

Análise cariotípica em diferentes variedades de sementes crioulas de *Phaseolus lunatus* L. (Phaseoleae, Fabaceae)

Autores:

Maria das Graças Rodrigues do Nascimento

Doutora em Agronomia, pesquisadora do Instituto Nacional do Semiárido (INSA), Campina Grande

Edna Ursulino Alves

Doutora em Agronomia, Professora da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia

Joel Maciel Pereira Cordeiro

Doutor em Agronomia, UFPB, Areia

Maria Lúcia Maurício da Silva

Doutora em Agronomia, Professora da Universidade Estadual, Catolé do Rocha

Leonardo Pessoa Felix

Doutor em Botânica, Professor da UFPB, Areia

Fabiane Rabelo da Costa Batista

Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora do INSA, Campina Grande

DOI: 10.58203/Licuri.21723

Como citar este capítulo:

NASCIMENTO, Maria das Graças Rodrigues *et al.* Análise cariotípica em diferentes variedades de sementes crioulas de *Phaseolus lunatus* L. (Phaseoleae, Fabaceae). In: ANDRADE, Jaily Kerller Batista (Org.). **Desafios globais, soluções locais: Avanços em Ciências Agrárias e Ambientais**. Campina Grande: Licuri, 2023, p. 128-139.

ISBN: 978-65-85562-17-1

Resumo

As sementes crioulas são de fundamental importância para manutenção e biodiversidade da variabilidade genética das espécies. Entre as variedades crioulas pode existir variação cariotípica, principalmente cromossômica, dependendo do seu centro de origem. O objetivo com este trabalho foi analisar o cariótipo de diferentes variedades crioulas de *Phaseolus lunatus* por meio da distribuição de bandas heterocromáticas e investigar a existência de variações intraespecíficas correlacionadas ou não ao tamanho e morfologia das sementes entre as variedades. As sementes de 19 variedades crioulas de *P. lunatus* foram postas para germinar, em seguida as radículas foram coletadas quando atingiram em média 1 cm. A análise citogenética foi realizada nas de 19 variedades por coloração com fluorocromo CMA e DAPI. Para todas as variedades analisadas foi constatado $2n = 22$, cariótipos com tamanho médio entre 2,45 a 5,85 μm , relativamente simétricos e cromossomos predominantemente metacêntricos. As sementes de cultivares crioulas de *Phaseolus lunatus* L. não diferem cromossomicamente.

Palavras-chave: Bandas Heterocromatinas. Citogenética. Número cromossômico..

INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma importante fonte de alimento e renda para diversas populações (OLIVEIRA et al., 2004), sendo a segunda espécie de maior interesse econômico do gênero *Phaseolus*, ficando atrás apenas de *P. vulgaris* L., além de sua rusticidade e capacidade de resistir a longos períodos de secas (ARAÚJO et al., 2015), cujas características tornam uma cultura importante para as regiões semiáridas, incluindo o Nordeste brasileiro.

Inicialmente *P. lunatus* foi cultivado a partir de plantas nativas originadas da América Central e regiões Andinas na América do Sul, o que resultou em dois grupos genéticos distintos na espécie, o Mesoamericano (sementes pequenas) e o Andino (sementes grandes) (SERRANO-SERRANO et al., 2010). O cultivo e cruzamento de diferentes variedades resultaram em uma ampla diversidade morfológica de sementes de *P. lunatus*, com distintos tamanhos e colorações, cujas variedades geralmente recebem nomes tradicionais, conforme as populações locais a designam com base em caracteres particulares, como “Orelha de Vó”, “Galo-de-Campina”, “Coquinho” e “Boca-de-Moça” (MORAES et al., 2017).

Em alguns grupos vegetais variações na morfologia da planta, no tamanho do fruto e sementes podem ser correlacionadas com variações cariotípicas, especialmente número e morfologia cromossômica (GUTIÉRREZ-FLORES et al., 2018). Para *P. lunatus*, contudo, observa-se o registro constante de $2n = 22$ em diversas variedades, sem registros de poliploidia ou disploidia (RICE et al., 2015).

