

Maria Elizabeth Michelin Ramos

DISSERTAÇÃO APRESENTA
DA A UNIVERSIDADE ESTA-
DUAL DE CAMPINAS COMO
PARTE DOS REQUISITOS PA-
RA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE EM BIOLOGIA
VEGETAL.

**ESTUDOS QUIMIOTAXONÔMICOS DE
ESPÉCIES DO GÊNERO PHASEOLUS L.
(LEGUMINOSAE - LOTOIDEAE) NATIVAS
E CULTIVADAS NO BRASIL**

R147e

3320/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. GEORGE JOHN SHEPHERD, Professor do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pela orientação, amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. HERMOGENES DE FREITAS LEITÃO FILHO, Chefe de Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio, amizade e leitura do manuscrito.

Aos professores e amigos dos Departamentos de Morfologia e Sistemática Vegetais e Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas.

À Sra. Maria Odeti Fontana Pedrossanti do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais pelo auxílio na confecção deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que financiou o início deste trabalho.

ÍNDICE

I - Introdução	01
II - Histórico	03
1 - Aspectos taxonômicos	03
O complexo <i>Phaseolus-Vigna</i>	08
2 - Uso de dados químicos	11
Estudos de proteínas em <i>Phaseolus</i>	14
III - Características das Seções	18
IV - Material e Métodos	29
1 - Material	29
2 - Métodos	30
V - Resultados	38
VI - Discussão	48
VII - Conclusões	63
VIII - Resumo	65
IX - Summary	66
X - Bibliografia	67

I - Introdução

Este trabalho é um estudo quimiotaxonômico através de globulinas de sementes de espécies do gênero *Phaseolus* L. s.l. que ocorrem no Brasil.

O valor econômico do gênero *Phaseolus* s.l. é bastante ponderável sob vários aspectos. A espécie *Phaseolus vulgaris* L., o feijoeiro comum, é um alimento de grande importância em todo o Brasil, como uma das principais fontes de proteínas e carboidratos vegetais. Outras espécies, como *Phaseolus lunatus* L., *Phaseolus coccineus* L. e *Phaseolus mungo* L., são igualmente cultivadas para fins alimentícios e atualmente já oferecem boas perspectivas econômicas. Sob o ponto de vista forrageiro, diversas espécies são importantes, particularmente o siratro, *P. atropurpureus* DC., intensamente cultivado no estado de São Paulo, consorciado com gramíneas. Por estes motivos, o gênero se apresenta de grande interesse taxonômico, pois muitos problemas ainda persistem na delimitação e relacionamento das espécies e o levantamento taxonômico poderá assentar as bases científicas nas quais um posterior trabalho de melhoramento genético poderá se basear.

O gênero *Phaseolus* s.l., tem dois centros de dispersão, um localizado na Ásia, com cerca de 54 espécies e outro americano, com cerca de 126 espécies. As espécies de um e de outro centro, apresentam marcadas diferenças morfológicas em diversos caracteres, mostrando uma independência entre os dois centros de dispersão e uma evolução e domesticação distintas.

Estudos serológicos, mostraram uma nítida separação entre as espécies endêmicas americanas e as espécies de origem asi

ática.

Trabalhos taxonômicos mais recentes, auxiliados por estudos palinológicos e químicos, tem sugerido a transferência das espécies de origem asiática para o gênero *Vigna* Savi, gênero muito próximo à *Phaseolus* e a colocação de algumas das espécies americanas tropicais no gênero *Macroptilium* (Benth.) Urb., restando no gênero *Phaseolus* somente as espécies endêmicas americanas, dos altos platôs das Américas do Sul e Central.

Estudos quimiotaxonômicos, através de globulinas de sementes do gênero *Phaseolus*, mostraram a validade da utilização desses dados na separação de grupos, de acordo com a presença ou ausência de Glicoproteína II (G2), dando uma certa aceitabilidade para as novas divisões propostas, apesar de terem sido testadas somente algumas das espécies do gênero.

O presente estudo quimiotaxonômico das espécies nativas e cultivadas no Brasil, servirá como um complemento às técnicas morfológicas e geográficas normalmente empregadas em estudos taxonômicos, podendo esclarecer alguns problemas básicos da distinção entre as seções do gênero, principalmente em relação aos gêneros *Vigna* e *Macroptilium*, assentando suas bases taxonômicas.

II - Histórico

1 - Aspectos taxonômicos

O gênero *Phaseolus* foi originalmente descrito por Linnê em 1753, sendo a espécie tipo do gênero *Phaseolus vulgaris* L.

Bentham em 1840, confirmou a validade do gênero e colocou-o na tribo *Phaseoleae* Benth., subtribo *Euphaseoleae* Benth., considerando básicos para o seu reconhecimento a quilha espiralada. Menciona 85 espécies para o gênero, distribuídas em sete seções: *Euphaseolus*, *Drepanospron*, *Leptospron*, *Strophostyles*, *Lasi*ospron, *Microcochle* e *Macroptilium*.

Em 1859, Bentham fez uma monografia do gênero, dividindo-o em três seções: *Strophostyles*, *Macroptilium* e *Euphaseolus*, incluindo nesta última as seções *Drepanospron* e *Leptospron*.

Posteriormente, em "Genera Plantarum" (Bentham & Hooker, 1865), Bentham inseriu novamente as seções *Leptospron* e *Drepanospron*, adicionando *Dysolobium* como uma seção do gênero. Esta última seção foi reconhecida como um gênero distinto por Prain em 1897.

Hassler em 1923, revisou as espécies sul-americanas do gênero e manteve cinco seções: *Euphaseolus*, *Drepanospron*, *Leptospron*, *Macroptilium* Benth.emend e *Strophostyles*. O seu sistema é baseado na conceituação genérica de Bentham, subdividindo, no entanto, as seções em séries, em um sistema bastante artificial, que não trouxe nenhuma melhora ao original de Bentham.

Piper em 1926, revisou as espécies americanas do gênero, conceituando a subtribo *Phaseolineae* Pip. e estabelecendo uma conceituação mais exata do gênero, considerando básicos para o seu reconhecimento a quilha espiralada, a presença de pelos subestigmáticos e o característico pedicelo floral, nodoso em sua inserção com a haste.

Este autor, deteve-se em caracteres mais estáveis e constantes dentro do gênero, estabelecendo oito seções: *Sigmoidotropis* Pip., *Ceratotropis* Pip., *Lasiospron* (Benth.) emend., *Macroptilium* Benth., *Microcochle* Benth e *Euphaseolus*, considerando as seções *Drepanospron* Benth. e *Strophostyles* Benth. como sinônimos respectivamente de *Euphaseolus* e *Ceratotropis* Pip..

Burkart em 1952, estudando as leguminosas da Argentina, segue a conceituação e divisão propostas por Piper.

O estudo do gênero *Phaseolus* s.l. no Brasil foi feito por Leitão Filho em 1972, onde é seguida a conceituação e divisão propostas por Piper e em 1974 ele reduziu a seção *Leptospron* Benth. a sinônimo de *Phaseolus* s.str., considerando que os caracteres que definiam a seção eram muito variáveis, sendo insuficientes para essa definição.

Urban, em 1928, elevou a seção *Macroptilium* Benth. a nível de gênero, baseando-se nos caracteres que definiam a seção.

Verdcourt em 1970, revisando as espécies africanas do gênero *Vigna*, encontrou-se frente ao problema de distinção entre esse gênero e *Phaseolus*, gêneros muito afins, admitindo a

existência de grupos periféricos entre esses dois gêneros.

Baseando-se em caracteres morfológicos, palinológicos e químicos, Verdcourt retém no gênero *Phaseolus* a seção *Phaseolus*, onde estão incluídas as seções *Drepanospron* e *Leptospron* Benth., considera a seção *Macroptilium* Benth. como um gênero independente, onde ele insere também a seção *Microcochle* Benth., transfere a seção *Lasiospron* Benth. para o gênero *Vigna* e considera as seções *Ceratotropis* Pip., *Sigmoidotropis* Pip. e *Cochliasanthus* Pip. como subgêneros de *Vigna*. (Tabela I).

Gillet em 1971, considera, baseando-se em Verdcourt (1970), a transferência de cerca de 100 espécies do gênero *Phaseolus* para o gênero *Vigna*, restando em *Phaseolus*, gênero usualmente estimado em cerca de 150-200 espécies, ao redor de 50 espécies.

Baudet (1974), estudou os caracteres de plântulas da tribo *Phaseoleae* e considerando a textura do cotilédone, as estipulas, a base das folhas primordiais e a pilosidade do epicótilo, aceitou as divisões propostas por Verdcourt. Em 1972, este autor, fez um estudo dos caracteres epidérmicos do complexo *Phaseolus-Vigna*, mostrando a existência de pelos uncinulados tipicamente no gênero *Phaseolus*, provendo uma base de distinção entre esse gênero, *Vigna* e *Macroptilium* e em 1976, juntamente com Maréchal (Baudet & Maréchal, 1976), mostrou ser esse caráter estável, que poderia conduzir a uma definição mais clara em relação aos gêneros aparentados.

Em 1974 e 1977, Maréchal & Baudet fizeram as combinações novas de sete espécies de *Macroptilium* (Benth.) Urb..

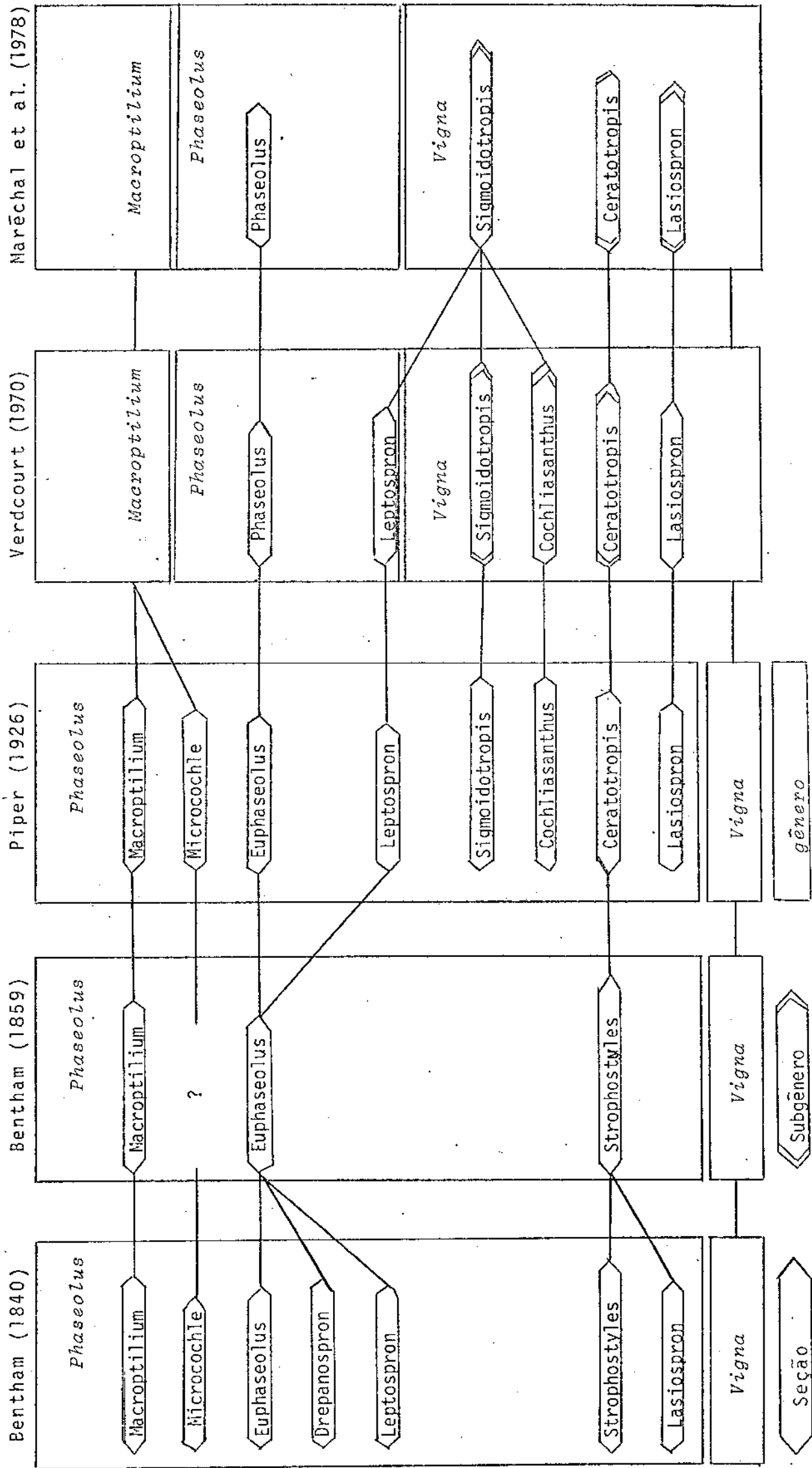


Tabela I - Principais divisões taxonômicas do gênero *Phaseolus*, propostas por alguns autores.

Stainier (1974), num estudo palinológico de espécies dos gêneros *Vigna* Savi, *Phaseolus* L. e *Physostigma* Balf., dividiu o gênero *Phaseolus* em três grupos, de acordo com a presença, leve pronunciamento ou ausência de pseudocolpus, aceitando as novas delimitações do gênero e concluindo que as espécies de *Phaseolus* transferidas para *Vigna*, possuem pólen tipicamente de *Vigna*.

Stainier em 1976, estudou quatro espécies sul-americanas do complexo *Phaseolus-Vigna*, as quais apresentaram um tipo polínico diferente dos normalmente encontrados em *Phaseolus* s.l..

Maréchal et al. (1978a), fizeram um estudo taximétrico do complexo *Phaseolus-Vigna* e gêneros aparentados, utilizando-se de todos os caracteres normalmente empregados na distinção dos gêneros, praticamente seguindo as divisões propostas por Verd - court (1970), apresentando no entanto, algumas modificações. O gênero *Phaseolus*, segundo esses autores, fica composto somente da seção *Phaseolus*, onde está incluída a seção *Drepanospron*. Aceitam o gênero *Macroptilium* (Benth.) Urb. onde incluem a seção *Microcochle* Benth. e transferem para o gênero *Vigna* em nível de subgênero as seções *Ceratotropis* Pip., *Lasiospron* Benth. e *Sig - moidotropis* Pip.. Nesse último subgênero incluem as seções *Coch - liasanthus* Pip. e *Leptospron* Benth..

Maréchal et al. (1978b), listaram as modificações nomenclaturais revalidades do complexo *Phaseolus-Vigna* e dos gêneros aparentados, baseando-se no trabalho de análise informática anterior (1978a).

O complexo *Phaseolus-Vigna*

Um dos problemas mais difíceis encontrados na subtribo *Phaseolineae*, tem sido o da distinção entre os gêneros *Phaseolus* e *Vigna*.

Classicamente a distinção entre os dois gêneros estava baseada no grau de encurvamento da quilha. Bentham, em 1865, distinguiu o gênero *Phaseolus* pela quilha espiralada, a qual é obtusa ou recurvada em *Vigna* e basicamente esta mesma distinção foi seguida por Ducke em 1943.

Gradualmente foi visto que essa distinção não era satisfatória e que espécies oriundas do Velho Mundo, colocadas por esse critério em *Phaseolus*, eram mais relacionadas ao gênero *Vigna* do que às espécies de *Phaseolus* do Novo Mundo.

Wilczek (1954), distinguiu os dois gêneros, baseando-se não somente na quilha, mas também em aspectos da estípula, truncada na base em *Phaseolus* e prolongada em *Vigna* e do estilete, terminal em *Phaseolus* e alongado além do estigma em *Vigna*. Desse maneira, Wilczek transferiu várias espécies do gênero *Phaseolus* para o gênero *Vigna*. Hepper (1958), levou em consideração para a distinção dos dois gêneros, além da quilha e das estípu-las, o fruto, que se apresenta septado em *Vigna* e não septado em *Phaseolus* e baseando-se nesta conceituação, transferiu *Phaseolus mungo* para *Vigna*. Tourner (1958), estudando sementes e plântulas do gênero *Phaseolus* chegou à conclusão que as transferências feitas por Wilczek e Hepper estavam corretas.

Verdcourt (1970), distinguiu os dois gêneros, baseando-se no grau de encurvamento da quilha, nas estípu-las truncadas -

na base ou prolongadas além do seu ponto de inserção, no estigma, estilete, fruto e grão de pólen. Dessa maneira:

Estípulas não prolongadas abaixo do seu ponto de inserção; quilha em espiral com um a cinco turnos completos; estigma interno, alongado ou pequeno, terminal ou subterminal; estilete sem apêndice terminal; fruto não septado; grão de pólen com escultura fina *Phaseolus*.

Estípulas prolongadas abaixo do seu ponto de inserção; quilha erecta-encurvada, raramente fazendo quase uma completa espiral; estigma lateral ou oblíquo, nunca terminal; estilete terminando além do estigma em um bico mais ou menos distinto; fruto septado; grão de pólen com reticulação aberta..... *Vigna*.

A proposição de Verdcourt é uma mudança de sistema, onde existe o gênero *Vigna* bem definido e o gênero *Phaseolus* mais ou menos confuso, para exatamente o inverso (Verdcourt, 1970).

Maréchal et al. (1978a), levam em consideração na distinção dos dois gêneros alguns outros caracteres, que consideram de grande peso taxonômico:

Estípulas truncadas na base; presença de pelos uncinulados; ausência de glândulas pedicelares; brácteas persistentes; pedicelo mais longo que o cálice; ráquis da inflorescência sem nós proeminentes ; quilha espiralada; estigma terminal; grão de pólen com exina sem escultura nítida ou finamente reticulada.....
..... *Phaseolus*.

Estípulas medifixas; ausência de pelos uncinulados ; glândulas pedicelares presentes; brácteas caducas; pedicelo mais

curto ou igual ao cálice; ráquis da inflorescência com n^{os} proe-
minentes; quilha recurvada; estigma não terminal; grão de pólen
com reticulação de malhas largas..... *Vigna*.

2 - Uso de dados químicos

Nos últimos anos, houve um interesse crescente de se relacionar a química das plantas a problemas sistemáticos (Alston & Turner, 1963; Heywood, 1973). Com o desenvolvimento de técnicas experimentais, como cromatografia e eletroforese, capazes de processarem pequenas quantidades de compostos químicos, ocorreu a evolução do uso de dados químicos em auxílio à taxonomia.

Numerosas são as substâncias avaliáveis para esses estudos, mas dois grupos de compostos principais podem ser distinguidos, os micromoleculares e os macromoleculares. Os compostos micromoleculares são muito variáveis, podendo-se citar como exemplos os aminoácidos não proteicos, flavonóides e óleos essenciais. Os compostos macromoleculares são principalmente os ácidos nucleicos e as proteínas.

Estudos comparativos de proteínas tem sido muito utilizados na taxonomia, porque elas são universalmente distribuídas e porque parece provável que as proteínas de espécies botanicamente próximas são bem similares e as de espécies pouco relacionadas, são diferentes. Osborne (1924), em um estudo sobre as propriedades de proteínas de sementes, chegou à conclusão de que se pode encontrar proteínas similares em sementes que são botanicamente próximas e relacionadas.

Tecidos de sementes maduras tem sido normalmente empregados em estudos sobre proteínas, pois as proteínas se apresentam em um mesmo estado fisiológico e representam o estado definitivo de desenvolvimento (maturidade).

Osborne (1924), investigou proteínas de sementes e distinguiu vários tipos, caracterizados segundo a sua solubilidade:

1. albuminas - solúveis em água e soluções salinas
2. globulinas - solúveis em soluções salinas, mas insolúveis ou solúveis apenas ligeiramente em água.
3. prolaminas . solúveis em etanol 70-80% (w/v), mas insolúveis em água ou álcool absoluto
4. glutelinas - solúveis em ácidos diluídos e álcalis

Em sementes de leguminosas, aproximadamente 80% das proteínas são de reserva ou armazenamento, pois são quebradas na germinação e utilizadas nesse processo como fontes de Nitrogênio e Carbono (Barker et al., 1976; Derbyshire et al., 1976). Dessas proteínas 50-75% são globulinas, pois necessitam altas concentrações salinas para sua solubilização.

