

PADRÃO DE HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA GC-RICA EM ACESSOS FEIJÃO- FAVA (*Phaseolus lunatus* L.) DO BRASIL E DO MÉXICO

Data de aceite: 01/09/2023

Yago de Oliveira Martins

Laboratório de Citogenética e
Citogenômica Vegetal
Departamento de Biologia, Universidade
Federal do Piauí
Teresina, Piauí, Brasil
<https://lattes.cnpq.br/6400476274227463>

Amanda Ellen Torres Silva

Laboratório de Citogenética e
Citogenômica Vegetal
Departamento de Biologia, Universidade
Federal do Piauí
Teresina, Piauí, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5797854747057247>

Andreza Francisca dos Anjos Sousa

Laboratório de Citogenética e
Citogenômica Vegetal
Departamento de Biologia, Universidade
Federal do Piauí
Teresina, Piauí, Brasil
<https://lattes.cnpq.br/7569631309447240>

Luhara Maria Souza Chaves Silva

Laboratório de Citogenética e
Citogenômica Vegetal
Departamento de Biologia, Universidade
Federal do Piauí
Teresina, Piauí, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2929936678352045>

Thales da Silva

Laboratório de Citogenética e
Citogenômica Vegetal
Departamento de Biologia, Universidade
Federal do Piauí
Teresina, Piauí, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5022701379455428>

Antonio Carlito Bezerra dos Santos

Programa de Pós-graduação em
Biodiversidade – PPGBio
Universidade Federal Rural de
Pernambuco – UFRPE
Recife, Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7518540852200560>

Thaysson Rodrigues Lopes

Mestrado em Biotecnologia, Universidade
Federal do Delta do Parnaíba
Parnaíba, Piauí, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7040059719778493>

Gardene Maria de Sousa

Laboratório de Morfologia e Taxonomia
Vegetal
Departamento de Biologia, Universidade
Federal do Piauí
Teresina, Piauí, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/8500244683205739>

Ana Paula Peron

Departamento Acadêmico de
Biodiversidade e Conservação da

Natureza. Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/3605560420792065>

Regina Lúcia Ferreira Gomes

Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Piauí
Teresina, Piauí, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/6938362260541348>

Ângela Celis de Almeida Lopes

Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Piauí
Teresina, Piauí, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2718756494613870>

Lidiane de Lima Feitoza

Laboratório de Citogenética e Citogenômica Vegetal
Departamento de Biologia, Universidade Federal do Piauí
Teresina, Piauí, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5456816132715008>

RESUMO: O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é a segunda espécie economicamente mais importante do gênero *Phaseolus* e constitui uma ótima fonte de proteína vegetal para diversos países da América, África, além de algumas regiões da Europa e Ásia. No Brasil, o cultivo da fava se configura ainda como uma alternativa de renda para pequenos produtores, especialmente na região Nordeste, que lidera o ranking de produção do país e possui uma diversidade genética tão alta quanto o México, apontado como um dos centros de domesticação da espécie. Os bancos de germoplasma constituem uma eficiente estratégia de conservação de recursos genéticos, pois além de preservar a variabilidade, também disponibilizam o material armazenado para futuras pesquisas botânicas, morfológicas, moleculares, citogenéticas e outras. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar citologicamente 13 acessos de *P. lunatus* do Brasil e do México pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí por meio da técnica de bandeamento com fluorocromos CMA e DAPI, e assim, analisar o padrão de heterocromatina constitutiva GC-rica. Todos os acessos apresentaram cariótipos simétricos, constituídos por 22 cromossomos de tamanho pequeno, variando de 0,84 μm a 3,41 μm , morfologia metacêntrica e submetacêntrica. As fórmulas cariotípicas encontradas foram 11M, 10M + 1SM e 9M + 2SM. O padrão de distribuição da heterocromatina foi do tipo pericentromérico, rico em GC, com blocos de diferentes tamanhos e intensidade, para todos os cromossomos dos cariótipos analisados. Também foi observado um par de bandas terminais CMA⁺ em todos os acessos, correspondendo à região organizadora de nucléolo (RON). Não foram identificadas bandas ricas em AT. O padrão de marcação com CMA gerou quatro fórmulas citológicas quanto ao número e composição por GC das bandas: 22CMA⁺/DAPI (MEX PL 2, MEX PL 3, MEX PL 5 e UFPI 925), 22CMA⁺/DAPI (UFPI 902 e UFPI 1022), 2CMA⁺/DAPI /20CMA⁺/DAPI (UFPI 999, UFPI 1113 e UFPI 1247) e 2CMA⁺/DAPI /20CMA/DAPI (UFPI 929, UFPI 1218 e UFPI 1250). Os acessos apresentaram quantidades de heterocromatina que

variaram de 17,33% a 38,82%, cujo valor médio encontrado foi de 25,38%. A dupla coloração com fluorocromos CMA e DAPI em associação com a quantificação da HC, permitiram uma boa análise a respeito do padrão de heterocromatina encontrado nos acessos de feijão-fava e da fração que este tipo de cromatina representa no cariótipo da espécie. Os dados gerados a partir deste trabalho enfatizaram a estabilidade cariotípica do gênero *Phaseolus* e contribuíram para uma melhor caracterização do germoplasma de *P. lunatus* disponível no BAG-UFPI.

PALAVRAS-CHAVE: feijão-fava, heterocromatina constitutiva, bandeamento com fluorocromos.

