveniente de *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (D2, um fragmento de 400-bp contendo duas repetições de DNAr 5S) (Pedrosa *et al.*, 2002). Plasmídeos foram isolados usando o kit Plasmid Mini Kit (Qiagen) e as sondas marcadas por *nick translation* com digoxigenina-11-dUTP (Roche Diagnostics) e biotina-11-dUTP (Roche Diagnostics) para DNAr 35S e 5S, respectivamente.

O pré-tratamento da FISH foi realizado de acordo com Pedrosa *et al.* (2001), A desnaturação das sondas e dos cromossomos, bem como os banhos pós-hibridização foram baseados em Heslop-Harrison *et al.* (1991). A mistura de hibridização consistiu de 20-50 ng/µL sonda, formamida a 50% (v/v) 20x SSC (citrato de sódio salino), dextran sulfato (p/v) a 5-10 ng mL<sup>-1</sup> e foi desnaturada a 75 °C por 10 min. Em seguida, as lâminas foram hibridizadas a 37 °C por 48 h e realizado uma série de banhos de estringência a 77%, com duas lavagens de 0,1× SSC a 42 °C por 5 min.

Sondas marcadas com digoxigenina e com biotina foram detectadas usando o conjugado anti-digoxigenina rodamina (Roche) e alexa flúor conjugado com estreptavidina (Invitrogen), respectivamente, em 1 % (p/v) BSA.

Imagens de células foram capturadas usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLB e uma câmera DFC 340FX com o programa Leica CW4000. Imagens foram pseudocoloridas e otimizadas para brilho e contraste com o programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated). A construção dos idiogramas das oito espécies/subespécies de *Vigna* cuja análise foi realizada no presente trabalho seguiu Pedrosa-Harand *et al.* (2009), utilizando o programa MicroMeasure versão 3.3 para medição e Adobe Flash CS3 para montagem do idiograma. Para as espécies de *Vigna*, de *Phaseolus* e *Lablab purpureus* L., cujos cariótipos foram compilados, esquemas dos cromossomos foram elaborados com base em dados de FISH de DNAr da literatura (Fonsêca *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2012; Bonifácio *et al.*, 2012; Bortoleti *et al.*, 2012; Almeida & Pedrosa-Harand, 2013;

Fonsêca & Pedrosa-Harand, 2013; Choi *et al.*, 2013; She *et al.*, 2015; She & Jiang, 2015; Vasconcelos *et al.*, 2015; Fonsêca *et al.*, 2016). Adicionalmente, os cromossomos de *V. vexillata* e *P. coccineus* L. foram representados como cromossomos metacêntricos de mesmo tamanho, uma vez que não foram publicados idiogramas para estas espécies.

**Tabela 1** – Números de cromossomos, bandas de CMA<sup>+</sup>/ DAPI<sup>+</sup>, sítios de DNAr 35S e 5S e valor 1C (pg) em espécies de *Vigna*.

Subgênero	Espécie	2n	Nº de sítios			1C (pg)/ Técnica	Procedência	Referência
			CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>+</sup>	DNAr 35S	DNAr 5S			
<i>Vigna</i>		20	8/ 0	-	-	-	Tvnu19	Galasso <i>et al.</i> (1996)
	<i>V. ambacensis</i> Welw. ex Baker [Syn. <i>V. heterophylla</i> A. Rich.]	20	8/ 0	-	-	-	Tvnu755	Galasso <i>et al.</i> (1996)
		-	-	-	-	0,48/ Fe-R <sup>12</sup>	406329	Parida <i>et al.</i> (1990)
	<i>V. gracilis</i> (Guill. and Perr.) Hook.f.	22	6/ 0	-	-	-	Tvnu1120	Galasso <i>et al.</i> (1996)
	<i>V. khandalensis</i> (Santapau) Sundararagh. & Wadhwa	22	2 a 8/ 2 a 8	-	-	-	<sup>1</sup> NBPGR	Shamurailatpam <i>et al.</i> (2015b)
		22	8/ 0	-	-	-	Tvnu 172	Galasso <i>et al.</i> (1993)
	<i>V. luteola</i> (Jacq.) Benth. [Syn. <i>V. repens</i> (L.) Kuntze]		8/ 0	-	-	-	<sup>2</sup> IITA - Nigéria	Pignone <i>et al.</i> (1995)
			-	-	-	0,55/ Fe-R <sup>12</sup>	284106	Parida <i>et al.</i> (1990)
	<i>V. marina</i> (Burm.f.) Merr.	22	6/ 0	-	-	-	Tvnu1441	Galasso <i>et al.</i> (1996)
			6/ 0	-	-	-	Tvnu 135	Galasso <i>et al.</i> (1993)
	<i>V. oblongifolia</i> A. Rich [Syn. <i>V. lancifolia</i> A. Rich.]	22	4/ 0	-	-	-	IITA - Nigéria	Pignone <i>et al.</i> (1995)
			-	-	-	0,50/ Fe-R <sup>12</sup>	300178	Parida <i>et al.</i> (1990)
			-	-	-	0,43/ Fe-R <sup>12</sup>	292872	Parida <i>et al.</i> (1990)
	<i>V. racemosa</i> Hutc & Dalziel	22	18/ 0	-	-	-	Tvnu181	Galasso <i>et al.</i> (1996)
<i>V. subterranea</i> (L.) Verdc.	22	-	6	2	-	<sup>4</sup> NPGS - Uganda	She <i>et al.</i> (2015)	
<i>Vigna</i>			8/ 0	-	-	-	Tvx 3236	Galasso <i>et al.</i> (1993)
	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. [Syn. <i>V. sinensis</i> (L.) Savi]	22	-	6	-	-	<sup>3</sup> NIAR 200001- India	Zheng <i>et al.</i> (1994)
			8/ 0	10	4	-	2 acessos	Galasso <i>et al.</i> (1995)
			8/ 0	-	-	-	IITA - Nigéria	Pignone <i>et al.</i> (1995)

Subgênero	Espécie	2n	Nº de sítios			1C (pg)/ Técnica	Procedência	Referência		
			CMA+/DAPI+	DNAr 35S	DNAr 5S					
<i>Vigna</i>	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. [Syn. <i>V. sinensis</i> (L.) Savi]	22	-	10	-	-	IPA 206 - Embrapa <sup>7</sup>	Guerra <i>et al.</i> (1996)		
			8, 10/ 0	10, 12	4	-	9 acessos	Galasso <i>et al.</i> (1998)		
			10/ 0	10	4	-	BR14-Mulato - Embrapa	Bortoleti <i>et al.</i> (2012)		
			-	8	4	-	RDA - Coreia	Choi <i>et al.</i> (2013)		
			-	14	4	-	BR14-Mulato - Embrapa	Vasconcelos <i>et al.</i> (2015)		
			-	12	4	-	IT97K-499-35 - África	Iwata-Otsubo <i>et al.</i> (2016)		
			-	-	-	0,55/ Fe <sup>11</sup>	-	Bennett & Smith (1976)		
			-	-	-	0,70/ CF <sup>10</sup>	BR14-Mulato - Embrapa	<b>Presente trabalho</b>		
			<i>V. unguiculata</i> subsp. <i>cylindrica</i> (L.) Verdc.	22	10/ 0	12	4	0,69/ CF <sup>10</sup>	<sup>5</sup> IPK - Korea	<b>Presente trabalho</b>
					-	-	-	0,60/ Fe-R <sup>12</sup>	291385	Parida <i>et al.</i> (1990)
			<i>V. unguiculata</i> subsp. <i>dekindtiana</i> (Harms.) Verdc.	22	6/ 0	6	4	-	2 acessos	Galasso <i>et al.</i> (1998)
					6/ 0	12	4	0,69/ CF <sup>10</sup>	IPK - Korea	<b>Presente trabalho</b>
			<i>V. unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i> (L.) Verdc.	22	-	6	-	-	Comercial - NIAR	Zheng <i>et al.</i> (1994)
					2 a 8/ 0	-	-	-	5 acessos	Alam <i>et al.</i> (2013)
					-	6	4	-	<sup>6</sup> RDA - Coreia	Choi <i>et al.</i> (2013)
-	10	4			-	China National Infrastructure of Plant Germplasm Resources	She <i>et al.</i> (2015)			
6/ 0	10	4			0,69/ CF <sup>10</sup>	IPK - China	<b>Presente trabalho</b>			
<i>V. aconitifolia</i> (Jacq.) Maréchal	22	2 a 7/ 2 a 8	-	-	-	NBPGR	Shamurailatpam <i>et al.</i> (2015a)			
		3 a 7/ 3 a 8	-	-	-	10 acessos	Shamurailatpam <i>et al.</i> (2015b)			
		-	2	2	-	NPGS - Afeganistão	She <i>et al.</i> (2015)			
		2/ 0	2	2	0,49/ CF <sup>10</sup>	IPK - Índia	<b>Presente trabalho</b>			

Subgênero	Espécie	2n	Nº de sítios			1C (pg)/ Técnica	Procedência	Referência
			CMA+/DAPI+	DNAr 35S	DNAr 5S			
<i>Ceratotropis</i>			-	6	4	-	RDA - Coreia	Choi <i>et al.</i> (2013)
	<i>V. angularis</i> (Willd.) Ohwi & H. Ohashi	22	-	6	2	-	China National Infrastructure of Plant Germplasm Resources	She <i>et al.</i> (2015)
			4/0	6	4	0,60/ CF <sup>10</sup>	IPK - Coreia	<b>Presente trabalho</b>
			-	-	-	0,55/ Fe-R <sup>12</sup>	157649	Parida <i>et al.</i> (1990)
	<i>V. dalzelliana</i> (Kuntze) Verdc.	22	2 a 6/ 3 a 5	-	-	-	NBPGR	Shamurailatpam <i>et al.</i> (2015a)
	<i>V. glabrescens</i> (Roxb.) Verdc.	44	2 a 9/ 2 a 7	-	-	-	NBPGR	Shamurailatpam <i>et al.</i> (2015a)
			-	-	-	1,0/ Fe-R <sup>12</sup>	207665	Parida <i>et al.</i> (1990)
	<i>V. hainiana</i> Babu, Gopin. I& S.K.Sharma	22	3 a 5/ 3 a 6	-	-	-	NBPGR	Shamurailatpam <i>et al.</i> (2015a)
			3 a 9/ 2 a 7	-	-	-	NBPGR	Shamurailatpam <i>et al.</i> (2015a)
	<i>V. mungo</i> (L.) Hepper	22	-	4	2	-	NPGS - Índia	She <i>et al.</i> (2015)
			4/0	4	2	0,61/ CF <sup>10</sup>	IPK - Afeganistão	<b>Presente trabalho</b>
			-	-	-	0,55/ Fe-R <sup>12</sup>	T9	Ignacimuthu & Babu (1988)
	<i>V. nakashimae</i> (Ohwi) Ohwi & H. Ohashi	22	8/0	10	2	0,65/ CF <sup>10</sup>	IPK	<b>Presente trabalho</b>
<i>Ceratotropis</i>	<i>V. radiata</i> (L.) Wilczek [Syn. <i>V. sublobata</i> (Roxb.) Babu & S.K.Sharma]	22	-	4	4	-	<sup>8</sup> NIFA - Paquistão	Khattak <i>et al.</i> (2007)
			4/6	4	6	-	cv. Berken - Kew <sup>9</sup>	Bortoleti <i>et al.</i> (2012)
	<i>V. radiata</i> (L.) Wilczek [Syn. <i>V. sublobata</i> (Roxb.) Babu & S.K.Sharma]	4 a 7/ 3 a 7	-	4	4	-	RDA - Coreia	Choi <i>et al.</i> (2013)
			-	-	-	-	NBPGR	Shamurailatpam <i>et al.</i> (2015a)
			-	4	4	-	China National Infrastructure of Plant Germplasm Resources	She <i>et al.</i> (2015)
			-	-	-	0,55/ Fe <sup>11</sup>	-	Bennett <i>et al.</i> (1982)
-	-	-	0,58/ CF <sup>10</sup>	cv. Berken - Kew	<b>Presente trabalho</b>			

Subgênero	Espécie	2n	Nº de sítios			1C (pg)/ Técnica	Procedência	Referência
			CMA+/DAPI+	DNAr 35S	DNAr 5S			
Ceratotropis	<i>V. radiata</i> (L.) Wilczek [Syn. <i>V. sublobata</i> (Roxb.) Babu & S.K.Sharma]		-	-	-	0,48/ Fe-R <sup>12</sup>	PS16	Ignacimuthu & Babu (1988)
	<i>V. trilobata</i> (L.) Verdc.	22	-	-	-	0,53/ Fe-R <sup>12</sup>	HFRS	Parida <i>et al.</i> (1990)
			-	2	2	-	RDA - Coreia	Choi <i>et al.</i> (2013)
			3 a 7/ 3 a 7	-	-	-	NBPGR	Shamurailatpam <i>et al.</i> (2015a)
	<i>V. umbellata</i> (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi	22	2 a 7/ 2 a 7	-	-	-	10 acessos	Shamurailatpam <i>et al.</i> (2015b)
			-	8	2	-	China National Infrastructure of Plant Germplasm Resources	She <i>et al.</i> (2015)
			2/ 0	6	2	0,58/ CF <sup>10</sup>	IPK - Coreia	<b>Presente trabalho</b>
			-	-	-	0,58/ Fe-R <sup>12</sup>	200841	Parida <i>et al.</i> (1990)
Plectrotropis	<i>V. vexillata</i> (L.) A. Rich.	22	8/ 0	-	-	-	Tvnu 72	Galasso <i>et al.</i> (1993)
			8/ 0	-	-	-	IITA - Nigéria	Pignone <i>et al.</i> (1995)
			-	6	4	-	RDA - Coreia	Choi <i>et al.</i> (2013)
			-	-	-	0,58/ Fe-R <sup>12</sup>	406383	Parida <i>et al.</i> (1990)

<sup>1</sup> National Bureau of Plant Genetic Resources (NBPGR)

<sup>2</sup> International Institute for Tropical Agriculture (IITA)

<sup>3</sup> National Institute of Agrobiological Resources (NIAR)

<sup>4</sup> National Plant Germplasm System (NPGS)

<sup>5</sup> Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)

<sup>6</sup> Rural Development Administration (RDA)

<sup>7</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

<sup>8</sup> Nuclear Institute for Food and Agriculture (NIFA)

<sup>9</sup> Royal Botanic Gardens (Kew)

<sup>10</sup> CF: Citometria de Fluxo

<sup>11</sup> Fe: Microdensitometria com coloração de Feulgen

<sup>12</sup> Fe-R: Feulgen Recalibrado. Os valores C originais obtidos por microdensitometria com coloração de Feulgen foram calibrados usando *Allium cepa* (2C = 33.5 pg) como padrão. Por esta razão foram recalibrados posteriormente por Bennett & Leitch (1995).



### ESTIMATIVA DO TAMANHO DO GENOMA

Dados de conteúdo de DNA foram obtidos por citometria de fluxo para 10 espécies/subespécies no presente trabalho, com dados inéditos para *V. unguiculata* subsp. *dekindtiana*, *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* e *V. nakashimae*. Adicionalmente, dados da literatura para tamanhos de genoma foram utilizados para uma análise comparativa, totalizando 16 espécies/subespécies (considerando apenas conteúdos de DNA publicados em periódicos indexados para espécies aceitas em <http://www.theplantlist.org>). Informações sobre as espécies, conteúdos de DNA, procedência das sementes utilizadas no presente trabalho estão disponíveis na Tabela 1 (ver também <http://data.kew.org/cvalues/>).

As medições de tamanho do genoma foram realizadas de acordo com o descrito por Doležel & Gödhde (1995). O tecido foliar de cada amostra foi fragmentado juntamente com padrão de calibração (*Zea mays* L.; 2C = 5,33 pg) em 1 mL do tampão de isolamento (GPB – *General Purpose Buffer*, Loureiro *et al.*, 2007). Posteriormente, a amostra foi filtrada com uma membrana de nylon de 30 µm e os núcleos foram corados com 60 µL de iodeto de propídeo (1 mg mL<sup>-1</sup>). As análises foram realizadas em triplicata e em dias diferentes no CyFlow Partec, totalizando o mínimo de 5.000 núcleos analisados por espécie/subespécies. Adicionalmente, o programa FlowMax v.2.7 foi utilizado para gerar os histogramas de fluxo de partículas, para que em seguida o valor 2C de cada espécie fosse calculado de acordo com a média das razões entre os valores de intensidade de fluorescência dos picos das amostras e o padrão de referência. Posteriormente, o teste de Pearson foi realizado para a correlação do número de sítios de DNAr 35S com o tamanho do genoma (valor 1C), usando o programa BioEstat 5.0. Vale ressaltar que os valores C descritos no presente trabalho como procedentes de Parida *et al.* (1990) e de Ignacimuthu & Babu (1988) foram obtidos originalmente por microdensitometria com coloração de Feulgen calibrados usando *Allium cepa* (2C = 33.5 pg) como padrão, porém recalibrados por Bennett & Leitch (1995).