Nos grupos vegetais numericamente estáveis, o emprego de marcadores citomoleculares é indicado na diferenciação cariotípica, contribuindo para análises evolutivas e diferenciações taxonômicas (PESSOA et al., 2014; CORDEIRO et al., 2016). Para *P. lunatus*, o uso de marcadores citomoleculares indicaram diferenças expressivas entre esta espécie e *P. vulgaris*, em que eventos estruturais de transposição ou inversão pericêntrica podem ter ocorrido depois da separação de ambas as linhagens (ALMEIDA e PEDROSA-HARAND, 2011; BONIFÁCIO et al., 2012).

Estudos citogenéticos são utilizados como suporte para a taxonomia e também para a compreensão evolutiva dos táxons (BIONDO et al., 2005; BORTOLUZZI et al., 2007). Desse modo, a contagem cromossômica agregada ao método de bandeamento com dupla coloração por fluorocromos, CMA (Chromomycin) e DAPI, permitem comparar

cariótipos e separar espécies ou variedades diferentes que possuem o mesmo número cromossômico (GUERRA, 1993; GUERRA e SOUZA, 2002; PESSOA et al., 2014).

No gênero *Phaseolus* a heterocromatina é estudada principalmente em espécies de interesse econômico, em que a mesma está distribuída na região pericentromérica e subtelomérica dos cromossomos, sendo em *P. vulgaris* visualizada como blocos ricos em bases CG nos pericentrômeros da maioria dos cromossomos (FONSÊCA et al., 2010).

As pesquisas com Fabaceae têm sido objeto de avaliações genômicas, incluindo sequenciamento completo, uso de marcadores moleculares e análises de transcriptoma e tem colaborado para o entendimento das suas relações interespecíficas e intergenéricas (VARSHNEY et al., 2012). Diferentes estudos têm demonstrado uma macrossintenia entre as leguminosas, com poucos rearranjos cromossômicos entre espécies do mesmo gênero, como observado, por exemplo, para *Glycine max* (Gm) e *G. soja*, (FINDLEY et al., 2010) e para *P. vulgaris* e *P. lunatus* em estudos cito comparativos (BONIFÁCIO et al., 2012; ALMEIDA e PEDROSAHARAND, 2013). Mesmo entre *P. vulgaris* e *P. microcarpus* espécie filogeneticamente mais distante (DELGADO-SALINAS et al., 2006) foi observada um forte sintenia com apenas três quebras de colinearidade (FONSÊCA e PEDROSA-HARAND, 2013).

No presente trabalho o objetivo foi analisar o cariótipo de diferentes variedades crioulas de *P. lunatus* por meio da distribuição de bandas heterocromáticas e investigar a existência de variações intraespecíficas correlacionadas ou não ao tamanho e morfologia das sementes entre as variedades.

MATERIAL MÉTODOS

Amostragem

A análise citogenética envolveu 19 variedades crioulas de *P. lunatus* provenientes dos municípios de Queimadas (18 variedades) e Sertãozinho (uma variedade) na Paraíba, Nordeste do Brasil. As sementes das 19 variedades crioulas de *P. lunatus* foram postas para germinar em placas de Petri contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada, em seguida as radículas foram coletadas quando atingiram em média 1 cm.

Análise citogenética

As raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina (2 mM) por 24 h a 10 °C, fixadas em etanol absoluto/ácido acético glacial (v/v) 3:1 por 30 minutos, em seguida colocadas por 2 h à temperatura ambiente e depois armazenado a -20 °C até serem analisadas. Para o preparo das lâminas, as raízes foram digeridas em solução contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma) (w/v) durante 50 minutos a 37 °C. As raízes foram esmagadas em uma gota de ácido acético a 45% e as lamínulas posteriormente removidas em nitrogênio líquido. As lâminas foram coradas com solução de DAPI (2 µg mL⁻¹): glicerol (1:1, v:v) para seleção das melhores metáfases. Posteriormente foram descoradas em etanol absoluto/ácido acético glacial (v/v) 3:1 por 30 minutos e depois mantidas em etanol absoluto por duas horas. As lâminas foram envelhecidas por três dias e então coradas por uma hora com 10µL de CMA (0,1 mg/mL) e depois com 10µL de DAPI (1µg/mL) por meia hora, montadas em glicerol/tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v) e depois estocadas por três dias no escuro para estabilização dos fluorocromos (BARROS E SILVA e GUERRA, 2010).

