



# Localización de satélites y cromosomas NOR para la interpretación del cariotipo de *Sesbania virgata* (Papilionoideae, Sesbanieae) de dos poblaciones americanas

FERNANDO TAPIA-PASTRANA<sup>1\*</sup> Y FERNANDO TAPIA-AGUIRRE<sup>2</sup>

*Botanical Sciences*  
96 (4): 619-627, 2018

DOI: 10.17129/botsei.1972

Received:

3 de enero de 2018

Accepted:

3 de agosto de 2018

Editor de sección:

Enrique Jurado

## Resumen

**Antecedentes:** Los estudios citogenéticos en el género *Sesbania* muestran desacuerdo entre los investigadores sobre el número preciso y posición de las constricciones secundarias y satélites, así como su relación con la organización del nucleolo. La carencia de esta información dificulta la realización de estudios de citogenética comparada y evolución cromosómica confiables en el género.

**Preguntas:** ¿Dónde se ubican las constricciones secundarias y satélites en los cromosomas de *Sesbania virgata*? ¿Estas regiones participan activamente en la organización nucleolar?

**Especie en estudio:** *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

**Sitio y año de estudio:** Municipio de Tlacotalpan, México y Provincia de Salta, Argentina, 2016.

**Métodos:** Se aplicó una técnica de extendido en superficie y secado al aire para obtener cromosomas en prometafase y metafase típica a partir de meristemos radiculares.

**Resultados:** Cada población exhibió un cariotipo diferente y solo dos constricciones secundarias asociadas a macrosatélites en los brazos cortos del par cromosómico más pequeño y no en brazos largos como fue sugerido por otros autores. La inclusión de las constricciones secundarias y satélites en el nucleolo de células en prometafase permitió corroborar su participación activa en la formación de éste. Esta información se utilizó para reevaluar la posición de las regiones del organizador nucleolar "NOR".

**Conclusiones:** Nuestros resultados concuerdan con el punto de vista predominante sobre la ubicación de los "NOR" en los brazos cortos de especies vegetales, particularmente en leguminosas. Además, dado que las poblaciones bajo estudio se encuentran geográficamente aisladas sugerimos que se favorece un proceso activo de especiación manifestado en los dos citotipos encontrados cuyas diferencias se atribuyen a cambios en la proporción de brazos de los cromosomas satelitales.

**Palabras clave:** citotipo, constricciones secundarias, NOR, nucleolo, satélites.

## Abstract

**Background:** Cytogenetic studies in the genus *Sesbania* show lack of agreement among the researchers about the precise number and position of secondary constrictions and satellites as well as their relation to the organization of the nucleolus. The lack of this information makes it difficult to carry out reliable comparative cytogenetic studies and chromosome evolution in this genus.

**Questions:** Where are the secondary constrictions and satellites located in the chromosomes of *Sesbania virgata*? Do these regions actively participate in the nucleolar organization?

**Study species:** *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

**Study site:** Municipality of Tlacotalpan, Mexico and Province of Salta, Argentina.

**Methods:** Surface spreading and air-drying technique was applied to obtain chromosomes in prometaphase and typical metaphase from radicular meristems.

**Results:** Each population exhibited a different karyotype and only two secondary constrictions associated with macrosatellites in the short arms of the smallest chromosome pair and not in long arms as was suggested by other authors. The inclusion of secondary constrictions and satellites in the nucleolus of cells in prometaphase allowed to corroborate their active participation in the formation of this one. This information was used to reevaluate the position of the nucleolar organizer regions "NOR's".

**Conclusions:** Our results agree with the predominant point of view on the location of the "NOR's" in the short arms of plant species, particularly in legumes. In addition, given that the populations under study are geographically isolated, we suggest that an active process of speciation manifested in the two found cytotypes whose differences are attributed to changes in the proportion of arms of the satellite chromosomes is favored.

**Keywords:** cytotype, NOR's; nucleolus, satellites, secondary constrictions.

<sup>1</sup> Laboratorio de Genecología,  
División de Estudios de  
Posgrado e Investigación,  
Facultad de Estudios  
Superiores Zaragoza,  
Universidad Nacional  
Autónoma de México, Mexico  
City, México.

<sup>2</sup> Facultad de Estudios  
Superiores Iztacala,  
Universidad Nacional  
Autónoma de México,  
Tlalnepantla, Estado de  
México, México.

\* Autor para la  
correspondencia:  
pasfer@unam.mx

This is an open access article distributed  
under the terms of the Creative  
Commons Attribution License CC  
BY-NC (4.0) international.