Técnicas de gel eletroforese e serologia tem sido empregadas em estudos de afinidades entre proteínas de sementes de plantas e também como medida do grau de similaridade e relacionamento entre espécies.

Em eletroforese utiliza-se a presença de grupos ionizáveis na superfície da molécula proteica, assim como o seu tamanho e configuração, que afetam sua mobilidade quando sujeitas a um campo elétrico. Em gel eletroforese há, além da separação por propriedades elétricas, um efeito peneirador, que aumenta a resolução da técnica. Recentemente, Boulter et al. (1966), mostraram as vantagens da utilização de geis de acrilamida, onde estão incluídas a economia de material, alta resolução, rápida separação e a simultânea análise de muitas amostras.

Shapiro, Viñuela e Maizel (1965) e Weber & Osborn (1969) demonstraram que a separação de proteínas por eletroforese de poliacrilamida na presença do detergente aniônico SDS é dependente do peso molecular das cadeias polipeptídicas. Ocorreria a quebra das ligações dissulfídricas das moléculas de proteínas, na presença de β -Mercaptoetanol, havendo então, a ligação destas com os ânions de SDS.

Em algumas plantas de importância econômica, tais como, trigo (Johnson et al., 1967), algodão (Johnson & Thein, 1970) e sorgo (Schechter & Dewet, 1975), os resultados obtidos com os estudos de proteínas de sementes mostraram-se valiosos para provarem interrelações entre diferentes taxa, quando as evidências morfológicas eram escassas e sugeriam interpretações duvidosas sobre a filogenia das espécies. Em espécies de leguminosas, como *Macrotyloma*, *Dolichos* e *Pseudovigna* (Dardene et al., 1973) os estudos quimiotaxonômicos se mostraram úteis como argumentos adicionais para novas propostas de divisões taxonômicas. Em *Vigna* (Carasco et al., 1977) os estudos das proteínas de sementes de espécies africanas se mostraram valiosos nas investigações sistemáticas desse gênero. Em *Crotalaria* (Boulter et al., 1970), estudos citológicos e de proteínas de sementes mostraram uma razoável correlação, onde o principal tipo de padrão de subunidade proteica apresentava uma comparável distribuição com o principal tipo de forma cromossômica. Evidências de ambas as linhas de investigação, levaram os autores a sugerir alterações em níveis taxonômicos.

Estudos de proteínas em *Phaseolus* L..

Os trabalhos efetuados com proteínas de sementes em *Phaseolus* L. tem se referido principalmente a estudos detalhados das proteínas de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. e em particular comparações dessa espécie com *Vicia faba* L.

Pusztai em 1966, isolou duas proteínas das sementes de *Phaseolus vulgaris* L.. A primeira se constituiu na maior fração proteica e era uma glicoproteína, sendo seu carbohidrato principalmente constituído de D-manose e D-glicosamina, juntamente com pequenas quantidades de arabinose, xilose e fucose, sendo por ele designada como Glicoproteína I. A segunda proteína era um inibidor de tripsina, inteiramente desprovida de açúcares e apresentava um pigmento azulado. Em 1970 demonstrou ser a primeira Glicoproteína II (Pusztai & Watt, 1970).

Barker et al. (1976), estudaram a principal proteína de reserva de sementes maduras de *Phaseolus vulgaris* cv 'Seafarer', identificando três proteínas com características de solubilidade diferentes, localizadas nos corpos proteicos.

A descoberta de duas globulinas com coeficientes de sedimentação diferentes, legumina (11S) e vicilina (7S), em *Pisum sativum* e *Vicia faba*, tem levado os autores a sugerir a existência dessas mesmas globulinas em espécies de *Phaseolus* L..

O isolamento de globulinas das sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus aureus*, por precipitação zonal isoelétrica, foi feito por Derbyshire & Boulter (1976), onde determinaram os pesos moleculares das subunidades constituintes, chegando os autores à conclusão, que uma das globulinas (11S), era muito seme-

lhante à legumina de *Vicia faba*.

O processo de extração de duas globulinas dos cotilédones de sementes de *Phaseolus vulgaris*, G1 e G2, foi descrito por Sun & Hall (1975), que mostraram que essas duas frações exibem características de solubilidade diferenciais, sob condições variadas de pH, concentração proteica e temperatura. Segundo esses autores, G1 dissocia-se normalmente em três subunidades com PM 53000, 47000 e 43000, respectivamente.

McLeester et al. (1973), extraíram duas frações de globulina de *Phaseolus vulgaris* que se mostraram com subunidades peptídicas diferentes das globulinas, legumina e vicilina, normalmente encontradas em *Vicia faba*.

De acordo com Boulter (Derbyshire et al., 1976), uma das globulinas de *Phaseolus vulgaris*, G1, não é legumina, mas Glicoproteína II e a outra globulina, G2, não é vicilina, mas possivelmente uma aglutinina.

Estudos quimiotaxonômicos do gênero *Phaseolus* s.l. tem sido escassos, sendo utilizadas, em geral, para esses estudos poucas espécies do gênero.

Boulter et al. (1967), estudaram através de eletroforese, globulinas de sementes de várias espécies de leguminosas. Espécies do gênero *Phaseolus* foram distribuídas em grupos, de acordo com o padrão proteico apresentado, mas poucas espécies do gênero foram estudadas.

O estudo das desidrogenases glutâmica e fórmica em espécies do gênero *Phaseolus* foi feito por Thurman et al. (1967),

sugerindo a formação de três grupos de espécies distintos, de acordo com o padrão de bandas obtido para as espécies.

Derbyshire et al. (1976), estudando proteínas de sementes de espécies de *Phaseolus* e *Vigna*, através de eletroforese e da reação de aglutinação de células vermelhas do sangue humano, grupo 0, separam as espécies em novos grupos, que coincidem com as novas proposições taxonômicas de Verdcourt (1970). Seus estudos sugerem, que espécies do gênero *Phaseolus* que ainda não tenham sido transferidas para outros gêneros possam ser separadas em grupos, de acordo com a presença ou ausência de Glicoproteína II.

A análise e distribuição dos aminoácidos e dos peptídeos livres da tribo *Phaseolineae* foi feito por Casemir & Le Marchand (1966) e por Bell (1971). Esses autores mostraram que espécies de *Vigna* poderiam se distinguir de *Phaseolus*, *Macroptilium*, *Dolichos* e *Labiab*, pela ausência de ácido pipecólico. Além disso, mostraram que duas espécies de *Phaseolus*, que não apresentavam ácido pipecólico (*P.mungo* e *P.aureus*), são consideradas por alguns taxonomistas, como pertencentes, em termos morfológicos, ao gênero *Vigna*.

Estudos serológicos de espécies do gênero *Phaseolus* (Kloz et al., 1966; Kloz & Klozova, 1968; Kloz, 1971), mostraram a aplicabilidade dessas investigações em pesquisas filogenéticas. O antiserum contra as frações albumina, globulina e faseolina de *Phaseolus vulgaris*, mostrou a existência de faseolina em *P.vulgaris*, *P.polyanthus*, *P.coccineus* e *P.acutifolius*, o mesmo não acontecendo com *P.lunatus* e *P.aureus*. Por outro lado, mostrou

que uma proteína denominada *Phaseolus* proteína III, estava presente nas três primeiras espécies, mas ausente em *P. aureus*. Usando o antiserum anti-*aureus*, Klotz (1971), prontamente separou as espécies endêmicas americanas das outras espécies, de acordo com suas regiões de origem.

Chrispeels & Baumgartner (1978), estudaram a atividade endopeptidásica em extratos de cotilédones de espécies de *Phaseolus* e *Vigna*, através de estudos imunológicos, mostrando que espécies de *Vigna* inibiam a atividade dessa enzima, o mesmo acontecendo com *Phaseolus mungo*, *P. aureus* e *P. adenanthus*, enquanto que nenhuma atividade inibitória foi observada em extratos de cotilédones das outras espécies de *Phaseolus*. Dessa maneira, eles confirmaram a passagem das espécies de *Phaseolus* com atividade inibitória endopeptidástica para o gênero *Vigna*.

Em geral, dados químicos tem sugerido a existência de diferenças nítidas entre as espécies tipicamente dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus*, além de possíveis agrupamentos de espécies dentro desses gêneros. É possível então, que informações sobre a composição proteica das espécies dêem uma base relativamente simples para a distribuição menos ambígua das espécies que se apresentam morfológicamente duvidosas, assim como, possam confirmar algumas das colocações feitas em bases morfológicas.

III - Características das Seções

Piper (1926) dividiu o gênero *Phaseolus* em oito seções: *Phaseolus*, *Leptospron* Benth., *Macroptilium* Benth., *Sigmoidotropis* Pip., *Ceratotropis* Pip., *Microcochle* Benth., *Lasiospron* Benth. e *Cochliasanthus* Pip.. Para a caracterização das seções foi utilizada a divisão proposta por Piper, listando-se, no entanto, as revalidações nomenclaturais feitas por autores mais recentes, como Maréchal et al. (1978b).

Phaseolus seção *Phaseolus* in *Ann.Wien.Mus.Naturg.* 2, 1840.

Esta seção é a mais importante e a mais numerosa do gênero, constituindo-se de plantas perenes, totalmente de origem americana. Consta de cerca de 50 espécies, com área de distribuição nos altos platôs da América do Sul e Central. A maioria das suas espécies é cultivada em toda a América, sendo suas sementes uma das principais fontes proteicas na alimentação de seus povos.

As características principais que definem a seção são: estípulas não prolongadas abaixo do seu ponto de inserção; pedicelos mais longos que o cálice; cálice campanulado com dentes menores que o tubo calicinal; bractéolas florais persistentes pelo menos até a antese; quilha espiralada de 1 a 2 turnos completos; alas maiores que o estandarte e a quilha; presença de pelos uncinulados; estigma terminal; grão de pólen com reticulação fina ou sem escultura óbvia.

No Brasil são encontradas sob cultivo 4 espécies, que

foram utilizadas para o nosso estudo:

Phaseolus acutifolius A.Gray var. *latifolius* Freeman

= *P. latifolius* Freeman

Phaseolus coccineus L.

= *P. multiflorus* Willd.

Phaseolus lunatus L.

= *P. amazonicus* Benth.

= *P. inamoenus* L.

Phaseolus vulgaris L.

= *P. compressus* DC.

= *P. derasus* Schrank.

Em cada espécie estão apresentadas somente os sinônimos mais comumente encontrados.

Phaseolus seção *Ceratotropis* Pip. in *Contr.U.S.Nat.Herb.* 22 (9), 1926. = *Vigna* subgên. *Ceratotropis* (Pip.) Verdc. in *Kew Bull.* 24 (3), 1970.

A seção *Ceratotropis* é composta de plantas anuais e apresenta uma área de distribuição exclusivamente asiática e oceânica, com apenas um representante em Madagascar e África Oriental.

São caracterizadas pelas estípulas prolongadas sob o seu ponto de inserção; brácteas florais caducas; pedicelo mais curto que o cálice; cálice campanulado; quilha recurvada com um apêndice lateral na pétala esquerda; estilete prolongado além do estigma em um bico mais ou menos distinto; ausência de pelos uncinulados; pólen triporado com exina reticulada em largas malhas.

A seção consta de cerca de 10 espécies, das quais cinco são comumente encontradas sob cultivo no Brasil:

Phaseolus aconitifolius Jacq.

= *Dolichos dissectus* Lam.

= *Vigna aconitifolia* (Jacq.) Maréchal

+ *Phaseolus angularis* (Willd.) Wight.

= *Azuki* *angularis* (Willd.) Ohwi

= *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi

+ *Phaseolus aureus* Roxb.

= *P. radiatus* L.

= *Vigna radiata* (L.) Wilczek

Phaseolus seção *Cochliasanthus* (Trew.)Pip. in *Contr.U.S.Nat.Herb* 22(9), 1926.

= *Phaseolus* seção *Caracallae* DC. in *Prodr.* 2, 1865

= *Phaseolus* seção *Phaseolus* serie *Caracallae* Hassl. in *Candollea* 1, 1923.

= *Vigna* subgên. *Cochliasanthus* (Trew.)Verdc.in *kew Bull.* 24(3), 1970.

= *Vigna* subgên. *Sigmoidotropis* seção *Caracallae* (DC.)Maréc., Masch. & Stainier in *Taxon* 27(2/3), 1978.

A seção *Cochliasanthus* é inteiramente de origem americana, com área de distribuição na América do Sul e possivelmente na Guatemala. É caracterizada pelas estípulas não prolongadas sob seu ponto de inserção; cálice campanulado, com dentes calicinais desiguais e menores que o tubo; quilha curvada e espiralada em 5 a 7 turnos.

A seção consta de somente duas espécies, as quais ocorrem no Brasil:

Phaseolus caracalla L. - RS,PR,SC,SP,RJ,MT,GO,BA,PA,AM

= *Vigna caracalla* (L.) Verdc.

Phaseolus lobatus Hook. - MT,RS.

= *Vigna hookeri* Verdc.

Phaseolus calcaratus Roxb.

= *Vigna umbellata* (Thumb.) Ohwi & Ohashi

Phaseolus mungo L.

= *P. bundoo* Siebold

= *Azuki mungo* (L.) Masamune

= *Vigna mungo* (L.) Hepper

+ espécies estudadas neste trabalho.

Phaseolus seção *Macroptilium* Benth. in *Ann.Wien.Mus.Naturg.* 2, 1840.

= *Macroptilium* (Benth.) Urban in *Symb.Antill.* 9, 1928.

A seção *Macroptilium* é inteiramente de origem americana, sendo distribuída naturalmente em todas as Américas. São plantas anuais ou perenes, caracterizadas pelas estípulas não prolongadas sob o seu ponto de inserção; ausência de pelos uncinulados; bractéolas florais caducas; pedicelo floral menor ou de comprimento igual ao do cálice; cálice tubuloso com 5 dentes nítidos; estandarte simétrico desprovido de calosidades; alas consideravelmente maiores que o estandarte e a quilha; quilha espiralada ou recurvada na parte superior; sementes pequenas com hilo curto e pólen tricolporado com exina finamente reticulada.

Espécies dessa seção tem sido atualmente bastante cultivadas como forrageiras, consorciadas com gramíneas, principalmente no estado de São Paulo.

Consta com cerca de 15 espécies, das quais 10 ocorrem no Brasil:

+ *Phaseolus atropurpureus* Moç.et Sessé ex DC.-SP,MA.

= *P.atropurpureus sericeus* A.Gray

= *P.vestitus* Hook.

= *Macroptilium atropurpureum* (Moç.et Sessé ex DC.)Urb.

+ *Phaseolus bracteatus* Nees et Mart.-MG,SP,MA,MT,PI,RJ,

= *P.bracteolatus* DC. BA,GO.

= *P.bracteolatus* Benth.

= *Macroptilium bracteatum* (Nees et Mart.) Maréchal & Baudet.

+ *Phaseolus erythroloma* Mart. ex Benth.-RS,PR,SC,MT,GO,
BA,RJ.

= *Macroptilium erythroloma* (Mart.ex Benth.) Urb.

+ *Phaseolus lathyroides* L.-RS,SP,MG,RJ,BA,CE,GO,PI,MA,MT

= *P.maritimus* Salzm.

= *P.semierectus* Mart.

= *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb.

+ *Phaseolus longepedunculatus* Mart.ex Benth.-SP,AM,GO,
MA,CE,PI,RJ,MT,PA,BA,PE,

PB.

= *Macroptilium longepedunculatum* (Mart.ex Benth.) Urb.

Phaseolus martii Benth.- RS,MG,PI.

= *Macroptilium martii* (Benth.) Maréchal & Baudet

Phaseolus monophyllus Benth.- MG,GO,MT.

= *Macroptilium monophyllum* (Benth.) Maréchal & Baudet

+ *Phaseolus panduratus* Benth.-RS,MG,SP,SC,CE,PI,MT,AM,
BA.

= *Macroptilium panduratum* (Benth.) Maréchal & Baudet

Phaseolus prostratus Benth.-RS,PR,MT,SC,SP.

= *Macroptilium prostratum* (Benth.) Urb.

Phaseolus uleanus Harms - BA.

+ Espécies estudadas neste trabalho.

Phaseolus seção *Leptospron* Benth. in *Ann. Mus. Wien. Naturg.* 2, 1840.

= *Vigna* subgên. *Cochliasanthus* (Trew.) Verdc. in *Kew Bull.* 24(3), 1970.

= *Vigna* subgên. *Sigmoidotropis* seção *Leptospron* (Benth.) Maréc., Masch. & Stainier in *Taxon* 27(2/3), 1978.

A seção *Leptospron* é inteiramente de origem americana, neo-tropical, caracterizada pelas estípulas não prolongadas sob o seu ponto de inserção; presença de glândulas sobre a raquis da inflorescência; bracteas e bractéolas caducas; cálice campanulado com o tubo calicinal menor que pelo menos o dente ventral; quilha espiralada de 1 a 3 turnos; estigma terminal; pólen tricolpado, exina verrucosa não reticulada.

É constituída de duas espécies distribuídas na América do Sul e Central, sendo as duas encontradas nativas no Brasil:

+ *Phaseolus adenanthus* Meyer-RS, PR, SC, RJ, ES, MG, BA, GO, AP, MA, AM.

= *P. latifolius* Benth.

= *P. truxiliensis* HBK.

= *Vigna adenantha* (Meyer) Maréchal, Mascherpa & Stainier
(*Vigna* subgên. *Sigmoidotropis* seção *Leptospron*)

Phaseolus linearis HBK. - RS, MT, SC, SP, GO, MG, AM, AP, RO

= *P. grandiflorus* Steud.

= *P. violaceus* Vel.

= *Vigna linearis* (HBK.) Maréchal, Mascherpa & Stainier
(*Vigna* subgên. *Cochliasanthus*)

+Espécie estudada

Phaseolus seção *Microcochle* Benth. in *Ann.Wien.Mus.Naturg.* 2, 1840.

= *Macroptilium* (Benth.) Urb. apud Verdc. pp in *Kew Bull.* 24(3), 1970.

Seção de origem americana, composta de plantas anuais ou perenes, caracterizadas pelas estípulas não prolongadas sob o seu ponto de inserção; flores pequenas; cálice campanulado, cinco lobado, dentes calicinais sub-iguais, iguais ou maiores que o tubo; quilha formando uma espiral completa; pólen com exina finamente reticulada.

Consta de 6 espécies nativas das Américas, sendo encontradas no Brasil três destas espécies:

Phaseolus acariaeanthus Harms. - MG.

Phaseolus psammodes Lind. - RJ, ES.

Phaseolus sabaerensis Hoehne - MT.

Phaseolus seção *Lasiospron* Benth. in *Ann.Wien.Mus.Naturg* 2, 1840.

= *Vigna* subgên. *Vigna* sec. *Lasiospron* (Benth.) Verdc. in *Kew Bull.* 24(3), 1970.

= *Vigna* subgên. *Lasiospron* (Benth.) Maréchal, Mascherpa & Stainier in *Taxon* 27 (2/3), 1978.

Seção de origem americana, neo-tropical, distribuída nas Américas Central e do Sul. Caracterizada por possuir flores amarelas, estípulas prolongadas sob o seu ponto de inserção; cálice com os dentes menores ou aproximadamente iguais ao tubo calicinal; quilha formando uma espiral; pólen triporado com exina reticulada em malhas largas.

Consta de três espécies, as quais ocorrem no Brasil:

Phaseolus campestris Benth.- AM, RO

= *P. juruanus* Harms.

= *P. schottii* Benth. var *campestris* sensu Hassl.