PATTERN OF CONSTITUTIVE HETEROCHROMATIN GC_RICH IN FAVA BEAN ACCESSIONS (*Phaseolus lunatus* L.) FROM BRAZIL AND MEXICO

ABSTRACT: Lima bean (*Phaseolus lunatus* L) is the second most economically important species of the genus and a great source of plant protein for several countries in America, Africa, as well as some regions in Europe and Asia. In Brazil, the cultivation of lima beans is still an alternative income for small producers, especially in the Northeast, which leads the country's production ranking and has a genetic diversity as high as Mexico, pointed as a center of domestication of species. In this context, germplasm banks are an efficient conservation strategy because, in addition to preserving variability, they also make stored germplasm available for future scientific research. Thus, the present work aimed to cytogenetically characterize 13 *P. lunatus* accessions from the Germplasm Active Bank of the Federal University of Piauí by means of the CMA and DAPI fluorochrome banding technique, and thus to analyze the constitutive heterochromatin pattern. All accessions presented symmetrical karyotypes, consisting of 22 small chromosomes, ranging from 0.84 μm to 3.41 μm , metacentric and subcentric morphology. The karyotypic formulas found were 11M, 10M + 1SM and 9M + 2SM. The distribution pattern of heterochromatin was GC-rich pericentromeric with blocks of different sizes and intensity for all karyotype chromosomes analyzed. A pair of CMA⁺ terminal bands were also observed in all accessions, corresponding to the nucleus organizer region (RON). No AT-rich bands identified. The CMA labeling pattern generated four cytological formulas for the number and GC composition of the bands: 22CMA⁺⁺/DAPI⁻ (MEX PL 2, MEX PL 3, MEX PL 5 and UFPI 925), 22CMA⁺/DAPI⁻ (UFPI 902 and UFPI 1022), 2CMA⁺⁺/DAPI⁻/20CMA⁺/DAPI⁻ (UFPI 999, UFPI 1113 and UFPI 1247) and 2CMA⁺/DAPI⁻/20CMA/DAPI⁻ (UFPI 929, UFPI 1218 and UFPI 1250). The accessions presented amounts of heterochromatin ranging from 17.33% to 38.82%, whose average value was 25.38%. The double coloration with fluorochromes CMA and DAPI in association with the quantification of HC, allowed a good analysis regarding the heterochromatin pattern found in lima bean accessions and the fraction that this type of chromatin represents in the karyotype of the species. The data generated from this work reinforced the karyotype stability of the genus *Phaseolus* and contributed to a better characterization of *P. lunatus* germplasm available in BAG-UFPI.

KEYWORDS: fava beans, constitutive heterochromatin, fluorochrome banding.

1 | INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), também conhecido como fava, feijão-de-lima ou fava-de-lima, é uma das quatro espécies do gênero explorada comercialmente, que ocupa o segundo lugar em consumo entre as espécies cultivadas do gênero, depois do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). É uma espécie de origem neotropical, considerada como cultura de subsistência nos trópicos úmidos da América (MAYOR et al., 2009), constituindo uma importante fonte de proteína para as populações rurais do Sul da América e África (LIOI et al., 1998). Essa leguminosa fornece em média 1,3% de gordura, 4% de cinza, 22% de proteínas, apresentando bom valor biológico, alto conteúdo de lisina e alta digestibilidade (GRANITO et al., 2007).

Aspectos como maior tolerância à seca e ao calor dão uma importância econômica e social mais significativa ao feijão-fava e permite uma maior exploração por parte da agricultura familiar, que se utiliza de técnicas rudimentares para o cultivo (FRANÇA et al., 2018). No Brasil, a região Nordeste destaca-se como a maior produtora de fava do país e foi responsável por aproximadamente 92,5% de toda a produção no ano de 2017. No México, na Península de Yucatán, o feijão-fava é a quarta principal cultura, sendo plantado no sistema agrícola tradicional mesoamericano conhecido como “milpa” (MARTINEZ-CASTILLO et al., 2008).

Estudos demonstram que o feijão-fava, assim como o feijão-comum (*P. vulgaris* L.) apresenta bastante diversidade e que passou por pelo menos dois eventos de domesticações independentes: um na Mesoamérica e outro nos Andes (BITOCCHI et al., 2018). A princípio, os estudos consideravam apenas dois *pools* gênicos para *P. lunatus*, denominados Mesoamericano e Andino, ambos contendo representantes selvagens e domesticados (GUTIÉRREZ et al., 1995; MOTTA-ALDANA et al., 2010). Entretanto, trabalhos posteriores relatam a ocorrência de outros subgrupos dentro de cada *pool* gênico, principalmente do mesoamericano, que inclui o México, apontado como um centro de diversidade, assim como o Brasil (ANDUEZA-NOH et al., 2013; MARTÍNEZ-CASTILLHO et al., 2014).

Várias tentativas a nível mundial e nacional foram despendidas no sentido de reunir, avaliar e manter coleções de fava, visando assegurar a conservação da sua variabilidade genética. Órgãos como CIAT, IITA, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí (UFPI) entre outros, mantêm vastas coleções. Contudo, segundo Baudoin (1988), a situação da coleção de feijão-fava é crítica, pois há muito germoplasma a ser coletado. Esse autor alertou também para o risco de perda de germoplasma principalmente no centro primário de diversidade, que está situado na América Latina.

Os bancos de germoplasma constituem uma estratégia de conservação importante, uma vez que preservam a variabilidade genética existente nas espécies sob condições controladas e as disponibilizam para futuros estudos. Entretanto, para que os recursos

ali conservados possam ser efetivamente utilizados, é preciso que haja um conhecimento a respeito dos seus potenciais. Para isso, é necessário análises morfológica, botânica, citogenética, molecular, bioquímica ou morfoagronômica.

