

Tesis de Posgrado

Estudio quimiotaconómico de las especies argentinas de la subtribu phaseolinae : géneros Vigna, Phaseolus, Macroptilium y Dolichopsis, (Phaseoleae-Papilionoideae-Leguminosae)

Zallocchi, Enrique Mario

1992

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zallocchi, Enrique Mario. (1992). Estudio quimiotaconómico de las especies argentinas de la subtribu phaseolinae : géneros Vigna, Phaseolus, Macroptilium y Dolichopsis, (Phaseoleae-Papilionoideae-Leguminosae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2531_Zallocchi.pdf

Cita tipo Chicago:

Zallocchi, Enrique Mario. "Estudio quimiotaconómico de las especies argentinas de la subtribu phaseolinae : géneros Vigna, Phaseolus, Macroptilium y Dolichopsis, (Phaseoleae-Papilionoideae-Leguminosae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2531_Zallocchi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO QUIMIOTAXONÓMICO DE LAS ESPECIES ARGENTINAS
DE LA SUBTRIBU PHASEOLINAE : GENEROS VIGNA,
PHASEOLUS , MACROPTILIUM Y DOLICHOPSIS
(PHASEOLEAE- PAPILIONOIDEAE-LEGUMINOSAE)

Enrique Mario Zallocchi

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

1992

Tesis
2531
ej 2

Dirección : Prof. Ing. Agr. Ramón Antonio Palacios
y Prof. Dra. Alicia Beatriz Pomilio

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Sistemática de Plantas
Vasculares (Departamento de Ciencias Biológicas) y
PROPLAME-CONICET (Departamento de Química Orgánica)
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi reconocimiento a todos aquellos que de una o varias maneras contribuyeron a la concreción de este trabajo:

A mis directores de Tesis, la Dra. Alicia B. Pomilio y el Ing. Agr. Ramón A. Palacios, que no sólo supieron orientarme e introducirme en el ámbito de la investigación científica, sino que fueron poseedores de la paciencia necesaria para lograr que el presente trabajo pudiera llevarse a cabo.

A la Dra. Alicia B. Pomilio, a quien debo mi formación en química orgánica de productos naturales, por su apoyo constante y su entusiasmo, y por la generosidad y calidez con que me brindó sus conocimientos.

Al Ing. Agr. Ramón A. Palacios, por haber sugerido el tema original de este trabajo, por su interés en mi formación, y por su amplitud de criterio para encarar los estudios biosistemáticos desde una perspectiva multidisciplinaria.

A la Dra. Patricia S. Hoc, por el material vegetal recolectado, por sus aportes relacionados a la taxonomía del género *Vigna*, y por su lectura crítica del manuscrito.

A la Lic. Susana I. Drewes, por sus aportes acerca de la taxonomía del género *Macroptilium* y por sus sugerencias en el tratamiento del tema.

A UMYMFOR-CONICET (Depto. de Química Orgánica-FCEN-UBA) por la realización de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica y de ^{13}C .

A la Dra. Rosa Erra Balsells del Laboratorio de Fotoquímica del Depto. de Química Orgánica (FCEN-UBA), por las facilidades para el uso de los espectrofotómetros UV.

Al Dr. Arturo Vitale por todo su apoyo en la confección y elaboración de esta Tesis

A los Dres. Ricardo Roffi, Adolfo Iribarren, Carlos Buschi y Claudio Schteingart, de quienes no sólo aprendí mucho de química sino también el valor de la tabla periódica y el aporte fundamental de Kekulé a la química orgánica.

A la Ing. Agr. Magdalena Brizuela por sus aportes en el uso del BMDP y otros temas de taxonomía numérica.

A mis compañeros del Laboratorio de Plantas Vasculares, María Aurora Agulló, Pablo Pica, Alejandra Vilela, Verónica Di Stilio y todos los anteriormente mencionados, por su apoyo durante la etapa de elaboración de este trabajo.

A la Lic. Alicia Burghardt por sus aportes en taxonomía numérica y genética evolutiva.

A la Dra. María Agueda Castro, por su apoyo y entusiasmo durante la ejecución de este trabajo.

A la Dra. Elizabeth Jares y a la Lic. Cristina Tettamanzi por la confección de espectros RMN.

A mis compañeros del PROPLAME a lo largo de estos años, la Lic. Adriana Casabuono , el Dr. Rodolfo Biekovsky y todos los nombrados más arriba, por los buenos momentos compartidos.

A María del Carmen Menéndez Sevillano por sus aportes en el tema de los cultivares primitivos del género *Phaseolus*.

Al Dr. Demetrio Boltovskoy por haber facilitado programas para los análisis de taxonomía numérica.

A la Universidad de Buenos Aires por el cargo y lugar de trabajo que hicieron posibles realizar esta tesis, y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Argentina (CONICET) por el apoyo financiero para su consecución a través del PROPLAME y del proyecto de investigación "Sistemática Experimental de Leguminosas".

Quisiera también recordar a la Dra. Lilia D. Bravo, quién estuvo muy ligada a las etapas iniciales de este proyecto, y aunque no pudo verlo cristalizado en su tiempo, dedicó muchos de sus esfuerzos en llevarlo adelante.

Finalmente, quisiera agradecer a mi esposa Cecilia Aguirre, y a nuestros tres hijos- Anael, Juan Víctor y Omar- por su apoyo en estos años y por todas las horas que ellos cedieron para que este trabajo pudiera ser realizado.

Buenos Aires, Diciembre de 1992.

PUBLICACIONES A QUE HA DADO LUGAR ESTA TESIS	1
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO	2
CAPITULO 1 : INTRODUCCION	
1.1. Generalidades	3
1.2. Objetivos	4
1.3. La subtribu Phaseolinae	
1.3.1. Reseña taxonómica	5
1.3.2. El problema de la delimitación de los géneros <i>Phaseolus</i> y <i>Vigna</i>	7
1.3.3. El género <i>Vigna</i>	10
1.3.4. El género <i>Phaseolus</i>	12
1.3.5. El género <i>Macroptilium</i>	13
1.3.6. El género <i>Dolichopsis</i> y otros géneros menores ausentes en la República Argentina ...	14
1.4. Flavonoides: Aspectos químicos y biosistemáticos	
1.4.1. Generalidades sobre flavonoides	16
1.4.1.1. Actividad biológica	21
1.4.1.2. Flavonoides en interacciones planta-huésped	22
1.4.1.3. Efectos fisiológicos sobre el metabolismo animal y acción farmacoquímica	24

1.4.2. Aproximación quimiotaxonómica a la familia Leguminosae	26
1.4.3. Estudios filogenéticos en base a flavonoides	
1.4.3.1. Consideraciones generales	29
1.4.3.2. Aspectos de la evolución química en las Papilionoideas	33
1.5. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) en quimiotaxonomía de flavonoides	34
1.5.1. La técnica de la CLAR	35
1.5.2. Aplicaciones de la CLAR en quimiotaxonomía	38
1.5.3. Comparación con otros métodos	40

CAPITULO 2 : MATERIALES Y METODOS

2.1. Material Vegetal utilizado	42
2.2. Técnica de aislamiento de flavonoides	53
2.3. Determinación estructural de flavonoides	
2.3.1. Espectroscopía UV con reactivos de desplazamiento	55
2.3.2. Resonancia Magnética Nuclear Protónica	57
2.3.3. Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C	57
2.3.4. Hidrólisis ácida e identificación de azúcares y agliconas	58

2.4. Análisis Numérico Multivariado

2.4.1. Distancia taxonómica	59
2.4.2. Análisis de Agrupamiento	60
2.4.3. Red Mínima	61
2.4.4. Análisis de Coordenadas Principales	61
2.4.5. Análisis Discriminante Paso a Paso	62

CAPITULO 3 : RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.1. Perfiles cromatográficos de las especies argentinas de la subtribu Phaseolinae

3.1.1. Género <i>Vigna</i>	64
3.1.2. Géneros <i>Phaseolus</i> y <i>Dolichopsis</i>	67
3.1.3. Género <i>Macroptilium</i>	69
3.1.4. CLAR: cromatogramas de los flavonoides aislados mediante cromatografía en papel eluidos en MeOH	71
3.1.5. Características cromatográficas	77
3.1.6. Determinación de los productos de hidrólisis ácida	79

3.2. Flavonoides aislados en las especies estudiadas

3.2.1. Flavonoles	80
3.2.1.1. Glicósidos de quercetina	81
3.2.1.2. Glicósidos de canferol	85
3.2.1.3. Otros flavonoles glicosidados	91
3.2.1.4. Flavonoles metilados	92

3.2.2. Flavonas	93
3.2.2.1. Glicósidos de luteolina y apigenina ...	93
3.2.2.2. Otras flavonas	95
3.2.3. Otros flavonoides aislados.....	97
3.2.3.1. Isoflavonoides	97
3.2.3.2. Flavanonas	98
3.2.4. Un nuevo tipo de glicósidos de canferol: Isoramninósidos	99
3.2.4.1. Espectroscopía UV	99
3.2.4.2. ¹ H-RMN	100
3.2.4.3. ¹³ C-RMN	100
3.2.4.4. Determinación estructural	106
3.2.5. Perfil químico de la subtribu Phaseolinae en la Argentina	110

3.3. Análisis Numérico Multivariante

3.3.1. Género <i>Vigna</i>	
3.3.1.1. Matriz básica de datos	113
3.3.1.2. Matriz de distancia	114
3.3.1.3. Análisis de agrupamiento	115
3.3.1.4. Análisis de coordenadas principales ..	116
3.3.1.5. Red mínima	117
3.3.2. Género <i>Phaseolus</i>	
3.3.2.1. Matriz básica de datos	118

4.2.2. <i>Phaseolus lunatus</i> y <i>Phaseolus augustii</i>	140
4.3. El género <i>Macroptilium</i>: discusión particular	
4.3.1. Las secciones <i>Microcochle</i> y <i>Macroptilium</i>	142
4.4. Discusión General	146
4.4.1. Análisis de agrupamiento para el complejo <i>Vigna-Phaseolus-Macroptilium</i>	147
4.4.2. Análisis discriminante: segregación de los grupos	149
4.4.3. Subtribu <i>Phaseolinae</i> : posición sistemática de los grupos estudiados en relación a las evidencias bioquímicas	151
CAPITULO 5 : CONCLUSIONES	157
5.1. Aspectos químicos	158
5.2. Aspectos taxonómicos	160
5.3. Perspectivas	165
CAPITULO 6 : BIBLIOGRAFIA	167
APENDICE: SINOPSIS TAXONOMICA	193
A1: Género <i>Vigna</i>	
A2: Género <i>Phaseolus</i>	
A3: Género <i>Macroptilium</i>	

Publicaciones a que ha dado lugar esta tesis:

Antimicrobial screening of some argentine higher plants-Part II
Tomes,C.; Viale,A.; Buschi,C.; Rofi,R.; Schteingart,C.; Iñigo,R.;
Zallocchi,E. and Pomilio,A. *Fitoterapia* 57 (1): 46-50 1986

Two new kaempferol isorhamminosides from *Vigna luteola*
A.B. Pomilio and E.M. Zallocchi. *J. Nat. Prod.* 52 (3) : 511-515
1989

**Bases de aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución
(CLAR) en quimiotaxonomía de flavonoides**
E.M. Zallocchi, A.B. Pomilio y R.A. Palacios. *Bol. Soc. Arg. Bot.*
26 (3-4) : 163-172 1990

**Preliminary observations on the argentinian wild forms of common
bean *P. vulgaris* var. *aborigineus* (Burk.) Baudet**
M.C. Menéndez Sevillano, R.A. Palacios, E.M. Zallocchi y M.M.
Brizuela. *An. Rep. BIC* 35 : 211-212 1992

**Estudio quimiotaxonómico de la subtribu Phaseolinae
(Phaseoleae-Papilionoideae-Leguminosae) I: Cromatografía de
flavonoides de las especies argentinas del género *Macroptilium*.**
E.M. Zallocchi, A.B. Pomilio y R.A. Palacios.
Darwiniana 32 (1-2) : (en prensa) 1992

Abreviaturas empleadas en este trabajo :

AA 15% = Acido Acético:Agua (15:85)
AcONa = acetato de sodio
BAA = sigla del herbario de la Fac. de Agronomía-UBA
BAFC = sigla del herbario de la FCEN-UBA
¹³C = isótopo del carbono de masa atómica 13 (ver también ¹³C-RMN)
CLAR = cromatografía líquida de alta resolución (también HPLC)
CLL = cromatografía líquido-líquido (también CPLL)
CPLL = cromatografía de partición líquido-líquido (también CLL)
DMSO-d₆ = Dimetil sulfóxido deuterado
EP = éter de petróleo fracción 60-80° C
EEP = extracto de éter de petróleo
EMe = extracto metanólico
¹H = átomo de hidrógeno de masa atómica 1 (ver también ¹H-RMN)
HPLC = high performance liquid chromatography (ver CLAR)
HPTLC = high performance thin layer chromatography (ver TLC)
IBAA = isobutanol:agua:ácido acético (3:1:1)
LIL = sigla del herbario del Instituto M. Lillo (Tucumán)
MBD = matriz básica de datos
MCD = coeficiente Mean Character Distance
MD = coeficiente Manhattan Distance
MeOH = alcohol metílico (=metanol; CH₃OH)
MeONa = metóxido de sodio (CH₃-O-Na)
mm = metros sobre el nivel del mar
NOA = Noroeste argentino
OTU = unidades taxonómicas operacionales
PA = percolado acuoso
PCA = análisis de componentes principales
PCl = percolado clorofórmico
PCO = análisis de coordenadas principales
PMe = percolado metanólico
ppm = partes por millón
R_f = relación de frente
RMN = resonancia magnética nuclear
¹³C-RMN = resonancia magnética nuclear de carbono 13
¹H-RMN = resonancia magnética nuclear protónica
RP = reverse phase (fase reversa)
RP C-18 = relleno de fase reversa de octadecil silano
RP C-8 = relleno de fase reversa de octocil silano
SDA = análisis discriminante paso a paso
SI = sigla del herbario del Instituto de Botánica Darwinion
TLC = thin layer chromatography (cromatografía de placa delgada)
t_R = tiempo de retención
UV = radiación electromagnética ultravioleta

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1. Generalidades

Dentro de la gran familia de las Leguminosas (Fabaceae) la tribu pantropical de las **Phaseoleae** DC (1825) es una de las más importantes, tanto por la cantidad de géneros que reúne, unos 84 (Lackey, 1981) como por el alto valor económico de muchas de las especies comprendidas.

No sólo es una de las tribus más numerosas de la subfamilia Papilionoideae con cerca de 1450 especies (Lackey, 1981) sino que también corresponde a una de las que presentan un mayor nivel evolutivo, considerando que "... en su grupo superior, la subtribu Faseolíneas, la flor alcanza un grado sorprendente de perfeccionamiento morfológico y etológico." (Burkart, 1952).

Sin embargo, por tratarse de plantas relativamente uniformes en cuanto a sus caracteres vegetativos (Burkart, 1952) y por las diversas interpretaciones (no siempre afortunadas) a que ha dado lugar su compleja estructura floral, se han sucedido a lo largo de la historia distintos sistemas para su clasificación sobre los cuales los autores no han llegado a ponerse del todo de acuerdo.

Por otra parte, debido al importante papel que juegan algunas especies cultivadas en regiones tropicales, sobretudo de los géneros *Vigna* y *Phaseolus* (Maréchal, 1969) la delimitación genérica de este grupo ha recibido especial atención a partir de la década de 1970. En particular a partir del trabajo del Dr. Verdcourt para la flora africana (Verdcourt, 1970a), aunque siempre habían existido esfuerzos más o menos acabados tendientes a esclarecer la taxonomía del grupo.

Actualmente la subtribu **Phaseolinae** Bentham -que Lackey (1981) consideró dentro de un sistema de 7 subtribus basándose en la morfología floral, el número cromosómico, caracteres epidérmicos y la distribución de canavanina, un aminoácido libre presente en las semillas- comprende unos 23 géneros de muy diferente abundancia específica, de los cuales sólo 7 están representados en el continente americano: *Vigna*, *Phaseolus*, *Macroptilium*, *Dolichopsis*, *Strophostyles*, *Oxyrhynchus* y *Ramirezella*.

De estos, los tres primeros (bien representados en la Argentina)

conforman el núcleo de la subtribu **Phaseolinae**; los tres siguientes contienen pocas especies (una, tres y cuatro respectivamente) y sólo *Dolichopsis* se halla en nuestro país, y por último *Ramirezella* es un género de México y Centroamérica que es reconocido por Maréchal et al. (1978a) pero no por Lackey (1983), que lo sinonimiza a *Vigna*.

Es así como durante los últimos 20 años los trabajos de Verdcourt (1970a, 1970b, 1980), Maréchal, Mascherpa & Stainier (1978a, 1978b) y Lackey (1981, 1983) han propuesto la delimitación genérica e infragenérica en base a un cúmulo de características morfológicas y palinológicas. Esta clasificación ha sido en general aceptada, quedando por establecer la bondad del sistema propuesto en base a otro tipo de información, tal como estos mismos autores se han ocupado de aclarar.

Sin lugar a dudas el estudio de compuestos fenólicos en forma sistemática para el grupo constituye una de las herramientas más valiosas para tal fin, y es precisamente el aporte que nos proponemos efectuar en este trabajo.

1.2. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo han sido:

- 1.- Estudiar desde un punto de vista quimiotaxonómico, empleando compuestos fenólicos como marcadores, las especies presentes en la flora argentina de los géneros correspondientes a la subtribu **Phaseolinae** (Phaseoleae-Papilionoideae-Leguminosae).
- 2.- Establecer la variabilidad a nivel interespecífico e intergenérico, estudiando las afinidades químicas entre las especies y las relaciones entre los distintos géneros y secciones.
- 3.- Contrastar los resultados obtenidos con el tratamiento sistemático aceptado para el grupo, a fin de contribuir al esclarecimiento de la taxonomía de la subtribu **Phaseolinae**.

Para la consecución de los mismos se efectuaron los siguientes estudios:

1.- Se estudiaron mediante cromatografía líquida de partición líquido-líquido bidimensional sobre papel y por cromatografía líquida de alta resolución los flavonoides presentes en 3 especies del género *Phaseolus*, 9 especies del género *Vigna*, 8 especies del género *Macroptilium* y 1 especie del género *Dolichopsis*.

2.- Se estableció el perfil cromatográfico de cada especie, aislando, purificando y determinando estructuralmente los flavonoides presentes.

3.- Se analizaron mediante técnicas de análisis numérico multivariante las relaciones de distancia y se efectuaron análisis de agrupamiento intra e intergenéricos, como asimismo se estudió la homogeneidad de los grupos mediante análisis discriminante.

1.3. La Subtribu Phaseolinae

1.3.1 Reseña taxonómica

En 1753 Linneo estableció el género *Phaseolus* (que caracterizó como "**scandentes**", es decir trepadora) en donde incluyó 11 especies americanas y paleotropicales, siendo *P. vulgaris* la especie tipo. A continuación consideró otras 12 especies para el género relacionado *Dolichos* (donde estableció 2 grupos: "volubiles" y "erecti"), siendo *D. lablab* la especie tipo.

El género *Vigna* fue creado por Savi en 1824 incluyendo, mayoritariamente, especies del Viejo Mundo. La especie tipo del género resultó *V. luteola* (Jacq.) Benth., que era una especie paleotropical hasta entonces incluida bajo *Dolichos* L..

Poco después, De Candolle (1825) estableció para *Phaseolus* dos secciones: **Euphaseolus** y **Strophostyles**, pero su sistema (donde consideraba 5 subgrupos en la primera y otros dos para la segunda) era muy heterogéneo y no brindaba una base clara para la clasificación.

Bentham (1837) ya incluía en *Phaseolus* unas 85 especies, las cuales distribuyó en 7 secciones: **Drepanospron**, **Euphaseolus**, **Leptospron**, **Strophostyles** (Elliot) DC, **Lasiospron**, **Microcochle** y **Macroptilium** (*Strophostyles*, género de Elliot, fue reducido a una sección de *Phaseolus* pero sin mencionar el tipo e incluyendo allí especies asiáticas poco relacionadas).

En "*Flora Brasiliensis*", Bentham (1859) incluye las especies de la sección **Lasiospron** en **Strophostyles**. Luego, en "*Genera Plantarum*", Bentham (1865) omitió **Microcochle**, pero agregó **Dysolobium**,

incluyendo un grupo de especies del Viejo Mundo. Estas secciones serían reconocidas como géneros independientes más tarde: *Dysolobium* por Prain (1897) y *Macroptilium* por Urban en 1928.

Hassler (1923) revisando las especies sudamericanas mantuvo 5 secciones para *Phaseolus*: **Euphaseolus** Benth., **Drepanospron** Benth., **Leptospron** Benth., **Macroptilium** Benth. emend. Hassler y **Strophostyles** (Elliot) DC., y crea un número de series en cada una. Sin embargo, su sistema no era conveniente y resultaba poco natural, pues se había basado en caracteres poco constantes como el tipo de indumento o la forma y tamaño de los folíolos, de modo que no clarificó lo suficiente los límites supra e infraespecíficos, y no tuvo mayor aceptación.

Muy poco después, Piper (1926) efectúa uno de los mejores estudios sobre las **Phaseolinae** americanas. Reconoció en total 12 géneros: *Phaseolus* L., *Oxyrhynchus* Brandagee, *Pachyrhizus* Piper, *Monoplegma* Piper, *Dolichopsis* Piper, *Vigna* Savi, *Condylostylis* Piper, *Plectotropis* Schum. & Thonn., *Strophostyles* Elliot, *Ramirezella* Rose, *Minkelersia* Mart. & Galeotti y *Alepidocalyx* Piper.

Para *Phaseolus* consideró 7 secciones: **Sigmoidotropis** Piper, **Ceratotropis** Piper, **Macroptilium** Benth., **Microcochle** Benth., **Cochliasantus** (Trew) Piper, **Leptospron** Benth. y **Euphaseolus** Benth.. La profundidad del trabajo de Piper (1926) -que cerraba así sus estudios sobre el grupo, los cuales había iniciado hacía casi una década (Piper 1920,1924) queda testimoniada en un comentario de Gillet (1964) citado por Verdcourt (1970): "... El peculiar entendimiento de la taxonomía de Piper se manifiesta en el hecho de que separó *Dolichopsis* de *Vigna* porque aquel posee legumbres no septadas. Actualmente [se reconoce que], la especie tipo del género *Vigna* (*V. luteola* (Jacq.) Benth.), que se da tanto en América como en Africa, presenta legumbres con septos. Tanto Happer como nosotros no hemos dejado de observar que las legumbres con septos son características de *Vigna*."

En 1928, Urban elevó la sección **Macroptilium** Benth. a género, efectuando una serie de nuevas combinaciones específicas que serán detalladas más adelante. Sin embargo, Burkart (1952) y otros botánicos continuaron aceptando el criterio de Piper (1926) y siguieron incluyendo a **Macroptilium** dentro de *Phaseolus*, considerando el género en sentido amplio (*Phaseolus sensu lato*) mientras que en sentido estricto (*Phaseolus sensu stricto*) el género quedó, con el tiempo, prácticamente reducido a las secciones **Euphaseolus** y **Drepanospron**, dado que **Macroptilium** y **Microcochle**

conformaron el género *Macroptilium* Urban y las restantes secciones fueron incluidas en su mayoría en el género *Vigna* posteriormente.

Rudd (1967) propuso que los géneros americanos *Oxyrhynchus* y *Monoplegma* eran congénéricos, y ambos muy probablemente relacionados al género monotípico *Peckelia*.

En 1970 Verdcourt presentó su trabajo basado principalmente en la distribución de los géneros de **Phaseoleae** del Viejo Mundo, en el contexto de la Flora Tropical del Este de Africa.

En el mismo redefinió *Phaseolus* como un género de unas 50 especies exclusivo del Nuevo Mundo, manteniendo a *Vigna* como gran género de distribución pantropical. Asimismo, apoya la propuesta de Rudd respecto a *Oxyrhynchus* y *Monoplegma*, y adhiere a la idea de *Macroptilium* como género distinto a *Phaseolus*.

En este estudio, donde por primera vez se aportan evidencias bioquímicas y palinológicas, se plantea claramente el problema de la compleja delimitación entre *Phaseolus* y *Vigna* (como se presentará detalladamente en el próximo punto).

Lackey (1977) mantuvo en líneas generales los conceptos genéricos de Verdcourt, pero *Clitoria*, *Clitoriopsis*, *Periandra* y *Centrosema* fueron transferidos a otra subtribu por sus características fitoquímicas y morfológicas (Lackey, 1981).

En su monumental trabajo de 1978, Maréchal, Mascherpa y Stainier efectuaron una revisión global de la subtribu **Phaseolinae**. En base al estudio de más de 150 caracteres morfológicos y palinológicos, y mediante el empleo de técnicas de análisis numérico establecieron y probaron un esquema bastante satisfactorio para el tratamiento del grupo. Si bien en líneas generales este trabajo se apoyó en el de Verdcourt (1970a), manteniendo la restricción de *Phaseolus* a las especies americanas, reconociendo a *Macroptilium* como un grupo homogéneo y considerando en *Vigna* las antiguas secciones de Piper para *Phaseolus*, quedaron una serie de puntos no resueltos, o al menos de dudosa interpretación.

1.3.2. El problema de la delimitación entre *Phaseolus* y *Vigna*

La delimitación entre *Phaseolus* y *Vigna* es uno de los mayores problemas en la clasificación de las **Phaseolinae** (Lackey, 1983). Hasta hace poco tiempo *Phaseolus* contenía unas 200 a 300 especies que respondían a características de diversos géneros (Verdcourt, 1971).

Clásicamente la diferenciación entre ambos se basaba en el grado en que el rostro de la quilla se incurva.

Ya Bentham (1865) había considerado a *Phaseolus* como de quilla espiralada mientras que a *Vigna* correspondía una quilla oblicua o a veces incurvada, pero no perfectamente espiralada.

Este criterio no resultó eficiente pues ciertas especies del Viejo Mundo que se consideraban bajo *Phaseolus* eran probablemente más próximas a otras de *Vigna* que a las de muchos *Phaseolus* americanos.

Wilczek (1954) separó ambos géneros considerando caracteres de las estípulas y la morfología del aparato estilar:

-Estípulas no prolongadas debajo del punto de inserción, quilla en una espiral de 1-5 vueltas completas, estigma elongado, interno, o a veces muy corto y terminal o subterminal; estilo sin apéndice apical.....**PHASEOLUS**

-Estípulas prolongadas por debajo del punto de unión, quilla erecta hasta incurvada, raramente formando 1 vuelta de espiral completa; estilo terminando más allá del estigma, en un rostro más o menos diferenciado.....**VIGNA**

En base a estos conceptos, Wilczek transfirió algunas especies africanas de *Phaseolus* a *Vigna* (como *P. radiatus* L. y *P. campestris* Mart.).

Hepper (1956) transfirió *P. mungo* L. a *Vigna* en base al trabajo anterior e introduciendo el concepto ya mencionado acerca del tabicamiento interno del fruto.

En otro trabajo (Hepper, 1958) este autor diferencia ambos géneros por las estípulas, la quilla y el carácter de fruto no septado (*Phaseolus*) o con septos (*Vigna*).

Sin embargo, el problema de distinguir estos dos géneros no pareció totalmente resuelto, dado que muchas especies no parecían responder a dicho esquema. Algunos autores ya venían proponiendo "soluciones" drásticas cuyo beneficio resultaba, por lo menos, dudoso, como por ejemplo introducir directamente *Vigna* en *Phaseolus* en forma completa, o bien establecer otro tipo de subdivisiones segregando muchos nuevos géneros. Así, Gagnepain (1916) propuso unir directamente *Vigna* y *Phaseolus* en un único género, o Richard (1847) quién fue uno de los primeros en sugerir que *Dolichos*, *Vigna* y *Phaseolus* eran tres secciones de un gran género natural, lo cual ciertamente no aportaba ninguna solución dado el gran número de

especies que contendría.

Desafortunadamente muchos estudios en los cuales se segregaron géneros menores del tronco principal **Vigna-Phaseolus** estuvieron basados en revisiones de una muy pequeña porción de especies respecto al total involucrado (Gillet,1964).

Wildeman (1902) describió *Liebrechtsia* separándolo de *Vigna* por presentar un estilo prolongado por encima del estigma, pero no fue mantenido por autores posteriores.

Ohwi (1953) segregó 5 especies japonesas de *Phaseolus* (sec. *Strophostyles* Benth.), creando el género *Azukia*, que presentaba un tipo de estilo similar a *Liebrechtsia*, además de tener estípulas peltadas y ciertos caracteres del polen.

Maekawa (1955) separó a su vez 2 especies de *Azukia*, para formar *Rudua* por encontrar sésiles el primer par de hojas (pecioladas en *Azukia*, como en *Phaseolus* y *Dolichos*). Toda esta serie de cambios fue realizada consultando únicamente 2 especies de *Phaseolus*, 1 de *Strophostyles*, 1 de *Dolichos* y 1 de *Vigna*! (Gillet,1964).

Como ya se ha mencionado, Verdcourt (1970a) restringió *Phaseolus* exclusivamente al continente americano, reasignando secciones de *Piper* para dicho género en *Vigna*, en base a evidencias bioquímicas brindadas por el estudio de aminoácidos y compuestos relacionados presentes en semillas y por evidencias palinológicas referentes a la ornamentación de la pared del grano de polen, que en *Vigna* presenta un retículo grueso mientras que en *Phaseolus* es casi liso o muy fino.

Consideró para *Vigna* 8 subgéneros: **Vigna, Sigmoidotropis, Dolichovigna, Haydonia, Ceratotropis, Cochliasanthus, Macrorhynchya y Plectotropis**. La clave que brinda se basa principalmente en caracteres de la quilla, el estilo, tipo de estípulas, forma del estandarte y la distribución geográfica. En varios de los subgéneros consideró distintas secciones.

Los estudios posteriores continuaron con este punto de vista (Baudet 1973,1974,1978; Baudet y Maréchal,1976; Lackey,1977) aunque se introdujeron algunas variantes a partir del esquema de Verdcourt (Maréchal et al.,1978a).

Aunque existió algún escepticismo respecto a la conveniencia de efectuar continuos cambios taxonómicos involucrando plantas tan utilizadas en agricultura (Westphal, 1974) y todavía persisten algunas dificultades específicas, como por ejemplo la ubicación de *V. adenantha* o la relación entre *Alepidocalyx* y *Minkelersia* con *Phaseolus*, puede decirse que en líneas generales este esquema de clasificación ha sido aceptado. A este fin tiende la revisión de Lackey (1983) para el grupo en América, donde se propone lograr la

mayor aceptación entre los autores promoviendo -no sin razón- conceptos genéricos estables dentro del grupo.