= *Vigna campestris* sensu Wilczek

= *Vigna juruana* (Harms.) Verdc.

Phaseolus pilosus HBK.- RS, MT, GO, MG, AM.

= *P. hirsutus* Mart.

= *P. lasiocarpus* Mart.

= *Vigna lasiocarpa* (Mart.) Verdc.

Phaseolus schottii Benth.- RS, SC, MT, BA, AM, RJ, GO, MG, CE, PA, RO.

= *P. longifolius* Benth.

= *P. ovatus* Benth.

= *Vigna longifolia* (Benth.) Verdc.

Phaseolus seção *Sigmoidotropis* Pip. in *Contr. U.S. Nat. Herb.* 22 (2), 1926.

= *Vigna* subgên. *Sigmoidotropis* (Pip.) Verdc. in *Kew Bull.* 24 (3), 1970.

A seção *Sigmoidotropis* é de origem americana constando de plantas perenes ou anuais, com área de distribuição nas Américas do Sul e Central. São caracterizadas por apresentarem estípulas não prolongadas sob o seu ponto de inserção; pedicelo mais curto que o cálice; brácteas florais caducas; cálice campanulado, com dentes de igual tamanho que o tubo; corola azulada; estandarte sem calosidades na face interna; estilete longo, recurvado, formando uma letra "S" ou espiralado; vagens retas, lineares, comprimidas lateralmente, com margens proeminentes.

Consta com cerca de 18 espécies, das quais sete ocorrem no Brasil:

+*Phaseolus appendiculatus* Benth. - RS, RJ, MG, SP, BA, PR, SC, MT, MA, ES

= *P. candidus* Vell.

= *P. membranaceus* Benth.

= *Vigna candida* (Vell.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

Phaseolus dolichopsoides Hoehne - SP, MT.

Phaseolus firmulus Benth. - MT, GO, MG, BA, MA, CE, PA, PI.

= *P. crassifolius* Benth.

= *Vigna firmula* (Benth.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

Phaseolus halophylus Pip., BA

= *Vigna halophylla* (Pip.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

+*Phaseolus peduncularis* HBK. - RS, PR, SP, MT, SC, MG, PI, MA, PA, BA

= *P. clitoroides* Benth.

= *P. pius* Benth.

= *Vigna peduncularis* (HBK.) Fawcet & Rendle

Phaseolus reptans Ducke - AM, PA.

Phaseolus robustus Pip. - RS, SP, GO.

+ Espécies utilizadas neste estudo.

IV - Material e Métodos

1 - Material

As sementes estudadas foram conseguidas através da Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e das várias coletas feitas pelos docentes do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), através do projeto "Coleta e Introdução de Leguminosas Forrageiras" (acôrdo BNDE, Instituto de Zootecnia, FUNIEC 280), estando os exemplares dessas coletas depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC).

As sementes estudadas foram:

Phaseolus seção *Phaseolus*

Phaseolus vulgaris L. cv 'carioca'

cv 'rosinha G2'

cv 'aroana'

cv 'moruna'

cv 'piratã'

Phaseolus lunatus L. cv 'São Martinho'

Phaseolus coccineus L.

Phaseolus acutifolius A.Gray var. *latifolius* Freeman

Todas cultivadas na fazenda experimental do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) - Fazenda Santa Elisa.

Phaseolus seção *Sigmoidotropis* Pip.

Phaseolus peduncularis HBK.- IAC 4; UEC /530, 1652

Phaseolus appendiculatus Benth.- UEC 7930

Phaseolus seção *Leptospron* Benth.

Phaseolus adenanthus Meyer - UEC 7557

Phaseolus seção *Ceratotropis* Pip.

Phaseolus aureus Roxb. - IAC 23

Phaseolus angularis (Willd.) Wight. - IAC 17

Phaseolus seção *Macroptilium* Benth.

Phaseolus atropurpureus DC. - UEC 4613

Phaseolus bracteatus Nees et Mart. - IAC 22, UEC 2026

Phaseolus erythroloma Mart. - U E C 7586

Phaseolus lathyroides L. - IAC 20, UEC 4112

Phaseolus longipedunculatus Mart. - IAC 102, UEC 4558

Phaseolus panduratus Mart. - UEC 3832

Vigna seção *Vigna*

Vigna luteola Benth. - UEC 3466.

2 - Métodos

a. Preparação dos extratos de proteínas

As sementes foram moidas num "moinho de bola", durante 15 minutos sendo transformadas numa farinha de sementes.

Amostras de farinha foram homogenizadas com solução extraente na proporção de 0,5g de farinha para 10ml de solução, durante 15 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi então centrifugada por 10 minutos à 2000 rpm.

Foram três os sistemas de extração utilizados:

1 - NaCl 1% - Soluções diluídas de Cloreto de Sódio são comumente utilizadas na extração de albuminas e globulinas de sementes.

2 - NaCl 1% contendo 1% de SDS e 1% de β -Mercaptoetanol - A utilização de detergentes (Dodecil Sulfato de Sódio - SDS) e agentes redutores (β -Mercaptoetanol), levaram a um maior teor de proteínas em estudos com cevada (Preaux & Lontie, 1965).

3 - Solução de ácido Ascórbico (NaCl 0,5M - ácido Ascórbico 0,25M) (Wright & Boulter, 1974).

As amostras devidamente preparadas foram utilizadas e guardadas no congelador para posterior utilização, quando então eram descongeladas à temperatura ambiente, seguindo-se o mesmo procedimento para a preparação das amostras.

b. Estimativa da concentração proteica

A concentração proteica foi estimada pelo método de Lowry et al. (1951), que consiste numa reação de coloração entre o reagente Folin-Ciocalteu e a tirosina proteica, utilizando-se como padrão de concentração proteica conhecida, amostras de Sero-Albumina-Bovina (BSA).

Esse método é o mais largamente utilizado para determinar o conteúdo proteico em quaisquer preparações de plantas (Harborne, 1976).

Todas as amostras foram então ajustadas a uma concentração de 2000 $\mu\text{g/ml}$, para a aplicação aos geis.

As leituras foram feitas em espectrocolorímetro, utilizando-se um comprimento de onda de 580 nm.

c. Preparação das amostras

As amostras foram preparadas pelo método de Weber et al. (1972), adicionando a cada 1 ml de amostra, como procedimento padrão, três vezes a concentração proteica de SDS, detergente, e 1% de β -Mercaptoetanol (reagente sulfidrílico), que em baixa concentração, quebra as ligações sulfidrílicas das proteínas e inibe a formação de novas pontes dissulfídricas; em banho-maria à 100°C, por três minutos, para a dissociação da molécula proteica.

Foram feitas também variações desse tratamento padrão:

- 1 - omissão do tratamento com β -mercaptoetanol
- 2 - extensão do banho-maria à 100°C para 5 minutos

As amostras foram então deixadas esfriar à temperatura ambiente, sendo adicionados a cada ml de solução, 50 μ l de Azul de Bromofenol (0,05% em 0,01M de tampão fosfato pH 7,0) como marcador da frente e vários cristais de sacarose, com o objetivo de se deixar a solução mais densa.

d. Preparação dos geis.

Os geis foram preparados pelo método de Laemmli (1970), que utiliza um tampão descontínuo, ou seja, a concentração e o pH dos tampões do gel e do eletrodo são diferentes.

A partir de uma solução estoque de poliacrilamida (30g

acrilamida; 0,2g Bisacrilamida/100 ml água destilada), foram feitos os geis, ficando o gel inferior com uma concentração final de 12%, onde foi utilizado o tampão TRIS/HCl pH 8,8 e o gel superior, ou "stacking", com uma concentração final de 5%, onde foi utilizado o tampão TRIS/HCl pH 6,8.

A polimerização dos geis foi feita utilizando-se Per - sulfato de Amônia (AMPS) e TEMED (N,N,N',N' -Tetrametiletilenediamina).

O tanque utilizado para a eletroforese foi do tipo vertical, utilizando-se geis do tipo "slab", que exigem menor quantidades de acrilamida que a necessária para os outros tipos de geis podendo ser colocadas várias amostras em um mesmo gel, facilitando as observações e comparações entre os vários extratos proteicos.

A solução de acrilamida foi colocada entre duas placas de vidro. O gel inferior foi colocado até cerca de 4/5 do comprimento da placa, sendo o restante preenchido com água destilada até a polimerização do gel, (cerca de 20 minutos), com o objetivo de se forçar a formação de uma superfície lisa e reta no gel. Depois de polimerizado o gel, a água era retirada, adicionando-se o gel "stacking" ou superior, introduzindo-se neste, entre as placas de vidro, um pente, que provoca a formação de reentrâncias no gel, formações essas que servirão para a posterior colocação das amostras.

O gel final, polimerizado, apresenta uma espessura de 1mm, uma largura de aproximadamente 13 cm e um comprimento total de cerca de 14 cm, podendo-se aplicar 10 amostras por gel.

e. Procedimento da eletroforese

A eletroforese foi desenvolvida utilizando-se o tampão TRIS-Glicina-SDS pH 8,8 (Laemmli, 1970).

As amostras proteicas, devidamente preparadas, foram colocadas nas reentrâncias feitas no topo dos geis, com o auxílio de uma microseringa, na quantidade de 30 μ l de amostra para cada reentrância (total de 60 μ g de proteína).

O ânodo foi colocado na parte inferior do tanque, iniciando-se a eletroforese à temperatura ambiente, com cerca de 18mA por gel, que foi mantido por cerca de 4 horas, tempo necessário para que a frente marcada com Azul de Bromofenol chegasse ao final do gel.

f. Preparação final dos geis

Depois de decorrida a eletroforese, os geis foram retirados do tanque e corados durante 30 minutos com "Coomassie Brilliant Blue" (1,25 g em Metanol, ácido Acético Glacial e água destilada 227:46:227 v/v/v), corante específico para proteínas, considerado como um dos mais sensíveis (Weber et al., 1972).

A diferenciação dos geis e consequente visualização das bandas proteicas foi feita por difusão em uma solução de ácido acético Glacial, Metanol e água destilada (75:50:875 v/v/v), com várias trocas de solução.

Após a clarificação, os geis foram prensados entre uma placa de vidro recoberta com papel plastificado (papel "zapp") e uma folha de papel de filtro Wattman nº 3 e colocados na estufa-

para secagem. Esse procedimento permite a montagem permanente do gel, não alterando as suas dimensões, possibilitando e facilitando o manuseio dos geis para obtenção de medidas, desenhos e fotografias e conseqüentemente as comparações entre as amostras.

g. Determinação dos Pesos Moleculares (PM)

Os Pesos Moleculares das subunidades proteicas foram calculados, baseando-se nas mobilidades relativas das bandas proteicas de PM conhecidos. A mobilidade de uma subunidade é descrita como a sua mobilidade relativa à da frente marcada com Azul de Bromofenol (mobilidade relativa: R_m) (Barker et al., 1976).

As proteínas de PM conhecidos utilizadas como padrão foram Sero-Albumina-Bovina (BSA - PM 68000), Ovalbumina (PM 43000) Quimotripsinogênio (PM 25700) e Lisosina (PM 14300).

Dois métodos foram utilizados para o cálculo dos R_m das proteínas de PM conhecido: as proteínas denaturadas com SDS eram misturadas e corriam juntas, ou as proteínas corriam paralelamente em um mesmo gel.

As mobilidades das subunidades proteicas de PM conhecidos eram então colocadas contra os seus PM em um gráfico-logarítmico, sendo então calculados os PM das subunidades proteicas estudadas, desconhecidas, através dos R_m obtidos para essas subunidades, utilizando-se para esses dados a média obtida nos vários geis feitos para as proteínas.

h. Determinação da homologia das bandas proteicas

A homologia das bandas proteicas foi estabelecida atra

vês de comparações visuais e do cálculo dos Rm. Quando os valores das mobilidades relativas de duas subunidades proteicas são diferentes pode-se dizer que são duas proteínas diferentes. No entanto, esse sentido de homologia não pode ser considerado isoladamente, pois em geis diferentes ou em um mesmo gel, dependendo da posição em que correu o extrato proteico, pode haver diferenças, que alteram a posição e consequentemente a mobilidade das subunidades. Por esta razão, foram feitas misturas de amostras proteicas diferentes, para correrem juntas no gel, com o objetivo de se estabelecer se bandas de plantas que exibem a mesma velocidade de migração possuem presumivelmente proteínas homólogas, ou se plantas que exibem diferentes velocidades de migração possuem proteínas diferentes. A não sobreposição de subunidades proteicas em mais de 50% indica a não homologia das bandas proteicas.

i. Determinação da Porcentagem de Similaridade

A porcentagem de similaridade foi calculada para todas as espécies estudadas, utilizando-se a fórmula de Whitney et al. (1968) (apud Ziegenfus & Clarkson, 1971):

$$100 \ a/(a+b)$$

onde a: número de bandas em comum às espécies

b: número total de bandas exibidas individualmente

j. Construção de dendrogramas

A construção de dendrogramas, a partir da análise de aglomerados, foi feita através de um programa, baseado no algo-

rítmo de Wishart (1969) (programa modificado por Dr.G.J. Shepherd, Unicamp). O programa foi executado no computador PDP- 10 do Centro de Computação, UNICAMP. As análises foram feitas utilizando-se três métodos: ligação única ("single linkage"), ligação completa ("complete linkage"), e aglomeração por média de grupo ("average linkage"). Em todas as estratégias as fusões começam com o par de entidades mais similares, estabelecidas por qualquer medida de similaridade empregada.

Na ligação única, a terceira entidade se une ao aglomerado já formado se for mais próxima a uma das entidades já ligadas, ou então forma nova ligação com uma quarta entidade da qual ela seja mais próxima. Na aglomeração completa ocorre exatamente o oposto da ligação única, estabelecendo-se um aglomerado a partir da distância mínima entre uma entidade e a outra mais remota em um grupo ou entre entidades mais remotas em dois grupos. Na aglomeração por média de grupo, a média da similaridade do primeiro par de entidades ligadas é usada para a formação de uma nova tabela de similaridade, a partir da qual surge a nova ligação.

V - Resultados

1 - Estimativa da concentração proteica

Os extratos proteicos feitos pelos três métodos de extração testados em todas as espécies, mostraram uma pequena variação na estimativa da concentração proteica, sendo que essa diferença não mostrou correspondência no padrão eletroforético do gel. Dessa maneira, o método que utiliza NaCl 1% como extraente, foi principalmente utilizado, por ser o mais simples de preparação.

Os resultados da análise da concentração proteica estão apresentados na Tabela II, onde se pode verificar uma maior concentração nas espécies de *Phaseolus* - seção *Phaseolus* e uma concentração aproximadamente igual, ao redor de 40mg/g em todas as outras espécies. A extração não foi exaustiva, não se objetivando obter o conteúdo proteico total, mas somente a quantidade necessária para a visualização de bandas proteicas no gel.

2 - Preparação das amostras

As variações feitas no tratamento padrão de preparação das amostras proteicas mostraram o bom funcionamento do método padrão utilizado. A omissão do tratamento padrão com β -Mercaptoetanol levou à formação de mais uma banda com Peso Molecular mais alto, o que era esperado, devido à falta de dissociação das cadeias com ligações dissulfídricas, originando uma molécula de PM mais alto. A extensão do banho-maria para 5 minutos não acarretou nenhuma diferença no padrão de bandas do gel, sugerindo que não há hidrólise das proteínas na preparação, mostrando serem suficientes os 3 minutos para a dissociação da molécula.

	<i>Vigna luteola</i>	30 - 40
Seção <i>Macroptilium</i> Benth.	<i>P.atropurpureus</i>	30 - 40
	<i>P.bracteatus</i>	30 - 40
	<i>P.erythroloma</i>	30 - 40
	<i>P.lathyroides</i>	30 - 40
	<i>P.longipedunculatus</i>	40 - 50
	<i>P.panduratus</i>	30 - 40
Seção <i>Phaseolus</i>	<i>P.vulgaris</i>	90 - 100
	<i>P.lunatus</i>	60
	<i>P.coccineus</i>	50
	<i>P.acutifolius</i>	40 - 50
Seção <i>Sigmoidotropis</i> Pip.	<i>P.appendiculatus</i>	30 - 40
	<i>P.peduncularis</i>	30 - 40
Seção <i>Ceratotropis</i> Pip.	<i>P.aureus</i>	30 - 40
	<i>P.angularis</i>	30 - 40
Seção <i>Leptospron</i> Benth.	<i>P.adenanthus</i>	40

Tabela II - Concentração proteica das espécies de *Phaseolus* e *Vigna luteola* estimada pelo método de Lowry et al. (mg/g).

3 - Determinação dos Pesos Moleculares (PM)

O padrão de bandas obtido através das proteínas com PM conhecidos, utilizados como medida de PM das subunidades proteicas, está representado na Figura 1, com os PM e as mobilidades relativas das suas bandas características.

O gráfico obtido pelo log do PM contra as suas respectivas mobilidades relativas é usualmente uma linha reta, o que pode ser observado na Figura 2, mostrando a boa separação feita pelo método utilizado.

4 - Caracterização das seções

a. *Phaseolus* seção *Phaseolus*

O padrão eletroforético das subunidades proteicas das quatro espécies estudadas de *Phaseolus* seção *Phaseolus* está representado na Figura 3, onde podemos observar a semelhança de várias bandas principalmente em relação a *P.vulgaris* e *P.coccineus*. Uma semelhança um pouco menor pode ser observada em relação a essas duas espécies e *P.acutifolius* e uma diferença razoavelmente grande em relação a *P.lunatus*. As mobilidades relativas de todas as subunidades proteicas dessas quatro espécies estão apresentadas na Tabela III.

As subunidades proteicas dos cultivares de *P.vulgaris* são semelhantes entre si, apresentando duas bandas principais, maiores, bem coradas, correspondentes aos Rm 0,42-0,46 (PM aproximado 44000-40000) e 0,47-0,49 (PM aproximado 39000-36500) e

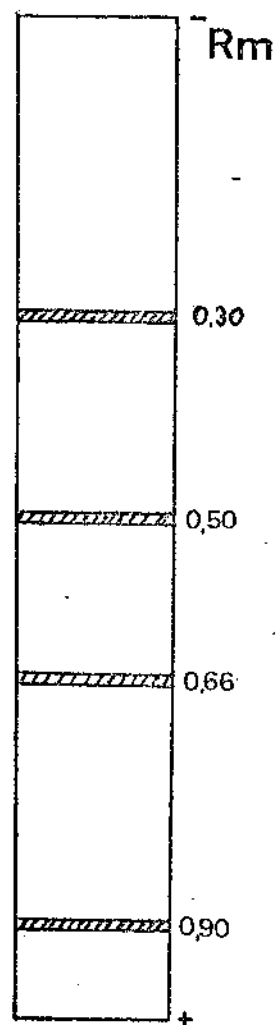


Figura 1 - Padrão de bandas das proteínas de PM conhecidos.

Rm 0,30: BSA (PM 68000); Rm 0,50: Ovalbumina (PM 43000)
Rm 0,66: Quimotripsinogênio (PM 25700); Rm 0,90: Lisosina (PM 14.300).