A citogenética é considerada uma ferramenta fundamental na caracterização dos recursos genéticos vegetais (MARTINS et al., 2021; ALMEIDA et al., 2022) e tem grande importância nos estudos onde se avalia as relações evolutivas entre as espécies (PAULA et al., 2020; IBIAPINO et al., 2022a; 2022b; COSTA et al., 2023). As abordagens citogenéticas envolvendo o número, morfologia, tamanho dos cromossomos, bem como presença de constrição secundária e quantidade de heterocromatina no cariótipo são dados importantes para a compreensão do processo de evolução nas plantas (RITO et al., 2021; GUERRA, 2000; MATA-SUCRE et al., 2020; CORDEIRO et al., 2022). Os primeiros relatos sobre contagem cromossômica no gênero *Phaseolus* remontam a 1925, quando Karpetschenko obteve o cariótipo $2n = 22$ para as espécies *P. acutifolius* A. Gray, *P. coccineus* L., *P. vulgaris* L. e *P. lunatus* L. A partir de então, diversos trabalhos citogenéticos foram realizados com ênfase na determinação dos números cromossômicos e estabeleceram $n=11$ como sendo o número básico, com exceção de três espécies que apresentaram um cariótipo $n=10$, sugerindo a ocorrência de aneuploidias, além de inversões e translocações que alteraram a posição do centrômero nas espécies analisadas (MERCADO-RUARO; DELGADO-SALINAS, 2000).

Dessa forma, devido ao valor socioeconômico que o feijão-fava apresenta para o Brasil e México, que são grandes centros de diversidade da espécie, o presente trabalho teve como objetivo analisar citogeneticamente 13 acessos de *P. lunatus* provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí, oriundos da região Nordeste do Brasil e do México. A análise foi realizada por meio da técnica de bandeamento com os fluorocromos cromomicina A_3 (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), com o objetivo de caracterizar o padrão de heterocromatina constitutiva nos cariótipos e identificar possíveis variações citológicas entre eles importantes para o melhoramento genético da espécie.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção dos acessos

Para a realização deste trabalho, foram caracterizados por meio da técnica de bandeamento com fluorocromos CMA/DAPI, 13 acessos *P. lunatus* L. oriundos do nordeste do Brasil e da Península de Yucatán – México, armazenados e disponibilizados pelo Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí, conforme estão representados na Tabela 1. Ambos os locais são relatados na literatura como tendo um alto índice de diversidade genética.

Identificação do acesso	Nome vulgar	Procedência
MEX PL 2	–	Península de Yucatán - México
MEX PL 3	–	Península de Yucatán - México
MEX PL 5	–	Península de Yucatán - México
UFPI 902	Fava-feijão	Areia – PB
UFPI 930	–	Maceió – AL
UFPI 925	–	Maceió – AL
UFPI 929	–	Surumbi – PE
UFPI 999	–	Passira – PE
UFPI 1022	Fava-roxinha	Areia – PB
UFPI 1113	Fava-branca	Bom Jesus das Selvas - MA
UFPI 1218	Fava-branca	Colinas – MA
UFPI 1247	Chumbinho	Miguel Alves – PI
UFPI 1250	Fava-branca	São Benedito – CE

Tabela 1 – Identificação dos 13 acessos de *P. lunatus* L. utilizados.

2.2 Preparo das raízes e bandeamento com fluorocromos CMA e DAPI

Após atingirem o tamanho ideal, as raízes foram coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002M) por 18 horas à 10°C. Em seguida, foram fixadas em solução Carnoy (etanol absoluto e ácido acético glacial na proporção 3:1) durante 24 horas à temperatura ambiente.

As lâminas foram feitas de acordo com o protocolo de Carvalho & Saraiva (1993), com algumas modificações. As raízes, antes estocadas no fixador, foram submetidas a duas lavagens com água destilada. Em seguida, a região meristemática foi destacada do restante da raiz e tratada com 10 µL de solução enzimática celulase 2% (Onozuka) pectinase 20% (Sigma) durante uma hora e meia em uma estufa a 37°C.

A coloração com fluorocromos seguiu o protocolo usado em Almeida et al., 2022. A pré-seleção foi feita utilizando 10 µL de DAPI (0,2mg/mL), e as melhores lâminas foram descoradas e deixadas à temperatura ambiente por 3 dias. Para a coloração definitiva, as lâminas foram coradas com 10 µL de CMA (0,1mg/mL) e mantidas em uma caixa escura por uma hora. Em seguida, foram retiradas as lamínulas com água destilada e as lâminas foram secas com uma bomba de ar. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de DAPI (0,2mg/mL) durante meia hora e, em seguida, as lâminas foram, lavadas, secas e montadas com tampão McIlvaine- glicerol (1:1 v/v).

2.3 Fotodocumentação e Morfometria

Os resultados obtidos foram fotografados por uma câmera digital Leica DF7000GT acoplada ao microscópio de epifluorescência Leica DM4B, no Departamento de Biologia da UFPI. As imagens obtidas foram editadas apenas quanto ao brilho e contraste com o apoio

do programa *Adobe Photoshop CC 2018*.

Para a morfometria, foram mensuradas cinco metáfases de cada acesso utilizando o programa *Micromeasure 3.5*. O tamanho dos blocos de heterocromatina constitutiva também foi calculado usando o programa *Micromeasure3.5*. Para identificar a porcentagem presente em cada acesso, foi comparado o tamanho total dos blocos heterocromáticos ao tamanho total do conjunto cromossômico. Os idiogramas evidenciando a distribuição dos blocos de HC foram feitos por meio do programa *Corel DRAW 2017*.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de bandeamento usando os fluorocromos CMA e DAPI possibilitou uma análise detalhada a respeito do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva nos 13 acessos de *Phaseolus lunatus* L. utilizados neste trabalho. Foi possível também inferir a respeito dos dados cariotípicos básicos, como número, morfologia e tamanho dos cromossomos (Tabela 2; Figuras 1 e 2).