1.3.3. El género *Vigna*

Inicialmente, como ya se mencionó (1.1.2.), la distinción de *Vigna* estaba fundada en la no espiralización de la quilla, teniendo en cuenta la quilla recta y no recurvada de *V. luteola*, la especie tipo, que posee una flor de simetría bilateral.

El grupo de especies asiáticas correspondientes a la sección **Ceratotropis** de Piper (1926) se caracterizan por tener flores netamente asimétricas, con una cierta torsión de la quilla, que está curvada, y por la presencia de un bolsillo sobre la derecha que separa una de las alas. Por este hecho, que las diferencia notablemente de las especies africanas, se mantuvo por mucho tiempo a ese grupo dentro del género *Phaseolus*, cuya característica básica, de acuerdo al esquema inicial (Bentham y Hooker, 1865) era la quilla espiralada y la flor típicamente asimétrica.

A partir de la revisión de los conceptos genéricos para *Vigna* y *Phaseolus* de Wilczek (op. cit.) fue necesario transferir a *Vigna* toda la sección **Ceratotropis** de *Phaseolus*.

Verdcourt (1970a) transfirió la sección **Lasiospron** Benth. emend. Piper basándose en características del estilo, las estípulas y el estandarte.

Las otras secciones americanas **Sigmoidotropis**, **Cochlianthus** y **Leptospron** presentan una serie de dificultades mucho más amplias, dado que existe una cierta mezcla de caracteres de *Phaseolus* s.str. y de *Vigna* (Maréchal et al., 1978a). Las estípulas son truncadas en la base, y el estigma puede ser terminal (como en *Phaseolus*) o presentar una continuación del estilo por encima, típico de *Vigna*. La quilla presenta distintos grados de espiralización, desde recurvada en una vuelta completa o incompleta, o en forma de letra "S" (**Sigmoidotropis**), hasta una espiral laxa (**Cochlianthus**) o una espiral recortada (como en *P. adenanthus*, sec. **Leptospron**).

Del mismo modo, los caracteres polínicos son muy variados: hay diferencias en el tipo de retículo de la exina, y muchas especies presentan aperturas colporadas, carácter que no se encuentra en las *Vigna* típicas del Viejo Mundo, aunque sí en los pequeños subgéneros **Dolichovigna** y **Macrorhyncha** (Maréchal et al., 1978a).

Ya en 1920, Fawcett y Rendle habían transferido 2 especies de la sección **Sigmoidotropis** de *Phaseolus* a *Vigna* (*V. peduncularis* y *V.*

antillana).

Aunque Piper (1926) mantuvo **Sigmoidotropis** en *Phaseolus* por comodidad, sugirió que esta sección podía ser elevada a rango genérico.

Finalmente, Verdcourt (1970a) consideró en base a las evidencias palinológicas, la morfología de la quilla y del estilo que **Sigmoidotropis** y **Cochliasanthus** quedaban incluídas en *Vigna*, aunque mantuvo **Leptospron** (con su único representante *P. adenanthus*) en *Phaseolus*, basándose en el hecho de que presenta un estilo terminal además del tipo de polen no reticulado y tricolporado, similar a otras especies de *Phaseolus*.

Por último, Maréchal et al.(1978a) consideran la inclusión de **Leptospron** en *Vigna* en base a la ausencia de pelos uncinulados presentes en *Phaseolus*, *Minkelersia* y *Alepidocalyx*, pero ausentes en el resto de las **Phaseolinae**, incluyendo *Vigna* (Baudet y Maréchal, 1976).

Asimismo, estos autores incorporaron **Cochliasanthus** como una sección de **Sigmoidotropis** - sec. **Caracallae**- (Maréchal et al., 1978b) y transfirieron el subgénero *Dolichovigna* de Vercourt al género *Dysolobium* Prain (1897), manteniendo el resto del sistema de Vercourt (1970a).

De este modo, *Vigna* ha quedado conformado como un gran género bastante heterogéneo, con numerosas subdivisiones.

De acuerdo al esquema de Maréchal et al. (1978a) el género está dividido en 7 subgéneros : **Vigna**, **Haydonia** (Wilczek) Verdcourt, **Plectotropis** (Schumach.) Baker, **Ceratotropis** (Piper) Verdcourt, **Lasiospron** (Benth. emend. Piper) Maréchal, Mascherpa y Stainier , **Sigmoidotropis** (Piper) Verdcourt emend. Maréchal, Mascherpa y Stainier y **Macrorhynchya** Verdcourt (ver APENDICE A1).

El subgénero **Vigna** abarca 6 secciones, principalmente de especies africanas salvo la sección **Vigna**, donde encontramos la especie tipo del género (*V. luteola*), que es pantropical.

Haydonia (3 secciones) y **Plectotropis** (2 secciones) están conformados mayoritariamente por especies africanas y algunas pantropicales.

Ceratotropis y **Macrorhynchya** (no subdivididos en secciones) abarcan unas 11 especies asiáticas el primero y tres especies de Africa, India y Sri Lanka el segundo.

El gran subgénero **Sigmoidotropis** abarca 5 secciones americanas, con especies en América tropical, llegando hasta nuestro país varias de ellas: *V. candida*, *V. peduncularis*, *V. hookerii*, *V. caracalla* y *V. adenantha*.

Por último, el subgénero **Lasiospron**, más pequeño y con igual distribución, comprende 3 especies, dos de las cuales crecen en la

Argentina: *V.longifolia* y *V.lasiocarpa*.

1.3.4. El género *Phaseolus*

Sin dudas, *Phaseolus* es el género que ha sufrido más modificaciones desde su creación por Lineo en 1753.

A partir de las 7 secciones inicialmente fundadas por Bentham (1837) se fue sucediendo la serie de cambios referidos (1.1.1 y 1.1.2.) hasta su conformación actual.

A partir de Verdcourt (1970a) el género es estrictamente americano, y en general su distribución está asociada a cadenas montañosas, especialmente la cordillera de Los Andes y la Sierra Madre Oriental y Sierra Madre Occidental en México, lo cual ha sido señalado por este autor como un carácter biofitogeográfico que apoya la delimitación del género.

En la República Argentina el género sólo fue tratado por Burkart (1952) quien ya había prestado atención a las especies silvestres de nuestro país como posibles antecesores de las formas cultivadas (Burkart, 1941). Fue así como este autor propuso inicialmente el binomio *P. aborigineus* (Burkart, 1952) que posteriormente pasó al rango de subespecie (Burkart, 1953) y finalmente fue incluido como una variedad de *P. vulgaris* (Baudet, 1977).

Desde ya, cabe aclarar que existen diversas opiniones sobre el nivel taxonómico de las formas silvestres, inmediatas antecesoras de las formas cultivadas (Palacios y Vilela, 1991) por lo que para unificar criterios nomenclaturales resulta conveniente continuar adoptando la propuesta de Baudet (1977).

Debe señalarse asimismo que Burkart (1944) describió otra especie para el género, *P. dolicharpus*, aunque posteriormente fue reconsiderada como una forma de *Dolichopsis* por el propio autor.

En su revisión del género de 1978, Maréchal, Mascherpa y Stainier además de traspasar a *Vigna* la sección **Leptospron** (que Verdcourt había dejado en *Phaseolus*) establecieron una nueva subdivisión en secciones.

Reconocieron tres secciones para el género: la gran sección **Phaseolus** donde ubican la gran mayoría de las especies, y donde encontramos todas las de nuestro país, corresponde a las anteriores secciones **Euphaseolus** y **Dysolobium** de Bentham; la sección **Minkelersia** que comprende al antiguo género de Piper, y la sección **Alepidocalyx** también un pequeño género de Piper (1926).

Posteriormente Lackey (1983) propuso la existencia de únicamente 2 secciones: **Phaseolus**, que coincide con la de Maréchal, Mascherpa y

Stainier (1978a) y *Minkeliersia*, donde este autor incluye a *Alepidocalyx* (ver también Apéndice A2).

1.3.5. El género *Macroptilium*

El género *Macroptilium* (Bentham) Urban (1928) fue el resultado de la unión de dos antiguas secciones del género *Phaseolus* L.: **Macroptilium** Bentham y **Microcochle** Bentham.

Las primeras especies fueron descritas ya por Linneo en 1763 (entre ellas, *P. lathyroides*), aunque la mayor parte de las especies se describieron en el siglo XIX en trabajos sobre el género *Phaseolus*. Bentham (1837,1839), describe *P. longepedunculatus*, *P. erythroloma* y *P. panduratus*, entre otras especies americanas, considerando a **Macroptilium** una de sus 7 secciones para *Phaseolus*. En su revisión posterior para el capítulo sobre las Leguminosae de la "**Flora Brasiliensis**" de Martius (Bentham, 1859), introdujo algunos cambios en las secciones, e incluyó *P. bracteatus* y *P. prostratus*, el primero ya descrito por Martius y Nees en 1824: estableció entonces tres secciones para *Phaseolus*, una de las cuales era **Macroptilium** y comprendía actuales especies del género.

Por otra parte, Lindman (1898) en su trabajo sobre las **Phaseoleae** austro-americanas describió *P. psammodes* como una nueva especie. En 1923, Hassler, estudiando las especies sudamericanas de *Phaseolus*, adoptó el esquema de Bentham y aunque introdujo toda una serie de subdivisiones en variedades, formas y subformas continuó considerando la sección **Macroptilium** sin mayores variantes.

El trabajo de Piper (1926) sobre las **Phaseolinae** americanas que propuso una nueva división de 7 secciones para *Phaseolus* siguió incluyendo las secciones **Macroptilium** y **Microcochle**.

Piper incluyó en **Microcochle** a *P. fraternum* Piper (sp. nov.) y *P. psammodes* Lindman, además de *P. heterophyllum* Willdenow entre otras.

Urban, en 1928, elevó a la categoría de género a la sección **Macroptilium** Bentham, efectuando una serie de nuevas combinaciones específicas. Sin embargo, como ya se había mencionado, Burkart (1952) y otros botánicos continuaron aceptando el criterio de Piper, por lo que mantuvieron este grupo dentro de *Phaseolus*.

Posteriormente, el nuevo género fue aceptado por la mayoría de los autores (Hutchinson, 1967; Maréchal, 1970; Lackey, 1977).

En su importante trabajo de 1970, Verdcourt también aceptó a *Macroptilium* como un género no incluido en *Phaseolus*, pero sin

efectuar nuevas combinaciones.

Finalmente, a partir de los trabajos de Lackey (1977; 1983) y sobre todo de Maréchal et al. (1978a, 1981) donde efectúan nuevas combinaciones a partir de estudios cromosómicos, palinológicos y morfológicos basados en técnicas de análisis numérico multivariado ponderado, se establecen las principales características del género.

Maréchal et al. consideran que se trata de un género muy homogéneo, donde los taxones presentan un elevado índice de similitud, y prefieren por lo tanto no efectuar una subdivisión en secciones, considerando que la separación entre especies con frutos rectos y erguidos y aquellas con vainas arqueadas y péndulas sería demasiado artificial (Maréchal et al., 1978a).

En cambio, Lackey (1983) reconoce dentro de *Macroptilium* 3 secciones (**Macroptilium** ; **Microcochle** (Bentham) Lackey y **Monophyllum** Lackey) e incluye una serie de nuevas combinaciones, entre las cuales consideró *M. psammodes* (Lindman) Lackey y *M. fraternum* (Piper) Lackey, restringiendo así *M. heterophyllum* (Willdenow) Maréchal et Baudet, donde aquellas especies habían sido incluídas por Maréchal et al. (1978a) siguiendo a Hassler (1923).

Trabajos más recientes sobre el género (Fevereiro, 1987) sostienen una división en secciones para el grupo.

Por último, vale aclarar respecto a las especies aquí consideradas para la República Argentina que *M. geophillus* (Burkart) Debouck, Juárez et Pérez (Juárez y Pérez 1986) citada para la provincia de Salta (Juárez y Pérez, 1987) es en realidad un sinónimo de *M. panduratum* (Martius ex Bentham) Maréchal et Baudet (1977), y por lo tanto el nombre válido sería *M. panduratum* (S. Drewes, com. per.). Dado que así ha sido considerado también por autores posteriores (Fevereiro, 1987) dicho tratamiento se mantuvo en este trabajo.

1.3.6. El género *Dolichopsis* y otros géneros menores ausentes en la República Argentina.

El género *Dolichopsis* Hassler (1907) es un género monotípico sudamericano, endémico del Paraguay y que se extiende en parte al NE argentino. Se caracteriza por tener flores simétricas, con estigma terminal oblicuo y estilo erecto, el estandarte desprovisto de callosidades en su cara interna, polen tricolporado con la exina finamente reticulada, legumbres septadas y estípulas no prolongadas

debajo del punto de inserción.

La descripción de Hassler estaba basada en un ejemplar, bastante incompleto, catalogado por Bentham (1859) como *Vigna ? paraguariensis*.

Piper (1926) reconoció el género de Hassler, separándolo por el carácter del fruto, pero sin describirlo ni considerar otras especies.

Burkart (1952) estudiando fotografías del ejemplar tipo reconoció la especie como correcta.

Maréchal, Mascherpa y Stainier (1978a) consideran también el género como válido y resaltan las particularidades del fruto y la forma de la implantación de las semillas.

Lackey (1983) considera 2 especies para *Dolichopsis*: ampliando la distribución hasta Bolivia y Brasil introduce *D. monticola* (Benth.) Lackey, manteniendo *D. paraguariensis* (Benth.) Hassler. En el presente estudio se analiza el perfil cromatográfico de un ejemplar de *Dolichopsis paraguariensis* a modo comparativo con respecto a los géneros *Vigna*, *Phaseolus* y *Macroptilium*.

De los géneros de la subtribu reconocidos por Lackey (1983) y que no están presentes en nuestro país, cabe citar a :

- *Strophostyles* Elliot (1822) que es un pequeño género norteamericano que presenta similitudes con *Dolichopsis* sobre todo en lo concerniente a la morfología floral (Maréchal et al., 1978a). Incluye 2 especies que abarcan desde el este de Canadá y centro de los Estados Unidos, hasta el norte de México.

Lackey (1983) considera 3 especies.

- *Pachyrhizus* Rich, ex D.C. (1825) es un género centroamericano, bastante homogéneo, que se diferencia del resto por caracteres de la inflorescencia (paniculada, pluriflora, sin glándulas), las flores simétricas, con una carena recta no rostrada y estigma terminal, y el fruto toruloso, septado. Lackey (1977) sugirió su exclusión de las **Phaseolinae**, para incluirlo en la subtribu **Diocleinae**, en base a la presencia de canavanina y rotenona en las semillas. Maréchal et al. (1978a) todavía lo incluyen **Phaseolinae** aunque no estarían en desacuerdo con Lackey.

Una monografía completa del género fue efectuada por Clausen (1944) donde incluye 4 especies.

- *Oxyrhynchus* Brandegees (1912) es un pequeño género de América Central que se extiende desde México hasta el norte de Colombia. Fue discutido adecuadamente por Piper (1924) y si bien por los caracteres del fruto (largo, comprimido lateralmente) y la semilla

(con un hilo muy desarrollado que rodea dos terceras partes de la circunferencia) pareciera muy próximo a la subtribu *Diocleinae*, la morfología floral no deja dudas en cuanto a su pertenencia a este grupo (Maréchal et al., 1978a; Lackey, 1977).

- *Ramirezella* Rose (1903) es un género casi exclusivo de México, con sólo una especie en El Salvador. Fue tratado en extenso por Piper (1926) donde describe 8 especies. Maréchal et al. (1978a) reconocen 7 especies, y por las características del polen de la mayor parte de las especies (una exina finamente reticulada), como por la arquitectura floral, concluyen que existe una afinidad muy alta con el subgénero *Sigmoidotropis* de *Vigna*.

Lackey (1981) no incluye al género, y en su trabajo de 1983 (op. cit.) menciona su idea de que quedaría englobado bajo el género *Vigna*.

1.4. Flavonoides: aspectos químicos y biosintéticos

1.4.1. Generalidades sobre flavonoides

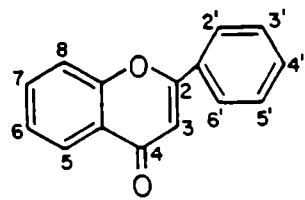
El término flavonoide se aplica desde hace bastante tiempo a una serie de compuestos fenólicos presentes universalmente en las Angiospermas como asimismo en muchas plantas menos evolucionadas, conformando moléculas importantes para el normal crecimiento, desarrollo y funcionamiento de las mismas.

Mientras que los carotenos, pigmentos liposolubles, son almacenados en los cloroplastos y cromoplastos de las células vegetales, los flavonoides (hidrosolubles) se localizan en las vacuolas, principalmente de los tejidos más superficiales (epidérmicos y subepidérmicos) de hojas, flores y frutos, aunque pueden acumularse en cualquier tejido vegetal (Brouilliard y Cheminant, 1988).

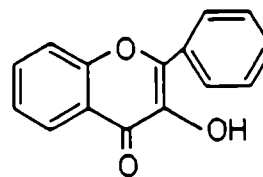
Hasta el momento se han identificado más de 4000 flavonoides diferentes en las plantas vasculares (Harborne, 1988a) y este número sólo representa una pequeña fracción del total, dado que sólo un pequeño porcentaje de especies vegetales se han estudiado respecto a su patrón de flavonoides (Harborne, 1988b).

Desde el punto de vista químico los flavonoides pueden considerarse como derivados de la 2-fenil-benzo- γ -pirona, pudiendo clasificarse en distintos tipos de acuerdo al grado de saturación del anillo benzopirona y a los patrones de sustitución que presente dicho anillo (Cody, 1988), dando lugar a los distintos compuestos llamados flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas, chalconas y auronas, cada uno de los cuales presenta a su vez diversas

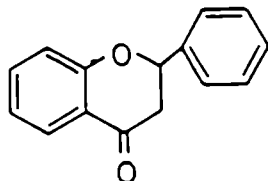
FIGURA 1.4.1 A: Principales tipos de flavonoides y familias estructurales derivadas



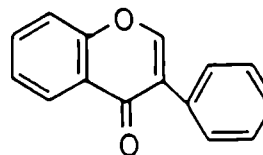
FLAVONA



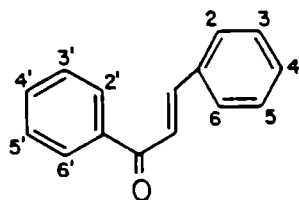
FLAVONOL



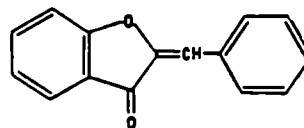
FLAVANONA



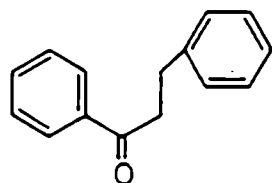
ISOFLAVONA



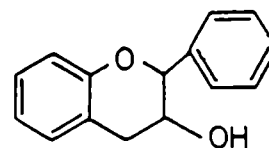
CHALCONA



AURONA

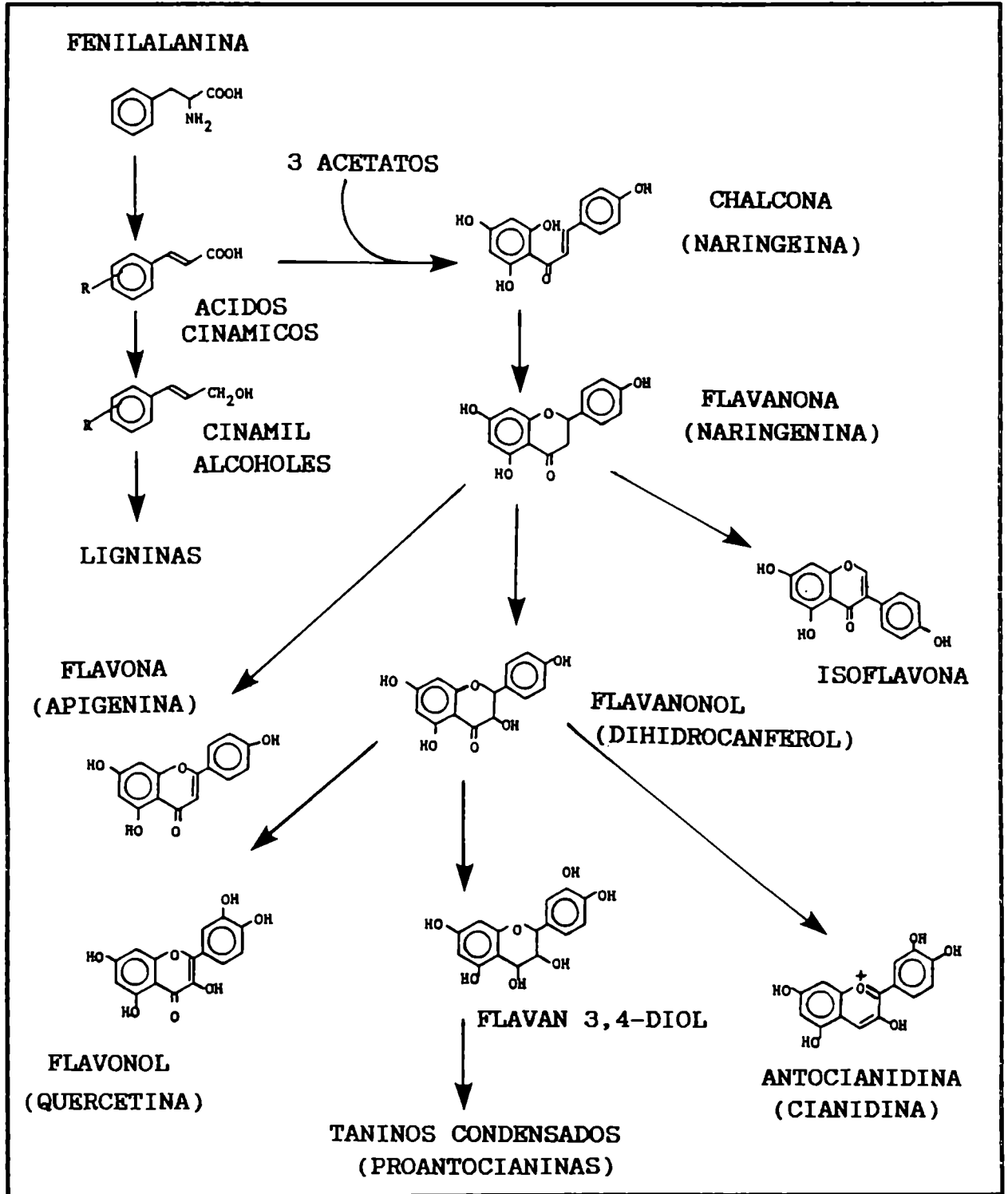


DIHIDROCHALCONA



CATEQUINA

FIGURA 1.4.1.B : Ruta biosintética de los flavonoides



familias de derivados hidroxilados, metoxilados y/o glicosidados (Figura 1.4.1.A). Así, por ejemplo, los flavonoles, un grupo muy extendido y numeroso, corresponden a flavonas que presentan un grupo hidroxilo como sustituyente en la posición 3. En términos generales, para cada tipo de esqueleto se ha determinado una forma de numeración sucesiva de los átomos de carbono de manera de facilitar la nomenclatura de los diferentes derivados.

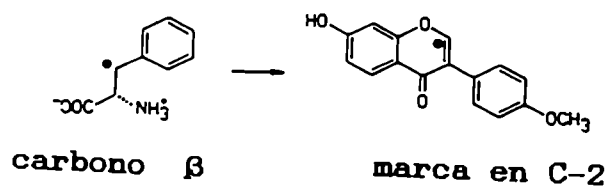
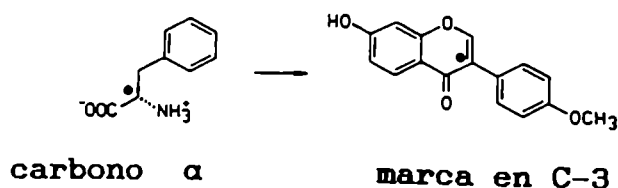
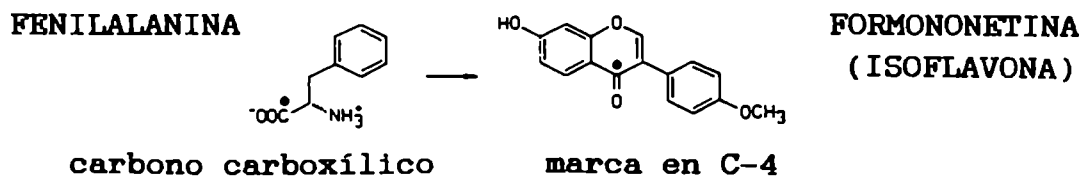
La variación química no viene dada solamente por la enorme cantidad de combinaciones posibles respecto al tipo de sustituyentes y sus posiciones sino que también deben considerarse otros factores como el grado de polimerización (monomérica, dimérica u oligomérica) y el tipo de conjugación (glicosidación, sulfatación o malonización) (Harborne, 1988b).

De esta forma, una de las principales características de este grupo de compuestos pasa a ser su gran capacidad de interactuar con metabolitos primarios, como polisacáridos o proteínas (Haslam y Lilley, 1986) lo que permitió a lo largo de la evolución ir ampliando su espectro de actividad biológica.

Puede verse claramente que la estructura básica de estos esqueletos comprende tres grupos o "bloques" de átomos de carbono $C_6-C_3-C_6$, los cuales han sido denominados con frecuencia como anillo A, anillo C y anillo B (Figura 1.4.1.A).

Ya en 1936, Robinson sugirió, trabajando sobre la síntesis de antocianinas, que el esqueleto resultante derivaba de la unión de dos bloques preexistentes (C_6-C_3 y C_6) y de esta forma dio el primer paso tendiente a lograr la elucidación completa de las vías biosintéticas de los flavonoides (Heller, 1986).

FIGURA 1.4.1. C : Utilización de precursores de ^{14}C -FENIL ALANINA para la elucidación de la biosíntesis de flavonoides



$^{14}\text{C} = \bullet$

En 1953, Birch y Donovan postularon que un intermediario policetoácido, que se forma por la adición de tres unidades de acetato a un ácido hidroxicinámico, se cicla dando lugar a una chalcona, estructura que pasa a ser de este modo el intermediario central en la ruta de los diversos flavonoides (Figura 1.4.1.B). Esta hipótesis fue confirmada posteriormente (Geissmann y Harborne, 1955) cuando se observó que flores blancas de una línea mutante de *Anthirrinum majus*, incapaces de producir flavonoides, presentaban una fuerte acumulación de derivados del ácido hidroxicinámico.

Diversos experimentos posteriores, tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando precursores marcados, como ¹⁴C-fenilalanina, permitieron elucidar por completo la vía biosintética de los distintos esqueletos, como aislar y purificar las enzimas involucradas (Heller, 1986) (Figura 1.4.1.C)

1.4.1.1. Actividad biológica

La funcionalidad de los flavonoides a nivel biológico está indudablemente correlacionada con la estructura química de cada molécula, pero esta relación estructura-actividad no siempre resulta clara o es inmediata (Harborne, 1988b).

Desde el punto de vista químico, su elevada reactividad se manifiesta en una alta capacidad de interacción con biopolímeros, y por ser capaces de catalizar reacciones de transporte electrónico (Cody, 1988).

Esto hace, por un lado, que participen en reacciones de interacción físico-química entre la planta y otros organismos del medio ambiente en procesos de atracción y nutrición de los polinizadores, resistencia ante ataque por parásitos, virus o bacterias,

nodulación en plantas fijadoras de nitrógeno, entre otras. Por otra parte, la elucidación de los mecanismos moleculares involucrados, en particular en relación a las respuestas desencadenadas a nivel de membrana celular (AMPC-mediated) y por su acción directa sobre la actividad de sistemas enzimáticos, reviste interés desde el punto de vista médico por su potencial farmacológico.

1.4.1.2. Flavonoides en interacciones planta-huésped

Desde el punto de vista de la coloración de órganos atractores, principalmente localizados en las flores, las flavonas y flavonoles constituyen mayoritariamente los pigmentos amarillos hidrosolubles (antiguamente denominados antoxantinas), los cuales difieren de las antocianinas en el grado de oxidación. Desde el punto de vista del color, las antocianinas son mucho más importantes, pero sin la contribución de flavonas y flavonoles como co-pigmentos, a veces mayoritarios, no se lograrían los efectos que observamos como color resultante (Harborne, 1967).

El color observable depende de la estructura química de cada flavonoide y usualmente se ve afectado por la conjugación con otras macromoléculas o con otros compuestos orgánicos aromáticos (Brouillard y Cheminant, 1988).

Este patrón resultante cumple un papel importante en la detección por parte del polinizador que percibe generalmente tanto en la franja visible como en el UV cercano, donde los flavonoides presentan bandas definidas de absorción.

Pero los estímulos sobre insectos se extienden a factores nutricionales. Se comprobó que determinados compuestos (por ejemplo, flavonol 3-O-xilosil-galactósidos de crucíferas sobre escarabajos que se alimentan de ellas) resultan el factor de atracción (Nielsen et al., 1979; Besson et al., 1985).

En muchos casos, la presencia de un flavonoide dado actúa como inhibidor de la atracción o afecta el desarrollo larval (Harborne, 1982; Hedin y Waage, 1986; Harborne, 1988b).

También se ha comprobado, en el caso de mariposas, que algunos flavonoides (entre otras sustancias) estimulan la ovoposición (Honda, 1986; Nishida et al., 1987; Harborne, 1988b; Rothschild et al., 1989).

Los flavonoides se ven también involucrados en reacciones de resistencia frente a la presencia o ataque por parte de tejidos fúngicos. Por una parte, la presencia en la superficie foliar de flavonoides como flavonas metiladas, flavanonas e isoflavonas

isopreniladas (Harborne, 1988b; Barberan et al.,1988) actúan como inhibidores de la germinación de esporas y del desarrollo de micelio.

Por otra parte, una segunda vía de respuesta frente a una invasión fúngica de tejidos internos de una planta está dada por la producción *in situ* de fungitoxinas, conocidas como fitoalexinas (Harborne, 1987). Este tipo de isoflavonoides, que presentan cierta semejanza estructural con los esteroides, son capaces de interferir el metabolismo esteroideal del hongo controlando así su desarrollo. Aunque este mecanismo no está totalmente esclarecido, en cuanto a la relación estructura-actividad biológica, se ha determinado que la O-metilación, la isopentenilación y la metoxilendioxigenación incrementan la toxicidad del sistema de anillos isoflavonoidales (Harborne,1988b).