**E**l género *Sesbania* Adans., comprende 56 especies (The plant List 2013) distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de África, Australia, Asia y América (Salimuddin & Ramesh 1993, Forni-Martins & Guerra 1999). Incluye herbáceas anuales y perennes, arbustivas y árboles con un porte de pequeño a mediano con grandes flores papilionadas amarillas (Daviña & Honfi 2000). *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., es un arbusto perenne de gran porte que alcanza hasta cuatro metros de altura y crece en ambientes tropicales. Es originaria de la región de las Pampas en Argentina (Branzini *et al.* 2012) con una distribución que comprende el centro y sur de Brasil, Argentina, Uruguay y Paraguay (Pott & Pott 1994) y se extiende hasta México donde se le encuentra asociada preferentemente con ambientes húmedos e inundables. Debido a sus características de crecimiento rápido ha sido usada para la reforestación de bosques riparios, control de la erosión de suelos, rehabilitación de áreas degradadas, producción de leña y carbón vegetal y recientemente como biorremediador debido a su capacidad de absorber metales en zonas contaminadas (De Souza-Moreira *et al.* 2006, Simões *et al.* 2008, Branzini *et al.* 2012). Por otra parte, en sus semillas han sido caracterizados algunos compuestos polifenólicos fitotóxicos como las catequinas, las cuales inhiben el crecimiento y competencia por parte de otras plantas (Simões *et al.* 2008).

Desde el punto de vista citogenético, en *Sesbania* se han estudiado alrededor de 29 especies y la mayoría de los taxa exhiben  $2n = 12$  (Forni-Martins *et al.* 1994), no obstante existen especies tetraploides ( $2n = 24$ ) como *Sesbania bispinosa*, *S. formosa*, *S. grandiflora*, *S. sericea*, *S. simpliciuscula* además de citotipos de *S. sesban* que exhiben un  $2n = 4x = 24$  (Pawar & Kulkarni 1955, Joshua 1989, Salimuddin & Ramesh 1993, Vijayakumar & Kuriachan 1995, Kumar *et al.* 2014) e incluso existen registros de  $2n = 14$  en *S. pachycarpa* (Abou-El-Enain *et al.* 1998, Kumar *et al.* 2014). El número básico propuesto para el género es  $x = 6$  (Goldblatt 1981, Bairiganjan & Patnaik 1989, Forni-Martins *et al.* 1994). Aunque existen conteos cromosómicos contradictorios (Kumar *et al.* 2014) existe acuerdo sobre la poca variación en forma y tamaño de los cromosomas entre las especies analizadas y se han descrito cariotipos donde predominan cromosomas metacéntricos (m) y submetacéntricos (sm), aunque también se han registrado pequeñas diferencias cariotípicas a nivel de subgénero (Forni-Martins *et al.* 1994). Sin embargo, la morfología cromosómica detallada para algunas especies aún es contradictoria (Salimuddin & Ramesh 1993) y existe controversia en relación con el número de constricciones secundarias, satélites, organizadores nucleolares y su posición en los cromosomas del complemento. En efecto, existen investigaciones (Abou-El-Enain *et al.* 1998) donde no se registran constricciones secundarias ni satélites en 14 especies y 19 accesiones y otras (Heering & Hanson 1993, Vijayakumar & Kuriachan 1995) donde estos marcadores pueden ser vistos claramente. Interesantemente las investigaciones anteriores incluyen a *S. keniensis* y *S. sesban*, por ejemplo. Asimismo, en *S. sesban* y *S. sesban* var. *nubica*, ambas  $2n = 12$ , se han descrito a los organizadores nucleolares en forma de constricciones secundarias en el primer par cromosómico (Datta & Neogi 1970, Sareen & Trehan 1979, Salimuddin & Ramesh 1993) y en forma de satélites en el brazo corto del cuarto par (Heering & Hanson 1993) y quinto par (Parihar & Zadoo 1987). Incluso, para esta misma especie se han descrito cariotipos con dos (Lubis *et al.* 1981) y tres pares de cromosomas nucleolares (Jacob 1941).

Por otra parte, Forni-Martins & Guerra (1999) utilizaron fluorocromos (CMA y DAPI) y mostraron que en *Sesbania virgata* la posición de las bandas CMA<sup>+</sup> adyacentes a las constricciones secundarias no concordaron con la posición de satélites propuestas en una investigación anterior (Forni-Martins *et al.* 1994). Además, señalaron la presencia de dos a cuatro regiones teñidas por CMA dentro del nucleolo en interfase lo que sugería que las bandas de CMA estaban asociadas a las regiones organizadoras del nucleolo o “NOR” y que el polimorfismo de las bandas CMA<sup>+</sup> observado en dos poblaciones brasileñas podría indicar la existencia de razas citogeográficas.