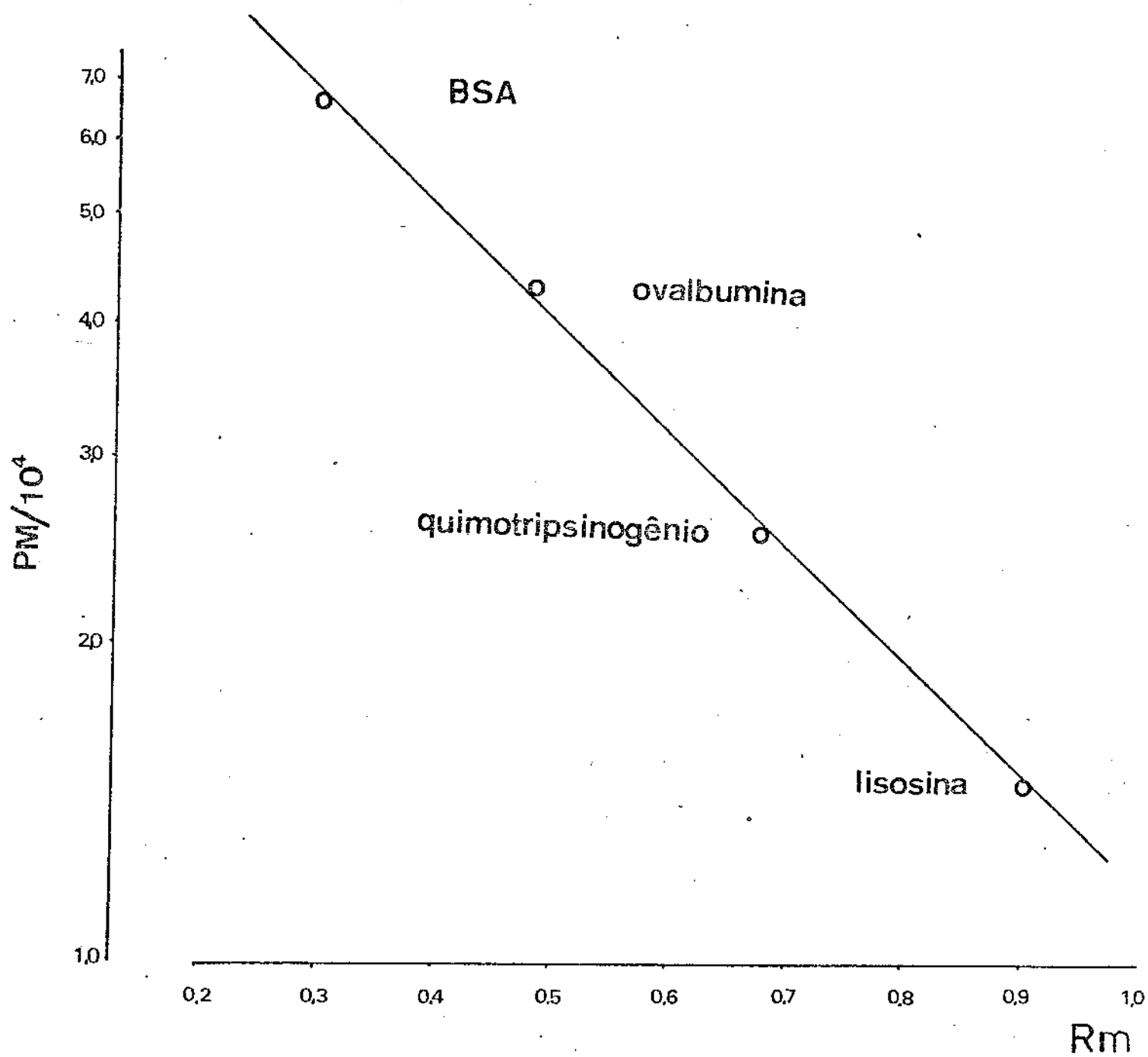


Figura 2 - Gráfico semilogarítmico das proteínas de PM conhecidos contra seus respectivos R_m.

Figura 3 - Subunidades proteicas das espécies de *Phaseolus* seção

Phaseolus. 1. *P.vulgaris* 2. *P.coccineus*

3. *P.acutifolius* 4. *P.lunatus*.

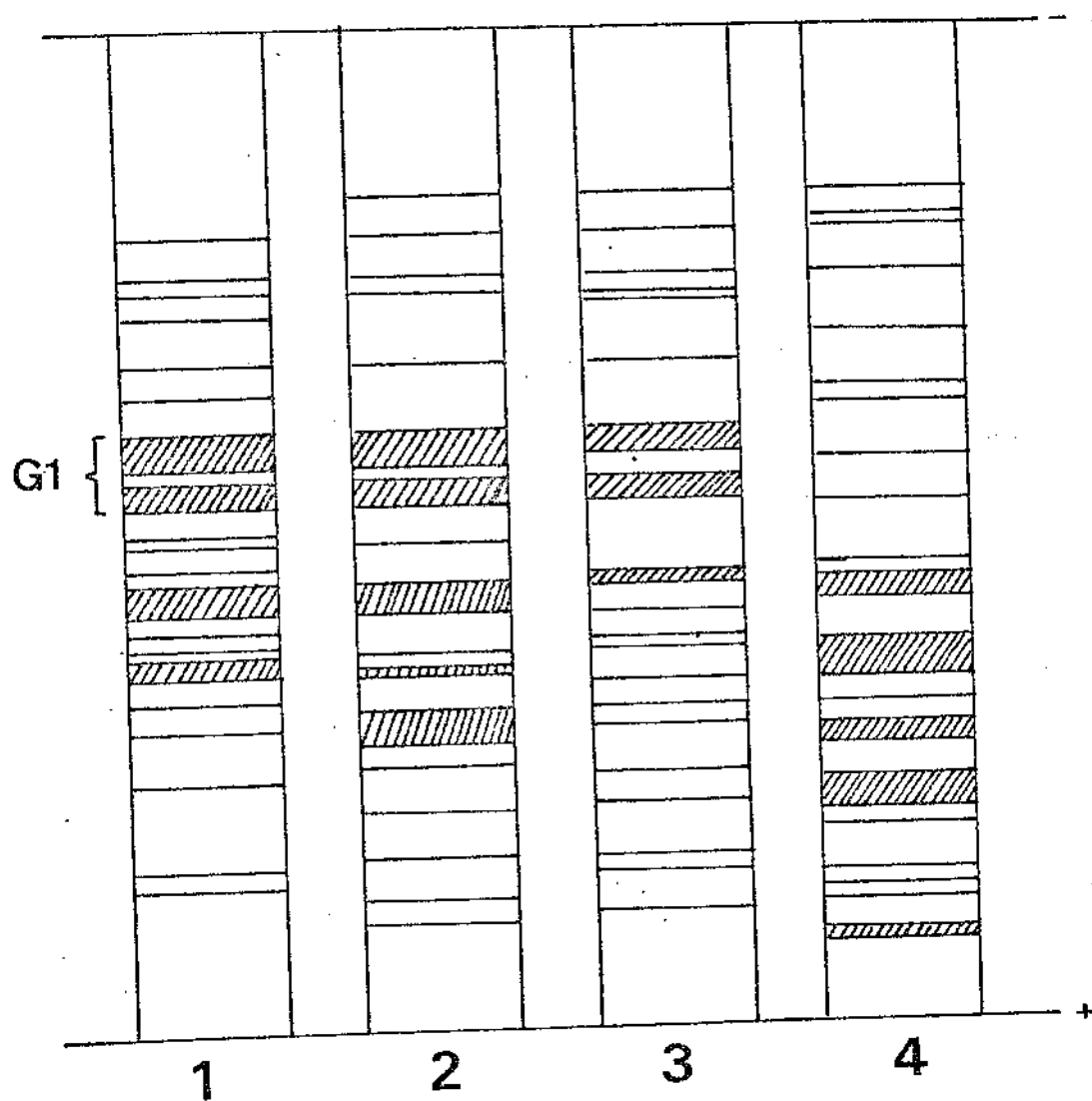


Tabela III - Mobilidade relativa de todas as subunidades proteicas das espécies de *Phaseolus* seção *Phaseolus*.

<i>P. vulgaris</i>	<i>P. coccineus</i>	<i>P. acutifolius</i>	<i>P. lunatus</i>
	0,17	0,17	0,17
			0,19
	0,20*	0,20*	0,20*
0,21**			
0,22			
0,25	0,25	0,24	0,25
0,26	0,27	0,26	
0,29		0,27	
			0,31
0,34	0,33	0,34	0,36
0,37			0,38
0,42-0,46*	0,41-0,45*	0,40-0,42*	0,43
		0,44-0,47*	
0,47-0,49*	0,46-0,48*	0,48	0,48
0,51			
0,52	0,53		0,54
0,55		0,57	
0,56-0,59**	0,57-0,60**	0,59-0,61**	0,56-0,58*
0,60			
0,62		0,63	0,62-0,66*
0,64-0,65	0,63-0,64		
	0,65	0,66	
0,68		0,68	0,68
0,70*	0,69-0,72**	0,70	0,70-0,72**
0,76		0,75	0,76-0,79**
		0,78	0,80
0,85		0,83	0,85
0,86			0,86
	0,88	0,89	0,88
0,92	0,90		0,91-0,92**
TOTAL 21	17	21	20

* bandas mais pronunciadas

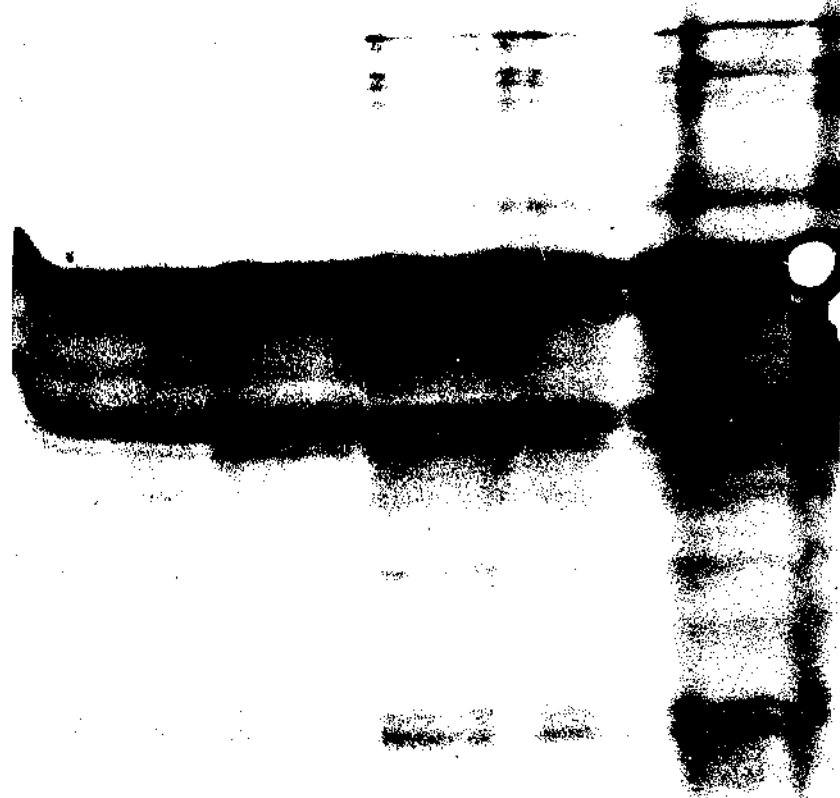
** bandas menos pronunciadas, mas evidentes

bandas menores mas bem evidentes correspondentes aos Rm 0,55-0,59 (PM aproximado 31000-28000) e 0,70 (PM aproximado 20000). Apresentam ainda bandas menores, menos evidentes, semelhantes entre si, variando nos diversos cultivares apenas em intensidade de coloração. (Foto I).

Phaseolus coccineus apresenta um padrão de bandas semelhantes ao de *P. vulgaris*, com duas bandas principais, mais pronunciadas, referentes aos Rm 0,41-0,45 (PM aproximado 46000-43000) e 0,46-0,48 (PM aproximado 40000-38500), homólogas às principais de *P. vulgaris*, apresentando também, bandas menores, evidentes, correspondentes aos Rm 0,20; 0,57-0,60 (PM aproximado... 29500-27000) e 0,69-0,72 (PM aproximado 21000-19000), sendo essas bandas também homólogas às de *P. vulgaris*, diferenciando-se dessa espécie pela presença de bandas menores, menos evidentes.

O padrão de bandas de *P. acutifolius* var. *latifolius* apresenta também duas bandas principais, relativas aos Rm 0,40-0,42 (PM aproximado 48000-44000) e 0,44-0,47 (PM aproximado ... 42000-39000) e três bandas evidentes, menores, correspondentes aos Rm 0,59-0,61 (PM aproximado 31000-26500) 0,68 (PM aproximado 21500) e 0,20. Suas bandas principais são homólogas às de *P. vulgaris* e *P. coccineus*. Em relação às bandas menores, menos pronunciadas, apresenta alguma homologia com as de *P. coccineus*, diferindo desta última e de *P. vulgaris* em relação às bandas menores menos evidentes.

O padrão das subunidades proteicas obtido para *P. lunatus* é distinto de todas as espécies precedentes, apresentando duas bandas principais nos Rm 0,56-0,58 (PM aproximado 30000-28000).



1 2 3 4 5

Foto I - Padrão de bandas dos cultivares de *P. vulgaris* L.

1. carioca 2. rosinha G2 3. moruna 4. aroana
5. piratã

e 0,62-0,66 (PM aproximado 26000-24000) e quatro bandas menores, correspondentes aos Rm 0,20; 0,70-0,72 (PM aproximado 20000 - 19000); 0,76-0,79 (PM aproximado 17000-15500) e 0,91.

O padrão de bandas de *Phaseolus* seção *Phaseolus* está representado na Figura 4, onde se observa seis bandas comuns às quatro espécies estudadas dessa seção.

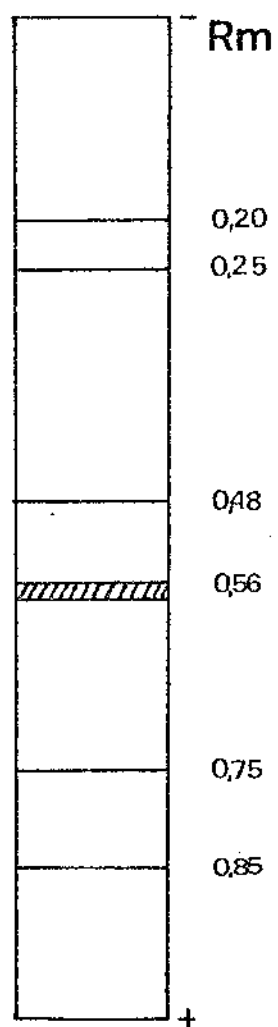


Figura 4 - Padrão de bandas características de *Phaseolus* seção *Phaseolus*.

b. *Phaseolus* seção *Macroptilium* Benth.

O padrão eletroforético de todas as subunidades proteicas das espécies estudadas da seção *Macroptilium* está apresentado na Figura 5, onde podemos observar a semelhança de padrão encontrado na seção.

As subunidades principais de todas as espécies da seção são constantes, constando de quatro bandas principais, correspondentes aos Rm 0,35-0,37 (PM aproximado 57000-54000); 0,38-0,40 (PM aproximado 52000-51000); 0,43-0,45 (PM aproximado 46000-41000) e 0,46-0,47 (PM aproximado 40000-39000), que podem ser correspondentes à principal proteína de reserva, Globulina-1 de acordo com os PM de suas subunidades. Apresentam ainda algumas bandas evidentes, menores e bem coradas em comum, relativas aos Rm 0,26; 0,56-0,57 (PM aproximado 30000-29000); 0,70-0,72 (PM aproximado 20000) e 0,86. Apresentam ainda algumas bandas menores comuns a quase todas as espécies, relativas aos Rm 0,20 e 0,30 (PM aproximado 68000). As espécies diferem entre si pela presença de bandas menores, menos evidentes.

As mobilidades relativas de todas as subunidades proteicas das espécies dessa seção estão apresentadas na Tabela IV.

O padrão de bandas característico da seção *Macroptilium* está representado na Figura 6, onde pode ser observada a presença de 8 bandas comuns a todas as espécies e duas bandas, que estão representadas por linhas pontilhadas, presentes em quase todas as espécies.

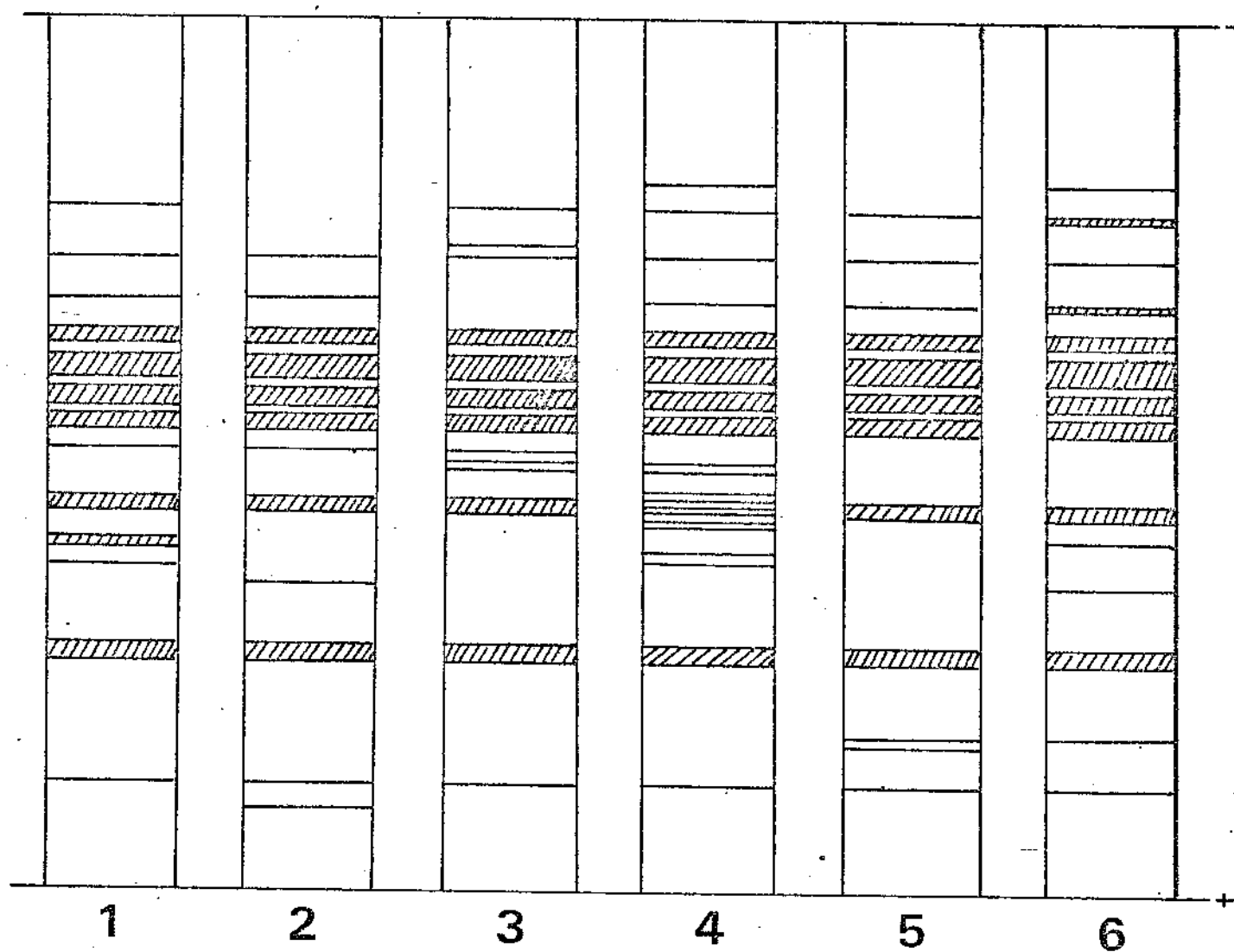


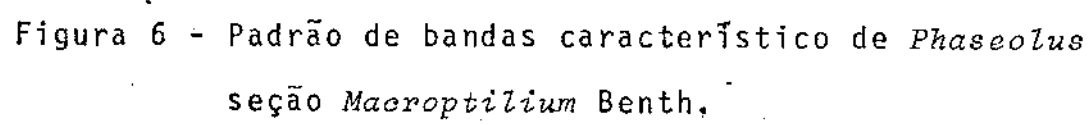
Figura 5 - Subunidades proteicas das espécies de *Phaseolus* seção *Macroptilium* Benth. 1- *P. lathyroides* 2- *P. panduratus* 3- *P. erythroloma* 4- *P. longipedunculatus* 5- *P. atropurpureus* 6- *P. bracteatus*.