Las fitoalexinas son compuestos particularmente interesantes dado que su actividad antibiótica es de amplio espectro, presentando efectos bacteriostáticos y bactericidas, e incluso se han descrito efectos fitotóxicos que afectan el desarrollo de las raíces, la germinación de semillas y la organización celular y los procesos de transporte electrónico en la cadena respiratoria (Smith y Banks,1988 y literatura allí citada).

Muchos de estos compuestos han sido obtenidos a partir de la infección inducida sobre tejidos cultivados *in vitro* (Biggs, 1975) dado que en condiciones normales no son producidos por la planta, y en caso de infección su producción es localizada. Esta técnica ha comenzado a utilizarse con mayor intensidad en los últimos tiempos, con la finalidad de estudiar los mecanismos biosintéticos y la actividad biológica de flavonoides, a la vez que permite obtener cantidades apropiadas de producto para ensayos farmacológicos (Law y Das, 1988).

Hacia fines de la década de 1980, diversos grupos de investigación lograron comprobar que había flavonoides involucrados en los procesos de fijación simbiótica de nitrógeno que se da en la familia Leguminosae por nodulación de bacterias del género *Rhizobium* (Firmin et al., 1986; Peters et al., 1988; Redmond et al.,1986).

Ciertos flavonoides exudados por las raíces contribuían al proceso de nodulación activando genes de la bacteria en un mecanismo sumamente específico (Okker et al., 1988 y literatura allí citada). En cada uno de los casos estudiados estaban involucradas diferentes flavonas o flavanonas (como por ejemplo luteolina, 7,4'-hidroxiflavona, 7,4'-hidroxi-3-metoxiflavona, apigenina, naringenina o eriodictiol, entre otras) y se trataba de distintas

especies de *Rhizobium*. En general, pudo demostrarse que muchas especies de leguminosas presentaban especificidad respecto a la infección capaz de dar nodulación (Spaink et al., 1987), y solamente las agliconas eran activas y no los respectivos glicósidos (Firmin et al., 1986).

Resultó igualmente interesante la comprobación de que otros flavonoides, especialmente isoflavonas (como daidzeína o genisteína, e incluso el canferol, un flavonol muy frecuente), resultaban inhibidores del proceso de nodulación pues suprimían la expresión génica correspondiente, aunque debe destacarse que la concentración de inhibidor requerida resulta dos órdenes de magnitud superior a la requerida para el activador, que es de unos 10 nanomoles.

1.4.1.3. Efectos fisiológicos sobre el metabolismo animal y acción farmacológica

Las células animales no producen flavonoides: solamente se han reportado dos casos de presencia de flavonoides en animales- uno en mamíferos y otro en lepidópteros- y es más que probable que el origen sea vegetal. En efecto, se detectó la presencia de 4'-metoxiflavano en glándulas secretoras del castor canadiense *Caster fiber* (Gaudemer y Lederer, 1964) y aunque su origen era presumiblemente dietario, ésto no pudo comprobarse en forma experimental. En el caso de los lepidópteros, se pudo detectar la presencia de flavonoides en el cuerpo y alas de mariposas de distintas familias (Morris y Thompson, 1963; Wilson, 1983, citado en Harborne, 1986).

Aunque incapaces de producirlos, los animales homeotermos, y en particular los mamíferos, presentan toda una gama de respuestas fisiológicas frente a flavonoides que sean aportados desde el medio externo ya sea por vía alimentaria o por vía sanguínea.

Desde mediados de la década de 1930, y sobre todo a partir de las investigaciones de Szent-Györgyi sobre los procesos oxidativos y el papel de la vitamina C como catalizador (que le valieron el Premio Nobel para el año 1937) se comenzó a tomar conciencia del papel de los flavonoides sobre el metabolismo animal.

En efecto, la presencia de flavonoides como hesperidina y desmetoxihesperidina, los glucósidos de eriodictiol, la quercitrina y otros glicoflavonoles y flavonas llegaron a ser considerados como un factor vitamínico (al que se llamó P) imprescindible para un normal intercambio a nivel de las paredes de los vasos capilares (Gabor, 1988 y trabajos allí citados).

Desde entonces hasta la fecha, y pese a que aquellos primeros trabajos fueron algo contradictorios en sus resultados clínicos, se ha demostrado, sin ningún lugar a dudas, que los flavonoides son capaces de inducir respuestas específicas y controlables en relación a su estructura química y a la dosis suministrada, por lo cual presentan un potencial farmacológico invaluable.

Los efectos estudiados están relacionados a su acción antihipertensiva (Beretz y Cazenave, 1988; Bourdillat et al., 1988; Gabor, 1988;) y sobre los niveles de colesterol en sangre (Sharma, 1979a y b; Gabor, 1988).

También se han descrito efectos antialérgicos (Lewis, 1986) y antiinflamatorios (Gabor, 1986; Della Loggia et al., 1986; Iwu, 1986), siendo conocidas sus propiedades antimicrobianas (Iwu, 1986) y antivirales (Selway, 1986; Vlietinck et al., 1986 y 1988), y antihepatotóxicas (Wagner, 1986; Iwu, 1986).

Asimismo se ha comprobado en numerosas experiencias la capacidad antitumoral de los flavonoides (Glusker y Rossi, 1986; Fujiki et al., 1986; Bracke et al., 1986 y 1988; Armand et al., 1988; Nomura et al., 1988; Bibby et al., 1988), aunque se han descrito efectos potencialmente mutagénicos y carcinogénicos para algunos compuestos (MacGregor, 1986; Yasukawa et al., 1988).

Del mismo modo, se han descubierto en algunas variedades moleculares capacidades contra los efectos de la diabetes (Varma, 1986) o la osteoporosis (Gabor, 1988), capacidad anticonceptiva (Gabor, 1988), acción de estimulación del sistema inmunológico (Middleton, 1986; Mookerjee et al., 1986; Berg y Daniel, 1988) y efectos sobre el transporte, la producción y el metabolismo de hormonas tiroideas (Koehrle et al., 1986 y 1988; Cody et al., 1986; Gaitan et al., 1988) y sobre los receptores de hormonas esteroidales, como el estradiol (Gumbinger et al., 1988).

Una dieta normal y variada provee a cualquier individuo de una enorme diversidad de flavonoides y compuestos fenólicos relacionados, como los taninos, cuya fuente no sólo se halla en alimentos naturales o sus derivados (Pierpoint, 1986; Glories, 1988) sino que también a través de su incorporación como colorantes y saborizantes en productos industrializados (Timberlake y Henry, 1988).

Se ha demostrado que la presencia de algunos compuestos tánicos en la dieta de animales de pastoreo o en ratones, afecta los procesos digestivos de asimilación, y por ende, el desarrollo (Butler et al., 1986).

En general, los mamíferos hidrolizan los glicósidos de flavonoides a la correspondiente aglicona, proceso que requiere enzimas poco

específicas (Bokkenheuser y Winter, 1988), aunque se ha postulado que la presencia de algunos de estos compuestos en el tracto intestinal cumple una función reguladora de la microflora bacteriana, dado el poder antimicrobiano de estos compuestos (Hackett, 1986).

Pudiendo sufrir procesos posteriores de oxidación, reducción y metilación (también mediados por microorganismos), es común que formen sistemas conjugados con ácidos urónicos o sulfatos. Estos compuestos polares suelen ser excretados por la orina, y forman parte también de las secreciones biliares, por lo que finalmente vuelven al duodeno tras su circulación intrahepática, órgano donde se concentran previamente (Hackett, 1986).

A nivel de las membranas celulares (Price y Middleton, 1986), algunos flavonoides actúan sobre enzimas tales como las peroxidasas (Shore y Lyttle, 1986), las ATP-asas (Lawrence et al., 1986; Racker, 1986), las fosfodiesterasas (Beretz et al., 1986), o las metiltransferasas induciendo cambios que afectan el nivel de ácidos libres, el transporte de calcio, potasio y sodio y los niveles de AMPc, como asimismo pueden influir sobre la activación de las proteínquininas (Srivastava y Chiasson, 1986; Middleton y Ferriola, 1988), las ciclooxigenasas y hasta las RNA-polimerasas (Laychock, 1986; Racker, 1986).

Flavonoides relativamente comunes, como la miricetina o la quercetina, son capaces de inhibir el transporte electrónico a nivel mitocondrial, lo cual podría explicar el poder citotóxico y antineoplásico de algunos de estos compuestos (Hodnick et al., 1986; Graziani, 1986).

1.4.2. Aproximación quimiotaxonómica a la familia Leguminosae

El amplio rango de distribución de esta familia, así como los innumerables casos en que sus miembros están presentes en nuestra vida cotidiana ha llevado, sin dudas, a que sea una de las más estudiadas desde el punto de vista químico. En efecto, desde hace décadas se vienen investigando productos naturales obtenidos de las más diversas especies, cuyas propiedades bioquímicas abarcan una enorme gama de utilidades.

Sin embargo, es desde hace relativamente poco tiempo que se ha encarado la tarea de aportar ideas desde un enfoque quimiotaxonómico para resolver las dificultades existentes en la clasificación y la filogenia. Esta situación se ve particularmente reforzada en esta familia por dos hechos no poco significativos: por un lado la existencia de una singular riqueza de metabolitos secundarios de bajo y mediano peso molecular, y por otra parte, la

permanencia en el tiempo de numerosas dificultades concernientes a la taxonomía del grupo, en particular a niveles de tribu o inferiores.

Los flavonoides han sido, dentro de los metabolitos secundarios, de los más empleados para estos fines, dadas sus características estructurales (Harborne, 1971a) y dada la particular abundancia que presentan en esta familia (Harborne, 1967; Torck, 1976).

Se han encarado estudios quimiotaxonómicos para varios géneros correspondientes a las distintas subfamilias. Dentro de las Papilionoideas, el estudio para las especies de *Baptisia* (Markham y Mabry, 1968; Markham et al., 1970; reseñado por Harborne, 1971a) constituye un verdadero clásico. Del mismo modo, se han estudiado otros géneros tales como *Prosopis* (Carman, 1973; Zallocchi, 1988; Zallocchi et al., 1990) o *Acacia* (Tindale y Roux, 1969) dentro de las Mimosoideas, o diversas especies en particular (Torck et al., 1971a y b; Harborne y Boardley, 1984).

Dentro de la tribu Phaseoleae se han publicado algunos trabajos que van desde el estudio parcial de varios géneros relacionados (Baudet y Torck, 1978), los flavonoides presentes en algunas especies de *Vigna* (Ishikura et al., 1981) o *Phaseolus* (Ford, 1971), hasta la diferenciación entre cultivares comerciales de *Phaseolus* por cromatografía en papel (Brown et al., 1971).

Desde el punto de vista químico, las Leguminosas presentan casi todas las clases de flavonoides, aunque cada subfamilia tiende a presentar compuestos distintivos (Harborne, 1967).

Las Mimosoideas se caracterizan por su riqueza en catequinas, leucoantocianidinas y otros compuestos polifenólicos relacionados (taninos). Las Caesalpinoideas tienen ellagninas y pigmentos raros del tipo de la hematoxilina y la brasilina.

Por último, las Papilionoideas se caracterizan por la presencia de isoflavonoides y rotenoides, siendo también muy ricas en antocianas y en flavonas y flavonoles glicosidados.

Flavonoides bastante inusuales, como los hidroxilados en posición 6 (derivados del tipo de la quercetagetina) o con hidroxilo libre en 5 (tipo fisetina o robinetina) pueden encontrarse en cualquiera de las tres subfamilias (Harborne, 1967).

La presencia de isoflavonoides en las Papilionoideas es una característica bastante notable, dado que no se da prácticamente en otro grupo (no ocurre así en el caso de los rotenoides) pero su distribución está generalizada entre todas las tribus por lo que puede adquirir valor taxonómico sólo a nivel genérico o específico. Por otro lado, este valor es relativo, dado que su presencia puede

estar inducida por la presencia de agentes biológicos agresivos en el medio ambiente (ver también 1.2.1.2.) tal como ha sido demostrado para el caso de *Phaseolus* (Woodward, 1979; Biggs, 1975), y en general no pueden diferenciarse los isoflavonoides constitutivos de los inducidos por infección (Gomes et al., 1981).

Además de los compuestos fenólicos, existe toda una serie de familias químicas que han sido estudiadas, aunque muy parcialmente, dentro de las Leguminosas.

El estudio más relevante es, probablemente, el referido a la distribución de canavanina- un aminoácido libre no proteico- que permitió a Lackey (1977) establecer una división en subtribus dentro de la tribu Phaseoleae.

La bioquímica comparada de aminoácidos no proteicos ya había sido útil anteriormente (Bell, 1971) para establecer relaciones en la tribu Lotoideae y entre las Mimosoideas (Krauss y Reinbothe, 1973). Estos resultados fueron posteriormente extendidos a todas las tribus de Papilionoideas (Bell, 1981) y resulta de interés la correlación entre la distribución de estos compuestos y su posible rol ecológico como inhibidores de predación sobre ácidos.

Respecto al grupo de los terpenos, pese a que presenta una complejidad y diversidad estructural potencialmente útil en quimiotaxonomía, su estudio no ha sido tan intenso sobre las Leguminosas (Harborne, 1971b) como en otras familias, donde abundan los aceites esenciales, ricos en mono-, di- y sesquiterpenos, tales como Rutáceas, Labiadas o Cupressaceas (Langenheim, 1981).

La determinación de terpenos ha sido más extensa sobre Mimosoideas, y sobre todo Caesalpinoideas (Harborne, 1981b; Langenheim, 1981), y en particular, sobre maderas o resinas de interés comercial. Mientras las Papilionoideas y las Mimosoideas parecen presentar mayor presencia de triterpenos, casi ausentes en Caesalpinoideas, las resinas de árboles tropicales de esta última subfamilia se caracterizan por presentar una composición muy rica en diterpenos (Langenheim, 1981).

Respecto a la presencia de alcaloides en las Leguminosas, es un hecho probado su utilidad en quimiotaxonomía, aún a pesar de las dificultades técnicas de aislamiento y la complejidad estructural intrínseca de estos compuestos.

La presencia de compuestos binarios, terciarios y cuaternarios de alcaloides quinolizidínicos únicamente en tribus de Papilionoideas (Sophoreae, Genisteae, Podalyrieae y más raramente en Dalbergieae y Galegae) sugiere que estas tribus se originaron a partir de un ancestro común (Mears y Mabry, 1971). La presencia de distintos

niveles estructurales dentro de este tipo de alcaloides también permite relacionar taxones a niveles genéricos, específicos e infraespecíficos.

La presencia de alcaloides pirrolizidínicos no alcanza amplitud en la familia, aunque sí permiten caracterizar al género *Crotalaria* (Lotoideae) (Mears y Mabry, 1971).

Los alcaloides derivados de la fenilalanina, la tirosina y el triptofano parecen alcanzar amplia distribución entre las Mimosoideas, principalmente en géneros como *Acacia*, *Prosopis*, *Piptadenia*, *Desmodium*, entre otros (Mears y Mabry, 1971; Smolensky y Kinghorn, 1981a).

Por último, algunos géneros, en forma aislada, presentan alcaloides con estructuras peculiares, pero poco estudiadas respecto a otros géneros, tal el caso de *Erythrina* o *Physostigma*, por lo cual su valor quimiotaxonómico es dudoso, aunque son de interés químico por sus propiedades (Smolensky y Kinghorn, 1981b).

Otros metabolitos secundarios han sido analizados con fines quimiotaxonómicos: en el caso de mono- y oligosacáridos se ha encontrado que las leguminosas son las plantas con mayor abundancia de galactósidos como sustancia de reserva (Courtois y Percheron, 1971). Respecto a los lípidos, se han realizado estudios del contenido de aceite en semillas, pudiendo correlacionarse características morfológicas y taxonómicas con el tipo y proporción de aceites insaturados, sobre todo a nivel de género (Wolff y Kwolek, 1971).

1.4.3. Estudios filogenéticos en base a flavonoides

1.4.3.1. Consideraciones generales

Como ya se mencionó anteriormente, la amplia variación estructural de los flavonoides unida a la relativamente menor complejidad técnica de aislamiento y determinación, que permite una estandarización y correlación de los resultados (Harborne, 1967; Mabry et al., 1970) hizo que los flavonoides se emplearan con mayor frecuencia en los estudios quimiotaxonómicos, tanto entre las Leguminosas como en muchas otras familias de Angiospermas, tales como las Oxalidáceas (Del Pero Martínez y De Azkue, 1984; Carmona, 1988), Ericáceas (Harborne, 1967), Menyanthaceas (Bohm et al., 1986) o Commelináceas (Del Pero Martínez y Swain, 1985), por citar sólo unos pocos ejemplos.

En general, los caracteres químicos se pueden correlacionar con los caracteres anatómicos o morfológicos (Harborne, 1967; Giannasi, 1980), con la distribución geográfica (Mabry, 1972; Carman y Mabry, 1975; Bragg et al., 1978; Harborne, 1979; Zallocchi et al., 1990) o en el caso de hibridaciones o modificación del nivel de ploidía, puede obtenerse información valiosa para llegar a determinar el cruzamiento e identificar a las especies parentales (Palacios y Bravo, 1981; Naranjo et al., 1984; Wolf y Dendford, 1984; Bohm, 1987; Palacios et al., 1991). En general, puede decirse que existen tres criterios para encarar estudios quimiotaxonómicos en base a flavonoides (Carmona, 1988): el que considera la presencia o ausencia de un compuesto; el que considera la acumulación y, por último, el de diversificación biosintética.

A medida que los flavonoides se utilizaban en un sentido puramente fenético para estudios quimiotaxonómicos, muchos autores trataron de establecer una correlación con el grado evolutivo de los organismos, planteando una secuencia filogenética (Harborne, 1967 y 1977; Swain, 1975 y 1986; Gornall y Bohm, 1978).

Esta secuencia presupone la adquisición de nuevas etapas en la ruta biosintética, y está relacionada a las características ecológicas en que se producía el proceso evolutivo y las ventajas adaptativas de las nuevas adquisiciones (Swain, 1986).

Existen muy pocas dudas de que el origen de las Angiospermas coincidió con un sustancial incremento del potencial de óxido-reducción de los catalizadores enzimáticos, dado por el desarrollo de las transferasas, capaces de insertar grupos que actuaran para proteger regiones específicas de la estructura de una micromolécula con ventajoso valor adaptativo (Gottlieb, 1986).

Dentro de este grupo (Angiospermas), Harborne (1972, 1977) y Swain (1975) propusieron un esquema de evolución de los flavonoides basado en el grado de oxigenación, insaturación, metilación, tipo de glicosidación, y en general por la desaparición de los productos correspondientes a los pasos iniciales del camino biosintético, lo que implica en los niveles más evolucionados la pérdida de proantocianinas, menor hidroxilación en el anillo B y la sustitución de flavonoles por flavonas (Tabla 1.4.3.A).

En su esquema de evolución, Harborne (1977) tiene en cuenta los siguientes patrones estructurales: oxigenación extra del anillo A, oxigenación en posición 2', la presencia de grupos O-CH₃, la presencia de C-glicósidos, la C-acilación y la desoxigenación. Sin embargo, la atribución del carácter de avanzado o primitivo se efectúa siempre en relación a la distribución de este carácter dentro del grupo en estudio, ya que en algunos casos la reducción

secundaria de un paso en la vía biosintética puede conducir a un estado final aparentemente más primitivo (como por ejemplo, la pérdida de un grupo O-CH₃ en posición 5, puede llevar en un taxón evolucionado a presentar un grupo -OH en 5, siendo éste un carácter primitivo, frecuente, por ejemplo, en las dicotiledóneas leñosas, pero que en realidad resulta altamente avanzado (Halbrock y Grisebach, 1975).

Otros métodos como la asignación de un puntaje para cada carácter químico según su posición en la vía metabólica (Bate-Smith, 1973) o tratamientos fenéticos utilizando presencia/ausencia y caracteres morfológicos y químicos, donde puede compararse la pérdida o ganancia de sustituciones para un tipo de flavonoide, entre el árbol resultante y un stock primitivo (Harborne y Turner, 1984) fueron algunas de las técnicas de análisis filogenético propuestas. A partir de las ideas de Hennig (1968 y bibliografía anterior del autor allí citada) tendientes a una sistemática filogenética y con el desarrollo del concepto de cladismo, y en particular su aplicación a la evolución vegetal (Stuessy, 1980) comenzaron a surgir trabajos basados en flavonoides que utilizaban este método (Humpries y Richardson, 1980).

Otra técnica de este tipo, particularmente útil para la reconstrucción de esquemas filogenéticos usando flavonoides pues permite introducir los niveles biosintéticos, es la denominada " Arbol de Wagner" (Wagner, 1980).

Empleada por varios autores (Bacon, 1979; Carman, 1973) se le han propuesto algunas modificaciones para simplificar su uso (Richardson y Young, 1982).

Finalmente, el desarrollo de técnicas microanalíticas que permiten estudiar los flavonoides presentes en hojas de angiospermas fósiles (Giannasi y Nicklas, 1977; Nicklas et al., 1985) hacen posible conocer en mayor detalle el desarrollo del proceso evolutivo.

**TABLA 1.4.3.A : Características evolutivas en flavonoides
(Swain,1975; Harborne, 1977)**

CARACTER QUIMICO	ESTADO PRIMITIVO	ESTADO AVANZADO
ANTOCIANAS TIPICAS EN PETALOS	Cianidina	Delfinidina Pelargonidina
OXIGENACION EN 3	3-deoxigenada	3-oxigenada
METILACION	sin grupos O-CH ₃	con grupos O-CH ₃
ACILACION	sin O-acilación	con O-acilación
TIPO DE GLICOSIDACION EN ANTOCIANAS	glicosidación simple	glicosidación compleja
PROANTOCIANAS EN HOJAS	Presentes	Ausentes
FLAVONOLES FOLIARES	Flavonoles en gral., incluyendo miricetina.	Canferol y quercetina solamente
FLAVONAS	Ausentes	Presentes
FLAVONOIDES FOLIARES METILADOS	Ausentes	Presentes
TIPO DE GLICOSIDACION	Simple	Compleja
HIDROXILACION EXTRA EN EL ANILLO	Ausente	Presente
HIDROXILACION EXTRA PRESENTE	En el carbono 8	En el carbono 6
OXIGENACION EN 2'	Ausente	Presente
BIFLAVONOLES	Presentes	Ausentes
FLAVANONAS	Presentes	Ausentes
C-GLICOSIDACION	Presente	Ausente
C-ACILACION	Presente	Ausente
PIGMENTOS AMARILLOS EN FLORES	Chalconas	Chalconas y Auronas

1.4.3.2. Aspectos de la evolución química en las Papilionoideas

Desde el punto de vista de la complejidad estructural de los flavonoides presentes, las Papilionoideas presentan un perfil relativamente primitivo (Gomes et al., 1981).

Las C-glicosilflavonas son muy esporádicas, y a veces existe un esquema de oxigenación con ciertas reminiscencias de las Gimnospermas, como la presencia de derivados 5,7- o 7- oxigenados en el anillo A, 4'- oxigenados, o bien sin posiciones oxigenadas en el anillo B, tal como ocurre con los 5,7,4'-O- flavonoles y dihidroflavonoles de la tribu Sophoreae, un taxón probablemente muy cercano al origen mismo de todo el grupo (Gomes et al., 1981).

Existe una transición en esta subfamilia desde las tribus con grandes árboles tropicales hacia las plantas herbáceas, predominantes en las regiones templadas, que va acompañada por un reemplazo de flavonoles por flavonas (Harborne, 1971a), un principio general que descubriera anteriormente Bate-Smith (1962). En este caso, se observa que conservando los patrones de oxigenación se pasa de flavonol a flavona, lo que permite evidenciar la proximidad evolutiva entre las tribus: las Genisteeae exhiben un patrón 5,7,3',4' de oxigenación en flavonoles a partir del cual desarrollan sus flavonas características; en Vicieae y Trifolieae encontramos un patrón 5,7,3',4',5' para flavonoles y desarrollan sus correspondientes flavonas, mientras que Tephrosieae, Phaseoleae y Robinieae exhiben 7,3',4',5'-oxi flavonoles y sus correspondientes flavonas derivadas en cada caso (Gomes et al., 1981).

Cuando, en cambio, se consideran los isoflavonoides, característicos de este grupo, las Papilionoideas ocupan una posición mucho menos primitiva que la sugerida por los patrones de oxigenación en flavonoides. Esta conclusión está basada en el hecho que, si bien existe una relación biosintética entre ambos tipos de moléculas (ambos derivan de chalconas), en general no se observan, para un taxón dado, los mismos patrones de oxigenación tal como se podría pensar en principio.

Mientras la evolución de los flavonoides se ha basado en compuestos oxigenados en posiciones 5,7, y 4', la evolución de los isoflavonoides giró alrededor de las 7,3',4'-oxi isoflavonas (Gomes et al., 1981).

Así, algunas características raras en los flavonoides, como la trioxigenación en el anillo B, o la oxigenación adicional y la isoprenilación del anillo A, suelen observarse en los

isoflavonoides, tal como ocurre en algunas tribus distantes (Dalbergieae y Thermopsidae) en el primer caso, o en algunas Papilionoideas tropicales y en muchas de zonas templadas en el segundo (Harborne, 1971).

En definitiva, no parece haber una conexión evolutiva entre el desarrollo de ambos grupos de compuestos, y ésto se explicaría por su diferente rol funcional en la planta.

La selección y evolución química de los isoflavonoides se dió en las zonas tropicales donde las condiciones ambientales favorecen la proliferación de microorganismos, en particular en las plantas leñosas (Gomes et al., 1981).

A lo largo de la evolución, los genes para la biosíntesis de isoflavonoides fueron transmitidos hacia las formas herbáceas, pero este proceso no se halla activado en condiciones normales, promoviéndose sólo bajo un estado de estrés o infección, o incluso únicamente bajo estimulación artificial (Ingham y Harborne, 1977). En algunos casos, se ha postulado la posible utilidad quimiotaxonómica de emplear isoflavonoides (Ingham y Harborne, 1977; Cagnin y Gottlieb, 1978) y de hecho se han calculado distancias entre las distintas tribus de Papilionoideas (Gomes et al., 1981) aunque los resultados obtenidos no parecen coincidir con los elaborados en base a flavonoides.

1.5. La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en quimiotaxonomía de flavonoides

La cromatografía líquida de alta resolución -CLAR- (o HPLC según sus siglas en inglés, por *High Performance Liquid Chromatography*) es considerada desde hace largo tiempo uno de los métodos más promisorios para la identificación de compuestos fenólicos (K. Markham, 1975) y ha pasado a convertirse en los últimos años en el más empleado por los diversos autores para el aislamiento y purificación de flavonoides dados los excelentes resultados obtenidos.

Una de las principales ventajas de esta técnica radica en la relativamente pequeña cantidad de muestra necesaria para una evaluación acertada de los compuestos presentes, mientras que respecto a cualquier otro sistema de cromatografía convencional sobre papel su capacidad resolutive es muy superior (Wulf y Nagel, 1976) permitiendo un gran ahorro de tiempo y esfuerzo mediante su empleo (Daigle y Conkerton, 1982).

La CLAR es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria (que puede ser un sólido poroso como por ejemplo un adsorbente clásico, una resina de intercambio iónico o un polímero poroso) se halla encerrada en una columna metálica mientras que la fase móvil es un líquido que es forzado a atravesarla bajo una cierta presión (Hamilton y Sewell, 1982).

El término alta resolución ("high performance") tiende a emplearse últimamente con preferencia al nombre propuesto originalmente de cromatografía líquida de alta presión ("high pressure") dado que el primero expresa con mayor exactitud la principal característica de esta técnica, mientras que el segundo sólo hace referencia a un parámetro operacional.

En CLAR el término fase normal se refiere a la técnica cromatográfica en que la fase móvil es menos polar que la fase estacionaria.

El término fase reversa o fase invertida (o RP por "reverse phase") se utiliza para designar sistemas de fase estacionaria no polar, en general silicagel tratada (RP C18; RP C8), usándose una fase móvil más polar, como agua o alcoholes (Engelhardt, 1979).

1.5.1. La técnica de la CLAR

Se requieren bombas de alta presión para hacer pasar el solvente por la columna pues el relleno ofrece una alta resistencia.

Al trabajar con flavonoides lo aconsejable es un detector UV de onda variable ajustado a una longitud de onda entre 290 y 300 nm apropiada de acuerdo a la banda I de absorción de los flavonoides y que no se superponga con el rango de absorción del solvente. Los cromatogramas resultantes del proceso de CLAR se obtienen gráficamente mediante la conexión de un registrador adecuado al detector utilizado a la salida de la columna.

La graficación a lo largo del tiempo de las variaciones de absorbancia en el detector determinan la aparición de picos que corresponden a la salida de cada uno de los componentes de la muestra inyectada.

La resolución o efectividad de la separación cromatográfica está dada por la relación entre la **selectividad** (o distancia entre picos) y la **eficiencia** de la columna (o ancho de banda).

Cada una de las sustancias separadas queda caracterizada por un parámetro que es el volumen de retención (V_R) o flujo total de solvente necesario para eluir el centro de una banda dada desde el momento de la inyección hasta que alcanza su valor máximo en el detector.

Sin embargo, el parámetro más utilizado para la caracterización de cada una de los compuestos separados es el tiempo de retención (t_r) dado que es mucho más sencillo de medir y es constante si no se varían las condiciones de flujo y temperatura.

Los principales parámetros a tener en cuenta son:

1) Tipo de Columna: La utilización de columnas de fase reversa es lo más indicado para trabajar con flavonoides. En general se emplean rellenos microporosos del tipo C-18 (Daigle y Conkerton, 1982; Wulf y Nagel, 1979 ; Lardy et al., 1978) o C-8 (entre otros: Harborne y Boardley, 1984; Niemann y Brederode, 1978) El tamaño de partícula adecuado es de 10 μm , o 5 μm para separaciones más finas.

Las dimensiones de la columna se eligen en base al equipo disponible y al tipo de trabajo a realizar (analítico o preparativo). Salvo que se disponga de una bomba de alta capacidad se utilizarán columnas analíticas o semipreparativas con un diámetro entre 5 y 15 mm y un largo de 150 a 300 mm.

La vida útil de una columna de fase unida es de 3 a 6 meses de uso continuo apropiado. Deben evitarse el uso de álcalis o sales pues disminuyen la estabilidad de la fase fija. El rango de trabajo se fija para valores de pH entre 2 y 8.

2) Fase Móvil: Al trabajar con columnas de fase reversa el solvente de máxima polaridad disponible es el agua. Se utiliza en mezclas de proporciones variables con un solvente miscible menos polar tal como Metanol o Acetonitrilo. La Tabla 1 muestra una serie eluotrópica de polaridad decreciente (ϵ_0 representa la fuerza del solvente) con los solventes más usualmente empleados en CLAR (Zallocchi et al., 1990b).

