

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**Elisa Guimarães Cabral**

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM POPULAÇÕES DE *Pueraria*  
*phaseoloides* (Roxb) BENTH (FABACEAE)**

DISSERTAÇÃO

Juiz de Fora

2019

**ELISA GUIMARÃES CABRAL**

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM POPULAÇÕES DE *Pueraria*  
*phaseoloides* (Roxb) BENTH (FABACEAE)**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área de concentração: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa**

Juiz de Fora

2019

Cabral, Elisa Guimarães.

Estudo citogenético em populações de *Pueraria phaseoloides* (Roxb) Benth (Fabaceae) / Elisa Guimarães Cabral. -- 2019.

72 f. : il.

Orientador: Saulo Marçal de Sousa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Citogenética. 2. *Pueraria phaseoloides*. 3. Kudzu tropical. 4. Plantas forrageiras. I. Sousa, Saulo Marçal de, orient. II. Título.

**ELISA GUIMARÃES CABRAL**

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM POPULAÇÕES DE *Pueraria  
phaseoloides* (Roxb) BENTH (FABACEAE)**

Dissertação de Mestrado submetido à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa**

**Orientador**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

---

**Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

---

**Dr<sup>a</sup>. Aryane Campos Reis**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

---

**Dr<sup>a</sup>. Shaiany Sabrina Lopes Gomes**

**Escola Estadual Fernando Lobo**

À milha família, que sempre me apoiou,  
incentivou e aplaudiu em cada sonho que  
conquistei.

DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela proteção e bênçãos em minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas e à Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade de realização do Curso.

Aos órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo; à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização do projeto e participação em eventos.

A todos os professores do Laboratório de Genética e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Ao Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa, pela orientação, dicas, críticas, empenho, paciência, contribuições para a realização deste trabalho e por acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini pela oportunidade de estágio durante os 4 anos de graduação, pelos ensinamentos e valiosas sugestões, permitindo meu crescimento profissional.

A todos os amigos do Laboratório de Genética pela companhia diária. Laís, Ana Luiza, Victória, Aryane, Juliana, Elyabe, Shaiany, Matheus, Isabel, Liliâne, obrigada por sempre me ajudarem com os experimentos e fazerem dos dias no laboratório mais animados.

Às amigas da Faculdade, que passamos juntas pelos obstáculos desde a graduação até o mestrado. Laura, Larissa, Marina, Raissa, Leonara e Marinna. Obrigada por toda ajuda e incentivo durante esses 7 anos.

Aos meus pais, Rita e Mauricio, que acreditaram, torceram e cujo amor é tão grande que não cabe em mim.

Aos meus irmãos Daniel e Leonardo pela convivência diária, por todas as chatices e impicância, e por me ajudarem em Juiz de Fora sempre, fazendo nossa segunda casa.

Ao meu namorado Dálmisson, pela compreensão, incentivo, puxões de orelhas, pela imensa paciência, ter suportado minhas falhas e ausências durante esse período, em especial por me fazer perceber o quanto preciso desse amor.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, o meu sincero obrigado!

## RESUMO

O gênero *Pueraria* (Fabaceae) possui 19 espécies nativas do sudeste asiático, utilizadas como medicinais, na alimentação humana, nas indústrias têxtil, de papel e madeireira. Esse grupo de plantas sempre apresentou grande diversidade morfológica, o que muitas vezes dificultou o agrupamento de algumas espécies, sendo um grupo taxonomicamente controverso. Recentemente, utilizando dados moleculares e morfológicos ao mesmo tempo, pesquisadores redistribuíram as espécies do grupo em 3 gêneros já existentes e criaram 2 novos gêneros para algumas espécies que não se encaixavam em outros. Dentre às espécies mais disseminadas do grupo, devido seu potencial econômico na agricultura, *P. phaseoloides*, se destaca, sendo muito utilizada nas regiões tropicais como forrageira. Apesar de sua importância econômica e problemas envolvendo sua taxonomia, poucos são os estudos básicos realizados para espécie. Neste trabalho, buscou-se, caracterizar cromossomicamente oito populações brasileiras da espécie *Pueraria phaseoloides*. Foram realizadas análises citogenéticas e determinação da quantidade de DNA. Foi confirmado o número cromossômico para espécie  $2n = 22$ , enquanto a quantidade de DNA encontrada foi de 3,20 pg. Através das análises morfométricas mostrou-se que o cariótipo é simétrico com 2 pares de cromossomos metacêntricos e 9 pares submetacêntricos. Os bandeamentos cromossômicos revelaram que 20 cromossomos apresentavam bandas  $CMA^+$  e 2 cromossomos com bandas  $CMA^{++}/DAPI^-$ . A FISH com sondas de DNAr 45S indicou que as sequências de tais sítios foram coincidentes com o par de marcas  $CMA^{++}$  mais fortes. O DNAr 5S mostrou-se presente na região subterminal de um par de cromossomos e a FISH com sondas teloméricas demonstrou a presença dessas sequências em regiões próximas aos centrômeros de alguns cromossomos, além das regiões terminais. Estes resultados são inéditos para *P. phaseoloides*, permitindo uma melhor caracterização da espécie.

Palavras-chave: Citogenética. Plantas forrageiras. *Pueraria phaseoloides*. Kudzu tropical.

## ABSTRACT

The genus *Pueraria* (Fabaceae) has 19 native species of Southeast Asia, used as medicinal, in human food, in the textile, paper and timber industries. This group of plants always present great morphological diversity, which often made it difficult to group some species, being a group taxonomically controversial. Recently, using molecular and morphological, researchers redistributed the species into 3 existing genera and created 2 new genera for some species that did not resemble into others. Among the most widespread species of the group, due to its economic potential in agriculture, *P. phaseoloides*, stands out, being widely used in tropical regions as forage. Even though their economic importance and problems involving their taxonomy, few are the basic studies performed for species. In this job, was sought, characterize eighth Brazilian populations of the *Pueraria phaseoloides* species. Cytogenetic analyzes and determination of the DNA amount were performed. The chromosome number was confirmed for species  $2n = 22$ , while the DNA content found was 3.20 pg. Through the morphometric analysis it was shown that the karyotype is symmetrical with 2 pairs of metacentric chromosomes and 9 submetacentric pairs. The chromosomal banding, it was observed that 20 chromosomes presented CMA<sup>+</sup> bands and 2 of these with CMA<sup>++</sup>/DAPI<sup>-</sup> bands. FISH with rDNA 45S probes indicated that the sequences of such sites coincided with the stronger CMA<sup>++</sup> tag pair. The rDNA 5S was present in the subterminal region of a pair of chromosomes, and FISH with telomeric probes demonstrated the presence of these sequences in regions next to the centromere of some chromosomes, in addition to the terminal regions. These results are inédited for *P. phaseoloides*, allowing a better characterization of the species.

Keywords: Cytogenetic. Forage plants. *Pueraria phaseoloides*. Kudzu tropical.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Árvore filogenética obtida por Egan e colaboradores para gênero *Pueraria* (EGAN et al., 2016)..... 21
- Figura 2: Regiões das populações estudadas de *Pueraria phaseoloides*.....30
- Figura 3: *Pueraria phaseoloides* cultivada *in vitro* em meio MS..... 32
- Figura 4: Histogramas representativos da estimativa da quantidade de DNA de *Pueraria phaseoloides*: A- População A com 3,38pg.; B- População B com 3,28pg.; C- População C com 3,27 pg.; D- População D com 3,20pg.; E- População E com 3,08pg.; F- População F com 3,13pg.; G- População G com 3,18pg.; H- População H com 3,09pg. (*Pisum sativum* 2C = 9,09 pg.)..... 39
- Figura 5: A - Metáfase mitótica de *Pueraria phaseoloides* com  $2n = 22$  cromossomos. Setas indicam o alongamento dos centrômeros e as estrelas o alongamento das RONS. B - Em evidência, um cromossomo com distensão na região do centrômero. Barra = 10  $\mu$ m..... 41
- Figura 6: Metáfases de *P. phaseoloides*: (A) sobreposição evidenciando as regiões CMA3 positivas; (B) metáfase corada com CMA, setas indicam o alongamento dos centrômeros. Barra = 10  $\mu$ m..... 43
- Figura 7: Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) em metáfases de *P. phaseoloides* evidenciando as regiões de DNA repetitivo: (A) Sítios de DNAr 5S (marcação pseudocolorizada em verde) e 45S (marcação em vermelho); (B) Sequências de DNA telomérico (setas indicam a presença de sequências intersticiais). Barra = 10 $\mu$ m..... 44
- Figura 8: Idiograma representativo dos cromossomos de *P. phaseoloides*. Retângulo amarelo = Bandas CMA, retângulo vermelho = DNAr 45S, retângulo verde = DNAr 5S e círculos pretos = sequências teloméricas. M = metacêntrico e SM = submetacêntrico..... 44

Figura 9: Cariogramas de *Pueraria phaseoloides*. A – Cromossomos corados com DAPI; B – Cromossomos corados com CMA; C – Cromossomos corados com DAPI e hibridizados com sondas de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho); D- Cromossomos corados com DAPI e hibridizados com sondas de sequências teloméricas (vermelho)..... 45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localização das oito populações estudadas de <i>Pueraria phaseoloides</i> ...	31
Tabela 2: Solução para hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	35
Tabela 3: Reagentes para reação de amplificação das sequências teloméricas.....	36
Tabela 4: Valor da quantidade de DNA 2C das oito populações de <i>Pueraria phaseoloides</i> .....	40
Tabela 5: Dados morfométricos médios dos cromossomos das oito populações de <i>Pueraria phaseoloides</i> .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

A	Grau de Assimetria do Cariótipo
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
a.C.	Antes de Cristo
AC	Assimetria dos Cromossomos
ANOVA	Análise de Variância
AT	Adenina e Timina
AGE/MAPA	Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
BC	Comprimento do Braço Curto
BL	Comprimento do Braço Longo
CABI	Centre For Agriculture And Bioscience International
CC	Classificação do Cromossomo
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
CG	Citosina e Guanina
CLH	Comprimento do Lote Haploide
Cm	Centímetro
CMA <sub>3</sub>	Cromomicina A <sub>3</sub>
CR	Comprimento Relativo do Cromossomo
Crom.	Cromossomo
CT	Comprimento Total do Cromossomo
CV	Coefficiente de Variação
DA	Distamicina
DAPI	4'6-diamin-2-phenyindole
d.C.	Depois de Cristo
ddH <sub>2</sub> O	Água Destilada
DIG	Digoxigenina
DNA	“Desoxyribonucleic Acid” – Ácido desoxirribonucleico
DNA <sub>r</sub>	DNA ribossomal
Dr.	Doutor
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO	“Food and Agriculture Organization” – Organização de Comida e Agricultura
FC	Fórmula Cariotípica
FISH	“Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization” – “Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente”
G0/G1	Valor 2C de DNA
GISH	“Genome <i>In Situ</i> Hybridization”- Hibridização <i>in situ</i> Genômica
H3	Proteína Histônica 3
h	Hora
HCL	Ácido Clorídrico
IC	Índice Centromérico
IP	Iodeto de Propídio
M	Metacêntrico
m	Metro
M	Molar
Mb	Mega Bases
mg	Miligramas
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mm	Milímetro
mL	Mililitros
MS	“Murashige e Skoog Basal Mistura de sais” – Mistura Basal de Sais
N	Número Haploide dos Cromossomos
nM	Nanômetro
P.	Pueraria
pg	Picogramas
pH	Potencial Hidroxiônico
Pop.	População
R	Relação entre os Braços dos Cromossomos
RNA	“Ribonucleic Acid” – Ácido Ribonucleico
RONs	Região Organizadora de Nucléolos
s	Segundos
SM	Submetacêntrico
SSC	NaCl 3M/ Citrato Trissódico 2H <sub>2</sub> O 0,3M
TNB	“Tris-NaCl-blocking buffer” – Tampão Bloqueador

UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
USA	“United States of America” – Estados Unidos da América
Var	Varição
X	Número cromossômico básico
WPB	Tampão Woody Plant Buffer
2C	Quantidade de DNA no Núcleo
8-HQ	8-Hidroxiquoteína
°C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 A FAMÍLIA FABACEAE E O GÊNERO <i>PUERARIA</i> .....	18
2.2 <i>PUERARIA PHASEOLOIDES</i> .....	22
2.2.1 DISTRIBUIÇÃO E TAXONOMIA.....	22
2.2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	23
2.3 CITOGENÉTICA E CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTAS PARA O PRÉ-MELHORAMENTO.....	25
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	30
4.2 ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA.....	31
4.3 PREPARAÇÕES CROMOSSOMICAS.....	33
4.4 MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA.....	33
4.5 BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO COM CMA <sub>3</sub> /DA/DAPI.....	34
4.6 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH).....	35
5 RESULTADOS.....	38
5.1 ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA.....	38
5.2 CONTAGEM E MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA.....	40
5.3 BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO COM CMA <sub>3</sub> /DA/DAPI.....	42
5.4 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE.....	43
6 DISCUSSÃO.....	46
7 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

# 1 INTRODUÇÃO

A família Fabaceae Lind., também conhecida como Leguminosae devido à presença de uma característica exclusiva do grupo, o fruto do tipo legume, é a terceira maior família de Angiospermas (LIMA, 2000; GIULIETTI et al., 2005). Ela possui destaque econômico na agricultura devido ao fato de suas sementes serem ricas em proteína de alta qualidade (GIULIETTI et al., 2005), proporcionando ao homem alimentos altamente nutritivos como: feijão, soja, lentilha, ervilha e o grão de bico. Muitas espécies dessa família também são importantes para a nutrição animal, como espécies de *Stylozanthos*, *Macrotyloma*, *Desmodium*.

Dentre os inúmeros gêneros utilizados para os mais diversos fins, inclusive para a produção animal, um grupo de leguminosas, o gênero *Pueraria*, vem recebendo grande atenção. Este grupo de plantas é nativo do Sudeste da Ásia e hoje são descritas 19 espécies e suas variedades (EGAN et al., 2016).

Algumas espécies desse gênero foram introduzidas em algumas regiões como Nova Guiné e Nova Caledônia, como fonte de alimento. Por outro lado, nas Américas foram inicialmente utilizadas na ornamentação e mais recentemente como pastagens e no controle de erosão de solos (KEUNG, 2002; RUEDA et al., 2003; VALENTIM e ANDRADE, 2005; DEMINICIS, 2009).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero, *Pueraria phaseoloides* (Roxb) Benth, também conhecida como Kudzu tropical, vem recebendo destaque na pecuária em várias regiões do mundo, inclusive na Amazônia, por desenvolver-se em solos ácidos. Além disso, por possuir atividade alelopática, apresenta vantagem competitiva em relação às plantas invasoras, com uma excelente produção de folhas, principalmente em solos úmidos (SOUZA et al., 2004). Adicionalmente, ela é utilizada como uma cobertura vegetal, além de atuar na fixação de nitrogênio no solo. Por ser uma boa fonte de proteína tem sido utilizada, também, como forrageira na nutrição animal (TANNER et al., 1979; NASCIMENTO e SILVA, 2004).

Forrageiras são plantas que constituem as pastagens e são caracterizadas como aquelas consumidas por herbívoros. Elas envolvem diversas espécies, desde herbáceas até arbustivas (PEREIRA et al., 2001). Como a maior parte da pecuária brasileira é dependente de pastagens, o melhoramento de

fORAGEIRAS está diretamente ligado à mesma, sendo muito relevante para o bom desempenho do rebanho, permitindo melhor qualidade e produtividade da planta, além de propiciar maior resistência a doenças e a diferentes fatores bióticos e abióticos (VALLE et al., 2008).