Tabela IV - Mobilidade relativa de todas as subunidades proteicas das espécies de *Phaseolus* seção *Macroptilium* Benth.

<i>P. lathyroides</i>	<i>P. panduratus</i>	<i>P. erythroloma</i>	<i>P. longipedunculatus</i>	<i>P. atropurpureus</i>	<i>P. bracteatus</i>
0,20		0,21	0,17		0,16
0,26*	0,26*	0,26*	0,20	0,20	0,19-0,20
		0,26	0,26*	0,25*	0,26*
0,30	0,30		0,30	0,30	0,29-0,30
	0,32			0,32	
0,33-0,36**	0,34-0,35**	0,36**	0,33-0,36**	0,35-0,36**	0,35-0,36**
	0,37-0,38**	0,37**	0,38-0,40**	0,38-0,40**	0,39-0,40**
0,38-0,42**		0,38**	0,41-0,43**	0,41-0,43**	0,41-0,43**
0,43-0,44**	0,43-0,44**	0,43-0,47**	0,44**	0,44-0,46**	0,44-0,45**
0,45-0,46**	0,45-0,47**				0,46
0,49	0,49	0,48-0,50	0,50		
		0,51	0,51		0,53-0,56**
			0,53	0,54-0,56*	
0,56*	0,55-0,57*		0,54*		
0,58-0,60		0,57*	0,55*		0,58
			0,56*		
			0,57*		
			0,60		
			0,61		
0,62	0,64				0,63
0,70-0,72**	0,69	0,69*	0,70-0,74*	0,70-0,74*	0,70-0,74**
	0,72*				
0,86*	0,86*	0,86*		0,80-0,81	0,80
	0,90		0,86*	0,86*	0,86*
Total	13	14	12	19	15

** bandas mais pronunciadas

* bandas menos pronunciadas, mas muito evidentes



c. *Phaseolus* seção *Sigmoidotropis* Pip.

O padrão eletroforético das subunidades proteicas das duas espécies estudadas da seção *Sigmoidotropis* estão apresentados na Figura 7 e os seus respectivos Rm na Tabela V.

Phaseolus peduncularis apresenta duas bandas principais, relativas aos Rm 0,39-0,40 (PM aproximado 55000-54000) e 0,42-0,44 (PM aproximado 52000-49000), duas bandas menores, bem coradas, correspondentes aos Rm 0,33-0,34 (PM aproximado 64500 - 64000) e 0,57 (PM aproximado 34500), além de bandas menores menos pronunciadas.

P. appendiculatus apresenta também duas bandas principais, maiores, mais pronunciadas, correspondentes aos Rm 0,42 - 0,43 (PM aproximado 52000-49500) e 0,44 (PM aproximado 49000), sendo homólogas a uma das bandas principais de *P. peduncularis* e que possivelmente se referem à G1 devido ao PM de suas subunidades. Apresenta ainda 5 bandas bem coradas e visíveis, menos pronunciadas, correspondentes aos Rm 0,28; 0,39 (PM aproximado - 55000); 0,59 (PM aproximado 33000) e 0,62 (PM aproximado 30000), bandas estas que são homólogas às bandas menores, menos evidentes de *P. peduncularis*, sendo as duas espécies diferenciadas pela presença de poucas bandas menos evidentes e pronunciadas.

O padrão característico das subunidades proteicas das duas espécies estudadas está representado na Figura 8, onde se verifica a presença de 10 bandas proteicas comuns às duas espécies, que apresentam, portanto, uma grande semelhança entre si, em termos de globulinas de sementes, apesar da não homologia das bandas principais.

Figura 7 - Subunidades proteicas das espécies de *Phaseolus* seção *Sigmoidotropis* Pip. 1- *P.appendiculatus* 2- *P.peduncularis*

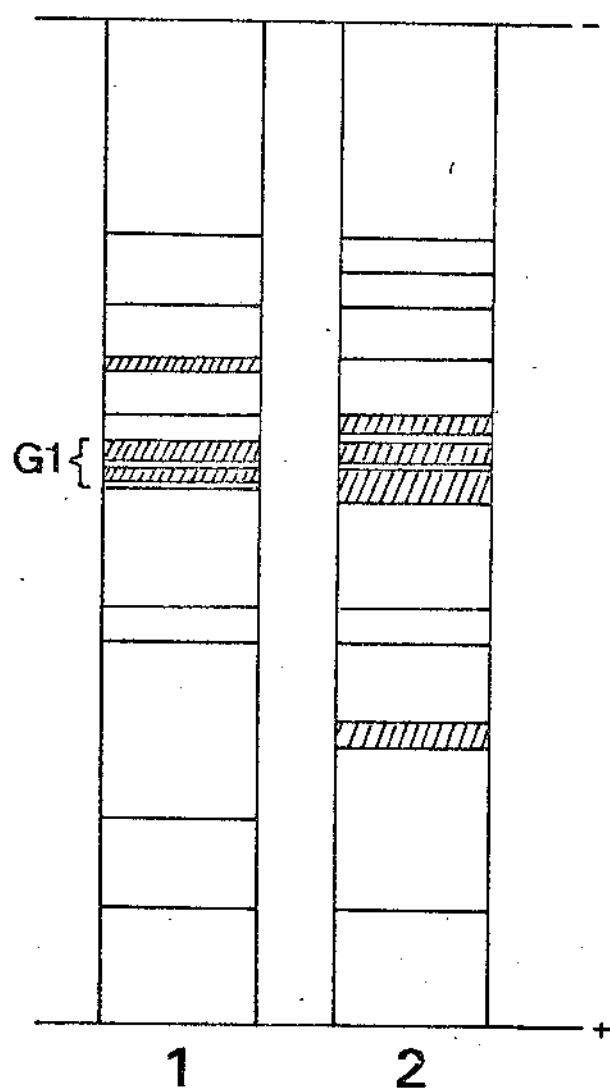


Tabela V - Mobilidades relativas de todas as subunidades proteicas das espécies de *Phaseolus* seção *Sigmoidotropis* Pip.

<i>P. peduncularis</i>	<i>P. appendiculatus</i>
0,21	0,22
0,25	
0,27	0,28*
0,33-0,34*	0,33
	0,34*
0,39-0,40**	0,39*
0,42-0,44**	0,42-0,43**
	0,44**
0,45	0,46
0,57*	0,59*
0,61	0,62*
0,69-0,72	-
	0,79
0,87	0,89
Total 11	12

* Bandas mais pronunciadas

** Bandas menos pronunciadas, mas evidentes

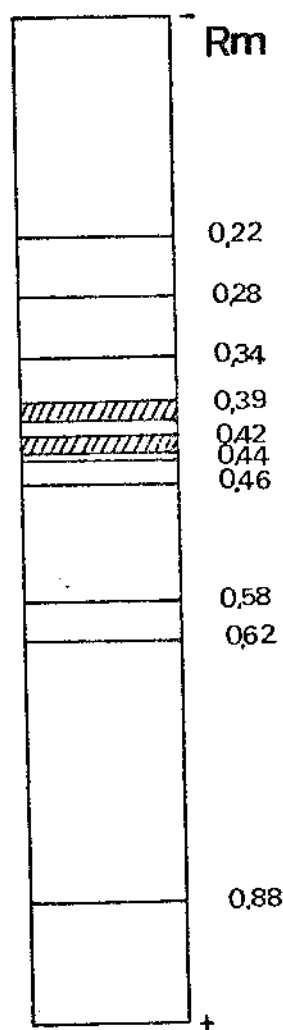


Figura 8 - Padrão de bandas características de *Phaseolus*
seção *Sigmoidotropis* Pip.

d. *Phaseolus* seção *Ceratotropis* Pip.

O padrão das subunidades proteicas das duas espécies estudadas da seção *Ceratotropis* estão representados na Figura 9 e seus respectivos Rm estão apresentados na Tabela VI.

Phaseolus aureus apresenta duas bandas principais, maiores, bem coradas, referentes aos Rm 0,36-0,40 (PM aproximado 56000-50000) e 0,42 (PM aproximado 49000) e 6 bandas menores, menos pronunciadas, relativas aos Rm 0,29-0,30 (PM aproximado ... 66000-64000); 0,32-0,33 (PM aproximado 60000-61000); 0,59-0,60 (PM aproximado 33000-32000); 0,63 (PM aproximado 30000) 0,72 - 0,73 (PM aproximado 24000-23500); 0,78-0,79 (PM aproximado ... 20000-19500) e 0,86-0,90 (PM aproximado 16000-14500), além de bandas menores, menos pronunciadas e evidentes.

P. angularis apresenta também duas bandas principais mais pronunciadas, relativas aos Rm 0,33-0,36 (PM aproximado 60000 56000) e 0,37-0,39 (PM aproximado 54000-51000) que são diferentes das principais de *P. aureus*, apresentando também uma banda menor, menos corada, bem evidente, correspondente ao Rm 0,51- 0,52 (PM aproximado 40000-39000), além de bandas menores, menos evidentes.

O padrão característico das subunidades proteicas das duas espécies da seção *Ceratotropis* está representado na Figura 10, onde podemos observar a presença de 11 bandas em comum, salientando uma grande semelhança entre as espécies, apesar da não homologia das bandas principais.

seção *Ceratotropis* Pip. 1. *P.aureus* 2. *P.angularis*

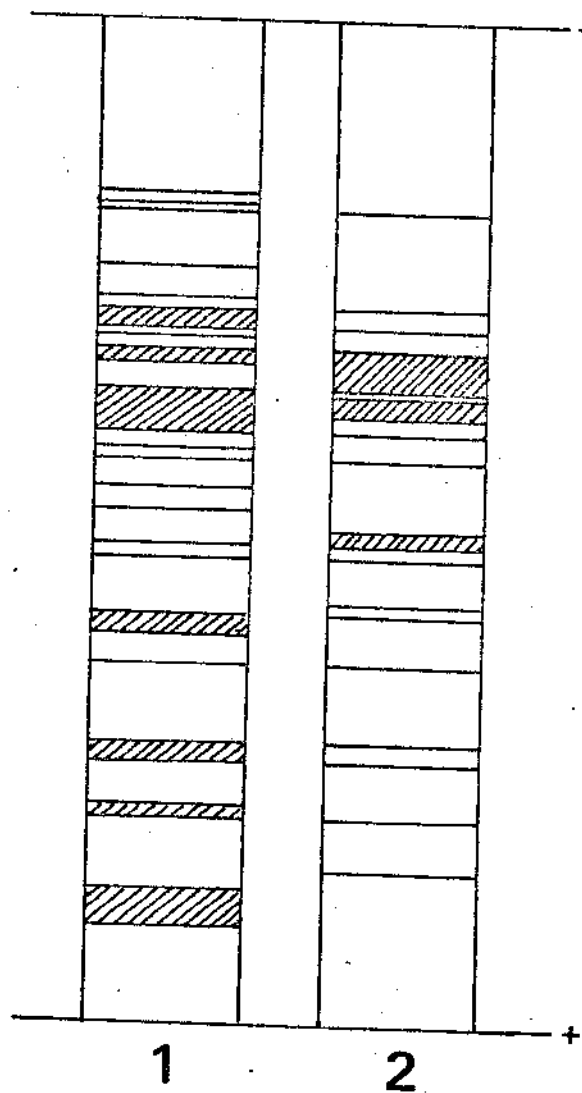


Tabela VI - Mobilidade relativa de todas as subunidades proteicas das espécies de *Phaseolus* seção *Ceratotropis* Pip.

<i>P. aureus</i>	<i>P. angularis</i>
0,17	
0,18	
0,19	0,19
0,24	
0,27	
0,29-0,30*	0,29
0,32-0,33*	0,31
	0,33-0,36**
0,36-0,40**	0,37-0,39**
	0,40
0,42**	
0,43	0,43
0,46	
0,49	
0,52	0,51-0,52*
0,54	0,53
	0,58
0,59-0,60*	0,59
0,63*	0,63
0,72-0,73*	0,70
	0,74
0,78-0,79*	0,80
0,86-0,90*	0,85
Total	21
	17

** Bandas mais pronunciadas

* Bandas menos pronunciadas, mas evidentes

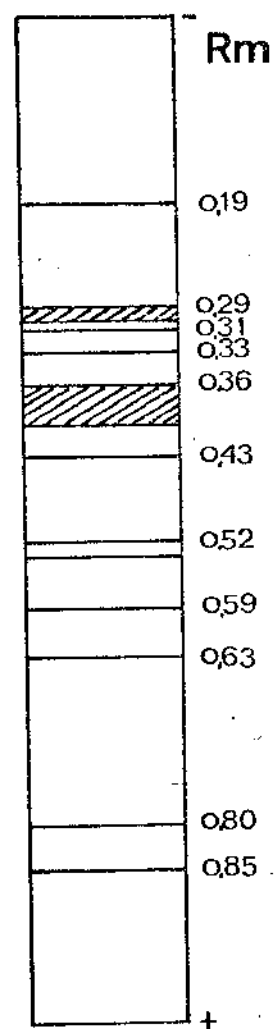


Figura 10 - Padrão de bandas características de *Phaseolus* seção *Ceratotropis* Pip.

e. *Phaseolus* seção *Leptospron* Benth.

Phaseolus adenanthus, a única espécie da seção estudada, apresenta um padrão eletroforético composto de 17 bandas (Figura 11), das quais duas são maiores, bem coradas e pronunciadas, relativas aos Rm 0,36-0,38 (PM aproximado 56000-54000) e 0,39 - 0,43 (PM aproximado 49000-43000), correspondentes, possivelmente a G1, de acordo com os PM de suas subunidades. Apresentam ainda duas bandas menores, mas bem pronunciadas, referentes aos Rm 0,31-0,33 (PM aproximado 61000-60000) e 0,60-0,62 (PM aproximado 33000-31000), sendo as 13 subunidades restantes, menos coradas e pronunciadas.

f. *Vigna* seção *Vigna*

Vigna luteola, a única espécie estudada do gênero *Vigna* apresenta um padrão eletroforético composto de um total de 8 subunidades proteicas e está representado na Figura 12.

Apresenta somente uma subunidade principal, bem evidente e corada, referente ao Rm 0,32-0,40 (PM aproximado 55000-54000) e uma banda menor, menos corada, mas bem evidente relativa ao Rm 0,34 (PM aproximado 64000), sendo as outras seis subunidades menos evidentes.

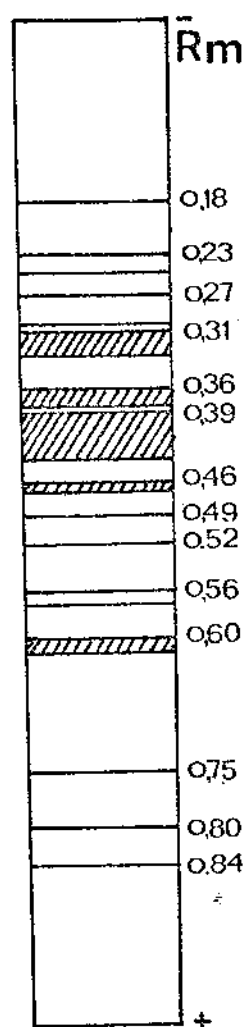


Figura 11 - Padrão eletroforético das subunidades proteicas de *Phaseolus adenanthus* Meyer.

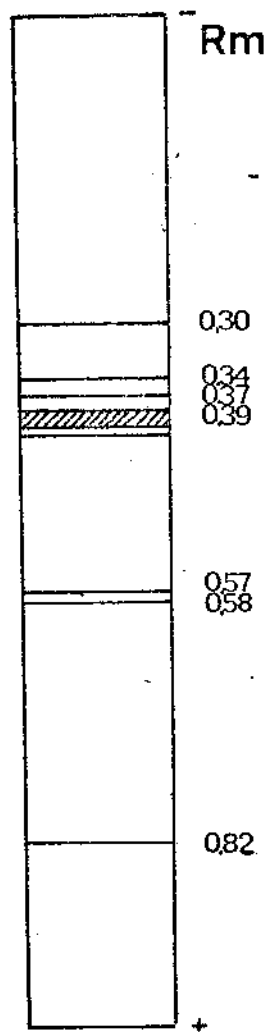


Figura 12 - Padrão de bandas de *Vigna luteola* Benth.

g. Comparação entre todas as espécies

As subunidades proteicas de todas as espécies estudadas estão representadas na Figura 13, onde podemos observar a constância do padrão de bandas em algumas das seções.

As mobilidades relativas das subunidades proteicas principais de todas as espécies estão apresentadas na Tabela VII, onde podemos verificar as semelhanças entre as espécies de *Phaseolus* seção *Phaseolus* e *Phaseolus* seção *Macroptilium*.

O dendrograma feito pelo método de ligação única está apresentado na Figura 14, onde podemos observar a formação de quatro grupos de espécies distintos. O 1º deles é formado pelas espécies da seção *Macroptilium* e o segundo grupo pelas espécies da seção *Phaseolus*, com *P. lunatus* um pouco mais distanciado. No terceiro grupo encontram-se as espécies da seção *Ceratotropis*, juntamente com *Vigna luteola*. O quarto grupo é composto pelas espécies da seção *Sigmoidotropis*. A espécie *P. adenanthus*, a única representante da seção *Leptospron*, se apresenta isolada, estando igualmente distanciada de qualquer um dos grupos anteriores.

O dendrograma feito pelo método de aglomeração por média de grupo está apresentado na Figura 15, onde pode ser observada, igualmente, a formação de quatro grupos. O primeiro grupo é constituído pelas espécies da seção *Macroptilium* e *P. lunatus*, no segundo grupo encontram-se as espécies da seção *Ceratotropis*, juntamente com *Vigna luteola* e *P. adenanthus*. O terceiro grupo

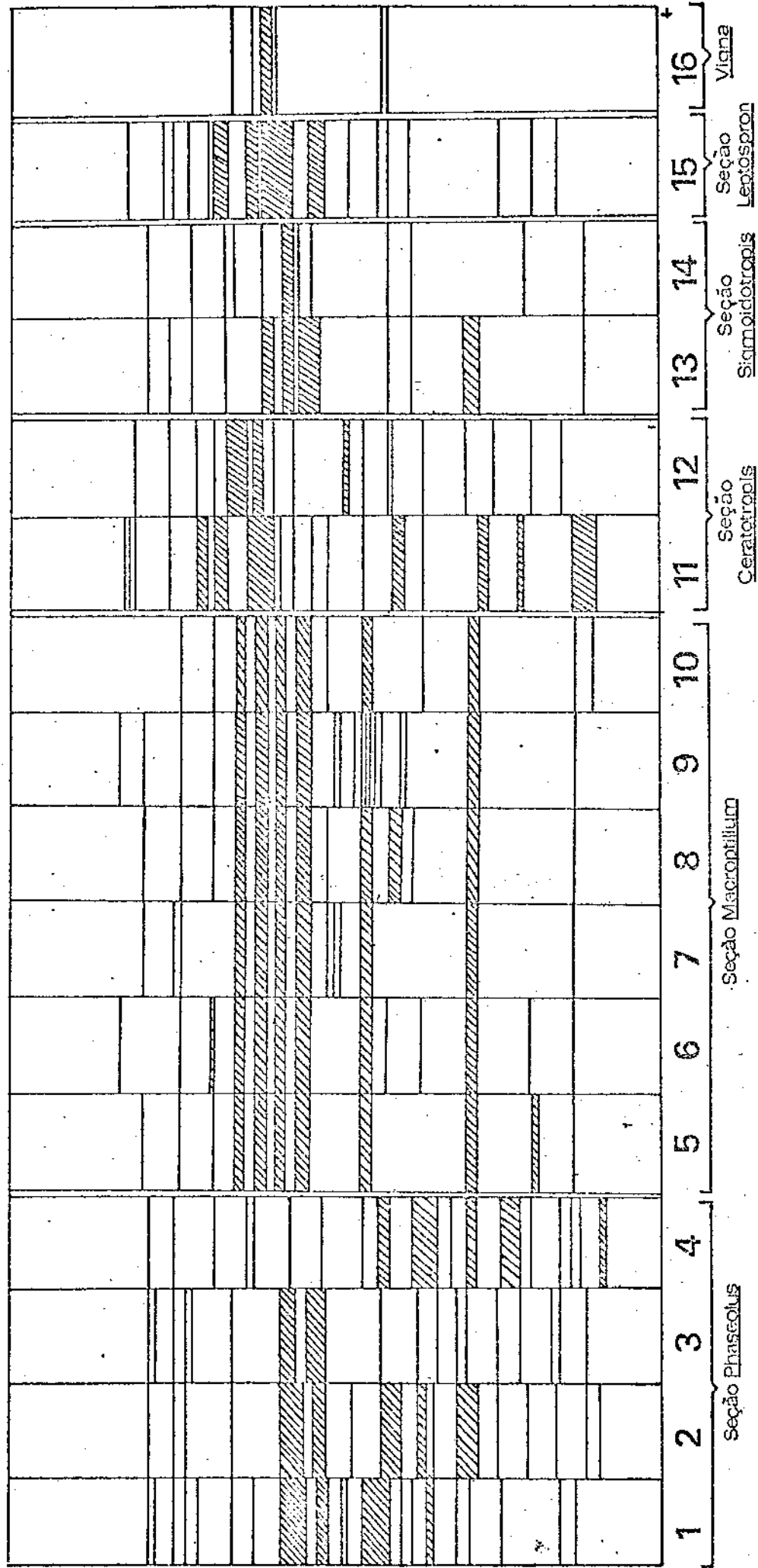


Figura 13 - Padrão das subunidades proteicas de todas as espécies estudadas.