Dado que la selectividad, y por ende, la resolución dependen del solvente, al buscar las condiciones de mejor resolución cromatográfica se debe tener en cuenta que, en fase reversa, variaciones crecientes en la composición de la mezcla para el solvente menos polar determinan un aumento de la fuerza de elución. Se logran cambios significativos aumentando su concentración o reemplazándolo por otro de polaridad decreciente que le siga en la lista.

Para la separación de flavonoides, trabajando con una columna RP C-18 se obtienen buenos resultados con mezclas Metanol:Agua en un rango de 35:65 a 70:30 según el grado de glicosidación, pudiéndose agregar de 1 a 5 % de Acido Acético (Harborne y Boardley, 1984; Daigle y Conkerton, 1982; Wulf y Nagel, 1976) o Acido Fórmico (Castele, Geiger y Van Sumere, 1982), lo que

en algunos casos mejora el ancho de las bandas, debido a la disminución o anulación de la ionización de los grupos -OH fenólicos ácidos.

También puede utilizarse Acetonitrilo en lugar de Metanol prácticamente con los mismos porcentajes.

La utilización de variaciones de la composición de la mezcla de elución a lo largo del desarrollo cromatográfico, o gradiente de solventes, permite reducir el tiempo total de corrida y mejorar la resolución.

En general se va variando la polaridad en forma decreciente a fin de disminuir los t_r de los compuestos más retenidos, aunque en definitiva la estrategia a seguir depende de la naturaleza de cada muestra en particular.

TABLA 1.5.1.A : Serie eluotrópica de polaridad decreciente

SOLVENTE	ϵ_0
Agua	Muy alta
Metanol	0.95
Etanol	0.88
N-propanol	0.82
Acetonitrilo	0.65
Acetato de Etilo	0.58
Acetona	0.56
Dioxano	0.56
THF	0.45
Benceno*	0.32
Tolueno*	0.29
N-pentano*	0.00

* No se utilizan en fase reversa

3) Velocidad de Flujo: En general se trabaja a valores de flujo entre 0.5 y 2 ml/minuto , lo que implica ubicarse en un rango de presión de trabajo de entre 500 y 3000 psi (14 psi equivalen aproximadamente a 1 atm).

4)Temperatura: La temperatura afecta la resolución porque al incrementarse disminuye la retención. Asimismo disminuye la viscosidad de la fase móvil mejorando la eficiencia de la separación y aumenta la solubilidad de las sustancias en la fase móvil. En fase reversa el máximo rendimiento se obtiene trabajando a temperaturas entre 40 y 60 grados, aunque si no se cuenta con un sistema capaz de termostatar los solventes se puede trabajar perfectamente a temperatura ambiente.

5)Desgasificación de solventes: Luego de proceder al filtrado de los solventes o mezcla a emplear (lo que evita que penetren partículas a la bomba o al sistema de conductos que pueden llegar a obstruir la columna) se deben eliminar los gases disueltos en la fase móvil por calentamiento y agitación en vacío o usando gas inerte, generalmente helio.

Es importante en el proceso de desgasificación no alterar la composición de la mezcla.

6) Volumen de muestra inyectado: La muestra se debe disolver en el solvente con menor fuerza de elución para lograr el menor volumen final que sea posible.

Del mismo modo, la concentración (cantidad) de muestra es un factor muy importante pues afecta la resolución por saturación de la columna, provocando bandas asimétricas y con colas pronunciadas resultando tiempos de retención menores.

El control adecuado de los parámetros de corrida permite alcanzar con esta técnica una reproducibilidad que es muy superior respecto a cualquier otra disponible para flavonoides. Su resolución y sensibilidad permiten detectar hasta cantidades del orden de los 50 ng (Wulf y Nagel,1976).

1.5.2. Aplicaciones de la C.L.A.R. en quimiotaxonomía

La inclusión de la CLAR en trabajos quimiotaxonómicos no es nueva dado que se ha aplicado a diversos estudios de flavonoides en diferentes especies (Daigle y Conkerton, 1982 citan varios ejemplos ; Asen y Griesbach, 1983) y otros de tipo filogenético (Meurer, Wiermann y Strack, 1988) aunque la mayoría se han efectuado con fines fitoquímicos, y muchos de éstos corresponden a la familia Leguminosae (Carlson y Dolphin,1980 ; West,Birac y

Pratt ,1978 ;Dorr y Guest,1987).

Existen varias aplicaciones de la CLAR que facilitan y permiten lograr una mayor exactitud en las determinaciones con fines quimiotaxonómicos:

1) Caracterización de patrones específicos: A partir de extractos de material vegetal se puede obtener directamente el patrón cromatográfico específico de los flavonoides presentes.

La información obtenida permite una rápida correlación entre las diversas muestras en estudio dado que cada flavonoide está caracterizado por un solo parámetro que es el Tiempo de Retención (t_R).

2) Co-cromatografía contra testigo: Un compuesto aislado previamente puede ser corrido en forma conjunta con un testigo conocido, o bien un segundo compuesto proveniente de otra fuente, cuando quiera corroborarse que se trata de la misma sustancia. Esto será fácil de evidenciar cuando se observa un único pico en el cromatograma obtenido a partir de su inyección conjunta.

Ambas muestras se preparan por separado y pueden inyectarse a la vez, o bien se efectúan dos corridas sucesivas y se comparan los t_R respectivos.

3) Aislamiento de sustancias de interés: Se puede trabajar en forma preparativa para el aislamiento masivo de un compuesto en particular. Se puede disponer de una columna preparativa adecuada a la masa de la muestra, o bien utilizar una columna semipreparativa y repetir la corrida un número suficiente de veces. Las fracciones correspondientes a uno o más picos de interés se recogen a la salida del detector en recipientes adecuados o bien mediante un colector automático de fracciones. Una vez reunida la muestra se procede a eliminar el solvente en un evaporador rotativo o por liofilización en el caso del agua, obteniéndose la sustancia pura. Luego, se puede determinar la estructura del flavonoide mediante distintas técnicas de análisis (por espectroscopía UV, RMN protónica o de ^{13}C , hidrólisis ácida, espectrometría de masa, etc.)

4) Elución y análisis de manchas de cromatogramas en papel: Se puede proceder a un análisis de eluidos de manchas de cromatogramas en papel ya sea con fines comparativos o bien para purificación. Es importante para esto un correcto filtrado (por lo menos dos veces) del eluido para evitar el ingreso de fibras de celulosa a la bomba o columna del cromatógrafo. En general, una mancha dada presentará

más de un componente cuando se analiza por CLAR, lo que demuestra la mayor resolución de este método.

De este modo podrán separarse y caracterizarse estos compuestos.

1.5.3 Comparación con otros métodos

La CLAR resulta un excelente método para la determinación de perfiles y el aislamiento de flavonoides. En la práctica, se han podido resolver muestras con más de 30 flavonoides glicosidados o metilados (Castele, Geiger y Van Sumere, 1982).

Para muestras con un promedio de entre 4 y 7 flavonoides, por ejemplo O-glicósidos en el rango de mono, di y triglicósidos, el grado de glicosidación está directamente relacionado con el tiempo de retención (Harborne y Boardley, 1984). Cada flavonoide queda caracterizado por el tiempo de retención (t_r): este valor es constante para cada compuesto en las condiciones experimentales fijadas.

Este parámetro de lectura inmediata permite un manejo simple de la información obtenida y una pronta caracterización de cada especie, facilitando el análisis numérico estadístico inter o intraespecífico.

La utilización de columnas de fase reversa permite encarar estudios comparativos relativamente sencillos, bajo condiciones estandarizadas, de muestras vegetales con fines quimiotaxonómicos (Zallocchi et al., 1990b).

Aunque la CLAR presenta un alto grado de resolución cromatográfica una vez determinadas las condiciones de trabajo, puede ocurrir que no existan diferencias demasiado significativas respecto a la técnica tradicional de CPLL (cromatografía de partición líquido-líquido) bidimensional sobre papel en cuanto al número de flavonoides detectados por ambos métodos, pero cuando existen son siempre a favor del primero (Zallocchi et al., 1990b).

Una ventaja adicional en el caso de la CLAR es que la correlación entre cromatogramas es inmediata pues los rangos de t_r característicos son suficientemente estrechos como para no tener superposiciones de otras sustancias.

En el caso de la cromatografía en papel la identificación es menos precisa y sujeta a mayor error, pues el proceso de detección es más engorroso e inexacto (observación de color, mediciones de R_f , recorte y elución de manchas, cálculos de superposición, etc.). Asimismo resulta más difícil controlar las condiciones de corrida (temperatura, grado de hidratación del papel, sembrado de muestras, saturación de la cuba) lo que afecta

la relación de frente y el tamaño de las manchas, dificultando la correlación entre cromatogramas. Este aspecto crea dificultades de gran magnitud a medida que crece el número de especies consideradas que buscan correlacionarse (Zallocchi et al., 1990b).

Otro aspecto muy importante a favor de la CLAR está dado por el hecho de que es posible caracterizar los compuestos en cuanto a su naturaleza química en base a su t_r .

Así, es posible diferenciar isoflavonas (Carlson y Dolphin, 1980), glicoflavonas isoméricas que no pueden separarse por otros métodos (Becker y Wilking, 1977; West, Birac y Pratt, 1978; Lardy, Boulliant y Chopin, 1984), flavonas polimetoxiladas (Rouseff y Ting, 1979; Bianchini, 1980), flavonoides sulfatados (Harborne y Boardley, 1984), isoflavonoides (Dorr y Guest, 1987) o diversos compuestos fenólicos (Court, 1977; Vanhaelen y Vanhaelen-Fastré, 1980).

Debe tenerse en cuenta que muchos de estos compuestos no pueden diferenciarse en el papel, o bien su caracterización es ambigua (basada en su coloración) y obliga a una serie de eluciones y nuevas corridas cromatográficas, o al empleo de reveladores especiales.

Una gran ventaja de la CLAR es que permite trabajar además en forma preparativa, obteniéndose al fin del proceso sustancias prácticamente puras y en cantidades necesarias para encarar los análisis químicos y espectroscópicos para una exacta determinación estructural del compuesto (Pomilio y Zallocchi, 1989).

La relación de costo del equipamiento básico y operativo es uno de los factores de mayor peso en contra de la introducción de esta técnica.

Otro aspecto desfavorable está dado por el necesario proceso de preparación previa a que deben someterse las muestras antes de efectuar la corrida (filtrado, purificación, etc.) lo que requiere un cierto tiempo de trabajo, aunque permite a su vez un aumento de la resolución final lograda y es de fácil estandarización.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1. Material vegetal utilizado

Vigna luteola (Jacq.) Bentham

- 1) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Gualeguaychú, Ceibas. 29/II/1984 (fl,fr). Palacios 1300 (BAFC).
- 2) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Gualeguaychú, Ceibas. 15/V/1984 (fl,fr). Palacios 1378 (BAFC).
- 3) ARGENTINA. Pcia. de Buenos Aires: Partido de Zárate, Canal Las Rosas, entre Río Luján y Paraná de Las Palmas. 1/III/1981 (fl,fr). Palacios 956 (BAFC).
- 4) ARGENTINA. Capital Federal: Ciudad Universitaria, 15/II/1983 (fl,fr). Zallocchi 001 (BAFC).
- 5) ARGENTINA. Pcia. de Buenos Aires: Partido de La Plata, Punta Lara. 1/III/1981 (fl,fr). Zallocchi 002 (BAFC).

Vigna adenantha (G.F.Meyer) Maréchal, Mascherpa y Stainier

- 6) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy : Depto. Ledesma, Río Negro I y ruta 34, de Jujuy a Fraile Pintado. 25/VI/1983 (fl,fr). Palacios 1209 (BAFC).
- 7) ARGENTINA. Pcia. de Tucumán: Depto. Famaillá, Lules, Quebrada del río Lules. 1/IV/1982 (fl,fr). Palacios 1048 (BAFC).
- 8) ARGENTINA. Pcia. de Chaco: Depto. San Fernando, Colonia Benitez, al lado del río hacia el pueblo. 30/III/1980 (fl,fr). Palacios 896 (BAFC).
- 9) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Gral. Alvear, Río Aguapey, 100 km al SE de Gob. Virasoro. 23/III/1982 (fl,fr). Palacios 1092 (BAFC).
- 10) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Concordia, Concordia. Parque San Martín. 20/II/1984 (fl,fr). Palacios 1277 (BAFC).
- 11) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Concordia, Concordia. Parque San Martín. 24/III/1980 (fl,fr). Palacios 849 (BAFC).
- 12) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Concordia, Concordia.

Parque San Martín. 24/III/1980 (fl,fr). Palacios 850 (BAFC).

13) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Conc. del Uruguay, Concepción del Uruguay, Banco Pelay. 5/VII/1985 (fr). Palacios 1380 (BAFC).

***Vigna candida* (Vellozo) Maréchal, Mascherpa y Stainier**

14) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, cantera a 6 km camino a Alberdi. 28/III/1980 (fl). Palacios 880 (BAFC).

15) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Javier, San Javier, camino al puerto. 25/III/1982 (fl). Palacios 1096 (BAFC)

16) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Javier, San Javier, camino al puerto. 25/III/1982 (fl). Palacios 1097 (BAFC).

17) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Javier, camino de San Javier a Puerto Arenas. 25/II/1984 (fl). Palacios 1288 (BAFC).

18) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Javier, a 3 km de la bifurcación S. Javier-Itacaruré. 25/II/1984 (fl). Palacios 1289 (BAFC).

19) ARGENTINA. Capital Federal: Ciudad Universitaria, cultivada Campo Experimental. 21/III/1989 (fl). Zallocchi 003 (BAFC).

***Vigna longifolia* (Bentham) Verdcourt**

20) PARAGUAY. Depto. Presidente Hayes: Estero Patiño, ruta Transchaco. 19/XII/1987 (fl,fr). Palacios 1519 (BAFC).

21) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. San Martín, ruta 14 y Arroyo Guaniraní. 22/II/1984 (fl). Palacios 1284 (BAFC).

22) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Paso de los Libres, P. de los Libres , 2 km al sur del Hotel de Turismo. 28/II/1984 (fl). Palacios 1297 (BAFC).

***Vigna caracalla* (L.) Verdcourt**

23) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. El Carmen, Dique La Ciénaga. 3/III/1988 (fr) P.Hoc 82 (BAFC).

24) ARGENTINA. Pcia. de Salta: Depto. La Viña, La Viña, antes de Anposcachi, Km 128. 1/III/1988 (fl). P.Hoc 76 (BAFC).

25) ARGENTINA. Pcia. de Salta: Depto. La Viña, El Candil. 1/III/1988 (fl,fr) P.Hoc 78 (BAFC).

26) ARGENTINA. Pcia. de Salta: Depto. La Viña, Camino de cornisa Salta-Jujuy, selva de laurel, 1400 msm. 3/III/1988 (fl,fr) P.Hoc 81 (BAFC).

27) ARGENTINA. Pcia. de Tucumán: Depto. Trancas, Colalao, camino a

Hualinchay. 23/II/1985 (fl). Palacios 1351 (BAFC).

28) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Santo Tomé, Gob. Virasoro, Establec. Las Marías, Potrero Sta. María. 22/III/1984 (fl). Palacios 1088 (BAFC).

***Vigna lasiocarpa* (Bentham) Verdcourt**

29) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino al puerto. 24/II/1984 (fl). Palacios 1285 (BAFC).

30) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino al puerto. 26/II/1984 (fl). Palacios 1295 (BAFC).

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

31) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino a Alberdi, cantera a 6 km. 28/III/1980 (fl y fr) Palacios 881 (BAFC).

32) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino hacia Oberá. 26/II/1984 (fl,fr). Palacios 1296 (BAFC).

33) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Javier, 1 km al norte de la bifurcación San Javier-Itacaruré. 25/II/1982 (fl). Palacios 1294 (BAFC).

34) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Santo Tomé, Gob. Virasoro, 1 km al norte del apeadero 489. 21/III/1982 (fl). Palacios 1076 (BAFC).

***Vigna hookerii* Verdcourt**

35) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Gualaguaychú, arroyo Gualayán (fl). Burkart 4215 (SI).

***Vigna spiralis* (Piper) Maréchal, Mascherpa y Stainier**

36) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. Santa Bárbara, Vinalito. 22/IV/83 (fl). Ahumada 4623 (UNJ-FCA)- dupl. BAFC. Det. P. Hoc.

***Dolichopsis paraguariensis* Piper**

37) PARAGUAY. Depto. Presidente Hayes, 66 al E. de Pozo Colorado. 18/XII/87 (fl,fr). Palacios 1513

***Phaseolus vulgaris* L. var *aborigineus* (Burkart) Baudet**

- 38) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. Capital, camino a Yala, 1680 msm. 21/III/1982 (fl y fr). Palacios 1010 (BAFC).
- 39) ARGENTINA. Pcia. de Salta: Depto. La Caldera, entre La Caldera y finca La Angostura. 28/III/1982 (fl,fr). Palacios 1043 (BAFC).
- 40) ARGENTINA. Pcia. de Tucumán: Depto. Trancas, Hualinchay, arroyo a la entrada. 28/III/1979 (fl,fr). Palacios 785 (BAFC).
- 41) ARGENTINA. Pcia. de Tucumán: Depto. Trancas, Hualinchay, arroyo a la entrada. 28/III/1979 (fl). Palacios 786 (BAFC).
- 42) ARGENTINA. Pcia. de Tucumán: Depto. Trancas, Hualinchay, arroyo a la entrada. 28/III/1979 (fl,fr). Palacios 787 (BAFC).
- 43) ARGENTINA. Pcia. de Tucumán: Depto. Trancas, camino a Hualinchay, bifurcación hacia Rearte, Km 43. 30/III/1982 (fl,fr). Palacios 1047 (BAFC).
- 44) ARGENTINA. Pcia. de Tucumán: Depto. Trancas, Hualinchay, 2 km al este, sobre laderas. 28/II/1985 (fl,fr). Palacios 1355 (BAFC).

***Phaseolus vulgaris* L. ("forma Merlo")**

- 45) ARGENTINA. Pcia. de San Luis: Depto. Junín, Merlo, espontáneo en cercos y alambrados. Leg. Batallanez. 24/IV/1943. SI 14949
- 46) ARGENTINA. Pcia. de San Luis: Depto. Junín, Merlo, espontáneo en cercos y alambrados. Leg. Batallanez. 24/IV/1943. SI 14954

***Phaseolus vulgaris* L. ("cultivares primitivos del NOA")**

- 47) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. Tumbaya, Tumbaya, quebrada del río León y alrededores de la desembocadura del A° del Medio, 1850 mnm, N° 1711 (BAA).
- 48) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. Capital, 13 Km al SO de Tiraxi, en la senda hacia Tiraxi. 1670 mnm, 13/IV/1986. N° 1712 (BAA).
- 49) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. Tumbaya, 90 Km al E de Tiraxi, 1880 mnm. 1/IV/1986. N° 1713 (BAA).

***Phaseolus lunatus* L.**

- 50) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. Sta. Bárbara, Vinalito. 30/III/1983 (fl). Ahumada 4674 (LIL, dupl. BAFC).
- 51) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy : Depto. Ledesma, Río Negro I y ruta

34, de Jujuy a Fraile Pintado. 25/VI/1983 (fl,fr). Palacios 1210 (BAFC).

52) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino al puerto viejo. 27/III/1980 (fl,fr) Palacios 866 (BAFC).

***Phaseolus augustii* Harms**

53) ARGENTINA. Pcia. de Tucumán: Depto. Trancas, Hualinchay, 1 km al este, entrada del camino frente al río. 23/II/1985 (fl,fr). Palacios 1320 (BAFC).

***Macroptilium lathyroides* (L.) Urban**

54) PARAGUAY. Depto. Presidente Hayes: Estero Patiño, ruta Transchaco. 19/XII/1987 (fl,fr). Palacios 1518 (BAFC).

55) ARGENTINA. Pcia. de Chaco: Depto. San Fernando, Colonia Benitez, camino de acceso a la ruta. 30/III/1980 (fl,fr). Palacios 891 (BAFC).

***Macroptilium longepedunculatum* (Bentham) Urban**

56) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Mburucuyá, Estancia Santa Teresa. 1/IV/1980 (fl). Palacios 908 (BAFC).

57) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Mburucuyá, Estancia Santa Teresa. 1/IV/1980 (fl). Palacios 910 (BAFC).

58) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Esquina, ruta 27, 10 km al sur de Esquina hacia Goya. 2/IV/1980 (fl). Palacios 902 (BAFC).

***Macroptilium panduratum* (Martius ex Bentham) Maréchal y Baudet**

59) PARAGUAY. Depto. Nueva Asunción, km 695, estación ganadera "Héroes del Chaco", 2 km al este. 12/12/1987 (fl). Palacios 1493 (BAFC).

60) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. San Pedro: San Pedro, camino a San Lucas. 680 msm. 22/II/1988 (fl). P.Hoc 66 (BAFC).

61) ARGENTINA. Pcia. de Salta: Depto. M. Guemes, río Mojotoro. 24/II/1985 (fl). Palacios 1325 (BAFC).

***Macroptilium bracteatum* (Ners. et Mart.) Maréchal y Baudet**

- 62) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. Ledesma, ruta a S.S. de Jujuy y río Ledesma. 25/VI/1983 (fl,fr). Palacios 1208 (BAFC).
63) ARGENTINA. Pcia. de Salta: Depto. Capital, Salta, bajada al río San Lorenzo. 25/III/1979 (fl). Palacios 769 (BAFC).
64) ARGENTINA. Pcia. de Chaco: Depto. Gral. Guemes, Castelli, entrada escuela 622. 17/XII/1980 (fl). Palacios 921 (BAFC).
65) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Concordia, Concordia. Parque San Martín. 20/II/1984 (fl,fr). Palacios 1275 (BAFC).

***Macroptilium erythroloma* (Bentham) Urban**

- 66) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino al puerto viejo. 27/III/1980 (fl). Palacios 862 (BAFC).
67) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino al puerto viejo. 27/III/1980 (fl). Palacios 867 (BAFC).
68) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino al río. 28/III/1980 (fl). Palacios 878 (BAFC).
69) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino al río. 25/III/1982 (fl,fr). Palacios 1100 (BAFC).
70) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino al río. 25/III/1982 (fl,fr). Palacios 1102 (BAFC).
71) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino al puerto. 24/II/1984 (fl). Palacios 1283 (BAFC).
72) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Ignacio, San Ignacio, camino al puerto. 24/II/1984 (fl,fr). Palacios 1284 (BAFC).
73) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. Candelaria, Santa Ana. 24/II/1984 (fl,fr). Palacios 1286 (BAFC).
74) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Javier, a 3 km de la bifurcación S. Javier-Itacaruré. 25/II/1984 (fl). Palacios 1290 (BAFC).
75) ARGENTINA. Pcia. de Chaco: Depto. San Fernando, Colonia Benitez, camino de acceso a la ruta. 30/III/1980 (fr). Palacios 892 (BAFC).

***Macroptilium psammodes* (Lindman) Lackey**

- 76) PARAGUAY. Gran Chaco. 1885-1895 Hassler 1009 (G)
77) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Santo Tomé, Gob. Virasoro, Establec. Las Marías, Barrio Tres Capones. 22/III/1984 (fl). Palacios 1083 (BAFC).
78) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Mburucuyá, Estancia

- Santa Teresa. 1/IV/1980 (fl). Palacios 909 (BAFC).
- 79) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Gral. Alvear, Río Aguapey, 100 km al SE de Gob. Virasoro. 23/III/1982 (fl,fr). Palacios 1090 (BAFC).
- 80) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Gral. Alvear, Gral. Alvear, 15 km al norte de la entrada. 23/II/1984 (fl,fr). Palacios 1280 (BAFC).
- 81) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. San Martín, ruta 14 y Arroyo Guaniraní. 22/II/1984 (fl). Palacios 1279 (BAFC).
- 82) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Esquina, ruta 27, 10 km al sur de Esquina hacia Goya. 2/IV/1980 (fl). Palacios 900 (BAFC).
- 83) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Gualaguaychú, Ceibas, ruta 12 de Ceibas a Médanos. 29/II/1984 (fl). Palacios 1298 (BAFC)
- 84) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Gualaguaychú, Ceibas, ruta 12 de Ceibas a Médanos. 29/II/1984 (fl). Palacios 1299 (BAFC)
- 85) URUGUAY. Depto. Rocha: La Paloma, Playa Solari. 10/II/1948 (fl,fr). Castellanos 18570 (LIL 464163)

***Macroptilium prostratum* (Bentham) Urban**

- 86) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. Candelaria, Loreto, camino de entrada desde ruta 12. 29/III/1980 (fl,fr). Palacios 882 (BAFC).
- 87) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Javier, bifurcación S. Javier-Itacaruré, camino a Santa Ana. 25/II/1984 (fl). Palacios 1287 (BAFC).
- 88) ARGENTINA. Pcia. de Misiones: Depto. San Javier, San Javier, alrededores del pueblo. 25/II/1984 (fl). Palacios 1291 (BAFC).
- 89) ARGENTINA. Pcia. de Corrientes: Depto. Santo Tomé, 40 km al este de Gob. Virasoro, arroyo Garabí. 20/III/1982 (fl). Palacios 1073 (BAFC).
- 90) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Concordia, Concordia. Parque San Martín, cerros arenosos. 24/III/1980 (fl). Palacios 857 (BAFC).
- 91) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Concordia, Concordia. Parque San Martín. 15/XII/1981 (fl,fr). Palacios 1006 (BAFC).
- 92) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Concordia, Concordia. Parque San Martín. 20/II/1984 (fl,fr). Palacios 1274 (BAFC).
- 93) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Colón, El Palmar, bajada al arroyo El Palmar, "La Glorieta". 24/III/1980 (fl,fr). Palacios 844 (BAFC).

94) ARGENTINA. Pcia. de Entre Ríos: Depto. Colón, El Palmar, ruta 14 y arroyo El Palmar. 21/XI/1982 (fl). Palacios 1205 (BAFC).

***Macroptilium fraternum* (Piper) Lackey**

95) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. Sta. Bárbara, camino de Palma Sola a El Fuerte, 5 km antes de El Fuerte. 24/III/1982 (fl) Palacios 1026 (BAFC).

96) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. Capital, ruta de San Salvador a El Carmen, 2 km al norte de Las Vaquerías. 21/III/1982 (fl) Palacios 1011 (BAFC).

97) ARGENTINA. Pcia. de Jujuy: Depto. San Antonio, ruta de San Salvador a El Carmen, arroyo Huaico Hondo. 21/III/1982 (fl,fr) Palacios 1014 (BAFC).

98) ARGENTINA. Pcia. de Salta: Depto. La Caldera, La Caldera, 1400 msm. 3/III/1988 (fl). P.Hoc 79 (BAFC).

99) ARGENTINA. Pcia. de Salta: Depto. La Caldera, La Caldera, 1500 msm. 3/III/1988 (fl). P.Hoc 80 (BAFC).

100) ARGENTINA. Pcia. de Salta: Depto. Rosario de Lerma, campo Quijano, camino al cerro, 1350 msm. 29/II/1988 (fl,fr). P.Hoc 72 (BAFC).

101) ARGENTINA. Pcia. de Salta: Depto. Rosario de Lerma, campo Quijano, camino al cerro, 1350 msm. 29/II/1988 (fl,fr). P.Hoc 73 (BAFC).

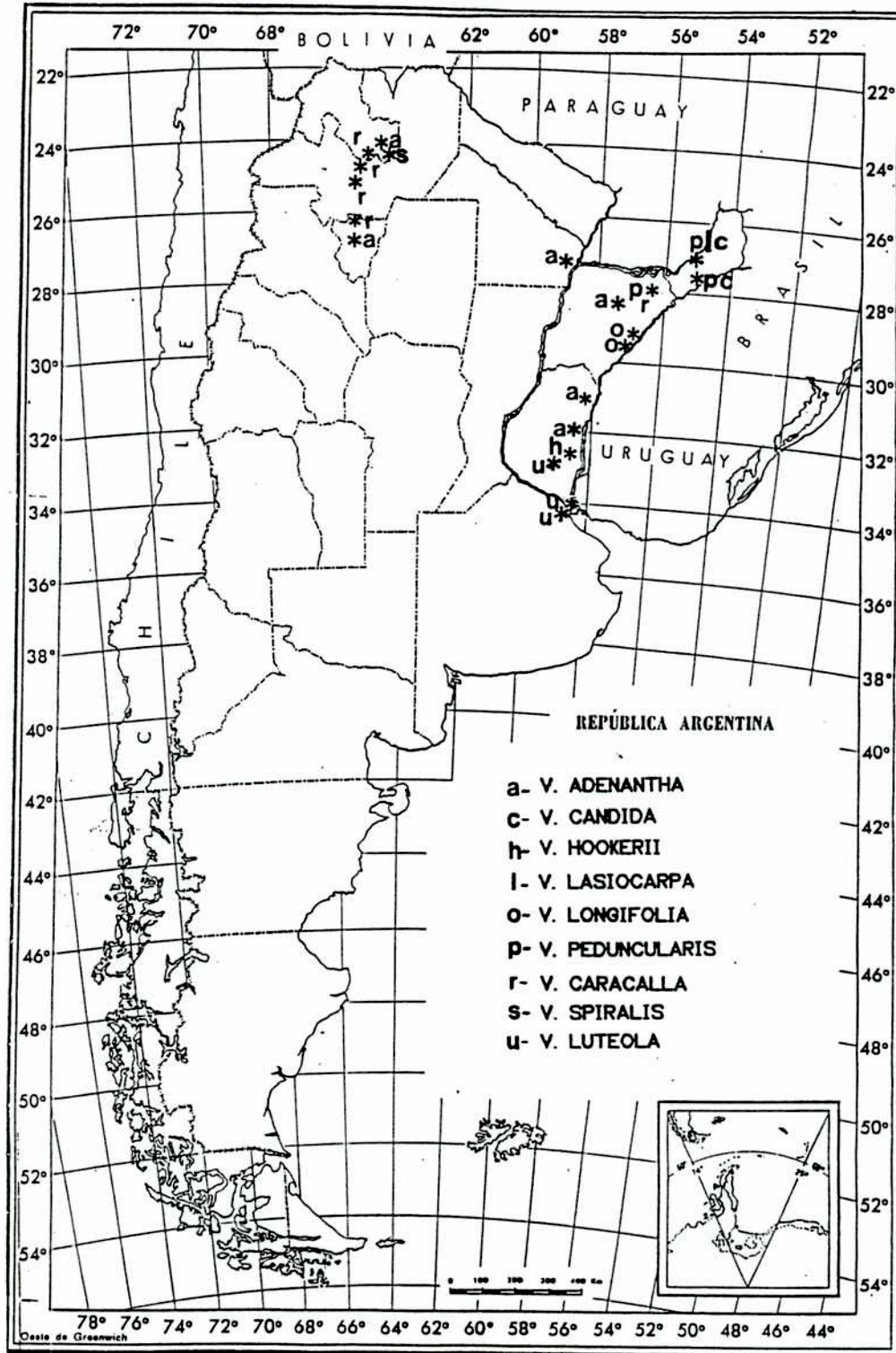
102) ARGENTINA. Pcia. de Salta: Depto. Capital, San Lorenzo, 1200 msm. 20/II/1988 (fl,fr). P.Hoc 59 (BAFC).