Aunque el número cromosómico de *Sesbania virgata* se conoce desde hace más de 70 años (Castronovo 1945) son pocos los estudios que detallan su arquitectura cromosómica y menos aun los que describen el número y posición de los satélites (Forni-Martins *et al.* 1994, Forni-Martins & Guerra 1999). El objetivo de este trabajo es aplicar una técnica de extendido en superficie y secado al aire para identificar en células en metafase y prometafase el número de constricciones secundarias y satélites, su tipo, posición y la relación que guardan con la orga-

#### Contribución de los autores:

Fernando Tapia-Pastrana dirigió el diseño de la presente investigación, encabezó los ensayos para la obtención de los cromosomas mitóticos, y contribuyó a la redacción, discusión y revisión del manuscrito final. Fernando Tapia-Aguirre participó en la preparación y análisis del material de trabajo, en la adquisición de datos y en su interpretación y contribuyó a la redacción, discusión y revisión del manuscrito final.

nización del nucleolo en dos poblaciones americanas geográficamente distantes de *Sesbania virgata*. Esta información se utilizará en la interpretación del cariotipo en esta especie y su consideración como razas geográficas o citotipos.

### Materiales y métodos

En México, semillas de *S. virgata* (ADS 2695) fueron recolectadas en el Municipio de Tlacotalpan, Estado de Veracruz, 18° 37' 0" N, 95° 40' 0" O. En Argentina, las semillas de *S. virgata* (ADS s/n) se recolectaron en la Provincia de Salta, Ruta Nacional 34, entre Embarcación y El cruce 23° 9' 49.18" S; 64° 3' 41.06" O. Lotes de 8 a 10 semillas fueron utilizados para el análisis de cada población. Este número de semillas, aunque reducido, permite obtener un número suficiente de células en metafase y prometafase para cumplir los objetivos de la presente investigación; las semillas fueron germinadas a temperatura ambiente en cajas Petri con algodón humedecido. Los meristemos radiculares se separaron de raíces de 1-1.5 cm de longitud y pretratados con 8-hidroxiquinoleína 0.002 M durante 5 horas a temperatura ambiente y fijados en solución Farmer, etanol absoluto-ácido acético glacial, 3:1.

Para la obtención de los cromosomas en prometafase y metafase se siguió el método de extendido en superficie y secado al aire propuesto por Tapia-Pastrana & Mercado-Ruaro (2001), con algunas modificaciones, el cual se basa en la maceración enzimática (pectinasa 20 % + celulasa 1 %) de los meristemos durante 75 minutos a 37 °C. El botón celular fue separado por centrifugación a 1,500 rpm durante 10 minutos y transferido a una solución de KCl 0.075 M durante 13 min a 37 °C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con la misma solución y el botón celular fue fijado en solución Farmer. Dos gotas del botón celular se colocaron en un portaobjetos y se dejaron secar al aire. La tinción de los cromosomas fue realizada con Giemsa al 10 % y las preparaciones se hicieron permanentes empleando resina sintética (Sigma) como medio de montaje. Todas las células en estadios de prometafase y metafase típica observadas en cada población fueron registradas y cuidadosamente analizadas. Los mejores campos, aquellos donde los cromosomas exhiben claramente la posición del centrómero y con un grado similar de condensación de la cromatina, fueron fotografiados con un microscopio óptico Zeiss Axioscop (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Alemania), usando película Kodak Technical Pan. Se utilizó un vernier digital Mitutoyo Digimatic Caliber CD-G''BS (Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japón) para establecer las tallas cromosómicas y otras medidas morfométricas sobre 5 fotografías de placas en metafase típica de cada población amplificadas con la misma magnificación. Para la obtención de la fórmula cariotípica y nomenclatura, se aplicó el sistema propuesto por Levan *et al.* (1964). La proporción de brazos, *r*, se obtuvo mediante el cociente q/p, valor que muestra la relación del brazo largo entre el brazo corto de los cromosomas individuales. La proporción de la suma total de longitudes de brazos cortos respecto a la suma total de longitudes cromosómicas como indicador de simetría o asimetría de un cariotipo (TF %) se realizó según Sinha & Roy (1979). Los ejemplares de herbario depositados en FEZA fueron preparados de plantas crecidas en condición de invernadero a partir de semillas proporcionadas por el Dr. Alfonso Delgado Salinas.

### Resultados

*Sesbania virgata*, Tlacotalpan, México. Para verificar la ubicación de las constricciones secundarias y satélites y establecer el número cromosómico diploide se observaron 21 células en metafase típica y 3 células en prometafase, las cuales exhibieron claramente un  $2n = 12$ .

*Sesbania virgata* Salta, Argentina. El número cromosómico diploide y la localización de constricciones secundarias y satélites se establecieron a partir de la observación de 142 células en metafase típica y nueve células en prometafase, todas exhibieron un  $2n = 12$ .

Las características cariotípicas de *Sesbania virgata* en las poblaciones de Tlacotalpan, México y de Salta, Argentina se describen en las Tablas 1 y 2 respectivamente. La Tabla 3 incluye otras características cuantitativas de ambos cariotipos. Se registró la presencia de solo dos cromosomas con satélite en ambas poblaciones. Los macrosatélites, siguiendo la clasificación de Battaglia (1955) fueron intensamente teñidos y fáciles de detectar.