Desta forma, esforços que auxiliem o conhecimento básico de plantas com potencial forrageiro são de extrema importância, para o pré-melhoramento (AMPONG-NYARKO e MURRAY, 2011). Dentre as diversas ferramentas utilizadas no pré-melhoramento vegetal, destaca-se a citogenética, que pode auxiliar na determinação e reconhecimento de espécies que serão intercruzadas, na identificação de poliploides, no conhecimento prévio da viabilidade meiótica e pós-meioótica de plantas selecionadas para cruzamentos, entre outras. Para *P. phaseoloides*, os trabalhos são raros, limitando-se à descrição do número cromossômico, que ainda é controverso, Darlington e Wylie (1955), Lackey (1977), Duke (1981), Kumar e Hymowitz (1989), por exemplo, descreveram para a espécie:  $2n=20$ , 22 e 24 cromossomos, respectivamente.

O mesmo problema em relação aos dados citogenéticos, é encontrado para o gênero *Pueraria* como um todo, uma vez que poucos estudos são encontrados nessa área. Apenas quatro das 19 espécies tem o número cromossômico determinado até o momento: *P. stricta* com  $2n = 20$  (LACKEY, 1977), *P. montana* var. *lobata* com  $2n= 22$  e 24 (DARLINGTON e WYLIE, 1955; LACKEY, 1977; DUKE, 1981; KUMAR e HYMOWITZ, 1989), *P. tuberosa* com  $2n=22$  (LACKEY, 1977), e *P. phaseoloides* com  $2n=20$ , 22 e 24 (DARLINGTON e WYLIE, 1955; LACKEY, 1977; DUKE, 1981; KUMAR e HYMOWITZ, 1989).

Outras informações mais refinadas como a morfometria cromossômica, padrões de bandas heterocromáticas e mapeamento de sequências específicas pela Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), não há nenhum relato para *Pueraria phaseoloides*, sendo que no gênero todo, apenas a espécie *P. lobata* possui dados referente à FISH (OHMIDO et al., 2013). O presente trabalho apresenta dados inéditos do cariótipo de *P. phaseoloides*, contribuindo para o conhecimento do grupo e para o estabelecimento de relações com outras espécies do gênero *Pueraria*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A FAMÍLIA FABACEAE E O GÊNERO *PUERARIA*

A família Fabaceae, é uma das maiores famílias de plantas com flor, ficando atrás apenas de Asteraceae e Orchidaceae, sendo considerada a maior família no Brasil (LIMA, 2000; GIULIETTI et al., 2005; BFG, 2015). Pelo fato das espécies apresentarem fruto do tipo legume (ou vagem), a família também é conhecida como Leguminosae, sendo a presença de vagem uma característica exclusiva desse grupo.

Essa família apresenta cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies (LPWG, 2017), os quais encontramos no Brasil 222 gêneros e 2.849 espécies (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2018). Possui distribuição cosmopolita e hábitos bastante variados e com porte desde grandes árvores, arbustos, ervas e até mesmo trepadeiras (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2018).

Em termos de importância econômica, Fabaceae é a família mais importante das eudicotiledôneas (GIULIETTI et al., 2005). Devido à grande diversificação em tamanho e formas de suas espécies, este grupo pode ser utilizado na produção de óleos essenciais, combustíveis, produtos químicos e medicamentos, na indústria madeireira e na ornamentação, além de possuírem plantas muito utilizadas na alimentação. Muitas espécies também possuem grande importância como forrageiras para a nutrição de bovinos, caprinos, ovinos e equinos e como adubos verdes (WOJCIECHOWSKI et al., 2004; MOREIRA et al., 2013).

Fabaceae possui tradicionalmente três subfamílias reconhecidas: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Faboideae) (POLHILL et al., 1981; LPWG, 2013), sendo esta última a maior em número de espécies, com 503 gêneros e aproximadamente 14.000 espécies (LEWIS et al., 2005), seguida por Caesalpinioideae com 170 gêneros e cerca de 3.000 espécies (DOYLE et al., 2000) e Mimosoideae com um número menor de gêneros, 77, com aproximadamente 3.000 espécies (LUCKOW, 2003).

Devido à parafilia conhecida para Caesalpinioideae, (LEWIS et al., 2005), foi proposta, recentemente, uma nova classificação a fim de representar mais corretamente as relações evolutivas e as características de cada uma das subfamílias de Fabaceae, havendo nesta nova proposta, a presença de seis subfamílias: Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae. Destas, as cinco primeiras foram segregadas de Caesalpinioideae, enquanto Mimosoideae foi incluída em Caesalpinioideae (LPWG, 2017).

A subfamília Papilionoideae (Faboideae) é considerada a mais diversa dentre as leguminosas e a mais importante economicamente (POLHILL, 1994; MARCHETTI et al., 2011), com distribuição em todos os ecossistemas (POLHILL e RAVEN, 1981), com 28 tribos (LPWG 2017). Dentro de Papilionoideae, encontra-se a tribo Phaseoleae, que se destaca por apresentar plantas forrageiras, ornamentais, e de uso na alimentação humana, como os gêneros *Phaseolus* (feijão), *Glycine* (soja) e *Pisum* (ervilha), sendo a maior e mais importante tribo das Leguminosas, com 89 gêneros e aproximadamente 1.567 espécies (SCHRIRE, 2005), distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (LACKEY, 1981; BRUNEAU, 1996; LPWG, 2017).

A tribo Phaseoleae possui oito subtribos, e dentre elas está a subtribo Glycininae à qual pertencem gêneros importantes como o da Soja (*Glycine*), *Pseudovigna*, *Calopogonium*, *Neonotonia*, *Teyleria* e *Pueraria* que é nativo do Sudeste da Ásia, com cerca de 19 espécies (MAESEN, 1985; EGAN et al., 2016).

Espécies de *Pueraria* apresentam importância econômica desde 500 a.C. (KENG, 1974) na China e 600 d.C. no Japão (SHURTLEFF e AOYAGI, 1977), onde vêm sendo utilizadas como plantas medicinais, na alimentação humana, como fonte de material para as indústrias têxtil, de papel e madeireira. Das 19 espécies descritas, as espécies *P. montana* var. *lobata* e *P. phaseoloides*, que são muito utilizadas na agricultura e pecuária, como forrageiras, sendo a primeira muito cultivada em zonas temperadas e a segunda em zonas tropicais (KEUNG, 2002).

Lackey (1977) e Maesen (1985) descreveram esse gênero como um agrupamento não natural com bases nas informações morfológicas das espécies, sendo que Maesen relatou ter encontrado dificuldade em agrupar algumas espécies com base em características como formato das sementes e forma das flores. Com o desenvolvimento das técnicas moleculares, foi possível confirmar que a hipótese de

Lackey (1977) e Maesen (1985), obtida por meio da análise de dados morfológicos, estava correta em relação à polifilia do grupo, uma vez que os dados moleculares permitiram a mesma interpretação (LEE e HYMOWITZ, 2001; EGAN et al., 2016).

Em 2001, Lee e Hymowitz estudaram pela primeira vez o gênero com base em um marcador molecular de cloroplasto (*rps16*), evidenciando a presença de quatro linhagens distintas dentro do grupo. Recentemente, Egan e colaboradores (2016) em um estudo mais completo, analisaram 20 espécies e as suas variedades, utilizando três marcadores moleculares (dois de cloroplasto, o gene *matK* e o espaçador intergênico *trnD-trnT*; e um nuclear, o *asymmetric leaves 2 - AS2*) e características morfológicas, apresentando uma hipótese para a divergência dentro do gênero *Pueraria*.

A partir deste trabalho, como pode ser observado na Figura 1, foi revelada a existência de cinco linhagens distintas para o gênero: um grupo principal (*Pueraria s.str.*) que inclui *P. tuberosa* (a espécie tipo do gênero) e todas as outras espécies, exceto *P. phaseoloides* e suas variedades (considerada grupo irmão de *Sinodolichos*), *P. stricta* (colocada dentro de *Teyleria*), *P. penduculares* e *P. yunnanensis* (criado um gênero novo para elas, *Toxopueraria*) e *P. wallichii* (também criado um gênero próprio denominado *Haymondia*).

Assim, tendo em vista a importância econômica e escassez de dados referente ao gênero, é importante que novos estudos sejam realizados para uma melhor compreensão do gênero.

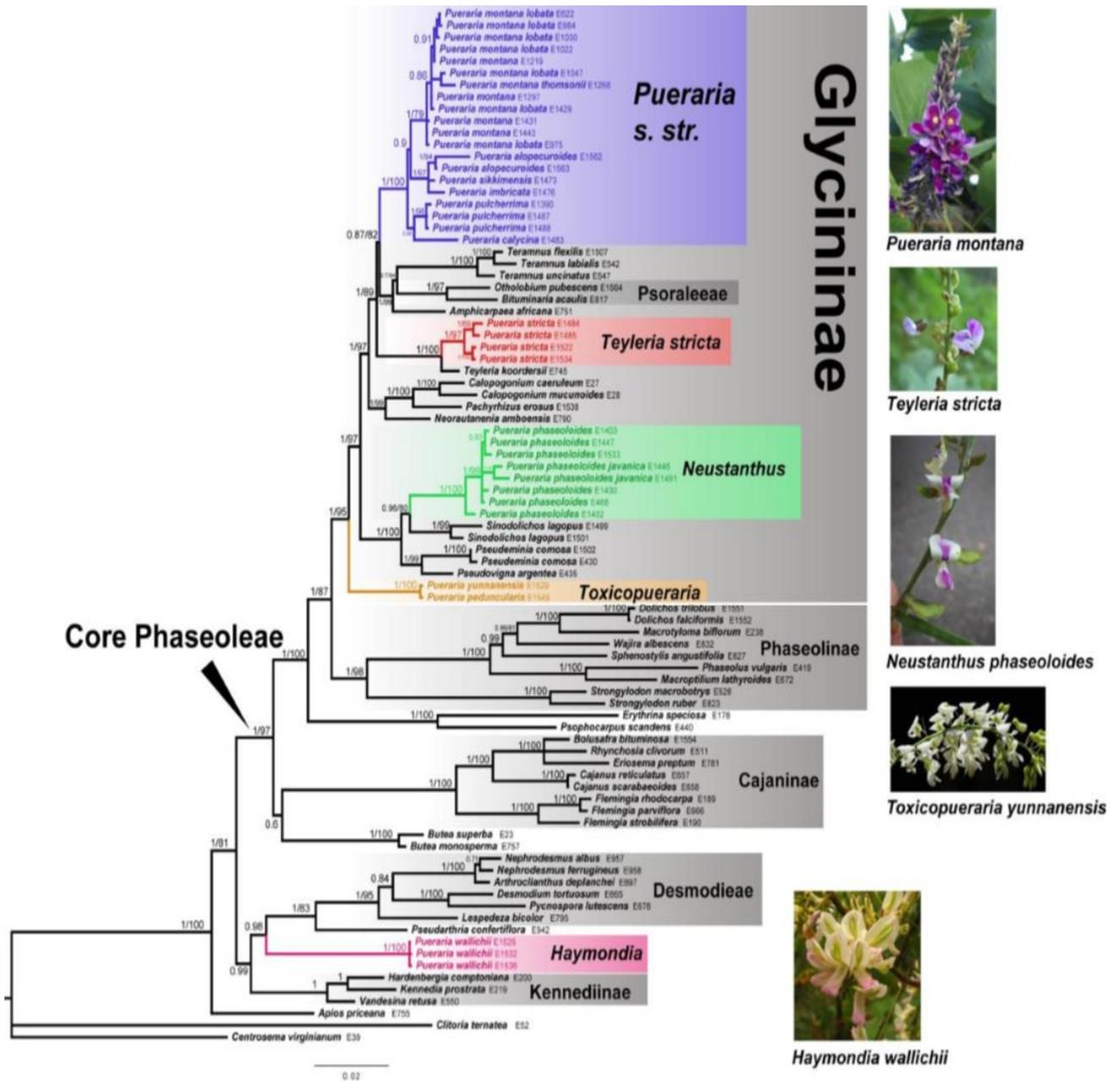


Figura 1: Árvore filogenética obtida por Egan e colaboradores para gênero *Pueraria* (EGAN et al., 2016).

## 2.2 *Pueraria phaseoloides*

### 2.2.1 DISTRIBUIÇÃO E TAXONOMIA

*Pueraria phaseoloides* (Kudzu tropical) é uma leguminosa forrageira nativa do leste e do sudeste da Ásia. Nas últimas décadas, devido ao seu potencial econômico e ecológico, foi introduzida em diversas regiões do mundo, como nos trópicos úmidos com a finalidade de recuperação de áreas degradadas e utilização como forragem (EMBRAPA, 1999).

Na filogenia apresentada por Egan et al. (2016), a espécie *P. phaseoloides* e suas variações foram consideradas um grupo monofilético que divergiu de *Pueraria* s.s. por volta de 13,4 milhões de anos. Benthán em 1852, já havia criado o gênero *Neustanthus* para acomodar esta espécie e suas variedades, assim como *P. peduncularis*, devido às diferenças na forma da vagem em relação às outras espécies do gênero *Pueraria*, mas em 1867, ele fundiu esses dois gêneros devido a um erro na descrição da morfologia da vagem em *P. tuberosa*, que é a espécie tipo do gênero.

Lackey (1977) e Maesen (1985) se basearam nos caracteres morfológicos do gênero: número de flores por nó, tipo de estípula, tipo cálice, tipo de vagem e forma de semente, encontraram dificuldades em agrupar todas as espécies, deixando *P. phaseoloides* e suas variedades, assim como outras espécies que possuíam características um pouco diferentes, separadas, não conseguindo agrupá-las.

Posteriormente, com novas espécies sendo descritas para o gênero, como: *P. xuzhunii* (OHASHI e IOKAWA, 2006), *P. bouffordii* (OHASHI, 2005) e *P. grandiflora* (PAN et al., 2015), estudos moleculares foram realizados, confirmando a polifilia do gênero (LEE e HYMOWITZ, 2001; EGAN et al., 2016). Assim, Egan e colaboradores (2016) sugeriram que *P. phaseoloides* e suas variedades fossem consideradas um gênero a parte de *Pueraria*, como foi feito anteriormente por Benthán, criando o gênero *Neustanthus*. Com isso, eles propõem que novas revisões taxonômicas para este grupo fossem feitas a partir de então, para que uma nova classificação seja utilizada.

## 2.2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Em seu habitat natural, *P. phaseoloides* é encontrada em beira de rios, estradas e florestas recultivadas (HALIM, 1997). Está presente nos dois hemisférios, desenvolvendo-se melhor entre as longitudes de 0° a 17° e a altitude pode variar de 0 a 1500 m (COOK et al., 2005). É uma planta de dia curto, tolerante a seca, podendo resistir também a pequenos períodos de inundação (HALIM, 1997; FAO, 2015). Em relação ao solo, ela se adapta em diferentes condições, desde arenosos até argilosos (COOK et al., 2005), é adequada para terrenos em condições ácidas (pH entre 3,5 e 5,5), não apresentado bom desempenho em solos salinos (HALIM, 1997).

Em relação à sua morfologia, Kudzu tropical é uma planta perene, trepadeira e/ou rasteira, com pilosidade hirsuta; suas raízes podem chegar até 2 m de profundidade, o seu caule principal pode ter 0,6 cm de espessura e quando em contato com o solo pode levar ao surgimento de novas raízes. As folhas são alternadas, trifolioladas, com estipelas persistentes, folíolos suborbiculares, os laterais são assimétricos e os do ápice são mucronados, seríceos nas duas faces, e a face abaxial prateada e pilosa. Suas inflorescências são racemosas axiais (7 - 42,5 cm) com as flores na metade superior da raque, agrupadas em nós proeminentes de 1-5 mm, variando de azuis a violáceas. Depois da polinização, as flores se transformam em um fruto (vagem) subcilíndrico pubescente com septos entre as sementes, que são de coloração castanha a negra e transversalmente oblongas (FAO, 2015; TOZZI et al., 2016).

Como *P. phaseoloides* possui um crescimento rápido e consegue também desenvolver-se em diferentes tipos de solo e clima, ela vem causando transtornos em alguns países, sendo considerada como erva daninha em diversas regiões como nos Estados Unidos (RANDALL, 2012), Costa Rica, Equador, Porto Rico e nas Ilhas do Pacífico (CABI, 2013).

