

ELIANA REGINA FORNI MARTINS

Biologista
Seção de Citologia
Instituto Agronômico
Campinas - SP

ESTUDOS CITOTAXONÔMICOS NO COMPLEXO
PHASEOLUS - VIGNA - MACROPTILIUM
(LEGUMINOSAE PAPILIONOIDEAE)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora:
Prof.a Dra. Neusa Diniz da Cruz

Campinas- SP

1984

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este exemplar corresponde a Declaração
fiscal da Tese defendida pela Sr.
Flávia R. F. Martins e Aprovada pelo
comissão julgadora.

Neusa Diniz da Cruz
11/6/84

Aos meus pais

Ao Fernando

À Valéria

Aos meus mestres

AGRADECIMENTOS

À Profa.Dra. Neusa Diniz da Cruz, chefe da Seção de Citologia do Instituto Agronômico de Campinas, pela orientação segura, pela amizade sincera e pelo incentivo nos momentos difíceis.

Ao Prof.Dr. Fernando Roberto Martins, do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais da UNICAMP, pelas sugestões e pelo apoio constante em todos os momentos.

Ao Instituto Agronômico de Campinas, por ter permitido a realização deste trabalho nas dependências da Seção de Citologia e por todas as facilidades concedidas.

Ao Prof.Dr. George J. Shepherd e à Profa.Dra. Luiza S. Kinoshita Gouvêa, do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais, e ao Prof.Dr. Gil M. Felipe, do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, pela leitura crítica e pelas sugestões formuladas.

À Seção de Biologia Aplicada do Instituto de Zootecnia, ao Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT-Colômbia) e às Seções de Leguminosas e de Genética do Instituto Agronômico, pelo fornecimento de sementes utilizadas neste trabalho.

Ao CENARGEN (Centro Nacional de Recursos Genéticos), pela intermediação junto ao CIAT no processo de solicitação de sementes.

Aos funcionários da Seção de Citologia do Instituto Agronômico, Sr. Noé Gonzales Blanco, Sr. Onivaldo Camargo, Sra. Antonia A. M. Ferreira e Srta. Eliete R. B. Dias, pela colaboração efetiva.

Às colegas da Seção de Citologia do Instituto Agrônomico, pela compreensão e pelo convívio amigo.

Aos professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UNICAMP, pelos ensinamentos, pela colaboração e pela amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais Luiz e Izolette, ao meu marido Fernando e a minha filha Valéria, pela paciência, alegria e motivação.

Aos que me premiam com sua amizade, a minha mais profunda gratidão.

CONTEÚDO

	Página
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	IV
RELAÇÃO DE TABELAS.....	V
1) ABSTRACT.....	1
2) RESUMO.....	3
3) INTRODUÇÃO.....	5
4) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
4.1) HISTÓRICO DA TAXONOMIA.....	8
4.2) CITOLOGIA.....	26
4.2.1) O Cariótipo.....	26
4.2.2) Estudos citológicos no gênero <i>Phaseolus</i> (s.l.).....	32
5) MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1) OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES.....	39
5.2) TRATAMENTO TAXONÔMICO.....	39
5.3) TESTE DE TÉCNICA CITOLÓGICA.....	43
5.4) ESTUDOS CITOLÓGICOS.....	47
6) RESULTADOS.....	51
6.1) TAXONOMIA.....	51
6.2) TÉCNICA CITOLÓGICA.....	54
6.3) CITOLOGIA.....	55
7) DISCUSSÃO.....	72
7.1) TÉCNICA CITOLÓGICA.....	72
7.2) CITOTAXONOMIA E EVOLUÇÃO.....	75
8) CONCLUSÕES.....	103
9) LITERATURA CITADA.....	106

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1 - Transferência de seções de <i>Phaseolus</i> (s.l.) para os gêneros <i>Macroptilium</i> e <i>Vigna</i>	21
2 - Ideogramas de espécies de <i>Macroptilium</i> , <i>Phaseolus</i> e <i>Vigna</i>	58
3 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Macroptilium atropurpureum</i>	59
4 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Phaseolus lunatus</i>	59
5 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Vigna unguiculata</i>	59
6 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Macroptilium erythroloma</i> . As setas indicam os cromossomos com satélite.....	59
7 - Célula tetraplóide de <i>Macroptilium atropurpureum</i>	59
8 - Campo de células tetraplóide de <i>Macroptilium atropurpureum</i>	59

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1 - Relação de espécies de <i>Macroptilium</i> , de <i>Phaseolus</i> e de <i>Vigna</i> utilizadas no estudo citológico.....	40
2 - Características distintivas entre os gêneros <i>Phaseolus</i> (P), <i>Macroptilium</i> (M) e <i>Vigna</i> (V).....	52
3 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Macroptilium atropurpureum</i>	60
4 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Macroptilium bracteatum</i>	61
5 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Macroptilium erythroloma</i>	62
6 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Macroptilium lathyroides</i>	63
7 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Phaseolus coccineus</i>	64
8 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Phaseolus lunatus</i>	65
9 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Phaseolus vulgaris</i>	66
10 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Vigna peduncularis</i>	67
11 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Vigna radiata</i>	68
12 - Cromossomos mitóticos metafásicos de <i>Vigna unguiculata</i>	69
13 - Fórmulas cariotípicas de espécies de <i>Macroptilium</i> , <i>Phaseolus</i> e <i>Vigna</i>	70

TABELA	PÁGINA
14 - Valores de comprimento total de cromatina (CTC) e de TF % para espécies dos gêneros <i>Macroptilium</i> , <i>Phaseolus</i> e <i>Vigna</i>	71
15 - Valores de CTC de espécies de <i>Macroptilium</i> , <i>Phaseolus</i> e <i>Vigna</i> , encontrados na literatura.....	77
16 - Valores de TF % em espécies de <i>Macroptilium</i> , <i>Phaseolus</i> e <i>Vigna</i> , segundo a literatura.....	78
17 - Fórmulas cariotípicas de espécies de <i>Macroptilium</i> , <i>Phaseolus</i> e <i>Vigna</i> , segundo diversos autores.....	80

1) ABSTRACT

CYTOTAXONOMIC STUDIES IN THE
Phaseolus - Vigna - Macroptilium complex
 (LEGUMINOSAE PAPILIONOIDEAE)

Cytotaxonomic studies were carried out on ten species of the *Phaseolus-Vigna-Macroptilium* complex (Leguminosae Papilionoideae). The species studied were: *M. atropurpureum*, *M. bracteatum*, *M. erythroloma*, *M. lathyroides*, *P. coccineus*, *P. lunatus*, *P. vulgaris*, *V. peduncularis*, *V. radiata* and *V. unguiculata*. Ideograms karyotypes and karyotype formulae, total chromatin length (TCL) and TF% index, which express the degree of karyotype symmetry, are presented for each species studied. The results obtained showed no agreement with the literature, which is very confused. The possible causes of those discrepancies are discussed, aiming to explain the differences observed. The standard deviation and coefficient of variation of both centromeric index and chromosome length of each chromosome pair were calculated in each species as an estimate of variation. Considering all the data, only 6,8% showed a coefficient of variation which can be considered high (between 20.1 to 30%); the majority showed intermediate values (between 10.1 to 20%). All the karyotypes showed the same number ($2n=22$) and similarities on both chromosome shape and length. However there was some tendency for species of the same genus to group together it was possible to characterise each genus studied through the comparison of TCL and TF% figures. Thus, it seems clear that chromosome data can be used to clarify the ge-

neric delimitation of the *Phaseolus-Vigna-Macroptilium*, complex although statistical analyses were not applied to discuss the significance of the present results.

2) RESUMO

ESTUDOS CITOTAXONÔMICOS NO COMPLEXO

Phaseolus-Vigna - Macroptilium
(LEGUMINOSAE PAPILIONOIDEAE)

Foram realizados estudos citotaxonômicos em dez espécies do complexo *Phaseolus-Vigna-Macroptilium* (Leguminosae Papilionoideae). As espécies estudadas foram: *M.atropurpureum*, *M.bracteatum*, *M. erythroloma*, *M.lathyroides*, *P.coccineus*, *P.lunatus*, *P.vulgaris*, *V.peduncularis*, *V.radiata* e *V.unguiculata*. Ideogramas, cariótipos e fórmulas cariotípicas, comprimento total de cromatina (CTC) e índice TF%, que exprime o grau de simetria cariotípica, são apresentados para cada espécie estudada. Os resultados obtidos mostraram discordância com dados de literatura, esta bastante controvertida. As possíveis causas para essas discrepâncias são discutidas, com o objetivo de explicar as diferenças observadas. Foram calculados o desvio-padrão e o coeficiente de variação, tanto para comprimento cromossômico como para índice centromérico de cada par cromossômico de cada espécie estudada, objetivando avaliar o grau de variação nos resultados obtidos. Considerando todos os valores, apenas 6,8% mostraram coeficientes de variação que podem ser considerados altos (entre 20,1% e 30%); a maior parte mostrou valores intermediários (entre 10,1% a 20%). Todos os cariótipos mostraram o mesmo número ($2n=22$) e semelhança na forma e tamanho de cromossomos. Contudo, existiu alguma tendência a agrupar espécies de um mesmo gênero e de individualizar cada gênero estudado através da comparação

de dados de CTC e TF%. Dessa forma, é possível sugerir a utilidade de dados cromossômicos como subsídio à delimitação taxonômica dos gêneros do complexo *Phaseolus-Vigna-Macroptilium*, embora ainda não tenham sido aplicados testes estatísticos para discutir a significância dos presentes resultados.

3) INTRODUÇÃO

Dentro dos gêneros *Phaseolus* L. e *Vigna* Savî, diversas espécies fornecem grãos que são diretamente utilizáveis pelo homem, contendo alta porcentagem de proteínas e alto valor em calorias (EVANS, 1976). As espécies de *Vigna* são consumidas, principalmente, pelos povos asiáticos. Parece não haver dúvidas de que o feijoeiro comum é a espécie cultivada há mais tempo no continente americano, com base em evidências não só arqueológicas, mas também considerando-se a evolução de um caráter genético pouco afetado pelo meio ambiente, a forma do estigma (LEITÃO FILHO, 1972). Através da datação com carbono marcado, estima-se que *P. vulgaris* L. já era domesticado no Peru por volta de 7.680 AC (EVANS, 1976). Dentre as leguminosas, *Phaseolus* é o gênero que oferece maior número de espécies comestíveis (HEISER JR., 1977). Além de *P. vulgaris*, as demais espécies cultivadas de importância econômica são: *P. coccineus* L. e *P. acutifolius* A. Gray (EVANS, 1980).

As leguminosas em geral também vêm assumindo importância econômica como plantas forrageiras. Embora, nas áreas de clima temperado e de solos ^{neutros} e alcalinos, seu uso se venha desenvolvendo desde os primórdios da civilização, foi somente neste século que começou o desenvolvimento pleno de pastagens com leguminosas nas áreas tropicais, onde as consequências da exploração de pastagens formadas somente de gramíneas já se revelavam catastróficas (ALLAN, 1975). Nesse contexto, novas espécies têm sido pesquisadas para aproveitamento como plantas forrageiras, dentre as quais algumas do gênero *Macroptilium* (Benth.) Urb., notando-se melhores resultados em *M. atropurpureum* (DC.) Urb., vulgarmente conhecido como siratro.

No decorrer dos últimos anos, os gêneros do complexo *Phaseolus-Vigna-Macroptilium* foram submetidos a diversos estudos taxonômicos, sendo seus limites gradativamente estabelecidos. Assim, o gênero *Phaseolus* que, em *sensu lato* (s.l.), compreendia cerca de 200 a 240 espécies, acha-se representado por um número bastante reduzido pela transferência de muitas delas para gêneros próximos. Um deles é *Macroptilium* (Benth.) Urb., formado por espécies antigamente enquadradas em *Phaseolus* L., seção *Macroptilium* Benth., posteriormente elevada a gênero. Um maior número de espécies foi transferido para o gênero *Vigna* Savi, que se viu ampliado e reorganizado em diversas categorias infra-genéricas.

As alterações taxonômicas mencionadas foram inicialmente sugeridas com base em caracteres morfológicos, sendo, posteriormente, corroboradas por estudos complementares na área da qumiotaxonomia e da palinologia.

A citotaxonomia é um outro campo de estudo que poderá fornecer subsídios para a elucidação da posição taxonômica dos gêneros *Phaseolus*, *Vigna* e *Macroptilium*. Embora existam trabalhos sobre citogenética de *Phaseolus* (s.l.), raramente se tem procurado dar um enfoque citotaxonômico às espécies estudadas e, mesmo assim, é pequeno o número de espécies abordadas. Devido ao fato de o número cromossômico em *Phaseolus* (s.l.) ser praticamente constante, a elaboração e a comparação de carióticos parece ser um bom parâmetro para argumentar em relação às mudanças taxonômicas mencionadas anteriormente, no que se refere à passagem de espécies de *Phaseolus* para *Vigna* e *Macroptilium*, além de poder revelar tendências evolutivas, através da análise do total de cromatina e da simetria cariotípica.

O presente estudo tem um caráter citotaxonômico e objetiva:

- a) contribuir para o esclarecimento da posição taxonômica de *Phaseolus*, *Macroptilium* e *Vigna*, através da elaboração e da comparação de cariôtipos de algumas de suas espécies;
- b) sugerir a posição e a relação evolutiva das espécies;
- c) fornecer subsídios para programas de melhoramento genético, sugerindo diferentes graus de afinidade interespecífica, mediante maior ou menor semelhança cariotípica.

4) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1) HISTÓRICO DA TAXONOMIA

O gênero *Phaseolus* foi descrito por LINNÉ , em 1735, na primeira edição de sua obra, "Systemae Naturae" (JACKSON,1895).

Na primeira edição de "Species Plantarum" , LINNÉ (1753) apresentou uma listagem de onze espécies, subdivididas em dois grupos, *Scandentes* e *Erecti*, acompanhadas de uma breve descrição, enquadrando *Phaseolus* na classe Diadelphia, subclasse (ordem) Decandria de seu sistema sexual de classificação. Na segunda edição daquela obra, LINNÉ(1763) aumentou essa listagem para treze espécies. Já na 12^a edição de "Pflanzensystem", LINNÉ (1782) continuou subdividindo o gênero em *Scandentes* e *Erecti* , sendo o primeiro grupo composto por nove espécies e o segundo , por seis.

DE CANDOLLE(1825) confirmou a validade do gênero e dividiu-o em duas seções: *Euphaseolus* DC., com vagem comprimida e *Strophostyles* (Ell.) DC., com vagem cilíndrica. Estabeleceu cinco subgrupos na primeira e dois na segunda seção. Aquele autor reconheceu a autoria de Elliott no gênero *Strophostyles*, quando reduziu o mesmo a uma seção do gênero *Phaseolus*. Contudo a seção *Strophostyles* (Ell.)DC. era composta por 17 espécies, dentre as quais somente 3 foram originalmente incluídas naquele gênero por ELLIOTT(1822). Assim, essa seção passava a abranger espécies americanas e asiáticas ⁽¹⁾.

(1) JACKSON(1995) citou o gênero *Strophostyles* E.Mey., descrito em 1835, representado por uma única espécie africana, *S.capensis*. Contudo, MEYER (1836), ao apresentar essa espécie, a colocou no gênero *Strophostyles* Ell. Atualmente, *S.capensis* está enquadrada no gênero *Vigna* Savi.

BENTHAM(1840) fêz uma sinopse do gênero *Phaseolus*, enquadrando-o na tribo Phaseoleae Benth., subtribo Euphaseoleae Benth., diferenciando-o de outros gêneros próximos pela quilha espiralada. Citou 85 espécies, distribuídas em sete seções: *Drepanospron* Benth., *Euphaseolus* DC. emend. Benth., *Leptospron* Benth., *Strophostyles* (Ell.) DC. emend. Benth., *Lasiospron* Benth., *Microcochle* Benth., *Macroptilium* Benth. (2). Essas seções foram diferenciadas por uma análise global de várias características, como a forma dos lacínios do cálice e a das vagens. Algumas seções podem ser mais prontamente reconhecidas, como:

1) *Drepanospron*, que era a única dessas seções para a qual BENTHAM(1840) mencionou a existência de frutos alargados e falcados, ao contrário das outras, para as quais mencionou frutos lineares, podendo, então, ser cilíndricos ou comprimidos;

2) *Macroptilium*, que se caracterizava por alas muito maiores do que o vexilo;

3) *Strophostyles*, que tinha estípulas prolongadas abaixo do seu ponto de inserção (estípulas recorrentes).

Mais tarde, BENTHAM(1859) fêz uma monografia do gênero *Phaseolus*, reconhecendo, desta vez apenas três seções: *Strophostyles* (Ell.) DC. emend. Benth. e *Macroptilium* Benth., ambas distintas pelas mesmas características apresentadas em 1840, e *Euphaseolus* DC. emend. Benth., onde incluiu as espécies das antigas seções *Drepanospron* e *Leptospron*. *Euphaseolus* caracterizava-se, então, pelas estípulas não recorrentes e pelas alas pouco mai

(2) A autoria das seções não segue a dos autores dos trabalhos mencionados na presente revisão, tendo sido modificada de acordo com o artigo 51 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (STAFLEU *et col.*, 1972).

cores do que o vexilo. Nessa monografia, Bentham incluiu uma espécie da seção *Lasiospron* Benth. (BENTHAM, 1840) na seção *Strophostyles* (Ell.) DC. emend. Benth., não fazendo nenhuma referência às espécies enquadradas na seção *Microcochle* Benth. (BENTHAM, 1840).

Posteriormente, BENTHAM (1862) reconsiderou a validade de de cinco seções já citadas nos trabalhos anteriores: *Leptospron* Benth., *Strophostyles* (Ell.) DC. emend. Benth. e *Macroptilium* Benth., porém adicionou uma nova seção, *Dysolobium* Benth., diferenciando-a das demais pela quilha pouco espiralada e pelas vagens septadas internamente. Contudo, ficou notório o estado de dúvida do autor em colocar este último grupo no gênero *Phaseolus*. Mais tarde, *Dysolobium* foi elevado por PRAIN (1897) à categoria de um gênero distinto.

HASSLER (1923) revisou 21 espécies sul-americanas do gênero *Phaseolus*. Baseando-se na caracterização genérica de BENTHAM (1862), reconheceu as cinco seções criadas por este último autor, apresentando uma chave de classificação para reconhecimento das mesmas. Esquemáticamente, as seções podem ser assim caracterizadas:

- estípulas recorrentes: *Strophostyles* (Ell.) DC. emend. Benth.
- alas bem maiores do que o vexilo: *Macroptilium* Benth. emend. Hassler
- lobos do cálice em número inferior a 3: *Leptospron* Benth.
- vagem reta ou subfalcada: *Euphaseolus* DC. emend. Benth.
- vagem falcada ou anciforme: *Drepanospron* Benth.

Algumas dessas seções foram subdivididas em séries e subséries. Seu sistema é considerado apenas um melhoramento do trabalho inicial de Bentham (VERDCOURT, 1970).

PIPER (1926) conceituou a subtribo Phaseolineae Pip., abrangendo 12 gênero americanos, caracterizados pelo pedúnculo nodoso com glândulas pedicelares e pelo estilete barbado. *Phaseolus* foi considerado o gênero mais importante e complexo nesse grupo. Diferenciava-se, então, dos demais pela quilha espiralada ou encurvada, pelos lobos calicíneos nem todos maiores do que o tubo do cálice e pela presença de bractéolas. Aquele autor estabeleceu para o gênero *Phaseolus* oito seções: *Sigmoidotropis* Pip., *Ceratotropis* Pip., *Cochlianthus* Pip., *Lasiospron* Benth. emend. Pip., *Macroptilium* Benth., *Microcochle* Benth. emend. Pip., *Leptospron* Benth. e *Euphaseolus* DC. emend. Pip. Mesmo reconhecendo as seções criadas por BENTHAM (1840), aquele autor considerou que as diferenças entre quilha curvada e quilha espiralada pareciam ser de maior significância na separação das seções do gênero *Phaseolus* do que características do cálice.

A nova seção *Sigmoidotropis* Pip. era, então representada por um grupo de espécies desmembrado da seção *Euphaseolus* Benth. e passou a ser a única seção do gênero *Phaseolus* a apresentar a quilha frouxamente encurvada, em forma de "S". PIPER (1926) chegou a sugerir a elevação dessa seção a gênero.

A nova seção *Ceratotropis* Pip. englobava um grupo natural de plantas orientais, com flores amarelas ou amareladas. Aquelas espécies estavam incluídas na seção *Strophostyles* (Ell.) Benth., que, como já dito, abrangia, além dessas espécies asiáticas, um outro grupo, americano, já estudado por ELLIOTT (1822).

Este último grupo de espécies, que constituía o gênero *Strophostyles* Ell., foi novamente conduzido à categoria de gênero no trabalho de PIPER(1926).

As seções *Ceratotropis* Pip. e *Lasiospron* Benth. emend. Pip. tinham como caráter comum estípulas recorrentes.

A nova seção *Cochliasanthus* Pip., embora com apenas duas espécies, foi diferenciada por PIPER (1926) por apresentar a quilha com o maior grau de espiralização dentro do gênero, ao redor de cinco a sete voltas.

A seção *Microcochle* Benth. caracterizava-se por apresentar flores pequenas, tendo os dentes do cálice subiguais, do mesmo tamanho ou maiores do que o tubo calicinal.

As espécies da seção *Drepanospron* Benth. foram incluídas na seção *Euphaseolus* Benth. por PIPER (1926).

A conceituação do gênero *Phaseolus* e a delimitação de suas seções conforme PIPER(1926) continuaram a ser aceitas e confirmadas por alguns autores. Um deles foi BURKART(1952), que apresentou 13 espécies de *Phaseolus* em seu estudo sobre as leguminosas argentinas.

LEITÃO FILHO(1972) apresentou um estudo botânico sobre o feijoeiro no Brasil. Posteriormente, LEITÃO FILHO(1974) analisou a situação taxonômica do gênero *Phaseolus*. Selecionou caracteres primários e secundários, nos quais baseou a divisão de suas seções. Considerou como caracteres primários a forma da quilha e a posição do estigma e, como secundários, a dimensão das flores, a presença de apêndices na quilha, a posição das estípulas e a forma do cálice. Com base nesses caracteres, elaborou uma chave para a determinação das seções, em número de sete, havendo grande semelhança com a divisão proposta por PIPER(1926).

A única diferença consistiu na redução da seção *Leptospron* Benth. à sinonímia de *Euphaseolus* Benth., por considerar insuficientes os caracteres utilizados por PIPER(1926) para defini-la (LEITÃO FILHO,1974).

Vários autores sugeriram alterações mais profundas na classificação básica de PIPER(1926), com proposições de passagem de espécies e de seções de *Phaseolus* a outros gêneros. Estes gêneros foram principalmente, *Vigna* e *Macroptilium*.

Com relação a *Vigna*, alguns trabalhos sugeriram a passagem de algumas espécies de *Phaseolus* do Velho Mundo para esse gênero. Ainda em outros casos, algumas espécies de *Phaseolus* foram transferidas para gêneros novos e pequenos, porém posteriormente, outros autores verificaram a semelhança entre estes e *Vigna* que, ao final, acabou prevalecendo sobre os demais. VERDCOURT (1970) apresentou uma revisão bibliográfica sobre diversos trabalhos enfocando o desmembramento e a transferência de espécies de *Phaseolus* para *Vigna* ou gêneros afins.

Com relação a *Macroptilium*, URBAN(1928) foi o primeiro autor a sugerir seu desmembramento de *Phaseolus*, elevando-o à categoria de gênero. Reconheceu a semelhança entre aqueles dois grupos, porém separou o primeiro por apresentar unguícula na ala e por ter a parte inferior da quilha adnada ao tubo estaminal.

Os problemas de distinção entre *Phaseolus*, *Vigna* e *Macroptilium* foram novamente investigados por VERDCOURT(1970), com base numa série de evidências não só morfológicas, mas também palinológicas e bioquímicas, estas através de eletroforese de amino-ácidos e outros componentes químicos.

VERDCOURT (1970) confirmou a validade do gênero *Macroptilium* (Benth.) Urb., porém aí colocou as espécies da seção *Microcochle* Benth. Basicamente, esta diferia da antiga seção *Macroptilium* Benth. senso PIPER (1926) apenas pelo formato do cálice. Este foi descrito como subtubular em *Macroptilium* Benth. e como campanulado em *Microcochle* Benth. Assim, o gênero *Macroptilium* ficou representado por espécies que tinham como características principais: ápice do estilete curvado em ângulo reto, lembrando um gancho quadrado; estípulas não recorrentes; alas arredondadas, maiores do que o estandarte e a quilha; unhas das alas e da quilha longas e parcialmente adnadas ao tubo estaminal; grãos de pólen de reticulação fina.