**Tabla 1.** Análisis cariotípico de *Sesbania virgata* Tlacotalpan, Veracruz, México. PC, par cromosómico; LCT, longitud cromosómica total haploide en  $\mu\text{m}$ ; LBL, longitud de brazo largo en  $\mu\text{m}$ ; LBC, longitud del brazo corto en  $\mu\text{m}$ ;  $r$ , proporción del brazo largo entre el corto de los cromosomas; N, nomenclatura; \*cromosoma con restricción secundaria y satélites; m, metacéntrico.

PC	LCT	LBL	LBC	$r$	N
1	4.19	2.40	1.79	1.34	m
2	3.81	2.33	1.48	1.57	m
3	2.70	1.43	1.27	1.13	m
4	2.39	1.30	1.09	1.19	m
5	2.07	1.12	0.95	1.18	m
6	1.71	0.98	0.73	1.34	m*

## Discusión

Un aspecto fundamental en la descripción de los cariotipos de especies vegetales es la búsqueda e identificación de marcadores cromosómicos (Guerra 2012). Para el caso del género *Sesbania*, la información disponible muestra notables discrepancias en relación con la identificación precisa de los cromosomas que portan satélites, así como al tipo y ubicación de estos, información útil en la delimitación taxonómica y citogenética comparada.

En el caso de las dos poblaciones de *S. virgata* estudiadas aquí, los complementos cromosómicos en metafase mostraron un  $2n = 12$  ( $x = 6$ ) y cariotipos bimodales (Figuras 1 y 2). Las diferencias en el tamaño cromosómico y la posición del centrómero fueron suficientes para permitir la identificación sin ninguna duda de los pares cromosómicos individuales, la elaboración detallada de los cariotipos (Tablas 1 y 2; Figura 3) y la obtención de otras características cuantitativas de los mismos (Tabla 3). Asimismo, los satélites fueron fácilmente discriminados como macrosatélites según la clasificación de Battaglia (1955) y se observaron intensamente teñidos y localizados sobre los brazos cortos de los dos cromosomas más pequeños a los cuales se unen mediante largas constricciones secundarias (Tablas 1 y 2 y Figuras 1-5). Se corroboró que la cromatina de las constricciones secundarias se mostró ampliamente descondensada en metafase y el tamaño de los satélites favoreció considerablemente su utilidad como marcadores cromosómicos en *S. virgata*. Por otra parte, en prometafase fue común encontrar a los dos cromosomas con satélite asociados al nucleolo por los extremos que portan satélite (Figuras 4 y 5). Lo anterior corrobora que éstos son los cromosomas “NOR”. La variación morfológica en la proporción de brazos entre los cromosomas portadores de satélites explica las diferencias entre las fórmulas cariotípicas e índices de asimetría (TF %) de ambas poblaciones (Tabla 3). El análisis detallado de los cromosomas somáticos en *S. virgata* de las poblaciones estudiadas reveló cariotipos esencialmente simétricos con predominancia de cromosomas metacéntricos acorde con los valores TF %.

A pesar de que investigaciones citogenéticas previas en *S. virgata* describen la presencia de satélites en el brazo largo del sexto par (Forni-Martins *et al.* 1994) y bandas CMA<sup>+</sup> adyacentes

**Tabla 2.** Análisis cariotípico de *Sesbania virgata* Salta, Argentina. PC, par cromosómico; LCT, longitud cromosómica total haploide en  $\mu\text{m}$ ; LBL, longitud de brazo largo en  $\mu\text{m}$ ; LBC, longitud del brazo corto en  $\mu\text{m}$ ;  $r$ , proporción del brazo largo entre el corto de los cromosomas; N, nomenclatura; \*cromosoma con restricción secundaria y satélites; m, metacéntrico; sm, submetacéntrico.

PC	LCT	LBL	LBC	$r$	N
1	3.42	2	1.42	1.41	m
2	3.22	1.87	1.34	1.40	m
3	2.15	1.17	0.97	1.21	m
4	1.95	1.05	0.90	1.17	m
5	1.78	0.97	0.80	1.21	m
6	1.42	0.9	0.52	1.73	sm*

**Tabla 3.** Características cuantitativas del complemento cromosómico de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. obtenidos a partir de cinco células en metafase. FC, fórmula cromosómica; LCTH, longitud cromosómica total haploide en  $\mu\text{m}$ ; TCP, talla cromosómica promedio en  $\mu\text{m}$ ; Rango (longitud del cromosoma mayor-longitud del cromosoma menor); Razón (cromosoma mayor/cromosoma menor); TF %, índice de asimetría (longitud total de brazos cortos/longitud cromosómica total  $\times 100$ ).