1 - *P. vulgaris* 2 - *P. coccineus* 3 - *P. acutifolius* 4 - *P. lunatus*

5 - *P. atropurpureus* 6 - *P. bracteatus* 7 - *P. erythroloma* 8 - *P. lathyroides*

9 - *P. longipedunculatus* 10 - *P. panduratus* 11 - *P. aureus* 12 - *P. angularis*

13 - *P. penduncularis* 14 - *P. appendiculatus* 15 - *P. adenanthus* 16 - *Vigna*

luteola.

Tabela VII - Mobilidade relativa (Rm) das principais subunidades proteicas dos extratos de sementes estudados

	bandas mais pronunciadas		bandas menos pronunciadas	
Seção Phaseolus	<i>P. vulgaris</i>	0,42-0,46 0,47-0,49	0,21 0,54-0,59	0,70
	<i>P. coccineus</i>	0,41-0,45 0,46-0,49	0,20 0,57-0,60	0,69-0,72
	<i>P. acutifolius</i>	0,40-0,42 0,44-0,47	0,20 0,50-0,61	0,60
	<i>P. lunatus</i>	0,56-0,58 0,62-0,66	0,20	0,70-0,72 0,76 0,91
Seção Macroptilium	<i>P. atropurpureus</i>	0,35-0,36 0,38-0,40 0,41-0,43 0,44-0,46	0,26 0,54-0,56	0,70-0,74 0,86
	<i>P. bracteatus</i>	0,35-0,36 0,39-0,40 0,41-0,43 0,44-0,45	0,26 0,53-0,56	0,70-0,74 0,86
	<i>P. longipedunculatus</i>	0,33-0,36 0,38-0,40 0,41-0,43 0,44-0,45	0,26 0,54 0,55 0,56 0,57	0,70-0,74 0,86
	<i>P. lathyroides</i>	0,33-0,36 0,38-0,42 0,43-0,44 0,45-0,46	0,26 0,56	0,70-0,72 0,86
	<i>P. erythroloma</i>	0,35-0,36 0,37,0,38 0,43 0,47	0,26 0,57	0,69 0,86
	<i>P. panduratus</i>	0,34-0,36 0,37,0,38 0,43-0,44 0,45-0,47	0,26 0,55-0,57	0,69-0,72 0,86
Seção - S. Cera- totro pis	<i>P. angularis</i>	0,33-0,36 0,37-0,39	0,51-0,52	
	<i>P. aureus</i>	0,36-0,40 0,42-0,43	0,29-0,30 0,32-0,33 0,59-0,60 0,63 0,72-0,73 0,86/9	
S. ligum- dotrps	<i>P. appendiculatus</i>	0,42-0,43 0,44	0,28 0,34 0,59	0,62
	<i>P. peduncularis</i>	0,39-0,41 0,42-0,44	0,33 0,57	
S. lapa- tos- pron	<i>P. adenanthus</i>	0,36-0,38 0,39-0,43	0,30-0,32	0,60-0,62
	<i>Vigna luteola</i>	0,39-0,40	0,34	

Figura 14 - Dendrograma da % de similaridade feito pelo método de ligação única.

- 1 - *P.vulgaris* 2 - *P.coccineus* 3 - *P.acutifolius*
 4 - *P.lunatus* 5 - *P.atropurpureus* 6 - *P.bracteatus*
 7 - *P.erythroloma* 8 - *P.lathyroides* 9 - *P.longipedunculatus*
 10 - *P.panduratus* 11 - *P.aureus* 12 - *P.angularis*
 13 - *P.penduncularis* 14 - *P.appendiculatus* 15 - *P.adenanthus*
 16 - *Vigna luteola*.

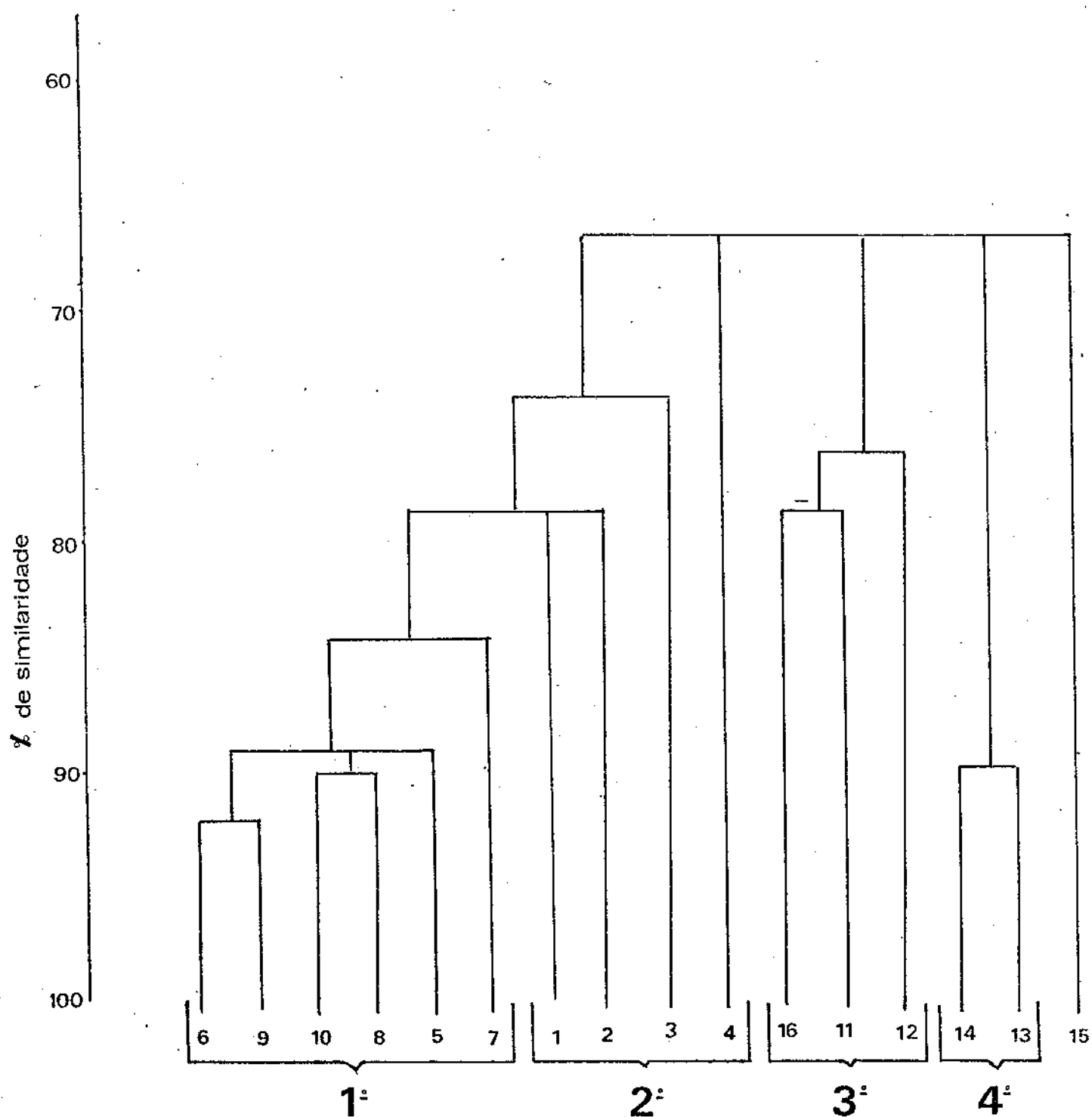
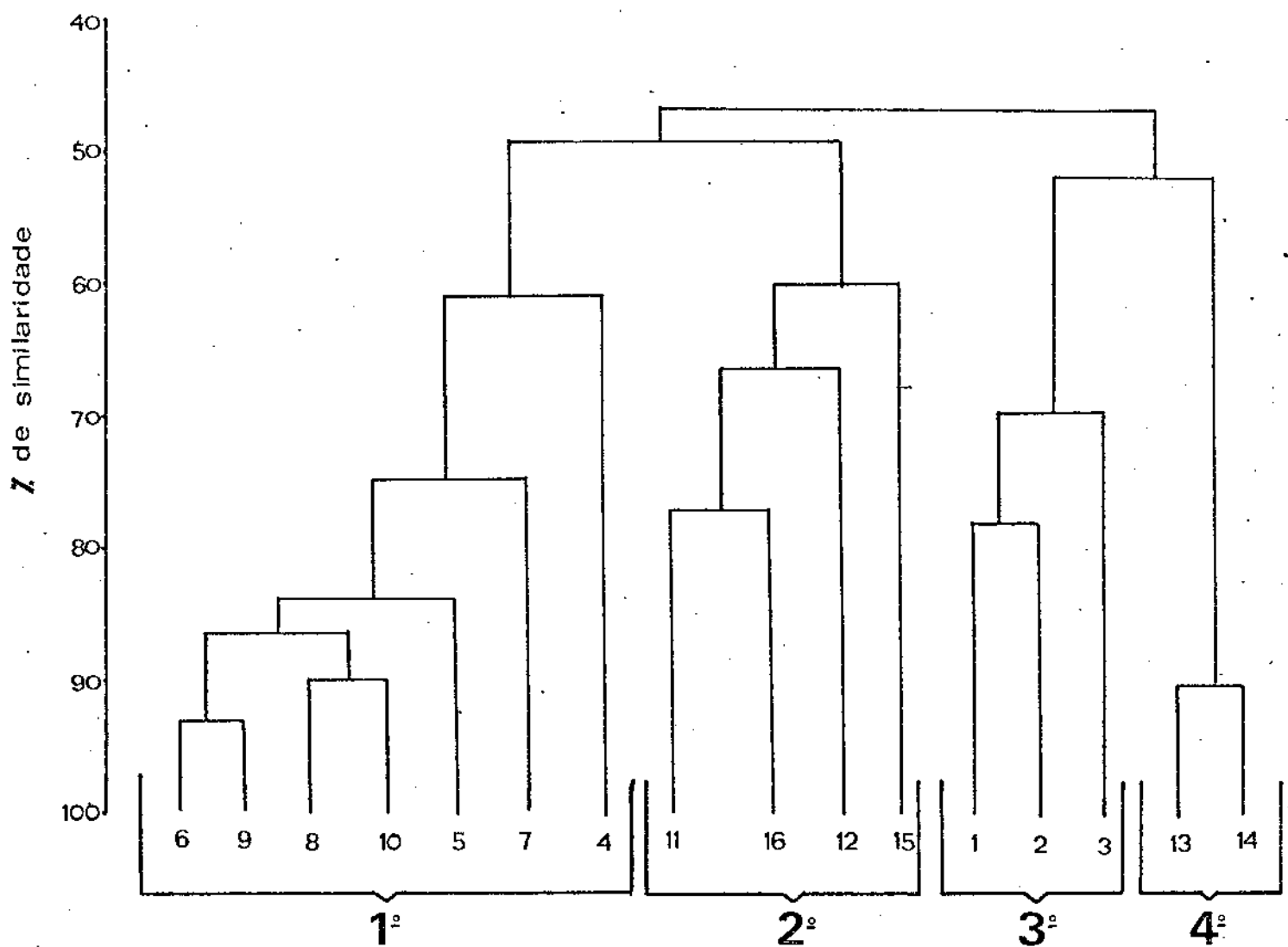


Figura 15 - Dendrograma da % de similaridade feito pelo método de aglomeração por média de grupo.

- 1 - *P.vulgaris* 2 - *P.coccineus* 3 - *P.acutifolius*
 4 - *P.lunatus* 5 - *P.atropurpureus* 6 - *P.bracteatus*
 7 - *P.erythroloma* 8 - *P.lathyroides* 9 - *P.longipedunculatus*
 10 - *P.panduratus* 11 - *P.aureus* 12 - *P.angularis*
 13 - *P.penduncularis* 14 - *P.appendiculatus* 15 - *P.adenanthus*
 16 - *Vigna luteola*.



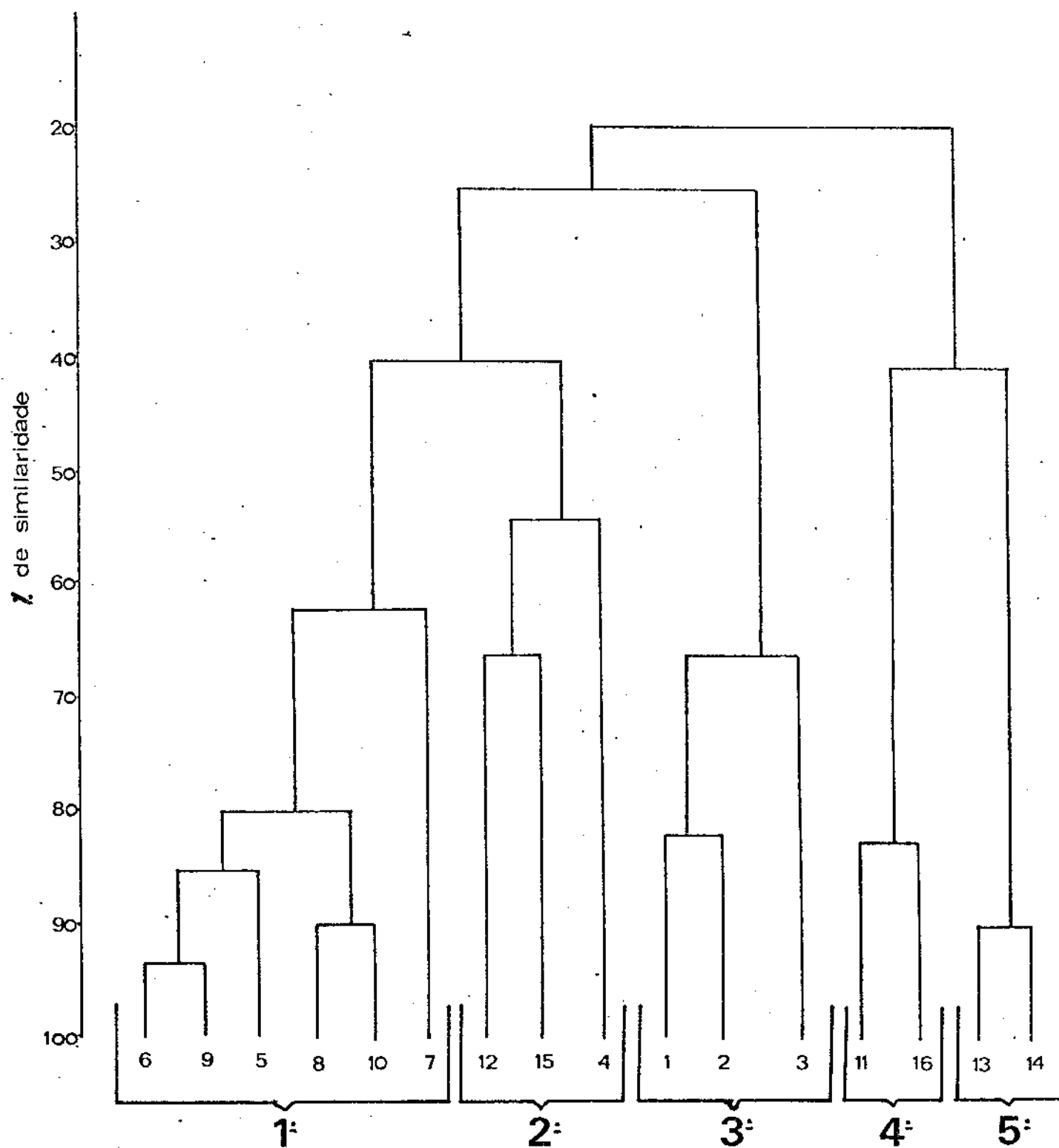
é formado pelas espécies restantes da seção *Phaseolus* e o quarto grupo é formado pelas duas espécies da seção *Sigmoidotropis*.

A análise feita pelo método de ligação completa, está representada na Figura 16, onde podemos notar a formação de cinco grupos de espécies. O primeiro grupo consta novamente das espécies da seção *Macroptilium*. O segundo grupo é formado por três espécies de seções distintas, *P. angularis* (Sec. *Ceratotropis*), *P. adenanthus* (Sec. *Leptospron*) e *P. lunatus* (Sec. *Phaseolus*). No terceiro grupo encontram-se as demais espécies da seção *Phaseolus*. O quarto grupo é formado por *P. aureus* (Sec. *Ceratotropis*) e *Vigna luteola* e no quinto grupo encontram-se as espécies da seção *Sigmoidotropis*.

Os dados da porcentagem de similaridade entre todas as espécies, estão apresentados na Tabela VIII, onde podemos observar uma variação de 20 a 93% de similaridade entre as espécies.

Figura 16 - Dendrograma da % de similaridade feito pelo método de ligação completa.

- 1 - *P.vulgaris* 2 - *P.coccineus* 3 - *P.acutifolius*
 4 - *P.lunatus* 5 - *P.atropurpureus* 6 - *P.bracteatus*
 7 - *P.erythroloma* 8 - *P.lathyroides* 9 - *P.longipedunculatus*
 10 - *P.panduratus* 11 - *P.aureus* 12 - *P.angularis*
 13 - *P.peduncularis* 14 - *P.appendiculatus* 15 - *P.adenanthus*
 16 - *Vigna luteola*.



Seções	Phaseolus				Macroptilium						Ceratotropis		Sigmoidotropis		Leptospron	Vigna
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)
(1)	-	78	66	25	43	45	62	42	78	54	64	43	58	36	37	30
(2)	-	-	73	53	37	46	43	41	34	43	61	43	66	50	60	25
(3)	-	-	-	38	37	58	45	64	50	48	53	48	50	48	63	27
(4)	-	-	-	-	64	64	58	60	51	66	55	61	38	31	54	28
(5)	-	-	-	-	-	85	62	89	85	80	64	66	63	34	50	34
(6)	-	-	-	-	-	-	73	89	93	86	51	59	64	38	57	35
(7)	-	-	-	-	-	-	-	73	84	41	41	40	56	23	51	20
(8)	-	-	-	-	-	-	-	-	84	90	54	62	58	48	53	53
(9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	56	66	50	38	47	53
(10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55	43	51	42	51	36
(11)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54	45	56	54	78
(12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57	50	66	75
(13)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90	38	40
(14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48	58
(15)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60
(16)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela VIII - Porcentagem de similaridade entre as espécies

- (1) *P. vulgaris* (2) *P. coecineus* (3) *P. acutifolius* (4) *P. lunatus*
(5) *P. atropurpureus* (6) *P. bracteatus* (7) *P. erythroloma* (8) *P. lathyroides*
(9) *P. longipedunculatus* (10) *P. panduratus* (11) *P. aureus* (12) *P. angularis*
(13) *P. peduncularis* (14) *P. appendiculatus* (15) *P. adenanthus* (16) *Vigna luteola*.