VERDCOURT (1970) reteve no gênero *Phaseolus* apenas as espécies da seção *Phaseolus* senso BENTHAM (1862), onde incluiu as seções *Drepanospron* Benth. e *Leptospron* Benth. Portanto, o gênero *Phaseolus* ficou, então, representado por espécies que, em geral, possuíam estilete e quilha torcidos em mais de 360°; estípulas não recorrentes; estandarte com um entalhe na unha e sem apêndices; grãos de pólen sem escultura evidente ou com reticulação muito fina.

Com relação às demais antigas seções de *Phaseolus* de PIPER (1926), VERDCOURT (1970) efetuou as seguintes alterações : *Ceratotropis* Pip., *Sigmoidotropis* Pip. e *Cochlianthus* Pip. passaram a subgêneros de *Vigna*, enquanto a seção *Lasiospron* Benth. emend. Pip. foi transferida como seção do subgênero *Vigna* do gênero *Vigna*. Essas alterações foram fundamentadas na presença das seguintes características morfológicas: estípulas recorrentes; quilha gibosa; reticulação do pólen largamente aberta (VERDCOURT, 1971).

Ao final do trabalho, VERDCOURT(1970) apresentou uma chave para a identificação de táxons infragenéricos de *Vigna*, de *Phaseolus*, de *Macroptilium* e de gêneros próximos.

Baseando-se em seu trabalho de 1970, VERDCOURT(1971) estimou um número aproximado de 50 espécies para o gênero *Phaseolus*, número que, anteriormente às mudanças apresentadas, estava entre 150 a 200.

Outros trabalhos parecem corroborar as proposições de VERDCOURT(1970). Um deles é o de BAUDET(1972), que estudou características epidérmicas de 36 espécies dos gêneros *Phaseolus*, *Vigna* e *Macroptilium*. Como generalização, obteve que *Phaseolus* era o único dos gêneros a apresentar pêlos uncinados. Essa característica foi re-investigada por BAUDET & MARÉCHAL(1976) em 62 gêneros de Phaseoleae e Hedyzareae e mostrou ser bastante estável na definição e separação de *Phaseolus* e gênero aparentados.

BAUDET(1974) ainda estudou vários caracteres morfológicos de plântulas de diversos gêneros de Phaseoleae, verificando a inconstância de alguns daqueles caracteres em certos táxons examinados. Encontrou, contudo, uma tendência dentro de cada gênero, que o autor considerou significativa para sua distinção. Assim, por exemplo, a ocorrência do pecíolo completo em folhas primárias apenas não foi observada em uma única espécie de *Phaseolus*, dentre as 13 examinadas. Germinação do tipo epigeal foi observada em 4 dentre as 5 espécies estudadas de *Macroptilium* e a hipogeal, em 14 dentre as 15 espécies estudadas de *Vigna*, subgênero *Vigna*, seção *Vigna*.

MARÉCHAL *et alii* (1978) fizeram um estudo de análise numérica do complexo *Phaseolus-Vigna* e gêneros próximos. Utilizaram-se de todos os caracteres conhecidos para a distinção dos

gêneros e, ao final, aceitaram as divisões propostas por VERDCOURT (1970), com algumas modificações. O gênero *Phaseolus* seria bastante homogêneo e distinguível de outros por uma série de caracteres estáveis, como: estípulas não recorrentes; presença de pêlos uncinados; brácteas florais persistentes, pelo menos, até a ântese; ausência de nós dilatados e de glândulas extraflorais sobre a raque da inflorescência; estilete simétrico e espiralado (1,5 a 2 voltas) e caduco; vagens não septadas.

Para aqueles autores, o gênero *Phaseolus* teria uma delimitação e uma subdivisão diferentes da apresentada por VERDCOURT (1970). Segundo MARÉCHAL *et alii* (1978), o gênero *Phaseolus* ficaria constituído por três seções: *Phaseolus* (onde incluíram a seção *Drepanospron* Benth.) e duas novas seções, *Alepido calyx* (Pip.) Maréchal, Mascherpa et Stainier e *Minkelersia* (Mart. et Galeotti) Maréchal, Mascherpa et Stainier⁽³⁾. As três seções de *Phaseolus* foram diferenciadas com base na análise global de vários caracteres, como presença ou ausência de bractéolas, relação entre o comprimento do pedicelo e o do cálice, e entre o dos lobos do cálice e o do tubo calicínico, além do tamanho da unguícula do estandarte.

MARÉCHAL *et alii* (1978) também aceitaram a validade do gênero *Macroptilium* (Benth.) Urb., agora englobando duas antigas seções do gênero *Phaseolus*: *Macroptilium* Benth. e *Microcochle* Pip. Esses autores reconheceram inúmeros caracteres comuns a *Phaseolus* e a *Macroptilium*, porém este último distinguia-se do primeiro pela ausência de pêlos uncinados, pela não persistência

(3) É de assinalar-se que essas duas últimas seções foram tratadas como gêneros distintos por PIPER (1926), o qual notou várias semelhanças entre eles e *Phaseolus* L., em especial a quilha espiralada ou curvada.

das brácteas, pelo menor comprimento dos pedicelos e pelo tipo de curvatura da quilha e do estilete, diferente de uma espiral.

Aqueles autores confirmaram a transferência das antigas seções *Ceratotropis* (Pip.) Verdc., *Sigmoidotropis* (Pip.) Verdc. e *Lasiospron* Benth. emend. Pip. para o gênero *Vigna*, todas em nível de subgênero. Esses autores efetuaram algumas alterações na situação apresentada por VERDCOURT (1970) para as duas últimas seções, que passaram a ser denominadas *Sigmoidotropis* (Pip.) Verdc. emend. Maréchal, Mascherpa et Stainier e *Lasiospron* (Benth. emend. Pip.) Maréchal, Mascherpa et Stainier.

Segundo MARÉCHAL *et alii* (1978), *Sigmoidotropis* seria um subgênero grande, sendo constituído por cinco seções: *Sigmoidotropis* Pip., *Caracallae* (DC.) Maréchal, Mascherpa et Stainier, *Peduncularis* Maréchal, Mascherpa et Stainier, *Condyllostyles* (Pip.) Maréchal, Mascherpa et Stainier e *Leptospron* (Benth.) Maréchal, Mascherpa et Stainier. Essa nova seção, *Caracallae*, corresponde ao antigo subgênero *Cochliasanthus* (Pip.) Verdc., apresentado por VERDCOURT (1970).

No total, segundo a conceituação apresentada por MARÉCHAL *et alii* (1978), o gênero *Vigna* seria subdividido em 7 subgêneros, ou seja, os subgêneros *Vigna*, *Plectotropis*, *Haydonia*, *Macrorhynchus*, *Ceratotropis*, *Lasiospron* e *Sigmoidotropis*. O gênero apresenta uma série de caracteres distintivos, como ausência de pêlos uncinados; brácteas florais caducas; eixos secundários das inflorescências reduzidos a duas protuberâncias glandulosas; nunca mais de duas flores por nodosidade, pedicelo espesso, mais curto ou do mesmo comprimento que o cálice; pétalas subiguais quanto ao comprimento; estilete caduco; vagens lineares, não septadas. Contudo, essas características não isolam

por completo o gênero *Vigna*, pois muitas delas ocorrem em pequenos gêneros próximos. A particularidade de *Vigna* seria combinar as características seguintes: estípulas recorrentes, auriculadas ou esporadas na base; eixo da inflorescência contraído; estigma subterminal; pólen tricolporado, possuindo exina que forma uma rede de malhas largas. Dentre os 7 subgêneros, essa combinação de características seria completa apenas para as espécies de *Plectotropis* e de *Cerototropis*.

FEVEREIRO(1979) fez um estudo sobre as espécies brasileiras do gênero *Macroptilium* (Benth.) Urb.. Essa autora dividiu o gênero em duas seções: *Macroptilium* (Benth.) Urb. e *Microcochle* (Benth.) Fervereiro. VERDCOURT(1970) já havia sugerido tal subdivisão, porém, na realidade, não chegou a efetivá-la. Aquela autora escolheu como caráter distintivo entre as duas seções a direção dos prolongamentos dos calos do vexilo.

SUBRAMANIAN(1979) analisou uma série de características morfológicas em espécies desses 3 gêneros, objetivando elucidar as interrelações entre eles. Nesse estudo, distribuiu as espécies em grupos denominados "bean group", "mungbean group", *Vigna proper* e *Macroptilium*. A forma e o tamanho das folhas primárias, características epidérmicas e morfológicas do pólen mostraram-se constantes em cada um deles, sendo, então, utilizados para tentar individualizar cada gênero.

SUBRAMANIAN(1979) verificou que as folhas primárias de "*Vigna proper*" e "mungbean group" são sésseis, de forma, no geral, ovado-lanceoladas a lanceoladas, enquanto as de *Macroptilium* e "bean group" são pecioladas, sendo mais ou menos reniformes no primeiro grupo e cordadas no segundo. No que se refere ao estudo da epiderme, *Macroptilium*, "*Vigna proper*" e "mungbean

"group" têm pêlos epidérmicos longos e eretos, enquanto "bean group" apresenta, além destes, também pêlos uncinados. Ainda neste ítem, em "*Vigna proper*" e "mungbean group" as células subsidiárias são menores que as células adjacentes, porém em *Macroptilium* e em "bean group" essa diferença não é significativa. O estudo comparativo de grãos de pólen confirmou os resultados já apresentados por outros autores, mostrando que em "*Macroptilium*" e em "bean group" a exina é fina e que em "*Vigna proper*" e "mungbean group" esta é largamente reticulada. Com base nos resultados apresentados acima, SUBRAMANIAN (1979) confirmou a proposição de VERDCOURT (1970), ao afirmar que as espécies de "mungbean group" estão intimamente relacionadas ao gênero *Vigna*, pois estas pertencem àquelas seções que foram transferidas de *Phaseolus* a *Vigna* por VERDCOURT (1970). Além disso, SUBRAMANIAN (1979) concluiu que *Macroptilium* é mais próximo a *Phaseolus*, formando um grupo intermediário entre *Vigna* e *Phaseolus*.

MARÉCHAL *et alii* (1981) rerepresentaram e confirmaram o resultado do estudo taxonométrico do complexo *Phaseolus-Vigna* e de gêneros aparentados, ressaltando o caráter bastante homogêneo de *Phaseolus* após a exclusão das diversas seções. Por outro lado, aqueles autores confirmaram o caráter amplo e heterogêneo de *Vigna*, mencionando, contudo, que esses diferentes grupos de *Vigna* pareciam apresentar maiores afinidades filogenéticas entre si do que com *Phaseolus*.

Dessa maneira, após as mudanças conceituais feitas por diversos autores, o gênero *Phaseolus* parece compreender um agrupamento bem mais natural do que anteriormente. Na FIGURA 1 são apresentados os trabalhos mais representativos a respeito das de-

limitações genéricas de *Phaseolus*, podendo-se visualizar, de forma esquemática, a transferência de seções para os gêneros *Macroptilium* e *Vigna*; pode-se perceber a individualização do gênero *Macroptilium* e a ampliação do gênero *Vigna* através da incorporação de antigas seções de *Phaseolus* sensu PIPER (1926).

Dentre os diversos sistemas de classificação para os gêneros do complexo *Phaseolus-Vigna-Macroptilium* e para seus táxons infragenéricos, as delimitações apresentadas por MARÉCHAL *et alii* (1978) parecem poder ser consideradas como as mais apropriadas e completas, uma vez que ponderam todos os caracteres disponíveis. Contudo, normalmente seria necessário recorrer a outras obras da literatura para chegar-se a determinações específicas, uma vez que, tanto no trabalho de MARÉCHAL *et alii* (1978) como no de VERDCOURT (1970), não são apresentadas a descrição das espécies, nem chaves para sua identificação.

Paralelamente à taxonomia clássica, vêm sendo desenvolvidos estudos na área de quimiotaxonomia e de palinologia em espécies do complexo *Phaseolus-Macroptilium-Vigna*, com o objetivo de fornecer informações complementares para esclarecimento das bases taxonômicas desses gêneros.

Dentre os compostos químicos de maior interesse para estudos quimiotaxonômicos, aqueles pertencentes ao grupo das substâncias macromoleculares, como proteínas, por exemplo, são os mais utilizados, por serem universalmente distribuídos e por parecer existir similaridade protéica entre espécies botanicamente próximas (MICHELIN-RAMOS, 1980).

MICHELIN-RAMOS (1980) apresentou uma revisão sobre diversos trabalhos enfocando a análise e a extração de proteínas

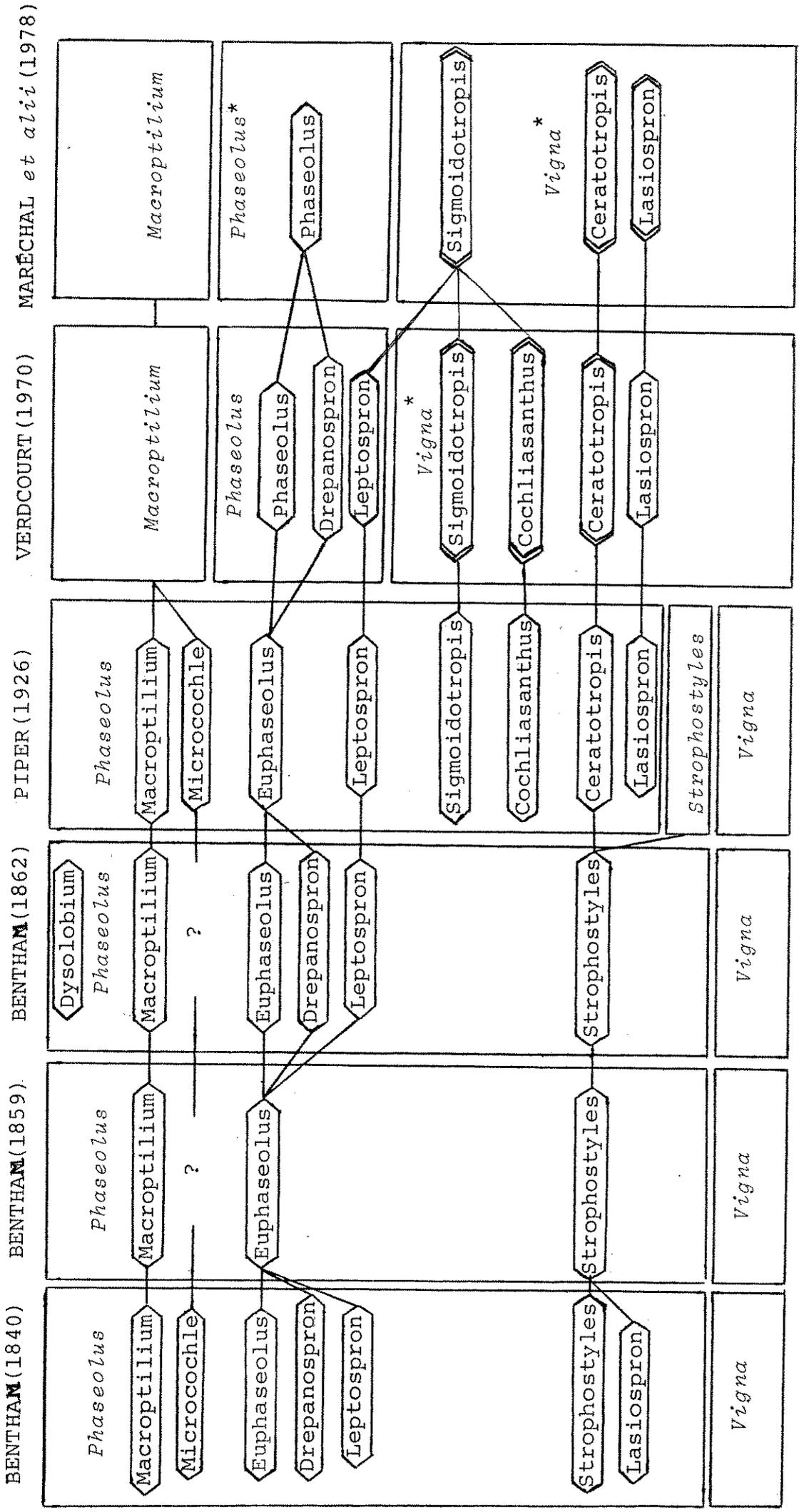


Figura 1 - Transferência de seções de *Phaseolus* (s.l.) para os gêneros *Macroptilium* e *Vigna*. Modificada de MICHELIN-RAMOS (1980). Os gêneros assimilados com * possuem maior número de subdivisões do que o indicado na figura.

Legenda: Seção Subgênero Gênero

em sementes de diversas espécies de *Phaseolus* (s.l.); contudo, a autora constatou a escassez de estudos quimiotaxonômicos no gênero, sendo utilizada, em geral, a comparação de pequeno número de espécies.

CASEMIR & MARCHAND (1966) estudaram a ocorrência de ácidos-aminados e de peptídeos livres em vários gêneros de Phaseolineae, como *Phaseolus*, *Macroptilium*, *Lablab*, *Dolichos*, *Vigna* e algumas espécies de *Phaseolus* duvidosas. Como generalidade, puderam mencionar que *Macroptilium*, pela ausência de asparagina e presença de P_3 , foi perfeitamente distinguível de *Phaseolus* e dos outros gêneros. (4) Da mesma forma, *Vigna* se distinguiu pela ausência de ácido piperônico. O agrupamento de espécies nos gêneros *Phaseolus*, *Macroptilium* e *Vigna* está de acordo com a nova proposição taxonômica que seria apresentada por VERDCOURT (1970) nos anos seguintes, com base em caracteres morfológicos, bioquímicos e palinológicos.

BOULTER *et alii* (1967) extraíram globulinas de sementes de algumas espécies de Leguminosae e as submetteram a eletroforese de disco. Algumas tribos foram caracterizadas por distintivos padrões de bandas protéicas. Dentre as espécies de Phaseoleae, quatro bandas foram encontradas. Contudo, mediante cuidadoso exame, vários grupos foram identificados. Um deles englobava espécies dos gêneros *Phaseolus* e *Vigna* propriamente ditos, além de *P. aureus* e *P. calcaratus* que, como visto nos tratamentos taxonômicos modernos, foram transferidos para *Vigna*. Num outro

(4) P_3 é um índice que representa uma estimativa semiquantitativa de aminoácidos livres. Na análise, os índices variaram de 1 a 5, sendo que P_5 representava a concentração mais alta de aminoácidos livres.

grupo foram colocados *P. atropurpureus* e *P. semierectus*, hoje reconhecimento pertencentes ao gênero *Macroptilium*. Assim, embora o número de espécies estudadas seja pequeno, parece ser possível separar os gêneros *Phaseolus* e *Vigna* em relação a *Macroptilium*.

THURMAN *et alii* (1967) estudaram a mobilidade eletroforética das desidrogenases glutâmica e fórmica em espécies de Fabaceae. Na tribo Phaseoleae foram obtidos três grupos distintos, de acordo com o padrão de bandas obtido para as espécies. Num primeiro grupo encontram-se espécies de *Vigna* e de *Phaseolus* propriamente ditos, além de *P. aureus* e *P. calcaratus*, hoje transferidos para *Vigna*. No segundo grupo encontra-se *P. semierectus*, transferido para o gênero *Macroptilium*. Contudo, no terceiro grupo acha-se a espécie *P. angularis*, também pertencente ao gênero *Vigna*. Desse modo, só a ampliação do número de espécies estudadas poderá fornecer maiores informações para delimitação dos gêneros *Phaseolus*, *Macroptilium* e *Vigna*.

DERBYHIRE *et alii* (1976a) determinaram o padrão de bandas protéicas e o potencial de aglutinação de extratos de sementes com relação ao grupo 0 de células sanguíneas humanas em 15 espécies de *Phaseolus* e *Vigna*. Dentre as seis espécies atualmente consideradas como *Phaseolus sensu stricto*, verificaram a presença da glicoproteína II como a maior proteína de sementes apenas em *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* e *P. dumosus*, mas não em *P. lunatus* e *P. filiformis*. Com exceção das espécies citadas acima, essa glicoproteína II foi detectada apenas em *P. atropurpureus* e *P. lathyroides*, integrantes da antiga seção *Macroptilium* Benth. que também se caracterizaram por possuir um padrão de globulinas diferentes do das outras espécies examinadas e pela capacidade lítica de seus extratos salinos em células sanguíneas vermelhas. As-

sim, os resultados de DERBYSHIRE *et alii* (1976a) coincidiram com as novas proposições taxonômicas apresentadas por VERDCOURT (1970).

Da mesma forma podem ser considerados os resultados apresentados por KLOZ (1971) sobre estudos serológicos no gênero *Phaseolus* (*sensu lato*). Aquele autor apresentou uma ampla listagem sobre tais estudos e mostrou a validade do uso de dados protéicos para caracterizar grupos de espécies relacionadas.

CHRISPEELS & BAUMGARTNER (1978) analisaram a atividade endopeptidásica em extratos de cotilédones de 11 espécies de *Phaseolus* e *Vigna*. Verificaram como generalidade, em 4 espécies de *Vigna* e também em *P. aureus*, *P. mungo* e *P. adenanthus*, que a atividade daquela enzima era inibida pela reação cruzada entre anticorpos contra a proteína isolada de cotilédones de plântulas de *P. aureus*. Além disso, testes de imunodifusão provaram que a protease de *Vigna* é distinta da de *Phaseolus*. Assim, com base nesses dados serotaxonômicos e em sugestões de cunho taxonômico, CHRISPEELS & BAUMGARTNER (1978) confirmaram a transferência das espécies *P. aureus* e *P. mungo* para o gênero *Vigna*, que passaram a ser denominadas de *V. radiata* e *V. mungo*. Com relação a *P. adenanthus*, concluíram que essa espécie é mais proximamente relacionada a *Vigna* do que a *Phaseolus*.

MICHELIN-RAMOS & SHEPHERD (1979), analisando o padrão eletroforético de subunidades protéicas em sementes de várias espécies de *Phaseolus* (s.l.), corroboraram a validade do gênero *Macroptilium*. Dando prosseguimento a esse trabalho, MICHELIN-RAMOS (1980) confirmou tal resultado, mencionando também a maior proximidade da seção *Ceratotropis* Pip. com o gênero *Vigna* do que com *Phaseolus*. O mesmo estudo ainda apresentou as seções *Sigmoidotropis* Pip. e *Leptospron* Pip. como grupos intermediários entre *Pha*

Phaseolus e *Vigna*.

No que se refere à palinologia, como já mencionado anteriormente nessa revisão, diversos autores basearam-se em características morfológicas de grãos de pólen para delimitar os gêneros *Phaseolus*, *Macroptilium* e *Vigna*, como VERDCOURT (1970) *et alii* (1978) e SUBRAMANIAN (1979). Contudo a generalização dos resultados obtidos foi feita considerando-se também diversos outros trabalhos no assunto, como os de TAYLOR (1966), STAINIER (1974, 1976) e MAKINO (1978). Assim, em *Phaseolus* e *Macroptilium* os grãos de pólen possuem exina com reticulação fina, enquanto em *Vigna* esta se apresenta largamente aberta.

Também foram desenvolvidos estudos palinológicos a nível de microscopia eletrônica em algumas espécies do complexo *Phaseolus-Vigna* por STAINIER & HORVAT (1978a, 1978b) e HORVAT & STAINIER (1979, 1980). Baseando-se em resultados obtidos paulatinamente em alguns desses trabalhos, MARÉCHAL (1982) confirmou a distinção entre *Phaseolus* e *Vigna*, observando-se a camada infractum da exina como sendo do tipo columelar e granular, respectivamente. A natureza granular dessa camada pode ser considerada praticamente constante no gênero *Vigna* com exceção, em parte do subgênero *Sigmoidotropis* (onde observou-se estrutura columelar em 3 seções e intermediária em outras 2) e de todo o subgênero *Macrorynchus*. Baseando-se nessa característica e também em análise de correlação, MARÉCHAL (1982) admite que somente o subgênero *Macrorynchus*, que é composto por 3 espécies, seja elevado a nível genérico, conservando os demais 6 subgêneros como constituintes do gênero *Vigna*.