<i>Sesbania virgata</i>	FC	LCTH	TCP	Rango	Razón	TF %
Tlacotalpan, México	6m	16.78 $\pm$ 1.47	2.80 $\pm$ 0.23	2.48	2.45	43.3
Salta, Argentina	5m+1sm	13.96 $\pm$ 0.91	2.32 $\pm$ 0.15	2.0	2.48	42.68

a constricciones secundarias aparentemente en el mismo lugar, además de una marca adicional en un par cromosómico mediano a grande (Forni-Martins & Guerra 1999) los resultados de la presente investigación muestran que en las poblaciones de *S. virgata* bajo estudio las constricciones secundarias y satélites se posicionan únicamente en el brazo corto del sexto par. Lo anterior parece confirmar una generalidad observada en los complementos cromosómicos de especies vegetales donde el 86 % de las constricciones secundarias preferentemente se localizan en los brazos cortos (Lima De Faria 1976, Lim *et al.* 2001), particularmente en Leguminosae (Tapia-Pastrana & Mercado-Ruaro 2001, Gómez-Acevedo & Tapia-Pastrana 2003, Tapia-Pastrana & Gómez-Acevedo 2005, Biondo *et al.* 2006, Tapia-Pastrana & Jiménez-Salazar 2011, Tapia-Pastrana 2012, Tapia-Pastrana *et al.* 2012). Por otra parte, si se considera que las dos poblaciones bajo estudio se encuentran geográficamente aisladas es probable que las diferencias citológicas a nivel intraespecífico registradas en esta investigación apunten hacia un proceso de diferenciación genómica vía remodelado cromosómico que favorece el proceso de especiación entre citotipos y que puede involucrar o no cambios morfológicos significativos (Kenton 1981, 1984, Kenton *et al.* 1988, Grant 1989, Palomino & Martínez 1994, Martínez *et al.* 2000). Procesos similares de diferenciación citológica en los genomas de citotipos que tienen su origen en rearreglos cromosómicos han sido informados en diversos géneros de angiospermas (Palomino & Martínez 1994 y literatura allí citada). La propuesta de razas cromosómicas en *S. virgata*

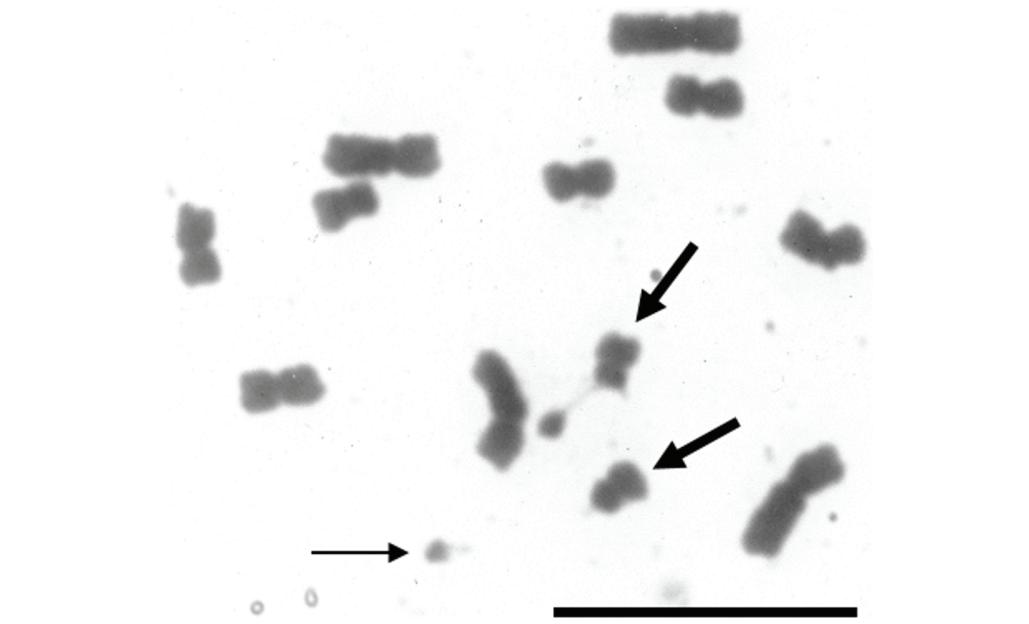


Figura 1. Complemento cromosómico de *S. virgata* ( $2n = 12$ ) de la población de Tlacotalpan, México. Las flechas gruesas señalan al par de cromosomas con constricciones secundarias asociadas a macrosatélites. La flecha delgada resalta a un satélite ampliamente separado del cuerpo del cromosoma al cual se asocia. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



Figura 2. Complemento cromosómico de *S. virgata* ( $2n = 12$ ) de la población de Salta, Argentina. Las flechas señalan al par de cromosomas con constricciones secundarias asociadas a macrosatélites. Barra = 10 μm.