Análise de dados

As metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss, com câmera de vídeo Axio Cam MRC5 usando o software Axiovision® v.4.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). As imagens foram editadas com o uso do software Adobe Photoshop CS3 Extended Version 10.0. As medições cromossômicas foram realizadas com o auxílio do programa ImageJ 1.51k (SCHNEIDER et al., 2012), enquanto a morfologia e a classificação cromossômica foram baseadas no índice centromérico de acordo com Guerra (1986).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todas as variedades analisadas constatou-se $2n = 22$, cariótipos com tamanho médio entre 1,23 a 4,02 µm relativamente simétricos e cromossomos predominantemente metacêntricos (Tabela 1, Figuras 2 e 3), resultado esse confirmado pelo índice centromérico maior que 36,53 os cromossomos são considerados 48 metacêntricos (Tabela 1), mesmo não tendo diferenças cromossômicas, as sementes das

variedades demonstraram diferenças visuais quanto ao seu tamanho e coloração (Figura 1).

Tabela 1. Características morfológicas das sementes de variedades de *Phaseolus lunatus* L.. Cor predominante, índice centromérico (IC), tamanho da semente (TS) e tamanho médio (TM), padrão de heterocromatina (PD) e figuras correspondentes. Tamanho da semente: P - pequena (< 10mm), G - grande (> 10mm); Padrão de heterocromatina: Ter (terminal), Per (pericentromérica).

Variedade	TS	Cor	TM (µm)	IC	PD	Figuras
Angico	P	M	2,70	45,40	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1A, 2A
Baía de Moita	P	M	1,56	44,11	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1B, 2B
Cancão	P	Ma	1,45	55,13	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1C, 2C
Carrapato	P	Me	1,90	41,33	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1D, 2D
Cearense	P	Mc	2,70	45,14	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1E, 2E
Coquinho	P	B	1,54	43,11	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1F, 2F
Eucalipto	P	B	2,50	45,11	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1G, 2G
Fava Feijão	P	M	1,34	40,41	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1H, 2H
Lua Nova	P	Ma	2,41	53,12	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1I, 2I
Manteiga	P	B	1,52	36,53	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1J, 2J
Miúda	P	Mv	1,52	39,01	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1K, 3A
Olho de Ovelha	G	B	2,42	64,31	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1L, 3B
Orelha de Vó Vermelha	G	B	4,02	44,41	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1M, 3C
Orelha de Vó Preta	G	B	2,34	63,54	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1N, 3D
Rainha	G	Ma	1,53	39,32	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1P, 3F
Rixinou	G	B	1,23	26,42	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1Q, 3G
Roxinha M	P	Rx	2,34	51,44	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1R, 3H
Roxinha	P	Ro	2,31	50,34	2Ter e 22Per CMA+/DAPI-	1S, 3I

Legenda: Tamanho da semente: P - pequena (< 10mm), G - grande (> 10mm); Padrão de heterocromatina: Ter (terminal), Per (pericentromérica). Cor: M - Marrom; Ma - Maculada (branca e vermelha); Me - Marrom escura; Mc - Marrom clara; B - Branca; Mv - Marrom-avermelhada; P - Preta; Ro - Rosa; Rx - Roxa.

Notas: Todas as amostras apresentavam número cromossômico (2n); Todas as variedades foram provenientes da cidade de Queimadas, Paraíba, exceto a variedade Miúda, que teve procedência da cidade de Sertãozinho, Paraíba.

Através da análise dos fluorocromos CMA/DAPI constatou-se a ocorrência apenas de regiões ricas em pares de base GC (CMA⁺/DAPI⁻) distribuídas nas regiões terminais (duas bandas) e pericentroméricas (22 bandas) (Figura 4). Os cariótipos de todas as variedades de *P. lunatus* são relativamente estáveis (número cromossômico, morfologia e bandas heterocromáticas), independente da morfologia, tamanho ou cor de suas sementes.



Figura 1. Variedades crioulas de *Phaseolus lunatus* L. A - Angico, B - Baía de Moita, C - Cancão, D - Carrapato, E - Cearense, F - Coquinha, G - Eucalipto, H - Fava Feijão, I. Lua Nova, J - Manteiga, K - Miúda, L - Olho de Ovelha, M - Orelha de Vó Vermelha, N - Orelha de Vó, O - Preta, P - Rainha, Q - Rixinou, R - Roxinha M, S - Roxinha.