4.2) CITOLOGIA

4.2.1) O cariótipo

O cariótipo foi redefinido por Lewitsky, em 1924 , como a aparência fenotípica de cromossomos somáticos, em contraste com seu conteúdo gênico (STEBBINS,1951) Mais tarde STEBBINS (1971) considerou o cariótipo como sendo o aspecto morfológico do complemento cromossômico como é visto na metáfase mitótica. Atualmente, o conceito de cariótipo é mais amplo, sendo aplicado ao conjunto de caracteres observados no complemento cromossômico de uma espécie, considerando todos os elementos marcadores possíveis, capazes de permitir o mais alto grau de especificação do endofenótipo (GUERRA FILHO,1975). É parte do endofenótipo, mostrando variações comparáveis à morfologia externa dos organismos, podendo, em alguns casos, caracterizar um táxon, como uma espécie ou raça (GRANT,1975). O termo ideograma é aplicado à representação diagramática do cariótipo (STEBBINS,1951). Assim, a elaboração e comparação de cariótipos constituem-se ferramentas auxiliares a resolução de problemas taxonômicos.

Estudos citotaxonômicos foram particularmente bem sucedidos em Gramineae, onde a comparação de cariótipos ente gêneros, ao lado do estudo da anatomia de folhas, desenvolvimento de plântulas, estrutura de grãos de pólen e distribuição geográfica, permitiu a Avdulov, em 1931, sugerir uma reorganização das tribos dessa família, principalmente Festucae, Agrostidae e Phalaridae, refetindo maior afinidade genética e evolutiva do que no sistema tradicional (STEBBINS,1956). TATEOKA (1960) apresen -

“ tou uma extensa revisão bibliográfica mostrando a incorporação de dados citológicos na sistemática de Gramineae.

A ordem Liliales exemplifica um outro caso bastante conhecido de utilização de cariótipos para caracterização de grupos taxonômicos, verificando-se concordância perfeita entre as características cromossômicas e as de distribuição geográfica, de ecologia e de biologia floral das numerosas espécies aí enquadradas. Na tribo Aloinae da família Agavaceae, reunindo como gêneros principais, *Aloe*, *Gasteria* e *Haworthia*, as espécies são todas africanas, com folhas suculentas e flores tubulosas vermelhas ou amarelas, polinizadas por pássaros. Todos os representantes dessa tribo têm como cariótipo básico sete pares cromossômicos, sendo três longos e acrocêntricos e quatro pares menores. A outra tribo tem como gêneros representativos *Yucca*, *Agave* e *Furcraea*, que ocorrem no deserto do México e no sudeste dos Estados Unidos, sendo, na sua maioria, plantas rosetadas com folhas providas de espinhos. Suas espécies têm trinta pares de cromossomos como cariótipo básico, dos quais cinco são de tamanho médio a grande e fortemente acrocêntricos, enquanto os outros 25 pares são bastante pequenos (STEBBINS, 1971).

Contudo, nem sempre comparações de cariótipos confirmam posições taxonômicas, mesmo que estas se baseiem numa série de características morfológicas. Como exemplo, pode citar-se o estudo de Matthei (1975, *apud* SCHIFINO-SAMPAIO, 1979) e de SCHIFINO SAMPAIO (1979) no complexo *Briza* (Gramineae). O primeiro autor sugeriu a subdivisão desse complexo em vários gêneros, apoiado em dados anatômicos, morfológicos, de distribuição geográfica e de números cromossômicos. Contudo, o segundo autor, após estudo de 19 espécies do complexo, envolvendo a comparação de cariótipos

e de quantidade de DNA nuclear, não encontrou indícios que apoias sem aquelas proposições.

Dessa forma, deve ter-se em mente que a comparação de cariótipos nem sempre permite a delimitação de determinados grupos taxonômicos. Assim como nos gêneros *Colchicum* (FEINBRUN, 1958) e *Salvia* (HAQUE & GHOSHAL, 1980) há variação no cariótipo de suas respectivas espécies, não se observando constância de números cromossômicos, em outros grupos, como nos gêneros *Paeonia* (STEBBINS, 1938), *Solidago* (KAPOOR, 1977) e *Tulipa* (SOUTHERN, 1967), as espécies têm cariótipos extremamente semelhantes, de forma que não podem ser utilizados como caracteres distintos entre eles.

Assim, critérios citotaxonômicos devem ser utilizada dos de uma maneira bastante crítica e sempre em conjunto com outros caracteres, não devendo, portanto, serem valorizados a - traves da utilização isolada (STEBBINS, 1971). Além disso, frequente mente observa-se variações cariotípicas, numa mesma espécie, popu lação ou indivíduo, às quais podem ser atribuídas a diversos fatores.

Diversos autores preocuparam-se em estabelecer os possíveis fatores responsáveis por variações na elaboração de cariótipos. BAJER (1959) observou que cromossomos homólogos podem ter comprimentos diferentes, em células diferentes ou numa mesma célula, em estágios correspondentes da mitose.

Segundo MATÉRN & SIMAK (1968), a variação no comprim ento cromossômico é causada mais por artefatos de técnica do que por variação genética.

Porém, SASAKI (1961), após um estudo de cromossomos humanos somáticos, onde verificou considerável variação no com-

primento e na proporção dos braços de cromossomos individuais, a tribuiu essa variação não só a procedimentos de técnica, mas também ao grau de condensação cromatínica entre cromossomos de uma mesma célula. SASAKI (1961) mencionou que o processo de condensação cromatínica não é sincronizado em todos os membros do complemento cromossômico num dado estágio do ciclo mitótico. Em uma mesma placa metafásica, após tratamento com colchicina, cromossomos longos tendem a contrair-se proporcionalmente mais do que os outros. Além disso, CONAGIN (1950) relatou que, numa mesma ponta de raiz, com uma outra substância utilizada no pré-tratamento, como o paradiclorobenzeno (PDB), por exemplo, o efeito não é uniforme, havendo diferentes graus de contração dos cromossomos em várias células examinadas.

MATÉRN & SIMAK (1968) também perceberam a importância da contração diferencial dos cromossomos numa mesma célula, o que pode provocar reversão de ordem dos mesmos. Também alertaram para o caso de reversão de braços num mesmo cromossomo, principalmente nos isobraquiais. Apresentaram, nos dois casos, a diferença mínima média entre os dois cromossomos ou entre os dois braços cromossômicos, para que as respectivas reversões pudessem ser evitadas.

A contração cromatínica diferencial pode alterar a razão entre os braços de um mesmo cromossomo. SASAKI (1961) verificou que os cromossomos mais contraídos tendem a ter centrômeros mais medianos do que os menos contraídos, em diferentes células. Além disso, após um estudo em *Salmo alpinus* (Pisces : Salmonidae), Svardson concluiu que os braços longos têm contração relativamente maior do que os curtos, entre prometáfase e

início de anáfase mitótica (BAJER,1959).

Além do mais, pode haver variabilidade genética entre células e entre homólogos, podendo, no caso, haver um polimorfismo natural. Em termos mais amplos, são conhecidos diversos trabalhos mostrando a variação de características cariotípicas em inúmeras variedades de uma mesma espécie, como em *Phaseolus mungo* (GOSWAMI,1979), em *Cajanus cajan* (SINHA & KUMAR, 1979) . Além desses, um estudo realizado em 11 variedades e em três populações selvagens de *Lathyrus sativus*, também mostrou variações consistentes nos carótipos das diversas linhagens, principalmente no que se refere ao volume e ao comprimento total dos cromossomos metafásicos, em meristemas de raiz (VERMA & OHRI,1979).

DATTA(1975), ao elaborar cariótipos de algumas variedades de ervilha, também constatou grande variação no comprimento dos cromossomos e de seus respectivos braços, atribuindo tal fato a diferenças de condensação e espiralização de cromonemas em diferentes placas. Sugeriu o cálculo de valores médios em cada tipo cromossômico para se obter ideogramas mais corretos.

SYBENGA (1959) apresentou três fatores de procedimentos de técnica que podem ser fontes de erros em estudos cariotípicos, que são: 1) grau de precisão dos métodos de medição dos cromossomos, 2) técnica de preparação de lâminas e 3) efeito de diferentes pré-tratamentos sobre o comprimento total dos cromossomos e suas proporções de braços.

No item sobre métodos de medição dos cromossomos poderia ser citado o grau de precisão dos aparelhos utilizados , o método de medição(direto ou por fotografia), a inclinação do cromossomo em relação ao eixo focal e a imprecisão dos extremos dos cromossomos (SYBENGA,1959);GUERRA FILHO,1975).

Quanto à preparação de lâminas, SYBENGA (1959) constatou que a técnica do esmagamento parece provocar aumento no comprimento total dos cromossomos, pelo aumento do ângulo entre os braços cromossômicos e o plano perpendicular ao eixo do microscópio, assim como o aumento da variação na proporção dos braços, através do maior alongamento dos braços longos do que dos curtos. MARÉCHAL (1970) considerou a técnica do esmagamento como uma fonte de erros experimentais, provocando deformação nas células, por achatamento, porém SHARMA & SHARMA (1972) consideraram o método do esmagamento mais vantajoso que o de cortes em parafina, por considerá-lo mais rápido e permitir a observação de células isoladas, contribuindo para melhor espalhamento dos cromossomos.

Alterações em tamanhos cromossômicos têm sido atribuídas a diversos fatores ambiente a que estão submetidos as células meristemáticas da raiz, como, por exemplo, tipos de soluções utilizadas como meios de cultura, principalmente dependendo da concentração de fósforo (PIERCE, 1937 ; BENNETT & REES, 1969).

Além disso, em centeio, o fenótipo cromossômico varia de acordo com o desenvolvimento da planta, observando-se maior volume cromossômico em condições de máxima taxa de crescimento relativo, o qual é afetado por diversos fatores ambiente, como nutrição mineral, substâncias de crescimento, temperatura e excisão de raízes (FLANNAGAN & JONES, 1973).

A idade das plantas também parece interferir sobre a variação no tamanho dos cromossomos. Em centeio, os cromossomos parecem atingir o dobro do tamanho durante as três primeiras semanas de desenvolvimento (BENNETT & REES, 1969), enquanto

que em *Vicia faba* cromossomos de raízes principais com uma semana de desenvolvimento são duas a três vezes maiores que os de raízes secundárias com três semanas de idade (BENNETT,1970).

Baetke (1967 *apud* DATTA,1975) encontrou grandes diferenças em volumes cromossômicos de células de raiz e de caule em 30 espécies de plantas. Em *Vicia faba*, BENNETT (1970) verificou diferenças em tamanhos cromossômicos de meristemas de raízes primárias e de caules, em diferentes idades, havendo, de início, um pico de volume cromossômico em ambos os tecidos, com posterior declínio, porém em cada idade, sempre são observados maiores valores em meristemas radiculares. Assim, tais alterações em tamanhos cromossômicos foram relacionados a diferentes taxas de metabolismo celular, refletindo alterações em atividade genética.

Variação em volumes cromossômicos frequentemente implicam apenas em alterações na massa nuclear e quantidade total de proteína, mantendo inalterada a quantidade de DNA nuclear (BENNETT & REES,1969 ; BENNETT, 1970 ; VERMA & OHRI,1979), porém, em outros trabalhos, observou-se correlação positiva entre volume cromossômico e quantidade de DNA (REES *et alii*, 1966; REES & JONES, 1968).

4.2.2) Estudos citológicos no gênero *Phaseolus* (s.l.)

A despeito da importância econômica, o gênero *Phaseolus* (s.l.) não foi alvo de estudos citológicos aprofundados. Os trabalhos relativos ao gênero abordam, principalmente, a determinação do número cromossômico de diversas espécies, relatando

com 11 e 22 os números haplóide e diplóide respectivamente (DARLINGTON, 1945; FRAHM-LELIVELD, 1955; TURNER, 1956; BIR & SIDHU, 1967 e BOLKHOVSKIKH *et alii*, 1969). Há algumas exceções como, por exemplo, *P. pilosus* com $2n=20$ (MARÉCHAL, 1969) e *P. anisotrichus* e *P. formosus*, com $2n=20$ e $2n=40$, respectivamente (LACKEY, 1980). Assim, para o gênero *Phaseolus*, THUAN (1975) apresentou $x=11$ como número cromossômico básico primitivo, sendo $x=10$ uma derivação originada pela perda de um cromossomo.

Mesmo havendo estudos para determinar o número, o comportamento e a forma dos cromossomos de *Phaseolus* (s.l.) estes são ainda insuficientes, pois abrangem apenas algumas espécies num gênero bastante numeroso.

Embora vários autores tenham se dedicado a estudos de cariótipo no gênero *Phaseolus* (s.l.) e tivessem conhecimento das proposições para alterações taxonômicas, como a elevação da seção *Macroptilium* a nível genérico (URBAN, 1928) e a transferência de outras antigas seções de *Phaseolus* para o gênero *Vigna* (VERDCOURT, 1970), na maioria dos casos preocuparam-se apenas com a sugestão de possíveis linhas evolutivas ocorridas nas espécies estudadas, raramente se preocupando em fazer uma análise com enfoque citotaxonômico. Além disso, embora esses vários autores tenham trabalhado independentemente, houve espécies comuns em seus estudos, nem sempre se observando concórdância nos resultados.

MARÉCHAL (1969, 1970) analisou citologicamente alguns gêneros da subtribo Phaseolinae dentre os quais *Phaseolus*, *Macroptilium* e *Vigna*, fornecendo o número cromossômico, comprimento total médio do maior e do menor par de cromossomos e

também do complemento cromossômico, não apresentando, contudo, cariótipos detalhados para cada uma das espécies estudadas.

THUAN(1975) elaborou um estudo cariotaxonômico em 44 espécies pertencentes a 18 gêneros e a 5 subtribos de Phaseoleae. Da mesma forma que MARÉCHAL(1969, 1970), o autor utilizou a técnica de inclusão em parafina e seccionamento em micrótomo para preparação de lâminas. Na subtribo Phaseolineae confirmou a quase constância do número cromossômico $2n=22$, apresentando comprimentos cromossômicos para onze espécies estudadas nos gêneros *Phaseolus* e *Vigna*, cujo valor máximo atingiu 2,6 μm em algumas delas. Além disso, THUAN(1975) analisou núcleos de células interfásicas, procurando outros caracteres cariológicos úteis para a delimitação taxonômica dos gêneros e para a sugestão da linha filogenética da tribo Phaseoleae. Como um resumo dessa tentativa de classificação cariotaxonômica, THUAN(1975) considerou a tribo Phaseoleae como um grupo natural tanto pela homogeneidade de estruturas nucleares como pelos números cromossômicos que se derivam de um número básico ancestral $x=8$, sendo a subtribo Phaseolineae considerada como a mais evoluída, especialmente através dos gêneros *Phaseolus*, *Vigna* e *Dolichos*, todos com $x=11$, com casos de derivação para $x=10$ cromossomos.

SINGH & ROY(1970) elaboraram o cariótipo de 4 espécies de *Phaseolus* (s.l.), confirmaram o número cromossômico $2n=22$ e, no geral, consideraram o cariótipo simétrico. Apresentaram ainda, para cada espécie estudada, a fórmula cariotípica, o comprimento total de cromatina para o complemento e o índice TF%, que representa a razão entre a soma total do comprimento dos braços curtos pela soma total dos comprimentos cromossômicos

(HUZIWARA, 1962).

Posteriormente, SARBHOY (1977, 1978a, 1978b) apresentou um estudo citogenético envolvendo a análise de cromossomos somáticos e do comportamento meiótico em 15 espécies de *Phaseolus* (s.l.), observando, no último caso, a ocorrência de pontes e fragmentos, que são uma indicação da presença de inversão e, também, monovalentes. A seguir, SARBHOY (1980) reapresentou os dados anteriores, incluindo a elaboração de cariótipos com as respectivas fórmulas cariotípicas e demais índices para as 15 espécies estudadas. Apresentou ainda o hábito de crescimento de cada espécie e, paralelamente à análise dos cariótipos, sugeriu como linha evolutiva dentro do gênero, a redução do comprimento total de cromatina e a dos valores TF%.

Também SINHA & ROY (1979a, 1979b) realizaram estudos citológicos no gênero *Phaseolus* (s.l.). A nível meiótico, analisaram a microsporogênese em 16 espécies, determinando a frequência de quiasmas e a viabilidade de grãos de pólen, além de detectarem a ocorrência de monovalentes, pontes e cromossomos retardatários em algumas delas. A nível mitótico, apresentaram cariótipos de cromossomos somáticos e demais índices para 14 espécies. Aqui também os autores consideram a redução do índice TF% como tendência evolutiva dentro do gênero, porém ao contrário de SARBHOY (1977, 1978a, 1978b, 1980) consideram que a evolução do cariótipo em *Phaseolus* (s.l.) ter-se-ia dado tanto por ganho como por perda de material cromatínico.

Dentre os autores que elaboraram cariótipos em espécies de *Phaseolus* (s.l.) como SINHA & ROY (1970), SARBHOY (1977, 1978a, 1978b, 1980) e SINHA & ROY (1978a) há o consenso de que

a poliploidia desempenhou papel pouco importante na evolução do gênero, ao contrário de alterações estruturais dos cromossomos, como inversões e translocações.

JOSEPH & BOUWKAMP (1978) elaboraram e compararam o cariótipo de 8 espécies do complexo *Vigna-Phaseolus* (este último abrangendo *Macroptilium*) procurando analisar a situação desses gêneros sob o ponto de vista citotaxonômico, porém não foram bem sucedidos devido a semelhança morfológica dos cromossomos.

Devido à semelhança morfológica de cromossomos mitóticos metafásicos de espécies de *Phaseolus* (s.l.), o que dificulta a elaboração de cariótipos de uma maneira convencional, alguns autores recorreram à técnica do bandamento para identificação dos cromossomos. MOK & MOK (1976) fizeram tal tipo de estudo comparando os padrões de bandas para *P. vulgaris* e *P. coccineus* não observando diferenças apreciáveis entre elas. Os autores dividiram os 11 pares cromossômicos em 3 categorias: 2 longos, 5 intermediários e 4 curtos, havendo em cada um deles, um padrão de banda diferente. Foram constatados dois pares com constrição secundária dentre os de tamanho intermediário.

BHATTACHARYA (1978) também aplicou a técnica do bandamento-C em *P. vulgaris*, tanto em cromossomos somáticos de raiz como em cromossomos politênicos do suspensor do embrião, constatando, igualmente, 2 pares cromossômicos com satélite, localizados nos dois maiores. O par cromossômico mais longo é heteromórfico, sendo que os 5 seguintes, em tamanho decrescente, apresentam constrição primária em posição submediana a subterminal, enquanto que nos 4 menores esta é mediana. No cromossomo 9,

que, é metacêntrico, BHATTACHARYA (1978) não observou nenhum padrão de banda. Realizando o mesmo tipo de estudo em *P. coccineus*, NAGL(1969) também não observou nenhum padrão de bandamento em um cromossomo metacêntrico.

Por outro lado, SCHWEIZER & AMBROS (1979) ao analisarem o padrão de bandamento-C em cromossomos mitóticos e em politênicos de *P. coccineus* observaram 3 pares cromossômicos com constrição secundária, diferindo do resultado apresentado por NAGL(1969). Nesse mesmo trabalho, SCHWEIZER & AMBROS(1979) também aplicaram a técnica do bandamento NOR para esses dois tipos de cromossomos, concluindo, igualmente, haver 3 pares de cromossomos organizadores de nucléolo nessa espécie.

Paralelamente aos cariótipos obtidos a partir de cromossomos somáticos, também já foi empregada a análise de cromossomos meióticos na fase de paquíteno para identificação de espécies de *Phaseolus* (s.l.). Assim KRISHNAN & DE (1965) e DE & KRISHNAN(1966) compararam cariótipos obtidos a partir de células em metáfase mitótica e em paquíteno em *P. aureus* e em *P. mungo*, respectivamente. Interessantes, no primeiro caso (KRISHNAN & DE,1965), foram as diferenças obtidas entre os dois tipos de cariótipos no que se refere à posição da constrição secundária, além de haver variação no número de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Num outro trabalho, KRISHNAN & DE(1970) analisaram cromossomos paquitênicos de um tetraplóide de *Phaseolus*, supostamente um alotetraplóide, a se considerar a não formação de tetravalentes durante a prófase I e metáfase I. Através da análise da forma dos cromossomos, os autores constataram que 6 pares cromossômicos comuns às espécies *P. aureus* e *P. mungo* tam

bém ocorriam no tetraplóide, sendo o sétimo diferente em cada um dos dois diplóides quanto à presença ou ausência do organizador nucleolar. Os demais pares cromossômicos eram coincidentes com os de uma ou de outra espécie diplóide, sugerindo que essas poderiam ser as espécies parentais envolvidas na formação desse híbrido tetraplóide.

CHENG & BASSET(1981) estudaram a morfologia de cromossomos meióticos, na fase de diplóteno, de *P.vulgaris*, notando grande semelhança com a observada em *P.coccineus* (Cheng, 1979 *apud* CHENG & BASSET 1981).

Foram conduzidos estudos citológicos em outras espécies de *Phaseolus* (s.l.), como a análise cariotípica de 32 variedades de *P. mungo*, onde GOSWAMI(1979) constatou rasoáveis diferenças entre elas, no que se refere a comprimento cromossômico, posição de constrição primária e no valor de TF%. Dentre as 32 variedades, 30 delas apresentaram constrição secundária no maior par cromossômico, porém, em apenas 20, o segundo cromossomo revelou tal estrutura. Os cromossomos apresentaram constrição primária em posição mediana e submediana, porém preferencialmente submediana na maioria das variedades.

5) MATERIAIS E MÉTODOS

5.1) OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES

Foram feitos contatos com várias Instituições e realizadas algumas coletas de campo objetivando a obtenção de sementes de diferentes espécies de *Phaseolus*, *Macroptilium* e *Vigna*, selvagens ou cultivadas. Na TABELA 1, são apresentadas as espécies utilizadas para este estudo citológico.

As sementes obtidas foram numeradas por cada introdução e armazenadas em ambiente frio e seco, para manter seu poder germinativo. Essas sementes foram posteriormente utilizadas para a formação da coleção de espécies ou colocadas para germinar para os estudos citológicos.

Para algumas das espécies mencionadas na TABELA 1, foram obtidas sementes de outras populações. Estas sementes foram armazenadas seguindo o mesmo procedimento já mencionado, não sendo, contudo, utilizadas no estudo citológico.

5.2) TRATAMENTO TAXONÔMICO

Foram herborizados, segundo técnicas usuais, ramos florais e vegetativos das espécies utilizadas no estudo citológico, tanto daquelas já mantidas em coleção, como de outras, coletadas no campo em estado selvagem.

As identificações foram feitas por comparação com materiais do Herbário do Departamento de Morfologia e Sistemati

TABELA 1 - Relação de espécies de *Macroptilium*, de *Phaseolus* e de *Vigna* utilizadas no estudo citológico. IZ - Instituto de Zootecnia, Nova Odessa (SP), CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical (Colômbia), IAC - Instituto Agronômico, Campinas (SP). Categorias infragenéricas segundo MARÉCHAL *et alii* (1978) e FEVEREIRO (1979).

ESPÉCIE	DATA	OBTENÇÃO	PROCEDÊNCIA	CATEGORIAS INFRAGENÉRICAS.	
				SUBGÊNERO	SEÇÃO
<i>M. atropurpureum</i>	II/80	coleta	Cidade Universitária, Campinas, SP	-	-
<i>M. bracteatum</i>	VIII/80	IZ	desconhecida	-	<i>Macroptilium</i>
<i>M. erythroloma</i>	VIII/80	IZ	desconhecida	-	<i>Macroptilium</i>
<i>M. lathyroides</i>	VIII/80	IZ	desconhecida	-	<i>Macroptilium</i>
<i>P. coccineus</i>	VIII/81	CIAT	desconhecida	-	<i>Phaseolus</i>
<i>P. lunatus</i>	IV/81	IAC	desconhecida	-	<i>Phaseolus</i>
<i>P. vulgaris</i>	VIII/79	comercial	desconhecida	-	<i>Phaseolus</i>
<i>V. peduncularis</i>	VIII/79	IZ	desconhecida	<i>Sigmoidotropis</i>	<i>Pedunculares</i>
<i>V. radiata</i>	IV/80	comercial	desconhecida	<i>Ceratotropis</i>	-
<i>V. unguiculata</i>	II/80	IAC	desconhecida	<i>Vigna</i>	<i>Catjang</i>

ca Vegetais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Herbário UEC) e através de bibliografia disponível para o gênero, como BENTHAM(1859) , HASSLER(1923), PIPER (1926) , URBAN(1928), VERDCOURT(1970), MARÉCHAL *et alii* (1978). Para a identificação das espécies brasileiras de *Macroptilium* utilizou-se, preferencialmente, a chave elaborada por FEVEREIRO (1979), autora que aceita a validade desse gênero.