Todos os acessos analisados apresentaram cariótipos compostos por 22 cromossomos, predominantemente metacêntricos (M), sendo observada a presença de, no máximo, dois pares submetacêntricos (SM) em alguns acessos. Dessa forma, as três fórmulas cariotípicas encontradas foram: 11M (MEX PL 3, MEX PL 5, UFPI 902, UFPI 925, UFPI 929, UFPI 930, UFPI 1218, UFPI 1247 e UFPI 1250), 10M + 1SM (MEX PL 2, UFPI 999 e UFPI 1022) e 9M + 2SM (UFPI 1113). Diversos trabalhos realizados com espécies do gênero *Phaseolus*, incluindo *P. lunatus* L., confirmam o número cromossômico básico ($x=11$) e a morfologia simétrica com predominância de metacêntricos e submetacêntricos (DELGADO-SALINAS 1998, 2000, 2009; MOSCONE et al., 1999; BONIFÁCIO et al., 2012). Análise citológica realizada por Sarbhoy (1980) em quatro espécies cultivadas já constatava um número de até cinco pares de cromossomos submetacêntricos para *P. lunatus* L., mostrando que as fórmulas 10M + 1M e 9M + 2SM se encontram dentro dos padrões já descritos. Moscone et al. (1999) também analisou o cariótipo dessas mesmas quatro espécies e descreveu, para *P. lunatus* L., um cariótipo composto apenas de cromossomos metacêntricos, o que dá suporte às informações cariotípicas dos 10 acessos que apresentaram fórmula 11M.

As mensurações cromossômicas mostraram um intervalo de tamanho variando de $0,84\mu\text{m}$ (UFPI 902) a $3,41\mu\text{m}$ (MEX PL 3). Entretanto, o intervalo mais significativo, considerando os acessos individualmente, foi observado no acesso MEX PL 5, com uma diferença de tamanho de $2,09\mu\text{m}$ entre o maior e o menor cromossomo. O tamanho pequeno dos cromossomos das espécies do gênero *Phaseolus* tem sido relatado desde os primeiros estudos utilizando coloração convencional. Para *P. lunatus* L., Sarboy (1977) chegou a relatar um comprimento de $2,40\mu\text{m}$ para o maior cromossomo da espécie, e um tamanho de até $3,00\mu\text{m}$ para uma determinada variedade de *P. vulgaris* L.. Mercado-Ruaro

e Delgado-Salinas (2009) realizaram uma análise cariotípica em seis espécies do gênero e encontraram uma variação de tamanho dos cromossomos de 0,70 a 2,36 μm entre as espécies.

Análises morfométricas e numéricas de cromossomos são uma maneira de indicar possíveis alterações cariotípicas que ocorreram ao longo do percurso evolutivo, bem como os processos que levaram à diversificação de espécies (GAO et al., 2012). O gênero *Phaseolus* é conhecido por apresentar uma alta estabilidade cariotípica representada por cariótipos $2n=22$, com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos de tamanho pequeno para todas as espécies (MERCADO-RUARO; DELGADO-SALINAS, 2000; 2009; ALMEIDA; PEDROSA-HARAND, 2013).

A dupla coloração com fluorocromos CMA e DAPI permitiu uma boa análise da localização cromossômica da heterocromatina constitutiva encontrada nos acessos utilizados nesta pesquisa. Para todos os cariótipos, o padrão de distribuição da HC (heterocromatina) foi pericentromérico, rico em GC, com bandas de diferentes tamanhos e intensidade. Também foram observadas bandas localizadas na região terminal de pelo menos um par de cromossomos, ligeiramente distendidas e com coloração quase sempre mais forte que as bandas pericentroméricas, indicando uma composição altamente rica em GC. Não foram encontradas bandas de heterocromatina ricas em AT (Figuras 1 e 2).

A marcação com o fluorocromo CMA_3 não foi uniforme em brilho e intensidade em todos os acessos. Dessa maneira, foram geradas diferentes categorias citológicas, de acordo com a intensidade do sinal emitido pelas bandas: $\text{CMA}^{++}/\text{DAPI}^-$, para bandas altamente ricas em GC; $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, para bandas de HC moderadamente ricas em GC e CMA/DAPI^- para bandas que apresentaram pouca GC, ambas reduzidas para AT. Em todos os acessos estudados, as bandas terminais apresentaram marcação $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ ou $\text{CMA}^{++}/\text{DAPI}^-$, mostrando a alta quantidade de GC em sua composição, e paralelamente, uma quantidade de AT reduzida. Baseado nas categorias citadas acima, foram geradas as seguintes fórmulas referentes ao número e composição das bandas: $22\text{CMA}^{++}/\text{DAPI}^-$ (MEX PL 2, MEX PL 3, MEX PL5 e UFPI 925), $2\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ e $20\text{CMA}/\text{DAPI}^-$ (UFPI 999, UFPI 1113 e UFPI 1247), $22\text{CMA}^+\text{DAPI}^-$ (UFPI 902 e UFPI 1022) e $2\text{CMA}^+\text{DAPI}^-$ e $20\text{CMA}/\text{DAPI}^-$ (UFPI 929, UFPI 930, UFPI 1218 e UFPI 1250).