### ANÁLISES FILOGENÉTICAS

O DNA genômico foi extraído a partir de folhas jovens das espécies *V. unguiculata* subsp. *cylindrica*, subsp. *dekindtiana*, subsp. *sesquipedalis* e *V. nakashimae*, de acordo com o protocolo CTAB descrito por Weising *et al.* (2005). Para as demais 34 espécies/subespécies de *Vigna*, bem como para as espécies de *Phaseolus* (grupos

externos) utilizadas na construção da árvore filogenética, foram utilizados dados disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), baseada em Delgado-Salinas *et al.* (2011) (Tabela 2). Duas matrizes de dados independentes foram construídas, incluindo: (a) espécies de *Vigna* disponíveis baseadas em Delgado-Salinas *et al.* (2011); (b) uma subamostragem, com apenas as espécies com dados citogenéticos disponíveis.

Regiões plastidiais (*trnL-trnF* e *matK*) e uma nuclear (ITS) foram amplificadas por PCR, segundo Taberlet *et al.* (1991), Sang *et al.* (1997) e White *et al.* (1990), respectivamente. Os produtos da PCR foram sequenciados na Plataforma de Sequenciamento LABCEN, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, utilizando o sequenciador ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Cada conjunto de sequências foi alinhado separadamente utilizando o *software* Geneious 7.1.9 (Kearse *et al.*, 2012) e esses conjuntos foram concatenados em uma única matriz (4.712 pb). A análise filogenética Bayesiana foi então realizada nesta matriz combinada. Para estimar o modelo evolutivo apropriado para todas as sequências, o *Akaike Information Criterion* (AIC) foi usado, como implementado no programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). O melhor modelo estimado para o nosso conjunto de dados foi GTR. A análise Bayesiana foi realizada no MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) a partir de um plugin implementado no Geneious. A análise foi conduzida para duas corridas independentes com 1.000.000 de gerações cada e amostragem a cada mil árvores. Os primeiros 10% das árvores amostradas foram descartados como *burn-in*. As árvores subsequentes foram mantidas para o cálculo de *probabilidade a posteriori* (*pp*) e a árvore final foi construída pelo método de 50% Majority-Rule Consensus Tree. As árvores foram visualizadas e editadas no programa Figtree v1.3.1 (Rambaut, 2007).

**Tabela 2** – Números de acesso do NCBI para as espécies analisadas filogeneticamente.

Espécie	Acesso no NCBI		
	<i>TrnL-TrnF</i>	<i>MatK</i>	ITS
<i>Vigna aconitifolia</i>	JX233509.1	JN008217.1	JX233501.1
<i>V. angularis</i>	JX233507.1	EU307332.1	JX233499.1
<i>V. mungo</i>	JX233508.1	AY582994.1	JX233500.1
<i>V. nakashimae</i>	-	JN008224.1	JF430408.1
<i>V. radiate</i>	EU717346.1	DQ445950.1	JX233505.1
<i>V. subterranean</i>	*	*	JX233498.1
<i>V. umbellaa</i>	JX233510.1	AF142701.1	JX233502.1
<i>V. unguiculata</i> subsp. <i>Cylindrical</i>	-	-	GQ275365.1
<i>V. unguiculata</i> subsp. <i>dekindtiana</i>	-	-	-
<i>V. unguiculata</i> subsp. <i>sesquipetalis</i>	JX233511.1	-	JF430410.1
<i>V. unguiculata</i>	EU717348.1	AY589510.1	AY748439.1
<i>V. vexillata</i>	*	JN008212.1	GQ275368.1
<i>Phaseolus coccineus</i>	JQ041849.1	AF142702.1	AF115160.1
<i>P. leptostachyus</i>	EU909073.1	DQ445983.1	AF115202.1
<i>P. lunatus</i>	JX170688.1	DQ445985.1	JQ609509.1
<i>P. macvaughii</i>	*	DQ450868.1	AF115200.1
<i>P. micranthus</i>	*	DQ445992.1	AF115205.1
<i>P. microcarpus</i>	*	DQ445993.1	KF943752.1
<i>P. vulgaris</i>	AY077929.1	DQ450862.1	JX233504.1
<i>Dipogon lignosus</i> (outgroup)	*	AY582988.1	AY583515.1
<i>Lablab purpureus</i> (outgroup)	EU717339.1	EU717408.1	GU217604.1

\*Espécies que não possuem dados no NCBI para estas regiões.  
 - Códigos a serem gerados, nossos dados de sequenciamento.

### MÉTODOS FILOGENÉTICOS COMPARATIVOS

A reconstrução de estados cariotípicos ancestrais (tamanho do genoma e número de sítios de DNAr 5S e 35S) foram realizadas no programa Mesquite v.2.75 (Maddison & Maddison, 2011). Para isso foi utilizada a função ‘Trace Character History’ a partir da 50% *majority-rule consensus tree* resultante das análises de inferência bayesiana (gerada a partir do alinhamento B). O estado ancestral para ‘número de sítios de DNAr 5S’ foi inferido usando a máxima verossimilhança sob o modelo Markov k-state one-parameter (Mk1), no qual todas as mudanças são igualmente prováveis. Os caracteres ‘número de sítios de DNAr 35S’ e ‘tamanho do

genoma' foram codificados como contínuos e a suas reconstruções feita a partir do algoritmo de máxima parcimônia. Para avaliar se existe correlação entre tamanho do genoma e número de sítios de DNAr, utilizamos dois métodos comparativos diferentes: 1) teste de correlação de Pearson e 2) análise de 'plot tree' que traça a árvore em um espaço bidimensional cujos eixos representam o estado dos táxons em dois caracteres contínuos, então isso permite mapear a árvore no espaço do carácter, o que pode sugerir padrões ou correlações (Maddison & Maddison 2011). O gráfico de *plot tree* foi gerado no programa Mesquite e nos nós internos da árvore foram plotados os estados ancestrais reconstruídos para 'número de sítios de DNAr 35S'.

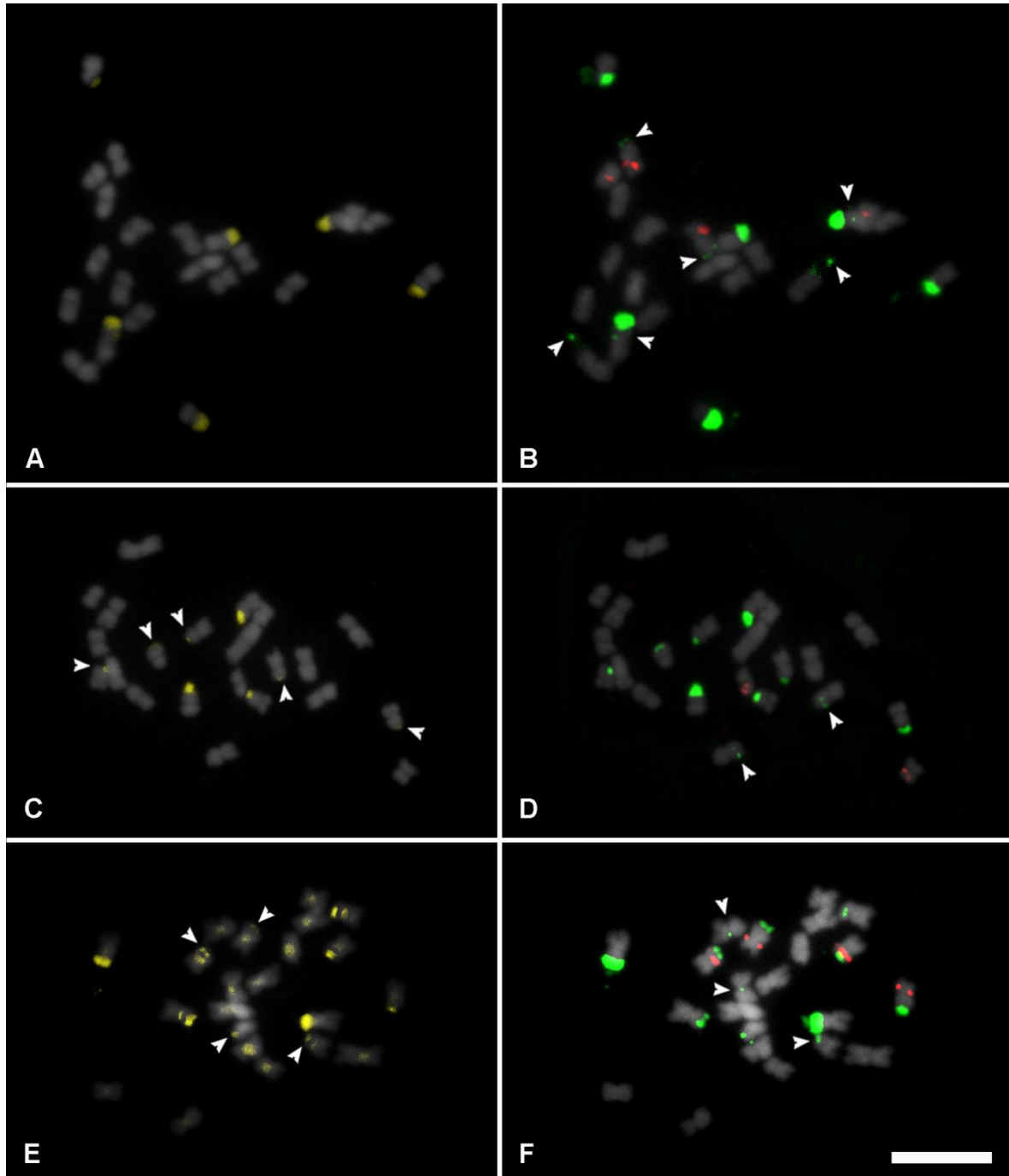
## RESULTADOS

### DISTRIBUIÇÃO DE BANDAS CMA/DAPI E DOS SÍTIOS DE DNAr

As 22 espécies/ subespécies de *Vigna* analisadas citogeneticamente (Tabela 1) apresentaram  $2n = 22$  cromossomos pequenos, com morfologia predominantemente, metacêntrica satelitado ( $m^{sc}$ ), metacêntrica (= m) e submetacêntrica (= sm), com exceção das espécies *V. ambacensis* (Galasso *et al.*, 1996) e *V. glabrescens* (Shamurailatpam *et al.*, 2015a), que apresentaram  $2n = 20$  e  $2n = 44$ , respectivamente. A dupla coloração com os fluorocromos CMA/ DAPI revelou bandas CMA<sup>+</sup> (ricas em pares de bases GC) colocalizadas com DNAr 35S, sendo descrita pela primeira vez para *V. angularis*, *V. unguiculata* subsp. *cylindrica* e *V. nakashimae* (Figura 1). Dentro do subgênero *Vigna*, o número de bandas CMA<sup>+</sup> variou de duas a 18 enquanto que no subgênero *Ceratotropis* esta variação foi de duas a nove (Tabela 1).

A única espécie do subgênero *Plectrotropis* analisada, *V. vexillata*, apresentou oito bandas CMA<sup>+</sup> (Tabela 1). Adicionalmente, as espécies *V. angularis*, *V. umbellata*, *V. unguiculata* subsp. *cylindrica*, subsp. *sesquipedalis* (presente trabalho) e *V. unguiculata* (Bortoleti *et al.*, 2012) apresentaram marcações CMA<sup>+</sup> em regiões pericentroméricas (Figuras 1 e S1; Tabela 1). Por outro lado, bandas DAPI<sup>+</sup> (ricas em AT) encontram-se descritas na literatura para sete das nove espécies analisadas para o subgênero *Ceratotropis*. No subgênero *Vigna*, por sua vez, apenas *V. khandalensis* apresentou bandas DAPI<sup>+</sup> (Shamurailatpam *et al.*, 2015b), enquanto *V.*

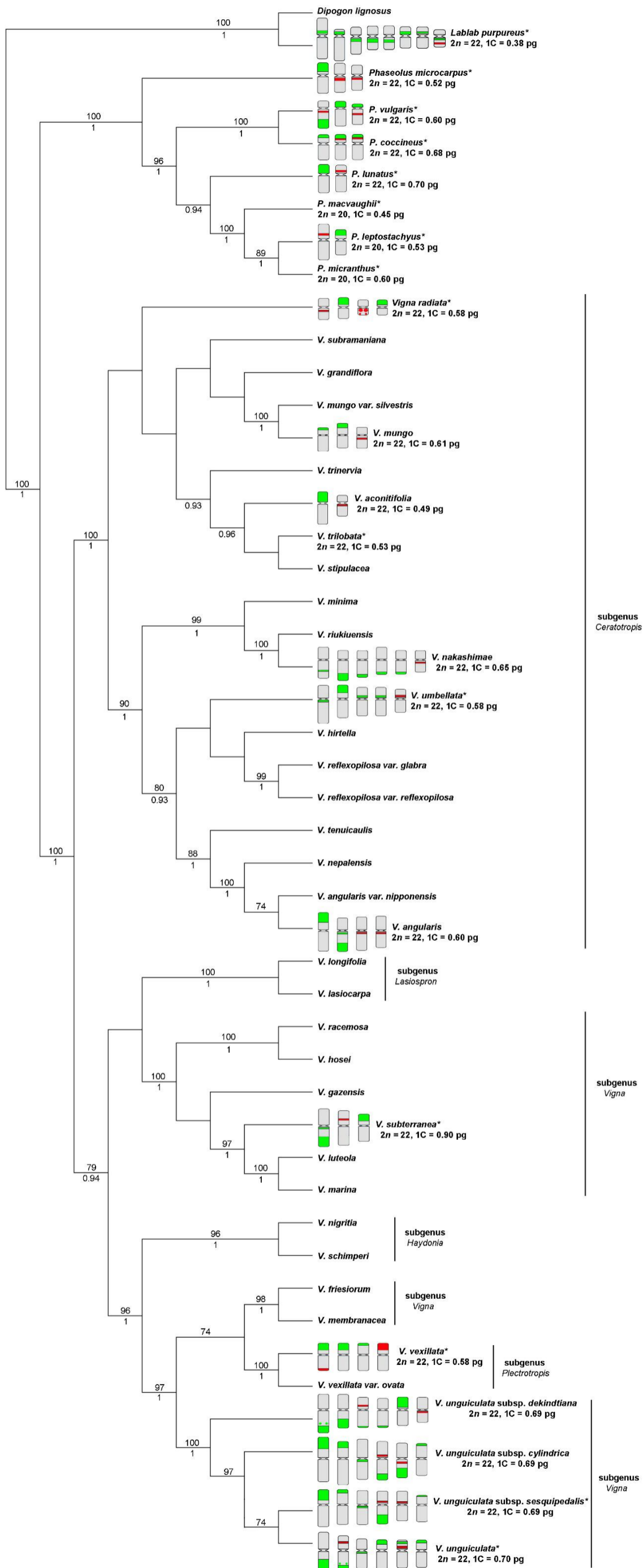
*vexillata*, a única espécie do subgênero *Plectrotropis* analisada, não apresentou bandas DAPI<sup>+</sup> (Galasso *et al.*, 1993; Pignone *et al.*, 1995).



**Figura 1** - Metáfases mitóticas de *Vigna unguiculata* subsp. *dekindtiana* (A–B), *V. unguiculata* subsp. *nakashimae* (C–D) e *V. unguiculata* subsp. *cylindrica* (E–F) após coloração com CMA (amarelo)/DAPI (cinza) e hibridizado *in situ* com sondas de DNAr 35S (verde) e 5S (vermelho). Cabeças de seta apontam para os sítios de CMA<sup>+</sup> e DNAr 35S. Barra em F = 5 µm.

Considerando os dados de FISH disponíveis para 12 espécies/ subespécies, pôde-se observar uma grande variação no número de sítios de DNAr 35S entre os subgêneros e as espécies de *Vigna*, variando de um par de sítios em *V. aconitifolia* (subgênero *Ceratotropis*) a sete pares de sítios em *V. unguiculata* (subgênero *Vigna*). Por outro lado, o número de sítios de DNAr 5S foi mais estável dentro do gênero com a maioria das espécies apresentando um ou dois pares de sítios (Figuras 1, S1; Tabela 1). Dados inéditos de FISH de DNAr foram apresentados para *V. unguiculata* subsp. *cylindrica* e *V. nakashimae*.