Os materiais herborizados, numerados, introduzidos no Herbário UEC e submetidos a estudo taxonômico são os seguintes:

Macroptilium atropurpureum (DC.) Urb. (5)
Phaseolus atropurpureus DC.
Phaseolus vestitus Hooker
Phaseolus Schiedeanus Schlecht
Phaseolus canescens Mart.et Galeotti
Phaseolus dysophyllus Benth.
Phaseolus affinis Pip.

- SP, Campinas, Cidade Univeristária , F.R. Martins nº 11.146 , 28/II/80 (UEC).

Macroptilium bracteatum (Nees et Mart.) Maréchal et Baudet
Phaseolus bracteatus Nees et Mart.
Phaseolus decipiens Salzm.

- SP, Campinas, Instituto Agronômico (em cultivo), E.R.F.Martins nº 11.149, 06/III/80 (UEC).

Macroptilium erythroloma (Mart.ex Benth.) Urb.
Phaseolus erythroloma Mart.ex Benth.

- SP, Campinas, Instituto Agronômico (em cultivo), E.R.F.Martins, nº 11.151, 06/III/80 (UEC).

(5) Não consta da chave de identificação específica de FEVEREIRO (1979).

Macroptilium lathyroides (L.) Urb.

Phaseolus lathyroides L.

Phaseolus hastaefolius Mart. ex Benth.

Phaseolus maritimus Salzm. ex Benth.

Phaseolus psoraleoides Wright et Arn.

- SP, Campinas, Instituto Agronômico (em cultivo), E.R.F.Martins
nº 11.153, 20/I/80 (UEC).

Phaseolus coccineus L.

Phaseolus multiflorus Lam.

- SP, Campinas, Instituto Agronômico (em cultivo), E.R.F.Martins
nº 14.360, 17/XI/82 (UEC).

Phaseolus lunatus L.

Phaseolus inamoensis L.

Phaseolus bipunctatus Jacq.

Phaseolus puberulus H.B.K.

Phaseolus xuaresii Zucc.

Phaseolus limensis Macfadyen

Phaseolus saccharatus Macfadyen

- SP, Campinas, Instituto Agronômico (em cultivo), E.R.F.Martins
nº 14.359, 20/XI/82 (UEC).

Phaseolus vulgaris L.

Phaseolus esculentus Salisb

Phaseolus communis L.

- SP, Campinas, Instituto Agronômico (em cultivo), E.R.F. Martins
nº 14.358, 20/XI/82 (UEC).

Vigna peduncularis (H.B.K.) Fawcett & Rendle

Phaseolus peduncularis H.B.K.

Phaseolus spixianus Benth.

Phaseolus pascuorum Benth.

Phaseolus clitorioides Benth.

Phaseolus modestus Benth.

Phaseolus pius Benth.

Phaseolus oblongifolius Micheli

Phaseolus clitorioides var. *clitorioides* (Benth.) Hassler

Phaseolus peduncularis var. *pusillus* Hassler

- SP, Campinas, Instituto Agronômico (em cultivo), E.R.F. Martins
nº 14.359, 20/XI/82 (UEC).

Vigna radiata (L.) Wilczek

Phaseolus radiatus L.

Phaseolus hirtus Retz.

Phaseolus abyssinicus Savi

Phaseolus aureus Roxb.

Azuki radiata Ohwi

Rudua aurea (Roxb.) Mackawa

- SP, Campinas, Instituto Agronômico (em cultivo), E.R.F. Martins
nº 11.159, 03/II/80 (UEC).

Vigna unguiculata (L.) Walpers

Cv. gr. *unguiculata* E. Westphal

Dolichos unguiculatus L.

Phaseolus sphaerospermus L.

Dolichos melanophthalmus DC.

Vigna sinensis (L.) Savi ex Hassk

Phaseolus unguiculatus (L.) Pip.

- SP, Campinas, Instituto Agronômico (em cultivo), E.R.F. Martins
nº 14.361, 15/XI/82 (UEC).

5.3) TESTE DE TÉCNICA CITOLÓGICA

Foram testadas várias técnicas, com o objetivo de determinar a mais apropriada à elaboração de cariótipos nos gêneros *Phaseolus*, *Vigna* e *Macroptilium*. Pela maior disponibilidade de sementes, foi escolhida a espécie *P. vulgaris* cv. Carioca

como material a ser empregado nos testes.

Inicialmente testou-se a necessidade de submeter as radículas das diversas espécies em estudo a pré-tratamento. Esse teste originou-se da sugestão de CONAGIN (1950), segundo a qual o pré-tratamento com PDB acentua a forma dos cromossomos longos, mas não a de curtos, em virtude da própria contração induzida por essa droga. Como se dispunha da informação de que os cromossomos do complexo *Phaseolus-Vigna-Macroptilium* são relativamente curtos (SARBHOY, 1977), pareceu conveniente verificar a necessidade do pré-tratamento para o estudo citológico proposto nestes materiais. Assim, no início dos trabalhos, para cada técnica citológica experimentada, foram separados dois lotes de radículas de *P. vulgaris*, sendo um submetido a pré-tratamento e outro não, para verificar-se a situação mais adequada ao estudo citológico.

Além da averiguação da necessidade de submeter as radículas a pré-tratamento, estas foram colocadas em solução saturada de PDB por diferentes períodos de tempo, para verificar o mais apropriado à obtenção do grau ideal de contração dos cromossomos de *P. vulgaris*; posteriormente, este período foi testado para todas as outras espécies em estudo. Os períodos de tempo variaram de duas até cinco horas, sendo, contudo, mantida consistência em cada um deles, por saber-se que a mínima variação poderia ser fonte de erros experimentais.

Na preparação das lâminas foram utilizadas radículas recém-emergidas de sementes, postas, a germinar em placas de Petri com 9cm de diâmetro, com dois papéis de filtro levemente umedecidos em aproximadamente 2 ml de água. Durante a germinação foi mantida temperatura constante de 25°C, não sendo controlada -

4

das as condições de luminosidade, que seguiram as variações do ambiente.

As radículas foram coletadas e preparadas de acordo com quatro técnicas: a de Sharma (*apud* MEDINA & CONAGIN,1964), a de PALMER & HEER(1973), a de KAWANO(1965) e uma outra, primeiramente utilizada neste trabalho. Nas três primeiras técnicas foi experimentada uma pequena alteração, que consistiu no tratamento das radículas com solução aquosa de pectinase a 2,5%, por duas horas, a 37°C, antes da hidrólise. Esse procedimento, também adotado na nova técnica aqui testada, baseou-se na aceitação de que esse tratamento enzimático freqüentemente propicia o melhor espalhamento dos cromossomos, por provocar separação celular pela dissolução dos sais pecticos da lamela média (SHARMA & SHARMA,1972).

Dentre as quatro técnicas testadas, empregou-se inicialmente, a técnica de Sharma (*apud* MEDINA & CONAGIN,1964) modificada, como segue:

- i) pré-tratamento com paradiclorobenzeno (PDB) por 2 a 5 h. entre 16 e 18°C ;
- ii) fixação em álcool etílico e ácido acético glacial (3:1);
- iii) tratamento com solução de pectinase a 2,5% por 2h, a 37°C;
- iv) hidrólise em orceína acética a 2% e HCl N (9:1), por 30 min, a 40°C;
- v) coloração em orceína acética a 1%, por 30min.
- vi) montagem, por esmagamento da ponta da raiz, entre lâmina e lamínula, em orceína acética a 1%.

Posteriormente, recorreu-se à técnica empregada por PALMER & HEER (1973) em soja, planta que apresenta dificuldades citológicas semelhantes às do feijão. Tal técnica modificada, pode ser assim esquematizada:

- i) pré-tratamento com PDB, por 2 a 4h, entre 15 e 16^oC;
- ii) fixação em álcool etílico e ácido acético glacial (3:1) por 2-3 dias, entre 35 a 40^oC;
- iii) hidrólise em HCl N por 10 min, a 60^oC;
- iv) coloração com reagente de Schiff por 90min;
- v) tratamento com pectinase a 2,5% por 2 h, a 30^oC;
- vi) montagem, por esmagamento da ponta da raiz, entre lâmina e lamínula, em carmim propiônico.

A nova técnica testada, empregada pela primeira vez neste trabalho, pode ser assim apresentada:

- i) pré-tratamento com PDB por 2 a 4 h, entre 15 e 16^oC;
- ii) fixação em álcool etílico e ácido acético glacial (3:1) por 2 dias;
- iii) tratamento com pectinase a 2,5% por 2h, a 37^oC;
- iv) montagem da lâmina, por esmagamento da ponta da raiz, em ácido acético 45%.

Como se pode perceber, esta nova técnica combina substâncias convencionais dos dois métodos anteriores, como PDB, componentes do fixador e pectinase, porém não utiliza coloração e o material é montado em ácido acético 45%, permitindo a observação do material somente em contraste de fase.

A quarta técnica experimentada neste trabalho foi a

de KAWANO (1965), ligeiramente modificada:

- i) pré-tratamento com PDB, por 3 h, entre 15 e 16°C;
- ii) fixação em álcool etílico e ácido acético glacial (1:1) por, pelo menos, 24h, à temperatura ambiente;
- iii) tratamento com pectinase a 2,5% por 2 h, a 37°C;
- iv) coloração com orceína acética a 2%, por 16 a 24h;
- v) hidrólise com HCl N e orceína acética a 1% (1:1) por 90 min;
- vi) montagem da lâmina, por esmagamento da ponta da raiz, em ácido acético e glicérol (20:1).

5.4) ESTUDOS CITOLÓGICOS

Sementes escarificadas de várias espécies de *Phaseolus*, de *Macroptilium* e de *Vigna* foram postas a germinar em placas de Petride 9cm de diâmetro com dois papéis de filtro levemente umedecidos, em aproximadamente 2ml de água, em estufa, a uma temperatura aproximadamente constante, de 25°C. Foi feita a escarificação para facilitar a absorção de água e reduzir o período de tempo necessário para a germinação das sementes.

As radículas emergidas foram coletadas antes de atingirem 1 cm de comprimento e, a seguir, preparadas segundo a técnica de Sharma (*apud* MEDINA & CONAGIN, 1964), com tratamento em solução de pectinase.

As preparações citológicas foram observadas em microscópio fotônico e, através de câmara clara, foram feitos de-

senhos dos cromossomos. Foram tiradas algumas fotografias em fotomicroscópio de marca ZEISS.

Os cromossomos foram medidos, preferencialmente, através dos desenhos em câmara clara, embora este método seja mais trabalhoso e demorado do que o da análise direta das fotografias. Essa escolha deveu-se à dificuldade de encontrar células com cromossomos bem espalhados e, principalmente, que estivessem no mesmo plano.

Os desenhos foram feitos com aumento de 2.500 vezes, dando um aumento total correspondente à escala de 36mm = 10 μ m, pela câmara clara. Os comprimentos dos cromossomos e de seus respectivos braços foram então, obtidos pela medição dos mesmos, no desenho, em milímetro, com o auxílio de régua milimetrada, sendo, depois, feita a conversão para micrômetros.

O cariótipo definitivo de cada espécie baseou-se em resultados de, pelo menos, dez células de cada espécie com exceção de *P. vulgaris*, em que apenas 9 foram analisadas. O menor número de células analisadas nessa última espécie refletiu a dificuldade em encontrarem-se cromossomos metafásicos em condições ideais de espalhamento e de contração.

Para cada espécie, após medido o comprimento de cada cromossomo e de cada um de seus braços, foi calculado o seu índice centromérico (i), parâmetro que mostra a razão do comprimento do braço curto (c) pelo comprimento total do cromossomo (t), ou seja, de acordo com LEVAN *et alii*, (1964).

$$i = 100c/t$$

Em cada célula, os homólogos são reconhecidos com

base no comprimento total do cromossomo (t) e no seu respectivo índice centromérico (i). O cariótipo definitivo de cada espécie foi estabelecido a partir de valores médios desses parâmetros (t e i), para cada par de homólogos, correspondentes nas diversas células analisadas.

Inicialmente, em cada células estudada, os pares cromossômicos foram arranjados em ordem decrescente de tamanho; porém, em determinadas ocasiões, foi feita a inversão de posição de determinadas pares cromossômicos, levando-se em consideração os seus respectivos índices centroméricos com relação à localização de pares semelhantes nas demais células estudadas de uma espécie. Tal procedimento foi adotado apenas quando havia certa equivalência de comprimento entre os pares cromossômicos envolvidos e levando em consideração um dos diversos fatores responsáveis por variações na elaboração de cariótipos, que é a contração cromatínica diferencial (CONAGIN, 1950; BAJER, 1959; SASAKI, 1961; MATÉRN & SIMAK, 1968).

Foram considerados pares cromossômicos com satélite aqueles em que foi observada a ocorrência dessa estrutura em , pelo menos, metade dos pares cromossômicos correspondentes analisados em cada espécie.

Para cada espécie estudada, foi calculado o índice TF%, criado por HUZIWARA (1962), que exprime a relação entre o comprimento total dos braços curtos e o comprimento total dos cromossomos do complemento.

Foram calculados, segundo o procedimento estatístico usual (SPIEGEL, 1976), a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação para cada par cromossômico de cada uma das dez es

“pêcies analisadas, tanto para o comprimento como para o índice centromérico.

6) RESULTADOS

6.1) TAXONOMIA

Conforme mencionado na literatura para a subtribo Phaseolineae, a associação de algumas características morfológicas permitiram determinar, a nível genérico, as espécies submetidas a estudos citológico no presente trabalho. Tais caracteres são: ausência ou presença de pêlos uncinados; presença ou ausência de nós dilatados e de glândulas extra-florais no eixo da inflorescência; contração ou não do eixo da inflorescência; formato do estilete; posição do estigma, persistência ou não de brácteas florais; e presença de estípulas recorrentes ou simples.

Ainda com base nos diversos trabalhos taxonômicos recentes, aqui revisados, foi possível elaborar uma listagem (TABELA 2) abordando diversas características mencionadas por diversos autores para individualizar os gêneros *Phaseolus*, *Macropodium* e *Vigna*.

Assim, pelo apresentado na TABELA 2, o gênero *Phaseolus* caracteriza-se por apresentar estípulas não recorrentes, folhas primárias pecioladas e cordadas, presença de pêlos uncinados, brácteas florais persistentes pelo menos até a ântese, ausência de nós dilatados e de glândulas extraflorais no eixo da inflorescência, estilete espiralado, estigma terminal, célula subsidiárias e adjacentes de tamanho subigual, grãos de pólen com reticulação fina e camada infratectum da exina do tipo columelar.

TABELA 2 - Características distintivas entre os gêneros *Phaseolus* (P), *Macroptilium* (M) e *Vigna* (V).

C A R A C T E T Í S T I C A S	P	M	V
estípulas recorrentes.....			x
estípulas não-recorrentes.....	x	x	
folhas primárias pecioladas.....	x	x	
folhas primárias sêsseis.....			x
folhas primárias cordadas.....	x		
folhas primárias reniformes.....		x	
folhas primárias ovado-lanceoladas e lanceoladas..			x
células subsidiárias e adjacentes de tamanho aproximadamente igual.....	x	x	
células subsidiárias menores que as adjacentes...			x
brácteas florais persistentes pelo menos até a antese.....	x		
brácteas florais caducas.....		x	x
presença de pêlos uncinados.....	x		
ausência de pêlos uncinados.....		x	x
presença de nós dilatados e de glândulas extraflorais no eixo da inflorescência.....		x	x
ausência de nós dilatados e de glândulas extraflorais no eixo da inflorescência.....	x		
eixo da inflorescência alongado.....	x	x	
eixo da inflorescência contraído.....			x
estilete espiralado.....	x		
estilete espiralado ou não.....			x
estilete curvado em ângulo reto.....		x	
estigma terminal.....	x	x	
estigma subterminal.....			x
ausência de ácido piperólico.....			x
ausência de asparagina e presença de P ₃		x	
grãos de pólen com exina de reticulação fina.....	x	x	
grãos de pólen com exina de reticulação grosseira			x
camada infratectum da exina do tipo columelar....	x		
camada infratectum da exina do tipo granular.....			x

O gênero *Macroptilium* apresenta muita semelhança com *Phaseolus*, porém pode ser diferenciado em relação a este no que diz respeito a 6 características apresentadas na TABELA 2: ausência de pêlos uncinados, presença de nós dilatados e de glândulas extraflorais no eixo da inflorescência, estilete curvado em ângulo reto, nunca espiralado, brácteas florais caducas, folhas primárias reniformes, ausência de asparagina e presença de P_3 .

Contudo, um maior número de características diferenciam *Vigna*: presença de estípulas recorrentes, folhas primárias sésseis, com forma ovado-lanceolada a lanceolada, células subsidiárias menores que as adjacentes, eixo da inflorescência contraído, estilete espiralado ou não, estigma subterminal, ausência de ácido piperônico, grãos de pólen com exina largamente aberta e camada infratectum da exina do tipo granular.

A determinação das espécies utilizadas no estudo citológico também seguiu trabalhos taxonômicos disponíveis. Dentre cada um dos três gêneros estudados, as espécies puderam ser mais prontamente reconhecidas por algumas características, a seguir apresentadas.

No gênero *Macroptilium*, tanto as espécies *M. bracteatum* como *M. erythroloma* apresentam pedúnculo estipitado e com fascículo de brácteas na base. Diferenciam-se entre si pelo formato do vexilo e presença ou ausência de papilas na região dos calos. *M. bracteatum* apresenta vexilo obovado e desprovido das referidas papilas, enquanto em *M. erythroloma* o vexilo é suborbicular e provido de papilas na região dos calos. Dentre os materiais examinados também foi possível observar uma distin

ção quanto à coloração da corola, sendo carmim em *M.bracteatum* e rosado em *M.erythroloma*.

M.atropurpureum e *M.lathyroides* não apresentam fascículos de brácteas na base da inflorescência. Essas duas espécies podem ser diferenciadas pelo formato dos folíolos e pela presença ou ausência de brácteas assoveladas no ápice da inflorescência. Tais brácteas são observadas em *M.lathyroides*. e *M.atropurpureum* caracteriza-se por apresentar uma pequena expansão em cada um dos dois folíolos laterais.

Dentre as três espécies de *Phaseolus* estudadas, *P.coccineus* diferencia-se por apresentar o estigma em posição acima das anteras. Por outro lado, as espécies *P.lunatus* e *P.vulgaris* podem ser distinguidas pelo formato da vagem. Em *P. lunatus* esta é achatada e amplamente falcada enquanto que em *P. vulgaris* é linear, sendo reta ou subfalcada.

Quanto ao gênero *Vigna*, dentre as três espécies aqui estudadas, *V. unguiculada* é a única a apresentar a quilha não espiralada, sendo apenas dobrada em ângulo próximo a 90°. Já *V. peduncularis* e *V.radiata* diferem quanto ao grau de espiralização da quilha. *V. peduncularis* apresenta a quilha com uma espiral bem aberta, enquanto que em *V.radiata* a espiralização é mais acentuada e, além disso, essa última espécie caracteriza-se por apresentar uma pétala da quilha com um apêndice lateral nítido.

6.2) TÉCNICAS CITOLÓGICAS

Os testes realizados submetendo ou não as raízes de *Phaseolus* (s.l.) a pré-tratamento em solução saturada de PDB mostraram que, no lote não submetido, os cromossomos se dispunham

na placa equatorial, agrupados, sendo difícil até mesmo fazer a contagem do número de cromossomos. Por outro lado, no lote submetido ao pré-tratamento, os cromossomos ficaram bem espalhados e individualizados.

Em todas as quatro técnicas citológicas testadas, o problema inicial foi a determinação do tempo de permanência das raízes em PDB, ou seja, a determinação do período de pré-tratamento ideal, para que os cromossomos ficassem bem espalhados mas não muito curtos, de maneira que suas formas se acentuassem. Após vários testes, ficou demonstrado que o período ideal é de cerca de 3h, à temperatura de $16 \pm 18^{\circ}\text{C}$. Abaixo de três horas não se conseguia espalhamento suficiente dos cromossomos, enquanto que, acima desse período, ficavam excessivamente contraídos.

Com relação à escolha de uma das quatro técnicas experimentadas, esta recaiu sobre a técnica de Sharma (*apud* MEDINA & CONAGIN, 1964), modificada pelo tratamento com solução de pectinase antes da hidrólise. Esta técnica foi escolhida por reunir algumas qualidades que facilitaram bastante o trabalho, como rapidez na preparação das lâminas, maior disponibilidade de drogas e maior facilidade em localizar o material sobre a lâmina, ao lado, principalmente, da caracterização da forma dos cromossomos de maneira satisfatória.

4.3) CITOLOGIA

Para as espécies *Macroptilium atropurpureum*, *M. bracteatum*, *M. erythroloma*, *M. lathyroides*, *Phaseolus coccineus*, *P. lunatus*, *Vigna peduncularis*, *V. radiata* e *V. unguiculata*, das quais foram a

nalizadas 10 ou 11 células, e para *P. vulgaris*, que teve 9 células estudadas, foi possível elaborar seus cariótipos com base em valores médios de comprimento cromossômico e de índice centromérico, para a maior parte dos cromossomos. A FIGURA 2 apresenta os ideogramas dessas dez espécies. Cada cromossomo do genoma está indicado por uma letra, em ordem decrescente de comprimento.

Nas FIGURAS 3, 4 e 5 são mostrados cromossomos mitóticos metafásicos de *M. atropurpureum*, *P. lunatus* e *V. unguiculata*, que representam seus respectivos gêneros.

Nas TABELAS 3 a 12, são apresentados os comprimentos médios, em μm , dos cromossomos de cada espécie, além de seus respectivos índices e posições centroméricas médias, segundo a nomenclatura proposta por LEVAN *et alii* (1964). Para cada valor médio de comprimento (\bar{X}) e de índice centromérico (\bar{Y}), são apresentados seus respectivos desvio-padrão (DP) e coeficientes de variação (CV), estes em porcentagem.

Uma observação bastante difícil referiu-se à visualização do número e posição de satélites. No geral, nas espécies em que foram encontrados, os satélites dificilmente eram visíveis em todas as células examinadas. Em alguns casos, como em *M. erythroloma*, embora o cariótipo médio apresente um único par cromossômico com satélite, numa única célula examinada foram observados dois pares cromossômicos com satélite, conforme pode ser visto na FIGURA 6.

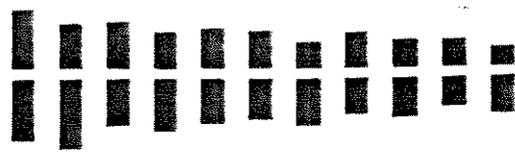
Foram observadas, esporadicamente, algumas células tetraplóides em meio a células diplóides normais, numa mesma raça em diversas espécies, como *M. atropurpureum*, *M. bracteatum*, *M. ery*

throloma, *M. lathyroides*, *P. lunatus* e *P. vulgaris*.

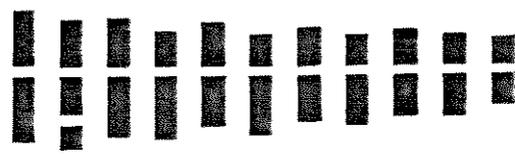
Dentre, aproximadamente, 100 raízes examinadas de *M. atropurpureum*, foram encontradas duas, onde todas as células em divisão eram tetraplóides. Esta situação difere da apresentada no parágrafo anterior. As FIGURA 7 e 8 mostram uma célula tetraplóide e um campo com várias células tetraplóides, respectivamente.