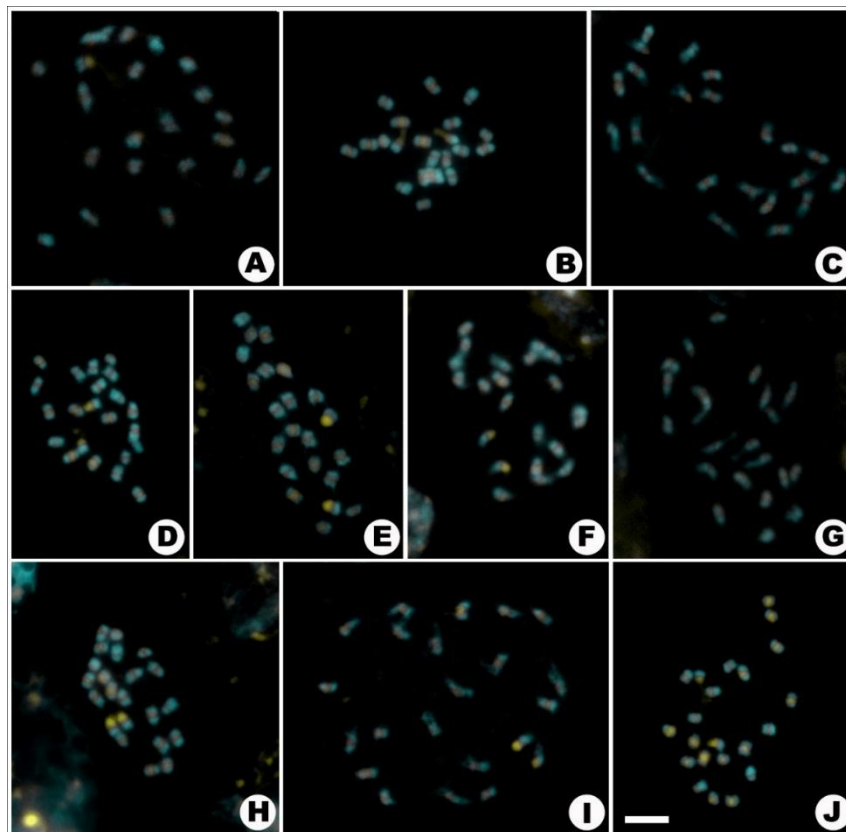


Figura 2. Células mitóticas em diferentes variedades de fava (*Phaseolus lunatus*).
 Legenda: A. - Angico, B - Baía de Moita, C - Cancão, D - Carrapato, E - Cearense, F - Coquinha, G - Eucalipto, H - Feijão Fava, I - Lua Nova, J - Manteiga. Barra de escala em J corresponde a 5 µm.