Uma característica importante de *P. phaseoloides* é seu potencial de fixação de nitrogênio no solo, podendo fixar de 100 a 300 kg/ha, sendo assim de grande ajuda para recuperação de solos degradados (JORGENSEN, 2013). Em plantações em que a espécie de interesse possui porte de árvores, o kudzu tropical

tem dois papéis principais que envolvem: devolver o nitrogênio ao solo e fornecer matéria orgânica às árvores vizinhas (CABI, 2013).

Adicionalmente, as raízes de *P. phaseoloides* também são utilizadas na medicina tradicional chinesa, e os estudos da constituição química dessa planta relataram a presença de um constituinte ativo, a puerarina, pertencente à classe das isoflavonas (KINJO et al., 1987; OHSHIMA et al., 1988; HIRAKURA et al., 1997), tendo ação hipotérmica, espasmolítica, hipotensora e antiarrítmica (SI et al. 2006).

Como os demais flavonoides, as isoflavonas apresentam cadeia C6-C3-C6, porém, do tipo difenil-1,2-propano, e apresenta distribuição restrita a família Fabaceae, sendo a subfamília Faboideae com maior quantidade de espécies com esse metabólito (VEITCH, 2007). Apenas cinco espécies das outras subfamílias (Caesalpinioideae e Mimosoideae) apresentam essa característica (INGHAM, 1983; ILYAS et al., 1994; SHAFIULLAH et al., 1995).

Para a espécie *P. phaseoloides*, foram descritas dois tipos de isoflavonas envolvidas na atividade alelopática, sendo de grande valia sobre ervas daninhas (LOBO et al., 2003). Titan (1999) mostrou a existência de atividade alelopática em *Pueraria*, tanto nas sementes como na parte aérea, estando relacionadas à presença de flavonoides, esteroides e alcaloides.

O conhecimento sobre estes metabolitos em diferentes espécies é de grande valia no momento da escolha da melhor leguminosa a ser utilizada na formação de bancos de proteína das pastagens. Além disso, deve-se considerar, também, a produtividade de forragem da mesma, palatabilidade, competitividade com as plantas invasoras e tolerância a pragas e doenças, sendo uma boa estratégia na escolha de espécies leguminosas que tenham alta disponibilidade e qualidade de forragens no período de estiagem, principalmente em regiões tropicais em que as gramíneas secam (MONTEIRO et al., 2009).

O Kudzu tropical pode ser utilizado na formação de pastagens em associação com gramíneas, onde tem um efeito positivo no crescimento destas e permanece produtivo no período de seca das gramíneas, conferindo para o gado melhor nutrição o ano todo (TELFORD et al., 1947). A base da alimentação de bovinos no Brasil é feita principalmente por alimento volumoso, que utiliza de forragens, principalmente na forma de silagem como alternativa nos períodos de escassez, permitindo assim ao gado um alimento de qualidade durante esse período (ATHAYDE et al., 2015).

O Brasil vem ocupando posição de destaque tanto na produção agrícola quanto na pecuária, sendo esta última uma das suas principais atividades econômica (AGE/MAPA, 2014). Assim, a cada ano, novas cultivares de forrageiras vem sendo registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), uma vez que pesquisas relacionadas a um melhor desempenho dessas plantas como fonte de alimento para os rebanhos vem aumentando rapidamente, e possibilitando aos produtores uma melhor rentabilidade e redução dos prejuízos causados ao solo.

Desta forma, devido ao grande potencial de *P. phaseoloides* para a pecuária e o pouco conhecimento biológico, mais especificamente, citogenético para a espécie, destaca-se a importância de estudos básicos relacionados à mesma. Tais esforços facilitarão e viabilizarão futuros progressos relacionados à produção e ao desenvolvimento de programas de melhoramento de *P. phaseoloides*.

### **2.3 CITOGÉNÉTICA E CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTAS PARA O PRÉ-MELHORAMENTO**

A citogenética compreende os estudos relacionados aos cromossomos. Ela tem papel importante em trabalhos evolutivos e taxonômicos, no melhoramento, na identificação de poliploides e híbridos, na certificação da viabilidade reprodutiva de linhagens específicas por meio do comportamento meiótico e pós-meiótico entre outros (STEBBINS, 1971; GUERRA, 1988; MELO, 2001; SOARES-SCOTT et al., 2005; SOUZA et al., 2009). Em *Oxalis*, por exemplo, foi possível a identificação de diferentes números básicos entre as espécies (AZKUE, 2000). Para outros grupos vegetais, com essa ferramenta foi possível determinar a ocorrência de poliploidia em várias espécies, como relatado em *Erigeron thunbergii* (NISHIKAWA e SATO, 2003) e *Lippia alba* (PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014).

Com a coloração convencional é possível estudar o tamanho e o número cromossômico, a presença de constrição secundária e satélites, o nível de ploidia e posições dos centrômeros, ou seja, a visualização do cromossomo como um todo. Com os dados morfométricos obtidos, é possível a classificação de cada cromossomo e a detecção, por exemplo, de possíveis alterações cromossômicas

estruturais. No trabalho com algumas espécies do gênero *Lathyrus*, foi observado que apesar das espécies possuírem o mesmo número cromossômico ( $2n=14$ ), várias delas apresentavam diferenças estruturais em relação a sua morfologia cromossômica (BATTISTIN et al., 1996). A coloração convencional permitiu também nas angiospermas estudos de morfometria, onde a maioria dos cromossomos foram classificados como metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm), apresentando simetria mais uniforme dos cariótipos. Além disso, o comprimento médio dos cromossomos desse grupo de plantas pode variar de 0,6 a 14,6  $\mu\text{m}$  (WEISS-SCHNEEWEISS e SCHNEEWEISS, 2013).

Embora as técnicas convencionais ajudem na classificação de espécies de diferentes grupos vegetais, muitas vezes estes dados podem não ser suficientes para uma análise mais detalhada, o que pode acontecer quando os cromossomos são muito pequenos ou parecidos entre si. Desta forma, técnicas como os bandeamentos C e bandeamentos com fluorocromos específicos, permitem a identificação de blocos com coloração diferenciada, possibilitando um padrão de bandas mais detalhada da morfologia cromossômica e permitindo a identificação de regiões específicas (ZANELA, 2009).

Estes procedimentos têm como alvo o estudo da heterocromatina constitutiva, que é caracterizada por permanecer fortemente condensada durante o ciclo celular, além de ser pobre em genes, sendo importante na caracterização dos cromossomos (COELHO, 2009). Essas regiões heterocromáticas podem ser compostas de repetições de DNA *in tandem*, que está presente em algumas regiões como nos centrômeros e nos telômeros (SUMNER, 2003).

Os fluorocromos mais utilizados são o 4'-6' diamidino-2-10-fenilindol (DAPI), que reconhece regiões heterocromáticas ricas em bases AT, e a cromomicina A3 ( $\text{CMA}_3$ ), que tem afinidade pelas regiões heterocromáticas ricas em bases GC (GUERRA, 2000; GUERRA e SOUZA, 2002). Guerra (1993) conseguiu classificar espécies de *Citrus* através do bandeamento com fluorocromos, onde foi possível verificar diferenças na quantidade e padrão de bandas para cada uma.

Nas últimas décadas, com o desenvolvimento de novas técnicas citogenéticas associadas à área molecular, como as técnicas de FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente) e GISH (Hibridização *in situ* Genômica), obteve-se uma melhora na sensibilidade e qualidade dos dados gerados (DONG et al., 2001; SOARES-SCOTT, 2005), sendo possível observar regiões específicas de DNA e a

identificação de alterações nos cromossomos (BENNET, 1995; STACE, 2000; KATO et al., 2005; YOUNIS et al., 2015) que não eram possíveis com os bandeamentos. Em *Vigna unguiculata*, por exemplo, a análise por FISH revelou a existência de três pares de sítios de DNAr, antes não detectados como constrições secundárias (GARCIA et al., 2009). A determinação da distribuição e variação dos sítios de DNAr 5S e 45S, ajudaram na compreensão da evolução em espécies de *Phaseolus*, onde a variação desses sítios entre as espécies pode estar relacionada a uma possível inversão pericentromérica (ALMEIDA e PEDROSA-HARAND, 2010).

A FISH permite localizar através da utilização de substâncias fluorescentes, sequências específicas de DNA ou RNA de genes ribossômicos como DNAr 5S e 45S, e de sequências repetitivas *in tandem*, como as teloméricas e centroméricas, ajudando assim na construção de mapas físicos cromossômicos e na diferenciação de espécies, que apresentam o mesmo número cromossômico, mas quantidade e posição das sequências diferentes (BRASILEIRO-VIDAL e GUERRA, 2002; RIEGEL, 2014). Para detectar essas sequências de interesse (alvo), isola-se uma parte específica do DNA que será marcada com uma molécula sinalizadora (sonda) que permite a identificação da sequência alvo do genoma estudado (SPEICHER e CARTER, 2005).

Diversas questões podem ser estudadas com esta técnica em plantas, sendo bastante utilizada em programas de melhoramento e análises filogenéticas/evolutivas (LEITCH et al., 1994). Em *Passiflora*, por exemplo, a quantidade e a localização dos sítios de DNAr 45S foram utilizados para inferir que o número diploide de  $2n=12$  representa provavelmente o genoma ancestral (MELO e GUERRA, 2003). Almeida e Pedrosa-Harand (2010) estabeleceram um mapa citogenético comparativo entre espécies de *Phaseolus*, contribuindo para a compreensão da evolução do gênero.

A estimativa de quantidade de DNA também vem sendo muito utilizada na caracterização de plantas e em estudos taxonômicos e evolutivos, onde o valor C de DNA, ou seja, o tamanho do genoma, tem um significado biológico fundamental. Além disso, o conhecimento da quantidade de DNA nuclear, de um grupo de organismos, pode ser útil em vários campos da genética permitindo análises da quantidade de DNA, contagem de células, nível de ploidia, estudo do ciclo celular e outros (YANPAISAN et al., 1999; DOLEZEL e BARTOS, 2005; SUDA e TRAVNICEK, 2006; LEPERS-ANDRZEJEWSKI et al., 2011).

Em plantas, basicamente, a técnica consiste no isolamento dos núcleos e coloração destes com um fluorocromo específico para DNA, e na leitura da intensidade de fluorescência emitida. Esta técnica tem se mostrado eficiente devido à sua precisão e rapidez para a preparação das amostras (DOLEZEL et al, 1998; DOLEZEL, 2007).

A aplicação desta técnica em associação às metodologias citogenéticas tem permitido, por exemplo, evidenciar a ocorrência de variabilidade intraespecífica (DOLEZEL e BARTOS, 2005; DOLEZEL, 2007), como em *Glycine max*, *Gibasis venestula*, *Poa annua* e *Collinsia verna*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Capsicum annum*, *Myrsine coriácea*, *Helleborus*, *Festuca* (BENNETT, 1985; ZONNEVELD et al., 2001; LOUREIRO et al., 2007; SPADETO, 2015), como também diferenças interespecíficas no tamanho do genoma de vários grupos taxonômicos vegetais (VOGLMAYR, 2000), sendo útil nos esclarecimentos dos impasses de caracterização taxonômica (LEPERS-ANDRZEJEWSKI et al., 2011).

Adicionalmente, a citometria também tem sido empregada em estudos para a identificação de hibridações e duplicações cromossômicas. Barre e colaboradores (1998), por exemplo, identificaram híbridos resultantes do cruzamento entre duas espécies diploides de café, *Coffea liberica*  $2C=1,42$  pg e *Coffea pseudozanguebariae*  $2C=1,13$  pg, enquanto, outros autores obtiveram sucesso na identificação, caracterização e confirmação de poliploides induzidos ou naturais, como observado em *Pfaffia glomerata* (GOMES et al, 2014), *Siphonochilus aethiopicus* (HANNWEG et al., 2016), em *Salix* (THIBAUT, 1998), *Medicago sativa* (HAVANANDA et al., 2011) e *Lippia alba* (REIS et al., 2014).

Dentro das angiospermas já se sabe que o tamanho do genoma varia cerca 2400 vezes ( $1C = 0,062 - 152,23$  pg) (DODSWORTH, 2015), sendo o menor valor descrito para *Genlisea tuberosa* (FLEISCHMANN et al., 2014) e o maior observado em *Paris japonica* (PELLICER et al, 2010).

Embora estudos relacionados à determinação da quantidade de DNA em plantas tenham aumentado nas últimas décadas (HIDALGO, 2017), para o gênero *Pueraria*, por exemplo, onde atualmente apenas a espécie *P. lobata* tem essa informação. Assim como para os dados de caracterização citogenética de suas espécies, em que apenas o número cromossômico de algumas espécies foi descritas, fazendo se necessário um incremento do conhecimento deste grupo com espécies promissoras economicamente.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar citogeneticamente oito populações brasileiras de *Pueraria phaseoloides*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estimar o conteúdo de DNA nuclear.
- Confirmar o número cromossômico da espécie.
- Determinar a fórmula cariotípica.
- Caracterizar o padrão de bandas heterocromáticas.
- Mapear os sítios de DNA ribossomal 45S e 5S.
- Determinar a posição de sequências teloméricas.
- Comparar os dados obtidos entre as oito populações estudadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas sementes de oito populações de *Pueraria phaseoloides* provenientes de diferentes regiões do país, como pode ser visto na Figura 2 e na Tabela 1, temos as suas localizações. As sementes dos estados de São Paulo, Rondônia e Acre foram obtidas de empresas que trabalham com essa espécie comercialmente, e as populações de Minas Gerais foram coletadas em fazendas dessas regiões.

As análises citogenéticas e a estimativa da quantidade de DNA foram realizadas no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora.

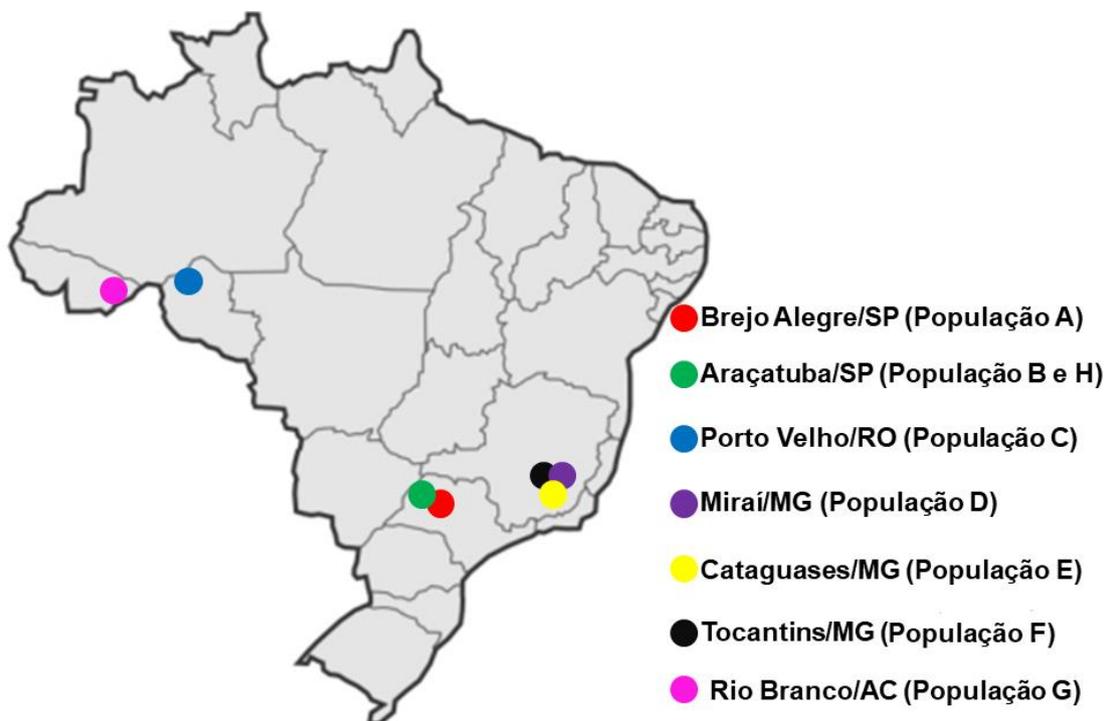


Figura 2: Regiões das populações estudadas de *Pueraria phaseoloides*.