(Forni-Martins & Guerra 1999) y la distribución y variación del citotipo (esta investigación) señalan la necesidad de realizar estudios de mayor alcance en esta especie que por su amplio intervalo de distribución geográfica presenta poblaciones geográficamente aisladas y por tanto sujetas a selección natural. Lo anterior es relevante pues es la primera ocasión que se realiza este tipo de investigación involucrando por lo menos una población mexicana para cualquier especie del género.

#### Agradecimientos

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la FES-Zaragoza por el apoyo prestado para la realización de la presente investigación. Al Dr. Alfonso Delgado-Salinas, Instituto de Biología, UNAM, por suministrar las semillas de las poblaciones bajo estudio. Las observaciones y sugerencias de dos árbitros anónimos mejoraron sustancialmente la interpretación y presentación de este trabajo.

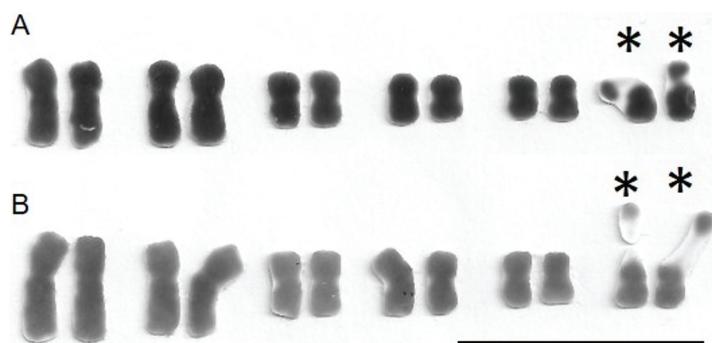


Figura 3. Cariotipos de *S. virgata*  $2n = 12$ . A, Tlacotalpan, México. B, Salta, Argentina. Los cromosomas están alineados por el centrómero y ordenados en forma decreciente. \*, satélites y constricciones secundarias asociadas a brazos cortos del sexto par. Barra, 10 μm.

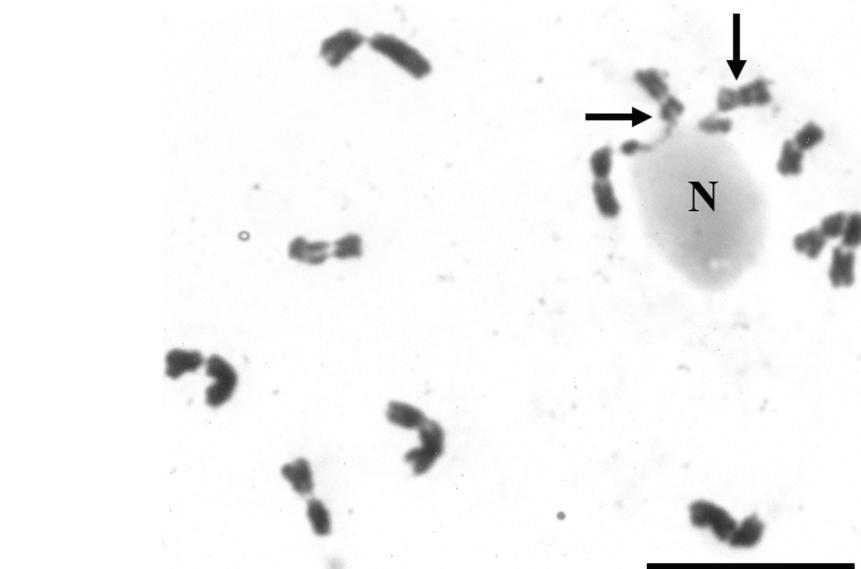


Figura 4. Núcleo en prometafase de *S. virgata*  $2n = 12$  de Tlacotalpan, México. Las flechas resaltan a los cromosomas satelitales asociados a un nucleolo único por los extremos que portan satélites. N, núcleolo. Barra, 10  $\mu\text{m}$ .