VI - DISCUSSÃO

O padrão eletroforético obtido para *P.vulgaris* e outras espécies, concorda, em geral, com o padrão obtido por trabalhos anteriores (Boulter et al., 1967; Puzstai, 1966). Algumas diferenças, no entanto, são encontradas, principalmente em relação à Globulina-1 que dissocia-se normalmente em três subunidades, α PM 53000; β PM 47000 e γ PM 43000 (Sun & Hall, 1975). A análise do padrão eletroforético de *P.vulgaris* mostrou a presença de somente duas subunidades, não correspondentes aos PM obtidos pelos outros autores (Sun & Hall, 1975; McLeester et al., 1973; Barker et al., 1976). No entanto, o sistema de eletroforese utilizado por esses autores foi, em geral, o de Ornstein & Davis (1961) e não o de Laemmli (1970) utilizado neste trabalho, não sendo utilizado um tampão descontínuo e nem o gel superior, além da concentração de acrilâmida utilizada por eles ser diferente. É possível que algumas das diferenças encontradas em nosso trabalho sejam devidas às variações nessas técnicas, assim como, no processo de extração. É provável ainda, que as variações aqui observadas sejam devido ao tipo de variação encontrada por Bliss (1978), que estimando o padrão eletroforético de Gl de outros genótipos de *P.vulgaris*, sugeriu uma variação genética no padrão de bandas, particularmente em relação à subunidade α .

O padrão eletroforético encontrado para os cultivares de *P.vulgaris* estudados, sem grandes variações entre eles, são condizentes com os resultados obtidos por Barker et al. (1976) e Derbyshire et al. (1976) e parece indicar que a técnica detecta um nível de variação superior ao que se esperaria entre espécies,

sendo por esta razão mais apropriados para estudos acima do nível de espécie.

Em relação às espécies da seção *Macroptilium*, o padrão das principais proteínas de reserva parece concordar com o descrito por outros autores para *P.vulgaris*, principalmente em termos dos PM das principais bandas proteicas apresentando, no entanto, quatro bandas principais ao invés de três como é descrito para *P.vulgaris*. (Figura 5, Tabela IV).

Pelas características químicas das sementes do gênero *Phaseolus* s.l., levando em conta o padrão de subunidades proteicas e a principal proteína de reserva das espécies, podemos separá-lo em vários grupos, que nem sempre correspondem às divisões taxonômicas propostas para o gênero.

A análise dos resultados será feita, inicialmente, para cada seção do gênero estudada, para depois apresentarmos uma visão global do problema dentro do gênero *Phaseolus* s.l..

a. *Phaseolus* seção *Phaseolus*

A seção *Phaseolus* é caracterizada quimicamente pela presença de globulina-1 como a principal proteína de reserva da semente, encontrada em *P.vulgaris*, *P.coccineus* e *P.acutifolius*, sendo encontrada em *P.lunatus* em bandas fracas e não proeminentes, não se podendo assumir se realmente elas pertencem à G1. (Figura 3).

Através do cálculo da porcentagem de similaridade entre as espécies dessa seção, analisados em qualquer dos métodos numéricos de aglomeração, *P.vulgaris* e *P.coccineus* formam um

grupo homogêneo, bem relacionado, com similaridade relativamente alta. A espécie *P. acutifolius*, se apresenta um pouco mais distanciada, mas ainda próxima e relacionada ao grupo e segundo Derbyshire et al. (1976), esta espécie difere das anteriores em apenas uma reação imunoquímica da maior proteína de reserva da semente. A espécie *P. lunatus*, apresenta uma distribuição diferenciada, diferindo das espécies da seção em relação à Gl e pelo potencial de aglutinação das células vermelhas do sangue humano, grupo O (Derbyshire et al., 1976).

Kloz & Klozova (1968), em estudo serológico da subtribo *Phaseolineae*, utilizando o antiserum contra as frações globulina, albumina e faseolina, chegaram às conclusões semelhantes, mostrando a proximidade de *P. vulgaris* em relação a *P. coccineus*, que se diferenciam muito pouco, ao passo que *P. acutifolius*, embora um pouco mais distanciada de *P. vulgaris*, é ainda mais claramente relacionado a este do que a *P. lunatus*, que se apresenta mais distantemente colocado.

Dados de hibridações entre essas espécies também confirmam as afinidades entre *P. vulgaris* e *P. coccineus*, com um distanciamento um pouco maior de *P. acutifolius* e relativamente grande em relação a *P. lunatus*. Cruzamentos de *P. vulgaris* (♀) e *P. coccineus* (♂), levaram a formação de híbridos férteis e viáveis, com formação de 0,32 univalentes na meiose de F1 (Maréchal et al., 1978a). Em geral, esse cruzamento leva à formação de híbridos facilmente, enquanto que o recíproco é produzido somente com dificuldade (Kloz et al., 1966). Miranda & Evans (1973), mostraram que a diferença recíproca em cruzamentos entre essas duas espécies não ocorre em populações naturais, sugerindo que a in-

compatibilidade unilateral se desenvolveu sob cultivo (apud Evans, 1976).

P. vulgaris pode ser cruzado somente com dificuldade com *P. acutifolius*, com formação de híbridos viáveis mas estéreis e com maior dificuldade, com *P. lunatus* (Evans, 1976).

O cruzamento de *P. acutifolius* ($\frac{0}{4}$) com *P. coccineus* ($\frac{0}{0}$), leva à formação de híbridos viáveis, mas auto-estéreis (Smartt, 1970; Coyne, 1964 apud Evans, 1976).

Parece haver alguma afinidade entre *P. vulgaris*, *P. coccineus* e *P. acutifolius*, como mostra a formação de híbridos viáveis, mas menor afinidade entre *P. lunatus* e as outras três espécies.

Há, portanto, uma correlação positiva entre o grau de similaridade dos caracteres proteicos e as possibilidades de cruzamentos entre as espécies.

Um certo paralelismo, parece existir também, entre a formação de híbridos interespecíficos e as diferenças observadas entre certos caracteres polínicos das espécies parentais. Desse modo, *P. vulgaris* apresenta um grão de pólen triporado, sem pseudocolpus, com exina finamente reticulada, o mesmo acontecendo com *P. coccineus*. A espécie *P. acutifolius* apresenta um grão de pólen tricolporado, sem pseudocolpus, com exina finamente reticulada e *P. lunatus* possui pólen tricolporado, mas com pseudocolpus e exina não estruturada (Stainier, 1974).

Em estudos numéricos da taxonomia dessa seção, Maréchal et al. (1978a), mostraram a existência de uma forte homologia do

complexo *vulgaris-coccineus*, estando *P.acutifolius*, juntamente com as outras espécies da seção, em posição intermediária, terminando o agrupamento com *P.lunatus*, que portanto, se encontra mais isolado.

Segundo esses autores, existe uma sequência contínua no gênero, que indica uma evolução do tipo polínico e não existe nenhuma separação nítida entre os agrupamentos das espécies, que justifiquem uma subdivisão da seção. A espécie *P.lunatus*, no entanto, apresenta caracteres químicos, polínicos e mesmo de cruzamentos, que a distanciam das outras espécies da seção. Não nos parece lógico, portanto, mantê-lo, dentro da seção sem maiores considerações, mas sim considerá-lo como uma espécie de transição e intermediária para outros grupos de espécies. Entretanto, ainda deve ser levado em consideração que *P.lunatus* apresenta habitat e época de domesticação diferentes das outras espécies estudadas da seção (Evans, 1976), o que justificaria as diferenças encontradas em relação a essas espécies.

b. *Phaseolus* seção *Macroptilium* Benth.

Pelo padrão de bandas de globulinas de sementes, esta seção se apresenta homogênea, diferindo de qualquer outra seção estudada. Suas espécies estão bem relacionadas, formando agrupamentos nítidos e constantes em qualquer das análises numéricas utilizadas no estudo. (Figuras 14, 15 e 16).

Estudos de serologia (Kloz et al., 1966; Kloz, 1971), usando antiserum de *P.aureus*, mostraram uma nítida separação das espécies dessa seção de origem americana, tropical e subtropical, das espécies endêmicas americanas, dos altos platôs das Américas

do Sul e Central e das espécies de origem asiática, mostrando a coerência das espécies desse grupo, assim como o distanciamento delas em relação às espécies das outras seções.

Boulter et al. (1967), estudando proteínas de sementes de leguminosas, separam duas espécies estudadas dessa seção em um grupo à parte das espécies de *Phaseolus* estudadas.

Derbyshire et al. (1976), apesar de terem estudado somente duas espécies dessa seção, *P. lathyroides* e *P. atropurpureus*, mostraram uma diferenciação entre essas duas espécies e as outras estudadas, em relação às globulinas de sementes e também da atividade lítica em células vermelhas do sangue humano, grupo O, não existente em espécies das outras seções estudadas.

Casimir & Le Marchand (1966), mostraram a clara separação das espécies da seção *Macroptilium*, em relação à *Phaseolus* e outros grupos de espécies, através da ausência de asparagina e da presença de peptídios livres (P3).

Em relação aos caracteres morfológicos, todas as espécies da seção apresentam uma uniformidade, com caracteres distintos de espécies típicas do gênero *Phaseolus*, como a ausência de pelos uncinulados na epiderme foliar (Baudet, 1974), alas proporcionalmente maiores que o estandarte e a quilha e a não espiralização da quilha.

Urban, em 1928, elevou a seção *Macroptilium* a nível de gênero, baseando-se em caracteres morfológicos da flor e em 1964, Huchtinson reconhece o gênero e distingue-o de *Phaseolus* através das características do cálice.

Verdcourt (1970), não somente aceita a tese de Urban , como também inclui em *Macroptilium* (Benth.) Urb. a antiga seção *Microcochle* Benth. que originalmente era diferenciada desta pela dimensão das flores e pelo cálice campanulado, considerando esses dois caracteres muito variáveis e portanto, não satisfatórios para a distinção.

Maréchal et al. (1978a), estudando numericamente esse grupo, chegaram a conclusão que ele é extremamente homogêneo e coerente, com índices de similaridade entre os taxa relativamente elevados, possuindo características numerosas e plenamente satisfatórias para separá-lo de *Phaseolus* e ser colocado juntamente com *Microcochle* Benth. no gênero *Macroptilium* (Benth.) Urb.

Os dados obtidos através das globulinas de sementes das seis espécies dessa seção estudadas, corroboram a transferência dessas espécies para um gênero independente, pois pelo menos em termos desses dados, elas são realmente homogêneas, constantes e diferentes de qualquer outra seção. A análise numérica dos dados contribui para melhor sustentar a idéia de transferência. Em termos de se colocar a seção *Microcochle* neste gênero, não podemos dar maiores esclarecimentos, devido à falta de estudos em espécies dessa seção.

c. *Phaseolus* seção *Sigmoidotropis* Pip.

As duas espécies estudadas dessa seção, apresentam um padrão de bandas com uma certa correspondência, diferindo entre tanto em uma das bandas principais, mais proeminentes (Figura 7). A análise do cálculo da porcentagem de similaridade mostrou um forte relacionamento (90%) entre as espécies estudadas.

Essa seção se particulariza por possuir caracteres tanto do gênero *Phaseolus* como de *Vigna*, sendo problemática sua separação. Dessa maneira, já em 1920, Fawcett & Rendle transferiram duas espécies da seção para o gênero *Vigna*: *V.antillana* e *V.peduncularis*.

Piper em 1926, manteve *Sigmoidotropis* como seção de *Phaseolus*, mas sugere a elevação dessa seção ao nível de gênero, por razão de comodidade.

Verdcourt (1970), baseando-se principalmente em caracteres polínicos e do estilete, estima que a balança pende em favor de se colocar a seção dentro do gênero *Vigna*, onde ele a situa ao nível de subgênero.

Um dos fatores mais fortes, que tem induzido a exclusão dessa seção do gênero *Phaseolus* é a ausência de pelos uncinulados.

Em relação ao grão de pólen, as características dentro da seção são muito variáveis. *P.peduncularis* apresenta grão de pólen tricolporado com exina reticulada em malhas grossas, ao passo que *P.appendiculatus* apresenta um grão triporado com exina reticulada (Stainier, 1974; 1976).

Maréchal et al.(1978a), em estudo numérico, mostraram a colocação da seção bem próxima das espécies de *Vigna* do velho mundo e a uma certa distância de *Phaseolus*. A análise numérica revela uma afinidade evidente com o gênero *Vigna*, mostrando, no entanto, uma transição evolutiva em relação aos outros gêneros estudados. Segundo esses autores, a seção parece provir de um ramo original, a partir do qual, se fez a diferenciação genérica.

Leitão Filho (1972, 1974), refere-se à proximidade da seção com o gênero *Vigna*, indicando que essa seção poderia ser a primeira e mais primitiva dentro da escala de evolução do gênero *Phaseolus*, principalmente depois da descrição de *P. dolichicarpus* (Sec. *Sigmoidotropis*) por Burkart, que a considera como uma espécie primitiva dentro do gênero e que manifesta afinidades com *Vigna*, *Dolichopsis* e talvez outros gêneros (Burkart, 1944).

Pelos dados de globulinas de sementes analisados pelos métodos numéricos de encadeamento, podemos dizer que as duas espécies da seção são homogêneas e relacionadas, apresentando relacionamento diferenciado com as outras espécies, de acordo com o método de análise numérica empregado, levando a se considerar como um grupo realmente intermediário entre os gêneros *Phaseolus* e *Vigna*. Desta forma, torna-se importante um aprofundamento do estudo das espécies dessa seção.

Maréchal et al. (1978a), incluem ainda em *Sigmoidotropis* as seções *Cochliasanthus* Pip. e *Leptospron* Benth.. Em relação à seção *Cochliasanthus* nada podemos esclarecer devido não termos estudado espécies dessa seção. A seção *Leptospron*, será discutida em um item posterior deste trabalho.

d. *Phaseolus* seção *Ceratotropis* Pip.

O padrão de bandas das duas espécies da seção *Ceratotropis* estudadas não é homogêneo, apresentando uma similaridade relativamente baixa (54%). No entanto, as duas espécies se apresentam bem relacionadas com *Vigna luteola* (75-77%).

Wilczek (1954), conceituando os gêneros *Vigna* e *Phaseolus*, basicamente transferiu as espécies da seção *Ceratotropis* para o gênero *Vigna*.

Owhi (1965), criou o gênero *Azuki* para três espécies dessa seção representadas na Flora do Japão. Posteriormente Owhi & Ohashi (1969), admitiram que esse gênero poderia ser confundido com *Vigna* Savi (apud Verdcourt, 1970).

Estudos serológicos mostraram a maior afinidade dessas espécies de origem asiática com *Vigna* do que com *Phaseolus* (Kloz, 1971), assim como a ausência de faseolina, característica de *Phaseolus* em espécies dessa seção (Kloz & Klozova, 1968).

Estudos de proteínas de semente (Derbyshire et al., 1976), mostraram a não detecção de glicoproteína II em espécies da seção *Ceratotropis*, mostrando uma diferenciação dessas espécies em relação à *Phaseolus*.

Chrispeels & Baungartner (1978), estudando a atividade endopeptidásica em extratos de cotilédones de espécies de *Phaseolus* e *Vigna*, mostraram a inibição da atividade dessa enzima em extratos de duas espécies da seção *Ceratotropis*, assim como em *Vigna*, o que não ocorria normalmente em espécies de *Phaseolus*, confirmando a passagem dessas duas espécies para o gênero *Vigna*.

As espécies dessa seção se apresentam com características morfológicas tipicamente do gênero *Vigna*, com uma associação completa dos caracteres particulares que definem o gênero: estípulas prolongadas sob o seu ponto de inserção, estilete prolongado além do estigma em um bico mais ou menos distinto, grão de pólen triporado com exina reticulada em malhas largas.

Maréchal et al. (1978a), consideram que a seção *Ceratotropis* deve ser transferida para o gênero *Vigna*, em nível de subgênero, seguindo a proposição de Verdcourt (1970), pois constitui dentro do gênero *Vigna* um grupo bastante homogêneo, que reúne características típicas, representando uma tendência evolutiva em relação a uma especialização, provavelmente devido à biologia floral e ao modo de fecundação. Se apresenta, através da análise numérica de suas características como um grupo homogêneo com distâncias inferiores a 0,25.

Pela análise numérica, a partir dos dados de globulina de sementes, nos métodos de ligação única e aglomeração por média de grupo, as duas espécies da seção estudadas, formam juntamente com *Vigna luteola*, um agrupamento nítido, mostrando um grande relacionamento entre as espécies (Figuras 14 e 15). Já em ligação completa somente *P. aureus* e *V. luteola* formam um agrupamento, estando *P. angularis* em um outro grupo separado, indicando ser essa espécie intermediária dentro da seção. (Figura 16).

e. *Phaseolus* seção *Leptospron* Benth.

O padrão de bandas de *P. adenanthus*, a única espécie dessa seção estudada, é característico e diferente de qualquer outra espécie.

Essa seção também se apresenta atualmente como um dos problemas mais difíceis de distinção entre os gêneros *Vigna* e *Phaseolus*. As suas espécies apresentam uma variação de caracteres que vão dos tipicamente de *Phaseolus*, como as estípulas não prolongadas sob o seu ponto de inserção e o estilete terminal ,

atē os tipicamente de *Vigna*, como a presença de glândulas pedice_lares, bracteas caducas e ausência de pelos uncinulados.

Os caracteres polínicos são igualmente variados. *P.adenanthus*, em particular, apresenta características polínicas de *Phaseolus*, como a presença de colporus e exina columelar. O aspecto exterior da exina, não estruturada, é no entanto, bastante particular (Stainier, 1976).

Hassler, em 1923, inclui na seção *Leptospron* três espécies: *P.adenanthus*, *P.linearis* e *P.speciosus*.

Em 1926, Piper cita a seção *Leptospron* em *Phaseolus*, mas não apresenta nenhum representante, colocando *P.adenanthus* e *P.linearis*, juntamente com muitas outras espécies, sob o título "Miscelânea de espécies, seção *Euphaseolus*".

Verdcourt (1970), mantém *P.adenanthus* em *Phaseolus*, onde ele a classifica como a única espécie da seção *Leptospron*, transferindo as outras duas espécies para o gênero *Vigna*.

Leitão Filho, em 1974, reduz a seção *Leptospron* a sinônimo de *Euphaseolus*, considerando que os caracteres utilizados para definir a seção eram muito variáveis e portanto insuficientes.

Em ensaio de imunodifusão, realizado a partir de extratos de cotilédones (Chrispeels & Baungartner, 1978), *P.adenanthus* mostrou uma reação serológica inibidora da atividade endopeptidásica, do mesmo modo que espécies de *Vigna*. Ao contrário, essa inibição foi nula em espécies de *Phaseolus* s.str..

No estudo de taxonomia numérica (Maréchal et al., 1978a) os diagramas de correspondência mostraram uma posição de *P. adenanthus*, muito mais próxima às espécies da seção *Sigmoidotropis* do que à *Phaseolus* s.str.. Segundo esses autores, a integração da seção *Leptospron* ao gênero *Vigna*, subgênero *Sigmoidotropis*, constitui o único tratamento racional. *P. adenanthus*, poderia se constituir em um elo de ligação entre os gêneros *Phaseolus* e *Vigna*.