No subgênero *Vigna*, o número de sítios de DNAr 35S variou de três pares de sítios (em dois pares cromossômicos) em *V. subterranea* a sete pares de sítios (em seis pares cromossômicos) em *V. unguiculata*. As demais subespécies de *V. unguiculata* apresentaram três ou seis pares de sítios de DNAr 35S. Todos os sítios de DNAr 35S apresentaram uma localização predominantemente terminal, e com menor frequência proximal ou intersticial. Esta última localização ocorreu apenas para os casos com dois sítios no mesmo cromossomo (*V. unguiculata* e *V. unguiculata* subsp. *dekindtiana*). Adicionalmente, houve uma maior estabilidade no número de sítios de DNAr 5S dentro do subgênero, com um par em *V. subterranea* ou dois pares de sítios nas subespécies de *V. unguiculata*, sempre em posição proximal ou intercalar. Além disso, um ou dois pares de cromossomos das subespécies de *V. unguiculata* foram portadores de ambos os sítios de DNAr 35S e 5S simultaneamente, localizados em braços opostos ou de forma adjacente para o segundo par (Figuras 1, S1; Tabela 1). No subgênero *Plectrotropis*, a única espécie com dados de FISH disponíveis (*V. vexillata*) apresentou três pares de sítios de DNAr 35S e dois pares de DNAr 5S, sendo um dos cromossomos portador de ambos os sítios de DNAr em braços opostos (Figura 2; Tabela 1).



**Figura 2** – Representação esquemática dos cromossomos portadores de sítios de DNAr 35S e 5S para espécies de *Vigna* e *Phaseolus*, mapeados em uma árvore filogenética baseada na análise de inferência bayesiana, utilizando a combinação das regiões de ITS, *trnK* e *matK* para a relação entre estas leguminosas. Os blocos em verde indicam sítios de DNAr 35S e os blocos em vermelho indicam sítios de DNAr 5S. Asteriscos (\*) indicam as espécies cujos dados foram compilados da literatura: *V. radiata* (Bortoleti *et al.*, 2012); *V. subterranea* (She *et al.*, 2015); *V. trilobata* (<http://data.kew.org/cvalues/>); *V. unguiculata* (Vasconcelos *et al.*, 2015); *V. vexillata* (Choi *et al.*, 2013); *P. coccineus* (Almeida *et al.*, 2012); *P. leptostachyus* (Fonsêca *et al.*, 2016); *P. lunatus* (Bonifácio *et al.*, 2012); *P. macvaughii* e *P. micranthus* (<http://data.kew.org/cvalues/>); *P. microcarpus* (Fonsêca & Pedrosa-Harand, 2013); *P. vulgaris* (Fonsêca *et al.*, 2010); *Lablab purpureus* (She & Jiang, 2015).

Para o subgênero *Ceratotropis*, o número de sítios de DNAr 35S variou de um em *V. aconitifolia* (menor número relatado para o gênero) a cinco pares em *V. nakashimae*, com localização terminal preferencial, observando-se, contudo também sítios proximais e intercalar, sendo este último apenas em *V. nakashimae*. Com relação aos sítios de DNAr 5S, também foi verificada uma certa estabilidade em número e posição. A maioria das espécies analisadas (quatro de um total de seis espécies) apresentou apenas um par de sítios de DNAr 5S (Figura 2; Tabela 1). As exceções foram *V. angularis* com dois pares de sítios de DNAr 5S e *V. radiata* com três pares (em dois pares de cromossomos). Todos os sítios de DNAr 5S em *Ceratotropis* foram localizados na região proximal, com exceção do terceiro de *V. radiata* em posição intercalar.

#### TAMANHO DO GENOMA

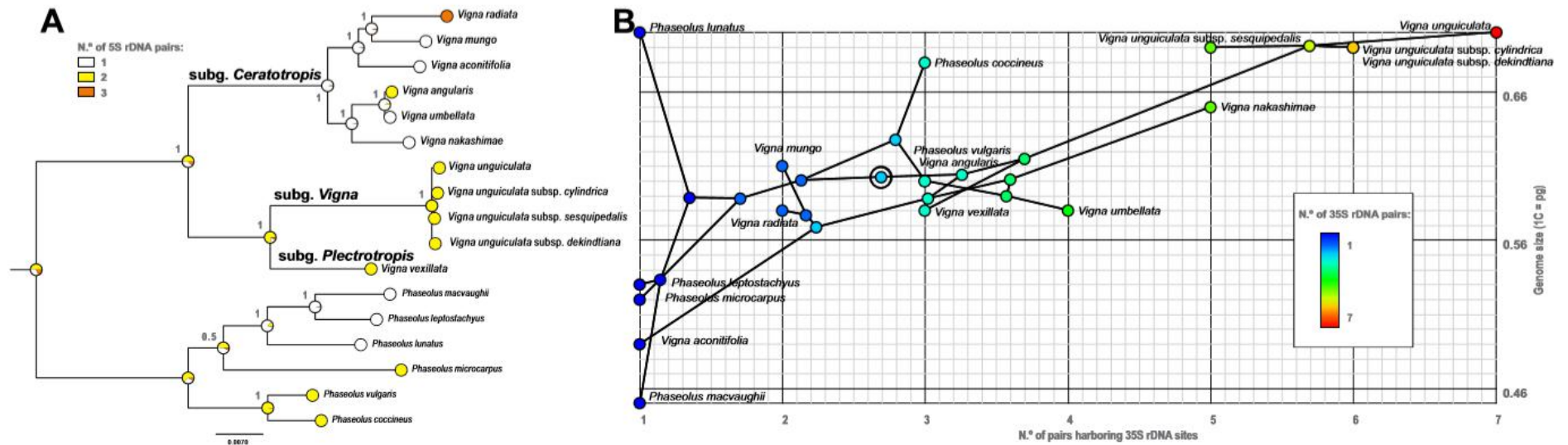
Dados de tamanho de genoma para 16 espécies diploides de *Vigna*, com variação de  $1C = 0,43$  em *V. oblongifolia* (syn. *V. lancifolia* A. Rich., subgênero *Vigna*, Parida *et al.*, 1990) a  $0,70$  pg em *V. unguiculata* (subgênero *Vigna*, presente trabalho) foram obtidos (Tabela 1). Resultados inéditos de conteúdo de DNA foram obtidos no presente trabalho para *V. unguiculata* subsp. *dekindtiana* ( $1C = 0,69$  pg), subsp. *sesquipedalis* ( $1C = 0,69$  pg) e *V. nakashimae* ( $1C = 0,65$  pg), além de confirmação de medição para outras seis espécies/subespécies (Tabela 1).

#### FILOGENIA DE *VIGNA* E RECONSTRUÇÃO DE CARACTERES

A Figura 2 apresenta idiogramas das espécies de *Vigna* plotados sobre a filogenia molecular mais completa do gênero (baseada em dados disponíveis no NCBI e em Delgado-Salinas *et al.* (2011), incluindo dados inéditos para três subespécies de *V. unguiculata*: subsp. *cylindrica*, subsp. *dekindtiana* e subsp. *sesquipedalis*). Adicionalmente, foi gerada uma subárvore, incluindo apenas as espécies com informação disponível de número de sítios de DNAr e de tamanho do genoma (Figura 3), abrangendo 11 espécies/ subespécies de *Vigna* e como grupos externos seis espécies do gênero irmão *Phaseolus* (Delgado-Salinas *et al.*, 2011). A descrição das sequências analisadas filogeneticamente, incluindo os códigos de acesso do GenBank encontram-se na Tabela 2.



As relações filogenéticas relatadas na Figura 2 foram concordantes com a topologia apresentada por Delgado-Salinas et al. (2011). O gênero *Vigna* foi dividido em dois grandes clados. Um foi dividido em dois clados irmãos, dos quais o primeiro agrupou espécies do subgênero americano *Lasiospron* e espécies de *Vigna* (incluindo *V. subterranea*) ( $pp = 1$ ), e o segundo agrupou espécies dos três subgêneros africanos, *Haydonia*, *Plectrotropis* (representado aqui por *V. vexillata*) e *Vigna* ( $pp = 1$ ). As subespécies de *V. unguiculata* foram agrupadas em uma politomia (Figura 2, ver Tabela 2) e *V. vexillata* foi posicionada no clado irmão desse agrupamento ( $pp = 1$ ). O segundo grande clado incluiu as espécies do subgênero asiático *Ceratotropis* ( $pp = 1$ ), as quais foram agrupadas em dois clados irmãos. O primeiro agrupou *V. aconitifolia*, *V. mungo* e *V. radiata* ( $pp = 1$ ), enquanto o segundo foi composto por *V. angularis*, *V. nakashimae* e *V. umbellata* ( $pp = 1$ ).



**Figura 3** – Reconstrução de estados cariotípicos ancestrais (tamanho do genoma e número de sítios de DNAr 5S e 35S), utilizando o programa Mesquite v.2.75 (Maddison & Maddison, 2011). (A) Estado ancestral para ‘número de sítios de DNAr 5S’, inferido usando a máxima verossimilhança sob o modelo Markov k-state one-parameter (Mk1), considerando todas as mudanças igualmente prováveis. (B) Reconstruções de caracteres ‘número de sítios de DNAr 35S’ e ‘tamanho do genoma’ codificados com contínuos, a partir do algoritmo de máxima parcimônia.

**Tabela 3** – Características das sequências *TrnL-TrnF*, *MatK* e ITS nas espécies analisadas filogeneticamente.

	Intervalo de comprimento (pb)	Porcentagem do conteúdo de G/C (%)	Sites variáveis	Sites Informativos	Transições	Transversões
<i>TrnL-TrnF</i>	350-1063	26,4%	131	76	6	27
<i>MatK</i>	780-2562	27,4%	73	44	7	10
ITS	507-848	45,2%	290	229	50	51

A análise de reconstrução do número de sítios de DNAr 5S revelou que a condição plesiomórfica para o subgênero *Ceratotropis* é a presença de um par de sítios (Figura 3A). Por outro lado, para o clado *Vigna+Plectrotropis*, dois pares parece ser a condição plesiomórfica mais provável. Contudo, um baixo número de espécies encontra-se amostrado neste clado. Adicionalmente, foi testada a correlação entre número de sítios de DNAr 35S e tamanho do genoma, sendo observada correlação positiva e significativa ( $r = 0,8878$ ;  $p = 0,0003$ ) uma vez que espécies com maior quantidade de sítios de DNAr 35S apresentaram valores de tamanho de genoma maiores (Tabela 1). Essa correlação também foi investigada pela função *plot tree* que confirmou a tendência de correlação positiva entre esses caracteres (Figura 3B).

## DISCUSSÃO

O presente trabalho apresentou uma integração de dados da literatura relacionados à distribuição da heterocromatina CMA<sup>+</sup> ou DAPI<sup>+</sup>, de sítios de DNAr 35S e 5S, tamanho do genoma em um contexto evolutivo. Foram incluídos dados citogenéticos inéditos para *V. nakashimae*, *V. unguiculata* subsp. *cylindrica*, subsp. *dekindtiana* e subsp. *sesquipedalis*, que se somaram às análises anteriores de outras espécies do gênero *Vigna*.

Pequenas diferenças foram observadas quando comparados os resultados da FISH de DNAr previamente publicados (Zheng *et al.*, 1993; Bortoleti *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; She *et al.*, 2015; Vasconcelos *et al.*, 2015) em relação ao presente trabalho. Variação no número, localização e tamanhos de sítios de DNAr

encontradas podem ser explicadas pela utilização de diferentes acessos, padrão de condensação cromossômica ou variações na metodologia e/ou sistema de captura de imagem utilizados. Adicionalmente, divergências também foram observadas para dados de tamanho do genoma previamente descritos (Bennett & Smith, 1976; Bennett *et al.*, 1982; Ignacimuthu & Babu, 1988; Parida *et al.*, 1990, dados destes dois últimos autores recalibrados por Bennett & Leitch, 1995) quando comparados aos dados obtidos por citometria de fluxo no presente trabalho. Estas diferenças estão provavelmente relacionadas à utilização de diferentes acessos, como por exemplo, observado no trabalho descrito por Parida *et al.* (1990) para *V. oblongifolia* (1C = 0,50 pg) e sua sinonímia *V. lancifolia* (1C = 0,43 pg), ou de diferentes técnicas, como observado para *V. unguiculata* com 1C = 0,60 pg pela técnica de microdensitometria com coloração de Feulgen (Parida *et al.*, 1990) ou com 1C = 0,70 pg por citometria de fluxo (presente trabalho).

A heterocromatina constitutiva centromérica/pericentromérica foi descrita para oito de 10 espécies analisadas anteriormente (pertencentes aos subgêneros *Ceratotropis*, *Plectrotropis* e *Vigna*) por bandeamento C. As exceções foram *V. gracilis* e *V. marina* (Zheng *et al.*, 1991; Galasso *et al.*, 1993; Galasso *et al.*, 1996), que apresentaram apenas bandas CMA<sup>+</sup> terminais não coradas positivamente pelo bandeamento C (Galasso *et al.*, 1996), provavelmente sítios de DNAr 35S. Na maioria das espécies de *Vigna*, as bandas CMA<sup>+</sup> foram restritas aos sítios de DNAr 35S, não colocalizando com a heterocromatina pericentromérica (Galasso *et al.*, 1996). Apenas as espécies *V. angularis*, *V. umbellata*, *V. unguiculata* subsp. *cylindrica*, subsp. *sesquipedalis* (presente trabalho) e *V. unguiculata* (Bortoleti *et al.*, 2012) apresentaram marcações CMA<sup>+</sup> em regiões pericentroméricas. Por outro lado, enquanto a presença de bandas C ou CMA<sup>+</sup> foi independente do subgênero analisado, as bandas DAPI<sup>+</sup>, foram encontradas preferencialmente nas espécies pertencentes à *Ceratotropis* (Shamurailatpam *et al.*, 2015a).

Como a heterocromatina pericentromérica parece ser uma condição comum à maioria das espécies de *Vigna* analisadas, as diferenças no tamanho do genoma mostradas no presente trabalho aparentemente estão correlacionadas ao número de sítios de DNAr 35S por espécie, como sugerido por Prokopowich *et al.* (2002) para eucariotos em geral, considerando 162 espécies de plantas e animais. Contudo, não se observou uma relação entre tamanhos de genomas e a proximidade filogenética. Por exemplo, o menor e o maior conteúdo de DNA de espécies diploides foram

encontrados em espécies do subgênero *Vigna*, para *V. oblongifolia* (1C = 0,43 pg, Parida *et al.*, 1990) e para *V. unguiculata* (1C = 0,7 pg, presente trabalho), respectivamente. Esta última espécie e suas subespécies apresentaram os maiores tamanhos de genoma diploide (0,69-0,70 pg) e os maiores números de sítios de DNAr 35S (5 a 7 pares) (She *et al.*, 2015; Vasconcelos *et al.*, 2015; presente trabalho).

Em *Phaseolus*, as espécies em geral apresentam baixo número de sítios de DNAr 35S por genoma haploide (1 ou 3), com localização terminal preferencial (Zheng *et al.*, 1994; Guerra *et al.*, 1996; Moscone *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2012; Bonifácio *et al.*, 2012; Fonsêca & Pedrosa-Harand, 2013; Fonsêca *et al.*, 2016), embora em *P. vulgaris* o número de sítios tenha variado significativamente dentro da espécie (3–9 por genoma haploide) (Pedrosa *et al.*, 2006). Segundo Fonsêca e Pedrosa-Harand (2017), a origem dos sítios adicionais parece ter resultado de eventos restritos ao clado do grupo Vulgaris, que inclui *P. vulgaris* e *P. coccineus*. Em *Vigna*, as nove espécies apresentaram um (uma espécie), dois (duas espécies), três (três espécies), quatro (uma espécie) ou cinco a sete (duas espécies, incluindo as subespécies de *V. unguiculata*) pares de sítios de DNAr 35S (Tabela 1; Choi *et al.*, 2013; She *et al.*, 2015; Vasconcelos *et al.*, 2015; presente trabalho). Embora a presença de três pares de sítios tenha sido encontrada em maior proporção e um número próximo a 3 tenha sido sugerido como plesiomórfico pela reconstrução de caracteres, dois pares parece ser o número ancestral, considerando a posição terminal nos cromossomos portadores como ancestral para os gêneros *Vigna*. Assim como em *Phaseolus* (Roa & Guerra, 2012), a posição terminal para os sítios de DNAr 35S é a mais frequente (35 de 46 pares de sítios identificados) e encontrada em todas as espécies de *Vigna* analisadas, observando-se uma maior proporção de espécies portadoras de dois pares terminais, com ou sem presença de sítios proximais ou intersticiais adicionais.