Na TABELA 13 são apresentadas as fórmulas cariotípicas das espécies de *Macroptilium*, de *Phaseolus* e de *Vigna* aqui estudadas, enquanto que na TABELA 14 são mostrados seus respectivos comprimento total de cromatina (CTC), em μm , e seus TF%.

a b c d e f g h i j k



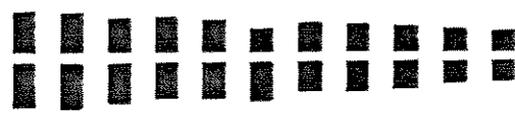
M. atropurpureum



M. bracteatum



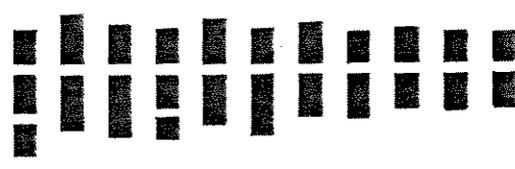
M. erythroloma



M. lathyroides



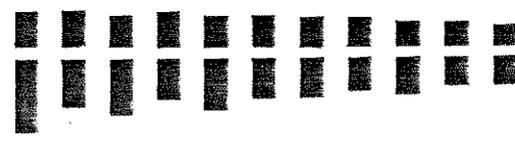
P. coccineus



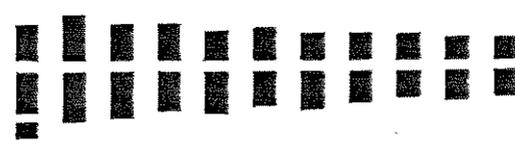
P. lunatus



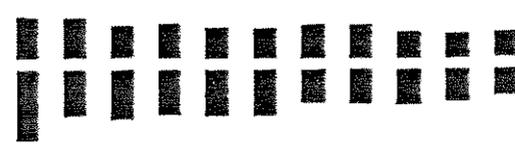
P. vulgaris



V. peduncularis



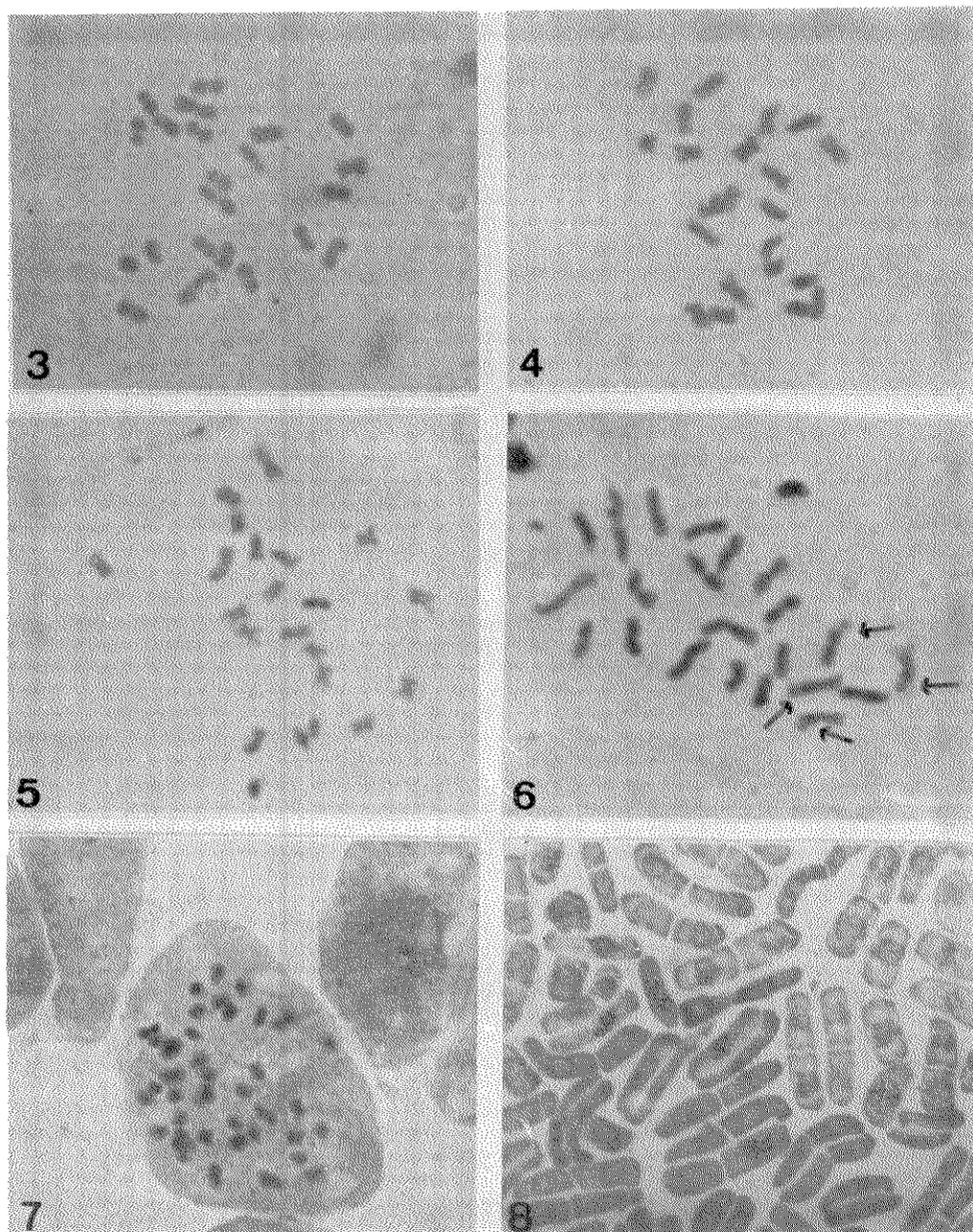
V. radiata



V. unguiculata

└─ 1 μm

FIGURA 2 - Ideogramas de espécies de *Macroptilium*, *Phaseolus* e *Vigna*.



FIGURAS 3 a 8 - Cromossomos mitóticos metafásicos de: 3 - *Macroptilium atropurpureum*; 4 - *Phaseolus lunatus*; 5 - *Vigna unguiculata*; 6 - *Macroptilium erythroloma*. As setas indicam os quatro cromossomos com satélite. X.1980.

7 - Célula tetraplóide de *Macroptilium atropurpureum*; X 1540.

8 - Campo com células tetraplóides de *Macroptilium atropurpureum*; X 245.

TABELA 3 - Cromossomos mitóticos metafásicos de *Macropitilium a tropurpureum*. Médias do comprimento cromossômico (\bar{X}) e do índice centromérico (\bar{Y}), com os respectivos desvios-padrões (DP) e coeficientes de variação (CV%). Posição do centrômero: m- mediana; sm - submediana. Número de mediações: n.

PAR	n	COMPRIMENTO (μm)			ÍNDICE CENTROMÉRICO			CENTR.
		\bar{X}	DP	CV%	\bar{Y}	DP	CV%	
a	11	2,73	0,36	13,06	49,4	1,80	3,65	m
b	11	2,60	0,31	12,08	42,0	7,11	16,94	m
c	11	2,21	0,28	12,89	49,8	0,60	1,21	m
d	11	2,11	0,17	7,87	40,4	5,06	12,52	m
e	11	2,00	0,19	9,30	48,3	2,61	5,40	m
f	11	1,88	0,21	11,16	47,6	3,64	7,66	m
g	11	1,79	0,17	9,51	39,1	7,29	18,64	m
h	11	1,73	0,14	8,28	49,4	2,11	4,28	m
i	11	1,64	0,17	10,42	42,3	6,40	15,15	m
j	19	1,42	0,14	9,78	48,7	2,83	5,81	m
k	3	1,39	0,25	17,64	37,0	3,00	8,11	sm

TABELA 4 - Cromossomos mitóticos metafásicos de *Macroptilium bracon*
teatum. Médias do comprimento cromossômico (\bar{X}) e do
índice centromérico (\bar{Y}), com seus respectivos desvios
padrões (DP) e coeficientes de variação (CV%). Posição
do centrômero: m - mediana; sm - submediana. Número
de medições: n. Satélite : * .

PAR	n	COMPRIMENTO (μm)			ÍNDICE CENTROMÉRICO			CENTR.
		\bar{X}	DP	CV%	\bar{Y}	DP	CV%	
a	11	2,85	0,43	15,13	48,6	2,30	4,73	m
b*	11	2,72	0,33	11,99	40,7	5,57	13,71	m
c	11	2,54	0,40	15,72	46,1	4,68	10,15	m
d	11	2,30	0,25	10,87	38,0	6,97	18,35	m
e	11	2,29	0,25	10,97	45,8	5,74	12,53	m
f	11	2,13	0,26	12,11	36,4	8,18	22,43	sm
g	11	2,01	0,22	10,96	46,6	4,34	9,31	m
h	11	1,93	0,25	13,06	40,2	6,16	15,33	m
i	11	1,82	0,24	13,03	48,9	2,77	5,67	m
j	11	1,76	0,18	10,44	42,7	5,73	13,43	m
k	10	1,44	0,19	13,01	46,9	5,04	10,75	m

TABELA 5- Cromossomos mitóticos metafásicos de *Macroptilium athroloma*. Médias do comprimento cromossômico (\bar{X}) do índice centromérico (\bar{Y}), com seus respectivos desvios-padrões (DP) e coeficientes de variação (CV%). Posição do centrômero: m - mediana. Número de medições n. Satélite:*

PAR	n	COMPRIMENTO (μm)			ÍNDICE CENTROMÉRICO			CENTR.
		\bar{X}	DP	CV%	\bar{Y}	DP	CV%	
a	10	2,39	0,28	11,86	48,9	2,60	5,32	m
b*	10	2,10	0,30	14,46	46,9	3,60	7,68	m
c	10	2,02	0,25	12,49	49,6	1,26	2,55	m
d	10	1,90	0,25	13,32	49,4	1,90	3,84	m
e	10	1,81	0,24	13,21	48,3	5,38	11,13	m
f	10	1,73	0,25	14,40	47,6	4,43	9,30	m
g	10	1,68	0,24	14,00	49,2	1,40	2,84	m
h	10	1,63	0,21	12,75	50,0	0,00	0,00	m
i	10	1,57	0,21	13,30	47,2	4,02	8,52	m
j	10	1,49	0,23	15,42	50,0	0,00	0,00	m
k	8	1,42	0,17	12,29	48,5	2,78	5,73	m

TABELA 6 - Cromossomos mitóticos metafásicos de *Macroptilium lathyroides*. Médias do comprimento cromossômico (\bar{X}) e do índice centromérico (\bar{Y}), com seus respectivos desvios-padrões (DP) e coeficientes de variação (CV%). Posição do centrômero: m - mediana. Número de medições: n.

PAR	n	COMPRIMENTO (μm)			ÍNDICE CENTROMÉRICO			CENTR.
		\bar{X}	DP	CV%	\bar{Y}	DP	CV%	
a	10	2,18	0,26	11,88	50,0	0,00	0,00	m
b	10	2,01	0,43	21,33	44,5	5,74	12,90	m
c	10	1,77	0,24	13,32	46,7	3,65	7,82	m
d	10	1,70	0,21	12,52	49,8	0,63	1,27	m
e	10	1,61	0,22	13,89	48,7	2,11	4,33	m
f	10	1,50	0,26	17,11	38,5	5,06	13,14	m
g	10	1,46	0,25	17,16	47,4	4,50	9,50	m
h	10	1,38	0,23	36,96	46,6	4,88	10,47	m
i	10	1,28	0,18	13,85	50,0	0,00	0,00	m
j	5	1,12	0,19	16,60	50,0	0,00	0,00	m
k	4	1,07	0,22	20,88	46,2	7,50	16,22	m

TABELA 7 - Cromossomos mitóticos metafásicos de *Phaseolus coccineus*. Médias do comprimento cromossômico (\bar{X}) e do índice centromérico (\bar{Y}), com seus respectivos desvios-padrões (DP) e coeficientes de variação (CV%). Posição do centrômero: m-mediana; sm-submediana. Número de mediações: n. Satélite: *.

PAR	n	COMPRIMENTO (μm)			ÍNDICE CENTROMÉRICO			CENTR.
		\bar{X}	DP	CV%	\bar{Y}	DP	CV%	
a*	10	3,10	0,53	17,10	37,0	9,36	25,29	sm
b*	10	2,71	0,36	13,44	33,5	6,90	20,60	sm
c	10	2,50	0,36	14,49	43,5	5,42	12,46	m
d*	10	2,46	0,35	14,11	35,0	7,27	20,78	sm
e	10	2,30	0,35	15,45	47,0	3,46	7,37	sm
f	10	2,24	0,28	12,46	36,1	7,20	19,95	sm
g	10	2,09	0,27	12,69	43,9	5,63	12,82	m
h	10	1,96	0,23	11,79	42,6	6,13	14,39	m
i	10	1,92	0,35	18,13	32,1	7,99	24,90	sm
j	7	1,78	0,19	10,42	47,4	3,41	7,19	m
k	3	1,61	0,21	13,26	40,3	10,00	24,83	m

TABELA 8 - Cromossomos mitóticos metafásicos de *Phaseolus lunatus*. Médias do comprimento cromossômico (\bar{X}) e do índice centromérico (\bar{Y}), com seus respectivos desvios-padrões (DP) e coeficientes de variação (CV%). Posição do centrômero: m - mediana; sm - submediana. Número de medições: n. Satélite: *.

PAR	n	COMPRIMENTO (μm)			ÍNDICE CENTROMÉRICO			CENTR.
		\bar{X}	DP	CV%	\bar{Y}	DP	CV%	
a *	10	2,67	0,48	17,98	32,9	6,95	21,13	sm
b	10	2,48	0,46	18,41	48,0	3,27	6,80	m
c	10	2,37	0,26	10,79	39,6	5,96	16,50	m
d *	10	2,27	0,31	13,62	36,0	5,96	16,56	sm
e	10	2,17	0,24	11,24	46,9	4,51	9,61	m
f	10	2,03	0,21	10,30	41,0	7,08	17,09	m
g	10	1,97	0,23	11,86	46,7	5,21	11,16	m
h	10	1,84	0,19	10,24	40,7	7,12	17,49	m
i	9	1,67	0,25	15,12	50,0	0,00	0,00	m
j	9	1,60	0,15	9,48	44,4	4,30	9,68	m
k	3	1,52	0,14	9,21	46,3	6,35	13,71	m

TABELA 9 - Cromossomos mitóticos metafásicos de *Phaseolus vulgaris*. Médias do comprimento cromossômico (\bar{X}) e do índice centromérico (\bar{Y}), com seus respectivos desvios-padrões (DP) e coeficientes de variação (CV%). Posição do centrômero: m -mediana; sm-submediana. Número de medições: n. Satélite: *.

PAR	n	COMPRIMENTO (μm)			ÍNDICE CENTROMÉRICO			CENTR.
		\bar{X}	DP	CV%	\bar{Y}	DP	CV%	
a*	9	2,79	0,34	12,23	31,9	7,24	22,69	sm
b	9	2,75	0,31	11,16	36,8	9,35	25,43	sm
c	9	2,51	0,40	15,95	43,9	7,90	17,99	m
d*	9	2,50	0,28	11,43	30,7	7,09	23,11	sm
e	9	2,31	0,22	9,74	31,7	6,46	20,40	sm
f	9	2,11	0,17	8,06	37,8	8,41	22,26	m
g	9	2,05	0,21	10,10	47,2	4,18	8,84	m
h	9	1,84	0,11	6,21	43,9	4,73	10,77	m
i	9	1,72	0,23	13,29	37,2	6,20	16,66	sm
j	8	1,59	0,13	8,11	46,1	5,59	12,12	m
k	6	1,49	0,16	10,91	38,8	9,72	25,04	m

TABELA 10 - Cromossomos mitóticos metafásicos de *Vigna peduncularis*. Médias do comprimento cromossômico (\bar{X}) e do índice centromérico (\bar{Y}), com seus respectivos desvios-padrões (DP) e coeficientes de variação (CV%). Posição do centrômero: m - mediana; sm - submediana. Número de medições: n.

PAR	n	COMPRIMENTO (μm)			ÍNDICE CENTROMÉRICO			CENTR.
		\bar{X}	DP	CV%	\bar{Y}	DP	CV%	
a	11	2,54	0,33	12,87	34,4	4,70	13,64	sm
b	11	2,13	0,21	10,08	45,4	6,70	14,76	sm
c	11	2,11	0,23	10,90	37,2	6,87	18,47	sm
d	11	1,91	0,22	11,72	47,3	3,58	7,57	m
e	11	1,91	0,17	8,75	37,9	7,83	20,65	m
f	11	1,79	0,25	13,69	46,4	3,56	7,66	m
g	11	1,75	0,20	11,48	42,4	7,31	17,26	m
h	11	1,59	0,18	11,10	46,4	4,59	9,90	m
i	11	1,55	0,20	12,80	40,1	5,66	14,13	m
j	11	1,35	0,19	14,03	45,2	6,23	13,78	m
k	6	1,27	0,20	15,45	41,0	5,48	13,36	m

TABELA -11- Cromossomos mitóticos metafásicos de *Vigna radiata*.
 Médias do comprimento cromossômico (\bar{X}) e do índice centromérico (\bar{Y}) com seus respectivos desvios-padrões (DP) e coeficientes de variação (CV%). Posição do centrômero: m-mediana; sm- submediana. Número de medições: n. Satélite: *.

PAR	n	COMPRIMENTO (μm)			ÍNDICE CENTROMÉRICO			CENTR.
		\bar{X}	DP	CV%	\bar{Y}	DP	CV%	
a*	11	2,43	0,22	8,99	38,2	6,91	19,08	m
b	11	2,39	0,21	8,66	46,8	3,52	7,51	m
c	11	2,03	0,16	7,67	43,6	3,26	7,48	m
d	11	1,91	0,17	8,93	49,4	1,29	2,62	m
e	11	1,76	0,17	9,83	42,6	5,30	12,42	m
f	11	1,68	0,24	14,26	48,7	2,24	4,60	m
g	11	1,62	0,22	13,90	42,0	5,83	13,88	m
h	11	1,53	0,18	12,10	47,0	3,46	7,37	m
i	10	1,41	0,18	12,96	47,5	4,03	8,49	m
j	8	1,40	0,16	11,48	43,6	6,48	14,85	m
k	5	1,26	0,23	18,48	46,2	3,77	8,16	m

TABELA 12- Cromossomos mitóticos metafásicos de *Vigna unguiculata*. Médias do comprimento cromossômico (\bar{X}) e do índice centromérico (\bar{Y}) com seus respectivos desvios-padrões (DP) e coeficientes de variação (CV%). Posição do centrômero: m - mediana; sm - submediana. Número de mediações: n.

PAR	n	COMPRIMENTO (μm)			ÍNDICE CENTROMÉRICO			CENTR.
		\bar{X}	DP	CV%	\bar{Y}	DP	CV%	
a	10	2,46	0,39	16,03	42,1	3,11	7,38	m
b	10	2,12	0,27	12,73	45,9	3,54	7,72	m
c	10	2,01	0,26	13,12	37,7	3,65	9,69	m
d	10	1,95	1,99	10,20	43,0	2,21	5,14	m
e	10	1,89	0,23	12,00	46,4	3,31	7,13	m
f	10	1,79	0,23	12,91	40,1	4,36	10,87	m
g	10	1,76	0,18	10,23	48,0	3,09	6,44	m
h	10	1,65	0,21	12,99	47,4	3,63	7,65	m
i	10	1,60	0,18	11,46	41,9	6,10	14,56	m
j	10	1,47	0,20	13,62	40,2	5,94	14,78	m
k	9	1,40	0,18	12,63	47,4	5,00	10,54	m

TABELA 13- Fôrmulas cariotípicas de espécies de *Macroptilium* , *Phaseolus* e *Vigna*. Posição do centrômero: m-mediana ; sm - submediana. Comprimento cromossômico: A-entre 3 e 4 μ m ; B- entre 2 e 3 μ m ; C-entre 1 e 2 μ m . Satélite: *.

ESPÉCIE	FÔRMULA CARIOTÍPICA
<i>M. atropurpureum</i>	5m(B) + 5m(C) + 1 sm(C)
<i>M. bracteatum</i>	5m(B) + 1m(B)* + 1sm(B) + 4m(C)
<i>M. erythroloma</i>	2m(B) + 1m(B)* + 8m(C)
<i>M. lathyroides</i>	2m(B) + 9m(C)
<i>P. coccineus</i>	1sm(A)* + 2m(B) + 2sm(B)* + 2sm(B) + 3m(C) + 1sm(C)
<i>P. lunatus</i>	4m(B) + 2sm(B)* + 5m(C)
<i>P. vulgaris</i>	3m(B) + 2sm(B)* + 2sm(B) + 3m(C) + 1sm(C)
<i>P. peduncularis</i>	3sm(B) + 8m(C)
<i>V. radiata</i>	2m(B) + 1m(B)* + 8m(C)
<i>V. unguiculata</i>	3m(B) + 8m(C).

TABELA 14- Valores de comprimento total da cromatina (CTC), em micrômetros, e de TF% para espécies dos gêneros *Macroptilium*, *Phaseolus* e *Vigna*.

ESPÉCIES	CTC (μm)	TF%
<i>M. atropurpureum</i>	43,00	44,91
<i>M. bracteatum</i>	47,58	43,72
<i>M. erythroloma</i>	39,48	48,69
<i>M. lathyroides</i>	35,46	47,16
<i>P. coccineus</i>	49,34	39,85
<i>P. lunatus</i>	45,18	42,95
<i>P. vulgaris</i>	47,32	38,73
<i>V. peduncularis</i>	39,30	42,15
<i>V. radiata</i>	38,84	45,05
<i>V. unguiculata</i>	40,20	43,65

7) DISCUSSÃO

7.1) TÉCNICAS CITOLÓGICAS

Os bons resultados de espalhamento de cromossomos obtidos com o pré-tratamento de raízes do complexo *Phaseolus-Vigna Macroptilium* com PDB sugerem que parece ser inevitável o emprego dessa técnica para elaboração de cariótipos em espécies desse grupo, apesar dos problemas que possam advir de sua utilização.

Mesmo considerando que espécies de *Phaseolus* (s.l.) têm cromossomos curtos e que, segundo as observações de CONAGIN (1950), o pré-tratamento com PDB acentua a forma de cromossomos longos, mas não a de curtos, a determinação do período ideal de pré-tratamento trouxe as facilidades atribuídas por SHARMA & SHARMA (1972) para o estudo de cromossomos, considerando não só o espalhamento como a visualização de constrições dos cromossomos.

Segundo SHARMA & SHARMA (1972), o pré-tratamento, independentemente da substância utilizada, quebra o balanço de viscosidade entre os constituintes do citoplasma e do fuso de divisão, destruindo o mecanismo deste. Isto faz com que os cromossomos fiquem livres dentro da célula, assegurando desse modo altas freqüências de células em metáfase e cromossomos bem espalhados. A visualização de constrições cromossômicas também se deve à mudança de viscosidade do citoplasma, levando à hidratação diferencial de segmentos dos cromossomos.

O excesso no período de pré-tratamento pode provocar não só o encurtamento em demasia dos cromossomos, como le-

var à duplicação do número de cromossomos, pela quebra do mecanismo do fuso (MEYER, 1945). BISWAS & BHATTACHARYA (1976) induziram poliplóides em *Phaseolus vulgaris* através do tratamento com colquicina, uma droga comumente usada em pré-tratamento e que é bastante conhecida como agente responsável pela duplicação de cromossomos em um número infindável de plantas agrícolas.

A padronização do período de pré-tratamento para todas as espécies aqui estudadas permitiu a comparação dos resultados obtidos, embora se deva considerar que durante o pré-tratamento as células possam estar em diferentes estádios de divisão, o que pode interferir sobre o grau de contração e sobre a forma dos cromossomos. Assim, o período de pré-tratamento com PDB durante 3 horas foi considerado ideal para a elaboração de cariótipos em *Phaseolus*, *Macroptilium* e *Vigna*, por acentuar a forma dos cromossomos.

Apesar de todos os cuidados tomados para se determinar as condições mais adequadas para a obtenção de todas as preparações citológicas, é necessário registrar a dificuldade na obtenção dos resultados. Mesmo após a padronização de todos os detalhes de técnica, foi necessário elaborar um grande número de lâminas para cada uma das espécies estudadas. Tal dificuldade parece ser inerente ao trabalho citológico.

A dificuldade em evidenciar com nitidez a morfologia dos cromossomos, o que é uma característica do material estudado, aliada ao tamanho razoavelmente pequeno dos mesmos, foi um dos fatores que mais prejudicaram esse estudo citológico.

Outro ponto de dificuldade observado foi uma resposta diferencial na obtenção de melhores preparações citológicas em determinadas épocas do ano. Mesmo controlando-se a tempera -

tura de germinação de sementes, apenas foram obtidas lâminas com células que pudessem ser utilizadas nesse estudo a partir de raídiculas emergidas nos meses de temperatura mais alta. Em outro período, o número de divisões celulares foi pequeno e dificilmente se podia obter o padrão de espalhamento e de contração cromossômicos desejáveis. Essa resposta diferencial a condições ambientais já foi verificada em outros grupos vegetais, como em *Hippastrum*, porém, neste caso, melhores preparações citológicas foram obtidas no período de inverno (J.A.A. Dutihl, comunicação pessoal).

Os valores de desvio-padrão (DP) e de coeficiente de variação (CV%) referentes ao comprimento cromossômico e ao índice centromérico para cada par cromossômico das espécies estudadas dão uma idéia da variação dos resultados obtidos. Em termos estatísticos, pode-se dizer que o CV% dá uma idéia da imprecisão do experimento, sendo considerado baixo quando inferior a 10%; médio, quando de 10 a 20%; alto, quando de 20 a 30%; e muito alto, quando superior a 30% (GOMES, 1978).