Acesso	2n	ITC (μm)	r (μm)	FC	CTC (μm)	CMC (μm)	CTLH (μm)
MEX PL 2	22	1,25 – 2,50	1,21	10M + 1SM	38,87	1,76	19,44
MEX PL 3	22	1,33 – 3,41	1,22	11SM	44,35	2,01	22,18
MEX PL 5	22	1,12 – 3,21	1,27	11M	45,06	2,04	22,53
UFPI 902	22	0,84 – 2,28	1,28	11M	31,10	1,41	15,55
UFPI 925	22	1,18 – 2,26	1,27	11M	34,64	1,53	16,90
UFPI 929	22	1,25 – 2,62	1,22	11M	38,00	1,72	19,00
UFPI 930	22	1,14 – 2,29	1,26	11M	34,74	1,55	17,05
UFPI 999	22	0,95 – 2,95	1,35	10M + 1SM	36,29	1,67	18,46
UFPI 1022	22	1,24 – 2,23	1,26	10M + 1SM	35,18	1,59	17,54
UFPI 1113	22	1,30 – 2,90	1,27	9M + 2SM	41,01	1,94	21,38
UFPI 1218	22	1,19 – 2,31	1,17	11M	37,72	1,71	18,86
UFPI 1247	22	1,42 – 2,46	1,22	11M	40,47	1,83	20,24
UFPI 1250	22	1,20 – 2,11	1,24	11M	36,20	1,63	18,01

Tabela 2. Número cromossômico diploide (2n), intervalo do tamanho cromossômico (ITC), média da razão entre os braços (r), fórmula cariotípica (FM), comprimento total cromossômico (CTC), comprimento médio cromossômico (CMC), comprimento total do lote haploide (CTLH).

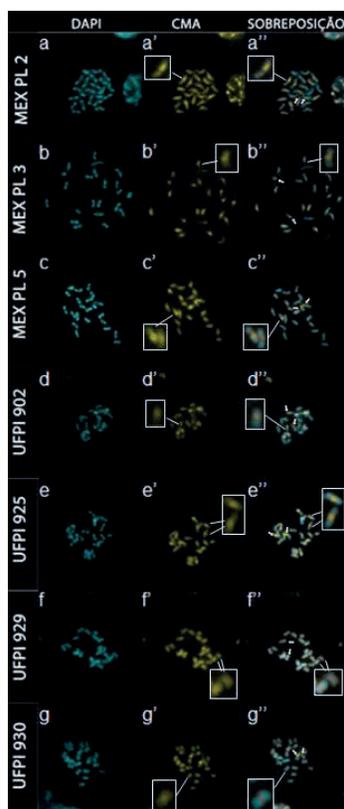


Figura 1. Bandeamento cromossômico com fluorocromos CMA/DAPI em acessos de *Phaseolus lunatus* L. do Banco Ativo de Germoplasma de *Phaseolus* da UFPI. Insertos evidenciam bandas pericentroméricas ricas em GC. Setas indicam par de bandas terminais que equivalem as RONS.

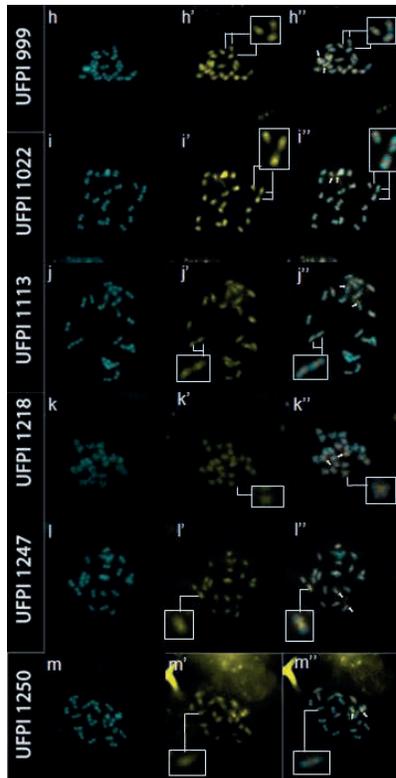
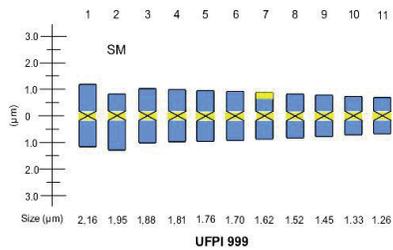
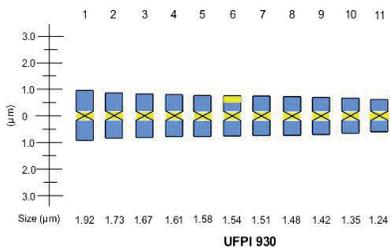
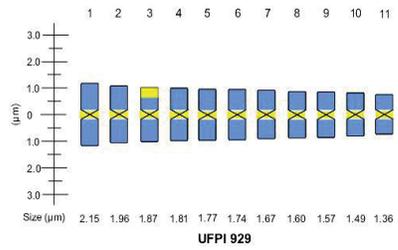
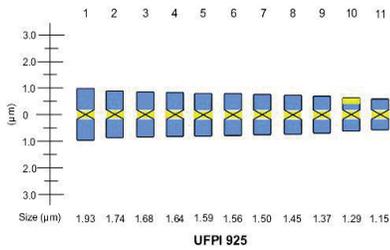
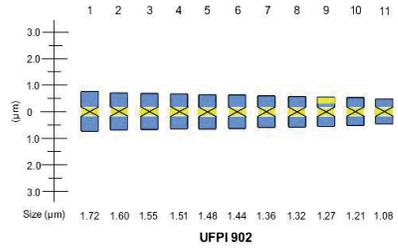
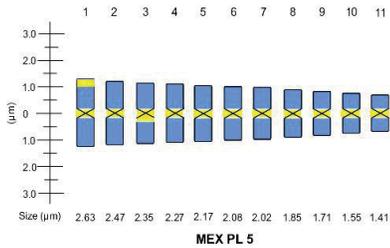
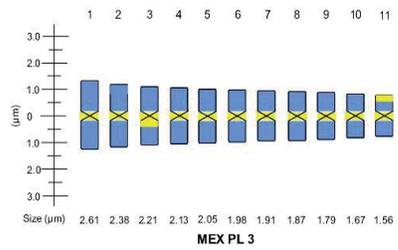
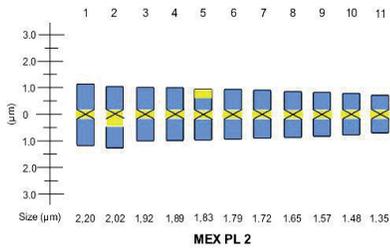


Figura 2. Bandejamento cromossômico com fluorocromos CMA/DAPI em acessos de *Phaseolus lunatus* L. do Banco Ativo de Germoplasma de Phaseolus da UFPI. Insetos evidenciam bandas pericentroméricas ricas em GC. Setas indicam par de bandas terminais equivalentes às RONS.