Adicionalmente, a presença de sítios de DNAr 35S e 5S em um mesmo cromossomo, em um mesmo braço cromossômico ou em braços opostos só foi encontrada nas subespécies de *V. unguiculata* (subgênero *Vigna*) e em *V. vexillata* (subgênero *Plectrotropis*) (Choi *et al.*, 2013; She *et al.*, 2015; Vasconcelos *et al.*, 2015; presente trabalho), que, embora de subgêneros diferentes, foram agrupadas em um mesmo clado. A presença simultânea de *loci* de DNAr 35S e 5S, em um mesmo braço cromossômico ou em braços opostos também foi reportada para a

leguminosa *Lablab purpureus* (L.) Sweet (She & Jiang, 2015) bem como para *P. vulgaris* (Pedrosa-Harand *et al.*, 2006), *P. coccineus* (Almeida *et al.*, 2012), ambas pertencentes a um mesmo clado, porém não está presente nas demais espécies de *Phaseolus* analisadas (Almeida & Pedrosa-Harand, 2011; Fonsêca & Pedrosa-Harand, 2013; Fonsêca *et al.*, 2016). Esta condição para os sítios de DNAr 35S e 5S parece ter ocorrido de forma independente nos referidos gêneros, mas parece ser uma condição relativamente comum nas espécies vegetais, sendo observada em 94 dos 162 gêneros de angiospermas e gimnospermas analisados (Roa & Guerra, 2015).

Em *Phaseolus*, os sítios de DNAr 35S e 5S estão conservados nos cromossomos 6 e 10, respectivamente (Fonsêca *et al.*, 2016). Em *Vigna*, no que diz respeito ao DNAr 35S, *V. unguiculata* e *V. aconitifolia* também compartilham o mesmo cromossomo 6 ancestral (Vasconcelos *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, em preparação), indicando ancestralidade do referido cromossomo para ambos os gêneros. Contudo, para o DNAr 5S, apesar de *V. unguiculata* ter preservado este *loci* no cromossomo 10 (Vasconcelos *et al.*, 2015), o cariótipo de *V. aconitifolia* parece ter acumulado rearranjos cromossômicos incluindo a localização do DNAr 5S, presente no cromossomo 5 (Oliveira *et al.*, em preparação). Contudo, este rearranjo parece ter ocorrido dentro do gênero *Vigna*, após divergência de ambos os gêneros, corroborando a hipótese de Iwata *et al.* (2013), que sugerem que rearranjos cromossômicos ou de transposição envolvendo *loci* de DNAr ocorreram após a divergência de *P. vulgaris* e *V. unguiculata*.

O DNAr tem sido considerado um sítio frágil, devido a repetitividade de *locus*, resultando em *hotspots* para recombinação e para quebras seguidas de rearranjos cromossômicos, gerando por consequência, alterações estruturais nos cromossomos e variações no número e na localização de sítios de DNAr (Huang *et al.*, 2008, 2012; Singh & Barman, 2013; Tchurikov *et al.*, 2015; Lan *et al.*, 2016).

Em *Vigna*, a evolução em concerto por *crossing over* desigual ou por recombinação não homóloga parece ter desempenhado um papel muito importante especialmente para mudanças nos *loci* terminais, tanto em número de *loci* quanto de unidades de repetição por *locus* (Wendel *et al.*, 1995; Rosato *et al.*, 2017).

Outra possibilidade proposta por Dubcovsky & Dvořák (1995), é a do modelo de dispersão, amplificação e deleção, em que o *loci* de 35S pode mudar de posição via dispersão dos *loci* menores, com amplificação do número de cópias de genes

nesses *loci* menores e posterior deleção dos *loci* maiores originais. Adicionalmente, mudanças no número de sítios de DNAr pode ocorrer por ação de elementos móveis (retrotransposons), que se acumulam nas proximidades ou ao redor de *loci* de DNAr (Raskina *et al.*, 2004a; 2004b; Kalendar *et al.*, 2008).

Em *Allium cernuum* Roth (Amaryllidaceae), o segmento de um retrotransposon do tipo  *copia-like* denominado “reliquia” localizado na região espaçadora intergênica (IGS) do DNAr 35S parece estar relacionado ao aumento no número de cópias e à dispersão do DNAr 35S (Chester *et al.*, 2010). Em *Vigna*, a subunidade de repetição com 174 pb da região espaçadora intergênica do DNAr ou similar (176 pb) foi encontrada nos *loci* de DNAr 35S de *V. angularis*, *V. radiata* e *V. unguiculata* mas também de forma independente arranjada em tandem nos genomas das duas últimas espécies (Unfried *et al.*, 1991; Iwata-Otsubo *et al.*, 2016), sendo confirmada por FISH e considerada a repetição em tandem mais abundante no genoma de *V. unguiculata* (Iwata-Otsubo *et al.*, 2016).

A espécie *V. unguiculata* e suas subespécies, crescidas geralmente em regiões quentes e semiáridas (Singh, 2005), apresentaram os maiores tamanhos de genoma e parecem ter acumulado as maiores divergências em relação ao número e à posição de sítios de DNAr 35S, além da presença de cromossomos portadores de DNAr 35S e 5S simultaneamente, tanto no mesmo braço quanto em braços cromossômicos opostos. Essa variabilidade cariotípica pode estar relacionada à instabilidade genômica induzida por condições ambientais adversas de calor e de seca extremos, como foi sugerido previamente para *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) coletada em quatro ilhas da Antártica Marítima, crescidas em ambiente de frio extremo (Amosova *et al.*, 2014). O aumento da instabilidade genômica pode ser ativado por elementos móveis, como consequência de efeitos adversos nas plantas, desempenhando um papel importante na dispersão de sítios de DNAr (Kalendar *et al.*, 2008; Chester *et al.*, 2010). Por outro lado, o subgênero *Ceratotropis* parece ter preservado um número de sítios de DNAr 35S por genoma haploide menor e com baixa variação (1–3), com exceção de *V. nakashimae*, com cinco pares de sítios e *V. umbellata* com três ou quatro pares (dependendo do acesso analisado) (Bortoleti *et al.*, 2012; She *et al.*, 2015; presente trabalho).

## CONCLUSÕES

Nossas análises indicam que as diferenças no tamanho do genoma mostradas no presente trabalho aparentemente estão relacionadas ao número de sítios de DNAr 35S encontrados por espécie. Por outro lado, embora as sequências de DNAr aparentemente tenham tido uma evolução cariotípica independente nos subgêneros *Vigna* e *Ceratotropis*, a maioria das espécies de *Ceratotropis* foram portadoras de menor número de sítios de DNAr de 5S e 35S. Além disso, considerando o número, a posição dos sítios de DNAr 35S nos cromossomos portadores e as relações filogenéticas das espécies de *Vigna*, pode-se indicar que dois pares de sítios parece ser o número ancestral, embora a presença de três pares tenha sido encontrada em maior proporção. Embora a presente amostragem ainda seja pequena, o número de sítios de DNAr 5S permite diferenciar os clados *Vigna+Plectotropis* de *Ceratotropis*, com uma amplificação no número desses sítios em *Vigna+Plectotropis*, sugerindo que a análise comparativa de sítios de DNAr por FISH pode possibilitar a identificação de sinapomorfias cariotípicas. No caso de *V. unguiculata*, a maior quantidade de sítios de DNAr e maiores genomas podem estar relacionados a condições ambientais e a sua história de cultivo. Sendo *Vigna* um gênero de origem relativamente recente (10 milhões de anos – Delgado-Salinas et al. 2011), a notável variabilidade no número e posição de sítios de DNAr e no conteúdo de DNA reportada aqui sugere que a fração repetitiva do genoma das espécies desse gênero seja altamente dinâmica.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa Meio-Norte (Teresina, Brazil), Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, Brazil) e ao IPK (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Alemanha) pelo suprimento de sementes, ao Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA (Recife, Brazil) pela multiplicação de sementes e a FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), e FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro e bolsas concedidas.



## REFERÊNCIAS

- Alam S.S., Tasmin R., Jahan I., Habib Md. A., Sultana S.S. 2013.** Fluorescent Banding and RAPD Analysis of Five Cultivars in *Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* (L.) Verdc. *Cytologia* **78**: 73-79.
- Ali H.B.M., Meister A., Schubert I. 2000.** DNA content, rDNA loci, and DAPI bands reflect the phylogenetic distance between *Lathyrus* species. *Genome* **43**: 1027-1032.
- Almeida C., Fonsêca A., dos Santos K.G., Mosiolek M., Pedrosa-Harand A. 2012.** Contrasting evolution of a satellite DNA and its ancestral IGS rDNA in *Phaseolus* (Fabaceae). *Genome* **55**: 1-7.
- Almeida C., Pedrosa-Harand A. 2011.** Contrasting rDNA evolution in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and common bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). *Cytogenetic and Genome Research* **132**: 212-217.
- Almeida C.C.S., Pedrosa-Harand A. 2013.** High macro-collinearity between lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.) as revealed by comparative cytogenetic mapping. *Theoretical and Applied Genetics* **126**: 1909-1916.
- Amosova A.V., Zemtsova L.V., Grushetskaya Z.E., Samatadze T.E., Mozgova G.V., Pilyuk Y.E., Volovik V.T., Melnikova N.V., Zelenin A.V., Lemesh V.A., Muravenko O.V. 2014.** Intraspecific chromosomal and genetic polymorphism in *Brassica napus* L. detected by cytogenetic and molecular markers. *Journal of Genetics* **93**: 133-143.
- Ansari H.A., Ellison N.W., Reader S.M., Badaeva E.D., Friebe B., Miller T.E., Williams W.M. 1999.** Molecular cytogenetic organization of 5S and 18S-26S rDNA loci in white clover (*Trifolium repens* L.) and related species. *Annals of Botany* **83**: 199-206.
- Baudoin J.P., Maréchal R. 1988.** Taxonomy and Evolution of the genus *Vigna*. In: Proceeding of the Second International Mungbean Symposium. Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan, p. 2-12.
- Bennett M.D., Smith J.B. 1976.** Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **274**: 227-274.
- Bennett M.D., Smith J.B., Heslop-Harrison J.S. 1982.** Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **216**: 179-199.
- Bonifácio E.M., Fonsêca A., Almeida C., Santos K.G.B., Pedrosa-Harand A. 2012.** Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **124**: 1513-1520.
- Bortoleti K.C.A., Benko-Iseppon A.M., Melo N.F., Brasileiro-Vidal A.C. 2012.** Chromatin differentiation between *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek and *V. unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution* **298**: 689-693.
- Cardoso D., Pennington R.T., De Queiroz L.P., Boatwright J.S., Van Wyk B.E., Wojciechowski M.F., Lavin M. 2013.** Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. *South African Journal of Botany* **89**: 58-75.
- Carvalho C.R., Saraiva L.S. 1993.** An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotech Histochem* **68**:142-145.

- Chester M., Sykorova E., Fajkus J., Leitch A.R. 2010.** Single integration and spread of a copia-like sequence nested in rDNA intergenic spacers of *Allium cernuum* (Alliaceae). *Cytogenetic and Genome Research* **129**: 35-46.
- Choi H.-W., Kim M.-Y., Lee S.-H., Sultana S., Bang J.-W. 2013.** Molecular cytogenetic analysis of the *Vigna* species distributed in Korea. *Genes and Genomics* **35**: 257-264.
- Delgado-Salinas A., Thulin M., Pasquet R., Weeden N., Lavin M. 2011.** *Vigna* (Leguminosae) sensu lato: the names and identities of the American segregate genera. *American Journal of Botany* **98**: 1694-1715.
- Doležel J., Godhde W. 1995.** Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* **19**: 103-106.
- Doyle J.J., Luckow M.A. 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* **131**: 900-10.
- Dubcovsky J., Dvořák J. 1995.** Ribosomal RNA multigene loci: Nomads of the triticeae genomes. *Genetics* **140**: 1367-1377.
- Falisto E. 2000.** Physical mapping of rRNA genes in *Medicago sativa* and *M. glomerata* by fluorescent *in situ* hybridization. *Journal of Heredity* **91**: 256-260.
- Fonsêca A., Ferraz M.E., Pedrosa-Harand A. 2016.** Speeding up chromosome evolution in *Phaseolus*: multiple rearrangements associated with a one-step descending dysploidy. *Chromosoma* **125**: 413-421.
- Fonsêca A., Ferreira J., dos Santos T.R., Mosiolek M., Bellucci E., Kami J., Gepts P., Geffroy V., Schweizer D., dos Santos K.G., Pedrosa-Harand A. 2010.** Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Research* **18**: 487-502.
- Fonsêca A., Pedrosa-Harand A. 2013.** Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome* **56**: 335-343.
- Fuchs J., Kuhne M., Schubert I. 1998.** Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent *in situ* hybridization. *Chromosoma* **107**: 272-276.
- Galasso I. 2003.** Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Lens* Miller. *Genome* **46**: 1118-1124.
- Galasso I., Harrison G.E., Pignone D., Brandes A., Heslop-Harrison J.S. 1997.** The distribution and organization of *Ty1-copia*-like retrotransposable elements in the genome of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Cowpea) and its relatives. *Annals of Botany* **80**: 327-333.
- Galasso I., Pignone D., Perrino P. 1993.** Cytotaxonomic studies in *Vigna*. II. Heterochromatin characterization in *Vigna unguiculata* and three related wild species. *Caryologia* **46**: 275-282.
- Galasso I., Saponetti L.S., Pignone D. 1996.** Cytotaxonomic studies in *Vigna*. III. Chromosomal distribution and reacting properties of the heterochromatin in five wild species of the section *Vigna*. *Caryologia* **49**: 311-319.
- Galasso I., Saponetti L.S., Pignone D. 1998.** Cytotaxonomic studies in *Vigna*. IV. Variation of the number of active and silent rDNA sites in *Vigna unguiculata* populations. *Caryologia* **51**: 95-104.
- Galasso I., Schmidt T., Pignone D., Heslop-Harrison J.S. 1995.** The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and characterization of 18S-5,8S-25S rRNA genes, 5S rRNA genes, telomere-like

- sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences. *Theoretical and Applied Genetics* **91**: 928-935.
- Guerra M., Kenton A., Bennett M. 1996.** rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by in situ hybridization. *Annals of Botany* **78**: 157-161.
- Heslop-Harrison J.S., Schwarzacher T., Anamthawat-Jónsson K., Leitch A.R., Shi M. 1991.** In situ hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* **3**: 109-115.
- Huang J., Ma L., Yang F., Fei S.Z., Li L. 2008.** 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. *PLoS ONE* **3**: e2167.
- Huang M., Li H., Zhang L., Gao F., Wang P., Hu Y., Yan S., Zhao L., Zhang Q., Tan J., Liu X., He S., Li L. 2012.** Plant 45S rDNA clusters are fragile sites and their instability is associated with epigenetic alterations. *PLoS ONE* **7**: e35139.
- Ignacimuthu S., Babu C.R. 1988.** Nuclear DNA and RNA amounts in the wild and cultivated Urd and Mung beans and their M1 plants. *Cytologia* **53**: 535-541.
- Iwata A., Greenland C.M., Jackson S.A. 2013.** Cytogenetics of legumes in the phaseoloid clade. *Plant Genome* **6**: 3.
- Iwata-Otsubo A., Lin J.Y., Gill N., Jackson S.A. 2016.** Highly distinct chromosomal structures in cowpea (*Vigna unguiculata*), as revealed by molecular cytogenetic analysis. *Chromosome Research* **24**: 197-216.
- Kajita T., Ohashi H., Tateishi Y., Bailey C.D., Doyle J.J. 2001.** rbcL and Legume Phylogeny, with Particular Reference to Phaseoleae, Millettieae, and Allies. *Systematic Botany* **26**: 515-536.
- Kalendar R., Tanskanen J., Chang W., Antonius K., Sela H., Peleg O., Schulman A.H. 2008.** Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 5833-5838.
- Kang Y.J., Kim S.K., Kim M.Y. et al. 2014.** Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species. *Nature* **5**: 5443.
- Kang Y.J., Satyawan D., Shim S. et al. 2015.** Draft Genome sequence of adzuki bean, *Vigna angularis*. *Scientific Reports* **5**: 8069.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Thierer T., 2012.** Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**: 1647-1649.
- Khattak G.S.S., Wolny E., Saeed I. 2007.** Detection of ribosomal DNA sites in chickpea (*Cicer arietinum* L.) and mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wiltzek) by fluorescence *in situ* hybridization. *Pakistan Journal of Botany* **39**: 1511-1515.
- Krishnan P., Sapra V.T., Soliman K.M., Zipf A. 2001.** FISH mapping of the 5S and 18S–28S rDNA loci in different species of *Glycine*. *Journal of Heredity* **92**: 295-300.
- Lan H., Chen C-L, Miao Y., Yu C-X, Guo W-W, Xu Q., Deng X-X. 2016.** Fragile Sites of ‘Valencia’ Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Chromosomes Are Related with Active 45s rDNA. *PLoS ONE* **11**: e0151512.
- Loureiro J., Rodriguez E., Doležel J., Santos C. 2007.** Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Annals of Botany* **100**: 875-888.
- Maddison W.P., Maddison D.R. 2011.** Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75