Assim, observando os valores de CV% apresentados nas TABELAS 3 a 12, nota-se que a grande maioria deles se enquadra na classe de CV% médio. Como maiores exceções, estão os valores de CV% para os índices centroméricos de *M. erythroloma*, onde quase todos os valores são menores do que 10% (CV% baixo) e também *P. vulgaris*, em que, ao contrário, mais da metade dos valores de CV% podem ser considerados altos. No total, dentre os valores de CV% apresentados nas TABELAS 3 a 12, em apenas 6,8% foram observados CV% classificados como altos.

Embora se tenha procurado padronizar diversos fatores que pudessem interferir nos resultados, como as condições para germinação de sementes, o comprimento das raízes primárias co

letadas, o período de pré-tratamento e outros detalhes de técnica citológica, como as condições para as medições dos cromossomos, outros fatores podem ser responsáveis pelas variações observadas. Dentre estes, possivelmente a contração cromatínica diferencial (BAJER, 1959; SASAKI, 1961; MATÉRN & SIMAK, 1968) seja a principal responsável pelas variações observadas nos valores de comprimento cromossômico e de índice centromérico e que são representados pelos respectivos DP e CV%, apresentandos nas TABELAS 3 a 12. Nestas tabelas pode-se observar que os maiores valores de CV% de comprimento cromossômico não guardam correspondência com os de índice centromérico. Isso parece corroborar a afirmação de que a contração cromatínica diferencial seja a principal responsável pelas variações observadas. Contrações diferenciais no comprimento como um todo podem ser advindas da contração total do cromossomo ou de uma contração maior do braço longo ou vice-versa. Contração diferenciais dos braços são refletidas nos CV% dos índices centroméricos e sua influência no comprimento cromossômico é também refletida no CV% dos comprimentos, como pode ser observado nas TABELAS 3 a 12.

7.2) CITOTAXONOMIA E EVOLUÇÃO

Algumas das espécies apresentadas no presente trabalho já foram também investigadas por outros autores ao nível de metáfase mitótica, como por SEN & BHOWAL, (1960); MARÉCHAL (1969, 1970); SINGH & ROY (1970), SARBHOY (1977, 1978a, 1978b, 1980); JOSEPH & BOUWKAMP (1978) e SINHA & ROY (1979a). Contudo, não houve concórdância nos resultados na maioria dos casos.

As TABELAS 15 e 16 apresentam, respectivamente, os valores de CTC e de TF% para as dez espécies estudadas, segundo diferentes autores. Na TABELA 17 são apresentados os cariótipos elaborados por esses autores nas diferentes espécies. Para cada uma das espécies apresentadas no presente trabalho, nas TABELAS 15, 16 e 17 foram verificados os seus respectivos nomes científicos antigos, fazendo-se a equiparação de acordo com a revisão apresentada por MARÉCHAL *et alii* (1978). Assim, dentre os diversos trabalhos citados nas referidas tabelas, foi possível comparar cariótipos de espécies aparentemente distintas que, na realidade, representam uma mesma unidade taxonômica. Também se observa na TABELA 17 que cariótipos de três espécies, como *M. erythrolo-*
ma, *V. peduncularis* e *V. unguiculata* são originalmente apresentados no presente trabalho.

Ainda complementando a TABELA 17, a morfologia de cromossomos de *V. unguiculata* foi estudada por outros autores, embora sua respectiva fórmula cariotípica ainda não houvesse sido apresentada. SEN & BHOWAL (1960) estudaram essa espécie sob a denominação de *V. sinensis*, *V. sesquipedalis* e *V. catjang*, observando-se grande semelhança nos três casos estudados, com dois pares cromossômicos com satélite e predominância de cromossomos metacêntricos. Em oposição, no trabalho de SRIVASTAVA & NAITHANI (1964), onde *V. unguiculata* é referida como *V. catjang*, dez de seus onze pares cromossômicos apresentam constrição primária subterminal, não se detectando a ocorrência de satélites.

A não concordância nos resultados citológicos obtidos pelos diversos autores supracitados, no que se refere à forma de cromossomos e visualização de satélite (TABELAS 15, 16 e

TABELA 15- Valores de CTC, em micrômetros, de espécies de *Ma - croptilium*, *Phaseolus* e *Vigna*, encontrados na literatura.

(1) -MARÉCHAL(1969,1970); (2) THUAN (1975); (3) SARBHOY (1977,1978,1980); (4) JOSEPH & BOUWKAMP (1978); (5) SINHA & ROY(1979); (6) presente trabalho.

ESPÉCIES	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
<i>M. atropurpureum</i>	46,89		30,90	-	33,98	43,00
<i>M. bracteatum</i>	-		30,80	43,26	-	47,58
<i>M. erythroloma</i>	40,25		-	-	-	39,48
<i>M. lathyroides</i>	32,19		28,60	22,34	-	35,46
<i>P. coccineus</i>	43,55	44,6	35,20	26,98	-	49,34
<i>P. lunatus</i>	42,41		35,20		31,86	45,18
<i>P. vulgaris</i>	34 a42	40,6	-		30,54	47,32
<i>V. peduncularis</i>						39,30
<i>V. radiata</i>	31 a37	42,4	37,40	23,94	34a40	38,84
<i>V. unguiculata</i>	35 a37		-	-	-	40,20

TABELA 16- Valores de TF% de espécies de *Macroptilium*, *Phaseo - lus* e *Vigna*, segundo a literatura: (1) SARBHOY (1978 , 1980), (2) JOSEPH & BOUWKAMP (1978); (3) SINHA & ROY (1979); (4) presente trabalho.

ESPÉCIES	(1)	(2)	(3)	(4)
<i>M. atropurpureum</i>	45,40	-	41,20	44,91
<i>M. bracteatum</i>	45,60	43,40	-	43,72
<i>M. erythroloma</i>	-	-	-	48,69
<i>M. lathyroides</i>	39,80	42,20	-	47,16
<i>P. coccineus</i>	46,57	42,02	-	39,85
<i>P. lunatus</i>	47,15	-	45,13	42,95
<i>P. vulgaris</i>	49,25a49,90	-	42,50	38,73
<i>V. peduncularis</i>	-	-	-	42,15
<i>V. radiata</i>	46,14	40,43	40,55a42,21	45,05
<i>V. unguiculata</i>	-	-	-	43,65

17) pode ser devida a vários fatores, como à possível variação genética existente entre indivíduos de uma mesma espécie (DATTA , 1975; KAMALA, 1976; VERMA & OHRI, 1979; SINHA & KUMAR, 1979; GOSWAMI , 1979; SHIFINO-SAMPAIO, 1979) e à idade e condição ambiente a que a planta esteve submetida (PIERCE, 1937; REES *et alii*, 1966; REES & JONES, 1968; BENNETT & REES, 1969; BENNETT, 1970; FLANNAGAN & JONES ; 1973; VERMA & OHRI, 1979). Além destes, podem ser citados como fatores responsáveis pela não concordância nos resultados obtidos, procedimentos de técnica citológica (SYBENGA, 1959; MARÉCHAL, 1970, SHARMA & SHARMA, 1972) e o critério de classificação de cromossomos, principalmente para cromossomos com posição de centrômero intermediária, ou seja, de transição entre tipos metacêntricos e submetacêntricos e, eventualmente, entre estes e subterminais.

SINGH & ROY (1970) e SINHA & ROY (1979) não mencionaram o critério adotado para a classificação dos cromossomos. JOSEPH & BOUWKAMP (1978) basearam-se na nomenclatura apresentada por SRIVASTAVA *et alii* (1973 *apud* JOSEPH & BOUWKAMP, 1978), enquanto que SARBHOY (1977, 1978a, 1978b, 1980), da mesma forma que no presente trabalho, segue a nomenclatura proposta por LEVAN *et alii* (1964). Existem ainda outros sistemas de classificação cromossômica não utilizados na elaboração de cariótipos em *Phaseolus*, como o de ADHIKARY (1974) e o de BATTAGLIA (1955), os quais, da mesma forma que os citados anteriormente, se baseiam na proporção de braços cromossômicos.

Assim, a existência de diversos sistemas de nomenclatura atesta a necessidade de padronização da classificação da posição da constrição primária para estudos de cariótipos. Talvez seja mais conveniente utilizar a nomenclatura proposta por LEVAN *et alii* (1964), que, na determinação do índice centroméri-

TABELA -17- Fórmulas cariotípicas de espécies de *Macroptilium*, *Phaseolus* e *Vigna*, segundo diversos autores. Posição do centrômero: m - mediana; sm-submediana; st -sub-terminal, nm-quasimediana; nst - quasisubterminal. Comprimento do cromossomo: A-maior do que 3 μm ; B - entre 3 e 2 μm ; C- entre 2 e 1 μm ; D- menor do que 1 μm . * satélite.

AUTORES	<i>M. ATROPURPUREUM</i>
SINGH & ROY (1970)	1m(C) + 5sm(C) + 2m(D) + 3sm(D)
SARBHOY (1978)	2nm(C) + 6sm(C) + 3m(C)
SARBHOY (1980)	2m(C) + 4sm(C) + 3m(D) + 2sm(D)
SINHA & ROY (1979)	5m(C) + 6sm(C)
NESTE TRABALHO	5m(B) + 5m(C) + 1sm(C)
AUTORES	<i>M. BRACTEATUM</i>
JOSEPH & BOUWKAMP (1978)	4m(B) + 2sm(B) + 1sm(B)* + 2m(C) + 1sm(C) + 1sm(C)*
SARBHOY (1980)	3m(C) + 5sm(C) + 3m(D) + 1sm(C)*
NESTE TRABALHO	5m(B) + 1m(B)* + 1sm(B) + 4m(C)

TABELA 17 (Continuação)

AUTORES	<i>M. ERYTHROLOMA</i>
NESTE TRABALHO	2m(B) + 1m(B) [*] + 8m(C)
AUTORES	<i>M. LATHYROIDES</i>
SINGH & ROY, 1970	3m(C) + 6sm(C) + 2m(D)
JOSEPH & BOUWKAMP (1978)	1m(C) + 1m(C) [*] + 2sm(C) + 4m(D) + 2sm(D) + 1st(D)
SARBHOY (1980)	5sm(C) + 3m(C) + 1sm(D) + 2st(D)
NESTE TRABALHO	2m(B) + 9m(C).
AUTORES	<i>P. COCCINEUS</i>
JOSEPH & BOUWKAMP (1978)	1sm(C) + 5m(D) + 4sm(D) + 1st(D)
SARBHOY (1980)	2sm(B) + 4sm(C) + 2m(C) + 3m(D)
NESTE TRABALHO	1sm(A) [*] + 3m(B) + 2sm(B) [*] + 1sm(B) + 3m(C) + 1sm(C)
AUTORES	<i>P. LUNATUS</i>
SINHA & ROY (1978)	7m(C) + 3sm(C) + 1st(C)
SARBHOY (1980)	4m(B) + 5sm(C) + 2m(D) + 1m(B) [*]
NESTE TRABALHO	4m(B) + 2sm(B) [*] + 5sm(C)

TABELA 17 (Continuação)

AUTORES	<i>P. VULGARIS</i>
SINHA & ROY (1979)	4m(C) + 6sm(C) + 1nst(C)
SARBHOY (1980)	4m(B) + 3sm(C) + 4m(C)
NESTE TRABALHO	3m(B) + 2sm(B) [*] + 2sm(B) + 3m(C) + 1sm(C)
AUTORES	<i>V. PEDUNCULARIS</i>
NESTE TRABALHO	2sm(B) + 1m(B) + 8m(C)
AUTORES	<i>V. RADIATA</i>
JOSEPH & BOUWKAMP (1978)	3m(C) + 1sm(C) + 1st(C) + 3m(D) + 3sm(D)
SINHA & ROY (1979)	4m(C) + 5sm(C) + 1sm(B) + 1st(B) [*]
SINHA & ROY (1979)	5m(C) + 3sm(C) + 2nst(C) + 1st(B)
SINHA & ROY (1979)	4m(C) + 1m(B) + 5sm(C) + 1st(B) [*]
SARBHOY (1980)	2sm(B) + 3sm(C) + 3m(C) + 3m(D) + 1sm(B) [*]
NESTE TRABALHO	2m(B) + 1m(B) [*] + 8m(C)
AUTORES	<i>V. UNGUICULATA</i>
NESTE TRABALHO	3m(B) + 8m(C)

co, utiliza o mesmo procedimento empregado por HAGA (1937) para determinar o índice F%, que expressa a razão entre o comprimento do braço curto pelo comprimento total de cada cromossomo do complemento. Assim, como muitos trabalhos sobre cariótipos apresentam esse índice F% é possível fazer uma correspondência direta com o índice centromérico de LEVAN *et alii* (1964), permitindo, dessa forma, a comparação de resultados obtidos por diferentes autores.

No presente trabalho, a visualização de satélites constituiu-se em uma grande dificuldade, talvez devido ao tamanho bastante reduzido dos cromossomos, os quais raramente são maiores que 3 μ m. A visualização de satélites parece ser melhor sucedida no estágio bem inicial da metáfase mitótica, ou seja, antes de os cromossomos atingirem seu maior grau de contração. A FIGURA 6 mostra uma célula de *M. erythroloma* com cromossomos bastante distendidos, permitindo observar constrição secundária em dois pares cromossômicos. Em outras células examinadas, onde os cromossomos se acham mais contraídos, foi possível visualizar somente um par com satélite. Ao que parece, à medida que a contração dos cromossomos se acentua, a constrição secundária vai se tornando imperceptível.

Dessa forma, a observação de células em diferentes estádios de metáfase mitótica pode levar à determinação inexata do cariótipo de uma espécie. Esse fato, talvez, possa ser o principal responsável pela discordância nos resultados apresentados na TABELA 17 no que se refere à observação de satélites por parte de diferentes autores, embora não se possa descartar a possibilidade de ocorrência de outros fatores responsáveis por diferenças na observação de cromossomos portadores de satélite, como supressão genética ou alterações estruturais em cromossomos

com provável função de organização nucleolar.

JOSEPH & BOUWKAMP (1978) citaram dois pares cromossômicos com satélite para *M. bracteatum*, enquanto que, no presente trabalho, apenas um foi observado. Aqueles autores também citaram dois pares cromossômicos com satélite para *M. lathyroides*, porém aqui estes não foram observados. Já em *M. erythroloma* também foi encontrado um único par cromossômico com satélite, não se dispondo de dados comparativos para essa espécie.

Em *V. radiata*, SINHA & ROY (1979) e SARBHOY (1980) verificaram a existência de um único par cromossômico com satélite, porém, no primeiro caso, esse localizava-se em cromossomos com centrômero na posição subterminal e, no segundo, num submediano, enquanto que aqui foi observado em cromossomos com centrômero mediano ($ic = 0,38$), bem próximo à transição para submediano.

Em *V. unguiculata*, tanto no presente trabalho como no de SRIVASTAVA & NAITHANI (1964), onde tal espécie era denominada por *V. catjang*, não foram observados cromossomos com satélites. Por outro lado, SEN & BHOWAL (1960) citaram a presença de dois pares de cromossomos com satélites em *V. sinensis*, *V. sesquipedalis* e em *V. catjang*, que são sinônimos dessa mesma espécie *V. unguiculata*.

No que se refere a *P. lunatus*, foi detectada a ocorrência de dois pares com satélites. Por outro lado, SARBHOY (1980) citou a ocorrência de único par, enquanto SINHA & ROY (1978) não detectaram satélites nessa espécie.

Em *P. vulgaris* e em *P. coccineus* foram observados, respectivamente, dois e três cromossomos com satélite, enquanto que MOK & MOK (1976), autores que trabalharam com bandamento nes

“sas espécies, verificaram a ocorrência de constrições secundárias em dois pares cromossômicos em cada uma delas. BHATTACHARYA (1978) também aplicou a técnica de bandamento em *P. vulgaris*, encontrando igualmente dois pares cromossômicos com satélite, enquanto que NAGL (1969), desenvolvendo tal tipo de estudo em *P. coccineus*, constatou a ocorrência de três pares com constrição secundária. CHENG & BASSET (1981) estudaram a morfologia de cromossomos de *P. vulgaris* na fase de diplóteno, detectando apenas um cromossomo ligado ao nucléolo.

Talvez, para se determinar com maior segurança o número de satélites de uma determinada espécie, seja necessário recorrer a outros tipos de análise, como através da técnica do bandamento NOR (região organizadora do nucléolo) ou através da contagem de cromossomos (bivalentes) ligados ao nucléolo, fazendo-se a correspondência com o número de cromossomos em metáfase mitótica com constrição secundária.

Contudo, nem sempre é observada tal correspondência ao comparar resultados da análise meiótica e mitótica de algumas espécies apresentadas por SARBHOY (1978a, 1978b, 1980) e por SINHA & ROY (1979). No trabalho de SARBHOY (1980), por exemplo, a espécie *M. bracteatum* é citada como tendo um par de cromossomos com satélite em metáfase mitótica, enquanto que na prófase meiótica são observados dois pequenos nucléolos, supondo-se que a cada um deles se associe pelo menos um par de cromossomos homólogos, ou seja, que possuam constrição secundária.

Utilizando este mesmo tipo de comparação, em certos casos pode haver coincidência no número de constrições secundárias numa determinada espécie, embora não haja coincidência quan

to à posição do cromossomo em que se localizam no ideograma . Isso foi verificado por KRISHNAN & DE (1965) em *P.aureus*, sendo que na fase de paquíteno os cromossomos com constrição secundária eram o oitavo e o nono em ordem decrescente de tamanho, enquanto que em metáfase mitótica eram os dois mais longos. Igualmente para *P.mungo*, DE & KRISHNAN (1966) verificaram que em paquíteno os cromossomos ligados ao nucléolo eram o sétimo e o nono, enquanto que em metáfase mitótica tais cromossomos foram classificados como o segundo e o terceiro, sempre em ordem decrescente de comprimento.

Analisando-se os índices cariotípicos apresentados na TABELA 14 podem ser feitas algumas considerações a respeito da caracterização cromossômica das dez espécies aqui estudadas. Assim, em termos de CTC (TABELA 14), embora a discussão não seja argumentada em testes estatísticos, pode-se reconhecer, a grosso modo, três grupos distintos. No primeiro, em que são agrupadas as espécies de cromossomos mais curtos, podem ser distinguidas *M.lathyroides*, *M.erythroloma*, *V.peduncularis*, *V.radiata* e *V.unguiculata*, variando de 35,46 a 40,20 μm . A seguir, observa-se *M.atropurpureum*, com valor de CTC de 43,0 μm que parece ser intermediário entre o primeiro e o terceiro grupo, sendo este último constituído pelas espécies *M.bracteatum* e as três de *Phaseolus* ou seja *P.lunatus*, *P.vulgaris* e *P.coccineus*, variando de 45,18 a 49,34 μm .

No que se refere a índice centromérico (TABELA 14) expresso pelo índice TF%, cada um dos três gêneros estudados parece ser representado por um grupo diferente, embora haja valores de sobreposição entre eles. Assim, no gênero *Phaseolus*

são observados os menores valores, variando de 38,73 a 42,95, seguindo-se em posição intermediária o gênero *Vigna*, com variação de 42,15 a 45,05 e, finalmente, o terceiro grupo representado pelo gênero *Macroptilium*, que possui valores variando de 43,72 a 48,69. Assim, o parâmetro Índice centromérico parece ser mais efetivo para separar as espécies e gêneros estudados, sendo também mais sintético para a análise dos resultados, já que leva em conta conjuntamente o comprimento cromossômico e a relação entre seus braços.

Um resultado interessante a ser discutido é a relação entre as espécies de *Phaseolus* estudadas, havendo sempre maior semelhança entre caracteres cariotípicos de *P. coccineus* e *P. vulgaris* do que com *P. lunatus*. Tais resultados estão de acordo com estudos baseados em caracteres bioquímicos, citológicos, de hibridações interespecíficas e morfológicos, nos quais foram discutidos os relacionamentos entre aquelas três espécies.

Assim, do ponto de vista bioquímico, podem ser citados os estudos de KLOZ (1971), DERBISHIRE et alii (1976a) e de MICHELIN-RAMOS (1980). No primeiro, foi detectada a presença de faseolina em *P. vulgaris* e em *P. coccineus*, mas não em *P. lunatus* (KLOZ, 1971). Através da determinação do padrão de bandas protéicas e do potencial de aglutinação de extratos de sementes com relação ao grupo O de células sanguíneas humanas, DERBISHIRE et alii (1976a) concluíram que *P. vulgaris* e *P. coccineus* são proximoamente relacionadas, enquanto que *P. lunatus* difere destas apenas por ligeiras reações imunoquímicas, não apresentando a glicoproteína II como a maior proteína da semente. Já MICHELIN-RAMOS (1980), através do estudo do padrão eletroforético de ban-

das protéicas, determinou que a principal proteína de reserva de sementes das espécies de *P.vulgaris*, *P.coccineus* e de *P.acutifolius* é a globulina I, enquanto que em *P.lunatus* não foi possível afirmar se esta realmente ocorre, devido à obtenção de bandas fracas e não proeminentes. É interessante assinalar a correspondência entre os resultados obtidos por MICHELIN-RAMOS (1980) e por DERBYSHIRE *et alii* (1976a), já que a globulina I e a glicoproteína II mencionadas por esses autores, respectivamente, parecem ser equivalentes. A globulina I é uma preparação impura da glicoproteína II (DERBYSHIRE *et alii*, 1976b).

Considerando resultados de hibridações interespecíficas também é possível verificar a maior proximidade de *P.vulgaris* com *P.coccineus* do que entre alguma delas com *P.lunatus*. Embora seja mais fácil obter híbridos no cruzamento entre *P.vulgaris* e *P.coccineus*, quando a primeira espécie é utilizada como parental feminino (AL YASIRI & COYNE, 1966; HAWKINS & EVANS, 1973; THOMAS, 1974; SAVOVA, 1979), há citações de hibridação natural entre elas (Tschermak-Seyseneg, 1942 *apud* SMARTT, 1970; MIRANDA, 1967; RUTGER & BECKHAM, 1970). Embora o sucesso na hibridação dependa dos cultivares utilizados, estudos citogenéticos de híbridos entre *P.vulgaris* X *P.coccineus* revelaram a ocorrência de pareamento predominantemente por bivalentes (HAQ *et alii*, 1980) com apenas 5 a 10% de univalentes (SAVOVA, 1979), sugerindo que a barreira interespecífica não deve estar a nível cromossômico.

Com relação à *P.lunatus*, as tentativas de cruzamentos com *P.vulgaris* parecem ter sido menos bem sucedidas. Alguns autores obtiveram êxito na hibridação, como HONMA & HEECKT (1959), porém em outros trabalhos houve abscisão das vagens em desenvolvimento (AL YASIRI & COYNE, 1966; HAQ *et alii*, 1978) sen

do necessário recorrer à cultura de embriões *in vitro*. Por outro lado, no cruzamento artificial entre *P.coccineus* e *P.lunatus* foram observados melhores resultados, obtendo-se híbridos quando a primeira espécie foi utilizada como parental feminino (HONMA & HEECKT, 1958). SMARTT (1970) mediante a análise de resultados obtidos em cruzamentos de espécies de *Phaseolus*, concluiu que *P.lunatus* divergiu antes de *P.acutifolius* em relação à linha *P.vulgaris*-*P.coccineus*. Em concordância com tais sugestões, BURNS (1977) propôs um novo sistema de classificação, objetivando a transferência de caracteres agrônômicos desejáveis para *P.vulgaris*, através do qual *P.vulgaris* e *P.coccineus* estão proximoamente relacionadas, seguindo-se *P.acutifolius* e, finalmente, em posição mais distante, está *P.lunatus*.

Em termos citológicos é difícil comparar cariótipos de *P.coccineus*, *P.lunatus* e *P.vulgaris* já que foram apresentados para as três espécies conjuntamente apenas aqui e por SARBHOY (1980). Para SARBHOY (1980), tanto em termos de CTC como de TF%, as espécies *P.coccineus* e *P.lunatus* têm valores mais próximos entre si do que com *P.vulgaris* (TABELAS 15 e 16). Por outro lado, os dados aqui apresentados na TABELA 14 mostram que as espécies *P.coccineus* e *P.vulgaris* têm valores de CTC e de TF% muito mais próximos, do que com relação a *P.lunatus*. Além disso, a observação dos ideogramas apresentados na FIGURA 2, cuja síntese é apresentada na TABELA 13 através das respectivas fórmulas cariotípicas sugere a maior proximidade das espécies *P.coccineus* com *P.vulgaris*. Nas fórmulas cariotípicas essas espécies diferem apenas em um dos três maiores pares cromossômicos, já que em *P.vulgaris* estes apresentam centrômeros em posição mediana, tendo comprimento variando de 2 a 3 μ m, enquanto que em *P.coccineus*

apenas dois deles apresentam estas características morfológicas, enquanto o outro é maior (entre 3 e 4 μm), tendo centrômero em posição submediana, além de uma constrição secundária.