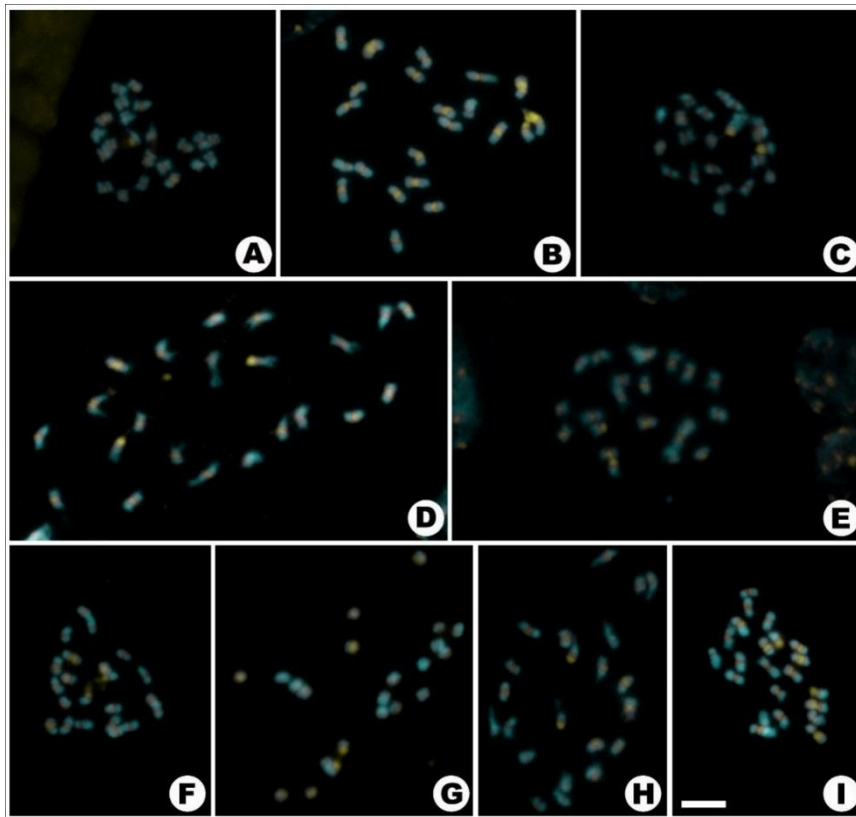


Figura 3. Células mitóticas em diferentes variedades de fava (*Phaseolus lunatus*).
 Legenda: A - Miúda, B - Orelha de ovelha, C - Orelha de Vó Vermelha, D - Orelha de Vó, E - Preta, F - Rainha, G - Rixinou, H - Roxinha M, I - Roxinha. Barra de escala em I corresponde a 5 μ m.

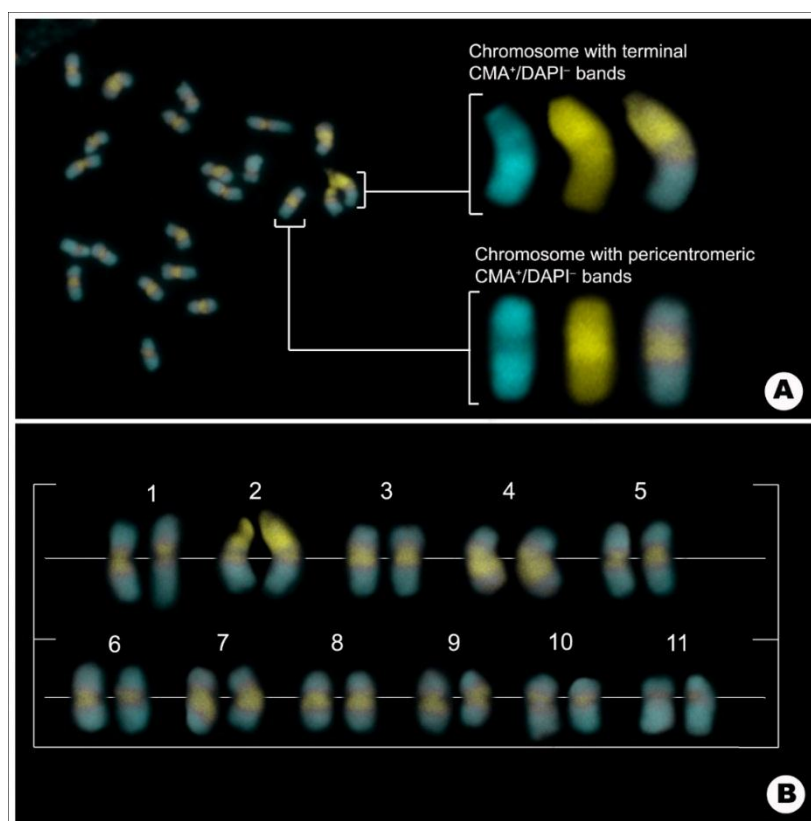


Figura 4. Padrão de bandas CMA/DAPI (A) e cariógrama (B) de fava (*Phaseolus lunatus*).

Os resultados encontrados neste trabalho para *P. lunatus* confirmam dados prévios descritos na literatura para esta espécie, seja em relação ao constante número cromossômico em diferentes variedades ($2n = 22$) ou em relação à distribuição de heterocromatina, onde são registradas 22 bandas CMA⁺/DAPI⁻ pericentroméricas e duas bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais, estas últimas correspondentes às RONS (regiões organizadoras de nucléolos) (Bonifácio et al., 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

A morfologia cromossômica e o índice centromérico confirmam a caracterização de um cariótipo simétrico com a predominância de cromossomos aproximadamente do mesmo tamanho (Paszko, 2006). Em determinados grupos vegetais variações em caracteres morfológicos das plantas (tamanho da planta e dos frutos, morfologia floral, presença de tricomas) podem ser correlacionados a variações cariotípicas, especialmente número e morfologia dos cromossomos e bandas heterocromáticas (Imran et al., 2015; Begum e Alam, 2016; Gutiérrez-Flores et al., 2018; Ferrer et al., 2019).