- Moraes A.P., Koehler S., Cabral J.S., Gomes S.S., Viccini L.F., Barros F., Felix L.P., Guerra M., Forni-Martins E.R. 2017.** Karyotype diversity and genome size variation in Neotropical Maxillariinae orchids. *Plant Biology* **19**: 298-308.
- Moscone E.A., Klein F., Lambrou M., Fuchs J., Schweizer D. 1999.** Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* **42**: 1224-1233.
- Oliveira A.R.S., Martins L.V., Bustamante F.O., Muñoz-Amatriain M., da Costa A.F., Benko-Iseppon A.M., Pedrosa-Harand A., Brasileiro-Vidal A.C.** Integrative BAC-FISH map in moth bean [*V. aconitifolia* (Jacq.) Maréchal] and its macrosyntenic relationship among *Vigna* and *Phaseolus* species, em preparação.
- Parida A., Raina S.N., Narayan R.K.J. 1990.** Quantitative DNA variation between and within chromosome complements of *Vigna* species (Fabaceae). *Genetica* **82**: 125-133.
- Pedrosa A., Jantsch M. F. Moscone E. A., Ambros P. F., Schweizer D. 2001.** Characterisation of pericentromeric and sticky intercalary heterochromatin in *Ornithogalum longibracteatum* (Hyacinthaceae). *Chromosoma* **110**:203-213.
- Pedrosa A., Sandal N., Stougaard J., Schweizer D., Bachmair A. 2002.** Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* **161**: 1661-1672.
- Pedrosa A., Almeida C.C.S., Moiselek M., Blair M.W., Schweizer D., Guerra M. 2006.** Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics* **112**: 924-933.
- Pignone D., Galasso I., Venora G. 1995.** Karyomorphological and heterochromatin similarities among four *Vigna* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* **42**: 57-60.
- Posada, D. 2008.** jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253–1256.
- Prokopowich C.D., Gregory T.R., Crease T.J. 2002.** The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome* **46**: 48-50.
- Raina S.N., Mukai Y., Kawaguchi K., Goel S., Jain A. 2001.** Physical mapping of 18S-5.8S- 26S and 5S ribosomal RNA gene families in three important vetches (*Vicia* species) and their allied taxa constituting three species complexes. *Theoretical and Applied Genetics* **103**: 839-845.
- Rambaut A. 2007.** FigTree, a Graphical Viewer of Phylogenetic Trees. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).
- Raskina O., Belyayev A., Nevo E. 2004a.** Quantum speciation in *Aegilops*: Molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 14818-14823.
- Raskina O., Belyayev A., Nevo E. 2004b.** Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. *Chromosome Research* **12**: 153-161.
- Roa F., Guerra M. 2012.** Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology* **12**: 225-238.
- Roa F., Guerra M. 2015.** Non-Random Distribution of 5S rDNA Sites and Its Association with 45S rDNA in Plant Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* **146**: 243-9.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.

- Rosato M., Ivarez I., Feliner G.N., Rosselló J.A. 2017.** High and uneven levels of 45S rDNA sitenumber variation across wild populations of a diploid plant genus (*Anacyclus*, Asteraceae). *PLoS ONE* **12**: e0187131.
- Sang, T., Crawford, D.J., and Stuessy, T.F. 1997.** Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* **84**(8): 1120–1136.
- Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J. et al. 2010.** Genome sequence of the paleopolyploid soybean. *Nature* **463**: 178-183.
- Schweizer D., Ambros P.F. 1994.** Chromosome banding. Stain combinations for specific regions. *Methods in Molecular Biology* **29**: 97-112.
- Seijo J.G., Lavia G.I., Fernández A., Krapovickas A., Ducasse D., Moscone E.A. 2004.** Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany* **91**: 1294-1303.
- Shamurailatpam A., Madhavan L., Yadav S.R., Bhat K.V., Rao S.R. 2015a.** Heterochromatin characterization through differential fluorophore binding pattern in some species of *Vigna* Savi. *Protoplasma* **252**: 629-635.
- Shamurailatpam A., Madhavan L., Yadav S.R., Bhat K.V., Rao S.R. 2015b.** Heterochromatin distribution and comparative karyo-morphological studies in *Vigna umbellata* Thunberg, 1969 and *V. aconitifolia* Jacquin, 1969 (Fabaceae) accessions. *Comparative Cytogenetics* **9**: 119-132.
- Shaw, J., Small, R.L. 2005.** Chloroplast DNA phylogeny and phylogeography of the North American plums (*Prunus* subgenus *Prunus* section *Prunocerasus*, Rosaceae). *Am. J. Bot.* **92**(12):2011–2030.
- She C.-W., Jiang X.-H. 2015.** Karyotype Analysis of *Lablab purpureus* (L.) Sweet Using Fluorochrome Banding and Fluorescence *in situ* Hybridisation with rDNA Probes. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **51**: 110-116.
- She C.-W., Jiang X.-H., Ou L.-J., Liu J., Long K.-L., Zhang L.-H., Duan W.-T., Zhao W., Hu J.-C. 2015.** Molecular cytogenetic characterisation and phylogenetic analysis of the seven cultivated *Vigna* species (Fabaceae). *Plant Biology* **17**: 268-280.
- Singh B.B. 2005.** Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: Singh RJ, Jauhar PP (eds) Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement. CRC Press, Boca Raton, p. 117-162.
- Singh M., Barman A.S. 2013.** Chromosome breakages associated with 45S ribosomal DNA sequences in spotted snakehead fish *Channa punctatus*. *Molecular Biology Reports* **40**: 723-729.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., and Bouvet, J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* **17**(5): 1105–1109.
- Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Snezhkina A.V., Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V., Kravatsky Y.V., Kretova O.V. 2015.** Hot spots of DNA double-strand breaks and genomic contacts of human rDNA units are involved in epigenetic regulation. *Journal of Molecular Cell Biology* **7**: 366-382.
- Totta C., Rosato M., Ferrer-Gallego P., Lucchese F., Rosselló J.A. 2016.** Temporal frames of 45S rDNA site-number variation in diploid plant lineages: lessons from the rock rose genus *Cistus* (Cistaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 11p.

- Unfried K., Schiebel K., Hemleben V. 1991.** Subrepeats of rDNA intergenic spacer present as prominent independent satellite DNA in *Vigna radiata* but not in *Vigna angularis*. *Gene* **99**: 63-68.
- Van-Lume B., Esposito T., Diniz-Filho J.A.F., Gagnon E., Lewis G.P. and Souza G. 2017.** Heterochromatic and cytomolecular diversification in the Caesalpinia group (Leguminosae): Relationships between phylogenetic and cytogeographical data. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **29**: 51-63.
- Vasconcelos E.V., Fonsêca A., Pedrosa-Harand A., Bortoleti K.C.A., Benko-Iseppon A.M., da Costa A.F., Brasileiro-vidal A.C. 2015.** Intra- and interchromosomal rearrangements between cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by BAC-FISH. *Chromosome Research* **23**: 253-266.
- Wanzenböck EM, Schöfer C, Schweizer D, Bachmair A. 1997.** Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **11**: 1007-1016.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. 2005.** DNA Fingerprinting in plants, principles, methods, and applications. 2ª Edição. Boca Raton: CRC Press, 444p.
- Wendel J.F., Schnabel A., Seelanan T. 1995.** Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 280-284.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: a guide to methods and applications. Edited by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York. pp. 315-322.
- Young N.D., Bharti A.K. 2012.** Genome-enabled insights into legume biology. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 14.1-14.23.
- Zheng J., Irifune K., Hirai K., Nakata M., Tanaka R., Morikawa H. 1994.** In situ hybridization to metaphase chromosomes in six species of *Phaseolus* and *Vigna* using ribosomal DNA as the probe. *Journal of Plant Research* **107**: 365-369.
- Zheng J.Y., Nakata M., Irifune K., Tanaka R., Morikawa H. 1993.** Fluorescent banding pattern analysis of eight taxa of *Phaseolus* and *Vigna* in relation to their phylogenetic relationships. *Theoretical and Applied Genetics* **87**: 38-43.
- Zheng J.Y., Nakata M., Uchiyama H., Morikawa H., Tanaka Y. 1991.** Giemsa C-banding patterns in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. *Cytologia* **56**: 459-466.

## 6 DISCUSSÃO GERAL

As reconstruções filogenéticas para *Vigna*, baseadas em dados de distribuição geográfica (Lavin et al., 2003; 2005; Delgado-Salinas et al., 2011) e em sequências de DNAr-ITS e cloroplastidiais (*petA-psbJ*, *psbD-trnT*, *trnT-trnE* e/ou *trnT-trnL*), sugerem a divisão do gênero em três grupos principais: asiático, africano e americano (Goel et al., 2002; Yano et al., 2004; Lavin et al., 2005; Tun YT e Yamaguchi, 2007; Delgado-Salinas et al., 2011). No presente trabalho, a árvore filogenética gerada, derivada de dados de sequências de espaçadores intergênicos (ITS), plastidiais (*trnL-trnF* e *matK*) e do conteúdo de DNA presente nas espécies e subespécies, corroborou a visão filogenética anteriormente reportada. Por outro lado, as divergências observadas para dados de tamanho do genoma previamente obtidos por microdensitometria com coloração de Feulgen (Bennett e Smith, 1976; Bennett et al., 1982; Ignacimuthu e Babu, 1988; Parida et al., 1990) e os dados obtidos por citometria de fluxo no presente trabalho provavelmente são decorrentes das metodologias e dos diferentes acessos utilizados (Bennett e Smith, 1976; Bennett et al., 1982; Ignacimuthu e Babu, 1988; Parida et al., 1990).

A hibridização *in situ* fluorescente utilizando sequências de DNAr foi realizada em várias espécies de plantas e tem sido utilizada como uma ferramenta para identificar e compreender a organização cromossômica, níveis de ploidia, aumento e/ou redução do DNA repetitivo e do tamanho do genoma, permuta desigual relação com elementos transponíveis, a filogenia e estudo de evolução cromossômica dentro e entre espécies relacionadas (Roa e Guerra 2012; 2015). Estudos citogenéticos utilizando sondas de DNAr em *Vigna* relataram pelo menos um par de sítio de DNAr 35S terminal colocalizado com bandas CMA<sup>+</sup> para as espécies avaliadas. Comparações cariotípicas interespecíficas utilizando fluorocromos CMA/ DAPI relataram que apenas três espécies e duas subespécies de *Vigna* [*V. angularis*, *V. umbellata*, *V. unguiculata* subsp. *cylindrica*, subsp. *sesquipedalis* (presente trabalho) e *V. unguiculata* (Bortoleti et al., 2012)] apresentaram marcações CMA<sup>+</sup> em regiões pericentroméricas e em algumas espécies pertencentes à *Ceratotropis* foram encontradas bandas DAPI<sup>+</sup> nas regiões intersticiais (Shamurailatpam et al., 2015b). A diversificação das regiões de heterocromatina também foi observada para espécies de outros gêneros como *Vicia*, *Phaseolus*, *Sesbania* e *Cicer* (Greilhuber

1975; Zheng et al., 1991; Forni-Martins et al., 1994; Forni-Martins e Guerra, 1999), que pode estar envolvida nos processos de diferenciação desse gênero.

Uma grande variação no número, tamanho e posição de sítios de DNAr dentro de *Vigna* foram relatadas (Zheng et al., 1993; Bortoleti et al., 2012; Choi et al., 2013; She et al., 2015; Vasconcelos et al., 2015). Essas variações no número e posição de sítios de DNAr podem ser decorrentes de mecanismos diferentes, tais como, rearranjos cromossômicos, *crossing-over* desiguais e / ou transposição (Moscone et al. 1999; Raskina et al. 2004; Datson e Murray 2006; Chung et al. 2008; ; Schubert e Lisak 2011), além de poderem estar relacionados à instabilidade genômica induzida por condições ambientais adversas, as quais podem ativar elementos móveis (Kalendar et al., 2008; Chester et al., 2010; Amosova et al., 2014). Assim, o DNAr tem sido considerado um sítio frágil, devido a repetitividade de *locus*, resultando em *hotspots* para recombinação e para quebras seguidas de rearranjos cromossômicos (Huang et al., 2008, 2012; Singh & Barman, 2013; Bustamante et al., 2014; Tchurikov et al., 2015; Lan et al., 2016; Rocha et al., 2015; 2017).

*Vigna unguiculata* apresentou um maior número de sítios de DNAr 35S (sete pares) dentro do gênero e quando comparada ao seu ancestral, *Vigna unguiculata* subsp. *dekindtiana* (seis pares, anteriormente *V. unguiculata* subsp. *unguiculata* var. *spontanea*) (Padulosi e Ng 1997; Vasconcelos et al., 2015). A presença de um sítio de DNAr 35S no mesmo braço cromossômico portador de sítio de DNAr 5S, ausente em sua espécie ancestral, pode ter sido resultante da ação de elementos móveis, de rearranjo cromossômico ou de *crossing-over* desigual. A presença simultânea dos dois sítios em um mesmo braço também foi relatada para *Vigna unguiculata* subsp. *cylindrica*, *P. vulgaris*, *P. coccineus* e para a espécie africana *Lablab purpureus*.

Em *Phaseolus*, o número de sítios de DNAr 35S no genoma haploide pode variar entre 1-3 pares para o DNAr 35S com localização terminal preferencial (Zheng et al., 1994; Guerra et al., 1996; Moscone et al., 1999; Pedrosa et al., 2006; Almeida et al., 2012; Bonifácio et al., 2012; Fonsêca & Pedrosa-Harand, 2013; Fonsêca et al., 2016), embora em *P. vulgaris* tenha sido observada uma variação numérica significativa (3-9 pares) (Pedrosa et al., 2006). Segundo Fonsêca e Pedrosa-Harand (2017), a origem dos sítios adicionais parece ter resultado de eventos restritos ao clado do grupo *Vulgaris*, que inclui *P. vulgaris* e *P. coccineus*. No que se refere ao DNAr 5S, um ou dois pares foram observados, com localização preferencial para a região proximal. Por sua vez, *Vigna* apresentou de um a sete pares de sítios de



DNAr 35S com prevalência para a posição terminal e um a dois pares de sítios de DNAr 5S com preferência para a posição proximal e intersticial (Tabela 1; Choi *et al.*, 2013; She *et al.*, 2015; Vasconcelos *et al.*, 2015; presente trabalho). Embora três pares de sítios tenham sido encontrados em maior quantidade nas espécies de *Vigna*, dois pares parece ser o número ancestral, considerando a posição terminal nos cromossomos portadores como ancestral para os gêneros *Vigna*.

A conservação do DNAr 35S e 5S foi observada em *Phaseolus* nos cromossomos 6 e 10, respectivamente. No entanto, apenas o cromossomo 6 de *Vigna* apresentou-se conservado, indicando ancestralidade do referido cromossomo para ambos os gêneros (Vasconcelos *et al.*, 2015; Fonsêca *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, em preparação). Apesar de *V. unguiculata* ter preservado o *loci* de DNAr 5S no cromossomo 10 (Vasconcelos *et al.*, 2015), o cariótipo de *V. aconitifolia* demonstra que rearranjos cromossômicos ocorreram no *loci* DNAr 5S, posicionando-o em no cromossomo 5 (Oliveira *et al.*, em preparação). Contudo, este rearranjo parece ter ocorrido dentro do gênero *Vigna*, após divergência de ambos os gêneros, corroborando com a hipótese de Iwata *et al.* (2013), que sugerem que rearranjos cromossômicos ou a transposição envolvendo *loci* de DNAr ocorreram após a divergência de *P. vulgaris* e *V. unguiculata*.

Um dos principais fatores que influencia na evolução cromossômica é o rearranjo da estrutura dos cromossomos, como inversões, translocações, fissão, fusão, duplicações e deleções. Os rearranjos cromossômicos podem promover modificações na estrutura, tamanho, forma e composição do cromossomo, além de induzir alteração do número cromossômico (Lysak *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2009).