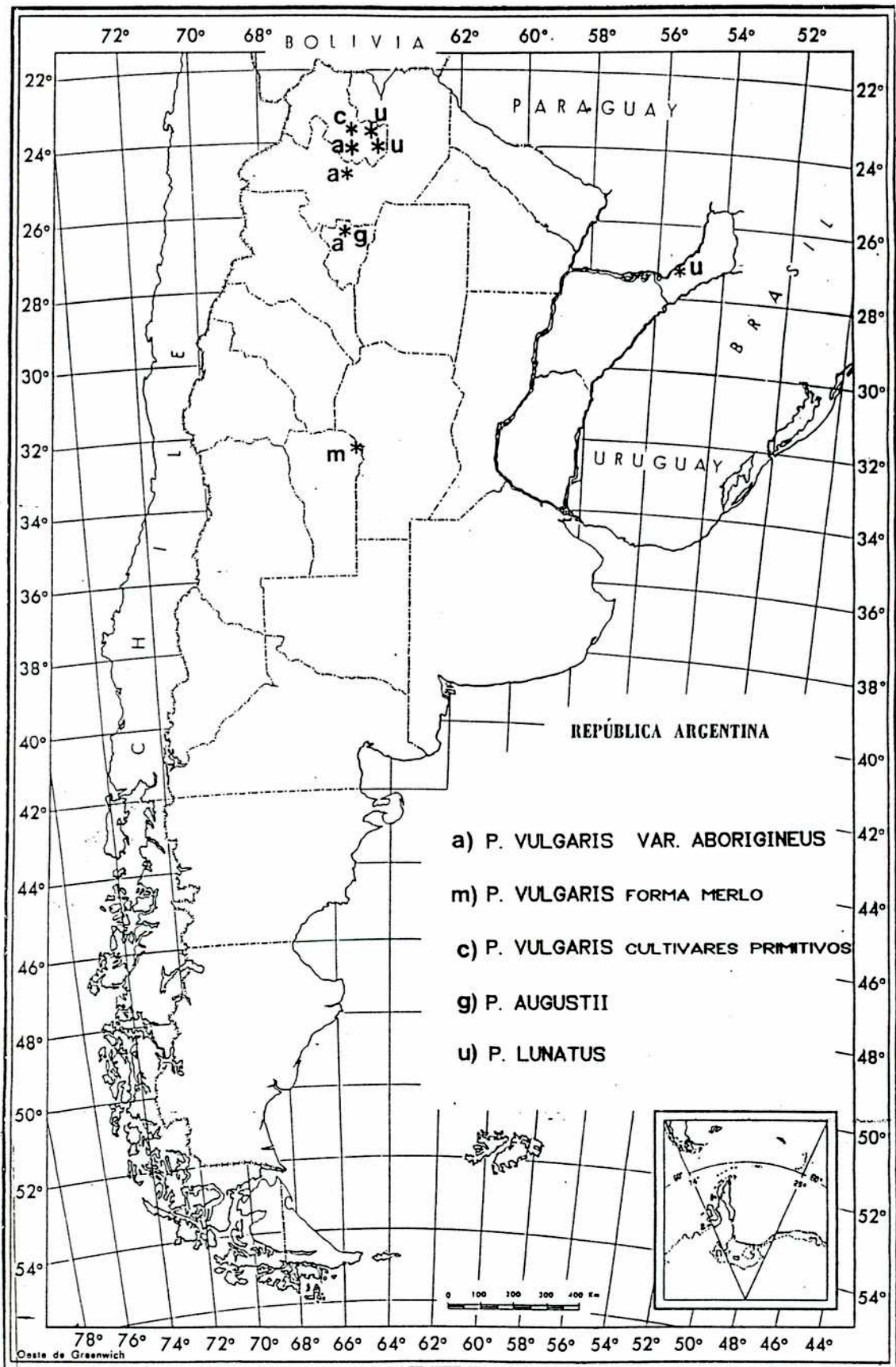
103) ARGENTINA. Pcia. de Tucumán: Depto. Trancas, camino a Hualinchay, bifurcación hacia Rearte, Km 43. 30/III/1982 (fl,fr). Palacios 1046 (BAFC).

Ubicación geográfica de las localidades citadas : Mapas de distribución de las poblaciones argentinas muestreadas.

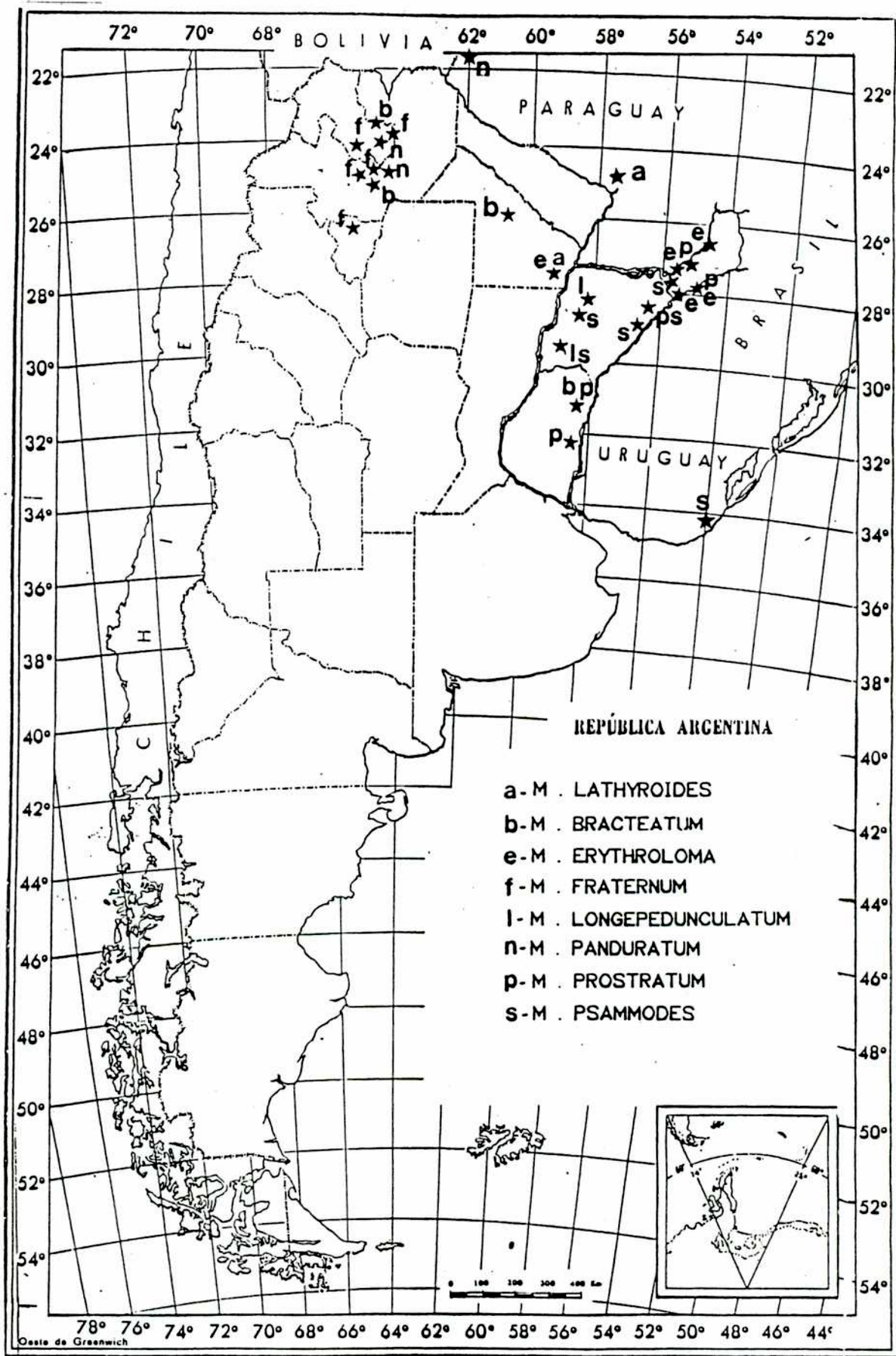
A continuación se detalla la ubicación geográfica de las poblaciones relevadas. Para cada género se elaboró un mapa distinto, aunque especies diferentes del mismo o de distinto género coexisten espacialmente en algunos casos.

Género *Vigna*





Género *Macroptilium*



2.2. Técnica de aislamiento de flavonoides

La metodología empleada para la determinación de los perfiles cromatográficos y el aislamiento de los flavonoides que resultaron de interés se ha esquematizado en la figura 2.2.A.

Las muestras para CPLL bidimensional sobre papel se obtuvieron a partir de 2g de material foliar, molido a consistencia pulverulenta, y extraído con MeOH : Agua (9:1) a temperatura ambiente durante 48 Hs, tras lo cual se procedió a filtrar y concentrar al vacío en un evaporador rotatorio.

En términos generales se siguió la metodología de Mabry et al. (1970) empleando papel Schleicher & Schüll N° 3469, en hojas de 29 x 30 cm.

El extracto obtenido en cada caso, se redisolvió en metanol. El solvente utilizado para la primera corrida fue Isobutanol:Agua:Acido Acético (3:1:1). La segunda corrida se efectuó con Acido Acético 15% V/V en agua. En ambos casos se desarrolló en forma descendente. Los cromatogramas fueron analizados bajo luz UV en presencia de vapores de amoníaco, caracterizando los flavonoides presente mediante su R_f y color de fluorescencia.

Los compuestos determinados fueron eluidos con metanol de calidad espectroscópica durante 15 minutos a temperatura ambiente, y las muestras fueron posteriormente filtradas y concentradas para su análisis.

Los cromatogramas de CPLL unidimensionales utilizando Butanol: Agua:Acido Acético (4:5:1) y Agua como solvente, se realizaron en forma descendente siguiendo la técnica de Harborne (1967) y con el mismo papel que en el caso anterior.

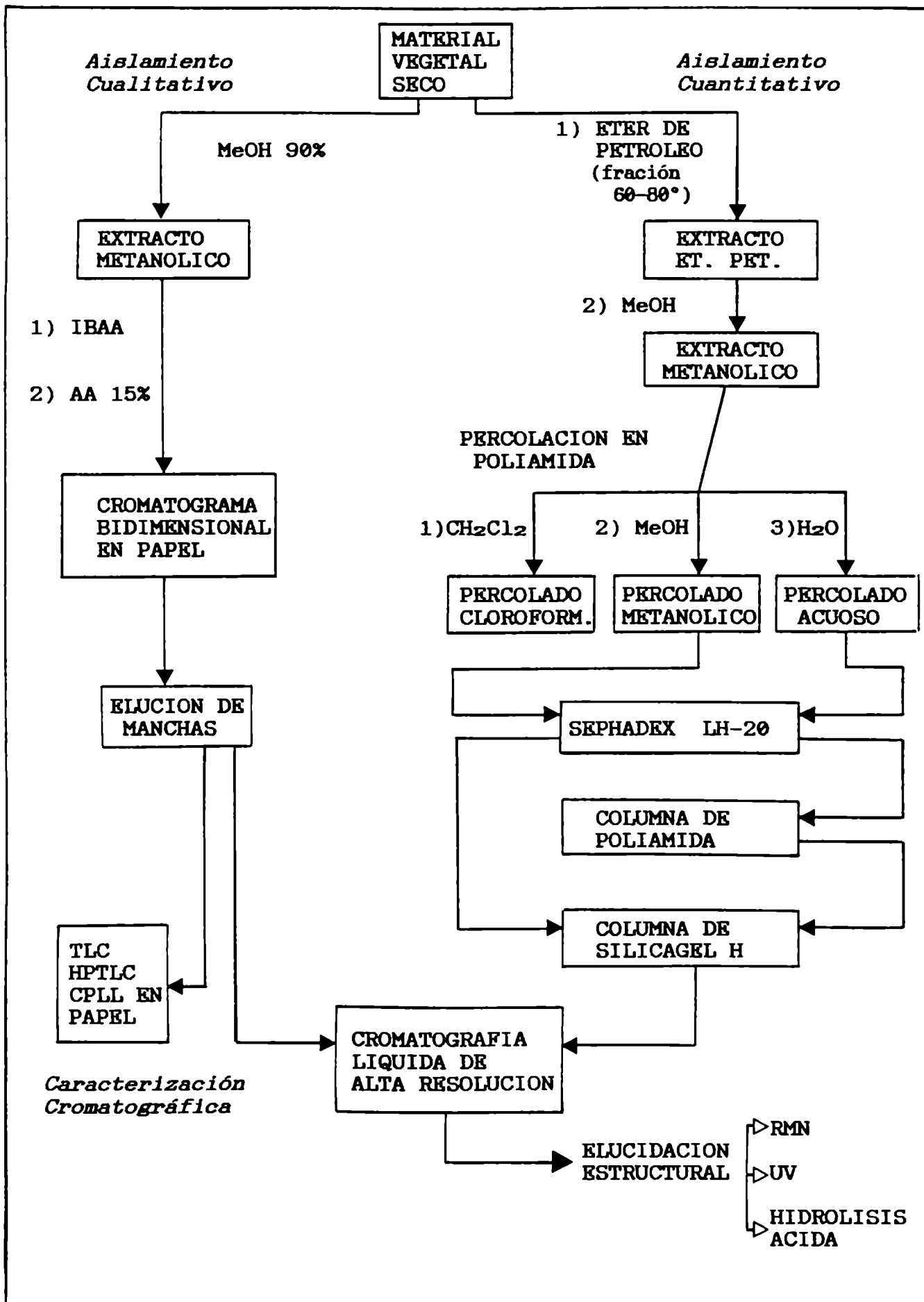
Las corridas cromatográficas en placa delgada de resolución normal (TLC) y de alta resolución (HPTLC) se efectuaron empleando como eluyente mezclas de distinta polaridad de CH_2Cl_2 : MeOH en un rango desde (9:1) a (7:3), empleando placas preparadas de gel de sílice extendidas sobre vidrio, marca Merck, de 10x20 cm y 20x20 cm en el primer caso, y de 10x10 cm en las de alta resolución.

En la vía de aislamiento cuantitativo se emplearon métodos cromatográficos preparativos y semipreparativos.

Para la cromatografía de exclusión molecular, se empleó Sephadex LH-20 en columna de vidrio con MeOH como solvente de elución, a presión normal y flujo constante.

Se empleó cromatografía de adsorción utilizando silica gel tipo H, marca Merck, en columna de vidrio trabajando a mediana presión, y usando como eluyente mezclas de polaridad creciente de CH_2Cl_2 : MeOH, en rangos similares a los mencionados para TLC.

FIGURA 2.2.A : Diagrama general de la metodología empleada en este trabajo para el aislamiento y purificación de flavonoides



Por último, tanto en el caso de la separación con poliamida en columna, como para la realización de los percolados, se empleó poliamida cromatográfica marca Woelm, previamente lavada con los correspondientes solventes de elución, trabajando en condiciones normales de presión y temperatura. Para el caso de la separación en columna se emplearon como eluyentes agua en primer término y MeOH posteriormente.

Para las determinaciones analíticas como para la purificación cuantitativa por CLAR, se utilizaron un cromatógrafo WATERS modelo 1000 en condiciones isocráticas, y un cromatógrafo KONIK modelo KNK 500-A, con gradiente de solventes. En ambos casos se trabajó a temperatura ambiente, con columnas de fase reversa de octadecil silano (RP-C 18) μ Bondapack y Spherisorb, y empleando como solvente mezclas de MeOH : Agua en relaciones variables.

Se utilizaron detectores UV de onda variable, operando a 291 nm.

2.3. Determinación estructural de flavonoides

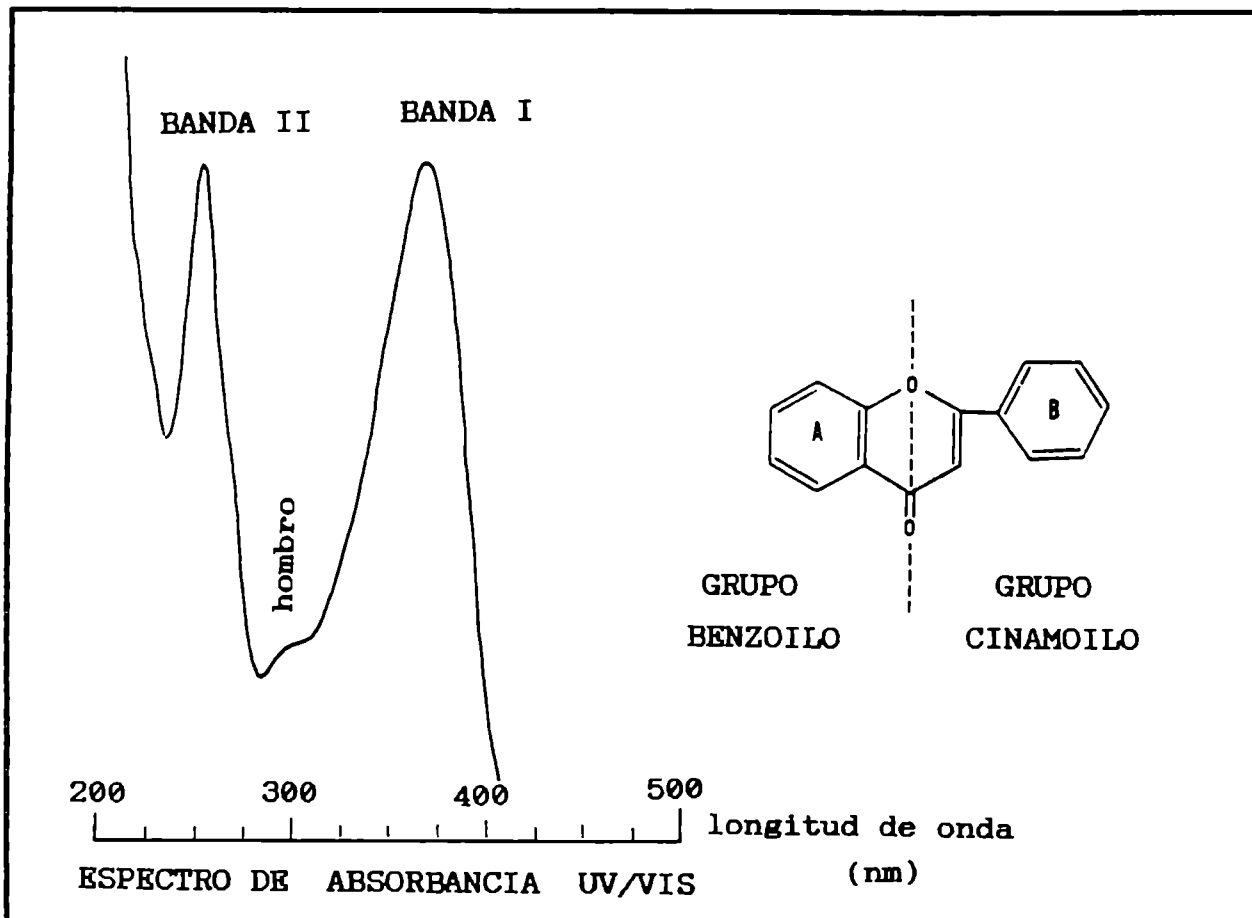
2.3.1. Espectroscopía UV con reactivos de desplazamiento.

En términos generales, los flavonoides presentan un espectro de absorción característico dado por dos bandas o picos que se ubican en el rango de 300-380 nm (banda I) y 240-280 nm (banda II). Las bandas de absorción se deben a la conjugación del grupo cinamoilo, correspondiente al anillo B (banda I), y al grupo benzoilo del anillo A (banda II), y se observan independiente-mente dado que los átomos de O interrumpen una conjugación entre ambos grupos (Figura 2.3.1.A). De igual modo, en el caso de las flavanonas, la ausencia del doble enlace en posición 2-3 interrumpe la conjugación del grupo cinamoilo, observándose una disminución y deformación de la banda I, que es reemplazada por un "hombro", permaneciendo la banda II sin cambios.

La presencia de sustituyentes en la molécula produce variaciones en el espectro de absorción afectando la posición de las bandas, lo que brinda información útil sobre el patrón de oxigenación (Mabry et al, 1970).

La utilización de reactivos de desplazamiento brinda una información adicional, dado que existe una reactividad diferencial entre los distintos grupos -OH libres, pues presentan un grado de acidez distinto según su posición. De este modo, ya desde mediados de los años '50 se emplean sustancias alcalinas (Harborne, 1967) que producen desplazamientos batocrómicos en las bandas.

FIGURA 2.3.1.A : Conjugación electrónica en flavonoides



La sistematización de esta técnica junto con el agregado de otras sustancias capaces de formar complejos más o menos lábiles con los -OH vecinales, tales como el H_3BO_3 y el $AlCl_3$ (Mabry et al., 1970) permite determinar la estructura del flavonoide.

Se emplean el MeONa, una base fuerte que provoca desplazamientos de unos 40 a 65 nm en la banda I cuando existe un -OH libre en posición 4', y otra base, menos fuerte, como el AcONa que ioniza los grupos -OH menos ácidos como los de posición 3, 4' o 7. En el caso de este último se produce un descenso batocrómico de unos 20 a 35 nm en la banda II, lo que permite su diagnóstico.

En el caso de -OH vecinales en posición -orto sobre el anillo B, el agregado de H_3BO_3 luego del AcONa produce corrimientos en la banda I de unos 12 a 30 nm.

La adición de $AlCl_3$ forma complejos ácido-lábiles entre los grupos -OH en posición orto del anillo B, provocando desplazamientos de entre 30 a 40 nm en la banda I, los cuales revierten agregando unas gotas de HCl.

Por el contrario, los complejos que se forman entre un grupo -OH libre en posición 3 o 5 y la función cetona en el carbono 4 no son lábiles, y producen desplazamientos que no desaparecen al agregar HCl.

Los espectros fueron efectuados midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro BECKMAN DK-2 con fototubo, barriendo a una velocidad de 36 nm por minuto, y en un espectrofotómetro HEWLETT-PACKARD con red de diodos.

2.3.2. Resonancia Magnética Nuclear Protónica.

La resonancia magnética nuclear (RMN) es un método espectrométrico de análisis no destructivo, que se basa en la absorción de energía en la zona de la radiofrecuencia por parte de los núcleos de algunos átomos, cuando se colocan en un campo magnético intenso y de alta homogeneidad (Joseph-Nathan, 1982).

Desde mediados de la década de 1960 la RMN de protones (^1H -RMN) se emplea en flavonoides, aunque inicialmente se analizaban como trimetilsilil-eter derivados por razones de solubilidad en los solventes deuterados disponibles entonces (CDCl_3 y DMSO-d_6) (Mabry et al., 1970). Posteriormente, se pudo obtener directamente el espectro ^1H -RMN utilizando metanol deuterado.

El uso de esta técnica permite elucidar la estructura indirectamente (puesto que se analiza la posición de los átomos de H en el esqueleto de la molécula, y muchos de ellos resultan equivalentes desde el punto de vista de la simetría molecular) midiendo las señales de radiofrecuencia observadas y los desplazamientos de estos valores hacia campos altos o bajos, como los acoplamientos que se produzcan por la vecindad de otros protones. En general, se conocen o pueden atribuirse todos estos parámetros correspondientes a flavonoides ya sean glicosidados o no (Buschi, 1982), y puede inferirse de qué compuesto se trata.

En nuestro caso, se utilizó como solvente DMSO-d_6 o metanol deuterado o , y los espectros fueron realizados en espectrómetros de resonancia VARIAN XL 100 y BRUKER 200 operando a 100.1 MHz y 200 MHz, respectivamente.

2.3.3. Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C .

La espectroscopía de RMN aplicada a los núcleos de carbono (^{13}C -RMN) data de mediados de la década de 1970. Gracias al acoplamiento de computadoras electrónicas a los espectrómetros de resonancia magnética fue posible estudiar en tiempos cortos los espectros RMN de núcleos escasos, como el isótopo del carbono de masa 13 (de abundancia natural cercana al 1%), mediante el método de pulsos cortos de radiofrecuencia e integración de resultados por transformadas de Fourier (Joseph-Nathan, 1982).

En esta técnica, cada carbono de la molécula da una señal específica de desplazamiento químico que puede ser asignada, y por lo tanto brinda una "imagen" mucho más clara del esqueleto molecular. La desventaja del método consiste en que requiere una mayor cantidad de masa de la sustancia a analizar, unos 10 mg (contra menos de la décima parte en ^1H -RMN) y los tiempos de ejecución pueden llevar en esos casos varias horas.

La aplicación creciente de esta técnica en flavonoides permite obtener a partir de la información disponible en la literatura (Agrawal y Rastogi, 1981 y Buschi, 1982 para un estudio general y bibliografía específica referida en 3.1.3.) los datos correspondientes para el análisis de los espectros y atribuir las señales de cada carbono.

Los espectros ^{13}C -RMN aquí presentados fueron realizados en un equipo VARIAN XL 100, operando a 25.2 MHz, y utilizando DMSO- d_6 como solvente.

2.3.4. Hidrólisis ácida e identificación de azúcares y agliconas.

Se efectuó, para el caso de los glicósidos, hidrólisis ácida empleando HCl 10% en solución acuosa, durante 60 minutos a 85°C.

La aglicona fue separada de los monosacáridos agregando acetato de etilo y recogiendo las fases acuosa y orgánica por separado.

La fase acuosa fue analizada por cromatografía en placa de celulosa de alta resolución empleando como solvente n-Butanol-Piridina-Agua (6:4:3) y efectuando dos corridas contra testigos (Schteingart, 1983). Se procedió a revelar con NO_3Ag en acetona en primer término, y luego con KOH 15% en MeOH, determinándose los R_f de cada azúcar. Las agliconas de la fase orgánica fueron determinadas por cromatografía en placa delgada de alta resolución (HPTLC) de silicagel, utilizando testigos disponibles. El sistema de solventes empleado fue CH_2Cl_2 : MeOH (9:1), y se empleó como revelador H_2SO_4

: Acido Acético (1:1) y exposición al calor (110°C durante 3 minutos), determinándose los R_f por observación de fluorescencia bajo luz UV.

Las determinaciones efectuadas se corroboraron por CLAR, efectuando co-cromatografía de las muestras con el testigo correspondiente.

2.4. Técnicas de Análisis Numérico Multivariado

2.4.1. Distancia taxonómica

La cuantificación del parecido o similitud entre las OTU es el requisito previo a la aplicación de cualquier técnica de análisis en taxonomía numérica.

Para tal fin debe aplicarse un coeficiente de similitud sobre la MBD de manera que pueda calcularse mediante operaciones matemáticas la semejanza (o, en forma complementaria, las diferencias) entre cada par posible de OTU's de la matriz, considerando todos los caracteres. De entre la gran variedad de coeficientes de este tipo que se han propuesto, los coeficientes de distancia conforman un grupo importante (junto a los de correlación y de asociación).

Todos los coeficientes de distancia se basan en el postulado de que se puede obtener una disposición de puntos representando a las OTU's en un espacio euclidiano adecuado de n-dimensiones empleando los estados o valores que estas OTU's toman para una serie de n caracteres considerados (Crisci y López Armengol, 1983).

Dentro de este grupo, el coeficiente Manhattan Distance (MD) es uno de los más empleados en estudios quimiotaxonómicos (Carmona, 1988) donde se emplean variables de doble estado representadas por 1 (=presencia) o 0 (=ausencia). Este coeficiente, como el MCD (Mean Character Difference) son casos especiales de una clase de funciones de distancia métrica llamadas de Minkowski (Sneath y Sokal, 1973) y se expresa como la sumatoria del valor absoluto de la diferencia entre los valores para cada caracter entre un par dado de OTU's (en el caso del MCD se trata de un valor promedio, es decir que se divide luego por el número total de caracteres considerados).

Es decir :

$$MD = \sum_{i=1}^n (X_{IA} - X_{IB})$$

y

$$MCD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_{IA} - X_{IB})$$

donde: X_{IA} = valor del caracter i en la OTU A; X_{IB} = valor del caracter i en la OTU B; n = número de caracteres.

A partir del cálculo de la distancia taxonómica entre las OTU's y de acuerdo a los valores consignados en la MBD (de dimensión m OTU's por n caracteres) utilizando el coeficiente de distancia se obtiene una matriz de distancia (MDD) de dimensión m filas por m columnas, donde la intersección de cada fila y columna indica la distancia entre dos OTU's dadas, siendo, desde luego, la diagonal de la MDD (correspondiente a la distancia de cada OTU consigo misma) igual a 0.

2.4.2. Análisis de agrupamiento

Existen numerosas técnicas para el análisis de matrices de similitud (Sneath y Sokal, 1973) pero algunas de ellas han demostrado ser particularmente útiles en estudios de quimiotaonomía, y son generalmente empleadas para una evaluación apropiada de toda la información química recabada, ya sea en forma independiente o en correlación con datos morfológicos o ecofisiológicos.

En el análisis de agrupamientos se utilizan técnicas que permiten formar grupos de OTU's que se asocian de acuerdo a su grado de similitud (Crisci y López Armengol, 1983).

Si bien existen numerosos criterios y distintas técnicas disponibles para tal fin, en este trabajo como en otros tantos de quimiotaonomía resulta conveniente el empleo del método de los pares no ponderados utilizando la media aritmética. En esta técnica de ligamiento promedio, también conocida como UPGMA (por *unweighted pair-group method using arithmetic averages*) se considera que el valor de similitud entre la OTU a incorporarse y un núcleo o grupo dado es igual al valor promedio que puede calcularse entre el ingresante y cada uno de los miembros del grupo. De esta manera, a medida que avanza el proceso de

agrupamiento siempre se vuelve a la matriz de similitud original para calcular las matrices derivadas.

Se calcula al fin del proceso un índice de correlación cofenética r que permite evaluar la distorsión del proceso de agrupamiento, considerando los valores de similitud resultantes, representados por el fenograma (matriz cofenética), en relación a la distancia real expresada en la MDD (Crisci y López Armengol, 1973).