Pela análise numérica dos dados de globulina de semente, podemos dizer que *P. adenanthus* realmente se apresenta como uma espécie intermediária, com diferentes posições de acordo com a técnica de aglomeração empregada na análise.

Um estudo de maior número de espécies dessa seção torna-se necessário, para um melhor esclarecimento de seu posicionamento em relação aos gêneros *Vigna* e *Phaseolus*.

f. Comparação entre todas as espécies

Pela análise numérica da porcentagem de similaridade do padrão de globulinas de sementes de todas as espécies estudadas, feita por três métodos de encadeamento, foram obtidos três dendrogramas de similaridades diferentes. Algumas das relações entre espécies, no entanto, se mantêm sempre constantes, em quaisquer das técnicas empregadas, mostrando a coerência de alguns dos agrupamentos formados. (Figuras 14, 15 e 16).

As espécies da seção *Macroptilium* Benth. apresentam-se sempre formando um agrupamento nítido e coerente, com variações muito pequenas nos índices de relacionamento entre as espé-

cies. Três das espécies de *Phaseolus* seção *Phaseolus*, *P.vulgaris*, *P.coccineus* e *P.acutifolius* se apresentam também sempre agrupadas, estando *P.vulgaris* e *P.coccineus* mais relacionadas e *P.acutifolius* um pouco mais distanciado. As duas espécies da seção *Sigmoidotropis*, *P.peduncularis* e *P.appendiculatus*, constituem sempre um grupo constante e distinto das outras espécies. *Vigna luteola* e *P.aureus* (seção *Ceratotropis*) se apresentam em qualquer um dos dendrogramas sempre unidas com um índice de similaridade bastante alto.

As três espécies restantes, são as que apresentam maiores problemas para a distinção dos grupos: *P.lunatus*, *P.adenanthus* e *P.angularis*.

P.angularis pela técnica de ligação única e por média de grupo se apresenta unida ao grupo formado pela outra espécie de sua seção, *P.aureus* e *Vigna luteola*, mas pelo método de enca-deamento ligação completa ela se encontra em outro grupo, formando uma ligação com índices de similaridade relativamente alto com *P.adenanthus* e um pouco mais distanciadamente com *P.lunatus*.

P.adenanthus se apresenta pela técnica de ligação única, isolado de qualquer outro grupo ligando-se a todos eles na mesma proporção de similaridade, o mesmo acontecendo com *P.lunatus*. Pela análise da técnica de aglomeração por média de grupo, *P.adenanthus* se coloca no grupo formado pelas espécies da seção *Ceratotropis* e *Vigna luteola* e *P.lunatus* se une ao grupo das espécies da seção *Macroptilium*. Em ligação completa essas duas espécies formam um novo grupo, isolado, juntamente com *P.angularis*.

Considerando que em aglomeração por média de grupo , os grupos se unem de acordo com a distância média entre os seus membros e que em ligação completa, a fusão é baseada na distância mínima entre uma entidade e a mais remota de um grupo, podemos dizer que essas espécies, embora relacionadas com as espécies de suas seções, como é o caso de *P.angularis* e *P.lunatus*, constituem na realidade, espécies de transição entre o grupo original e outros grupos próximos. Segundo Maréchal et al. (1978a), *P.adenanthus* poderia se constituir em um elo de ligação entre os gêneros *Phaseolus* e *Vigna* e *P.lunatus*, seria um estágio mais avançado de evolução, principalmente em termos polínicos, dentro do grupo *Phaseolus* s.str..

A espécie *P.angularis* pode ser considerada da mesma maneira, pois embora relacionada às espécies de sua seção, na verdade constituiria um dos elos de transição para outros grupos , possivelmente de *Vigna*.

A idéia de se considerar a seção *Sigmoidotropis* como uma transição evolutiva entre os gêneros *Vigna* e *Phaseolus*, pode também ser bem evidenciada pela posição apresentada por ela nos diversos dendrogramas obtidos. Pela técnica de ligação única , as espécies encontram-se distantemente colocadas em relação a qualquer um dos outros grupos formados. Já em aglomeração por média de grupo, as espécies desta seção se encontram mais relacionadas com as espécies da seção *Phaseolus* ; ao contrário, em ligação completa, elas se apresentam mais próximas ao grupo onde se encontra *Vigna luteola*.

VII - CONCLUSÕES

Pelo estudo das globulinas de sementes, feito através de eletroforese em geis de poliacrilamida contendo SDS, em espécies de *Phaseolus* s.l., nativas e cultivadas no Brasil, auxiliado pela análise numérica utilizando-se três métodos de encadeamento, podemos concluir que as espécies estudadas podem ser distribuídas em quatro grupos, dos quais dois podem ser considerados como pertencentes a outros gêneros, apresentando ainda espécies intermediárias entre os gêneros *Vigna* e *Phaseolus*, com um difícil problema de posicionamento.

As espécies da seção *Macroptilium* Benth. apresentam um padrão de bandas característico e constante, com diferenças nítidas em relação a qualquer outra espécie estudada, constituindo sempre como um agrupamento nítido e coerente. Dessa maneira a elevação dessa seção ao nível de gênero, proposta por Urban em 1928 e acatada por vários autores posteriores nos parece válida e correta em termos de globulinas de sementes, devendo ser considerada como um gênero independente: *Macroptilium* (Benth.) Urb.

As espécies da seção *Ceratotropis* Pip. apresentam um padrão de subunidades proteicas bem mais próximo ao de *Vigna luteola* do que ao de *Phaseolus* s.str.. Apesar de termos estudado somente duas espécies dessa seção, das quais uma pode ser considerada intermediária e somente uma espécie do gênero *Vigna*, nos parece acertada a idéia de Verdcourt (1970) de transferir as espécies dessa seção para o gênero *Vigna*, principalmente pelo fato de que em termos morfológicos elas são muito mais próximas à *Vigna* do que à *Phaseolus* s.str..

As espécies da seção *Sigmoidotropis* Pip. quanto às globulinas de semente formam um agrupamento nítido, se apresentando, no entanto, intermediárias entre os gêneros *Phaseolus* e *Vigna*. A idéia de se transferir as espécies dessa seção para o gênero *Vigna* nos parece precoce uma vez que somente um pequeno número de espécies dessa seção foram até hoje estudadas.

As espécies de *Phaseolus* seção *Phaseolus* se apresentam com um padrão de bandas relativamente homogêneo, caracterizada por possuírem G1 como a principal proteína de reserva da semente, formando um grupo constante e coerente, com exceção de *P. lunatus*, espécie intermediária dentro do grupo, originalmente colocada em uma seção do gênero à parte, *Drepanospron*, e atualmente considerada como um estágio avançado da evolução dentro das espécies da seção. As espécies da seção, formam realmente um agrupamento nítido e *P. lunatus* apesar de uma certa distância das espécies desse grupo, não apresenta caracteres, principalmente morfológicos, que justificam a sua separação em outro grupo.

Phaseolus adenanthus, se apresenta em termos de proteína de sementes como uma espécie diferenciada, apresentando no entanto relações tanto com o gênero *Vigna* como com *Phaseolus*, podendo ser considerada como intermediária entre os dois gêneros, ou como afirmam alguns autores, como um elo de ligação entre os dois gêneros. No entanto o estudo de maior número de espécies dessa seção e do gênero *Vigna* se faz necessário para se obter um posicionamento dessa seção mais claro em relação aos gêneros *Vigna* e *Phaseolus*.

VII - RESUMO

Foram estudadas quinze espécies do gênero *Phaseolus* L. s.l. e uma espécie do gênero *Vigna* Savi, nativas e cultivadas no Brasil, através de globulinas de sementes. A análise do padrão eletroforético das subunidades proteicas, auxiliada pela análise numérica desses dados, levou à separação das espécies em diversos grupos, nem sempre correspondentes às novas divisões taxonômicas que tem sido propostas para o gênero por diversos autores.

É confirmada neste trabalho, a elevação de *Phaseolus* seção *Macroptilium* Benth. para o nível de gênero independente, *Macroptilium* (Benth.) Urb. pois pelos dados de globulinas de sementes as espécies estudadas dessa seção se apresentam homogêneas constantes e diferentes de qualquer outra seção. É verificada também, a maior proximidade de *Phaseolus* seção *Ceratotropis* Pip. com o gênero *Vigna*, o que talvez possa ser um tratamento mais racional para as espécies dessa seção.

Além disso foi verificada a existência de grupos intermediários entre os gêneros *Phaseolus* e *Vigna*, como é o caso de *Phaseolus* seção *Sigmoidotropis* Pip. e *Phaseolus* seção *Leptospron* Benth. A posição dessas seções em relação aos dois gêneros, em termos de globulina de sementes é discutida.

IX - SUMMARY

Seed proteins of 15 species of *Phaseolus* L. s.l. and one species of *Vigna* Savi, which are native or cultivated in Brazil, were studied using gel electrophoresis. Analysis of the protein subunit patterns, aided by a numerical analysis of the data showed that the genus *Phaseolus* can be divided into various subgroups according to the proteins present. These groups do not always correspond to the new taxonomic subdivisions recently proposed for the genus.

The data obtained support the elevation of *Phaseolus* sect. *Macroptilium* Benth. to the generic level as *Macroptilium* (Benth.) Urb., since seed proteins of species from this section show it to be homogeneous, constant and different from the other sections of *Phaseolus* s.l.. The greater affinity of sect. *Ceratotropicis* Pip. with *Vigna* was also confirmed, suggesting a more rational taxonomic position for this section.

The existence of groups which are intermediate between the genera *Phaseolus* and *Vigna*, such as sects. *Sigmoidotropis* Pip. and *Leptospron* Benth. of *Phaseolus* was also demonstrated. The position of the latter sections in relation to the two genera is discussed.

X - BIBLIOGRAFIA

BARKER, D.J.; E. DERBYSHIRE; A. YARWOOD & D. BOULTER (1976) .
Purification and characterization of the major storage protein
of *Phaseolus vulgaris* seeds, and their intracellular and coty-
ledonary distribution. *Phytochemistry* 15:751-757.

BAUDET, J.C. (1972). Intérêt taxonomique des caractères épider-
miques dans le complexe *Phaseolus-Vigna*. *Bull.Soc.Roy.Bot* .
Belgique 106:53-59.

_____ (1974). Signification taxonomique des caractères
blastogéniques dans la tribu des Papilionaceae - *Phaseoleae*.
Bull.Jard.Bot.Nat.Belgique 44:259-293.

_____ & R. MARÉCHAL (1976). Signification taxonomique de
la présence de poils uncinulés chez certains genres de *Phaseo-*
leae et d'*Hedysareae* (Papilionaceae). *Bul.Jard.Bot.Nat.Bel-*
gique 46:419-426.

BELL, E.A. (1971). Comparative biochemistry of non-protein ami-
no acids In: HARBORNE, J.B.; D. BOULTER & B.L. TURNER ed.; *Chemotaxono-*
my of The Leguminosae Academic Press. London.

BENTHAM, G. (1840). De leguminosarum generibus commentationes.
Ann.Wiener.Mus.Naturgesch. 2:61-142.

_____ (1859). Leguminosae in K.F.P. VON MARTIUS, *Flora*
Brasiliensis 15(1):179-187.

_____ & F.J.D. HOOKER (1885). *Genera Plantarum* 1:434-600.

- BLISS, F.A. (1978). Improving the quantity and quality of bean seed protein. A progress report. Univ. of Wisconsin, USA.
- BOULTER, D.; D.A. THURMAN & E. DERBYSHIRE (1967). A disc electrophoretic study of globulin protein of legume seeds with reference to their systematics. *New Phytol.* 66:27-36.
- BOULTER, D.; E. DERBYSHIRE; J. A. FRAHN-LELIVELD & R.M. POLHIL (1970). Observation on the cytology and seed-proteins of various African species of *Crotalaria* L. (Leguminosae). *New Phytol.* 69:117-131.
- BURKART, A. (1944). Tres nuevas leguminosas del Paraguay. *Darwiniana* 6(3):477-493.
- _____ (1952). *Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas*. Acme Agency.
- CARASCO, J.F.; E. DERBYSHIRE & D. BOULTER (1977). Seed protein profile of African representatives of *Vigna* spp.. *Taxon* 26 (5/6):513-516.
- CASEMIR, J. & G. LE MARCHAND (1966). Répartition et importace systématique des acides aminés et des peptides libres des *Phaseolineae*. *Bull.Jard.Bot.Etat.Bruxelles* 36:53-56.
- CHRISPEELS, M.J. & B. BAUNGARTNER (1978). Serological evidence confirming the assignement of *Phaseolus aureus* and *P.mungo* to the genus *Vigna* - *Phytochemistry* 17:125-126.
- DARDENNE, G.A.; P.THONART; E. OTOUL & R.MARÉCHAL (1973). Etude chimiotaxonomique dans les genres *Macrotyloma*, *Dolichos* et *Pseudovigna*. *Phytochemistry* 12:1983-1992.

DERBYSHIRE, E. & D. BOULTER (1976). Isolation of legumin-like - protein from *Phaseolus aureus* and *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*. 15:411-414.

_____; J.N. YARWOOD; E. NEAT & D. BOULTER (1976). Seed proteins of *Phaseolus* and *Vigna*. *New Phytol.* 76:283-288.

DUCKE, A. (1943). As leguminosas da Amazonia brasileira. *Boletim técnico do Instituto Agronômico do Norte* 249:141-155.

EVANS, A.M. (1976). Beans - *Phaseolus* spp. (Leguminosae-Papilionatae) in N.W. Simmonds ed. *Evolution of crop plants*. London.

FAWCETT, A. & A.B. RENDLE (1920). *Flora of Jamaica* 4:62-71. London.

GILLET, J.B. (1971). Leguminosae subfam. Papilionoideae. In *Flora of Tropical East Africa* 1-3. London.

HARBORNE, J.B. (1976). *Phytochemical methods*. Chapman & Hall Ltd. London.

HASSLER, E. (1923). Revisio speciarum austro-americanarum generis *Phaseoli* L.. *Candollea* 1:417-472.

HEPPER, F.N. (1958). Papilionaceae In: *Flora of Tropical West Africa* ed.2 1:505-586. London.

HUTCHINSON, J. (1964). *The genera of flowering plants I*. Oxford University Press.

JOHNSON, B.L.; D. BARNHART & O. HALL (1967). Analysis of genome and species relationships in polyploid wheats by protein electrophoresis. *Amer.J.Bot.* 54:1089.

- JOHNSON, B.L. & M.M. THEIN (1970). Assesment of evolutionary affinities in *Gossypium* by protein electrophoresis. *Amer. J. Bot.* 57:1081-1092.
- KLOZ, J. (1971). Serology of the Leguminosae In: HARBORNE, J.B.; D.BOULTER & B.L.TURNER ed., *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Academic Press. London.
- _____ & E. KLOZOVA (1968). Variability of protein I and II in the seeds of species of the genus *Phaseolus* In: HAWKES, J. G. ed., *Chemotaxonomy and Serotaxonomy*. Academic Press. London.
- _____ ; _____ & V. TURKOVÁ (1966). Chemotaxonomy and genesis of protein with special reference to the genus *Phaseolus*. *Preslia* 38:229-236.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of *Bacteriophage* T4. *Nature* 227:680-685
- LEITÃO FILHO, H.F. (1972). Botânica de *Phaseolus vulgaris* L. e as espécies brasileiras do gênero *Phaseolus* L.. *Ann. Iº Simpósio Brasileiro de feijão* 1:200-237.
- _____ (1974). Contribuição ao estudo taxonômico do gênero *Phaseolus* L. no Brasil. *Bragantia* 33(6):55-63
- LÓWRY, O.H.; N.J. ROSENBROUGH; A.L. FARR & R.J. RANDALL (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- MARÉCHAL, R. & J.C. BAUDET (1974). Combinaisons nouvelles dans le genre *Macroptilium* (Benth.) Urb. (Papilionaceae). *Bull. Jard. Bot. Nat. Belgique* 44:443..

MARÉCHAL, R. & J.C. BAUDET (1977). Combinaisons nouvelles dans le genre *Macroptilium* (Benth.) Urb. (Papilionaceae). *Bull. Jard. Bot. Nat. Belgique* 47:257-265.

_____ ; J.M. MASCHERPA & F. STAINIER (1978a). Étude taxonomique d'un group complexe d'espèce des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et poliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28:1-273.

_____ ; _____ & _____ (1978b). Combinaisons et noms nouveaux dans le genres *Phaseolus*, *Mirkelersia*, *Macroptilium*, *Ramirezella* et *Vigna*. *Taxon* (2/4):199-202.

MCLEESTER, R.C.; T.C. HALL; S.M. SUN & F.A. BLISS (1973). Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*. *Phytochemistry* 2:85-93.

PIPER, C.V. (1926). Studies in american *Phaseolineae*. *Contr. U. S. Nat. Herb.* 22:663-701.

PREAUX & R. LONTIE (1975). The proteins of barley. In: HARBORNE J.B. & G.F. VAN SUMERE ed., *The Chemistry and Biochemistry of plant proteins*. Phytochem. Soc. Symposia Series 11:89-111. Academic Press. London.

PUSZTAI, A. (1966). The isolation of two proteins, glycoprotein I and a trypsin inhibitor from the seed of Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochem. J.* 101:379-384.

PUSZTAI, A. & W.B. WATT, (1970). Glycoprotein II. *Biochem. Biophys. Acta* 207, 413.

- SCHECHTER, Y. & J.M. DE WET (1975). Comparative electrophoresis and isoenzyme analyses of seed protein from races of *Sorghum*. *Amer. J. Bot.* 62:254.
- STAINIER, F. (1974). Contribution à l'étude palynologique des Papilionaceae - Phaseoleae-Phaseolineae. III - Étude de quelques espèces des genres *Phaseolus* L., *Vigna* Savi et *Phytostigma* Balf.. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belgique* 44:1-15.
- _____ (1976). Note sur le pollen de quelques espèces sud-américaines du complexe *Phaseolus* - *Vigna*. *Pollen et Spores* 18(4):523-531.
- SUN, S.M. & T.C. HALL (1975). Solubility characteristics of globulin from *Phaseolus* seeds in regard to their isolation and characterization. *J. Agr. Food Chem.* 23(2):184-189.
- THURMAN, D.A.; D. BOULTER; E. DERBYSHIRE & B.L. TURNER (1967). Electrophoretic mobilities of formic and glutamic dehydrogenases in the Fabaceae: a systematic survey. *New Phytol.* 66:37-45.
- TOURNER, M. (1958). L'ambérique et le mungo ne son pas des *Phaseolus*. *Riz et Riziculture* 4:131-148.
- URBAN, I. (1928). Plantas cubenses novas vel rariores a clo. Er. L. Erkman lectae IV. *Symbol. Antill.* 99:443-543.
- VERDCOURT, B. (1970). Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the Flora of Tropical East Africa IV. *Kew Bull.* 24(3):507-570.

- WEBER, K. & M. OSBORNE (1969). The reability of molecular weight determinations by Dodecyl-Sulfate-Polyacrilamide gel electrophoresis. *Jour. Biol. Chem.* 244(16):4406-4412.
- WEBER, K.; J.R. PRINGLE & M. OSBORNE (1972). Measurement of molecular weight by electrophoresis on SDS-Acrylamide-gel. *Methods Enzymol.* 26c:3-27.
- WILCZEK, R. (1954). Phaseolineae In: *Flore du Congo Belge et du Rwanda-Urundi*. 6:260-409. Bruxelles.
- WISHART, D. (1969). An algorithm for hierarchical classifications *Biometrics* 22:165-170.
- WRIGHT, D.J. & D. BOULTER (1974). Purification and subunit structure of legumin of *Vicia faba* L. (broad bean). *Biochem. J.* 141:413-418.
- ZIEGENFUS, T.T. & R.B. CLARKSON (1971). A comparison of the soluble seed proteins of certain *Acer* species. *Can. J. Bot.* 49(11):1951-1957.