Estudos citogenéticos comparativos revelaram diversos rearranjos cromossômicos em espécies de plantas, como relatado em Brassicaceae (Ziolkowski, 2002; Lysak *et al.*, 2006; 2010; Fransz *et al.*, 2016), Solanaceae (Lou *et al.*, 2010) e Poaceae (Febrer *et al.*, 2010; Betekhtin *et al.*, 2014). Entre *Arabidopsis lyrata* e *A. thaliana* foram observados cinco eventos de inversões, duas translocações e três fusões / fissões (Lysak *et al.*, 2006). *Brachypodium distachyon*, *B. sylvaticum* e *Brachypodium pinnatum* também foram diferenciadas por rearranjos cromossômicos, como duplicações, translocações e inversões (Betekhtin *et al.*, 2014). Entre *V. aconitifolia* e *V. unguiculata* foram observadas três inversões pericêntricas (*Vac2*, *Vac3* e *Vac4*) e a ausência da duplicação em *Vac3*, indicando quebras de colinearidade, além de uma translocação envolvendo *Vac1-Vac5*, revelando a

quebra da sintonia com *Vu1-Vu5*. Translocações como estas, também foram relatadas entre *V. unguiculata*, *V. radiata* e *V. angularis* envolvendo sete dos 11 pseudocromossomos destas espécies (<https://legumeinfo.org/genomes/gbrowse/vigun.IT97K-499-35>).

Entre *V. aconitifolia* e *P. vulgaris* duas translocações foram reveladas (*Pv2* e *Pv3* resultaram em *Vac2* e *Vac3*; *Pv1* e *Pv8* originaram *Vac1* e *Vac8*) e seis pseudomoléculas de *P. vulgaris* (*Pv4*, *Pv6*, *Pv7*, *Pv9*, *Pv10* e *Pv11*) apresentaram sintonia entre as espécies de *Vigna*, *P. vulgaris*, *P. lunatus* e *P. microcarpus*, com apenas uma quebra de colinearidade originada pela inversão pericêntrica observada em *Vu4* (Pedrosa-Harand *et al.*, 2009; Fonsêca *et al.*, 2010; Bonifácio *et al.*, 2012; Almeida e Pedrosa-Harand, 2013; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013). Adicionalmente, 20 sondas BACs (14 de *Pv* e seis de *Vu*) e o bacteriófago SJ19.12 não apresentaram marcação ou foram dispersas em *V. aconitifolia*, indicando que algumas sequências podem ser espécie-específicas e estar ausentes em algumas espécies, como foi observado para *V. unguiculata* e algumas espécies de *Phaseolus*. Por outro lado, as sequências dispersas provavelmente apresentam sequências repetitivas em seus insertos, como observado por Pedrosa-Harand *et al.* (2009) e Fonsêca *et al.* (2010) para FISH dos referidos BACs em *P. vulgaris*.

Dessa forma, o estudo da filogenia associada as técnicas de coloração com flourocromos CMA/DAPI e a FISH com sondas de DNAr 5S, DNAr 35S e BACs de *P. vulgaris* e de *V. unguiculata*, possibilitou a construção de árvores filogenéticas comparativas, a construção de um mapa citogenético de *V. aconitifolia* e a realização de análises cito-comparativas entre espécies dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus*, fornecendo informações sobre a diversidade genética intra- e intergenérica, colaborando com estudos de macrossintenia e possibilitando um melhor entendimento a respeito da evolução cariotípica do grupo.

## 7 CONCLUSÕES

1. A posição e o número de sítios de DNAr 35S são variáveis dentro do gênero *Vigna*, com predominância de localização terminal e dois pares de sítios como provável número ancestral para o gênero.
2. Os sítios de DNAr 5S são estáveis dentro de *Vigna*, com predominância de dois pares de sítios em regiões proximais para o DNAr 5S.
3. A evolução cariotípica relacionada aos sítios de DNAr 35S parece ter acontecido de forma independente entre os subgêneros *Ceratotropis* e *Vigna*.
4. *Vigna aconitifolia* apresenta conservação parcial da macrossintenia quando comparada a *V. unguiculata* e a espécies do gênero *Phaseolus*, observando-se rearranjos cromossômicos tais como translocações, inversões e duplicações.

## REFERÊNCIAS

- ADETULA OA (2005) Centromeric banding pattern of mitotic chromosomes in *Vigna vexillata* (TVnu 73) African Journal of Biotechnology Vol. 4: 400-402.
- ADETULA OA (2006) Comparative study of the karyotypes of two *Vigna* sub species. Afr J Biotechnol 5: 563-565.
- Ahn CS, Hartmann RW (1978) Interspecific hybridization between mungbean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek) and Adzuki bean (*V. angularis* [Willd] Ohwi and Ohashi). J Am Soc Hortic Sci 103: 3-6.
- AKITO K, ISEMURA T, SHIMIZU T, SOMTA P, SRINIVES P, TABATA S, TOMOOKA N AND VAUGHAN D (2011) Asian *Vigna*. Genome Research 33-40.
- ALAM SS, TASMIN RI, JAHAN I, HABIB MDA, AND SULTANA SS (2013) Fluorescent Banding and RAPD Analysis of Five Cultivars in *Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* (L.) Verdc. Cytologia 78: 73-79.
- ALIYEVA-SCHNORR L, BEIER S, KARAFIATOVA M, SCHMUTZER T, SCHOLZ U, DOLEŽEL J, STEIN N AND HOUBEN A (2015) Cytogenetic mapping with centromeric BAC contigs shows that this recombination-poor region comprises more than half of barley chromosome 3H. The Plant Journal 84: 385-394.
- ALMEIDA CCS AND PEDROSA-HARAND A (2013) High macro-collinearity between lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.) as revealed by comparative cytogenetic mapping. Theor Appl Genet 126: 1909-1916.
- AMOSOVA AV, BOLSHEVA NL, SAMATADZE TE, TWARDOVSKA MO, ZOSHCHUK SA, ANDREEV IO, BADAIEVA ED, KUNAKH VA, MURAVENKO OV (2015) Molecular Cytogenetic Analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic. PlosOne 10: 1-17.
- BARONE A, DELGIUDICE A AND NG NQ (1992) Barriers to interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* and *Vigna vexillata*. Sexual Plant Reprod. 5:195-200.
- BAUDOIN JP AND MARÉCHAL R (1988) Taxonomy and Evolution of the genus *Vigna*. In: Proceeding of the Second International Mungbean Symposium. Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan, p. 2-12.
- BAUDOIN JP AND MARÉCHAL R (1991) Taxonomy and wide crosses of pulse crops, with special reference to *Phaseolus* and *Vigna*. Pp. 287–299 in Crop Genetic Resources of Africa, Vol. II (N.Q. Ng, P. Perrino, F. Attere and H. Zedan, eds. IBPGR, Rome, Italy.
- BELARMINO LC, OLIVEIRA ARS, BRASILEIRO-VIDAL AC, BORTOLETI KCA, BEZERRA-NETO JP, ABDELNOOR RV AND BENKO-ISEPPON AM (2012) Mining plant genome browsers as a mean for efficient connection of physical genetic and cytogenetic mapping: an example using soybean. Genet Mol Biol 35: 1:335-347.

BENNETT MD, SMITH JB, (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 274: 227-274.

BENNETT MD, SMITH JB, HESLOP-HARRISON JS (1982) Nuclear DNA amounts in angiosperms. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 216: 179-199.

BENNETT MD, LEITCH IJ, PRICE HJ, JOHNSTON JS (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (~ 100 Mb) and *Drosophila* (~ 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~ 157 Mb and thus ~ 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of ~ 125 Mb. *Annals of Botany* 91: 547-557.

BETEKHTIN A, JENKINS G, HASTEROK R (2014) Reconstructing the evolution of *Brachypodium* genomes using comparative chromosome painting. *PLoS ONE* 2014, 9, e115108.

BHARATHI A, SELVARAJ KSV, VEERABADHIRAN P AND LAKSHMI BS (2006) Crossability barriers in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek): with its wild relatives. *Indian J. Crop Science* 1: 120-124.

BONIFÁCIO EM, FONSÊCA A, ALMEIDA C, SANTOS KGB AND PEDROSA-HARAND A (2012) Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 124: 1513-1520.

BORÉM A AND VIEIRA MLC (2005) Glossário de Biotecnologia. 1. ed. Visconde do Rio Branco: Editora Suprema, v. 1, p.177.

BORTOLETI KCA (2010) Mapeamento cromossômico comparativo em *Glycine* Willd, *Phaseolus* L. e *Vigna Savi*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 153 p.

BORTOLETI KCA., BENKO-ISEPPON AM, DE MELO NF AND BRASILEIRO-VIDAL AC (2012) Chromatin differentiation between *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek and *V. unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 298: 689-693.

BRINK M AND JANSEN PCM (2006) *Vigna aconitifolia* (Jacq.) Maréchal. In: Brink M, Belay G, editors. PROTA 1: Cereals and Pulses/ Céréales et Légumes Secs. Wageningen, Netherlands: PROTA, Wageningen, Holanda.

BROUGHTON WJ, HERNANDEZ G, BLAIR M, BEEBE S, GEPTS P AND VANDERLEYDEN J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.): model food legumes. *Plant Soil* 252: 55-128.

BUSTAMANTE FO, ROCHA LC, TORRES GA, DAVIDE LC, MITTELMANN A, TECHIO VH (2014) Distribution of rDNA in Diploid and Polyploid Lam. and Fragile Sites in 45S rDNA Regions. *Crop Science* 54: 617

BUSTAMANTE FO, ALIYEVA-SCHNORR L, FUCHS J, BEIER S AND HOUBEN A (2017) Correlating the genetic and physical map of barley 3H revealed limitations of the FISH-based mapping of nearby single copy probes caused by the dynamic structure of metaphase chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 152: 90-96.

CHACÓN SMI, PICKERSGILL B AND DEBOUCK DG (2005) Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 432-444.

CHEN HK, MOK MC, SHANMUGASUNDARAM S AND MOK DWS (1989) Interspecific hybridization between *Vigna radiata* (L.) Wilczek and *V. glabrescens*. *Theor. Appl. Genet.* 78: 641-647.

CHENG Z, BUELL CR, WING RA, GU M AND JIANG J (2001) Toward a cytological characterization of the rice genome. *Genome research* 11: 2133-2141.

CHESTER M, SYKOROVA E, FAJKUS J, LEITCH AR (2010) Single integration and spread of a copia-like sequence nested in rDNA intergenic spacers of *Allium cernuum* (Alliaceae). *Cytogenetic and Genome Research* 129: 35-46.

CHOI HW, KIM M-Y, LEE S-H, SULTANA S AND BANG J-W (2013) Molecular cytogenetic analysis of the *Vigna* species distributed in Korea. *Genes Genom* 35: 257-264.

CHUNG MC, LEE YI, CHENG YY, CHOU YJ, LU CF (2008): Chromosomal polymorphism of ribosomal genes in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 745–753.

CURTIN PD (1969) *The Atlantic slave trade: a census*. University of Wisconsin Press, Madison. pp. 74-102.

DARLINGTON CD, WYLIE AP (1955) *Chromosome atlas of flowering plants*. In: George Allen and Unwin (eds) Ltd. London.

DATSON PM, MURRAY BG (2006): Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research* 14: 845–857.

De DN, Krishnan R (1966) Studies on pachytene and somatic chromosomes of *Phaseolus mungo* L., *Genetica* 37: 581-587.

DELGADO-SALINAS A, THULIN M, PASQUET R, WEEDEN N AND LAVIN M (2011) *Vigna* (Leguminosae) sensu lato: the names and identities of the American segregate genera. *Am J Bot* 98: 1694-1715.

DELGADO-SALINAS A, BIBLER R AND LAVIN M (2006). Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): A recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany* 31: 779-791.

DIKSHIT HK, SINGH D, SINGH A, NEELU J, KUMARI J AND SHARMA TR (2012) Utility of adzuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi] simple sequence repeat (SSR) markers in genetic analysis of mungbean and related *Vigna* spp. African Journal of Biotechnology 11: 13261-13268.

DOI K, KAGA A, TOMOOKA N, VAUGHAN DA (2002) Molecular phylogeny of genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* based on rDNA ITS and atpB-rbcL intergenic spacer region of cpDNA sequences. Genetica 114: 129-145.

EGAWA Y, TOMOOKA N (1991) International Symposium Series in JIRCAS Tsukuba, Japan, 2:112-120.

ENDO TR, GILL BS (1996) The Deletion Stocks of Common Wheat Journal of Heredity 87: 295-307.

ENDO TR (2007) The gametocidal chromosome as a tool for chromosome manipulation in wheat. Chromosome Research 15(1): 67–75|

FARIS DG (1965) The origin and evolution of the cultivated forms of *Vigna sinensis*. Can J Genet Cytol 7: 433-452.

ELSHIRE RJ, GLAUBITZ JC, SUN Q, POLAND JA, KAWAMOTO K, BUCKLER ES, MITCHELL SE (2011) A robust simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PloSone 6: 19379.

FATOKUN CA AND SINGH BB (1987) Interspecific hybridization between *Vigna pubescens* and *V. unguiculata* (L.) Walp. through embryo rescue. Plant Cell. Tissue Organ Culture 9:229-233.

FEBRER M, GOICOECHEA JL, WRIGHT J, MCKENZIE N, SONG X, LIN J, COLLURA K, WISSOTSKI M, YU Y, AMMIRAJU JS, WOLNY E, IDZIAK D, BETEKHTIN A, KUDRNA D, HASTEROK R, WING RA, BEVAN MW (2010) An integrated physical, genetic and cytogenetic map of *Brachypodium distachyon*, a model system for grass research. PLoS ONE 5: 13461.

FRANZ P, LINC G, CHENG-RUEI L, AFLITOS SA, LASKY JR, TOOMAINJAN C, ALI H, PETER J, DAM PV, JI X, KUZAK M, GERATS T, SCHUBERT I, SCHNEEBERGER K, COLOT VINCENT, MARTIENSSEN R, KOORNNEEF M, NORDBORG M, JUENGER TE, JONH H SCHRANZ ME (2016) Molecular, genetic and evolutionary analysis of a paracentric inversion in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 88: 159–178.

FIETTO, JLR, MACIEL, TEF (2015) Sequenciando genomas. In: Moreira LM (Org). Ciências Genômicas: Fundamentos e Aplicações, São Paulo, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, pp. 45-47.

FINDLEY, SD, CANNON S, VARALA K, DU J, MA J, HUDSON ME, BIRCHLER J, STACEY G (2010) A fluorescence *in situ* hybridization system for karyotyping soybean. Genetics 185:727-744.

FONSÊCA AFA, FERREIRA J, SANTOS TRB, MOSIOLEK M, BELLUCCI E, KAMI J, GEPTS P, GEFFROY V, SCHWEIZER D, SANTOS KGB, PEDROSA-HARAND A (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Chromosome Res 18: 487-502.

FONSÊCA AFA, PEDROSA-HARAND (2013) Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. Genome 56: 335-343.

FONSÊCA A, FERRAZ ME, PEDROSA-HARAND A (2016) Speeding up chromosome evolution in *Phaseolus*: multiple rearrangements associated with a one-step descending dysploidy. Chromosoma 125:413-421.

FONSÊCA A, PEDROSA-HARAND A (2017) Cytogenetics and Comparative Analysis of *Phaseolus* Species. Compendium of Plant Genomes 3: 57-68.

FRAHM-LELIVELD JA (1965) Cytological data on some wild tropical *Vigna* species and cultivars from cowpea and asparagus bean. Euphytica 14: 251-270.

FRANSZ P, LINC G, CHENG-RUEI L, AFLITOS SA, LASKY JR, TOOMAINJAN C, ALI H, PETER J, DAM PV, JI X, KUZAK M, GERATS T, SCHUBERT I, SCHNEEBERGER K, COLOT VINCENT, MARTIENSSEN R, KOORNNEEF M, NORDBORG M, JUENGER TE, JONH H SCHRANZ ME (2016) Molecular, genetic and evolutionary analysis of a paracentric inversion in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 88: 159–178.

FREIRE-FILHO FR (1988) Origem, evolução e domesticação do caupi. In: Araújo JP de, Watt EE (Org.). O caupi no Brasil. Brasília, DF: IITA: EMBRAPA, pp 26-46.