Para uma maior clareza quanto à morfologia e tamanho dos cromossomos, bem como da distribuição das bandas de HC, encontra-se representado na forma de idiogramas o conjunto haploide dos acessos analisados (Figura 3).



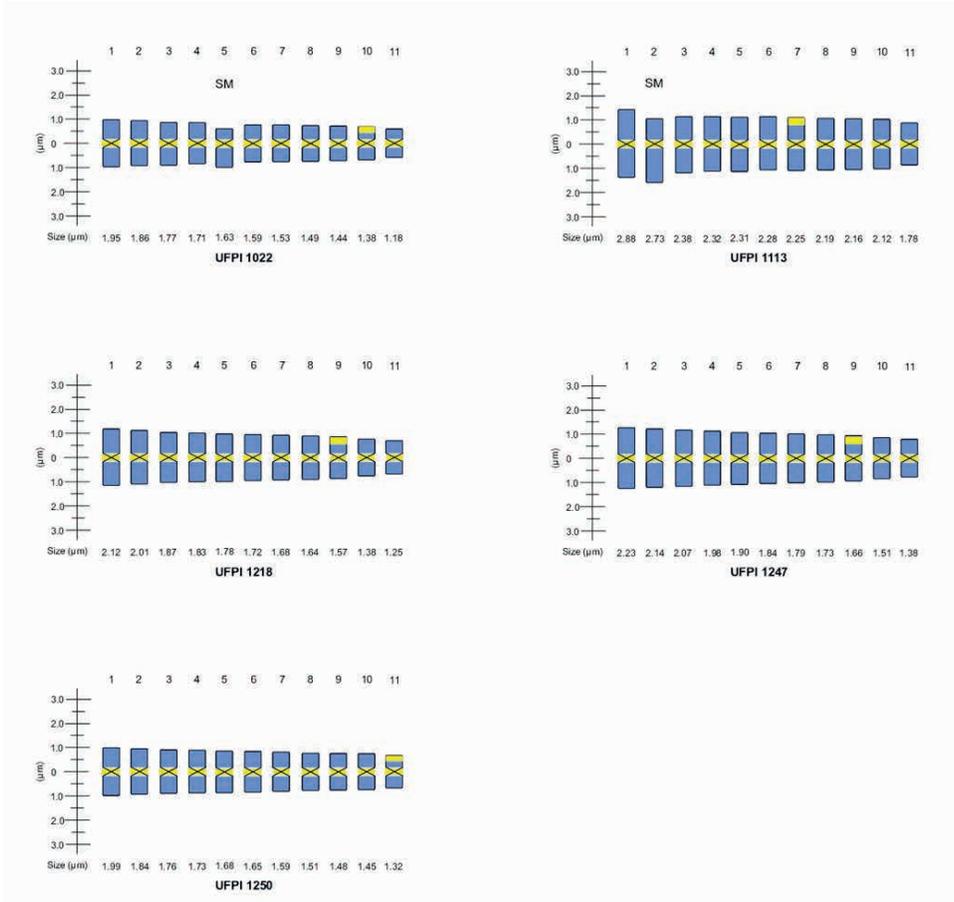


Figura 3 - Idiogramas representando os cromossomos dos acessos de *Phaseolus lunatus* L. analisados em número, tamanho, morfologia e padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Em amarelo, bandas heterocromática pericentroméricas e terminais (RONs), ricas em GC. SM= cromossomo submetacêntrico.

Figura 3... cont. Idiogramas representando os cromossomos dos acessos de *Phaseolus lunatus* L. analisados em número, tamanho, morfologia e padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Em amarelo, bandas heterocromática pericentroméricas e terminais (RONs), ricas em GC. SM= cromossomo submetacêntrico.

Foi realizada também a quantificação da heterocromatina constitutiva como uma maneira de complementar os dados até aqui apresentados, permitindo uma melhor compreensão da fração que este tipo de cromatina ocupa no genoma de *P. lunatus* (Tabela 3).

Acesso	Número de bandas CMA/DAPI	Heterocromatina (%)
MEX PL 2	22CMA ⁺⁺ /DAPI ⁻	38,82
MEX PL 3	22CMA ⁺⁺ /DAPI ⁻	21,57
MEX PL 5	22CMA ⁺⁺ /DAPI ⁻	28,57
UFPI 902	22CMA ⁺ /DAPI ⁻	29,04
UFPI 925	22CMA ⁺⁺ /DAPI	33,16
UFPI 929	2CMA ⁺ /DAPI ⁻ e 20CMA/DAPI ⁻	19,26
UFPI 930	2CMA ⁺ /DAPI ⁻ e 20CMA/DAPI ⁻	21,67
UFPI 999	2CMA ⁺⁺ /DAPI e 20CMA ⁺ /DAPI ⁻	26,07
UFPI 1022	22CMA ⁺ /DAPI ⁻	17,33
UFPI 1113	2CMA ⁺⁺ /DAPI e 20CMA ⁺ /DAPI ⁻	24,89
UFPI 1218	2CMA ⁺ /DAPI ⁻ e 20CMA/DAPI ⁻	22,56
UFPI 1247	2CMA ⁺⁺ /DAPI e 20CMA ⁺ /DAPI ⁻	24,26
UFPI 1250	2CMA ⁺ /DAPI ⁻ e 20CMA/DAPI ⁻	22,56

Tabela 3 - Número de bandas CMA/DAPI e percentual de heterocromatina observada nos acessos de *Phaseolus lunatus* L. do BAG de Feijão-fava da UFPI.