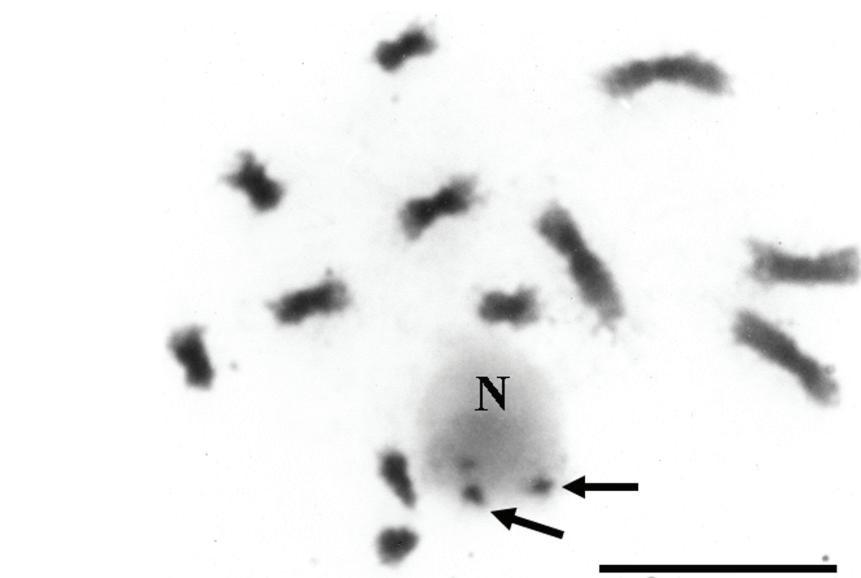


Figura 5. Núcleo en prometafase de *S. virgata*  $2n = 12$  de Salta, Argentina. Las flechas resaltan a los cromosomas satelitales asociados a un nucléolo único por los extremos que portan satélites. N, núcleo. Barra, 10  $\mu\text{m}$ .

#### Literatura citada

- Abou-EI-Enain MM, EI-Shazly HH, El-Kholy MA. 1998. Karyological studies in some African species of the genus *Sesbania* (Fabaceae). *Cytologia*. **63**: 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.63.1>
- Bairiganjan GC, Patnaik SN. 1989. Chromosomal evolution in Fabaceae. *Cytologia*. **54**: 51-64. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.54.51>
- Battaglia E. 1955. Chromosome morphology and terminology: (with 12 figures). *Caryologia*. **8**: 179-187. DOI: <https://doi.org/10.1080/00087114.1955.10797556>

- Biondo E, Miotto STS, Schifino-Wittmann MT. 2006. Cytogenetics of species of *Chamaecrista* (Leguminosae-Caesalpinioideae) native to southern Brazil. *Botanical Journal of Linnean Society*. **150**: 429-439. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00480.x>
- Branzini A, González RS, Zubillaga M. 2012. Absorption and translocation of copper, zinc and chromium by *Sesbania virgata*. *Journal of Environmental Management*. **102**: 50-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.01.033>
- Castronovo A. 1945. Estudio cariológico de doce especies de leguminosas argentinas. *Darwiniana*. **7**: 38-57.
- Datta RM, Neogi AK. 1970. Chromosome numbers and karyotypes in the genera *Crotalaria* and *Sesbania*. *Acta Agronomica Hungarica*. **19**: 343-350.
- Daviña JR, Honfi AI. 2000. Los cromosomas de algunas especies leñosas. *Bonplandia*. **10**: 169-173.
- De Souza-Moreira FM, Cruz L, De Faria SM, Marsh T, Martínez-Romero E, De Oliveira-Pedrosa F, Pitard RM, Young JPW. 2006. *Azorhizobium doeberinerae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Systematic and Applied Microbiology*. **29**: 197-206. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.09.004>
- Forni-Martins ER, Franchi-Tanibata M, Cardelli-de-Lucena MA. 1994. Karyotypes of species of *Sesbania* Scop. (Fabaceae). *Cytologia*. **59**: 479-482. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.59.479>
- Forni-Martins ER, Guerra M. 1999. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. species (Fabaceae). *Caryologia*. **52**: 97-103. DOI: <https://doi.org/10.1080/00087114.1998.10589160>
- Goldblatt P. 1981. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in Legume Systematics Part 2*. Kew: Royal Botanic Gardens, 427-463. ISBN: 9780855212247
- Gómez-Acevedo SL, Tapia-Pastrana F. 2003. Estudio genecológico en *Prosopis laevigata*, *Acacia farnesiana* y *Acacia schaffneri* (Leguminosae). *Darwiniana*. **41**: 47-54.
- Grant V. 1989. *Plant Speciation*. Columbia University Press ISBN-13: 978-0231083263
- Guerra M. 2012. Cytotaxonomy: The end of childhood. *Plant Biosystems*. **146**: 703-710. DOI: <https://doi.org/10.1080/11263504.2012.717973>
- Heering JH, Hanson J. 1993. Karyotype analysis and interspecific hybridisation in three perennial *Sesbania* species (Leguminosae). *Euphytica*. **71**: 21-28. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00023463>
- Jacob K. 1941. Cytological studies in the genus *Sesbania*. *Bibliografia Genetica*. **1**: 225-300.
- Joshua DC. 1989. Karyotype analysis in *Sesbania* species. *Nucleus*. **32**: 161-163.
- Kenton A. 1981. Chromosome evolution in the *Gibasis linearis* Alliance (Commelinaceae). I. The Robertsonian differentiation of *G. venustula* and *G. speciosa*. *Chromosoma*. **84**: 291-304. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00399139>
- Kenton A. 1984. Chromosome evolution in the *Gibasis linearis* group (Commelinaceae) III. DNA variation, chromosome evolution and speciation in *G. venustula* and *G. heterophylla*. *Chromosoma*. **90**: 303-310. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00287039>
- Kenton A, Langton D, Coleman J. 1988. Genomic instability in a clonal species, *Tradescantia commelinoides* (Commelinaceae). *Genome*. **30**: 734-744.
- Kumar S, Fribe B, Gill BS. 2014. Physical localization of rRNA genes by fluorescence in situ hybridization (FISH) and analysis of spacer length variants of 45S rRNA (slvs) genes in some species of genus *Sesbania*. *Plant Systematics and Evolution*. **300**: 1793-1802. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1006-z>
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. **52**: 201-219. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>
- Lim KB, Wennekes J, De Jong JH, Jacobsen E, van Tuyl JM. 2001. Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* and *Lilium rubellum* by chromosome banding and fluorescence in situ hybridization. *Genome*. **44**: 911-918. DOI: <https://doi.org/10.1139/g01-066>
- Lima De Faria A. 1976. The chromosome field. I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas*. **83**: 1-22. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1976.tb01565.x>
- Lubis SHA, Okada H, Sastrapradja S. 1981. On the cytology of four species of *Sesbania*. *Annales Bogorienses*. **7**: 115-127. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.58.241>
- Martínez J, Méndez I, Palomino G. 2000. Cytological and genetical differentiation between cytotypes of *Echeandia nana* (Anthericaceae). *Caryologia*. **53**: 147-158. DOI: <https://doi.org/10.1080/00087114.2000.10589190>
- Palomino G, Martínez J. 1994. Cytotypes and meiotic behavior in Mexican populations of three species of *Echeandia* (Liliaceae). *Cytologia*. **59**: 295-304. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.59.295>
- Parihar RS, Zadoo SN. 1987. Cytogenetical studies of the genus *Sesbania* Scop. I Karyotype. *Cytologia*. **52**: 507-512. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.52.507>
- Pawar MS, Kulkarni SA. 1955. Chromosome numbers in *Sesbania* species. *Current Science*. **24**: 207-208.