FREIRE-FILHO FR, RIBEIRO VQ, CARDOSO MJ, AZEVEDO JN, RAMOS SRR et al., (2011) Coleção ativa de germoplasma de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e de outras espécies do gênero *Vigna*, da Embrapa Meio-Norte, no período de 1976 a 2003 -Teresina : Embrapa Meio-Norte,125 p. Documento 209/ Embrapa Meio-Norte.

FORNI-MARTINS ER, FRANCHI-TANIBATA N, CARDELLI MAL (1994) Karyotypes of species of *Sesbania* Scop. (Fabaceae). Cytologia 59: 479-482.

FORNI-MARTINS ER, GUERRA M (1999) Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). Caryologia 52: 97-103.

FORNI-MARTINS ER (1986) New Chromosome number in the genus *Vigna* Savi (Leguminosae - Papilionoideae). Bull. Jardin Bot. nat. Belgique. 56: 129-133.

GALASSO I AND PIGNONE D (1991) *Vigna vexillata* (L.) A. Richard and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. due cariotipi a confronto Proc. XXXV S.I.G.A. Congress, p. 90.

Galasso I, Pignone D, Perrino P (1992) Cytotaxonomic studies in *Vigna*. I. General technique and *Vigna unguiculata* C-banding. Caryologia 45: 155-161.



GALASSO I, PIGNONE D AND PERRINO P (1993) Cytotaxonomic studies in *Vigna*. II. Heterochromatin characterization in *Vigna unguiculata* and three related wild species. *Caryologia* 46: 275-282.

GALASSO I, SCHMIDT T, PIGNONE D AND HESLOP-HARRISON JS (1995) The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and characterization of 18S-5.8S-25S rRNA genes, 5S rRNA genes, telomere-like sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences. *Theor Appl Genet* 91: 928-935.

GALASSO I, SAPONETTI LS AND PIGNONE D (1996) Cytotaxonomic studies in *Vigna*. III. Chromosomal distribution and reacting properties of the heterochromatin in five wild species of the section *Vigna*. *Caryologia* 49: 311-319.

GALASSO I, HARRISON GE, PIGNONE D, BRANDES A AND HESLOP-HARRISON JS (1997) The distribution and organization of Ty1-copia-like retrotransposable elements in the genome of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Cowpea) and its relatives. *Ann Bot* 80: 327-333.

GALASSO I, SAPONETTI LS AND PIGNONE D (1998) Cytotaxonomic studies in *Vigna*. IV. Variation of the number of active and silent rDNA sites in *Vigna unguiculata* populations *Caryologia* 51: 95-104.

GHAFOO, A, SHARIF A, AHMAD Z, ZAHID MA AND RABBANI MA (2001) Genetic diversity in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). *Field Crop Res* 69: 183-190.

GOEL S, RAINA SN, OGIHARA Y (2002) Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA in the *Phaseolus-Vigna* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 1-19.

GOMATHINAYAGAM P, GANESHRAM S, RATHNASWAMY R AND RAMASWAMY NM (1998) Interspecific hybridisation between *V. unguiculata* (L.) Walp. and *V. vexillata* (L.) A. Rich. through *in vitro* embryo culture. *Euphytica* 102: 203-209.

GRAHAM PH, VANCE CP (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiol* 131: 872-877.

GREILHUBER J (1975) Heterogeneity of heterochromatin in plants: comparison of Hy- and C-bands in *Vicia faba*. *Plant Syst. Evol.* 124: 139-156.

GUEDES RE (2008) Bases para o Cultivo Orgânico de Feijão-Caupi [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)] no Estado do Rio de Janeiro. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 68 p.

GUERRA M, KENTON A AND BENNETT MD (1996) rDNA Sites in Mitotic and Polytene Chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp and *Phaseolus coccineus* L. revealed by Fluorescent in situ Hybridization. *Ann Bot* 78: 157-161.

HARLAN JR AND DE WET JMJ (1971) Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20: 509-517.

- HEPPER RN (1963) Plants of the 1957-58 West African Expedition: II The Bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*) and Kersting's groundnut (*Kerstingiella geocarpa*) wild in West Africa. *Kew Bull.* 16: 395-407.
- HOUGAARD BK, MADSEN LH, SANDAL N, MORETZSOHN MC, FREDSLUND J, SCHAUSER L, NIELSEN AM, ROHDE T, SATO S, TABATA S et al. (2008) Legume anchor markers link syntenic regions *between Phaseolus vulgaris, Lotus japonicus, Medicago truncatula and Arachis*. *Genetics* 179: 2299-2312.
- HUANG J, MA L, YANG F, FEI SZ, LI L (2008) 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. *PLoS ONE* 3: e2167.
- HUANG M, LI H, ZHANG L, GAO F, WANG P, HU Y, YAN S., ZHAO L., ZHANG Q., TAN J., LIU X., HE S., LI L. 2012. Plant 45S rDNA clusters are fragile sites and their instability is associated with epigenetic alterations. *PLoS ONE* 7: e35139.
- HUYNH B-L, CLOSE TJ, ROBERTS PA, HU Z, WANAMAKER S, LUCAS MR, CHIULELE R, CISSÉ N, DAVID A, HEARNE S, et al. (2013) Gene Pools and the Genetic Architecture of Domesticated Cowpea. *The Plant Genome* 6: 1-8.
- IGNACIMUTHU S, BABU CR (1988) Nuclear DNA and RNA amounts in the wild and cultivated Urd and Mung beans and their M1 plants. *Cytologia* 53: 535-541.
- IWATA A, GREENLAND CM AND JACKSON SA (2013) Cytogenetics of legumes in the phaseoloid clade. *Plant Genome* 6: 1-8.
- IWATA-OTSUBO A, JER-YOUNG L, NAVDEEP G, SCOTT JACKSON A (2016) Highly distinct chromosomal structures in cowpea (*Vigna unguiculata*), as revealed by molecular cytogenetic analysis. *Chromosome Research* 24:197–216.
- JAVADI F, TUN YT, KAWASE M, GUAN KY, YAMAGUCHI H. (2011) Molecular phylogeny of the subgenus *Ceratropis* (genus *Vigna*, Leguminosae) reveals three eco-geographical groups and Late Pliocene-Pleistocene diversification: evidence from four plastid DNA region sequences. *Ann Bot-London* 108: 367-380.
- JIANG J AND GILL BS (2006) Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49: 1057-1068.
- JOSEPH LS AND BOUWKAMP JC (1978) Karyomorphology of Several Species of *Phaseolus* and *Vigna* *Cytologia* 43: 595-600.
- JUDD WS, CAMPBELL CS, KELLOGG EA, STEVENS PF, DONOGHUE MJ (2009) *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético* 3a ed. Porto Alegre: Artmed, pp 612.
- KALENDAR R, TANSKANEN J, CHANG W, ANTONIUS K, SELA H, PELEG O, SCHULMAN AH (2008) *Cassandra* retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 5833-5838.

KANG YJ, KIM SK, KIM MY , LESTARI P, KIM KH, HA B-K, JUN TH, HWANG WJ, LEE T, LEE J et al. (2014) Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species. *Nature* 5: 5443-5452.

KANG YJ, SATYAWAN D, SHIM S, LEE T, LEE J, HWANG WJ, KIM SK, LESTARI P, LAOSATIT K, KIM KH, et al. (2015) Draft genome sequence of adzuki bean, *Vigna angularis* 5:8069-8077.

KAO F-I, CHENG Y-Y, CHOW T-Y, CHEN H-H, LIU S-M, CHENG C-H AND CHUNG M-C (2006) An integrated map of *Oryza sativa* L. chromosome 5. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 891-902.

KAYS SJ, DIAS JCS (1995) Common names of commercially cultivated vegetables of word in 15 languages. *Economic Botany* 49: 115-152.

KRISHNAN P, SAPRA VT, SOLIMAN KM, ZIPF A (2001) FISH mapping of the 5S and 18S–28S rDNA loci in different species of *Glycine*. *Journal of Heredity* 92: 295-300.

KUMAR V, SUBRAMANIAM B (1987) Chromosome atlas of flowering plants of the Indian Subcontinent. In: Dicotyledons. Botanical Survey of India, Kolkata

KUMAR S, BANKS TW, CLOUTIER S (2012) SNP discovery through next-generation sequencing and its applications. *International journal of plant genomics*, v. 2012.

LAVANIA UC, LAVANIA S. (1982) Chromosome banding patterns in some Indian pulses. *Annals of Botany* 49: 235-239.

LAVIN M, WOJCIECHOWSKI MF, GASSON P, HUGHES C AND WHEELER E (2003) Phylogeny of robinoid legumes (Fabaceae) revisited: *Coursetia* and *Gliricidia* recircumscribed, and a biogeographical appraisal of the Caribbean endemics. *Systematic Biology* 28: 387-409.

LAVIN M, HERENDEEN PS , WOJCIECHOWSKI MF (2005) Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Systematic Biology* 54: 575-594.

LYSAK M, FRANSZ P, SCHUBERT I (2006) Cytogenetic analyses of Arabidopsis. *Methods Mol Biol* 323:173–186.

LONARDI S, ZHU T, MUÑOZ-AMATRIAIN M, LIANG Q, WANAMAKER S, OUNIT R, ALHAKAMI H, LUO MC, CLOSE TJ (2017) Assembly of Eleven Pseudomolecules Representing the Cowpea Genome Sequence. *Plant & Animal Genome XXV* P0688.

LUCAS MR, DIOP N-N, WANAMAKER S, EHLERS JD, ROBERTS PA AND CLOSE TJ (2011) Cowpea-soybean synteny clarified through an improved genetic map. *Plant Genome* 4: 218-225.

LUSH WM, AND EVANS LT (1981) The domestication and improvement of cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Euphytica* 30: 579-587.

LUO MC, DEAL KR, AKHUNOV ED, AKHUNOVA AR, ANDRESON OD, ANDERSON JA, BLAKE N, CLEGG MT, COLEMAN-DERR D, CONLEY EJ, CROSSMAN CC, DUBCOSVSKY J, GILL BS, GU YQ, HADAM J, HEO HY, HUO N, LASO G, MA Y, MATTHEWS DE, MCGUIRE PE, MORRELL PL, QUALSET CO, RENFRO J, TABANAO D, TALBERT LE, TIAN C, TOLENO DM, WARBUTON ML, YOY FM, ZHANG W, DVORAK J (2009) Genome comparisons reveal a dominant mechanism of chromosome number reduction in grasses and accelerated genome evolution in Triticeae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 15780-15785.

MARÉCHAL R, MASCHERPA JM AND STAINIER F (1978) Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28: 1-273.

MARÉCHAL, R, MASCHERPA, JM, STAINIER, F (1981) Taxometric study of the *Phaseolus-Vigna* complex and related genera. In: Polhill, RM, Raven, PH (Eds.), *Advances in Legume Systematics*, Vol. 1. RBG, Kew, 329-335.

MAXTED N, MABUZA-DLAMINI P, MOSS H, PADULOSI S, JARVIS A AND GUARINO L (2004) An Ecogeographic Survey: African *Vigna*. In: *Systematic and Ecogeographic Studies of Crop Gene Pools* 10. pp. 1–468. IPGRI, Rome.

MITHEN R (1987) The African gene pool of *Vigna*. I. *V. nervosa* and *V. unguiculata* from Zimbabwe. *Plant Genet. Resour. Newsl.* 70:13–19.

MOSCONE EA, KLEIN F, LAMBROU M, FUCHS J, SCHWEIZER D (1999) Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* 42: 1224-1233.

MUCHERO W, DIOPB NN, BHAT PR, FENTON RD, WANAMAKER S, POTTORFF M, HEARNE S, CISSE N, FATOKUN C, EHLERS JD, et al. (2009) A consensus genetic map of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] and synteny based on EST-derived SNPs. *Agric Sci* 106: (43): 18159-64.

MUÑOZ- AMATRIÁIN M, MIREBRAHIM H, XU P, WANAMAKER SI, LUO M, ALHAKAMI H, ALPERT M, ATOKPLE I, BATIENO BJ, BOUKAR O, BOZDAG S, CISSE N, DRABO I, EHLERS JD, FARMER A, FATOKUN C, GU YQ, GUO YN, HUYNH BL, JACKSON SA, KUSI F, LAWLEY CT, LUCAS MR, MA Y, TIMKO MP, WU J, YOU F, BARKLEY NA, ROBERTS PA, LONARDI S AND CLOSE TJ (2017) Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food security. *The Plant Journal* 89, 1042-1054.

NG NQ AND MARÉCHAL R (1985) Cowpea taxonomy, origin germ plasm. In: Sinch SR, Rachie KO, eds. *Cowpea research, production and utilization*. Cheichecter, John Wiley, p.11-21.

NG NQ AND PADULOSI S (1988) Cowpea genepool distribution and crop improvement. In: eds. Ng NQ, Perrino P, Attere F and Zedan H, *Crop Genetic Resources of Africa 2*: 161-174.

NG NQ AND PADULOSI S (1991) Cowpea gene pool distribution and crop improvement. Pp. 161–174 *in* *Crop Genetic Resources of Africa*, Vol. 2 (N.Q. Ng, P. Perrino, F. Attere and H. Zedan, eds.). IITA, Ibadan, Nigeria.

PADULOSI S, NG NQ (1997) Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: Singh BB, Mohan Raj DR, Dashiell KE, Jackai LEN (eds) *Advances in Cowpea Research*. Copublication Intl Inst Tropical Agric (IITA) and Japan Intl Res Center Agric Sci (JIRCAS). Sayce, Devon, UK, pp. 1-12.

PARIDA, A., RAINA, S. & NARAYAN, R. (1990) Quantitative DNA variation between and within chromosome complements of *Vigna* species (Fabaceae). *Genetica* 82:125-133.

PEDROSA A, SANDAL N, STOUGAARD J, SCHWEIZER D AND BACHMAIR A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661-1672.

PEDROSA-HARAND A AND 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, GEFFROY V, GEPTS P AND SCHWEIZER D (2009) Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. *Chromosome Res* 17: 405-417.

PEREIRA PAA, DE SOUZA CRB (1992) Tipos de Faseolina em raças 'crioulas' de feijão no Brasil. *Pesq Agropec Bras* 28:1219-1221.

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.

PIGNONE D, GATASSO I AND VENORA G (1995) Karyomorphological and heterochromatin similarities among four *Vigna* species *Genetic Resources and Crop Evolution* 42: 57-60.

RAO SR AND RAINA SN (2004) Studies on Male Meiosis in Cultivated and Wild *Vigna* Species. *Plant Biotechnology and Molecular Markers* 331-345.

RAO SM AND CHANDEL KPS (1991) Karyomorphological Studies in the Cultivated and Wild *Vigna* Species in Indian Gene Centre. *Cytologia* 56: 47-57.

RAVEENDAR S, LEE JR, PARK JW, LEE GA, JEON YA, LEE YJ, LEE WH, CHO GT, MA KH, LEE SY, CHUNG JW (2015) Identification of Genus *Vigna* using ITS2 and matK as a Two-Locus DNA Barcode. *Plant Breeding and Biotechnology*. 3: 153-159.

- RASKINA O, BELYAYEV A, NEVO E (2004) Quantum speciation in *Aegilops*: Molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 14818-14823.
- RIBEIRO T, DOS SANTOS KGB, RICHARD MMS, SÉVIGNAC M, THAREAU V, GEFFROY V AND PEDROSA-HARAND (2016) Evolutionary dynamics of satellite DNA repeats from Phaseolus beans. *Protoplasma* 254: 791-801.
- Roa F and Guerra M (2012) Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology* 12: 225-238.
- ROA F AND GUERRA M (2015) Non-Random Distribution of 5S rDNA Sites and Its Association with 45S rDNA in Plant Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 146: 243-9.
- ROCHA LC, BUSTAMANTE FO, SILVEIRA RAD, TORRES GA, MITTELMANN A, TECHIO VH (2015) Functional repetitive sequences and fragile sites in chromosomes of *Lolium perenne* L.. *Protoplasma* 252: 451-460.
- ROCHA LC, SILVA GA, BUSTAMANTE FO, SILVEIRA RAD, TECHIO VH (2017) The dynamics of 45S rDNA sites in the cell cycle: fragile sites and chromosome stability. *Genetics and Molecular Research* 16: 1-9.
- ROSENSWIG R (2015) A Mosaic of Adaptation: The Archaeological Record for Mesoamerica's Archaic Period *Journal of Archaeological Research* 23:115-162.
- SAINI A, REDDY KS AND JAWALI N (2008) Intra-individual and intra-species heterogeneity in nuclear rDNA ITS region of *Vigna* species from subgenus *Ceratotropis*. *Genet Res* 90:299-316.
- SAINI A AND JAWALI N (2009) Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 280:187-206.
- SATO S, ISOBE S AND TABATA S (2010) Structural analyses of the genomes in legumes. *Curr Opin Plant Biol* 13: 1-7.
- SCHLUETER JA, GOICOECHEA JL, COLLURA K GILL N, LIN JY, YU Y, KUDRNA D, ZUCCOLO A, VALLEJOS CE, MUNOZ-TORRES M, et al. (2008) BAC-end sequence analysis and draft physical map of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genome. *Trop Plant Biol* 1:40-48.
- SCHMUTZ J, CANNON J, SCHLUETER J, MA T, MITROS WN, MA J, MITROS T, NELSON W, HYTEN DL, SONG Q, THELEN JJ, CHENG J et al. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.
- SCHMUTZ JM, MCCLEAN PE., MAMIDI S, WU GA, CANNON SB, GRIMWOOD J, JENKINS J, SHU S, SONG Q, CHAVARRO C, et al. (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat Genet* 46: 707-713.