Entre as Fabaceae, *P. lunatus* tem ampla variação na morfologia de suas sementes (tamanho, forma e cor), e alterações cariotípicas poderiam estar envolvidas nesta característica da espécie. Contudo, nas análises citogenéticas desenvolvidas neste trabalho envolvendo diversas variedades de *P. lunatus* com distintas características morfológicas não houve diferenças significativas em relação ao número cromossômico ($2n = 22$), morfologia dos cromossomos (predominantemente metacêntrica) ou padrão de bandas heterocromáticas (duas bandas terminais e 20 pericentroméricas CMA⁺/DAPI⁻). Embora seja esperado que grupos vegetais tenham número cromossômico e padrão de distribuição de heterocromatina constantes em uma mesma espécie (Guerra, 2000, 2008), variações intraespecíficas são observadas em alguns grupos, como *Zephyranthes sylvatica* Baker (Amaryllidaceae) (Felix et al., 2008), *Anthurium affine* Schott (Araceae) (NASCIMENTO et al., 2019) e *Pinus nigra* Arnold (Pinaceae) (Bogunić et al., 2015).

Em muitos casos, a estabilidade cariotípica no número cromossômico e/ou distribuição de heterocromatina verificada em uma mesma espécie pode se estender a um gênero ou clado filogenético por inteiro, caracterizando-se assim como um caráter cariotípico plesiomórfico deste grupo. Em gêneros como *Lycium* L. (Solanaceae) (Stiefkens et al., 2010), *Pereskia* Mill. (Cactaceae) (Castro et al., 2016) e *Ceiba* Mill. (Malvaceae) (Figueredo et al., 2016), por exemplo, os padrões de heterocromatina são notavelmente estáveis e característicos. No gênero *Phaseolus* o número cromossômico é constante ($2n = 22$), embora existam determinadas variações no padrão de heterocromatina evidenciadas por CMA/DAPI e FISH (Fluorescence in situ hybridization)

entre algumas espécies (Moscone et al., 1999; Bonifácio et al., 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

Nos eucariotos, na heterocromatina há diferentes classes, dinâmicas estruturais e distintas sequências de composição (DNA satélites, transposons, sequências repetidas em tandem), o que repercute especialmente em sua localização no cromossomo (pericentromérica, terminal e intersticial), mas também no tamanho e quantidade no cariótipo das espécies (Barros e Silva et al., 2010; Mehrotra e Goyal, 2014; Allshire e Madhani, 2017). Em *P. lunatus* a repetição do padrão de bandas heterocromáticas entre as diferentes variedades indica uma natureza estável em sua composição, necessitando de análises mais aprofundadas para revelar diferenças intraespecíficas notáveis. Contudo, mesmo entre diferentes espécies a busca de variações cariotípicas significativas parece ser desafiadora. Entre *P. lunatus* e *P. vulgaris*, por exemplo, diferenças citotaxonômicas só foram possíveis de serem estabelecidas após a utilização de análises citomoleculares envolvendo CMA/DAPI, BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) e FISH (Bonifácio et al., 2012; Fonsêca e Pedrosa-Harand, 2013).

Análises envolvendo plantas oriundas dos principais centros de origem de *P. lunatus* ou de diferentes regiões do continente americano, ou mesmo a análise cariotípica de plantas silvestres, podem ser promissoras para incrementar as discussões sobre a estabilidade cariotípica existente no número cromossômico e distribuição de heterocromatina desta espécie.

CONCLUSÕES

A análise cariotípica envolvendo 19 variedades de *Phaseolus lunatus* L., confirmou a existência de estabilidade cariotípica em relação ao número cromossômico ($2n = 22$) e padrão de bandas heterocromáticas, onde são registradas 22 bandas CMA⁺/DAPI⁻ pericentroméricas e duas bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais.