Se puede demostrar que valores de r superiores a 0.8 implican una baja distorsión de la técnica, y por tanto el fenograma o *cluster* resultante es una buena representación de la MDD (Sneath y Sokal, 1973).

El detalle de los métodos y procedimientos de computación empleados en este trabajo pueden encontrarse en la bibliografía citada.

2.4.3. Red mínima ("Minimum Spanning Tree")

En base a la técnica desarrollada por Prim (1957) se puede construir partiendo de la MDD una red o retículo en la cual están representadas todas las OTU, y de tal modo que la suma de las distancias entre éstas es mínima.

Los puntos que representan las OTU están unidos en forma secuencial por segmentos cuya longitud representa la distancia entre dichas OTU, y sin que puedan existir lazos cerrados ("loops"). La longitud total del árbol o retículo resultante es la suma de las longitudes de los segmentos constituyentes (Pielou 1984).

En algunos casos el uso conjunto de esta técnica con métodos de ordenamiento puede evitar interpretaciones erróneas. Algunos autores han discutido este método y su utilización para establecer agrupamientos (Rohlf, 1973; Ross, 1969; Gower y Ross, 1969).

2.4.4. Análisis de Coordenadas Principales

El análisis de componentes principales (PCA) es un método de ordenamiento que permite encontrar el patrón de relaciones entre la totalidad de las OTU, facilitando la representación de éstas en función de los caracteres empleados, y sin gran pérdida de información (Crisci y López Armengol, 1983).

Sin embargo, el tipo de datos disponibles condiciona el uso de determinadas técnicas numéricas: en el caso del PCA, este método no puede utilizarse si la MBD contiene únicamente datos de tipo doble-estado (Crisci y López Armengol, 1983), por lo que sólo resulta

adecuado cuando se usan variables cuantitativas.

En el caso de variables de doble estado ausencia-presencia (que es la situación más frecuente en estudios quimiotaenómicos), o con variables cualitativas en general, resulta más apropiada la técnica de análisis numérico introducida por Gower (1966) denominada análisis de coordenadas principales.

Partiendo de una matriz de similitud, el análisis de coordenadas principales, a veces llamado PCO (Pielou, 1984), tiene como objetivo tratar de obtener una representación geométrica de las N OTU's en relación a una distancia razonablemente compatible con la similitud (Cuadras Avellana, 1981).

Al ser las variables dicotómicas, las OTU's no se pueden representar directamente como puntos de un espacio multidimensional. El método de Gower consiste en calcular una matriz de datos que defina una configuración de puntos en ese espacio R^N de manera que su distancia euclídea coincida o represente con la mejor aproximación la distancia entre ellas en la matriz de similitud.

En síntesis, lo que se hace es calcular las "coordenadas" para las OTU's en un espacio euclídeo multidimensional, compatibles con la distancia entre ellas (Cuadras Avellana, 1981).

A partir de los resultados obtenidos, las OTU's pueden ser representadas gráficamente en un espacio tridimensional proyectado en perspectiva (Moss, 1967; Rohlf, 1968), utilizando las coordenadas calculadas para las tres dimensiones que expresan la mayor variabilidad.

El PCO es en realidad un método métrico de análisis de proximidades (AP), técnica de análisis de datos que había sido introducida bastante antes por Torgerson (1952), y desarrollada por Sephard (1962) y Kruskal (1964). Sin embargo, como observa Gower (1966) el PCO es de cálculo mucho más sencillo que el AP, que exige la resolución de un largo proceso iterativo. Una comparación entre ambos métodos fue discutida por Gower (1971).

Las posibilidades del PCO como método de clasificación en biología han sido resaltadas por Blackith y Reyment (1971), Cuadras Avellana (1981), Pielou (1984) y otros.

El detalle de los métodos y procedimientos de computación empleados en este trabajo pueden encontrarse en la bibliografía citada.

2.4.5. Análisis Discriminante Paso a Paso

El análisis discriminante paso a paso, o SDA -por Stepwise Discriminant Analysis- (Jennrich y Sampson, 1983) es una técnica

de análisis numérico discriminante que permite estudiar la pertenencia de una dada OTU a uno de una serie de grupos preestablecidos. El proceso computacional, bastante complejo y largo, utiliza una serie de variables canónicas calculadas a partir de la matriz de datos y funciones discriminantes para contrastar la pertenencia a un grupo.

Las variables usadas en el procesamiento de las funciones de clasificación lineal son seleccionadas de forma escalonada. Esta selección es posible en ambos sentidos, hacia adelante o hacia atrás. En cada paso se considera la variable que permite una mejor separación de los grupos, es decir que en cada paso se incluye en la función discriminante la variable que agrega la máxima separación de los grupos (o bien la variable que aporta un mínimo es removida).

Las diferencias importantes entre los grupos van siendo establecidas por comparación: este proceso va guiando la selección de las variables subsiguientes.

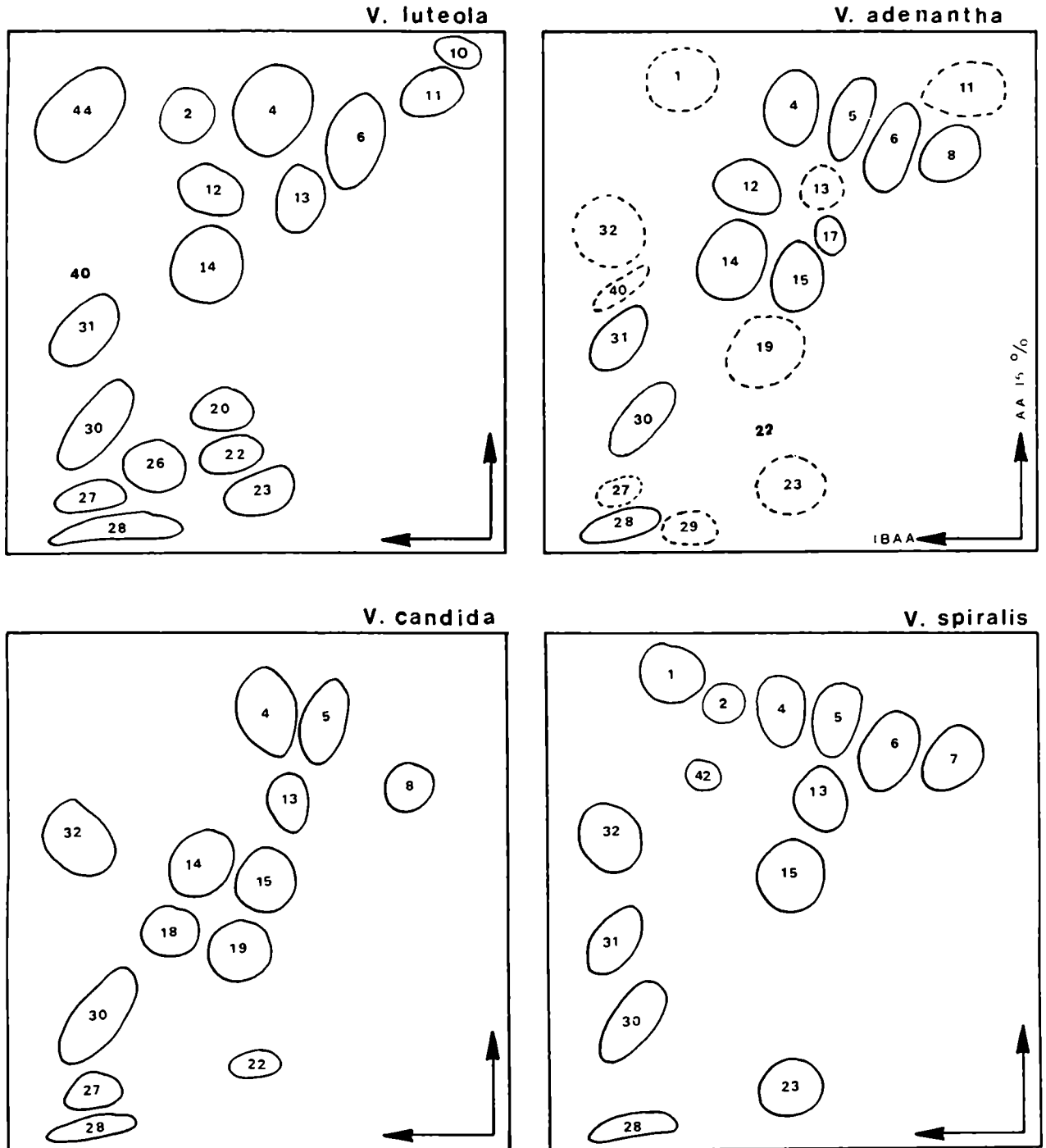
La clasificación de los grupos es evaluada y acumulada en una tabla de clasificación, y un proceso de corte-validación actúa en el programa para reducir el sesgo en la clasificación de los grupos. Los datos fueron procesados en el Instituto del Cálculo (FCEN-UBA) utilizando un computador VAX, empleando programas del BMDP Statistical Software Package (Dixon, 1983).

CAPITULO 3

RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.1. Perfiles cromatográficos de las especies estudiadas

3.1.1. Género *Vigna*



REFERENCIAS:



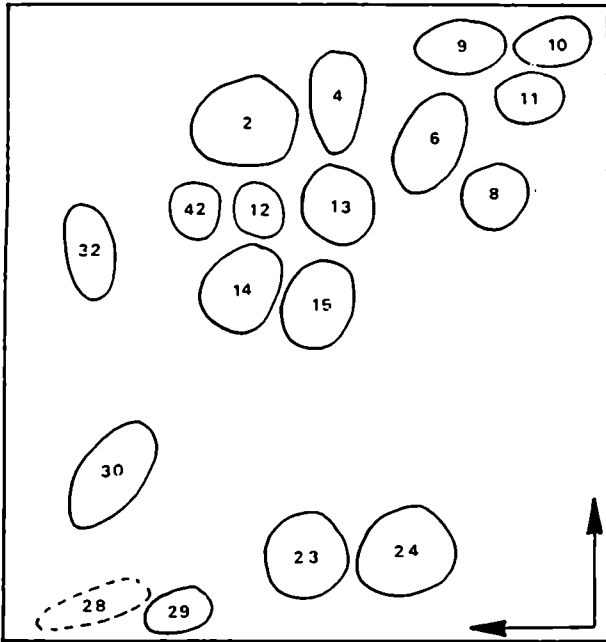
PRESENCIA MAYOR AL 59 %



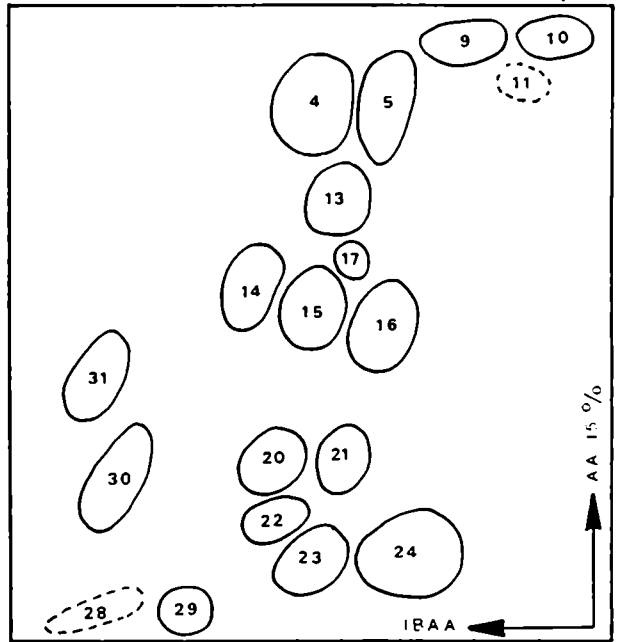
PRESENCIA ENTRE 59 Y 25 %

PRESENCIA MENOR AL 25 %

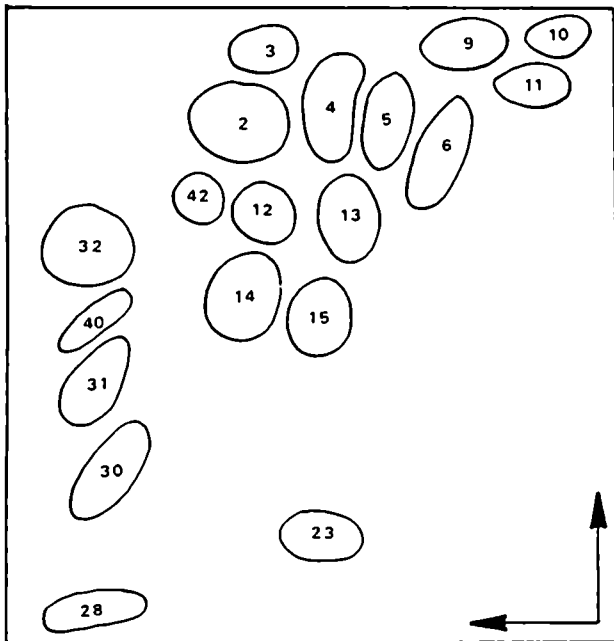
V. longifolia



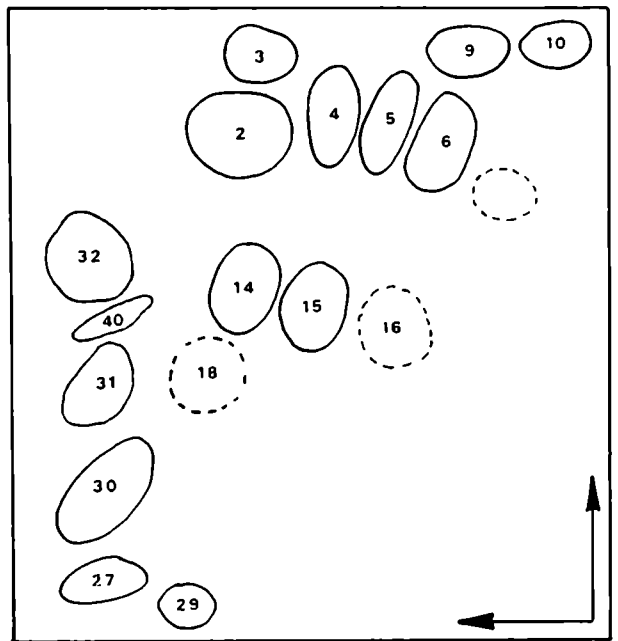
V. lasiocarpa



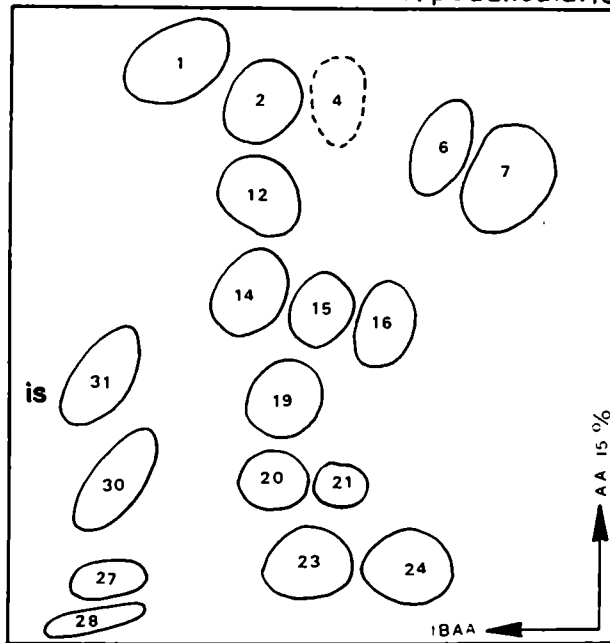
V. hookerii



V. caracalla

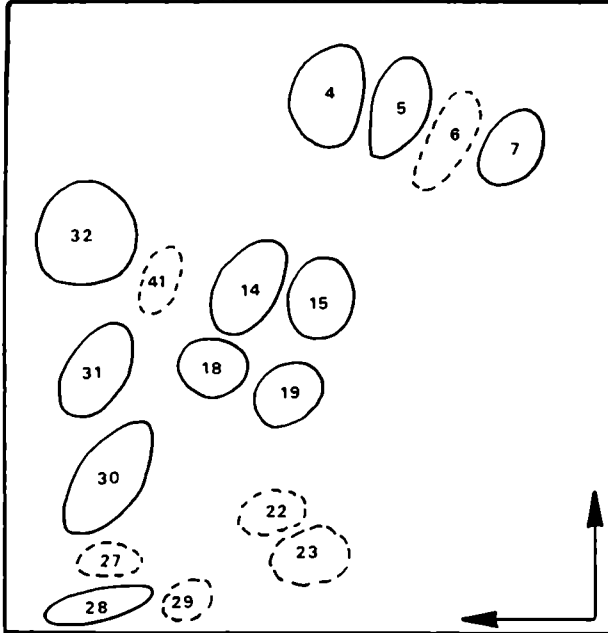


V. peduncularis

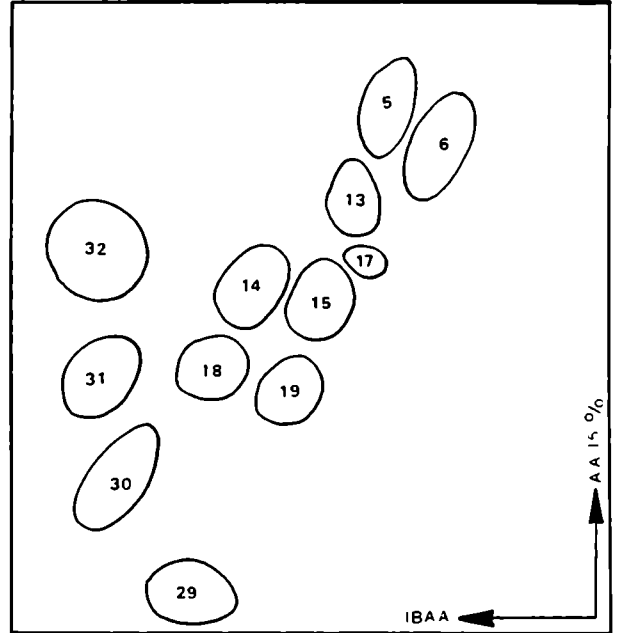


3.1.2. Géneros *Phaseolus* y *Dolichopsis*

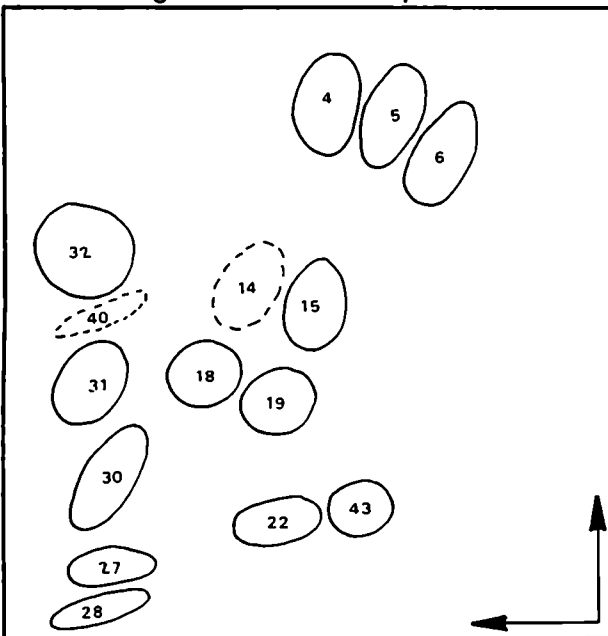
P. vulgaris var. *aborigineus*



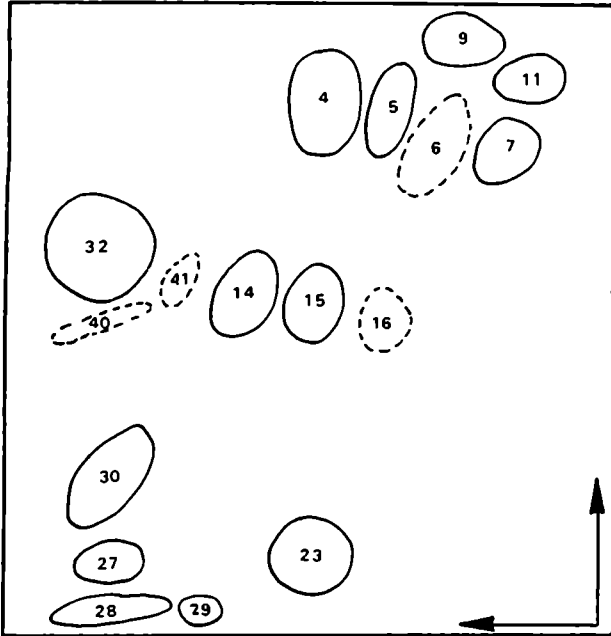
P. vulgaris «forma Merlo»



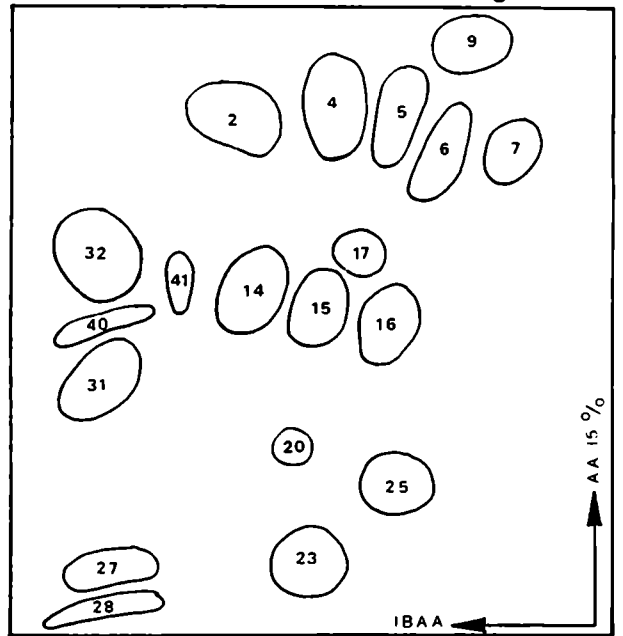
P. vulgaris «cultivares primitivos»



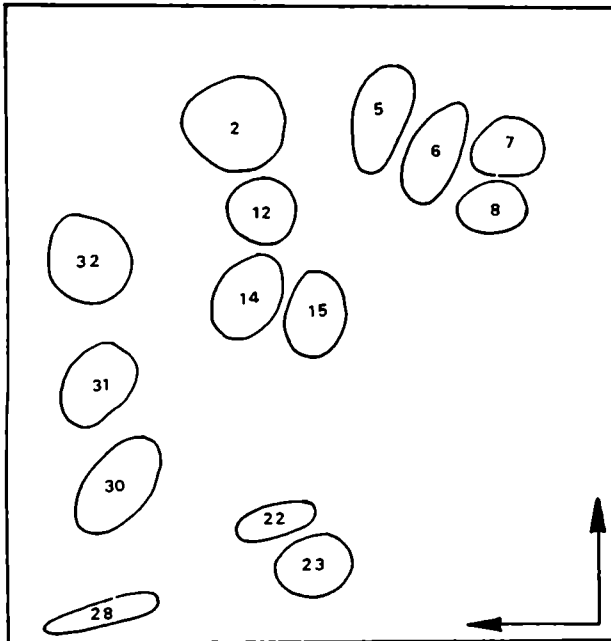
P. lunatus



P. augustii

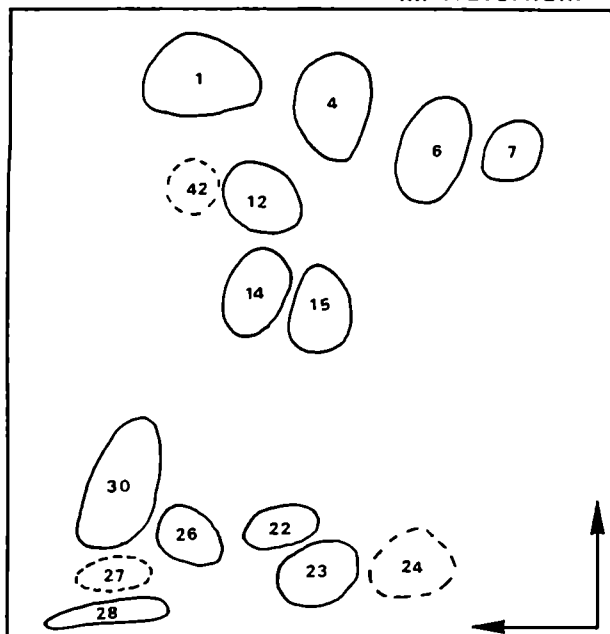


Dolichopsis paraguariensis

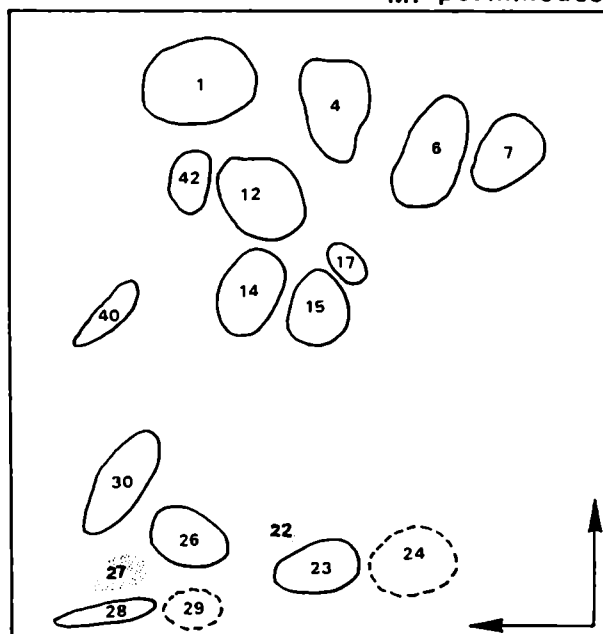


3.1.3. Género *Macroptilium*

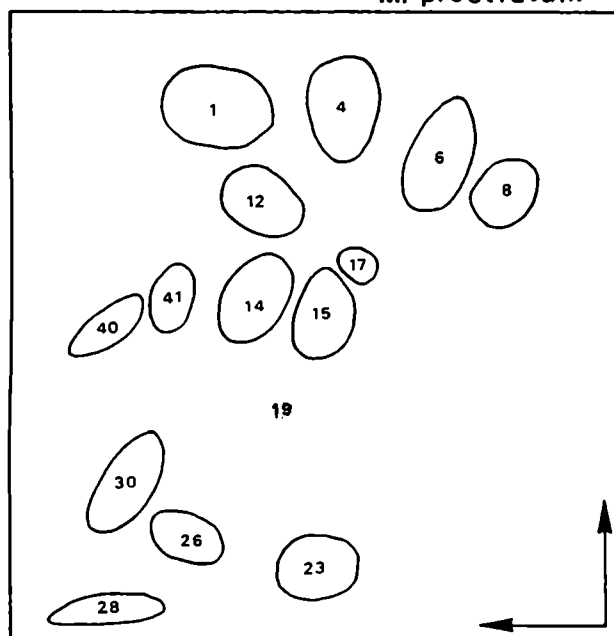
M. fraternum



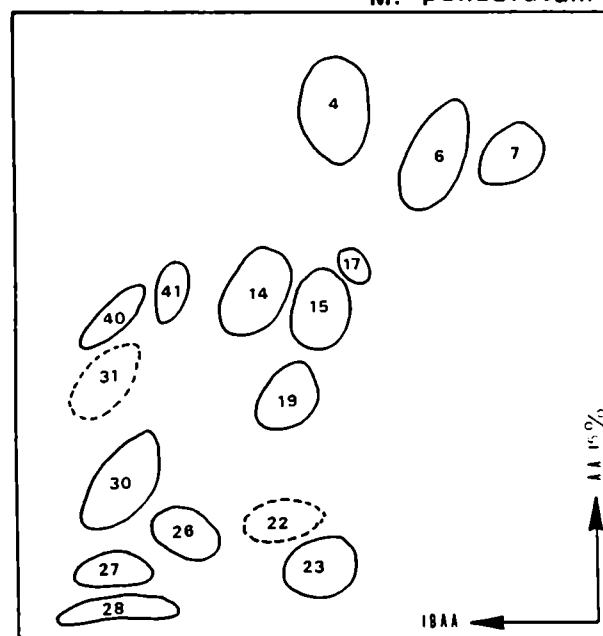
M. psammodes



M. prostratum



M. panduratum



REFERENCIAS:



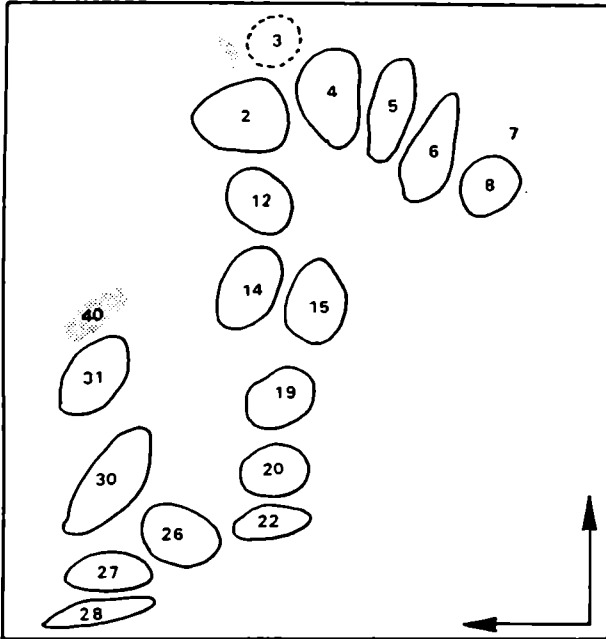
PRESENCIA MAYOR AL 59 %



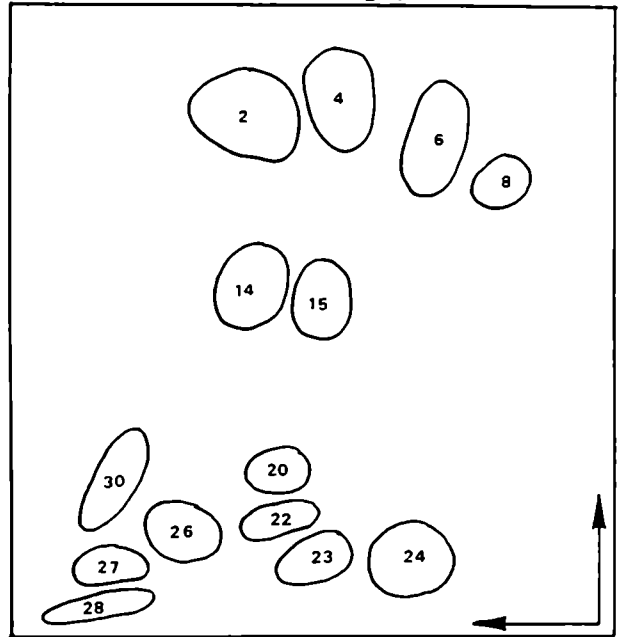
PRESENCIA ENTRE 59 Y 25 %

PRESENCIA MENOR AL 25 %

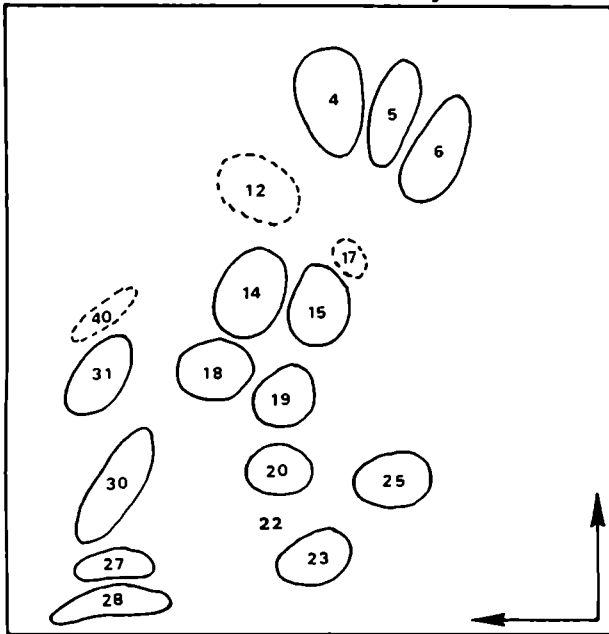
M. bracteatum



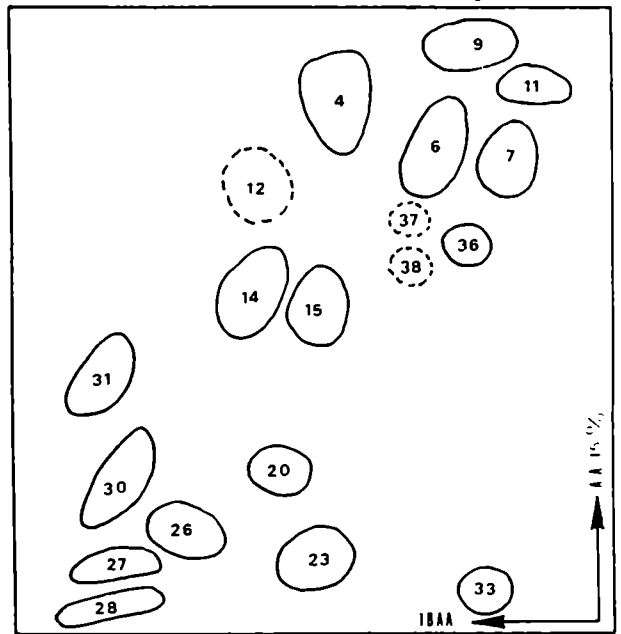
M. longepedunculatum



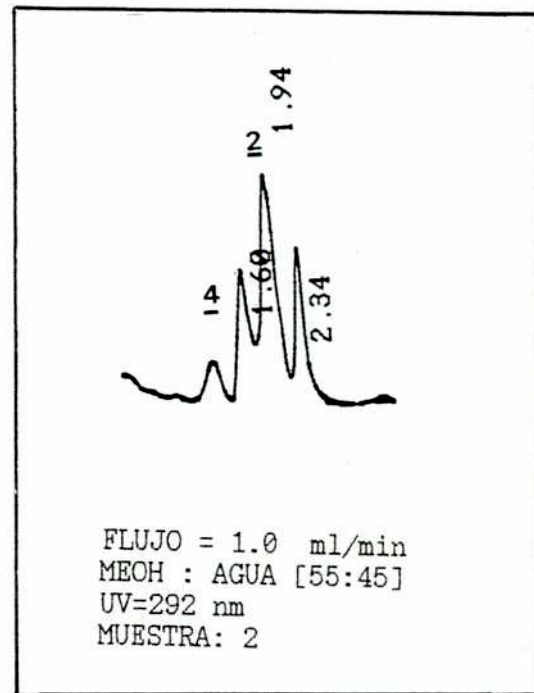
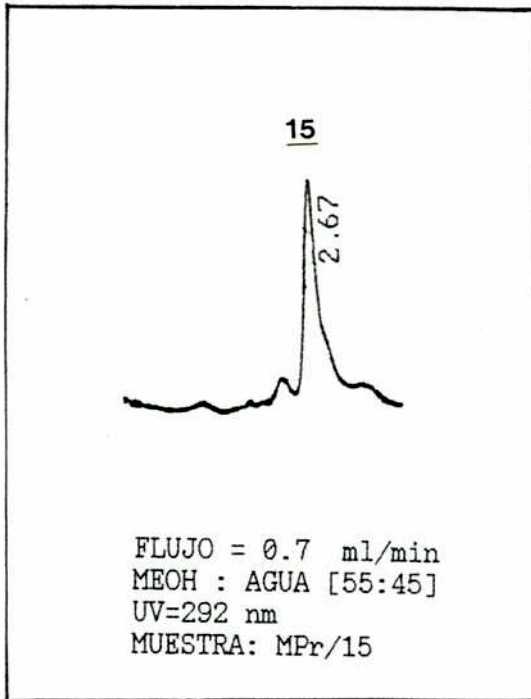
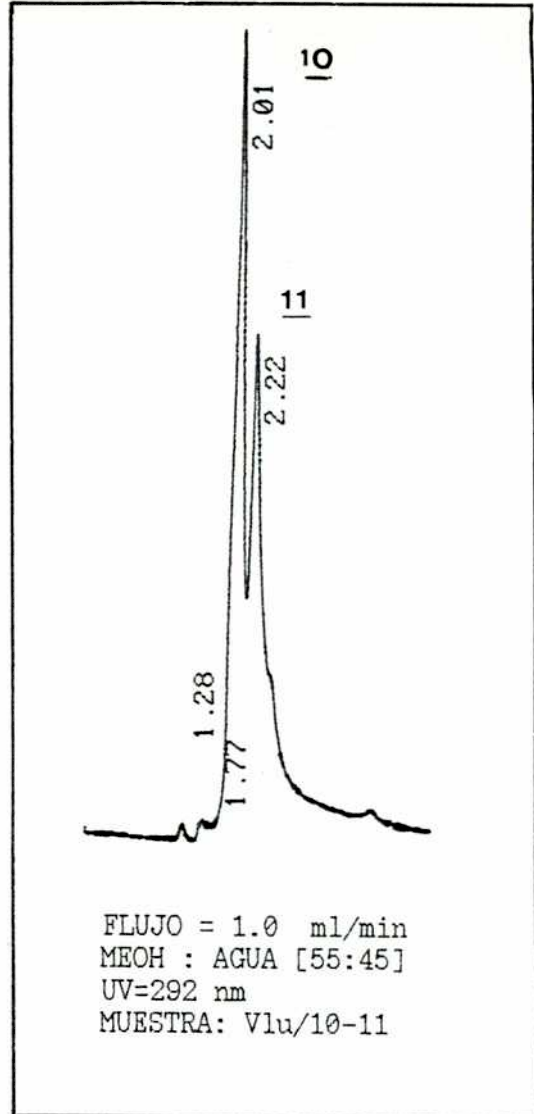
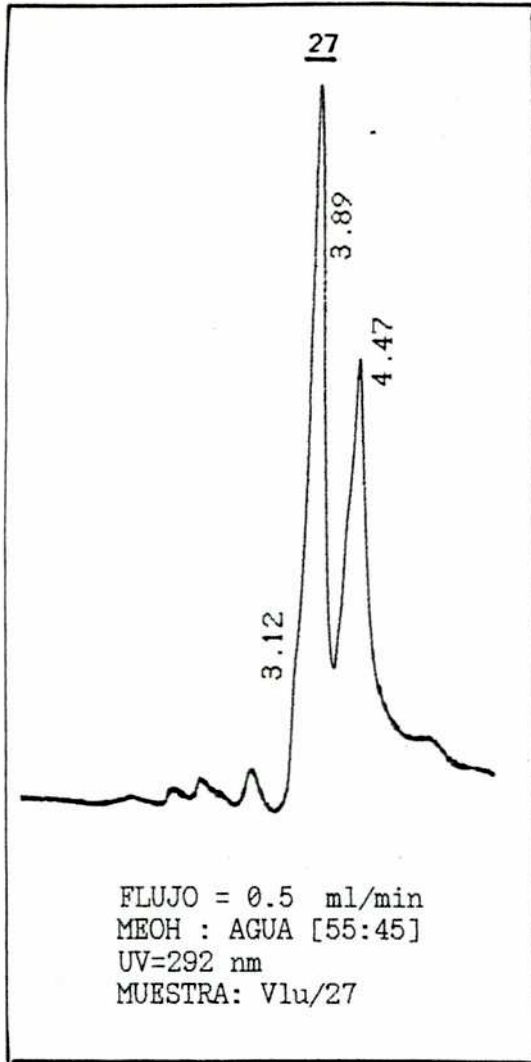
M. erythroloma

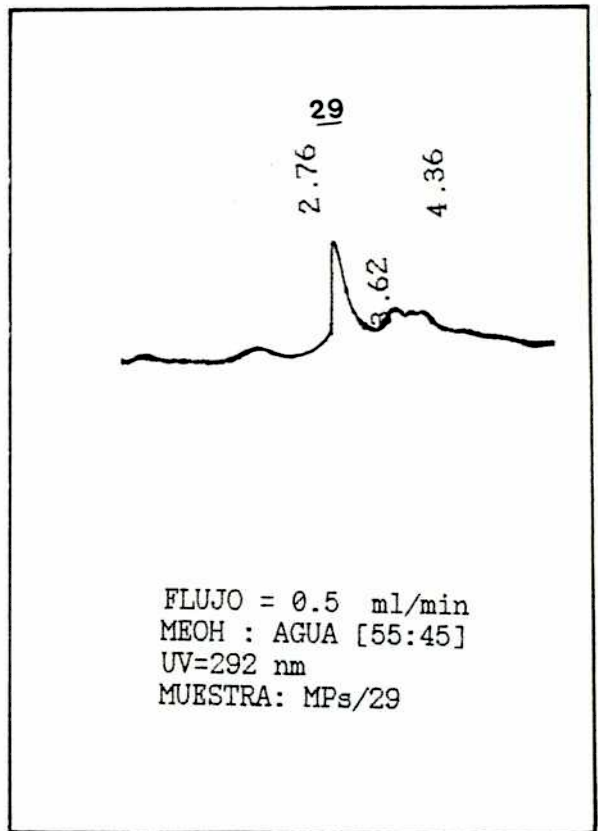
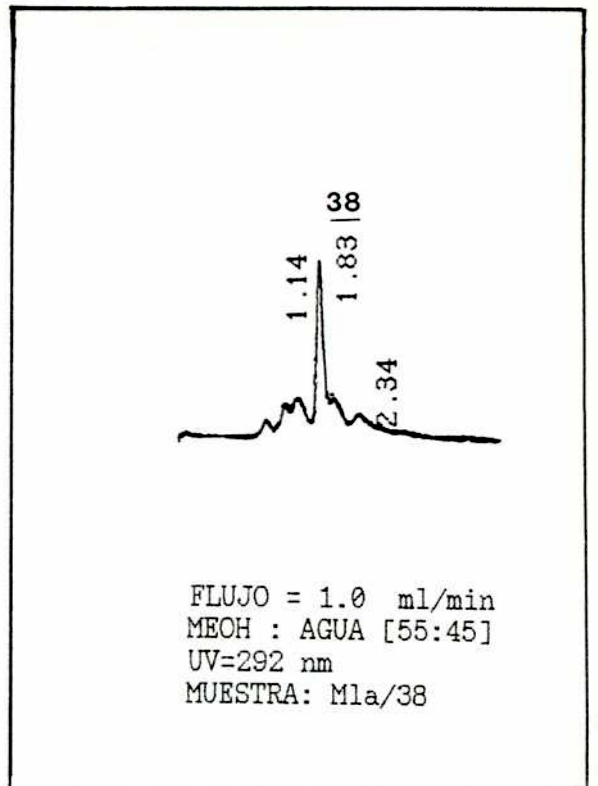
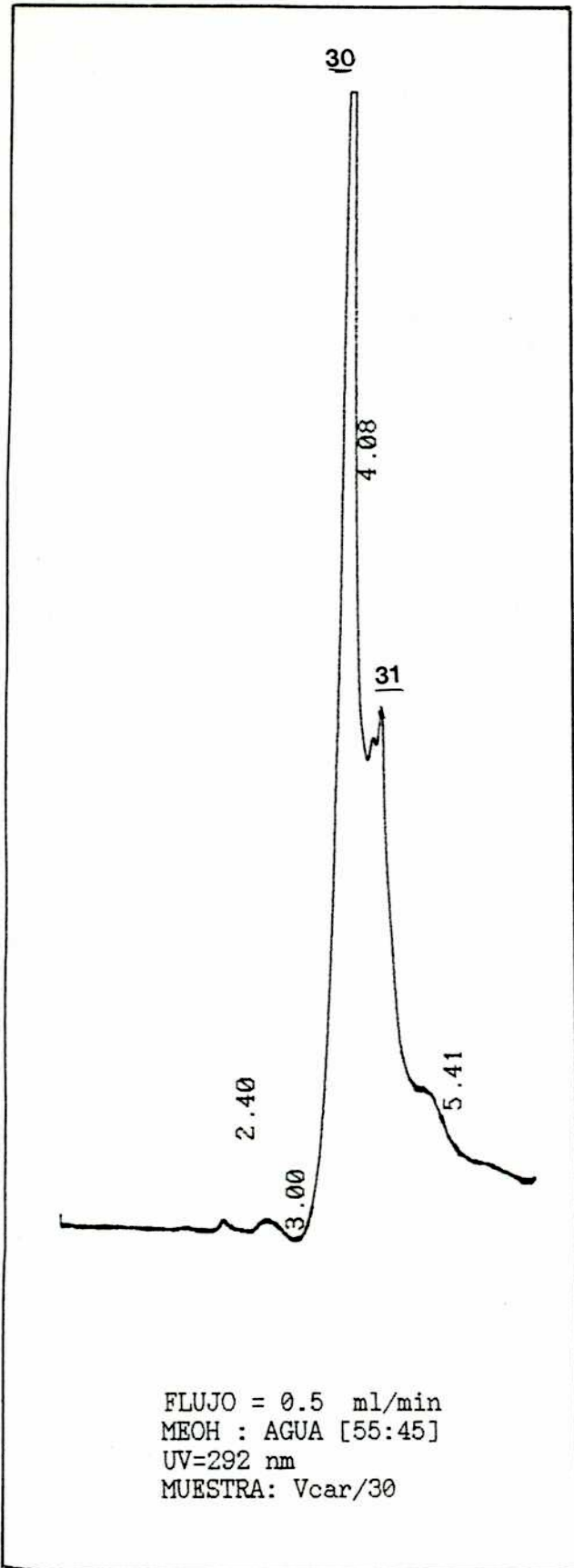


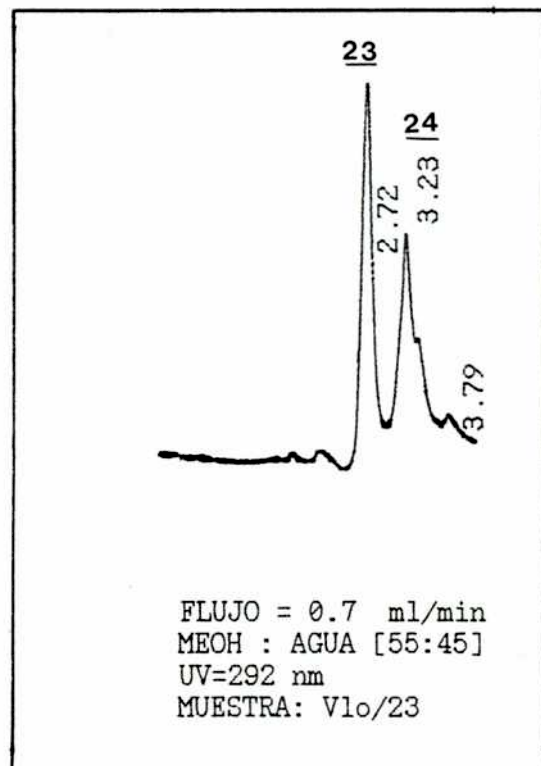
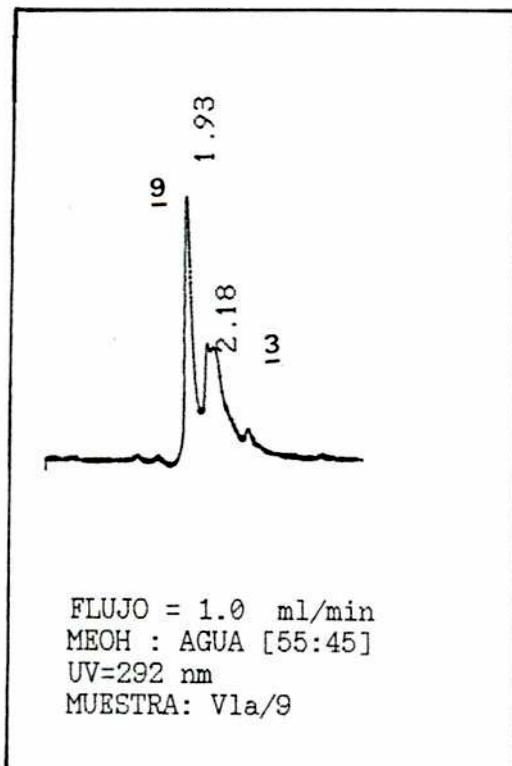
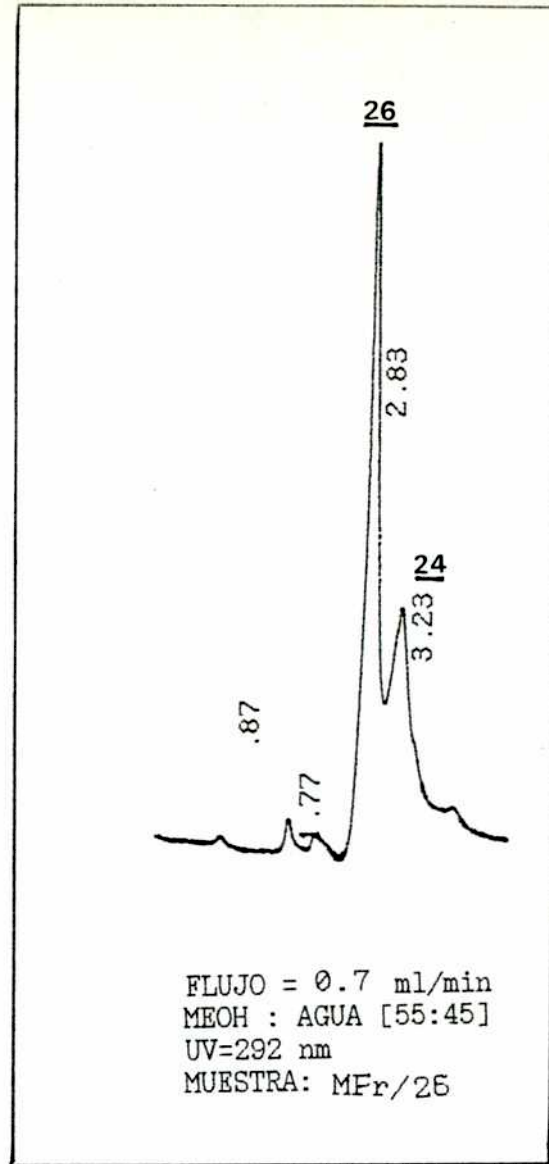
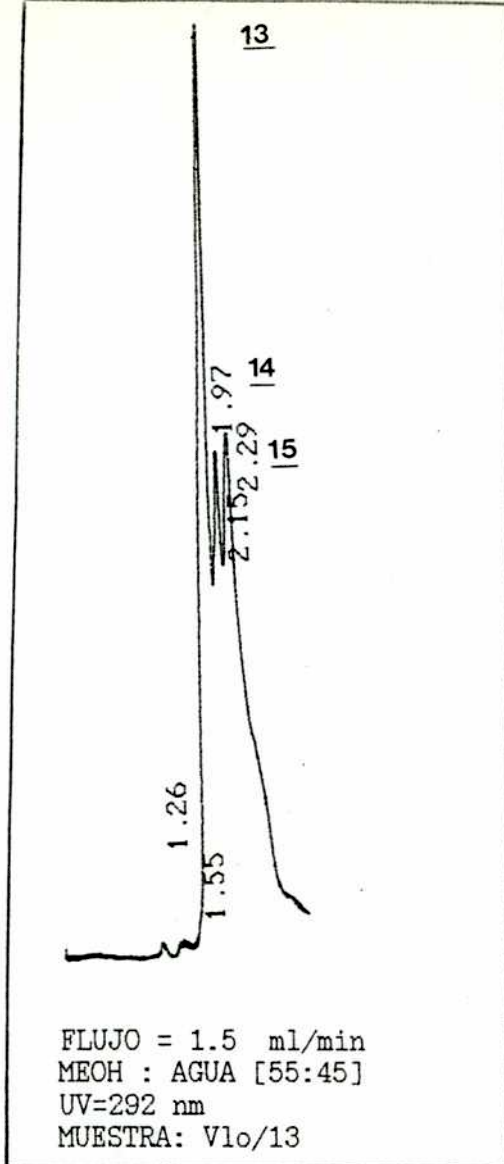
M. lathyroides

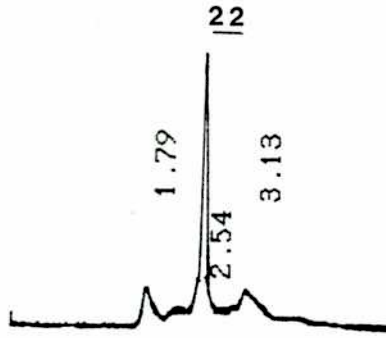


3.1.4. CLAR: cromatogramas de los flavonoides aislados mediante cromatografía en papel eluidos en MeOH

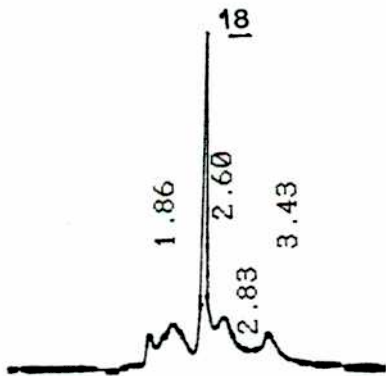




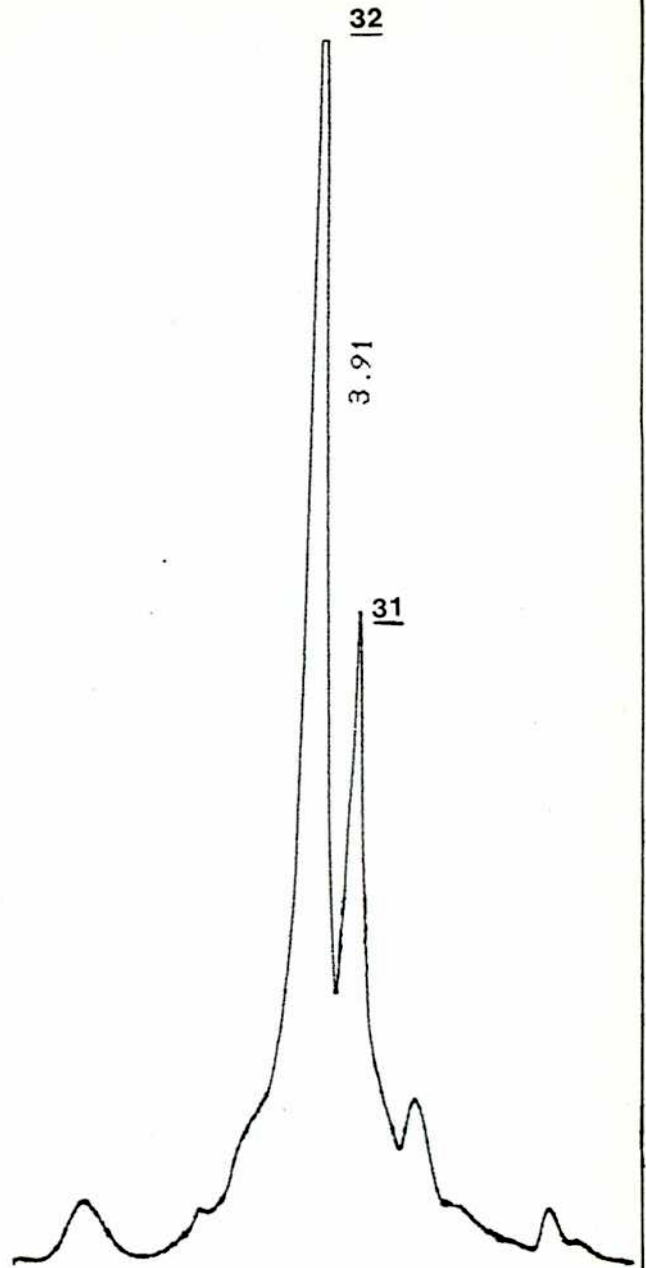




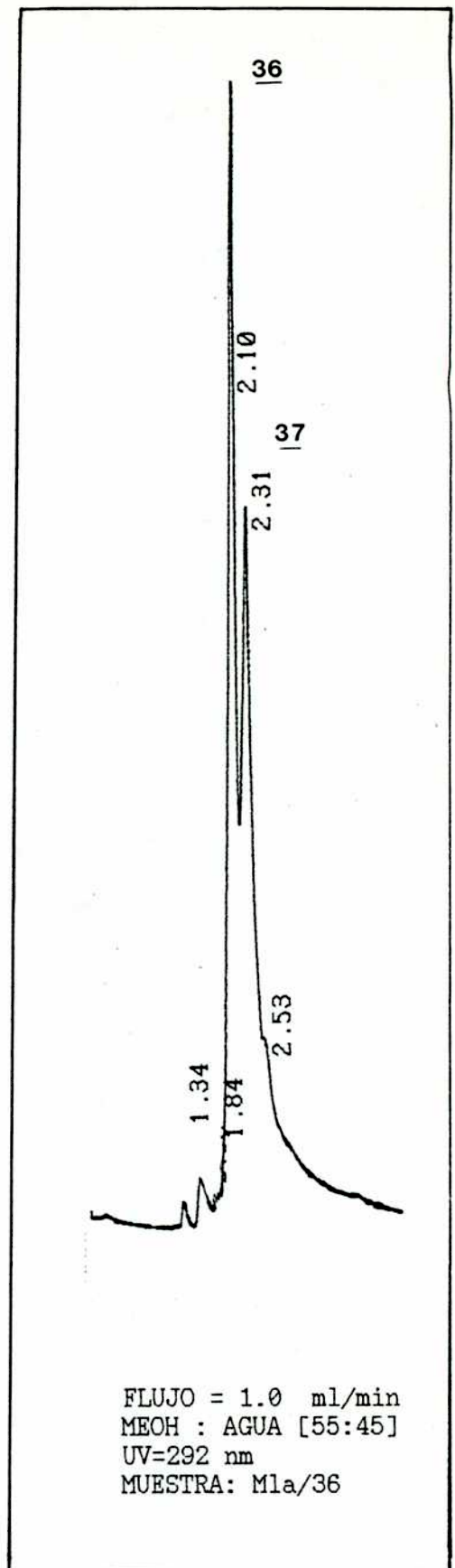
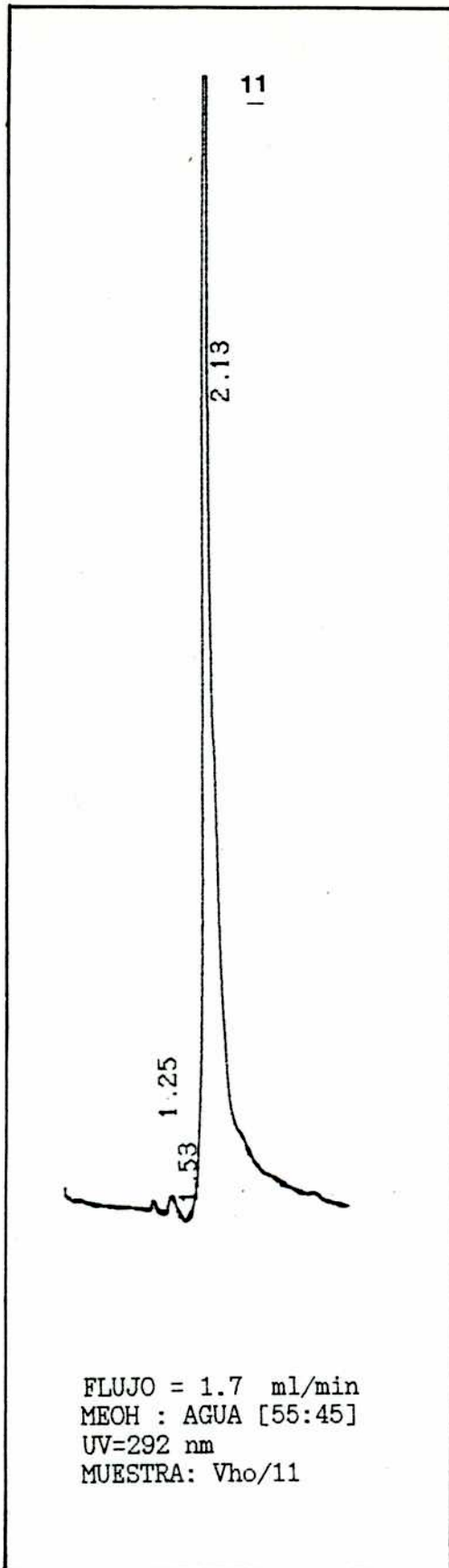
FLUJO = 0.7 ml/min
 MEOH : AGUA [55:45]
 UV=292 nm
 MUESTRA: Vlu/22