Medeiros (2017) analisou citologicamente 21 acessos de feijão-fava do BAG de Phaseolus da UFPI, provenientes da região Nordeste, por meio da dupla coloração com fluorocromos CMA e DAPI. Além de confirmar o padrão de distribuição já citado, todas as fórmulas relacionadas a quantidade de bandas CMA/DAPI observadas neste trabalho também foram relatadas em sua análise, sendo verificada a presença de mais uma banda (22CMA/DAPI⁻) que não foi encontrado nos acessos aqui utilizados. Além disso, todas as regiões terminais observadas apresentaram pelo menos uma marcação positiva para CMA (CMA⁺). Tais informações são semelhantes às encontradas neste trabalho, inclusive na variação das categorias citológicas geradas.

Em relação à porcentagem de heterocromatina observada, o maior valor foi encontrado corresponde a 38,82% (MEX PL 2), enquanto o menor equivale a 17,33% (UFPI 1022). A média encontrada entre os acessos foi equivalente a 25,38%. Dessa forma, cinco acessos (MEX PL 2, MEX PL 5, UFPI 902, UFPI 925 e UFPI 999) mostraram um valor ligeiramente acima da média calculada neste trabalho, enquanto os oito demais acessos mantiveram a quantidade de HC abaixo da média. Ao relacionar a porcentagem de heterocromatina encontrada com as fórmulas citológicas descritas, é possível observar que, dos 5 acessos que apresentaram um maior percentual de HC, 3 deles (MEX PL 2, MEX PL 5 e UFPI 925) se enquadram na categoria 22CMA⁺⁺/DAPI⁻ indicando além de uma grande quantidade de heterocromatina, uma composição altamente rica em GC.

Andrade (2018) também quantificou a heterocromatina constitutiva em 24 acessos nordestinos de fava do BAG da UFPI e observou uma média de 28,81%, similar à relatada neste trabalho. Valores acima de 30% foram relatados em 8 acessos, sendo observado até 38,77% de heterocromatina em um dos acessos, quantidade semelhante à encontrada no

acesso MEX PL 2 (38,82%) nesta análise.

Espécies do gênero *Phaseolus* apresentam um conteúdo de DNA relativamente baixo comparado à proporção de HC observada (BENNETT; LEITCH, 2012; FEITOZA et al., 2017). A quantidade de heterocromatina constitutiva encontrada nos acessos foi maior do que a relatada por trabalhos como o de Moscone et al. (1999), cujo conteúdo heterocromático foi de 10% para *Phaseolus lunatus* L. Zheng et al. (1991) relataram um valor de até 30,9% de HC para *P. coccineus* e 36,9% para uma espécie do gênero *Vigna*.

Fonsêca et al (2010) construíram um mapa citogenético para *P. vulgaris* e também quantificaram a heterocromatina pela mesma metodologia utilizada neste trabalho. Os autores relataram que quase metade do seu genoma (48%) equivale à heterocromatina, sendo 34% referente às bandas pericentroméricas, podendo justificar o maior valor relatado neste trabalho (38,82%), uma vez que o mesmo método de quantificação foi usado e que as espécies são proximamente relacionadas.

Segundo Guerra (2000), não há um único padrão característico de HC para todas as angiospermas e seu significado funcional pode ser diferente entre as espécies. Tanto a heterocromatina quanto a eucromatina podem sofrer alterações em períodos relativamente curtos. Até mesmo dentro de uma espécie, é possível a ocorrência de polimorfismos relacionados ao número e comprimento das bandas e, assim, variar a quantidade de heterocromatina (SUMNER, 1990).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B.M. et al. **Karyotype polymorphism of GC- rich constitutive heterochromatin in *Capsicum L.* pepper accessions.** Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 22, n. 1, e38642113, 2022.

ALMEIDA, C.; PEDROSA-HARAND, A. **High macro-collinearity between lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.) as revealed by comparative cytogenetic mapping.** Theoretical and Applied Genetics, v. 126, p. 1909–1916, 2013.

ANDRADE, T. E. G. **Caracterização citogenética e predição de cruzamentos intraespecíficos em acessos superiores de *Phaseolus lunatus* L.** 74p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

ANDUEZA-NOH, R. H et al. **Multiple domestications of the Mesoamerican gene pool of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.): evidence from chloroplast DNA sequences.** Genetic Resources and Crop Evolution, v.60, p.1069–1086, 2013.

BENNETT, MD; LEITCH IJ; **Banco de dados de valores C de DNA vegetal.** <http://data.kew.org/cvalues>. 2012.

BITOCCHI, E. et al. **Beans (*Phaseolus* spp.) as a model for understanding crop evolution.** Frontiers in Plant Science, v.8, p.1-21, 2018.

BONIFÁCIO, E. M.; FONSÊCA, A.; ALMEIDA, C.; DOS SANTOS, K.G.B.; PEDROSA-HARAND, A. **Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.)**. Theoretical and Applied Genetics, v.124, p.1513–1520, 2012.

CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. **An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration**. Biotechnic & Histochemistry, Los Angeles, n. 68, p.142-145, 1993.

CORDEIRO, J.M.P et al. **Chromosome number, heterochromatin, and genome size support recent polyploid origin of the *Epidendrum nocturnum* group and reveal a new species (Laeliinae, Orchidaceae)**. Botany, v. 1, p. 409-421, 2022.