Embora em *P. lunatus* ocorra ampla variação no tamanho, forma e cor das suas sementes, estas diferenças morfológicas não são correlacionadas a caracteres cariotípicos. Desta forma, variação intraespecífica citológica na espécie provavelmente é inexistente, embora a análise de plantas oriundas dos principais centros de origem ou de plantas silvestres possa ser promissora para incrementar as discussões sobre a estabilidade cariotípica em *P. lunatus*.

REFERÊNCIAS

Allshire, Robin C; Madhani, Hiten D. Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, n. 4, p. 229-244, 2018.

Almeida, C; Pedrosa-Harand, A. Contrasting rDNA evolution in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and common bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 132, n. 3, p. 212-217, 2011.

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, n. 7, p. 1909-1916, 2013.

Araujo, Ademir Sergio Ferreira; Lopes, Ângela Celis Almeida; Gomes, Regina Lucia Ferreira; Bezerra Junior, José Evando Aguiar; Antunes, Jadson Emanuel Lopes; Lyra, Maria do Carmo Catanho Pereira; Barreto, Márcia do Vale Barreto. Diversity of native rhizobia-nodulating *Phaseolus lunatus* in Brazil. *Legume Research*, v. 38, n. 5, p. 653-657, 2015.

Barros e Silva, A E; Guerra, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 85, n. 2, p. 115-125, 2010.

Bellucci, E; Bitocchi, E; Ferrarini, A; Benazzo, A.; Biagetti, E; Klie, S; Minio, A; Rau, D; Rodriguez, M; Panziera, A; Venturini, L; Attene, G; Albertini, E; Jackson, S.A.; Nanni, L; Fernie, A.R; Nikoloski, Z; Bertorelle, G; Delledonne, M; Papa, R. Biondo, E; Miotto, S.T.S; Schifino-Wittmann, M.T. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 28, n. 4, p. 797-808, 2005.

Bonifácio, Eliene Mariano; Fonsêca, Arthur; Almeida, Cícero; Santos, K G; Pedrosa-Harand, Andrea. Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v. 124, n. 8, p. 1513-1520, 2012.

Bortoluzzi, R.L.C; Biondo, E; Miotto, S.T.S; Schifino-Witmann, M.T. Abordagens taxonômicas e citogenéticas em Leguminosae-Caesalpinioideae na região Sul do Brasil. *Revista Brasileira Biociências*, v. 5, n. 2, p. 339-341, 2007.

Castiglione, R.M; Frediani, M; Gelati, M.T; Venora, G; Giorgetti, L; Caputo, P. Cytological and molecular characterization of *Vicia barbazitae* Ten. & Guss. *Protoplasma*, v. 249, n. 4, p. 779-788, 2012.

Cordeiro, J.M.P; Lima, S.A.A; Paz, S.N; Santos, A.M.S; Felix, L.P. Karyotype evolution in the genus *Jacaranda* Juss. (Jacarandaeae, Bignoniaceae): chromosome numbers and heterochromatin. *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 4, p. 1-8, 2016.

Delgado-Salinas, A; Bibler, R; Lavin, M. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany*, v. 31, n. 4, p. 779-791, 2006.

Findley, S.D; Cannon, S; Varala, K.; Du, J; Ma, J; Hudson, M.E; Birchler, J.A; Stacey, G. Fluorescence in situ hybridization system for karyotyping soybean. *Genetics*, v. 185, n. 3, p. 727-744, 2010.

Fonsêca, A; Ferreira, J; Santos, T.R.B.; Mosiolek, M; Bellucci, E.; Kami, J; Gepts, P; Geffroy, V; Schweizer, D; Santos, K.G.B; Pedrosa-Harand, A. Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Research*, v. 18, n. 4, p. 487-502, 2010.

Fonsêca, A; Pedrosa-Harand, A. Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome*, v. 56, n. 6, p. 335-343, 2013.

Guerra, M. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*, v. 9, p. 741-743, 1986.

Guerra, M. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*, v. 71, n. 1, p. 234-241, 1993.

Guerra, M. Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, v. 146, n. 3, p. 703-710, 2012.

Guerra, M; Souza, M.J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC-Editora, 2002.