Tabela 1: Localização das oito populações estudadas de *Pueraria phaseoloides*.

População	Cidade	Estado	Latitude (Sul)	Longitude (Oeste)
Pop. A	Brejo Alegre	SP	21° 09' 59"	50° 11' 07"
Pop. B	Araçatuba	SP	21° 12' 32"	50° 25' 58"
Pop. C	Porto Velho	RO	08° 45' 43"	63° 54' 14"
Pop. D	Miraí	MG	21° 11' 43"	42° 36' 51"
Pop. E	Cataguases	MG	21° 23' 21"	42° 41' 48"
Pop. F	Tocantins	MG	21° 10' 30"	43° 01' 04"
Pop. G	Rio Branco	AC	09° 58' 29"	67° 48' 36"
Pop. H	Araçatuba	SP	21° 12' 32"	50° 25' 58"

#### 4.2 ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA

Para determinar a quantidade de DNA das populações de *P. phaseoloides*, sementes foram esterilizadas em hipoclorito de sódio a 3% por 2 min e álcool 70% por 1 min, e germinadas *in vitro*, em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Em seguida, folhas de plântulas com aproximadamente 3 meses (Figura 3) foram maceradas juntamente ao tecido foliar do padrão interno de referência, *Pisum sativum* cv. Ctirad (9.09 pg de DNA) (DOLEZEL et al. 1998), em 700 µL do tampão WPB (LOUREIRO et al., 2007). O tecido macerado foi filtrado em uma malha de 50 µm e o produto do filtrado coletado em um tubo de poliestireno. A coloração dos núcleos da suspensão celular foi realizada com a adição de 25 µL de iodeto de propídio (1mg/mL). Além disso, 5 µL de RNase (1mg/mL) foram acrescentados à mistura com a finalidade de diminuir possíveis interferências ocasionados por moléculas de RNA durante a leitura das amostras.



Figura 3: *Pueraria phaseoloides* cultivada *in vitro* em meio MS.

As análises foram realizadas em triplicatas a partir de 7 indivíduos de cada população. Nesta etapa, pelo menos 10.000 núcleos foram analisados por amostra, em citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, EUA). Os histogramas gerados foram analisados utilizando-se o programa CytExpert 2.0.1 e o conteúdo de DNA obtido segundo a fórmula proposta por DOLEZEL e BARTOS (2005):

$$\text{Amostra (2C)} = \frac{\text{Valor observado no canal do pico da espécie}}{\text{Valor observado no canal do pico do padrão}} \times \text{Quantidade de DNA do padrão interno}$$

Para a comparação da quantidade de DNA entre as populações estudadas, foi realizada análise de variância (ANOVA) através do software PAST, com nível de significância de 5%.

### 4.3 PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Para a obtenção de metáfases mitóticas bem espalhadas, sementes de cada população de *Pueraria phaseoloides* foram germinadas em placas de Petri forradas com papel de filtro e umedecidas com água destilada. Após a germinação, raízes com aproximadamente 0,5 cm foram coletadas e tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ Sigma®), na concentração de 3 mM, por 22 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução fixadora Carnoy constituída de etanol e ácido acético (3:1 v/v), e armazenadas a temperatura de -20°C, por no mínimo 24h.

Após o tempo descrito para fixação, o material foi lavado em água destilada e digerido em solução enzimática 2% (p/v) celulase Onozuka R-10 (Serva®) / 20% (v/v) pectinase (Sigma®) à 37°C por 3 h 30 min. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular com secagem ao ar (CARVALHO, 1995) e coradas com Giemsa 5% durante 5 minutos. Foram avaliadas 20 metáfases por população em microscópio ótico Olympus BX 51.

### 4.4 MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA

Para a confirmação do número cromossômico em *P. phaseoloides*, foram observadas pelo menos 20 metáfases de cada população em estudo.

Após a obtenção das metáfases cromossômicas, foram realizadas análises morfométricas para os cromossomos das oito populações estudadas. Para isso, foram obtidos: o comprimento do lote haploide (CLH); o comprimento do braço curto (BC); o comprimento do braço longo (BL); o comprimento total do cromossomo (CT = BL+BC); a relação entre braços ( $r = BL/BC$ ); o índice centromérico (IC =  $[BC/CT] \times 100$ ) e o comprimento relativo dos cromossomos (CR =  $[CT/CLH] \times 100$ ) (LEVAN et al., 1964).

O grau de assimetria do cariótipo (A) foi estimado de acordo com o proposto por Watanabe et al. (1999), onde  $A_i = (BL-BC) / (BL+BC)$  e  $A = (1/n) \sum A_i$  (podendo variar de 0, cariótipo simétrico, a 1, cariótipo assimétrico), sendo n o

número haploide de cromossomos para a espécie. A caracterização do tipo cromossômico foi realizada segundo Levan et al. (1964), onde os pares de cromossomos homólogos foram classificados quanto a posição do centrômero, utilizando a relação de braços: cromossomos metacêntricos (m) quando a razão de braços variou entre 1 a 1,7; submetacêntricos (sm) quando esta razão variou de 1,71 a 3,0; subtelocêntrico (st) quando a variação foi de 3,01 a 7,0 e em acrocêntrico (a) quando a razão entre os braços foi superior a 7,0.

Para a montagem do idiograma e cariogramas, os cromossomos foram ordenados pelo tamanho do braço curto (dispostos do maior braço curto para o menor).

#### **4.5 BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO COM CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI**

Para a determinação do padrão de bandas heterocromáticas, foi realizada a coloração com CMA<sub>3</sub>/DA e DAPI conforme o procedimento descrito por Schweizer (1976). Com as lâminas envelhecidas por pelo menos 3 dias, foram aplicados 30 µL de CMA<sub>3</sub> (0,1 mg/mL), cobrindo-as com lamínulas plásticas e mantendo-as à temperatura ambiente, em câmara escura por um período de 1h. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada e secas ao ar. Em seguida, foram adicionados, em cada lâmina, 30 µL de Distamicina (0,1 mg/mL) e as mesmas incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente em câmara escura. Sequencialmente, após lavagem, foram aplicados 30 µL da solução de DAPI (0,1 mg/mL) por lâmina, as quais foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente em câmara escura. As lâminas foram montadas em meio antifade (30 µL) e armazenadas em um refrigerador por pelo menos 3 dias para serem analisadas em microscopia de fluorescência (Olympus BX 51) com filtros específicos para o fluorocromo DAPI (360 a 390 nm) e o CMA<sub>3</sub> (430 a 480 nm). As imagens foram capturadas com uma câmera Olympus DP72 acoplada ao microscópio fluorescência.

#### 4.6 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

A Hibridização fluorescente *in situ* foi realizada segundo Jiang et al. (1995) com algumas modificações. As sondas para a localização de regiões de DNAr no genoma de *P. phaseoloides* foram periodicamente obtidas a partir de cepas de *Escherichia coli* transformadas para este fim. Foram utilizadas sondas contendo a região DNAr 18s de *Triticum aestivum* e DNAr 5S de *Zea mays* gentilmente cedidas pelo Dr. Jiming Jiang, University of Wisconsin, USA.

Para a desnaturação dos cromossomos, cada lâmina recebeu 100 µL de formamida 70%, sendo incubadas posteriormente em estufa (80-85°C) por 1 minuto, e submetidas, em seguida, à seguinte série alcóolica (etanol): 70% - gelado, 90% e 100% - temperatura ambiente; por 5 min cada.

A mistura de hibridização foi composta de formamida deionizada 100%, dextran sulfato 50%, 20x SSC, sonda e água ultrapura (Tabela 2), que foi desnaturada 10 min à 90°C. Cada lâmina recebeu 19 µL da mistura de hibridização já desnaturada no termociclador e foi selada com lamínula de vidro. Em seguida as lâminas foram mantidas em uma câmara escura e úmida em estufa a 37°C por, no mínimo, 24h. Passado o período de incubação, as lâminas passaram por banhos em soluções salinas (2x SSC) à temperatura ambiente por 5 min e à 42°C por mais 5 min, para remoção do excesso de sonda.

Tabela 2: Solução para hibridização *in situ* florescente.

Reagente	Volume
Formamida deionizada 100%	10 µL
Dextran sulfato 50%	4 µL
20x SSC	2 µL
Sonda	1 µL
Água Ultrapura	2 µL

As sequências teloméricas foram amplificadas a partir de iniciadores complementares entre si (sense: telomérico F 5'CCCTAAA3' e anti-sense: telomérico R 5'GGGATTT3') de *Arabidopsis* sp. Para a amplificação, uma mistura contendo: *primers* teloméricos F e R, enzima Taq DNA polimerase, Dntps, tampão de reação da enzima Taq DNA polimerase, solução de MgCl<sub>2</sub> e água ultrapura

(Tabela 3) foi submetido à reação no termociclador durante 3h com as seguintes condições:

- 10 ciclos de:
  - 94°C (5 min) - Desnaturação;
  - 94°C (1 min) - Desnaturação;
  - 55°C (30 s) – Anelamento dos *primiers*;
  - 72°C (1 min) – Elongação.
- 35 ciclos de:
  - 94°C (1 min) - Desnaturação;
  - 60°C (30 s) – Anelamento dos *primiers*;
  - 72°C (1 min e 30 s) – Elongação.

A extensão final foi realizada a 72°C durante 5 min. Ao final da reação, fragmentos de DNA telomérico de diversos tamanhos foram obtidos. A sonda foi marcada com reação de nick-translation.

Tabela 3: Reagentes para reação de amplificação das sequências teloméricas.

Reagente	Concentração	Volume
<i>Primers</i> teloméricos F e R	100 mM cada	0,2 µL cada
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	5 U/µL	0,4 µL
Dntps	2 mM cada	1 µL cada
Tampão de reação da enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	10x	5 µL
Solução de MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 µL
Água Ultrapura	-	37,7 µL

A detecção das sondas ocorreu por meio da seguinte mistura: 20 µL de TNB Buffer 5x, 80 µL de ddH<sub>2</sub>O e 1 µL de Rhodamina anti-DIG, cada lâmina recebeu 101 µL da solução de detecção. As lâminas foram novamente incubadas em uma câmara escura e úmida a 37°C, por 1h, e em seguida lavadas em três banhos a temperatura ambiente em 1xTNT (5 min cada), e depois uma lavagem em 1x PBS (5 min). Cada lâmina foi contracorada com 20 µL de DAPI com Vectashield.

O material foi mantido em câmara úmida e escura na geladeira até ser analisado. A visualização das marcas da FISH foi realizada em microscopia de fluorescência (Olympus BX 53) e as imagens foram capturadas com a câmera

Olympus DP72 acoplada ao microscópio. Foram analisadas pelo menos 10 metáfases representativas de cada população, utilizando o software Imagepro-plus.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA

O padrão interno utilizado, *Pisum sativum* ( $2C = 9,09$  pg), mostrou-se eficiente para mensurar a quantidade de DNA de *P. phaseoloides*. As suspensões nucleares forneceram histogramas com picos G0/G1 bem definidos. Os gráficos analisados (Figura 4) mostraram dois picos dominantes, que correspondem aos núcleos que estão na fase G1 do ciclo celular de *Pueraria phaseoloides* e de *Pisum sativum*. O conteúdo de DNA das oito populações de *Pueraria phaseoloides* variou de 3,08 a 3,38, apresentando um conteúdo médio  $2C = 3,20$ pg (Tabela 4).

Para a verificação das diferenças entre as médias do conteúdo de DNA entre as populações, foi realizada análise de variância (ANOVA), não sendo apontadas diferenças significativas para valores obtidos para as populações estudadas.

Em relação aos coeficientes de variação (CV) para as amostras lidas, foi observado um CV médio de 2,72.

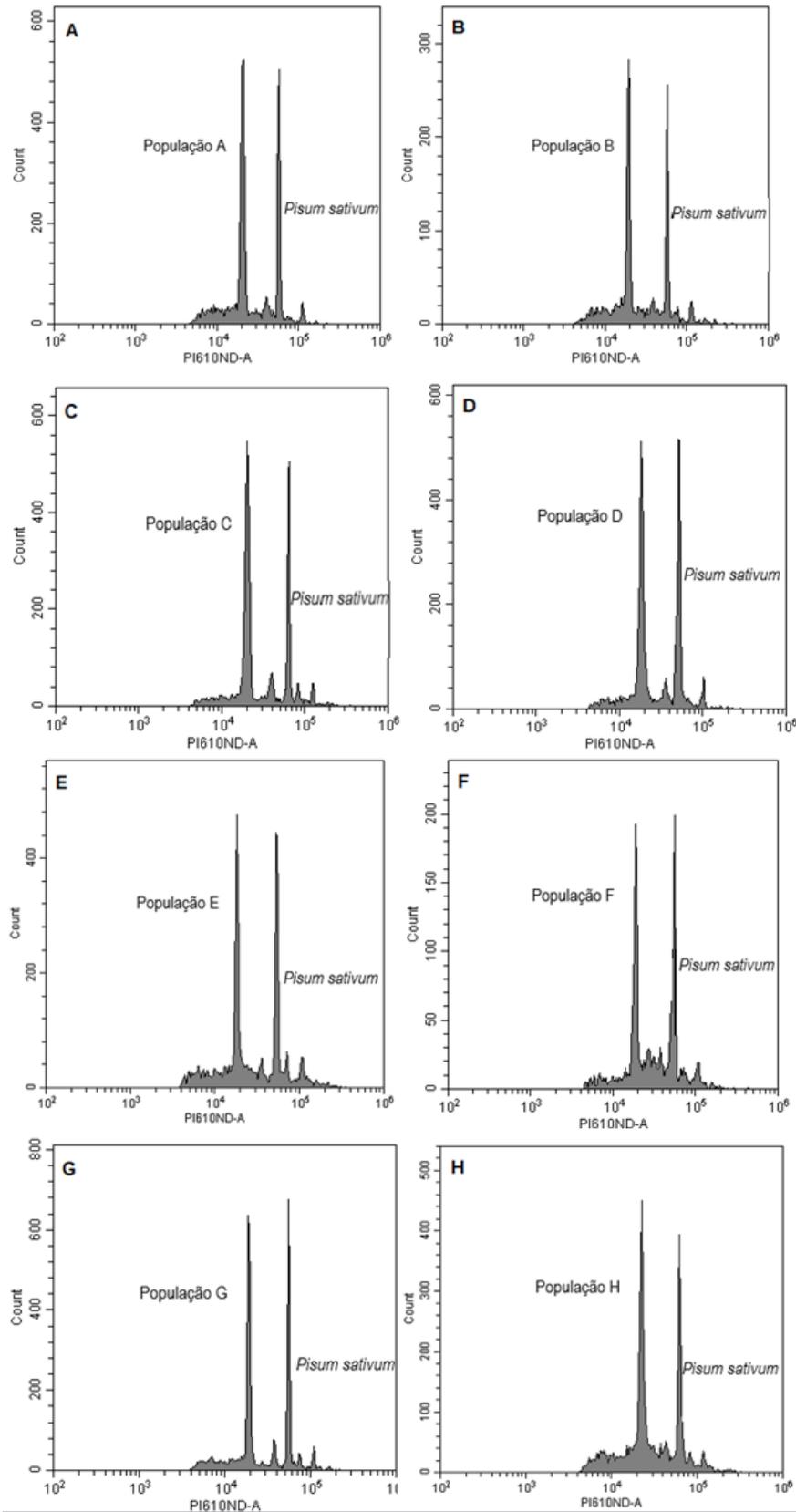


Figura 4: Histogramas representativos da estimativa da quantidade de DNA de *Pueraria phaseoloides*: A- População A com 3,38pg.; B- População B com 3,28pg.; C- População C com 3,27 pg.; D- População D com 3,20pg.; E- População E com 3,08pg.; F- População F com 3,13pg.; G- População G com 3,18pg.; H- População H com 3,09pg. (*Pisum sativum* 2C = 9,09 pg.)