- Pott A, Pott VJ. 1994. *Plantas do Pantanal*. Corumba: Embrapa. ISBN: 9788585007362
- Salimuddin Ramesh B. 1993. Karyological studies in the genus *Sesbania*. *Cytologia*. **58**: 241-246. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.58.241>.
- Sareen TS, Trehan R. 1979. Karyotypes of some taxa in *Sesbania* Adanson. *Acta Botanica Indica*. **7**: 178-180.
- Simões K, Du J, Kretzschmar FS, Broeckling CD, Stermitz FS, Vivanco JM, Braga MR. 2008. Phytotoxic catechin leached by seeds of the tropical weed *Sesbania virgata*. *Journal of Chemical Ecology*. **34**: 681-687. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9443-1>
- Sinha SSN, Roy H. 1979. Cytological studies in the genus *Phaseolus* I. Mitotic analysis in fourteen species. *Cytologia*. **44**: 191-199. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.44.191>.
- Tapia-Pastrana F. 2012. Karyological characterisation of four American species of *Crotalaria* (Leguminosae: Papilionoideae) by splash method. *Kew Bulletin*. **67**: 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12225-012-9385-1>
- Tapia-Pastrana F, Gómez-Acevedo SL. 2005. El cariotipo de *Pithecellobium dulce* (Mimosoideae-Leguminosae). *Darwiniana*. **43**: 52-56.
- Tapia-Pastrana F, Jiménez-Salazar A. 2011. Los cariotipos de *Cologania grandiflora* y *Erythrina americana* (Leguminosae- Papilionoideae- Phaseoleae) de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. **82**: 776-781.
- Tapia-Pastrana F, Mercado-Ruaro P. 2001. A combination of the "squash" and "splash" techniques to obtain the karyotype and assess meiotic behavior of *Prosopis laevigata* L. (Fabaceae: Mimosoideae). *Cytologia*. **66**: 11-17. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.66.11>
- Tapia-Pastrana F, Mercado-Ruaro P, Gómez-Acevedo SL. 2012. Contribución a la citogenética de *Tamarindus indica* (Leguminosae: Caesalpinoideae). *Acta Botanica Mexicana*. **98**: 99-110. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm98.2012.1142>
- The Plant List. 2013. Version 1.1 <<http://www.theplantlist.org/>> (accesed January 28, 2018).
- Vijayakumar MG, Kuriachan PI. 1995. Karyomorphology of five taxa of *Sesbania* from South India. *Cytologia*. **48**: 3-4, 329-334. DOI: <https://doi.org/10.1080/00087114.1995.10797342>