SCHUBERT I, MARTIN AL (2011) Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics* 27:207-216.

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. *Chromosome Today* 10: 33-43.

Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB 2016) Feijão - Análise da Conjuntura Agropecuária. p.13.

SEN NK, BHOWAL JG (1960) Cytotaxonomy studies on *Vigna*. *Cytologia*, 25:195-207.

SHAMURAILATPAM A, MADHAVAN L, YADAV SR, BHAT KV AND RAO SR (2015a) Heterochromatin characterization through differential fluorophore binding pattern in some species of *Vigna* Savi *Protoplasma* 252: 629-635.

SHAMURAILATPAM A, MADHAVAN L, YADAV SR, BHAT KV AND RAO SR (2015b) Heterochromatin distribution and comparative karyo-morphological studies in *Vigna umbellata* Thunberg, 1969 and *V. aconitifolia* Jacquin, 1969 (Fabaceae) accessions *CompCytogen* 9: 119-132.

SHARMA SK, BOLSER D, DE BOER J, SØNDERKÆR M, AMOROS W, CARBONI MF, D'AMBROSIO JM, DE LA CRUZ G, DI GENOVA A, DOUCHES DS, EGUILUZ M, GUO X, GUZMAN F, HACKETT CA, HAMILTON JP, LI G, LI Y, LOZANO R, MAASS A, MARSHALL D, MARTINEZ D, MCLEAN K, MEJÍA N, MILNE L, MUNIVE S, NAGY I, PONCE O, RAMIREZ M, SIMON R, THOMSON SJ, TORRES Y, WAUGH R, ZHANG Z, HUANG S, VISSER RG, BACHEM CW, SAGREDO B, FEINGOLD SE, ORJEDA G, VEILLEUX RE, BONIERBALE M, JACOBS JM, MILBOULRNE D, MARTIN DM, BRYAN GJ (2013) Construction of reference chromosome-scale pseudomolecules for potato: integrating the potato genome with genetic and physical maps. *G3* 3: 2031-47.

SHE CW, JIANG XH, OU LJ, LIU J, LONG KL, ZHANG LH, DUAN WT, ZHAO W AND HU JC (2015) Molecular cytogenetic characterisation and phylogenetic analysis of the seven cultivated *Vigna* species (Fabaceae) *Plant Biology* 17: 268-280.

SINGH M, BARMAN AS 2013. Chromosome breakages associated with 45S ribosomal DNA sequences in spotted snakehead fish *Channa punctatus*. *Molecular Biology Reports* 40: 723-729.

SMARTT J (1979) Interspecific hybridization in the grain legumes: a review. *Econ. Bot.* 33: 329–337.

Smartt J (1981) Genepools in *Phaseolus* and *Vigna* cultigens. *Euphytica* 30:445–449.

SMARTT J (1984) Gene Pools in Grain Legumes<sup>1</sup>. *Economic Botany* 38: 24-35.

SMARTT J. Grain Legumes: Evolution and Genetic Resources Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 151 p.

SONG J, DONG F, JIANG J (2000) Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato molecular cytogenetics research. *Genome*, 43: 199-204.

SOMTA P, KAGA A, TOMOOKA N, KASHIWABA K, ISEMURA T, CHAITIENG B, SRINIVES P AND VAUGHAN DA (2006) Development of an interspecific *Vigna* linkage map between *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi and *V. nakashimae* (Ohwi) Ohwi & Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics *Plant Breeding* 125: 77-84.

STEELE WM (1976) Cowpea, *Vigna unguiculata* (Leguminosae-Papilionatae). In: Simmonds NW (ed) *Evolution of Crop Plants*. Longman, London, pp 183-185.

Teófilo EM, Paiva JB and Filho LM (2001) Polinização artificial em *Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Ciênc Agrotec* 25: 220-223.

THULIN M, LAVIN M, PASQUET R AND DELGADO-SALINAS A (2004) Phylogeny and biogeography of Wajira (Leguminosae): A monophyletic segregate of *Vigna* centered in the Horn of Africa region. *Syst Bot* 29: 903-920.

TIMKO MP AND SINGH BB (2008) Cowpea, a multifunctional legume. In: Moore PH and Ming R (eds), *Genomics of Tropical Crop Plants*, Springer Science Business Media, LLC, New York, pp 227-258.

TOMOOKA N, MAXTED N, THAVARASOOK C AND JAYASURIYA HM (2002). Two new species, sectional designations and new combinations in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* (Piper) Verdc. (Leguminosae, Phaseoleae). *Kew Bull.* 57: 613-624.

TUN YT, YAMAGUCHI H (2007) Phylogenetic relationship of wild and cultivated *Vigna* (Subgenus *Ceratotropis*, Fabaceae) from Myanmar based on sequence variations in non-coding regions of trnT-F. *Breeding Science* 57: 271-280.

VALLEJOS CE, SAKIYAMA NS AND CHASE CD (1992) A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131: 733-740.

VARSHNEY RK, CHEN W, LI Y, BHARTI AK, SAXENA RK AND SCHLUETER JA (2012) Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. *Nat Biotechnol* 30: 83-128.

VARSHNEY RK, SONG C, SAXENA RK, AZAM S, YU S AND SHARPE AG (2013) Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nat Biotechnol* 31: 240-246.

VARSHNEY RK, SAXENA RK, UPADHYAYA HD, KHAN AW, YU Y, KIM C, RATHORE A, KIM D, KIM J, AN S, KUMAR V, ANURADHA G, YAMINI KN, ZHANG W, MUNISWAMY S, KIM JS, PENMETSA RV, VON WETTBERG E, DATTA SK (2017) Whole-genome resequencing of 292 pigeonpea accessions identifies genomic



regions associated with domestication and agronomic traits. *Nat Genet.* 49: 1082-1088.

VASCONCELOS EV, FONSÊCA AFA, PEDROSA-HARAND A, BORTOLETI KCA, BENKO-ISEPPON AM, COSTA AF, BRASILEIRO-VIDAL AC (2015) Intra- and interchromosomal rearrangements between cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by BAC-FISH. *Chromosome Res* 23: 253-66.

VENORA, G AND SACCARDO, E (1993). Mitotic karyotype analysis in the *Vigna* genus by means of an image analyser. *Caryologia*, 46: 139-149.

VENORA G AND PADULOSI S (1997) Karyotypic analysis of wild taxa of *V. unguiculata* (L.) Walpers. *Caryologia* 50: 125-138.

VENORA G, BLANGIFORTI S AND CREMONINI R (1999) Karyotype analysis of twelve species belonging to genus *Vigna*. *Cytologia* 64: 117-127.

VIJAYKUMAR A, SAINI A, JAWALI N (2011) Molecular characterization of intergenic spacer region of 5S ribosomal RNA genes in subgenus *Vigna*: extensive hybridization among *V. unguiculata* subspecies. *Plant Syst Evol*, 294: 39-55.

YANO A, YASUDA K, YAMAGUCHI H (2004) A test for molecular identification of Japanese archaeological beans and phylogenetic relationship of wild and cultivated species of subgenus *Ceratotropis* (Genus *Vigna*, Papilionaceae) using sequence variation in two non-coding regions of the trnL and trnF genes. *Economic Botany* 58:135-S146.

YOUNG ND AND BHARTI AK (2012) Genome-enabled insights into legume biology. *Annu Rev Plant Biol* 63:14.1-14.23.

YU K (2012) Bacterial Artificial Chromosome Libraries of Pulse Crops: Characteristics and Applications. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 8p.

Zheng JY, Nakata M, Uchiyama H, Morikawa H and Tanaka R (1991) Giemsa C-banding patterns in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. *Cytologia* 56: 459-466.

ZHENG, JY, NAKATA M, IRIFUNE K, TANAKA R, AND MORIKAWA H (1993) Fluorescent banding pattern analysis of eight taxa of *Phaseolus* and *Vigna* in relation to their phylogenetic relationships. *Theor. Appl. Genet.* 87: 38-43.

ZHENG J, IRIFUNE K, HIRAI K, NAKATA M, TANAKA R AND MORIKAWA H (1994) *In situ* Hybridization to Metaphase Chromosomes in Six Species of *Phaseolus* and *Vigna* Using Ribosomal DNA as the Probe *J. Plant Res* 107: 365–369.

ZIOLKOWSKI PA, KACZMAREK M, BABULA D, SADOWSKI J (2006) Genome evolution in *Arabidopsis*/Brassica: conservation and divergence of ancient rearranged segments and their breakpoints. *The Plant Journal* 47: 63-74.

**Citação de recursos Internet:**

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Conab 2015), [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_07\\_09\\_16\\_20\\_14\\_conjuntura\\_agropecuaria\\_do\\_feijao\\_-\\_junho\\_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_07_09_16_20_14_conjuntura_agropecuaria_do_feijao_-_junho_2015.pdf) (30 de julho de 2015).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Safra 2016/17 (Conab 2017) [https://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_07\\_12\\_11\\_17\\_01\\_boletim\\_graos\\_julho\\_2017.pdf](https://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_07_12_11_17_01_boletim_graos_julho_2017.pdf) (27 de dezembro de 2017).

DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES (2010). *Mungbean* Production Guideline. Document, Republic of South Africa, Pretoria, Cape Town .Available at: <http://www.nda.agric.za/docs/Brochures/MbeanpGUDELINS.pdf> (27 de dezembro de 2017).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa 2003) <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/doencas.htm> (30 de julho de 2015).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa 2015) <https://www.embrapa.br/meio-norte/cultivos> (30 de julho de 2015).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO 2007) <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=2147> and <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/dataSheet?id=2147> (10 de julho de 2017).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO 2014) <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000088.htm> (23 de dezembro de 2017)

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO 2015) <http://faostat3.fao.org> (30 de julho de 2015).

JOINT GENOME INSTITUTE (DOE JGI 2017) [https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org\\_Vunguiculata\\_er](https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Vunguiculata_er) (10 de janeiro de 2018).

KEW ROYAL BOTANIC GARDENS (Kew 2016) <http://data.kew.org/cvalues/cvalpapers.html> (30 de julho de 2017).

KEW ROYAL BOTANIC GARDENS (Kew 2017) <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:525534-1> (10 de janeiro de 2018).

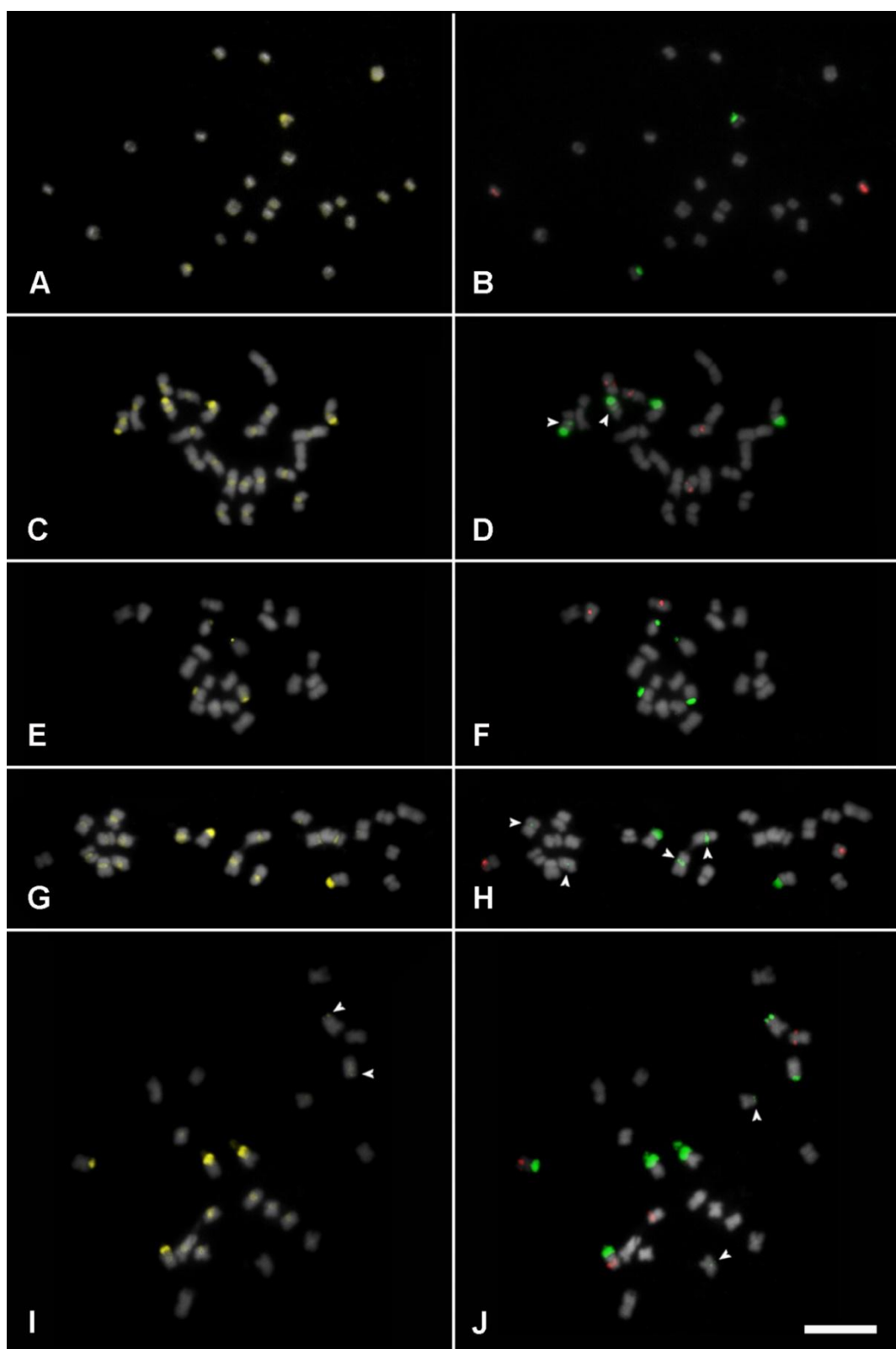
MGSC - Medicago Genome Sequence Consortium (2015) *Medicago truncatula* genome “Mt2.0” release whitepaper. README: prerelease of *Medicago truncatula* genome sequences. Disponível em:[http://tofu.cfans.umn.edu/downloads\\_genome/Mt1/](http://tofu.cfans.umn.edu/downloads_genome/Mt1/) em 30 de julho, de 2015.

MUREVANHEMA YY, Jideani VA (2013) Potential of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) milk as a probiotic beverage-a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 53(9):954-67. United States Department of Agriculture (USDA 2014) [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Pulse%20Annual\\_Beijing\\_China%20-%20Peoples%20Republic%20of\\_12-18-2014.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Pulse%20Annual_Beijing_China%20-%20Peoples%20Republic%20of_12-18-2014.pdf) (23 de fevereiro de 2016).

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA 2015) <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?41595#uses> (30 de julho de 2015)

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA 2015a) <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods?fgcd=&manu=&facet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Stats&new=&measureby=>(30 de julho de 2015).  
United States Department of Agriculture (USDA 2018) [https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg\\_viuns2.pdf](https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_viuns2.pdf) (3 de Janeiro de 2018).

## ANEXO A - FIGURA SUPLEMENTAR 1 DO ARTIGO 1



**Figura S1** – Metáfases mitóticas de *Vigna aconitifolia* (A–B), *V. angularis* (C–D), *V. mungo* (E–F), *V. umbellata* (G–H) e *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (I–J) após coloração com CMA (amarelo)/DAPI (cinza) e hibridizado *in situ* com sondas de DNAr 35S (verde) e 5S (vermelho). Cabeças de seta apontam para os sítios de CMA<sup>+</sup> e DNAr 35S. Barra em J = 5  $\mu$ m.