Tabela 4: Valor da quantidade de DNA 2C das oito populações de *Pueraria phaseoloides*.

<b>Acesso</b>	<b>Nº crom.</b>	<b>Valor DNA 2C (pg)</b>	<b>CV* (%)</b>
População A	2n = 22	3,38	2,70
População B	2n = 22	3,28	2,69
População C	2n = 22	3,27	2,94
População D	2n = 22	3,20	2,94
População E	2n = 22	3,08	2,89
População F	2n = 22	3,13	2,30
População G	2n = 22	3,18	2,68
População H	2n = 22	3,09	2,67

\*CV = coeficiente de variação do pico G1.

## 5.2 CONTAGEM E MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA

As oito populações aqui estudadas, apresentaram plantas com 22 cromossomos ( $2n = 2x = 22$ ) (Figura 5). Foi observada também a presença de regiões com fragilidade em alguns cromossomos: constrições secundárias no par de cromossomo 8 e nas regiões centroméricas da maioria dos cromossomos, sendo mais comum nos pares de cromossomos 2; 4; 5 e 6.

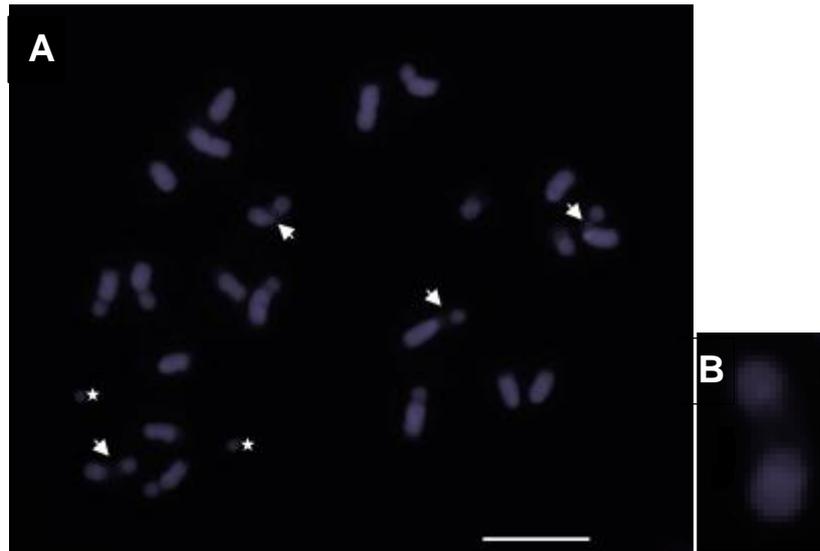


Figura 5: A - Metáfase mitótica de *Pueraria phaseoloides* com  $2n = 22$  cromossomos. Setas indicam o alongamento dos centrômeros e as estrelas o alongamento das RONS. B - Em evidência, um cromossomo com distensão na região do centrômero. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

De modo geral, o comprimento médio dos cromossomos das populações variou de 2,50  $\mu\text{m}$  (cromossomo 11) a 3,70  $\mu\text{m}$  (cromossomo 1) e o comprimento relativo destes cromossomos em relação ao tamanho do genoma variou de 7,20% (cromossomo 11) a 10,64% (cromossomo 1). O comprimento médio do conjunto haploide foi 34,81  $\mu\text{m}$ .

Com bases nas medidas morfométricas, foi obtida a fórmula cariotípica,  $FC = 2m + 9sm$  (2 pares metacêntricos e 9 pares submetacêntricos). Os parâmetros gerais do cariótipo de *P. phaseoloides* estão listados na Tabela 5. O índice de assimetria mostrou um cariótipo simétrico, com  $A = 0,15$ .

Tabela 5: Dados morfométricos médios dos cromossomos das oito populações de *Pueraria phaseoloides*.

<b>Cromossomo</b>	<b>BC</b>	<b>BL</b>	<b>CT</b>	<b>R</b>	<b>IC</b>	<b>CC</b>	<b>CR</b>	<b>HC</b>
1	1,64	2,06	3,70	1,25	44,40	M	10,64	0,11
2	1,36	2,08	3,45	1,52	39,63	M	9,92	0,20
3	1,21	2,42	3,63	1,99	33,42	SM	10,44	0,32
4	1,11	2,23	3,34	2,01	33,20	SM	9,61	0,32
5	1,05	2,04	3,10	1,93	34,11	SM	8,91	0,31
6	1,01	1,99	3,01	1,96	33,73	SM	8,65	0,32
7	0,98	2,28	3,27	2,31	30,13	SM	9,40	0,39
8	0,96	2,09	3,05	2,17	31,50	SM	8,78	0,36
9	0,92	2,06	2,99	2,23	30,95	SM	8,59	0,38
10	0,87	1,84	2,72	2,09	32,28	SM	7,81	0,35
11	0,78	1,72	2,50	2,20	31,17	SM	7,20	0,37
<b>CLH</b>			34,81					
<b>Assimetria</b>								0,15
<b>Cariotípica</b>								

\*Comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo (CT); relação entre os braços (R); índice centromérico (IC); classificação do cromossomo (CC); comprimento relativo do cromossomo (CR); heterogeneidade cromossômica (HC); comprimento do lote haploide (CLH), metacêntrico (M); submetacêntrico (SM).

### 5.3 BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO COM CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI

Em relação às bandas CMA<sub>3</sub>, foram observadas marcas positivas em todos os 22 cromossomos (Figura 6). Observamos que duas bandas apresentavam uma marca mais forte, sendo classificada como CMA<sup>++</sup> em um dos pares cromossômicos, os outros 20 cromossomos, encontramos marcas CMA<sub>3</sub> com intensidade mais moderada, que variaram também em tamanho. Estas bandas foram então classificadas como CMA<sup>+</sup>. Para todas as populações, os cromossomos 1, 2 e 6 apresentaram duas bandas CMA<sup>+</sup>, uma em cada um dos braços, o cromossomo 8 apresentou a banda CMA<sup>++</sup> no braço curto, e os demais apresentam uma única marca CMA<sup>+</sup> no braço longo. As colorações, realizadas com os fluorocromos no presente trabalho, demonstraram com mais eficiência a ocorrência de estiramentos nos centrômeros de alguns cromossomos (Figura 5).

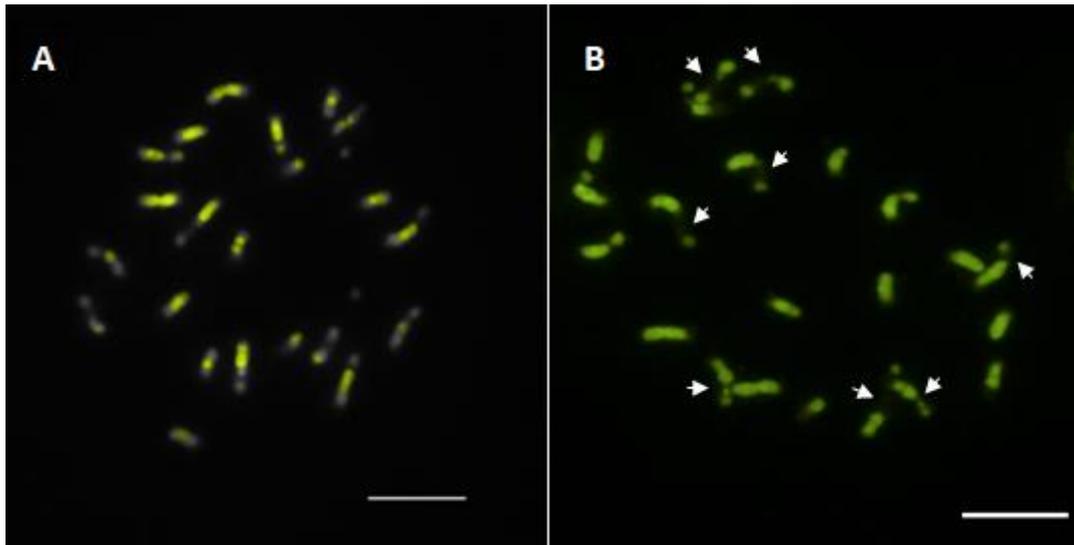


Figura 6: Metáfases de *P. phaseoloides*: (A) sobreposição evidenciando as regiões CMA<sub>3</sub> positivas; (B) metáfase corada com CMA, setas indicam o alongamento dos centrômeros. Barra = 10 µm.

#### 5.4 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE

A Hibridização *in situ* fluorescente com a sonda para DNA ribossomal 5S permitiu a identificação de um par de cromossomos (braço longo do par 9) com sítios subterminais, enquanto para sonda de DNA ribossomal 45S, observou-se um par de sítios pericentroméricos no braço curto do par de cromossomos número 8. As marcas de DNAr 45S apresentaram-se bem maiores quando comparados àquelas observados para sítios de DNAr 5S, além de ser possível a visualização do sítio frágil nessa região (Figura 7). Com a utilização da sonda telomérica foram detectadas marcas tanto nas extremidades de cada cromossomo, quanto nas proximidades da região dos centrômeros dos cromossomos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (sinais teloméricos intersticiais) (Figura 7), sendo encontrado, também, um padrão de marcas maiores nestes cromossomos, exceto no 3. Quando comparados os tamanhos de sequências teloméricas intersticiais e terminais, foram observados variações (Figuras 7 e 8).

Com os dados obtidos das análises morfométricas, bandeamento e a FISH, foi possível a montagem do idiograma e cariogramas para a espécie (Figuras 8 e 9).

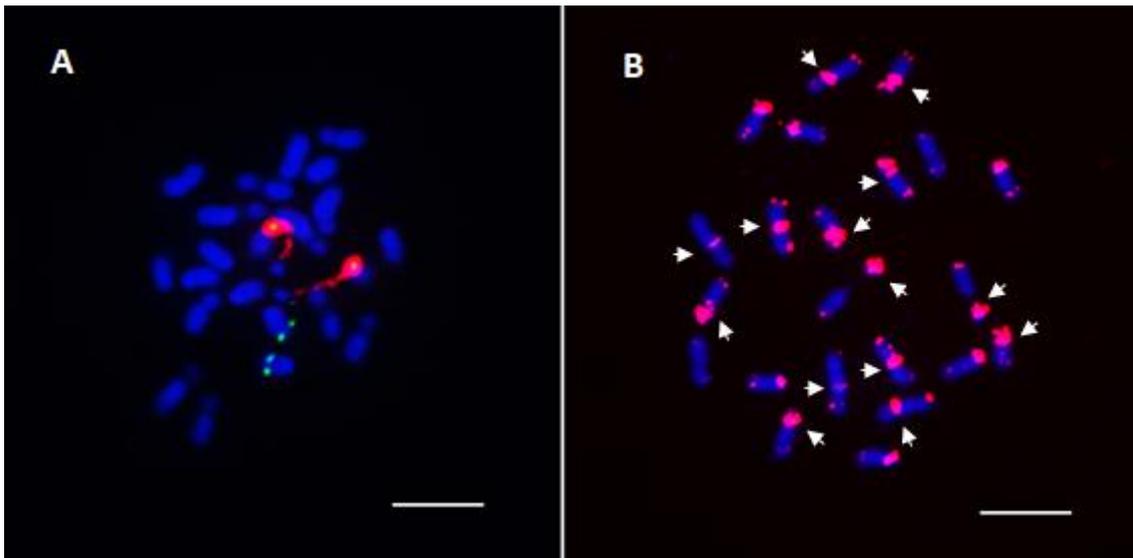


Figura 7: Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) em metáfases de *P. phaseoloides* evidenciando as regiões contendo: (A) Sítios de DNAr 5S (marcação pseudocolorizada em verde) e 45S (marcação em vermelho); (B) Sequências de DNA telomérico (setas indicam a presença de sequências intersticiais). Barra = 10 μm.

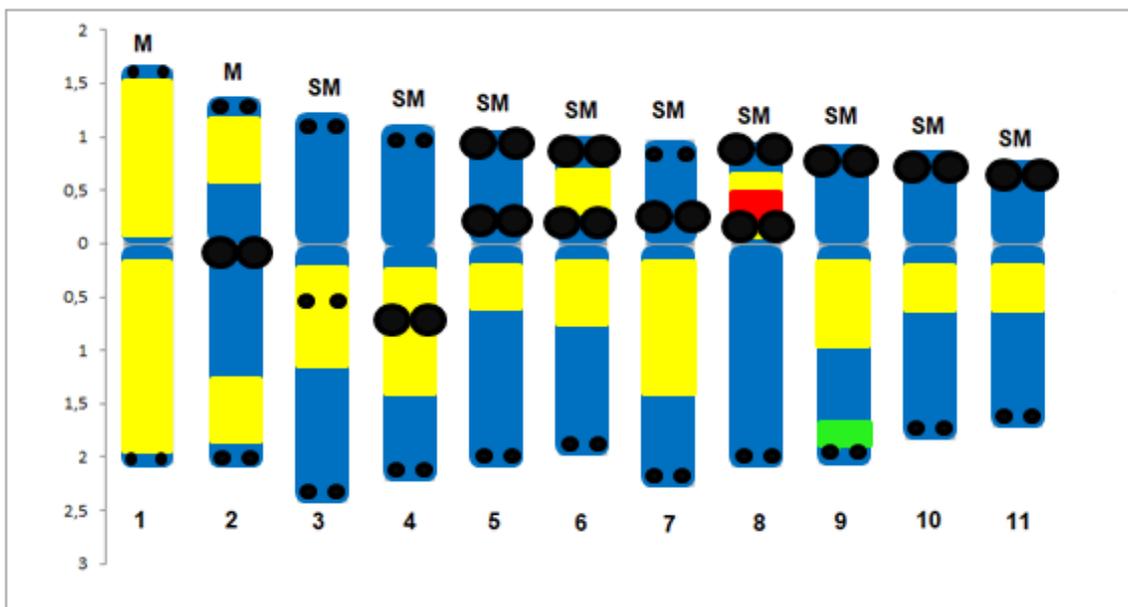


Figura 8: Idiograma representativo dos cromossomos de *P. phaseoloides*. Retângulo amarelo = Bandas CMA, retângulo vermelho = DNAr 45S, retângulo verde = DNAr 5S e círculos pretos = sequências teloméricas. M = metacêntrico e SM = submetacêntrico.