As espécies *P.vulgaris* e *P.coccineus* também foram comparadas através de cariótipos obtidos pela técnica de bandamento (MOK & MOK, 1976) e através de cariótipos obtidos pela análise de cromossomos meióticos em diplôteno (CHENG & BASSET, 1981), não sendo constatadas diferenças apreciáveis entre elas, o que sugere o íntimo relacionamento entre essas duas espécies. Infelizmente, não se dispõe de dados semelhantes para a espécie *P.lunatus*.

Através de estudos taxonômicos, envolvendo não só caracteres morfológicos, mas também todos os disponíveis, MARÉCHAL *et alii* (1978) reconheceram as espécies *P.vulgaris* e *P.coccineus* como integrantes de um grupo com alto índice de similaridade, que variava de 82 a 91%. No extremo oposto, a uma distância considerável, acha-se *P.lunatus*, com apenas 65 a 75% similaridade, estando outras espécies mais próximas ao grupo de *P.vulgaris* e *P.coccineus*. *P.acutifolius* mostra similaridade de 80 a 83% com *P.vulgaris* e de 75 a 81% com *P.lunatus*, sendo intermediária entre esses dois grupos.

Embora os cromossomos de espécies de *Macroptilium*, de *Phaseolus* e de *Vigna* não apresentem diferenças acentuadas na forma e nem tampouco em número, podem ser discutidas algumas tendências evolutivas dentre as espécies estudadas.

Contudo, tal discussão deve levar em consideração que determinadas características cromossômicas não podem ser apontadas como critérios unidirecionais para avaliar-se a direção do processo evolutivo. A evolução do complemento cromossômico em di

ferentes organismos pode ter ocorrido em diferentes direções e a extrapolação de conceitos de um grupo para outro deve ser considerada com extrema cautela (JONES,1970).

A análise conjunta de diferenças na posição do centrômero e no comprimento relativo dos cromossomos possibilitou a criação do conceito de simetria de cariótipos por Levitsky (STEBBINS,1971).Embora existam evidências contrárias em alguns grupos de plantas (JONES,1970),geralmente é aceita a tendência a aumentar a assimetria em plantas superiores (STEBBINS,1971).O aumento em assimetria cariotípica em gêneros com número cromossômico constante pode ter sido causado por inversões pericêntricas ou translocações desiguais (STEBBINS,1971). Particularmente para o gênero *Phaseolus*,tais alterações estruturais são citadas como as principais responsáveis na evolução, ao contrário de alterações em número de cromossomos, como poliploidia (SARBHOY , 1977).

A comparação de valores de TF% propicia a análise do grau de simetria de cariótipos, sendo maior nos valores próximos a 50. Assim, analisando a TABELA 14, a espécie com cariótipo mais assimétrico é *P. vulgaris* (TF% = 38,3), seguida por *P. lunatus* (TF% = 42,30),ficando o maior grau de simetria para as espécies de *Macroptilium*, especialmente *M. erythroloma* (TF% = 48,71).

Assim, embora os resultados de TF% sejam referentes a apenas dez espécies e se necessite ampliar o número de espécies em estudo, parece que, em termos de simetria de cariótipos, as espécies do gênero *Phaseolus* propriamente dito são mais evoluídas do que as de *Macroptilium*, estando as de *Vigna* em posição

intermediária. Contudo, é necessário considerar que os valores TF% obtidos neste trabalho não estão em concordância com os apresentados por outros autores, principalmente por SARBHOY (1980), segundo o qual *P. vulgaris* apresenta um cariótipo extramamente si métrico.

Contudo uma outra linha evolutiva sugerida para o gênero *Phaseolus* (s.l.) é a redução de CTC (SARBHOY, 1977). Examinando os valores de CTC apresentados na TABELA 14, dentre as dez espécies estudadas, os das três espécies de *Phaseolus* propriamente dito, classificam-se entre os quatro maiores, sendo a segunda posição ocupada por *M. bracteatum*. Assim, por esse critério, tais espécies de *Phaseolus* estariam entre as mais primitivas, portanto numa posição evolutiva oposta à sugerida pelo conceito de simetria de Levitsky. Aqui mais uma vez torna-se difícil traçar um paralelo entre estes resultados de CTC e os apresentados por outros autores, que no geral, são discordantes entre si.

Outros critérios podem ser empregados para determinar o grau de evolução de gêneros próximos, como é o caso de *Phaseolus*, *Macroptilium* e *Vigna*. Um deles é a variação da quantidade de DNA nuclear, porém seu significado não é muito claro (GRANT, 1975). Muitas vezes, diferenças no conteúdo de DNA entre espécies próximas podem estar relacionadas ao DNA redundante, o que pode ser deduzido da facilidade de hibridação entre espécies com grandes diferenças de DNA (AYONOADU, 1974).

Aquele autor estudou a variação da quantidade de DNA nuclear numa série de espécies de *Phaseolus* (s.l.), das quais *P. lathyroides*, *P. lunatus*, *P. coccineus* e *P. vulgaris* são comuns ao presente trabalho, encontrando os valores de 2,3; 2,5; 3,2; e 3,7;

Esses números por si sô, forneceria pouca informação, porém ao associá-los ao hábito de cada espécie (bi-anual para *P.lathyroides*, anual a perene para *P.lunatus* e *P.coccineus* e anual para *P.vulgaris*), AYONOADU(1974) sugeriu que a evolução no gênero *Phaseolus* (s.l.) ter-se-ia dado pelo ganho de material cromossômico, baseando-se na aceitação de que plantas anuais sejam mais recentes do que as perenes e bi-anuais. Dessa forma, *P.vulgaris* seria a espécie mais evoluída dentre as quatro analisadas. Essa hipótese choca-se com a de SARBHOY(1977), segundo a qual a evolução no gênero *Phaseolus* ter-se-ia dado por redução de CTC, porém a ela parecem-se adequar os valores de CTC aqui obtidos e mostrados na TABELA 14.

BENNETT & SMITH(1976) apresentam uma lista bastante grande com valores de DNA para inúmeras espécies de angiospermas dentre as quais se acham oito do gênero *Phaseolus* (s.l.) Nesta lista são também apresentadas outras informações, como ciclo de vida de cada espécie, sendo que, dentre as oito citadas, três são anuais, três são perenes, uma é bi-anual e, para a última, esse dado não é fornecido. Também neste trabalho, as maiores quantidades de DNA nuclear pertencem a espécies anuais.

MARÉCHAL *et alii*(1978,1981) apresentam as tendências evolutivas nesses três gêneros estudados. Segundo os autores, o início da diferenciação genérica deve ter se dado na região neotropical, sendo o subgênero *Sigmoidotropis* de *Vigna* considerado como o mais primitivo dentre as táxons infragenéricos de *Phaseolus*, de *Vigna* e de *Macroptilium*. De um lado, nesse gênero *Sigmoidotropis*, há tendências em direção a *Phaseolus* que culminam com a seção *Leptospron* e, de outro, há a tendência em dire -

ção aos demais subgêneros de *Vigna* do velho mundo, através da seção *Pedunculares*. O referido subgênero *Sigmoidotropis* apresenta caracteres morfológicos comuns a *Phaseolus*, como por exemplo, a presença de estípulas não recorrentes, e outros típicos de *Vigna*.

LEITÃO FILHO (1974) definiu caracteres primários e secundários para caracterizar as diversas espécies de *Phaseolus* (s.l.) sendo a forma da quilha e a posição do estigma considerados como caracteres primários. Através da análise desses caracteres, a antiga seção *Sigmoidotropis* de *Phaseolus* (s.l.) foi considerada como a mais primitiva do gênero, por apresentar quilha encurvada, formando uma nítida letra S, e por ter estigma subterminal.

STAINIER & HORVAT (1978), através do estudo da ultraestrutura da exina, determinaram a natureza da camada infratectum nos gêneros *Phaseolus* e *Vigna* como sendo columelar e granular, respectivamente, observando, contudo, que no subgênero *Sigmoidotropis* do gênero *Vigna* a referida camada tinha estrutura granular, mas com arranjo em colunas verticais, sendo, provavelmente, um ponto de junção primitivo entre linhas evolutivas desses dois gêneros.

MICHELIN-RAMOS (1980), através do estudo de eletroforese de proteínas de sementes, também concluiu que esse grupo *Sigmoidotropis* se apresenta intermediário entre *Phaseolus* e *Vigna*.

Assim, LEITÃO FILHO (1974), STAINIER & HORVAT (1978) e MICHELIN-RAMOS (1980) parecem confirmar o caráter intermediário de *Sigmoidotropis*, apontado como o subgênero mais primitivo em *Vigna*.

O subgênero *Lasiospron* do gênero *Vigna*, de distribuição neotropical, apresenta cinco caracteres distintivos des-

se gênero, como estípulas prolongadas, inflorescência contraída, pedicelos curtos, pólen triporado com exina de reticulação frouxa e estigma subterminal em uma das três espécies do grupo MARÉCHAL *et alii* ,1981).

No subgênero *Plectotropis*, que deve ter ser originado no velho mundo, já são encontradas todas as características típicas do gênero *Vigna* mencionadas anteriormente. Seu maior centro de variabilidade específica está concentrado na África, mas há espécies como *V. vexillata* com centro de variabilidade infra-específica tanto na África como na Ásia. Há dúvidas sobre o local original de penetração de estoques originários da América, se na África ou na Ásia. No velho mundo parecem ter divergido duas linhas evolutivas; uma delas direcionou-se para a Ásia, havendo especialização de estruturas florais, culminando no subgênero *Ceratotropis*, uma entidade taxonômica bastante homogênea; a outra linha resultou no subgênero *Vigna* nativo na África, representado por espécies que apresentam simplificação de morfologia floral, restaurando a simetria bilateral (MARÉCHAL *et alii*, 1981).

Pelas sugestões formuladas por MARÉCHAL *et alii* (1978 e 1981), os gêneros *Phaseolus* e *Macroptilium*, concentrados exclusivamente no continente americano, originaram-se independentemente a partir do subgênero *Sigmoidotropis* do gênero *Vigna*.

Aceitando as proposições evolutivas de MARÉCHAL (1978 e 1981) e considerando a tendência à assimetria cariotípica e ao ganho de material cromatínico como um grau mais evoluído, os resultados obtidos no presente estudo citotaxonômico, indicam que as espécies do gênero *Phaseolus* seriam mais evoluídas que as de *Vigna* e de *Macroptilium*. Entretanto, observa-se dis

cordância quando se comparam cariótipos das três espécies de *Vigna* aqui estudadas, sendo que cada uma delas enquadra-se dentro de um subgênero diferente. A espécie *V. peduncularis* pertence ao subgênero *Sigmoidotropis*, *V. radiata* ao subgênero *Ceratotropis* e *V. unguiculata* ao subgênero *Vigna*. Assim, pelo discutido anteriormente seria esperado que a espécie do subgênero *Sigmoidotropis* apresentasse menor valor de CTC e maior de TF% do que a das duas outras espécies, porém observa-se que a referida espécie mostra valores intermediários para esses dois parâmetros cromossômicos (TABELA 14). Contudo, é bom ressaltar o pequeno número de espécie aqui estudadas.

O estudo de linhas evolutivas no complexo *Phaseolus-Vigna-Macroptilium* torna-se bastante complicado porque algumas espécies de *Phaseolus* e de *Vigna* foram domesticadas pelo Homem, sofrendo processo gradual de seleção que visou a preservação de características agronômicas favoráveis. Por outro lado, as espécies de *Macroptilium* não devem ter passado por tal processo e, somente agora, algumas de suas espécies estão sendo cultivadas como plantas forrageiras, passando por um programa de melhoramento genético.

BURKART (1952), SMARTT (1976) e EVANS (1980) apresentam diversas características que parecem decorrentes da domesticação de diferentes espécies do complexo. Entre as características mais citadas estão a perda de deiscência de frutos e a redução ou desaparecimento de endocarpo fibroso para evitar a perda das sementes.

Foi observado nas espécies estudadas de *Macroptilium* e de *Vigna* com exceção de *V. unguiculata*, que as vagens são deis-

centes, possuindo diversas sementes (até 20 em *Macroptilium*), dispersas por autocoria. Por outro lado, nas três espécies de *Phaseolus* e em *V. unguiculata*, que são todas cultivadas, as vagens são indeiscentes, possuindo, no geral, sementes maiores e em menor número, as quais seriam dispersas por barocoria. Segundo BURNS (1977), dentre as quatro espécies de *Phaseolus* mais comumente cultivadas, três possuem sementes grandes, ou seja, *P. coccineus*, *P. lunatus* e *P. vulgaris*, enquanto que apenas *P. acutifolius* apresenta sementes pequenas. Contudo, é necessário ressaltar que numa mesma espécie, como *P. vulgaris*, podem ser observadas diferentes texturas de vagens, indo desde as muito fibrosas altamente deiscentes até aquelas mais tenras e que raramente se abrem (EVANS, 1980).

A observação de células tetraplóides esporádicas em meio às células diplóides normais em espécies de *Phaseolus* e de *Macroptilium* mais uma vez contesta a sugestão de BERGER (1958), segundo a qual, dentre as leguminosas, a subfamília Papilionoideae apenas ocasionalmente apresentaria essa situação, de tal forma que esse critério seria útil para a delimitação taxonômica das três subfamílias de Leguminosae. Ainda segundo esses autores, todas as espécies de Mimosoideae estudadas até aquela época mostravam algumas células poliplóides em meio à condição diplóide normal e, em Caesalpinioideae, esta eram encontradas apenas algumas espécies.

SCHREIBER (1966) apresentou vários casos de variação de ploidia durante a histogênese, em animais e vegetais. Esse autor denominou tal fenômeno de endopoliploidia, ou crescimento rítmico, das células de certos tecidos que desempenham um papel muito importante, seja no crescimento total do organismo, seja

na diferenciação de determinadas categorias celulares. A endopoliploidia se caracterizaria pela multiplicação repetida dos genomas, sem que se realize a divisão do núcleo e da célula. Infelizmente, estudos sobre endopoliploidia foram realizados muito mais em animais do que em vegetais. Um desses estudos mostrou que existe relação entre a variação no nível de ploidia e a diferenciação funcional de tecidos secretores de insetos, pois estes podem aumentar o nível de secreção, aumentando o número de genomas, que poderiam ser distribuídos em cromossomos simples de genomas poliplóides, ou em cromossomos politênicos de genomas diplóides.

Dessa maneira, extrapolando o exemplo mencionado acima para a observação de raras células tetraplóides em meio a células diplóides normais de uma raiz, seria possível associar essa variação no nível de ploidia a uma maior elaboração de substâncias, como proteínas e outras, necessárias ao crescimento constante desse órgão, em plântulas.

A associação de uma maior intensidade de síntese de substâncias com alterações no nível de ploidia foi também observada em cromossomos politênicos de células do tecido suspensor do embrião de *Phaseolus coccineus* (AVANZI *et alii*, 1970). Esses autores supuseram que, em alguns estádios do desenvolvimento, células do suspensor produziriam maior quantidade de RNA ribossômico do que a necessária para elas próprias. Por outro lado, BRADY & CLUTTER (1974) re-investigaram o problema e não confirmaram a ocorrência de síntese de DNA extra em cromossomos politênicos daquela espécie.

A ocorrência de raízes com células exclusivamente tetraplóides em *Macroptilium atropurpureum* (UEC 11.146) é bas -

tante interessante. Como os materiais examinados eram raízes primárias, é permitido supor que, caso a germinação das sementes e consequente desenvolvimento das plântulas fossem bem sucedidos em condições naturais, haveria o aparecimento de plantas tetraplóides. Dessa forma, essa população de *M.atropurpureum* poderia ser constituída por indivíduos diplóides e tetraplóides. Tal fenômeno também foi observado em espécies de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) por J.H.A.Dutihl (comunicação pessoal), porém neste caso as plantas apresentam eficiente sistema de propagação vegetativa. Essa poliploidia pode ser explicada pela falta de divisão (citocinese) após a divisão cromossômica, de modo que a célula fique com o número de cromossomos duplicado.

Como tais raízes com células tetraplóides foram encontradas em meio a uma população diplóide de *M.atropurpureum* e como a referida espécie é exótica, não mencionada como de ocorrência no Brasil (HUTTON, 1962), pode-se fazer especulações a respeito de seu sistema genético. Essa espécie sofreu um processo de melhoramento genético na Austrália objetivando sua utilização como planta forrageira (HUTTON & BEALL, 1977) o que permite supor o surgimento de formas poliplóides que seriam mantidas isoladas geneticamente das formas diplóides, embora pudessem pertencer a uma mesma população. Por outro lado, talvez seja mais válido considerar a ocorrência de formas poliplóides como apenas ocasional, ou, talvez supor que as raízes com tetraploidia não necessariamente originem plantas do nível de ploidia diferente de $2n=22$, número de cromossomos para essa espécie.

Na realidade, a poliploidia parece ser um evento bastante raro no gênero *Phaseolus* (s.l.), não desempenhando papel

de destaque na evolução desse grupo vegetal. SARBHOY (1977) e SINHA & ROY (1979b) opinaram que a evolução tivesse ocorrido através de rearranjos estruturais, como inversões e translocações. Essa seria uma situação bastante diferente daquela apresentada por STEBBINS (1956) em Gramineae, onde 70% das espécies estudadas citologicamente são poliplóides. Em termos de vantagens adaptativas, por conter uma série de recombinações de características de espécies diplóides, os poliplóides podem ser tolerantes a uma maior diversidade de ambiente, não só devido aos genomas individuais, como também à própria população, que pode possuir maior variedade de genótipos interrelacionados do que em populações exclusivamente diplóides.

Os resultados aqui obtidos confirmam a constância do número cromossômico $2n=22$ para espécies do complexo *Phaseolus - Vigna-Macropitilium*, com raras exceções citadas na literatura (DARLINGTON, 1955; SEN & BOHWAL, 1960; BOLKHOVSKIKY *et alii*, 1969; MARÉCHAL, 1970; BANDEL, 1972; JOSEPH & BOUWKAMP, 1978; GOLDBLATT, 1981). Contudo, embora a análise dos cariótipos elaborados para as dez espécies estudadas mostre uma predominância de cromossomos com centrômero em posição mediana e medindo de 1 a 3 μm de comprimento, sugerindo uma aparente uniformidade de forma e tamanho, um estudo mais aprofundado enfocando principalmente o índice TF%, que resume a posição centromérica para os cromossomos de uma dada espécie, tem-se, a grosso modo, três grupos, cada um correspondendo a um dos gêneros estudados. A aplicação de testes estatísticos adequados para apurar a real significância dos resultados poderá melhor avaliar a utilidade da utilização de dados cromossômicos como critério taxonômico na delimitação dos gêneros *Phaseolus*, *Vigna* e *Macroptilium*, agora melhor individua

lizados após estudos taxonômicos, quimiotaxonômicos e palinológicos.

Em acréscimo aos estudos taxonômicos desenvolvidos nesses 3 gêneros, um outro critério que pode ser útil para delimitá-los é o tipo de estrutura utilizada na estratégia contra insetos, ou seja, pêlos uncinados em *Phaseolus* e nectários extraflorais em *Vigna* e *Macroptilium* (FORNI-MARTINS & MARTINS, 1982). *Phaseolus* é o único que possui pêlos uncinados e tanto ninfas como adultos de insetos podem ser impalados através de diferentes partes do corpo, como membranas intersegmentais do abdomen e em segmentos das pernas, dependendo da densidade e do ângulo do gancho dos pêlos uncinados (PILLEMER & TINGEY, 1976).

Já em *Macroptilium* e *Vigna*, a estratégia defensiva está relacionada a nectários extraflorais, através de relações mutualísticas entre plantas e formigas, sendo que as plantas fornecem alimento às formigas, recebendo, em troca, proteção contra insetos herbívoros (JANZEN, 1981). Essa função protetora dos nectários extraflorais já havia sido defendida por BENTLEY (1977), que apresentou uma revisão com uma série de evidências experimentais em favor a essa hipótese. Em um experimento realizado com plantas de *Phaseolus vulgaris* e, portanto, sem nectários extraflorais, às quais foi fornecido "néctar", verificou-se uma relação inversa entre a abundância de formigas e a intensidade de danos causados às plantas por insetos herbívoros (BENTLEY, 1977). Parecem existir diferenças estruturais nos nectários extraflorais dos gêneros, *Vigna* e *Macroptilium*, como na posição da bráctea que protege cada nectário antes de entrar em funcionamento. Em *Vigna*, essa bráctea tem seu ponto de inserção abaixo do nectário, enquanto que em *Macroptilium* a inserção ocorre na

própria margem do nectário. Estudos anatômicos posteriores poderão indicar outras possíveis diferenças estruturais nos nectários extraflorais desses dois gêneros (FORNI-MARTINS & MARTINS, 1982).

8) CONCLUSÕES

Na elaboração de cariótipos foram utilizados cromossomos em metáfase mitótica de pontas de raiz. Foi constatado ser essencial o pré-tratamento com PDB. Dentre as técnicas citológicas testadas foi escolhida a técnica de Sharma modificada pelo uso de pectinase.

Foi confirmado o número cromossômico $2n=22$ para todas as espécies estudadas. Os cromossomos apresentam tamanho reduzido e bastante semelhante entre si, variando de 1 μm até no máximo 3 μm de comprimento; possuem centrômero em posição mediana e submediana, e em algumas espécies foram observadas constrições secundárias. São apresentados ideogramas e fórmulas cariotípicas para cada espécie estudada.

As fórmulas cariotípicas aqui obtidas foram comparadas às elaboradas por outros autores nas mesmas espécies aqui estudadas, observando-se quase sempre a não concordância nos resultados, tanto quanto à forma de cromossomos quanto à visualização de satélites; tais diferenças podem ser explicadas pela provável ocorrência de variação genética entre indivíduos de uma mesma espécie, pelas condições ambiente a que as plantas estudadas foram submetidas, por diferentes procedimentos de técnica citológica e pelo tipo de nomenclatura utilizada para a classificação de cromossomos.

Em cada espécie foram calculados valores médios de desvio padrão e de coeficiente de variação (CV%) para cada um de seus pares cromossômicos, separadamente para comprimento cromossômico e para índice centromérico. Observou-se variação entre cé

lulas observadas de uma mesma espécie, sendo que a maioria dos valores de CV% obtidos se enquadra na classe média. Tal variação pode ser atribuída a variação genética, contração cromatínica diferencial ou problemas de técnica, embora se tenha procurado padronizar condições para germinação de sementes, coleta e pré-tratamento de raízes e condições para medições dos cromossomos.

Em algumas espécies foram observadas células tetraplóides em meio a células diplóides normais, enquanto que em *M. atropurpureum* foram examinadas raízes com células exclusivamente tetraplóides em uma população com indivíduos diplóides.

Foram calculados o comprimento total de cromatina (CTC) e o índice TF% para cada uma das espécies estudadas. Os valores de CTC variaram de 35,46 μm a 49,34 μm . O valor mínimo foi observado em *M. lathyroides*, encontrando-se os maiores valores em *M. bracteatum* e nas três espécies de *Phaseolus*. O índice TF%, que exprime o grau de simetria cariotípica de cada espécie, variou de 48,69 até 38,73. Os menores valores, que indicam maior assimetria no cariótipo, foram obtidos em espécies do gênero *Phaseolus*, contrastando com *M. erythroloma*, em que foi verificado TF% igual a 48,69.

No geral, em termos evolutivos, considerando a tendência à assimetria cariotípica e ao aumento de CTC, tem-se que as espécies de *Phaseolus* seriam mais evoluídas do que as de *Macroptilium*, estando as de *Vigna* em posição intermediária. Contudo, dentro do gênero *Vigna* parece não se observar essa mesma relação no que se refere a diferentes espécies e seus correspondentes subgêneros.

Embora haja falta de testes estatísticos para se ter

bases mais seguras para a interpretação dos resultados, comparando-se CTC pode-se verificar, a grosso modo, três grupos distintos. As espécies de *Phaseolus* e de *Vigna* agrupam-se distintamente em cada um deles. *M.atropurpureum* parece ser intermediária entre esses dois agrupamentos, sendo *M.bracteatum* incluído juntamente com as espécies de *Phaseolus*, restando *M.erythroloma* e *M.lathyroides* no grupo de *Vigna*. Por outro lado, quando se analisam os índices centroméricos, através do TF%, são observados três grupos distintos, cada um correspondendo a um dos gêneros estudados.

Como foi observada constância no número e aparente uniformidade em tamanho e forma dos cromossomos, a aplicação de testes estatísticos poderá melhor avaliar sua utilização no estudo citotaxonômico do complexo *Phaseolus-Vigna-Macroptilium*.