COSTA, L; MARQUES, A; BUDDENHAGEN, C.E.; PEDROSA-HARAND, A; SOUZA, G. **Investigating the diversification of holocentromeric satDNA in (Cyperaceae)**. Annals of Botany, v. 01, p. 01-10, 2023.

FONSÊCA, A. et al. **Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. L.)**. Chromosome Research, v. 18, p. 487–502, 2010.

FRANÇA, S.M; SILVA, P.R.R; GOMES-NETO, A.V; GOMES, R.L.F; MELO, J. W.S. **Resistance of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) to the red spider mite *tetranychusneo caledonicus* (Acari: Tetranychidae)**. Frontiers in Plant Science, v. 9, p.1-8, 2018.

GRANITO, M.; BRITO, Y.; TORRES, A. **Chemical composition, antioxidant capacity and functionality of raw and processed *Phaseolus lunatus***. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.87, p.2801-2809, 2007.

GUERRA, M. **Patterns of heterochromatin in plant chromosomes**. Genetics and Molecular Biology, v.23, n.4, p.1029-1041, 2000.

GUTIÉRREZ-SALGADO A, GEPTS P and DEBOUCK DG. **Evidence for two gene pools of the lima bean, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas**. Genet. Resour. Crop Ev., v.42, p.15-28, 1995.

IBIAPINO, A. et al. **Karyotype asymmetry in *Cuscuta* L. subgenus pachystigma reflects its repeat DNA composition**. Chromosome Research v.1, p.1, 2022.

IBIAPINO, A. et al. **The evolution of cytogenetic traits in *Cuscuta* (Convolvulaceae), the genus with the most diverse chromosomes in Angiosperms**. Frontiers in Plant Science, v.13, p. 842260, 2022.

LIOI, L., LOTTI, C., GALASSO, I. **Isozyme diversity, RFLP of the rDNA and phylogenetic affinities among cultivated Lima beans, *Phaseolus lunatus* L. (Fabaceae)**. Plant Systematics and Evolution, v.213, p.153–164, 1998.

MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; CAMACHO-PÉREZ, L.; VILLANUEVA-VIRAMONTES, S.; ANDUEZA-NOH, R. H.; CHACON-SÁNCHEZ, M. I. **Genetic structure with in the Mesoamerican gene pool of wild *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) from Mexico as revealed by microsatellite markers: implications for conservation and the domestication of the species**. American journal of Botany, v.101, p.851-864, 2014.

MAYOR, Z. F.; FERNÁNDEZ, L.; LEÓN, N. **Contribution of the traditional methods of conservation and management of in situ maize (*Zeamays* L.) and beans (*Phaseolus* sp.) variability to food security of farmers families in Cuba.** FAO: Food and Agriculture Organization of the UN. Bary, Italy, 2009. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/ag/agp/planttreaty/gb4/bari/Zoila_Fundora.pdf.

MARTINS, L.V et al. **BAC- and oligo-FISH mapping reveals chromosome evolution among *Vigna angularis*, *V. unguiculata*, and *Phaseolus vulgaris*.** Chromosoma, v130(2-3), p.133-147, 2021.

MATA-SUCRE, Y; COSTA, L; GAGNON, E; LEWIS, GWILYM P.; LEITCH, ILIA J.; SOUZA, G. **Revisiting the cytomolecular evolution of the *Caesalpinia* group (Leguminosae): a broad sampling reveals new correlations between cytogenetic and environmental variables.** Plant systematics and evolution, v. 1, p. 1, 2020.

MEDEIROS, E. C. N. **Caracterização citogenética e morfológica de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) do Banco de Germoplasma da UFPI.** 64p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

MERCADO-RUARO, P.; DELGADO-SALINAS, A. **Cytogenetics studies in *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae).** Genetics and Molecular Biology, v. 23, p. 985-987, 2000.

MERCADO-RUARO, P.; DELGADO-SALINAS, A. **Karyotypic analysis in six species of *Phaseolus* L. (Fabaceae).** Caryologia, v. 62, n. 3, p. 167-170, 2009.

MOSCONE, E. A.; KLEIN, F.; LAMBROU, M.; FUCHS, J.; SCHWEIZER, D. **Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae).** Genome, v. 42, n. 6, p. 1224-1233, 1999.

MOTTA-ALDANA, J. R.; SERRANO-SERRANO, M. L.; HERNÁNDEZ-TORRES, J.; CASTILLO-VILLAMIZAR, G.; DEBOUCK, D.G. **Multiple origins of lima bean landraces in the Americas: evidence from chloroplast and nuclear DNA polymorphisms.** Crop Science, v. 50, p. 1773–1787, 2010.

PAULA, A.P.O et al. **Karyotypic variability in *Calliandra sect. androcallis* (leguminosae - caesalpinioideae).** Plant Biosystems, v. 1, p. 1-12, 2020.

RITO, K. F.; ARROYO-RODRÍGUEZ, V; CAVENDE; S; SOUZA, G; LEAL, I. R.; TBABRELLI, M. **Unraveling the drivers of plant taxonomic and phylogenetic β -diversity in a human-modified tropical dryforest.** Biodiversity and Conservation, v. 1, p. 1-17, 2021.

SUMNER, A.T. **Nucleolar organizers (NORs).** In: Chromosome Banding, A.T. Sumner (ed.), Unwin Hyman Ltd., London. 1990.

ZHENG, J.; NAKATA, M.; UCHIYAMA, H.; MORIKAWA, H.; TANAKA, R. **Giemsa C banding patterns in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna Savi*, Fabaceae.** Cytologia, v. 56, n. 3, p. 459-466, 1991.