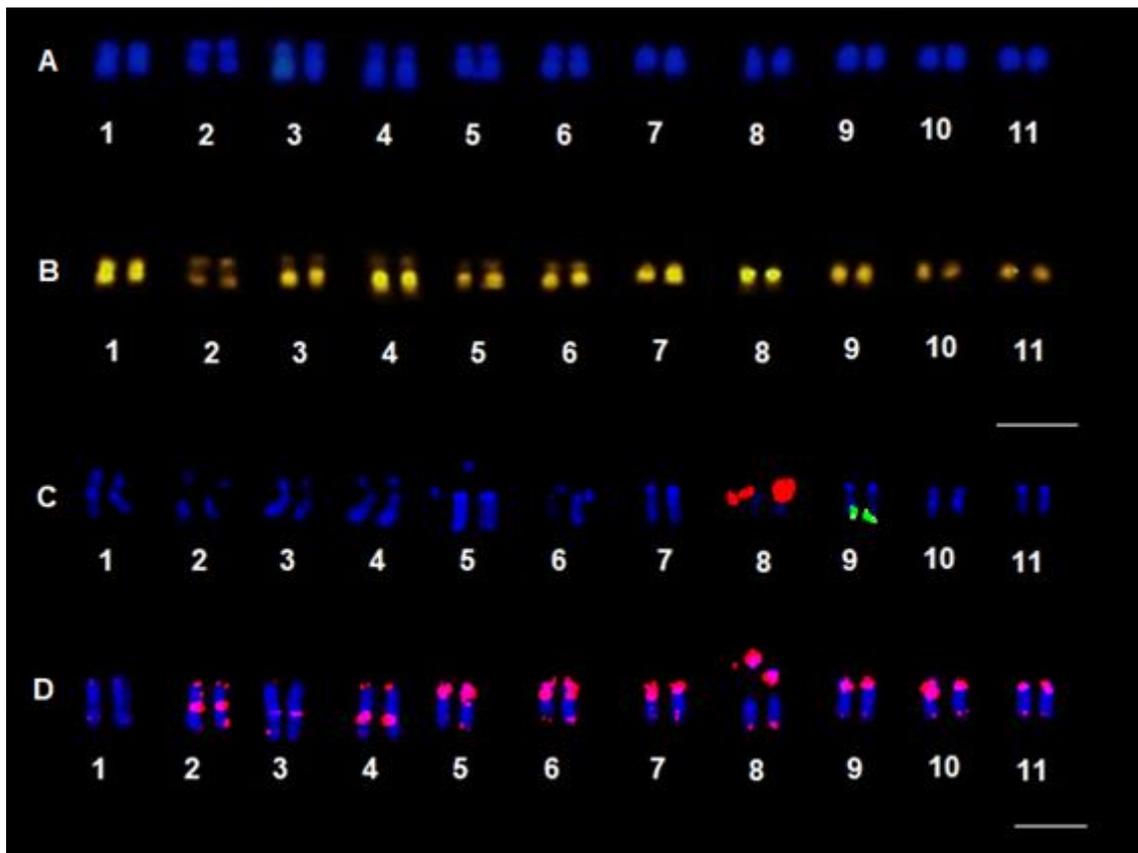


Figura 9: Cariogramas de *Pueraria phaseoloides*. A – Cromossomos corados com DAPI; B – Cromossomos corados com CMA; C – Cromossomos corados com DAPI e hibridizados com sondas de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho); D- Cromossomos corados com DAPI e hibridizados com sondas de seqüências teloméricas (vermelho).

## 6 DISCUSSÃO

Para todas as populações estudadas no presente trabalho, os dados cromossômicos foram muito similares, indicando que *P. phaseoloides* é uma espécie estável citogeneticamente.

O número cromossômico  $2n=22$ , encontrado neste trabalho para *P. phaseoloides*, não difere do apresentado por Lackey (1977) e Duke (1981), embora outros autores tenham relatado número diferente para ela. Essa diferença na contagem pode estar relacionada com o preparo da técnica ou pelo fato desta espécie apresentar distensões cromossômicas. Até o momento, o número cromossômico era a única informação relacionada à citogenética desta espécie. Em relação ao gênero *Pueraria*, estes dados também são escassos, sendo registrados  $2n=22$  para *P. montana* var. *lobata* (OHMIDO et al., 2013),  $2n=20$  para *P. stricta* e  $2n=24$  para *P. tuberosa* (LACKEY, 1977).

Dados da literatura indicam que algumas espécies e gêneros da família Fabaceae apresentam este mesmo número cromossômico, dentre estes, os gêneros *Cratylia* (VARGAS, 2005), *Camptosema*, *Galactia* (GOLDBLATT, 1981) e a maioria das espécies do gênero *Phaseolus* (BONIFACIL et al., 2012). Dentro da subfamília Papilionoideae, a tribo Phaseoleae, à qual pertence o gênero *Pueraria*, possui números básicos  $x=10$  ou  $x=11$  (BRUNEAU et al., 1995), sendo  $2n=22$  o número cromossômico mais comum para as espécies desta tribo. Assim, levando em conta o número básico  $x=11$  para a tribo Phaseoleae, podemos considerar que *Pueraria phaseoloides* é uma espécie diploide.

O cariótipo de *P. phaseoloides* mostrou-se simétrico, apresentando a fórmula cariotípica  $FC = 2m + 9sm$ , sem ocorrência de cromossomos acrocêntricos ou subtlocêntricos. De acordo com Paszko (2006), em um cariótipo simétrico há a prevalência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos com tamanhos parecidos. Bairiganjan e Patnaik (1989) ao analisarem 118 espécies da família Leguminosae, observaram que apenas 18 possuíam cromossomos acrocêntricos, não sendo comum a presença desse

tipo de cromossomo na família. A simetria em cariótipos de Fabaceae foi também observada por Kumari e Bir (1989).

O tamanho dos cromossomos, observados no presente trabalho, variou de 2,21  $\mu\text{m}$  (Pop. F) a 4,18  $\mu\text{m}$  (Pop.G), com valor médio de 3,13  $\mu\text{m}$ , valor próximo ao encontrado para outros gêneros da subfamília Papilionoideae (*Phaseolus*, *Vigna* e *Macroptilium*), que apresentam comprimentos cromossômicos entre 1 a 3  $\mu\text{m}$  (FORNI-MARTINS, 1989). Outras espécies de Papilionoideae também podem apresentar comprimentos maiores para o tamanho cromossômico, como relatado para *Crotalaria lanceolata* que apresenta valores entre 1,23 a 3,99  $\mu\text{m}$ , (ANDRADE et al., 2008), e em *Cratylia argentea*, com o comprimento dos cromossomos variando de 2,88 a 4,03  $\mu\text{m}$  (VARGAS, 2005).

Por possuir maiores cromossomos em relação a outras espécies de Fabaceae, *P. phaseoloides* também apresenta um tamanho do genoma não muito comum para este grupo de plantas. Esta planta apresentou um genoma com tamanho  $1C=1544$  Mb (3,20 pg -  $2C$ ), relativamente grande em comparação a outras espécies de Fabaceae, como: *Lotus japonicus* ( $2n=12$ ); com  $1C=466$  Mb (OHMIDO et al., 2010) e *Trifolium pratense* ( $2n=14$ ), com 440 Mb (KATAOKA et al., 2012), assim como dentro do grupo Papilonoideae onde *Dipteryx alata* com  $1C= 807.2$  Mb (TAQUARY, 2017). Quando a comparação é feita com a única espécie do gênero *Pueraria* que apresenta tal estudo realizado, *P. lobata*, com  $1C=990$  Mb ou 2,01 pg ( $2C$ ) (OHMIDO et al., 2013), o valor também é bastante diferente, mostrando que esse gênero pode ser variável neste quesito e que estudo com outras espécies devem ser realizados para melhor entendimento de tal variação no gênero. Essa diferença, em relação a outras espécies de Fabaceae, pode estar relacionada à grande quantidade de heterocromatina observada nos cromossomos de *P. phaseoloides*, região esta do genoma na qual os processos de amplificação de sequências repetitivas, muito comuns em sequências heterocromáticas, podem ter promovido um aumento significativo do genoma na espécie (MEHROTRA e GOYAL, 2014).

O padrão de heterocromatina pericentromérica, encontrada no presente trabalho, é muito relatado em outros gêneros da família Fabaceae como em *Vigna* (SHAMURAILATPAM et al., 2015), *Vicia* (GREILHUBER,

1975), *Phaseolus* (ZHENG et al., 1991), *Sesbania* (FORNI-MARTINS e GUERRA 1999) e *Cicer* (GALASSO et al., 1996), por exemplo. Das 22 marcas CMA<sup>+</sup> aqui relatadas para *P. phaseoloides*, um par de cromossomos apresentou um sinal mais forte que os demais cromossomos. Pela hibridação *in situ* fluorescente, utilizando sondas para o DNA ribossomal 45S, e por meio de coloração sequencial CMA/DAPI, foi possível observar que tais bandas mais brilhantes coincidem com o único par de regiões organizadora de nucléolos presente em *P. phaseoloides*. Tal coincidência é bastante comum em plantas (GAETA et al., 2010), inclusive em Fabaceae, como pode ser visto em *Phaseolus* (EUGENIA, 2017), *Arachis* (SILVA, 2010), *Vigna*, (GALASSO et al., 1992; PEDROSA-HARAND et al., 2009; BONIFÁCIO et al., 2012), e para as espécies *Crotalaria juncea* (MODIN et al., 2007), *Copaifera langsdorfii* (GAETA et al., 2010) e *Mimosa caesalpinifolia* (SOUSA et al., 2013).

Pela FISH, foi possível observar que *P. phaseoloides*, além de possuir um par de sítios de DNAr 45S, também apresenta um par de sítios de DNAr 5S. Tal observação foi um pouco diferente ao comparar com a outra espécie do gênero em que a FISH para tais sequências foi realizada. Em *Pueraria lobata*, Ohmido e colaboradores (2013) relataram a presença de seis marcas de DNAr 45S e duas para DNAr 5S. Essa variação na quantidade de marcas em relação a essas duas espécies pode ser resultante de modificações estruturais nos cromossomos, sugerindo a presença de rearranjos cromossômicos como inversões, deleções ou translocações durante a evolução cromossômica das espécies do gênero (SCHUBERT, 2007; RASKINA et al., 2008).

Com a utilização de sequências teloméricas como sondas, foi possível detectar a presença de marcas teloméricas terminais e intersticiais em *P. phaseoloides*. Por definição, as sequências teloméricas estão presentes nas extremidades dos cromossomos, mas ocasionalmente podem aparecer em regiões não terminais, sendo assim chamadas de sequências repetitivas teloméricas intersticiais (BOLZAN e BIANCHI, 2006). A origem dessas sequências, em sítios cromossômicos não terminais pode acontecer através de dois mecanismos: inserção de DNA telomérico em locais instáveis durante o reparo da quebra da dupla fita de DNA durante o processo de replicação (AZZALIN et al., 2001), como também pode ocorrer como resultado de

rearranjos cromossômicos, durante a evolução (HOLMQUIST e DANCIS, 1979; HASTIE e ALLSHIRE, 1989). Estes mecanismos estão relacionados também com intensidade das marcas, onde o primeiro tende a apresentar sítios menores, enquanto que sítios maiores são associados à presença de elementos transponíveis, inversões, fusões e outras alterações cromossômicas estruturais (AZZALIN et al., 2001; LIN e YAN, 2008).

Vários estudos indicam que sequências teloméricas intersticiais no genoma, podem estar relacionadas à instabilidade genômica, pois são locais que sofrem frequentes rearranjos, sendo conhecidas como sítios frágeis (PRESTING et al., 1996; TEK e JIANG, 2004; LIN e YAN, 2008; GASPIN et al., 2010; BOLZAN, 2012; MANDÁKOVÁ et al., 2016). Esses sítios podem ocasionar alterações cromossômicas, ou facilitar a quebra/distensão cromossômica.

A presença de sítios teloméricos intersticiais em *P. phaseoloides* pode ser uma possível explicação para a distensão centromérica em alguns de seus cromossomos, onde todos os cromossomos com centrômeros distendidos apresentam sequências teloméricas nas proximidades do centrômero. Uma vez que essa coincidência de sequência teloméricas intersticiais e distendimento da região centromérica é muito raro em plantas, onde só encontramos relatos para apenas uma espécie, a *Phleum echinatum*, onde os pesquisadores também encontraram a presença dessas sequências nas regiões onde os cromossomos distendiam (GRABOWSKA-JOACHIMIAK et al., 2015). Entretanto, novos estudos como o padrão de metilação nessa região, estudo de imunolocalização envolvendo as histonas presentes no centrômero, ainda necessitam ser realizados para complementar tal inferência.

## 7 CONCLUSÕES

Não foram observadas diferenças em relação aos critérios analisados neste trabalho para as oito populações de *Pueraria phaseoloides*, mostrando uma uniformidade entre estas populações. Esses dados foram inéditos para a espécie, sendo importantes para futuros trabalhos de caracterização e estudos evolutivos do gênero.

Através da quantificação do DNA por citometria de fluxo, foi determinado o conteúdo de DNA de 3,20 pg.

O número cromossômico encontrado corroboram alguns dados descritos previamente, em que a espécie é um diploide com  $2n=22$ . Com as análises morfométricas, pode se visualizar um cariótipo simétrico de acordo com os índices de assimetria aplicados, possuindo a seguinte fórmula cariotípica:  $2m + 9sm$ .

O bandeamento com CMA/DAPI e a hibridização fluorescente *in situ* foram bem sucedidas neste trabalho, mostrando a presença das marcas de CMA+ em todos os cromossomos e dois sítios pericentroméricas de DNAr 45S e dois subterminais de 5S, além da presença de sequências teloméricas intersticiais em alguns cromossomos, ajudando assim na caracterização da espécie.

A espécie apresenta uma grande quantidade de heterocromatina e várias sequências teloméricas intersticiais, indicando que no passado evolutivo da espécie, fusões cromossômicas e outros tipos de alterações como translocações e transposições podem ter feito parte dos processos de diferenciação de *Pueraria phaseoloides*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, J.P.; PABLOS, B.; OSOEGAWA, K.; JONG, P.J.; MARTIN-GALLARDO, A.; VILLASANTE, A. TAHRE, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. *Molecular biology and evolution*, v.21, n.9, p.1620-1624, 2004.

ABIEC. 2016. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Perfil da Pecuária no Brasil - Relatório Anual 2016. Disponível em <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>.

AGE/MAPA, 2014. Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/12/produto-interno-bruto-da-agropecuaria-deve-ser-de-rs-1-trilhao>. Acessado em: 13 de dezembro de 2017.

ALFENITO, M.R.; BIRCHLER, J.A. Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics*, v.135, n.2, p.589-597, 1993.

ALMEIDA, C.; PEDROSA-HARAND, A. Contrasting DNA evolution in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Cytogenetic and genome research*, v.132, n.3, p.212-217, 2010.

AMPONG-NYARKO, K.; MURRAY, C.L. Utility of Forage Grass Nutrient Composition Databases in Predicting Ethanol Production Potential. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, v.5, n.3, p.295-305, 2011.

ANDRADE. D. A. V. de, ORTOLANI. F. A., MORO. J. R., MORO. F. V., Aspectos morfológicos de frutos e sementes e caracterização citogenética de *Crotalaria lanceolata* E. Mey. (Papilionoideae - Fabaceae), *Revista Acta botânica brasileira*, v.22, n.3, p.621-625, 2008.

ATHAYDE, A.A.R.; COUTINHO, J.J.O.; COURA, R.A.N.; RODRIGUES, L.M. Efeito de aditivo em silagens de leguminosas forrageiras. *Ciência e Praxis*, v.8, n.15, 2015.

AZKUE, D. Chromosome diversity of South American *Oxalis* (Oxalidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.132, p.143-152, 2000.

AZZALIN, C.M.; NERGADZE, S.G.; GIULOTTO, E. Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma*, v.110, p.75–82, 2001

BAIRIGANJAN, G.C.; PATNAIK, S.N. Chromosomal evolution in Fabaceae. *Cytologia*, v.54, n.1, p.51–64, 1989.

BARRE, P.; LAYSSAC, M.; D'HONT, A.; LOUARN, J.; CHARRIER, A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Relationship between parental chromosomal contribution and nuclear DNA content in the coffee interspecific *hybrid C. pseudozanguebariae* × *C. liberica var 'dewevrei'*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 96, n.2, p.301-301, 1998.

BATTISTIN, A.; BIONDO, E.; AULER, N.M.F. Cariótipos em 16 populações de *Lathyrus* L. *Revista Brasileira de genética*, v.19, n.3, p.129, 1996.

BENNETT, M.D. Intraspecific variation in DNA amount and the nucleotypic dimension in plant genetics. In: FREELING, M. *Plant genetics. UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* v. 35, p.283-302, 1985.

BENNETT, M.D. The development and use of genomic in situ Hybridization (GISH) as a new tool in plant biosystematics. In: *Kew Chromosome Conference, 4. Proceedings...* Kew: Royal Botanic Gardens, p.167-183. 1995.