9) LITERATURA CITADA

- ADHIKARY, A.K. 1974. Precise determination of centromere locations. *Cytologia* 39:11-6.
- ALLAN, D.C. 1975. *Ecologia das pastagens*. Série Biogeografia n.9. São Paulo, Instituto de Geografia, Universidade de São Paulo.
- AL-YASIRI, S.A. & COYNE, D.P. 1966. Interspecific hybridization in the genus *Phaseolus*. *Crop Science* 6:59-69.
- AVANZI, S.; CIONINI, P.G.; D'AMATO, F., 1970. Cytochemical and autoradiographic analyses of the embryo suspensor cells of *Phaseolus coccineus*. *Caryologia* 23:605-38.
- AYONOADU, U.W.U. 1974. Nuclear DNA variation in *Phaseolus*. *Chromosoma* 48:41-9.
- BANDEL, G.. 1972. *Variação numérica de cromossomos e evolução nas leguminosas*. Tese de Doutorado. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- BATTAGLIA, E.. 1955. Chromosome morphology and terminology. *Caryologia* 8:179-87.
- BAJER, A.. 1959. Change of length and volume of mitotic chromosomes in living cells. *Hereditas* 45:579-96.
- BAUDET, J.C.. 1972. Intérêt taxonomique des caractères épidermiques dans le complexe *Phaseolus-Vigna*. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique* 106:53-9.
- BAUDET, J.C.. 1974. Signification taxonomique des caracteres blastogéniques dans la tribu des Papilionaceae-Phaseoleae. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belgique* 44:259-93.
- BAUDET, J.C. & MARÉCHAL, R.. 1976. Signification taxonomique de la présence de poils uncinulés de Phaseoleae et d'Hedysereae (Pa-

- pilionaceae). *Bull. Jard. Bot. Nat. Belgique* 46:419-26.
- BENNETT, M.D. & REES, H.. 1969. Induced and developmental variation in chromosomes of meristematic cells. *Chromosoma* 27:226-44.
- BENNETT, M.D.. 1970. Natural variation in nuclear characters of meristems in *Vicia faba*. *Chromosoma* 29:317-35.
- BENNETT, M.D. & SMITH, J.B.. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. Roy. Acad. Sci., B*, 274:227-74 .
- BENTHAM, G.. 1840. De Leguminosarum generibus commentationes. *Ann. Nat. Mus. Wien.* 21:61-142.
- BENTHAM, G.. 1859 . Leguminosae: Papilionaceae. IN: MARTIUS, C.F. P.; ENDLICHER, S.; EICHLER, A.C.; URBAN, J., ed.. 1840/1906. *Flora Brasiliensis*. Munique, Lipsiae apud Frid. Fleischer in Comm. V.15, parte 1. P. 179-93.
- BENTHAM, G.. 1862. Leguminosae. In : BENTHAM, G. & HOOKER, F.J.D., ed.. 1862/1867. *Genera Plantarum*. Londres, Reeve and Co., Williams and Norgate. V.1. P.434-600.
- BENTLEY, B.L. 1977. Extrafloral nectarios and protection by pugna-cious bodyguards. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 8. 407-27.
- BERGER, C.A.; WITKUS, E.R.; McMAHON, R.M.. 1958. Cytotaxonomic studies in Leguminosae. *Bull. Torrey. Bot. Club.* 85 405-10.
- BHATTACHARYA, S.. 1978. Giemsa-banding pattern of chromosomes in *Phaseolus vulgaris* L. *Cytologia* 43:581-8.
- BIR, S.S. & SIDHU, S.. 1967. Cytological observations on the North Indian members of family Leguminosae. *The Nucleus* 10:47-67.
- BISWAS, A.K. & BHATTACHARYYA, N.K.. 1976. Induced polyploidy in Legumes: III - *Phaseolus vulgaris* L. *Cytologia* 41:105-10.
- BOLKHOVSKIKH, Z., GRIF, V.; MATVEJEVA, T.; ZAKHARYEVA, O. 1969. In: FEDOROV, An.A., ed. *chromosome number of flowering plants*. V. L. Komarov Botanical Institute, Academy of Sciences of the U.S.S.R.

- BOULTER, D.; THURMAN, D.A.; DERBYSHIRE, E.. 1967. A disc electrophoretic study of globulin protein of legume seeds with reference to their systematics. *New Phytol.* 66:27-36.
- BRADY, T. & CLUTTER, M.E.. 1974. Structure and replication of *Phaseolus* polytene chromosomes. *Chromosoma* 45:63-79.
- BURKART, A.. 1952- *Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas*. 2.ed. Buenos Aires, ACME Agency.
- BURNS, R.. 1977. *Espécies de Phaseolus spp. cultivadas y silvestres*. Trabajo presentado al Curso de Adiestramiento en Producción de Frijol para Investigadores de América Latina. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- CASIMIR, J. & MARCHAND, G., le. 1966. Répartition et importance systématique des acides aminés et des peptides libres des *Phaseolinae*. *Bull. Jard. Bot. État Bruxelles* 36:53-6.
- CHENG, S.S. & BASSET, M.J.. 1981. Chromosome morphology in common bean (*Phaseolus vulgaris*) at the diplotene stage of meiosis. *Cytologia* 46:675-84.
- CHRISPEELS, M.J. & BAUMGARTNER, B.. 1978. Serological evidence confirming the assignment of *Phaseolus aureus* and *P. mungo* to the genus *Vigna*. *Phytochemistry* 17:125-6.
- CONAGIN, C.H.T.M.. 1950- Ação do paradiclorobenzeno sobre os cromossomos somáticos. *Bragantia* 10:365-9.
- DARLINGTON, C.D.. 1945. *Chromosome atlas of flowering plants*. Londres, George Allen and Unwin.
- DATTA, P.C.. 1975. Natural variation of chromosome length and a critical assessment of the karyotype in sweet pea. *Cytologia* 40:561-8.
- DE CANDOLLE, A.P.. 1825. *Prodromus, Systematis Naturalis, Regni Vegetalis*. Paris, Sumptibus Sociorum, Treuttel et Wurtz. V.1. Leguminosae. P. 93-524.

- DE, D.N. & KRISHNAN, R..1966. Studies on pachytene and somatic chromosomes of *Phaseolus mungo*. *Genetica* 37:581-7.
- DERBYSHIRE, E.; YARWOOD, J.N.; NEAT, E.; BOULTER, D..1976a -Seed proteins of *Phaseolus* and *Vigna*. *New Phytol.* 76:283-8.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J.; BOULTER, D..1976b . Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15:3-24.
- ELLIOT, S.. 1822. *A sketch of the botany of South-Carolina and Georgia*. Charleston, s.ed. V.2. P.229-31.
- EVANS, A.M..1976. Beans. In : SIMMONDS, N.W., ed.1976. *Evolution of crop plants*. London, Longman Group Limited. P.168-72.
- EVANS, A.M..1980. Structure, variation, evolution and classification in *Phaseolus*. In: SUMMERFIELD, R.J. & BUNTING, A.H., ed..1980 . *Advances in legume science*. 2.ed. Kew, Royal Botanic Garden, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. P.337-47.
- FEINBRUN, N..1958. Chromosome numbers and evolution in the genus *Colchicum*. *Evolution* 12:173-88.
- FEVEREIRO, V.P.B..1979. *Macroptilium (Benth) Urban do Brasil. Leguminosae - Faboideae - Phaseoleae - Phaseolinae*. Tese de Mestrado. Rio de Janeiro, Universidade Federal.
- FLANNAGAN, T.W. & JONES, R.N..1973. The influence of some environmental factors upon the chromosome phenotype in meristematic cells of rye. *Cytologia* 38:11-9.
- FORNI-MARTINS, E.R. & MARTINS, F.R..1982. Estratégias defensivas no complexo *Macroptilium-Phaseolus-Vigna*. *Ciência e Cultura* (Suplemento) 34(7):833.
- FRAHM-LELIVELD, J.A..1953. Some chromosome numbers in tropical Leguminous plants. *Euphytica* 2:46-8.
- GOLDBLATT, P.1981. Cytology and phylogeny of Leguminosae In: POL HILL, R.M. & RAVEN, P.H., ed. 1981. *Advances in legume systematics*.

- Part 2. Kew, Royal Botanic Gardens, Ministry of Agricultura, Fisheries and Food.
- GOMES, F.P..1978. *Curso de estatística experimental*. 8.ed. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo; São Paulo, Nobel.
- GOSWAMI, L.C..1979. Karyological studies of thirty two varieties of black gram (*Phaseolus mungo* L.). *Cytologia* 44:549-56.
- GRANT, V..1975. *Genetics of flowering plants*. New York, Columbia University Press. P.315.
- GUERRA FILHO, M.S..1975. *Estudos de cromossomos somáticos em trigo*. Tese de Mestrado. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- HAGA, T..1937. Karyotypic polymorphism in *Paris hexaphylla* Cham., with special reference to its origin and to meiotic chromosome behaviour. *Cytologia* (Fujii Jubilaei Volumen):681-700.
- HAQ, M.N., LANE, G.R.; SMARTT, J..1980. The cytogenetics of *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L., their interspecific hybrids, derived amphidiploid and backcross progeny in relation to their potential exploitation in breeding. *Cytologia* 45:791-8.
- HAQUE, M.S. & GHOSHAL, K.K..1980. Karyotypes and chromosome morphology in the genus *Salvia* Linn. .*Cytologia* 45:627-40.
- HASSLER, E.1923. *Phaseoli austro-americani*. *Candollea* 1:417-72.
- HAWKINS, C.F. & EVANS, A.M.1973. Elucidating the behaviour of pollen tubes in intra and interspecific pollinations of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* Lam. *Euphytica* 22:378-85.
- HEISER Jr., C.B..1977- *Sementes para a civilização: a história da alimentação humana*. São Paulo, Cia. Ed. Nacional. P.132.

- HONMA, S. & HEECKT, O..1958. Bean Interspecific hybrid involving *P. coccineus* and *P. lunatus*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 72:360-4.
- HORVAT, F. & STAINIER, F..1979. L' étude de L'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et dans le genres apparentés. III. *Pollen et Spores* 21:2-30.
- HORVAT, F. & STAINIER, F..1980. L'étude de l'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et dans le genres apparentés. IV. *Pollen et Spores* 22:139-72.
- HUTTON, E.M..1962. Siratro- a tropical pasture legume bred from *Phaseolus atropurpureus*. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 2:117 - 25.
- HUTTON, E.M. & BEALL, L.B.. 1977. Breeding of *Macroptilium atro - purpureum*. *Tropical Grasslands* 11:15-31.
- HUZIWARA, Y.. 1962. Karyotype analysis in some genera of Compositae: VIII. Further studies on the chromosomes of *Aster*. *Amer. J. Bot.* 49:116-9.
- JACKSON, B.D..1985. *Index Kewensis*. 2. re-impressão. V.2 Oxford, University Press by Vivivan Ridler, 1960.
- JANZEN, D.H. 1981. The defenses of legumes against herbivores. In: POLHILL, R.M. & RAVEN, P.H., ed., 1981. *Advances in legume systematics*. Part 1. Kew, Royal Botanic Garden. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. P. 951-77.
- JONES, L..1970. Chromosome changes in plant evolution. *Taxon* 19: 172-9.
- JOSEPH, L.S. & BOUWKAMP, J.C..1978. Karyomorphology of several species of *Phaseolus* and *Vigna*. *Cytologia* 43: 595-600.
- KAMALA, T..1976. Nucleolus organizing chromosomes in *Brassica* and their bearing on the phylogeny of the genus. *Cytologia* 41: 615-20.

- KAPOOR, B.M.. 1977. Further observations on the chromosome morphology of some *Solidago* species. *Cytologia* 42:241-53.
- KAWANO, S.. 1965. Applications of pectinase and cellulase in an orcein squash method. *Bot. Magaz.* 78:36-42.
- KLOZ, J.. 1977. Serology of the Leguminosae. In: HARBONE, J.B. ; BOULTER, D.; TURNER, B.L., ed. 1971. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Academic Press. London.
- KRISHNAN, R. & DE, D.N.. 1965. Studies on pachytene and somatic chromosomes of *Phaseolus aureus*. *Nucleus* 8:7:16.
- KRISHNAN, R. & DE, D.N.. 1970. Pachytene chromosomes and the origin of a tetraploid species of *Phaseolus*. *Cytologia* 35:501-12.
- LACKEY, J.A.. 1980. Chromosome numbers in Phaseoleae (Fabaceae: Faboideae) and their relation to taxonomy. *Amer. J. Botany* 67:595-602.
- LEITÃO FILHO, H.F.. 1972. Botânica de *Phaseolus vulgaris* L. e as espécies brasileiras de *Phaseolus*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FEIJÃO, 1º, Campinas, 1971. *Anais*. Viçosa, Imprensa Universitária, Universidade Federal. P. 145-54.
- LEITÃO FILHO, H.F.. 1974. Contribuição ao estudo taxonômico do gênero *Phaseolus* L. no Brasil. *Bragantia* 33:53-63.
- LEVAN, A.: FREDGA, K; SANDBERG, A.A.. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-20.
- LINNÉ, C.. 1753. *Species Plantarum*. Stockholm, Laurentii Salvii. V. 2. P.723-5.
- LINNÉ, C.. 1763. *Species Plantarum*. 2.ed. Holmiae, Impresis Direct, Larentii Salvatii. V. 2. P. 1016-8.
- LINNÉ, C.. 1782. *Pflanzensystem*. 12.ed. Nürnberg, Gabriel Nicolaus Rassepe. V.8. P.538-48.

- MAKINO, H.. 1978. Palynological studies in Leguminosae (Lotoideae).
Tribe Phaseoleae. *Hoehnea* 7:47-98.
- MARÉCHAL, R.. 1969. Données cytologiques sur les espèces de la
sous tribu des Papilionaceae-Phaseoleae-Phaseolinae. *Bull.*
Jard. Bot. Nat. Belgique 39:125-65.
- MARÉCHAL, R.. 1970. Données cytologiques sur les espèces de la
sous tribu des Papilionaceae-Phaseoleae-Phaseolinae. *Bull.*
Jard. Bot. Nat. Belgique 40:307-48.
- MARÉCHAL, R.; MASCHERPA, J.M.; STAINIER, F.. 1978. Étude taxono-
mique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et
Vigna (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques
et poliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera*
28:1-273.
- MARÉCHAL, R.; MASCHERPA, J.M.; STAINIER, F.. 1981. Taxonomic
study of the *Phaseolus-Vigna* complexes and related genera.
In: POLHILL, R.M. & RAVEN, P.H., ed.. 1981. *Advances in legu-
me systematics*. Kew, Royal Botanic Garden, Ministry of Agri-
culture, Fisheries and Food. P. 329-35.
- MARÉCHAL, R.. 1982. Arguments for a global conception of the ge-
nus *Vigna*. *Taxon*. 31:280-3.
- MATÉRN, B. & SIMAK, M.. 1968. Statistical problems in karyoty-
pes. *Hereditas* 59:280-8.
- MEDINA, D.M. & CONAGIN, C.H.T.M.. 1964. *Técnica citológica*. Pu-
blicação n. 2610. Campinas, Instituto Agrônômico.
- MEYER, E.H.F.. 1836. *Commentariorum de plantis africae austra-
lioris*. Leipzig, s.ed. V.1, parte 1. P.I-LVI, 1-172.
- MEYER, J.R.. 1945. Prefixing with paradichlorobenzene to facili-
tate chromosome study. *Stain Technology* 20:121-5.

- MICHELIN-RAMOS, M.E.. 1980. *Estudos quimiotaconômicos de espécies do gênero Phaseolus (Leguminosae - Lotoideae) nativas e cultivadas no Brasil*. Tese de Mestrado. Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
- MIRANDA, C.S.. 1965. Herencia y evolución de la forma del estigma em *Phaseolus vulgaris* L. y *Phaseolus coccineus*. *Agricultura Técnica en Mexico* 2:194-6.
- MOK, D.W.S. & MOK, M.C.. 1976. A modified Giemsa technique for identifying bean chromosomes. *J.Heredity* 67:187-8.
- NAGL, W.. 1969. Banded polytene chromosomes in the legume *Phaseolus vulgaris*. *Nature* 221:70-1.
- PALMER, R.G. & HEER, H.. 1973. A root tip squash technique for soybean chromosomes. *Crop Science* 13:389-91.
- PIERCE, W.P.. 1937. The effect of phosphorus and nuclear volume in a violet species. *Bull. Torrey Bot. Club* 64:345-54.
- PILLEMER, E.A. & TINGEY, W.M.. 1976. Hooked trichomes: a physical plant barrier to a major agricultural pest. *Science* 193:482-4.
- PIPER, C.V.. 1926. Studies in American Phaseolineae. *Contr. U.S. Nat. Herb.* 22:663-701.
- PRAIN, D.. 1897. Noviciae Indicae 15. *J. Asiat. Soc. Bengal.* 66:425-8.
- REES, H.; CAMERON, F.M.; HAZARIKA, M.H.; JONES, G.H.. 1966. Nuclear variation between diploid angiosperms. *Nature* 211:828 - 30.
- REES, H. & JONES, R.N.. 1968. Nuclear DNA variations in *Allium*. *Heredity* 23:591-605.
- RUTGER, J.N. & BECKHAM, L.S.. 1970. Natural hybridization of *Pha*

- seolus vulgaris* L x *Phaseolus coccineus* L. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 95:659-61.
- SARBHOY, R.K.. 1977. Cytogenetical studies in the genus *Phaseolus* Linn.: III. Evolution in the genus *Phaseolus*. *Cytologia* 42:401-13.
- SARBHOY, R.K.. 1978a. Cytogenetical studies in the genus *Phaseolus* Linn.: I and II. Somatic and meiotic studies in fifteen species of *Phaseolus* (Part I). *Cytologia* 43:161-70.
- SARBHOY, R.K.. 1978b. Cytogenetical studies in the genus *Phaseolus* Linn.: I and II. Somatic and meiotic studies in fifteen species of *Phaseolus* (Part II). *Cytologia* 43:171-80.
- SARBHOY, R.K.. 1980. Karyological studies in the genus *Phaseolus* Linn. *Cytologia* 45:363-73.
- SASAKI, M.. 1961. Observation on the modification in size and shape of chromosomes due to technical procedure. *Chromosoma* 11: 514-22.
- SAVOVA, N.. 1979. Investigations on *Phaseolus vulgaris* x *Phaseolus coccineus* interspecific hybridization:1. Crossability and type of hybrid development in F₁. *Genet. Sel.* 12:232-41.
- SCHIFINO-SAMPAIO, M.T.. 1979. *Citotaxonomia do complexo Briza (Gramineae). Número cromossômico, cariótipo, quantidade de DNA nuclear, comportamento meiótico.* Tese de Mestrado. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SCHREIBER, G.. 1966. Genes e desenvolvimento. In: PAVAN, C. & CUNHA, A.B., org.. *Elementos de genética*. 2.ed. São Paulo, Cia. Ed. Nacional e EDUSP. P. 214-17.
- SCHWEIZER, A.D. & AMBROS, P.. 1979. Analysis of nucleolus organizer regions (NORs) in mitotic and polytene chromosomes of

- Phaseolus coccineus* by silver staining and giemsa C-banding. *Plant Syst. and Evolution* 132:27-52.
- SEN, N.K.. & BHOWAL, J.G.. 1960. Cytotaxonomic studies on *Vigna*. *Cytologia* 25:195-207.
- SHARMA, A.K. & SHARMA, A.. 1972. *Chromosome Techniques (theory and practice)*. Londres, Butterworths; Baltimore, University Park Press. P.87.
- SINGH, A. & ROY, R.P.. 1970. Karyological studies in *Trigonella*, *Indigofera* and *Phaseolus*. *The Nucleus* 13:41-54.
- SINHA, S.S.N. & KUMAR, P.. 1979. Mitotic analysis in thirteen varieties of *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. *Cytologia* 44:571-80.
- SINHA, S.S.N. & ROY, R.P.. 1979a. Cytological studies in the genus *Phaseolus*: I - Mitotic analysis in fourteen species. *Cytologia* 44:191-9.
- SINHA, S.S.N. & ROY, R.P.. 1979b. Cytological studies in the genus *Phaseolus*: II - Meiotic analysis in sixteen species. *Cytologia* 44:201-9.
- SMARTT, J.. 1970. Interspecific hybridization between cultivated american species of the genus *Phaseolus*. *Euphytica* 19:480-9.
- SMARTT, J.. 1976. Comparative evolution of pulse crops. *Euphytica* 25:139-43.
- SOUTHERN, D.I.. 1967. Species relationships in the genus *Tulipa*. *Chromosoma* 23:80-94.
- SPIEGEL, M.R.. 1976. *Estatística*. São Paulo, McGraw Hill.
- SRIVASTAVA, L.M. & NAITHANI, S.P.. 1964. Cytogenetical studies in certain minor "pulses and beans". *Cytologia* 29:453-64.
- STAFLEU, F.A.; DEMOULIN, V.; GREUTER, W.; HIEPKO, P.; LINCZEUSKI, I.A.; McVAUGH, R.; MEIKLE, R.D.; ROLLINS, R.C.; ROSS, R. ;

- SCHOFF, J.M.. 1972. *International Code of Botanical Nomenclature*. Utrecht, A. Oosthoek's Uitgeversmaatschappij N.V.
- STAINIER, F.. 1974. Contribution à l'étude palynologique des Papilionaceae-Phaseoleae-Phaseolinae. III- Étude de quelques espèces des genres *Phaseolus* L., *Vigna* Savi et *Physostigma* Balf. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belgique* 44:1-15.
- STAINIER, F.. 1976. Note sur le pollen de quelques espèces sud-américaines du complexe *Phaseolus-Vigna*. *Pollen et Spores* 28:523-31.
- STAINIER, F. & HORVAT, F.. 1978a. L'étude de l'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et des genres apparentés. *Pollen et Spores* 20:195-214.
- STAINIER, F. & HORVAT, F.. 1978b. L'étude de l'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et des genres apparentés. II. *Pollen et Spores* 20:341-9.
- STEBBINS, G.L.. 1938. Cytogenetic studies in *Paeonia*. II. The cytology of the diploid species and hybrids. *Genetics* 23:83-110
- STEBBINS, G.L.. 1951. *Variation and evolution in plants*. New York, Columbia University Press. P. 442-75.
- STEBBINS, G.L.. 1956. Cytogenetics and evolution of the grass family. *Amer. J. Bot.* 43:890-905.
- STEBBINS, G.L.. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. London, Edward Arnold Publishers. P. 87-90.
- SUBRAMANIAN, D.. 1979. Morphological studies in *Vigna* Savi and its related genera. *J. Indian Bot. Soc.* 58:247-56.
- SYBENGA, J.. 1959. Some sources of error in the determination of chromosome length. *Chromosoma* 10:355-64.
- TATEOKA, T.. 1960. Cytology in grass systematics: a critical re

- view. *The Nucleus* 3:81-110.
- TAYLOR, A.S.B.. 1966. Estudios sobre polen de *Phaseolus Turri-*
alba 16:7-14.
- THOMAS, H.. 1974. Investigations into the inter-relationships of
of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. *Genetica* 35:59-
74.
- THUAN, N.V.. 1975. Contribution à l'étude caryo-taxinomique des
Phaséolées. *Rev. Gén. Bot.* 82:157-214.
- THURMAN, D.A.; BOULTER, D.; DERBYSHIRE, E.; TURNER, B.L.. 1967.
Electrophoretic mobilities of formic and glutamic dehydroge-
nases in the Fabaceae: a systematic survey. *New Phytol.* 66:
37-45.
- TURNER, B.L.. 1956. Chromosome numbers in the Leguminosae: I.
Amer. J. Bot. 43:577-81.
- URBAN, I.. 1928. Leguminosae. In: *Plantae cubenses novae vel ra-*
riores a clo. Eckam lectae. Symbol. Antill. 9:433-58.
- VERDCOURT, B.. 1970. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae
for the tropical East Afrika: IV. *Kew Bull.* 24:507-70.
- VERDCOURT, B.. 1971. Tribe 10: Phaseoleae. In: GILLET, J.B.; POL-
HILL, R.M.; VERDCOURT, B. Leguminosae (part 4). Subfamily Pa-
pilionoideae (2). MILNE-REDHEAD, E. & POLHILL, R.M., ed. *Flo-*
ra of tropical East Africa. London, Crown Agents for Oversea
Governments and Administrations. P. 613-64.
- VERMA, S.C. & OHRI, D.. 1979. Chromosome and nuclear phenotype
in the legume *Lathyrus sativus* L. *Cytologia* 44:77-90.