Gutiérrez-Flores, C; Luz, J.L.L; León, F.J.G; Cota-Sánchez, J.H. Variation in chromosome number and breeding systems: implications for diversification in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Comparative Cytogenetics*, v. 12, n. 1, p. 61-82, 2018.

Iwata, A; Greenland, C.M; Jackson, A.S. Cytogenetics of Legumes in the Phaseoloid Clade. *The Plant Genome*, v. 1, n. 6, p. 1-8, 2013.

Jha, T.B; Saha, P.S; Adak, M; Jha, S; Roy, P. Chromosome morphometric analysis of Indian cultivars of *Lens culinaris* Medik. using EMA based Giemsa staining method. *Caryologia*, v. 70, n. 3, p. 270-283, 2017.

Liang, G; Chen, H. Scaling chromosomes for an evolutionary karyotype: a chromosomal tradeoff between size and number across woody species. *PLoS One*, v. 10, n. 12, p. e0143817, 2015.

Martin, E; Yildiz, H K; Kahraman, A; Binzat, O K; Eroğlu, H.E. Detailed chromosome measurements and karyotype asymmetry of some *Vicia* (Fabaceae) taxa from Turkey. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, v. 71, n. 3, p. 224-232, 2018.

Moraes, Clara Sales; Dias, Terezinha Aparecida Borges; Costa, Sylvana de Paiva Pinto; Vieira, Rogério da Costa; Noronha, Sérgio Eustáquio de; Burle, Marília Lobo. Catálogo de fava (*Phaseolus lunatus* L.) conservada na Embrapa. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017.

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.

Oliveira, A.P.; Alves, E.U.; Alves, A.U.; Dornelas, C.S.M.; Silva, J.A.; Pôrto, M.L.; Alves, A.V. Produção de feijão-fava em função do uso de doses de fósforo em um Neossolo Regolítico. *Horticultura Brasileira*, v. 22, n. 3, p. 543-546, 2004.

Pessoa, E.; Felix, L.P.; Alves, M.A. New *Epidendrum* (Laeliinae-Orchidaceae) from the Atlantic forest of Northeastern Brazil: evidence from morphology and cytogenetics. *Brittonia*, v. 66, n. 4, p. 347-352, 2014.

Rice, A.; Glick, L.; Abadi, S.; Einhorn, M.; Kopelman, N.M.; Salman-Minkov, A.; Mayzel, J.; Chay, O.; Mayrose, I. The Chromosome Counts Database (CCDB) - a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytologist*, v. 206, n. 1, p. 19-26, 2015.

Scaldaferro, M.A.; Grabiele, M.; Moscone, E.A. Heterochromatin type, amount and distribution in wild species of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 60, n. 2, p. 693-709, 2013.

Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, v. 9, n. 7, p. 671, 2012.

Serrano-Serrano, M.L.; Hernández-Torres, J.; Castilho-Villamizar, G.; Sánchez, M.I.C. Gene pools in wild lima bean (*P. lunatus* L.) from the Americas: evidences for an Andean origin and past migrations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 54, n. 1, p. 76-87, 2010.

Singh, R.J.; Nelson, R.L.; Chung, G.H. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series: oilseed crops. CRC Press: Boca Raton, v. 1, n. 4, p. 13-50, 2007.

Varshney, R.K.; Chen, W.; Li, Y.; Bharti, A.K.; Saxena, R.K.; Schlueter, J.A.; Donoghue, M.T.A.; Azam, S.; Fan, G.; Whaley, A.M.; Farmer, A.D.; Sheridan, J.; Iwata, A.; Tuteja, R.; Penmetsa, R.V.; Wu, W.; Upadhyaya, H.D.; Yang, S.P.; Shah, T.; Saxena, K.B.; Michael, T.; Mccombie, W.R.; Yang, B.; Zhang, G.; Yang, H.; Wang, J.; Spillane, C.; Cook, D.R.; May, G.D.; Xu, X.; Jackson, S.A. Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. *Nature Biotechnology*, v. 30, n. 1, p. 83-89, 2012.

Watanabe, K.; Yahara, T.; Hashimoto, G.; Nagatani, Y.; Soejima, A.; Kawahara, T.; Nakazawa, M. Chromosome numbers and karyotypes in Asteraceae L. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 94, n. 3, p. 643-654, 2007.