BENSASSON, D. Evidence for a high mutation rate at rapidly evolving yeast centromeres. *BMC evolutionary biology*, v.11, n.1, p.211, 2011.

BFG - The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* v.66, n.4, p. 1085-1113, 2015.

BOLZAN, A.D.; BIANCHI, M.S. Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutation Research*, v.612, n.3, p.189–214, 2006.

BOLZAN, A.D. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis*, v. 27, n.1, p.1–15, 2012

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

BRASILEIRO-VIDAL, A.C.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, A.P.; IORCESKI, E.J. Atualização em técnica celular e molecular aplicada ao melhoramento genético vegetal. Embapa Trigo, p.277-298, 2002.

BRUNEAU, A. Phylogenetic and Biogeographical Patterns in Erythrina (Leguminosae: Phaseoleae) as Inferred from Morphological and Chloroplast DNA Characters. *Systematic Botany*, v.21, n.4, p.587-605, 1996.

BRUNEAU, A.; DOYLE, J.L. & DOYLE, J.J. Phylogenetic evidence in Phaseoleae: evidence from chloroplast restriction site characters. In M.D. Crisp & J.J. Doyle (eds.). *Advances in Legume Systematics: Phylogeny. Part 7*. The Royal Botanic Gardens, Kew p.309–330, 1995.

CABI - CENTRE FOR AGRICULTURE AND BIOSCIENCE INTERNATIONAL. *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK, 2013.

CARVALHO, C. R. Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.). 1995. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.1995.

COELHO, M.S.E. 2009. Caracterização citogenética de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. *P. cincinnata* Mast. e seu híbrido interespecífico. Dissertação de Mestrado em Agronomia. Universidade Federal da Paraíba, Areia. 67p. 2009.

COOK, B.G.; PENGELLY, B.C.; BROWN, S.D.; DONNELLY, J.L.; EAGLES, D.A.; FRANCO, M.A.; HANSON, J.; MULLEN, B.F.; PARTRIDGE, I.J.; PETERS, M.; SCHULTZE-KRAFT, R. Tropical Forages. Ciat And Ilri, Brisbane, Australia, 2005.

DARLINGTON, C.D.; WYLIE, A.P. Chromosome atlas of flowering plants. George Allen & Unwin Ltd., Ed pp.xix, n.2, p.516, 1955.

DEMINICIS, B.B. Recursos genéticos de leguminosas tropicais em pastagens e utilização na alimentação de Ruminantes. In: Damasceno AA (ed). Leguminosas forrageiras tropicais: características importantes, recursos genéticos, e causas dos insucessos de pastagens consorciadas. Viçosa, Brasil, p.61–122, 2009.

DODSWORTH, S.; CHASE, M.W.; LEITCH, A.R. Is post-polyploidization diploidization the key to the evolutionary success of angiosperms?. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.180, n.1, p.1-5, 2016.

DONG, J.; KHARB, P.; CERVERA, M.; HALL, T.C. The use of FISH in chromosomal localization of transgenes in rice. *Methods in Cell Science*, v.23, p.105-113, 2001.

DOLEŽEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal Applied Genetics*, v.38, n.3, p.285-302, 1997.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSAK, M.A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, v.82, n.1, p.17-26, 1998.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, v.95, n.1, p.99–110, 2005.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (Ed.). Flow cytometry with plant cells: analysis of genes chromosomes and genomes. John Wiley & Sons, 2007.

DOYLE, J.J.; CHAPHILL, J.A.; BAILEY, C.D.; KAJITA, T. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcl* sequences and non-molecular. In: P.S. Herendeen and A. Bruneau (editors). *Advances in Legume Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, p.1–20, 2000.

DUKE, J.A. Handbook of Legumes of World Economic Importance. Plenum Press, New York, p.212-215, 319,323. 1981.

EGAN, A.N., VATANPARAST, M., CAGLE, W. Parsing polyphyletic *Pueraria*: delimiting distinct evolutionary lineages through phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.104, p.44-59, 2016.

EMBRAPA. Redução dos impactos ambientais da pecuária de corte no Acre. Rio Branco: Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre, 1999.

EUGÊNIA, C.N.M. 2017. Caracterização citogenética e morfológica de acessos de feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.) do banco de germoplasma da UFPI. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2017.

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Grassland Index. A searchable catalogue of grass and forage legumes. Rome, Italy, 2015.

FLEISCHMANN, A.; MICHAEL, T.P.; RIVADAVIA, F.; SOUSA, A.; WANG, W.; TEMSCH, E.M.; GREILHUBER, J.; MULLER, K.F.; HEUBL, G. Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. *Annals of botany*, v.114, n.8, p.1651-1663, 2014.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 15 Nov. 2018.

FONTANELI, R.S. 1999. Forage systems for year-round grazing by lactating dairy cows. Dissertação (Ph.D.) University of Florida, Gainesville. 220p, 1999.

FORNI-MARTINS, E. R. 1989. Cariótipo e sua análise numérica como subsídio a estudos taxonômicos e evolutivos de *Phaseolus L.*, *Vigna Savi* e *Macroptilium* (Bentham) Urban – Leguminosae, Papilionoideae. 146 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de Campinas, Campinas. 1989.

FORNI-MARTINS, E.R.; GUERRA, G. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania Scop*, species (Fabaceae). *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, v.52, n.1-2, p.97-103, 1999.

GAETA, M.L.; YUYAMA, P.M.; SARTORI, D.; FUNGARO, M.H.P.; VANZELA, A.L.L. Occurrence and chromosome distribution of retroelements and NUPT sequences in *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae). *Chromosome Research*, v.18, n.4, p.515–524, 2010.

GALASSO, I.; PIGNONE, D.; PERRINO, P. Cytotaxonomic studies in *Vigna*. I. General technique and *Vigna unguiculata* C-banding. *Caryologia*, v.45, n.2, p. 155-161, 1992.

GALASSO, I.; PIGNONE, D.; FREDIANI, M.; MAGGIANI, M.; CREMONINI, R. Chromatin characterization by banding techniques, in situ hybridization, and nuclear content in *Cicer L.* (Fabaceae). *Genome*, v.39, n.2. p.258–265, 1996.

GARCIA, S.; GARNATJE, T.; PELLICER, J.; MCARTHUR, E.D.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; VALLÈS, J. Ribosomal DNA, heterochromatin, and correlation with genome size in diploid and polyploid North American endemic sagebrushes (*Artemisia*, Asteraceae). *Genome*, v.52, n.12, p.1012-1024, 2009.

GASPIN, C.; RAMI, J.; LESCURE, B. Distribution of short interstitial telomere motifs in two plant genomes: putative origin and function. *BMC Plant Biology*, v.10, n.1, p.283, 2010.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P. de.; WANDERLEY, M. das G. L. & VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade*, v.1, n.1, p.52-61, 2005.

GOLDBLATT, P. Cytology and phylogeny of Leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RAVEM, P.H. (Ed.). *Advances in legumes systematics*. Kew: Royal Botanical Gardens, part 2, p.427-463, 1981.

GOMES, S.S.L.; SALDANHA, C.W.; NEVES, C.S.; TREVIZANI, M.; RAPOSO, N.R.B.; NOTINI, M.M.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.; CAMPOS, J.M.S.; OTONI, W.C.; VICCINI, L.F. Karyotype, genome size, and in vitro chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.118, p.45-56, 2014.

GONG, Z.Y.; WU, Y.F.; KOBLIZKOVA, A.; TORRES, G.A.; WANG, K.; IOVENE, M.; NEUMANN, P.; ZHANG, W.L.; NOVAK, P.; BUELL, C.R. Repeatless and repeat-based centromeres in potato: Implications for centromere evolution. *Plant Cell*, v.24, p.3559–3574, 2012.

GRABOWSKA-JOACHIMIAK, A.; KULA, A.; GERNAND-KLIEOTH, D.; JOACHIMIAK, A.J. Karyotype structure and chromosome fragility in the grass *Phleum echinatum* Host. *Protoplasma*, v.252, p.301–306, 2015.

GREILHUBER, J. Heterogeneity of heterochromatin in plants: comparison of Hy- and C- bands in *Vicia faba*. *Plant Systematic and Evolution*, v.124, p.139–156, 1975.

GUERRA, M. 1988. Introdução a Citogenética Geral. In: Guerra M (eds) *Heterocromatina e Bandeamento Cromossômico*. Guanabara, Rio de Janeiro, p.24-35, 1988.

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

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

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. FUNPEC, São Paulo, 131p. 2002.

HALIM, R.A. *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth. In: *Auxiliary plants. Plant Resources of South-East Asia No. 11*. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia, p.217-220, 1997.

HANNWEG, K.; STEYN, W.; BERTLING, I. In vitro induced tetraploids of *Plectranthus esculents* are nematode-tolerant and have enhanced nutritional value. *Euphytica*, v.207, n.2, p.343-351, 2016.

HASTIE, N.D.; ALLSHIRE, R.C. Human telomeres: fusion and interstitial sites. *Trends in Genetics*, v.5, p.326-331, 1989.

HAVANANDA, Y.; CHARLES, B.E.; DOYLE, J.J. Complex patterns of autopolyploid evolution in alfalfa and allies (*Medicago sativa*; Leguminosae). *American Journal of Botany*, v.98, n.10, p.1633–1646, 2011.

HENIKOFF, S.; AHMAD, K.; MALIK, H.S. The Centromere Paradox: Stable Inheritance with Rapidly Evolving DNA. *Science*, v.293, n.5532, p.1098-1102. 2001.

HIDALGO, O.; PELLICER, J.; CHRISTENHUSZ, M.; SCHNEIDER, H.; LEITCH, A.R.; LEITCH, I.J. Is There an Upper Limit to Genome Size? *Trends in Plant Science*, v.22, n.7, p.567–573, 2017.

HIRAKURA, K., MORITA, M., NAKAJIMA, K., SUGAMA, K., TAKAGI, K., NIITSU, K., IKEYA, Y., MARUNO, M., OKADA, M. Phenolic glucosides from the root of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry*, v.46, n.5, p.921–928, 1997.

HIRSCH, C.D.; JIANG, J. Centromeres: Sequences, Structure, and Biology. In: Wendel, J.; Greilhuber, J.; Dolezel, J.; Leitch I. (eds) *Plant Genome Diversity Volume 1*. Springer, Vienna. 2012.

HOFFMAN, K.; MULLER, L. D.; FALES, S. L., HOLEN, L. A. Quality evaluation and concentrate supplementation of rotational pasture grazed by lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v.76, n.9, p.2651-2663, 1993.

HOLMQUIST, G.P.; DANCIS, B. Telomere replication, kinetochore organisers, and satellite DNA evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.76, p.4566–4570, 1979.

ILYAS, M.; KAMIL, M.; PARVEEN, M.; KHAN, M.S. Isoflavones from *Garcinia nervosa*. *Phytochemistry*, v.36, n.3, p.807-809, 1994.

INGHAM, J. L. Naturally Occurring Isoflavonoids (1855–1981). In: HERZ W., GRISEBACH H., KIRBY G.W. (Eds) *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Fortschritte

der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, v.43. Springer, Vienna. 1983.

JIANG, J.; GILL, B. S.; WANG, G. L.; RONALD, P. C.; WARD, D. C. Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice with bacterial artificial chromosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, v.92, n.10, p.4487-4491, 1995.

JIANG, J.; BIRCHLER, J.A.; PARROT, W.; DAWE, R.K. A molecular view of plants centromeres. Trend Plant, v.8, p.570-575. 2003.

JORGENSEN, S.E. Handbook of Environmental Data and Ecological Parameters: Environmental Sciences and Applications. Elsevier, v.6, p.1210, 2013.

KATO, A., VEGA, J. M., HAN, F., LAMB, J. C., & BIRCHLER, J. A. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. Current opinion in plant biology, v.8, n.2, p.148-154, 2005.

KATAOKA, R.; HARA, M.; KATO, S.; ISOBE, S.; SATO, S.; TABATA, S.; OHMIDO, N. Integration of linkage and chromosome maps of red clover (*Trifolium pratense* L.). Cytogenetic Genome Research, v.137, p.60-69, 2012.

KENG, H. Economic plants of ancient North China as mentioned in Shih Ching (Book of). Econ. Bot. 28, 391-410. 1974.

KEUNG, W.M. *Pueraria*. The Genus *Pueraria*. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles V.23. (Harvard Medical School). Taylor & Francis, London. xviii + 290p. 2002.

KINJO, J.E., FURUSAWA, J.I., BABA, J., TAKESHITA, T., YAMASAKI, M., NOHARA, T. Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. III. Isoflavonoids and related compounds in the Roots and the voluble stems. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.35, n.12, p.4846–4850, 1987.

KUMAR, P.S.; HYMOWITZ, T. Where are the diploid ( $2n=2x=20$ ) genome donors of *Glycine* Willd. (Leguminosae, Papilionoideae)? *Euphytica*, v.40, p.221-226, 1989.

KUMARI, S.; BIR, S.S. Karyomorphological evolution in Caesalpiniaceae. *Journal of Cytology & Genetics, Russian*, v.24, p.149-163, 1989.

LACKEY, J.A. 1981. Phaseoleae. In R.M. Polhill & P.H. Raven (eds.). *Advances in Legume Systematics. Part 1. The Royal Botanic Gardens, Kew*, p. 301-327. 1981.

LACKEY, J.A. 1977. A synopsis of the Phaseoleae (Leguminosae, Papilionoideae). Unpublished Ph.D. Dissertation, Departments of Botany and Plant Pathology, Iowa State University, Ames. 1977.

LEE, J.; AND T. HYMOWITZ. A molecular phylogenetic study of the subtribe *Glycininae* (Leguminosae) derived from chloroplast DNA rps16 intron sequences. *American Journal of Botany*, v.88, p.2064–2073, 2001.

LEITCH, A.R.; SCWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I.J. *In situ Hybridization: a practical guide*, p.1-3, 1994.

LEITCH, I.J.; LEITCH, A.R. Genome size diversity and evolution in land plants. Ed. Leitch, I.J.; Greilhuber, J.; Doležel, J.; Wendel, J.F. *Plant Genome Diversity, Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes*, Springer-Verlag, v.2, p.307-322, 2013.

LEITCH, I.J.; LEITCH, A.R. Ecological and genetic factors linked to contrasting genome dynamics in seed plants. *New Phytol*, v.194, p.629-646, 2012.

LEPERS-ANDRZEJEWSKI, S.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BRONW, S.C.; WONG, M.; DRON, M. Diversity and dynamics of plant genome size: an example of polysomaty from a cytogenetic study of *Tahitian vanilla* (*Vanillax tahitensis*, Orchidaceae). *American Journal of Botany*, v.98, n.6, p.986-997, 2011.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, Landskrona, v.52, p.201-210, 1964.

LEWIS, G.P. *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew , 577p, 2005.

LIMA, H.C. *Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do Estado do Rio de Janeiro*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2000.

LIN, K.W.; YAN, J. Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v.658, n.1-2, p.95-110, 2008.

LOBO, L.T.; LIMA, F.C.S; SILVA, G.A.; ARRUDA, M.S.P., SILVA, M.N.; ARRUDA, A.C.; SOUA FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S.; SANTOS, A.S. Isoflavona de *Pueraria phaseoloides* (Leguminosae). 31a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2003.

LOUREIRO, J. 2007. *Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal*. Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal. 2007.

LPWG (Legume Phylogeny Working Group). Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, v.62, p.217-248, 2013.

LPWG (Legume Phylogeny Working Group). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* v.66, p.44-77, 2017.

LUCKOW, M., J. T. MILLER, D. J. MURPHY, AND T. LIVSHULTZ. A phylogenetic analysis of the *Mimosoideae* (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. In B. B. Klitgaard and A. Bruneau [eds.], *Advances in*

legume systematics, part 10, Higher level systematics, p.197– 220. Royal Botanic Gardens, Kew, 2003.

MAESEN, L.J.G. Revision of the genus *Pueraria* DC. With some notes on *Teyleria* Backer: Leguminosae. Wag. Ag. Un. p.85, 1985.

MANDAKOVA, T.; MUMMENHOFF, K.; AL-SHEHBAZ, I.A.; MUCINA, L.; MUHLHAUSEN, A.; LYSAK, M.A. Whole-genome triplication and species radiation in the Southern African tribe Heliophilleae (Brassicaceae). *Taxon*, v.61, n.5, p. 989-1000, 2012.

MARASCHIN, G.E., 1997. Oportunidade do uso de leguminosas em sistemas intensivos de produção animal a pasto. In: A.M. Peixoto, J.C. Moura e V.P. Faria (eds). Simpósio sobre o manejo da pastagem. Piracicaba. Anais. FEALQ. Piracicaba. 1997.

MARCHETTI, M.; CATRICE, O.; BATUT, J.; MASSON-BOIVIN, C. *Cupriavidus taiwanensis* bacteroids in *Mimosa pudica* Indeterminate nodules are not terminally differentiated. *Applied and Environmental Microbiology*, v.77, n.6, p.2161-2164, 2011.

MEHROTRA, S., GOYAL, V. Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* v.12, p.164–171, 2014.

MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution*, Viena, v.226, n.1-2, p. 69-84, 2001.

MELO, N.F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA Sites in *Passiflora* L. Species with Distinct Base Chromosome Numbers. *Annals of Botany*, v.92, n.2, p.309–316, 2003.

MELTERS, D.P.; BRADNAM, K.R.; YOUNG, H.A.; TELIS, N.; MAY, M.R.; RUBY, J.G.; SEBRA, R.; PELUSO, P.; RANK, D.; GARCIA, J.F.; DERISI, J.L. Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. *Genome biology*, v.14, n.1, p.R10. 2013.

MENDEZ-LAGO, M.; WILD, J.; WHITEHEAD, S.L.; TRACEY, A.; PABLOS, B.; ROGERS, J.; SZYBALSKI, W.; VILLASANTE, A. Novel sequencing strategy for repetitive DNA in a *Drosophila* BAC clone reveals that the centromeric region of the Y chromosome evolved from a telomere. *Nucleic acids research*, v.37, n.7, p.2264-2273, 2009.

MODIN, M.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rDNA genes sites. *Genetics and Molecular Biology*, v.30, n.1, p.65-72, 2007.

MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Heterochromatin patterns and ribosomal DNA loci distribution in diploid and polyploid *Crotalaria species* (Leguminosae, Papilionoideae), and inferences on karyotype evolution. *Genome*, v.54, n.9, p.718-726, 2011.

MONTEIRO, E.M.M.; LOURENÇO JÚNIOR, J.B.; SANTOS, N.F.A.; AVIZ, M.A.B. Valor nutritivo da leguminosa *Pueraria phaseoloides* como alternativa na suplementação alimentar de ruminantes na Amazônia Oriental. *Ciência Rural*, v.39, n.2, p.613-618, 2009.

MOREIRA, F.M.S.; LIMA, A.; JESUS, E.; SILVA, K.; NOBREGA, R.; FLORENTINO, L. Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que nodulam leguminosas. In: MOREIRA, F.S.; CARES, J.E.; ZANETTI, R.; STÜMER, S.L. O ecossistema solo componente: relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. Lavras – MG. Ed. UFLA, cap. 17, p.343- 347, 2013.

MURASHIGE, T e SOOKG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physilgy Plantarum*, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NASCIMENTO, J.T.; SILVA, I.F. Avaliação quantitativa e qualitativa da fito massa de leguminosas para uso como cobertura de solo. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.3, p.947-949, 2004.

NISHIKAWA, T.; SATO, K. Chromosome numbers of *Erigeron miyabeanus* Tatew, e Kitam (Asteraceae) and the alien taxa from Hokkaido, northern Japan. *Bulletin oh the national Science Museum*, v.29, p.145-148, 2003.

OHMIDO, N.; ISHIMARU, A.; KATO, S.; SATO, S.; TABATA, S.; FUKUI, K. Integration of cytogenetic and genetic linkage maps of *Lotus japonicus*, a model plant for legumes. *Chromosome Science*, v.18, p.287-299, 2010.

OHMIDO, N.; SHIMOURA, A.; KATO, S.; ISOBE, S.; TABATA, S. Kudzu (*Pueraria lobata* Ohwi) karyotyping using FISH and Chromosome Image Analysis System IV. *Chromosome Science*, v.16, p.17-21, 2013.

OHASHI, H. A new species of *Pueraria* (Leguminosae) from Guizhou, China. *J. Jpn. Bot.* v.80, p.9-13, 2005.

OHASHI, H., IOKAWA, Y. A new species, *Pueraria xyzhunii* (Leguminosae) from Yunnan, China, with pollen stainability and pollon morphology in comparison to related species. *J. Jpn. Bot.* V.81, p.26-34, 2006.

OHSHIMA, Y., OKUYAMA, T., TAKAHASHI, K., TAKIZAWA, T., SHIBATA, S. Isolation and high performance liquid chromatography of isoflavonoids from the *Pueraria* Root. *Planta Medica*, v.54, n.3, p.250–254, 1988.

PASZKO, B. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution*, v.258, n.1-2, p.39-48, 2006.

PEDROSA-HARAND, A.; KAMI, J.; GEPTS, P; GEFFROY, V.; SCHWEIZER, D. Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. *Chromosome Research*, v.17, n.3, p.405–417, 2009.

PELLICER, J.; FAY, M.F.; LEITCH, I.J. The largest eukaryotic genome of them all? *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.164, p.10–15, 2010.

PEREIRA, A.V.; VALLE, C.B.DO.; FERREIRA, R.P.; MILES, J.W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: Nass, LL, Valois ACC, De Melo, IS & Valadares-Ingliš MC(Eds.) Recursos genéticos & melhoramento – plantas. Rondonópolis, Fundação MT. p.549-602, 2001.

PIERRE, P.M.O.; SOUSA, S.M.; DAVIDE, L.C.; MACHADO, M.A.; VICCINI, L.F. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). *Annals of the Brazilian Academy of Science*, v.83, p. 993–1005, 2011.

POLHILL, R.M. Complete synopsis of legume genera. In *Phytochemical dictionary of the Leguminosae* (F.A. Bisby, J. Buckingham & J.B. Harborne, eds.) Chapman and Hall, New York, v.1, p.49-54, 1994.

POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. Papilionoideae. In *Advances in legume systematics* (R.M. Polhill & P.H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, p.192-208, 1981.

POLHILL, R.M., RAVEN, P.H.; STIRTON, C.H. Evolution and systematics of the Leguminosae. In *Advances in legume systematics* (R.M. Polhill & P.H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, p.1-26, 1981.

PRESTING, G.G.; FRARY, A.; PILLEN, K.; TANKSLEY, S.D. Telomere-homologous sequences occur near the centromeres of many tomato chromosomes. *Molecular and General Genetics MGG*, v.251, n.5, p.526-531, 1996.

RANDALL, R.P. A global compendium of weeds. Department of Agriculture and Food, Western Australia, p.1124, 2012.

RASKINA, O.; BARBER, J.C.; NEVO, E.; BELYAYEV, A. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, v.120, n.3-4, p.351-357, 2008.

REIS, A.C.; SOUSA, S.M.; VALE, A.A.; PIERRE, P.M.O.; FRANCO, A.L.; CAMPOS, J.M.S.; VIEIRA, R.F.; VICCINI, L.F. *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autopolyploid complex?. *American Journal of Botany*, v.101, p.1002-1012, 2014.

RICHARDS, E.J.; AUSUBEL, F.M. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, v.53, n.1, p.127-136, 1988.

RIEGEL, M. Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genetics and Molecular Biology*, v.37, n.1, p.194-209, 2014.

RUEDA, B. L.; BLAKE, R. W.; NICHOLSON, C. F.; FOX, D.G.; TEDESCHI, L.O.; PELL, A.N.; FERNANDES, E.C.M.; VALENTIM, J.F.; CARNEIRO, J.C. Production and economic potentials of cattle in pasture based systems of the western Amazon region of Brazil. *Journal of Animal Science*, v.81, p.2923-2937, 2003.

RUIZ-HERRERA, A.; PONSÁ, M.; GARCÍA, F.; EGOZEUE, J.; GARCÍA, M. Fragile sites in human and *Macaca fascicularis* chromosomes are break points in chromosome evolution. *Chromosome Research*, v.10, p.33-44, 2002.

SCHMIDT, T.; HESLOP-HARRISON, J.S. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends Plant Sci*, v.3, p.195-199, 1998.

SCHRIRE, B.D. Tribe *Phaseoleae*. In G. Lewis, B.D. Schrire, B. Mackinder & M. Lock (eds.) Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 393-43, 2005.

SCHUBERT, I. Chromosome evolution. *Curr Opin Plant Biol*, v.10, p.109–115, 2007.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with Cromomicin and DAPI. *Chromosoma*. 58: 307-354.1976.

SHAFIULLAH, M.; PARVEEN, M.; KAMIL, M.; ILLYAS, M. A novel isoflavone glycoside was isolated from the leaves of *C. siamea*, collected from Aligarh. Its structure was elucidated from chemical and spectral data as 2',4',5,7-tetrahydroxy-8-C-glucosylisoflavone (2'-hydroxygenistein 9-C-glucoside). *Fitoterapia*, v.65, n.5, p.339-341, 1995.

SHAMURAILATPAM, A.; MADHAVAN, L.; YADAV, S.R.; BHAT, K.V.; RAO, S.R. Heterochromatin characterization through differential fluorophore binding pattern in some species of *Vigna Savi*. *Protoplasma*, v.252, n.2, p.629–635, 2015.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. The Book of Kudzu, a Culinary and Healing Guide. Auntum Press, Brookline, MA. 1977.

SI, J., CHANG, Q., SHEN, L.; CHEN, D. Chemical constituents from *Pueraria lobata*. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, v.15, p.248-250, 2006.

SILVA, E.B.C. Citogenética evolutiva na família Asteraceae usando fluorocromos CMA/DAPI e FISH com sondas de DNAr 45S e 5S. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2010.

SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Citogenética clássica e

molecular em *passifloras*. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético, p.30, 2005.

SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. The role of hybridization in plant speciation. *Annu Rev Plant Biol*, v.60, p.561-588, 2009.

SOUSA, S.M.; REIS, A.C.; VICCINI, L.F. Polyploidy, B chromosomes, and heterochromatin characterization of *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae-Mimosoideae) *Tree Genetics & Genomes*, 2013.

SOUZA FILHO, A.P.S.; SILVA, M.A.M.M; DUTRA, S. Germinação de sementes de *Pueraria phaseoloides*: efeitos do pH, do nitrato e da salinidade. In: XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Porto Alegre, 2004.

SOUZA, L. G.; CROSA, O.; WINGE, H.; GUERRA, M. The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): a populational and cytomolecular analysis. *Genetics and molecular biology*, v.32, n.1, p.111-116, 2009.

SPADETO, M.S. propagação in vitro e determinação do número cromossômico de *Myrsine coriacea* (Sw.) R.Br. ex Roem. & Schult. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, 2015.

SPEICHER, R.M.; CARTER, N.P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature*, v.6, p.782-792, 2005.

STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21th centuries. *Taxon*, v. 49, p. 451-477, 2000.

STEBBINS, G.L. Chromosomal evolution in higher plant. London, 216p. 1971.

SUDA, J.; TRAVNICEK, P. Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry: New prospects for plant research. *Cytometry*. V.69, p.273- 280, 2006.

SUMNER, A.T. *Chromosomes: Organization and Function* . Blackwell Publishing, London, p. 24 –132, 2003.

TANNER, R.D.; HUSSAIN, S.S; HAMILTON, L.A.; WOLF, F.T. Kudzu (*Pueraria lobata*): Potential Agricultural and Industrial Resource. *Economic Botany*, v.33, n.4, p.400-412, 1979.

TAQUARY, A.M.A. Tamanho, montagem *de novo* e anotação do genoma de *Dipteryx alata* (Leguminosae). Tese (Doutorado). Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 137f. 2017.

TEK, A.L.; JIANG, J. The centromeric regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence. *Chromosoma*, v.113, n.2, p.77-83, 2004.

TELFORD, E.A.; CHILDERS, N.F. Tropical kudzu in Puerto Rico. *Fed. Exp. Sta. Puerto Rico Circ.* n.27, 1947.

THIBAUT, J. Nuclear DNA amount in pure species and hybrid willows (*Salix*): a flow cytometric investigation. *Canadian Journal of Botany*, v.76, n.1, p.157-165, 1998.

TITAN, G.N.A. 1999. Processo de obtenção de extratos hidroalcoólicos em *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*) e acompanhamento de sua atividade alelopática. Monografia - Universidade Federal do Pará, Belém. 38f, 1999.

TOZZI, A.M.G.A., MELHEM, T.S., FORERO, E., FORTUNA-PEREZ, A.P., WANDERLEY, M.G.L., MARTINS, S.E., ROMANINI, R.P., PIRANI, J.R., FIUZA DE MELO, M.M.R., KIRIZAWA, M., YANO, O., CORDEIRO, I. Subfamília

Papilionoideae. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, v. 8, p.167-397, 2016.

UCHIDA, W.; MATSUNAGA, S.; SUGIYAMA, R.; KAWANO, S. Interstitial telomere-like repeats in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Genes Genet Syst*, v.77, p.63–67, 2002.

VALENTIM, J.F; ANDRADE, C.M.S. Tropical Kudzu (*Pueraria phaseoloides*): successful adoption in sustainable cattle production systems in the Western Brazilian Amazon. In: XX International Grassland Congress: Offered Papers. p.328. 2005.

VALLE, C.B.; SIMIONI, C.; RESENDE, R.M.S.; JANK, L.; CHIARI, L. Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: Resende, RMS, Valle CBdo & Jank L (Eds.) Melhoramento de Forrageiras Tropicais. 1ª ed.Campo Grande, Embrapa. p.13-53, 2008.

VARGAS, S. M. 2005. Citogenética de acessos de *Cratylia sp.* (FABACEAE – PAPILIONOIDEAE). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. p.48, 2005.

VEITCH, NC. Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Product Reports*, v.24, p.417–464, 2007.

VILELA, D.; ALVIM, M.J.; CAMPOS, O.F.; RESENDE, J.C. Produção de leite de vacas Holandesas em confinamento ou em pastagem de coast-cross. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.25, p.1228-1244, 1996.

VOGLMAYR, H. Nuclear DNA amounts in Mosses (Musci). *Annals of Botany*, v. 85, p. 531-546, 2000.

WATANABE, K.; YAHARA, T.; DENDA, T.; KONSUGE, K. Chromosomal Evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae) Statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using

phylogenetic information. *Journal of Plant Research*, v.112, n.2, p.145-161, 1999.

WEISS-SCHNEEWEISS, H., SCHNEEWEISS, G.M. Karyotype diversity and evolutionary trends in angiosperms. *Plant Genome Diversity*. v.2, p.209-230, 2013.

WOJCIECHOWSKI, M.F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M.J. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid mat-K gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*. V.91, p.1846-1862, 2004.

YANPAISAN, W.; NICHOLAS, J.; KING, G.; DORAN, P.M. Flow cytometry of plant cells with applications in large escale bioprocessing. *Biotechnology Advances*, v.17, p.3-27, 1999.

YOUNIS, A.; RAMZAN, F.; HWANG, Y.J.; LIM, K.B. FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. *Plant Cell Reports*, v.34, n.9, p.1477–1488, 2015.

ZANELA, L. 2009. Caracterização cariotípica de quatro espécies brasileiras de *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) com as técnicas de FISH, CMA, DAPI E AgNOR. Dissertação de Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP. 96p, 2009.

ZHENG, J.Y.; 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, p.459–466, 1991.

ZONNEVELD, B.J.M. Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (Ranunculaceae) discriminate between species and sectional divisions. *Plant Systematics and Evolution*, v.229, p.125-130, 2001.