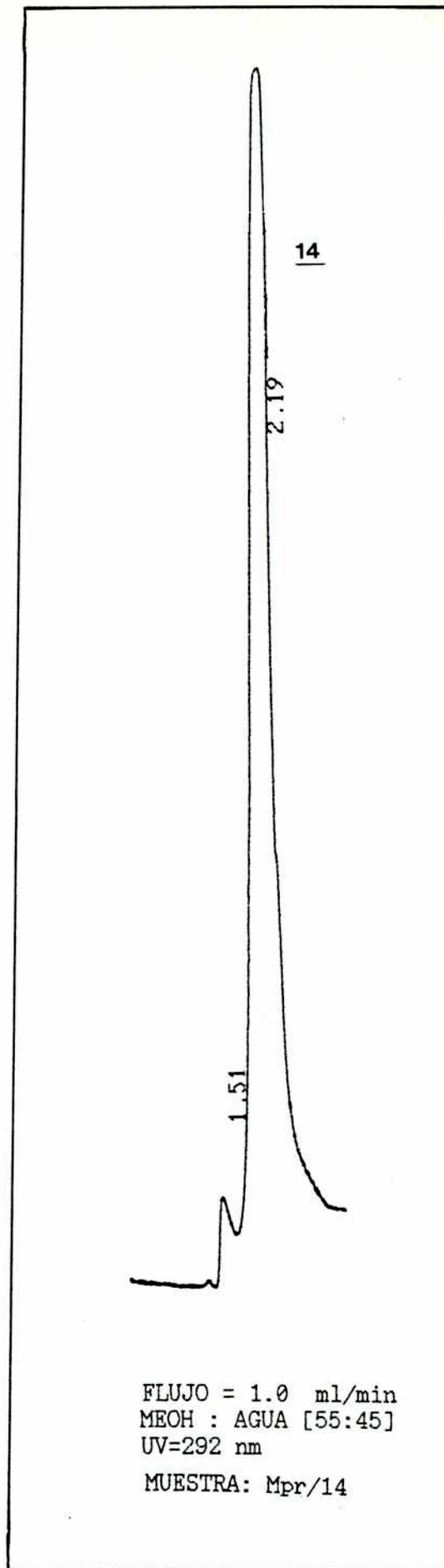
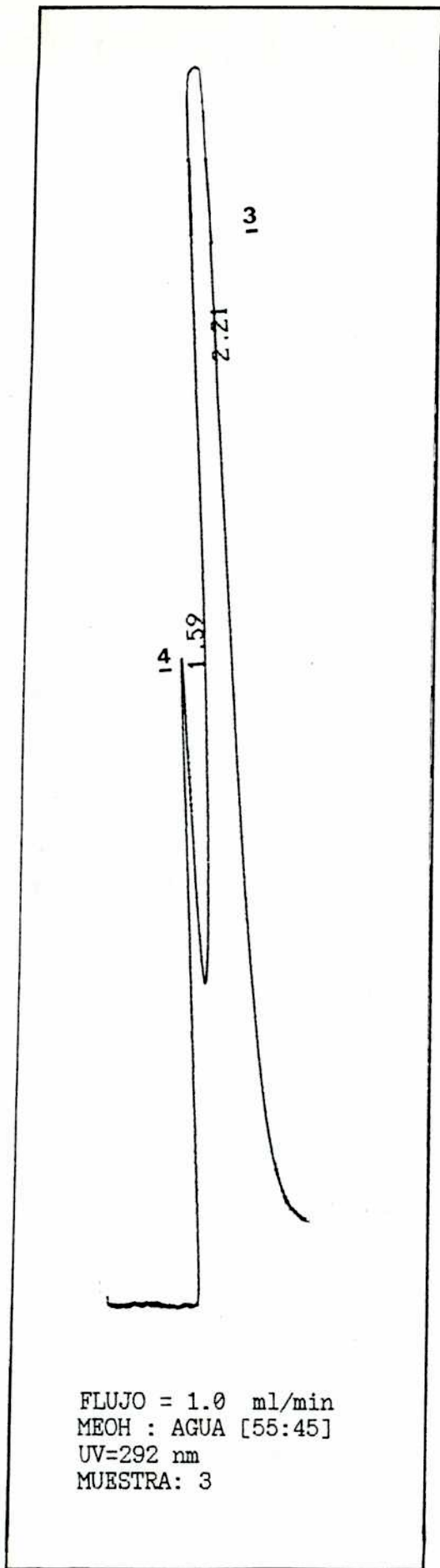


FLUJO = 0.7 ml/min
 MEOH : AGUA [55:45]
 UV=292 nm
 MUESTRA: MEr/18



FLUJO = 0.5 ml/min
 MEOH : AGUA [55:45]
 UV=292 nm
 MUESTRA: Pab/32





3.1.5. Características cromatográficas

FLAVONOIDE	CPLL BIDIMENSIONAL				CLAR	
	No	Rf1 x100	Rf2 x100	UV/ NH3	tR min	CON DIC
CANFEROL-3-RUT-7-GLUR	1	70	89	VA	1.49	C
CANFEROL-3-diGLU-7-GLU	2	60	82	A	1.94	D
CANFEROL-3-triGLU-7-RAM	3	56	93	A	2.21	D
CANFEROL-3-ROB-7-RAM	4	45	84	A	5.51	A
QUERCETINA-3-SOFOROSIDO	5	56	82	Vb	2.11	D
QUERCETINA-3-ROB-7-RAM	6	29	75	A	1.32	C
QUERCETINA-3-GLU-7-RUT	7	17	78	A	2.51	D
QUERCETINA-3-diGLU	8	17	74	VA	2.93	D
QUERCETINA-3,7-diGLUR	9	23	92	A	1.93	D
CANFEROL-3-ISO-7-RAM	10	8	93	AP	7.51	A
CANFEROL-3-ISO	11	14	86	AP	10.8	A
CANFEROL-3-XILGLU	12	56	68	Vb	1.45	C
4',7-DIHIIDROXIFLAVONA-7-O-RAMGLU	13	43	67	VA	1.97	C
CANFEROL-3-RUT	14	58	53	A	2.19	D
QUERCETINA-3-RUT	15	49	51	A	2.67	E
QUERCETINA-3-GENCIOSIDOSO	16	38	48	A	3.14	E
ISORAMNETINA-3-RUT	17	42	56	BA	2.15	E
ISORAMNETINA-3-GAL	18	65	42	A	2.60	E
QUERCETINA-3-GAL	19	54	39	A	3.29	E
APIGENINA-7-GLU	20	54	29	Ap	11.1	B
MIRICETINA-3-GLU	21	46	26	Ap	3.11	E
ACACETINA-7-GAL (?)	22	53	18	Vi	2.54	E
LUTEOLINA-7-GAL	23	48	13	Ap	2.72	E
QUERCETINA-7-GLU	24	32	11	Ap	3.23	E
CANFEROL-7-GLURAM	25	35	24	Ap	2.53	E
CANFEROL-7-RAM	26	70	16	Ap	2.83	E
QUERCETINA-3-OMe	27	83	9	V	3.89	F
DIOSMETINA	28	82	4	ViC	4.01	F
CANFEROL-3-OMe	29	70	3	VA	2.76	F
3-HIDROXI-4'-METOXIFLAVONA	30	81	19	V	4.08	F

FLAVONOIDE	Nº	RF1 x100	RF2 x100	UV/ NH ₃	tR min	CON DIC
QUERCETAGETIN-5-pentametil-ETER	31	84	40	V	4.31	F
GARBANZOL	32	28	40	AV	3.91	F
QUERCETINA-3,7-diGLU	36	25	62	A	2.10	D
QUERCETINA-3-GLU-7-RAM	37	34	65	A	2.35	D
QUERCETINA-3-RAMdiGLU	38	33	57	A	1.89	D
IRIGENINA	40	84	49	Vi	1.99	D
Flavanona no identificada	41	73	54	BV	3.67	D
DAIDZEINA 7-GLU	42	66	70	Vi	3.71	D
LUTEOLIN 7-GLU	43	43	19	AB	10.5	B
FLAVANONOL (?)	44	86	83	PA	----	--
7-HIDROXI-ISOFILAVONA	IS	90	40	Az	----	--

REFERENCIAS:

Color al UV/NH₃:

A= amarillo ; Az= azul ; B= blanco ; C= celeste ; Na= naranja ;
P= pardo ; V= verde ; Vi= violeta [b=brillante; p=pálido]

Glicósidos sustituyentes:

GAL= galactosa ; GLU= glucosa ; GLUR= ac. glucurónico;
ISO= isoramninósido; RAM= ramnosa; ROB= robinobiósido;
RUT= rutinósido; XIL= xilosa

Condiciones de CLAR [CONDIC]

	FASE FIJA					
	Columna	long (cm)	φ (mm)	MeOH (%)	H ₂ O (%)	FLUJO (ml/min)
A	μBondapack	30	10	55	45	1.50
B	RP-18			58	42	1.50
C				55	45	1.50
D	Spherisorb	25	4.6	55	45	1.00
E	RP-18			57	43	0.70
F				57	43	0.50

3.1.6. Determinación de los productos de hidrólisis ácida

Agliconas

	TLC (R_f)		CLAR (T_R)
	A	B	minutos
CANFEROL	0.402	0.851	6.04
QUERCETINA	0.238	0.601	7.59
APIGENINA	0.462	0.875	6.37
LUTEOLINA	0.343	0.675	7.63
ACACETINA	0.731	0.925	----

Referencias

TLC : eluyente MeOH : CH₂ Cl₂ [A= 94 : 6 ; B= 90 : 10];
soporte: placas de vidrio; adsorbente: gel de sílice tipo G

CLAR : Cromatógrafo KONIK KNK-500-A, columna Spherisorb
analítica, RP-C 18 ; fase móvil= MeOH : H₂O [6 : 4],
flujo= 1.5 ml/min; detector UV onda variable a 292 nm.

Monosacáridos

Se utilizaron placas para HPTLC de celulosa sobre vidrio. Fase
móvil = Butanol : Piridina : H₂O [6 : 4 : 3]

	HPTLC-Celulosa (R_f)
ACIDO GLUCURONICO	0.556
ARABINOSA	0.482
GALACTOSA	0.347
GLUCOSA	0.407
MANOSA	0.635
RAMNOSA	0.690
XILOSA	0.526

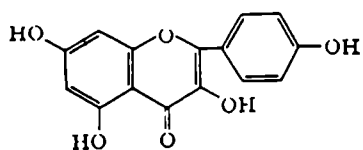
3.2. Flavonoides presentes en las especies argentinas de la subtribu Phaseolinae

3.2.1. Flavonoles

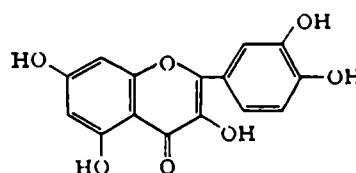
Este grupo de compuestos constituye el de mayor frecuencia relativa en el grupo. No se hallaron agliconas libres en ninguna de las especies estudiadas, estando la mayor parte de los flavonoles formando glicósidos, un hecho muy frecuente en las Leguminosas (Harborne, 1971a). Las principales agliconas resultaron la quercetina y el canferol, las dos más características de este grupo (Harborne, 1971a) encontrándose otros flavonoles minoritarios como la miricetina o la isoramnetina (un derivado de la quercetina metilado en la posición 3' del anillo B) formando algunos glicósidos.

Varios de estos flavonoides ya fueron reportados para especies de Phaseolinae o en otras leguminosas.

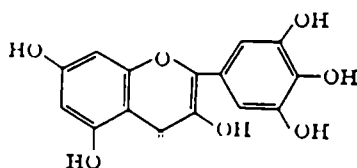
La robinina (4) aislada de *Robinia pseudoacacia* (tribu Galegae) había sido encontrada en *P. vulgaris* (Harborne, 1967) y *Vigna* (Ishikura et al., 1981). Del mismo modo existen referencias en la bibliografía para la quercetina-3-glucurónido y otros 3,7-O-glicósidos en *Phaseolus* (Harborne, 1971a) y otras leguminosas como *Pisum* (Harborne 1971a) o *Baptisia* (Markham y Mabry, 1968). La presencia de canferol-3-rutinósido (14), de rutina (15) y de canferol-7-ramnósido (26) ya había sido descripta para el género *Vigna* (Ishikura et al., 1981).



CANFEROL

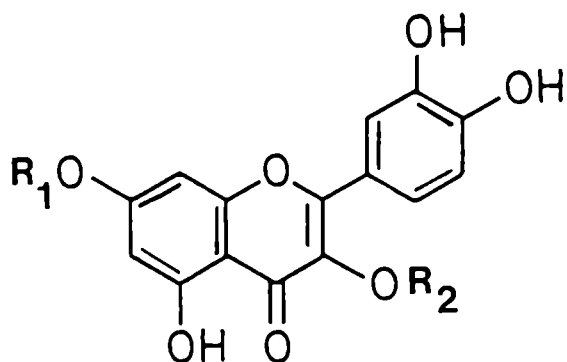


QUERCETINA

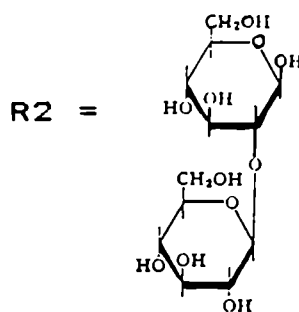


MIRICETINA

3.2.1.1. Glicósidos de quercetina



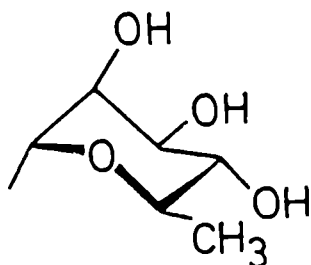
5) R₁ = H



SOFOROSIDO

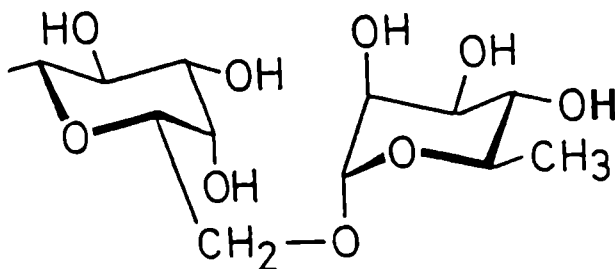
QUERCETINA-3-O-[β-D-GLUCOPIRANOSIL-(1→2)-O-D-GLUCOPIRANOSIDO

6) R₁ =



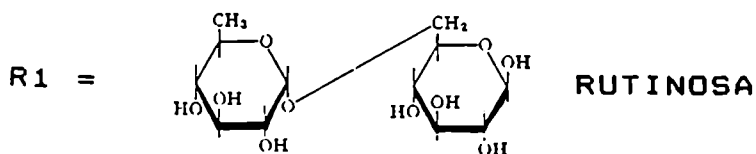
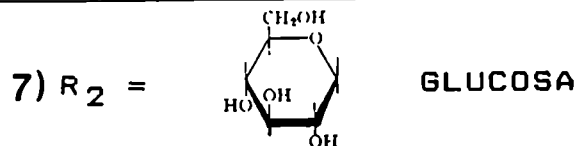
RAMNOSA

R₂ =



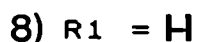
ROBINOBIOSIDO

QUERCETINA-3-[β-D-GALACTOPIRANOSIL-(1→6)-O-α-L-RAMNOPIRANOSIDO]-7-O-α-L-RAMNOPIRANOSIDO



QUERCETINA-3-O-β-D-GLUCOPIRANOSIDO-7-O-[α-L-RAMNOPIRANOSIL-(1→6)-D-GLUCOSIDO]

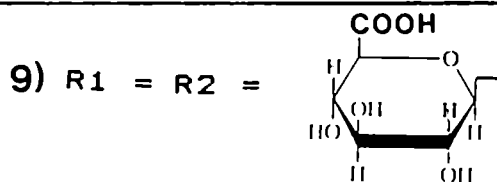
UV (λ_{max}; nm)= MeOH 258, 266(h), 356; MeONa: 253, 262, 268, 405; AlCl₃: 272, 300, 353, 410; /HCl: 270, 310, 355, 385; AcONa: 259, 369; /H₃B₃O₃: 265, 255, 370.



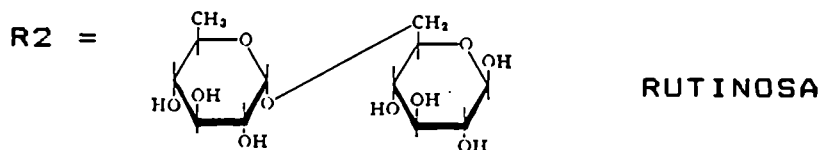
R₂ = **GLUCOSA-GLUCOSA**

UV (λ_{max}; nm)=
MeOH: 256, 272(h), 359

QUERCETINA-3-O-β-D-diGLUCOPIRANOSIDOSIDO



QUERCETINA-3,7-O-β-D-diGLUCURONICO

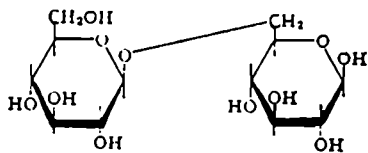


QUERCETINA-3-O-[α-L-RAMNOPIRANOSIL-(1→6)-D-GLUCOPIRANOSIDO] (= RUTINA)

UV (λ_{max}; nm)= MeOH: 257, 266(h), 305 (h), 360

16) R1 = H

R2 =

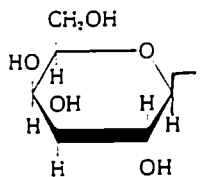


GENCIOBIOSIDO

QUERCETINA-3-O-[β -D-GLUCOPIRANOSIL-(1 \rightarrow 6)-D-GLUCOPIRANOSIDO]

19) R1 = H

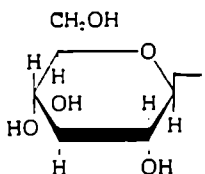
R2 =



QUERCETINA-3-O- β -D-GALACTOPIRANOSIDO

UV (λ max; nm) = MeOH: 257, 361

24) R1 =



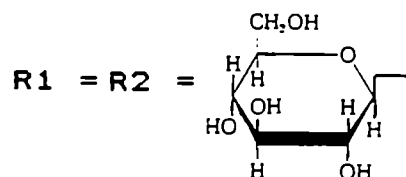
GLUCOSA

R2 = H

QUERCETINA-7-O- β -D-GLUCOPIRANOSIDO

UV (λ max; nm) = MeOH: 258, 374

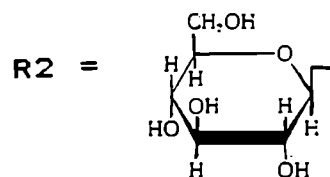
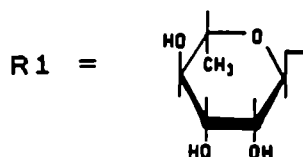
36)



QUERCETINA-3,7-O-β-D-diGLUCOPIRANOSIDO

UV (λ max; nm) = MeOH: 256, 268(h), 356; MeONa: 268, 300(h) 400; AlCl₃: 274, 300 (h), 340, 420; /HCl: 270; 300(h), 400 AcONa: 262, 300(h), 372; /H₃BO₃: 262, 378.

37)



QUERCETINA-3-O-β-D-GLUCOPIRANOSIDO-7-O-α-L-RAMNOPIRANOSIDO

UV (λ max; nm) = MeOH: 258, 268(h), 360; MeONa: 244, 272(h), 400 AlCl₃: 274, 300(h), 353, 420; /HCl: 270; 301(h), 360, 400 AcONa: 258, 301(h), 368; /H₃BO₃: 260, 378

38)

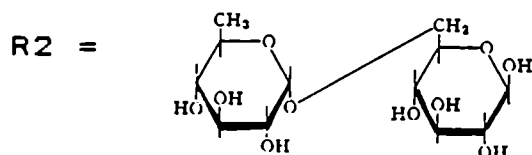
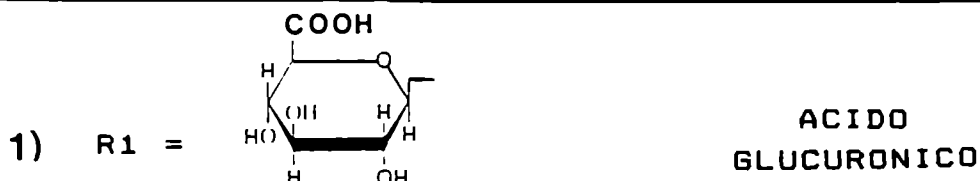
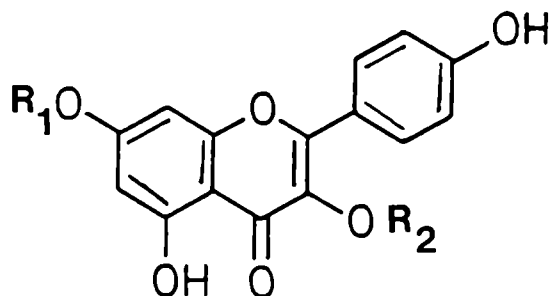
R1 = H

R2 = RAMNOSA-GLUCOSA-GLUCOSA

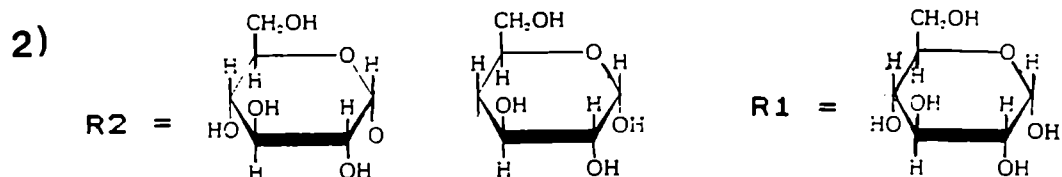
QUERCETINA-3-O-α-L-RAMNOPIRANOSIL-DIGLUCOPIRANOSIDO

UV (λ max, nm) = MeOH: 258, 268(h), 302(h), 358

3.2.1.2. Glicósidos de canferol

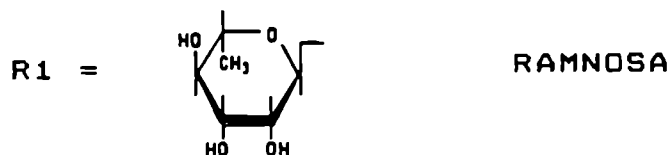


CANFEROL-3-O-β-RUTINOSIDO-7-O-β-D-GLUCURONICO



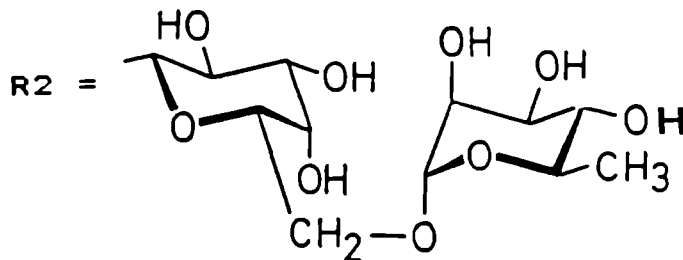
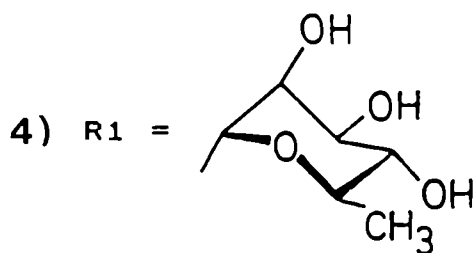
CANFEROL-3-O-β-D-diGLUCOPIRANOSIDO-7-O-β-D-GLUCOPIRANOSIDO

3) R2 = **GLUCOSA-GLUCOSA-GLUCOSA**



CANFEROL-3-O-β-D-triGLUCOPIRANOSIDO-7-O-α-L-RAMNOPIRANOSIDO

UV (λ max; nm) = MeOH: 244(h), 265, 352; MeONa: 245, 272, 302(h), 390; AlCl₃: 254 (h), 272, 300(h), 400; /HCl: id.; AcONa: 268, 358; /H₃BO₃: 265, 352



CANFEROL-3-O-[β -D-GALACTOPIRANOSIL (1 \rightarrow 6)-O- α -L-RAMNOPIRANOSIDO]-7-O- α -L-RAMNOPIRANOSIDO

ESPECTROSCOPIA UV CON REACTIVOS DE DESPLAZAMIENTO

METANOL	METOXIDO DE SODIO	Cl ₃ Al	+HCl	ACETATO DE SODIO	+H ₃ BO ₃
244 nm(h)	245 nm	254 nm	254 nm		
265 nm	272 nm	273 nm	273 nm	265 nm	264 nm
320 nm(h)	302 nm	300 nm	300 nm		
350 nm	390 nm	400 nm	400 nm	357 nm	351 nm

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

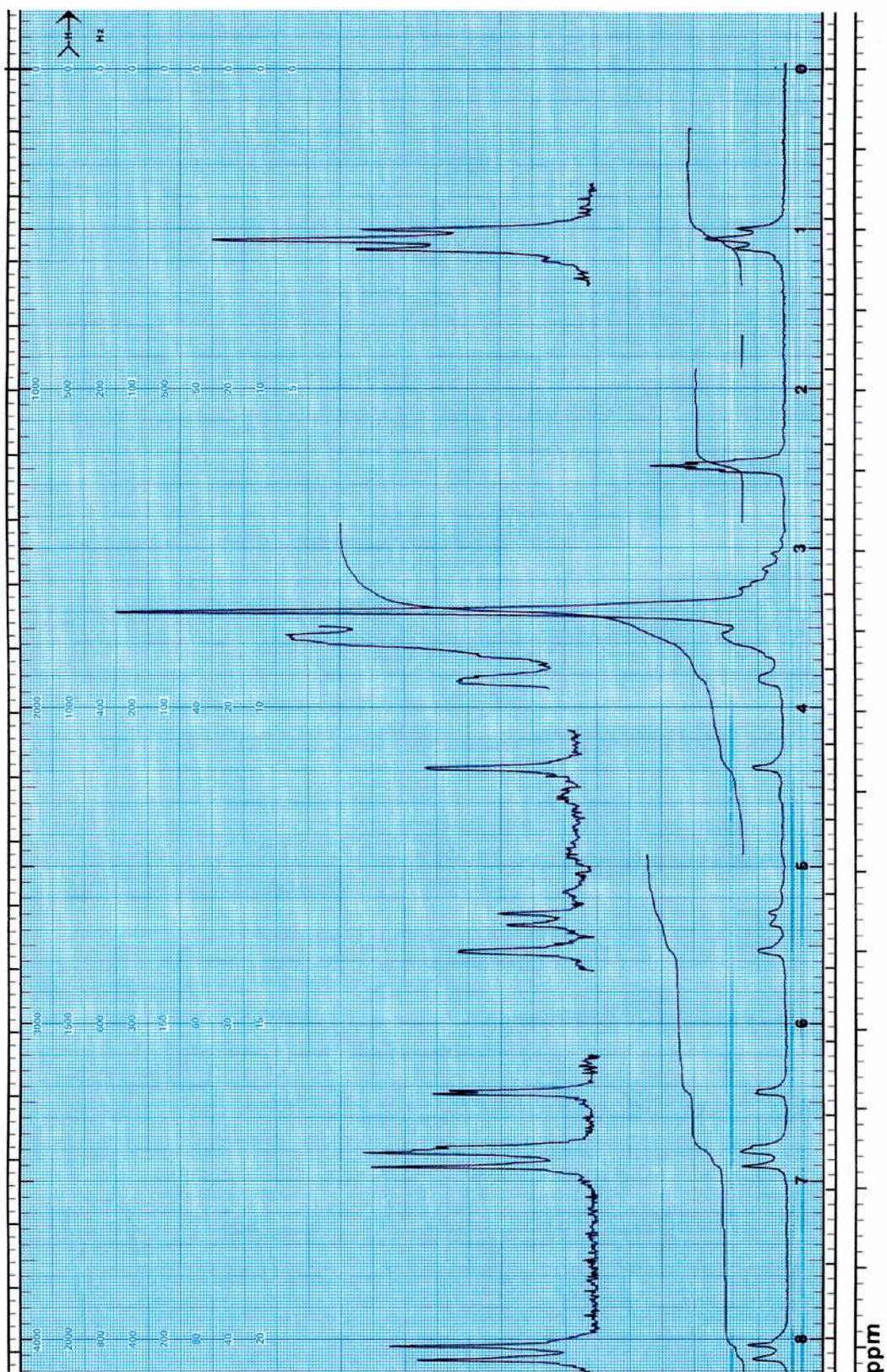
¹H

d(ppm)	multiplicidad	asignación
1.10	3 H, m	H-6(ramnosa)
4.35	1 H, d J=1,5Hz	H-1(ramnosa)
5.32	1 H, d J=7 Hz	H-1(galactosa)
5.54	1 H, d J=1,5Hz	H-1(ram.C-7)
6.43	1 H, d J=2 Hz	H-6'
6.79	1 H, d J=2 Hz	H-8
6.83	2 H, d J=8 Hz	H-3' y H-5'
8.10	2 H, d J=8 Hz	H-2' y H-6'

¹³C

ppm	asignación	ppm	asignación
177.3	C-4	71.7	C-4 ram
161.3	C-7	71.4	C-2 gal
160.6	C-5	70.9	C-3 ram
159.8	C-4'	70.4	C-2 ramn y C-3 ram 7
156.8	C-9		
155.7	C-2	70.2	C-2 ram 7
133.3	C-3	69.9	C-5 ram 7
130.8	C-2' y C-6'	69.7	C-5 ram
120.5	C-1'	67.8	C-5 ram
114.9	C-3' y C-5'	68.1	C-4 gal
105.4	C-10	65.1	C-6 gal
101.7	C-1 gal	17.8	C-6 ram
99.8	C-1 ram		
99.1	C-6		
98.2	C-1 ram 7		
94.4	C-8		
73.4	C-3 gal		
72.8	C-4 ram		

4 : Espectro ^1H -RMN




```

THRESH(CH)= 2.0
OFFSET(HZ)= 50.0
PF FRO(MHZ)= 25.2000
NO. INT. OFFSET(HZ) PPM
1 24 4467.9 172.304
2 35 4365.2 161.355
3 69 4045.7 168.550
4 54 4817.9 155.816
5 40 3923.6 155.703
6 33 3359.3 133.312
7 83 3295.0 138.799
8 30 3035.4 150.457
9 109 2894.5 114.860
10 21 2605.3 195.373
11 30 2561.4 101.648
12 59 2514.8 99.684
13 21 2498.0 59.131
14 34 2475.3 98.231
15 22 2379.3 94.422
16 33 1850.2 73.424
17 37 1835.1 72.825
18 60 1807.4 71.726
19 44 1800.3 71.447
20 39 1787.0 70.916
21 62 1775.2 70.446
22 112 1749.9 70.319
23 66 1721.9 69.919
24 71 1755.4 69.664
25 70 1715.6 68.083
26 40 1709.6 67.844
27 21 1639.1 65.047
28 92 1034.4 41.052
29 220 1013.4 40.216
30 43 998.0 39.637
31 248 992.3 39.381
32 34 977.6 38.798
33 209 971.4 38.550
34 97 950.6 37.724
35 24 929.6 36.893
36 129 448.3 17.792

```

```

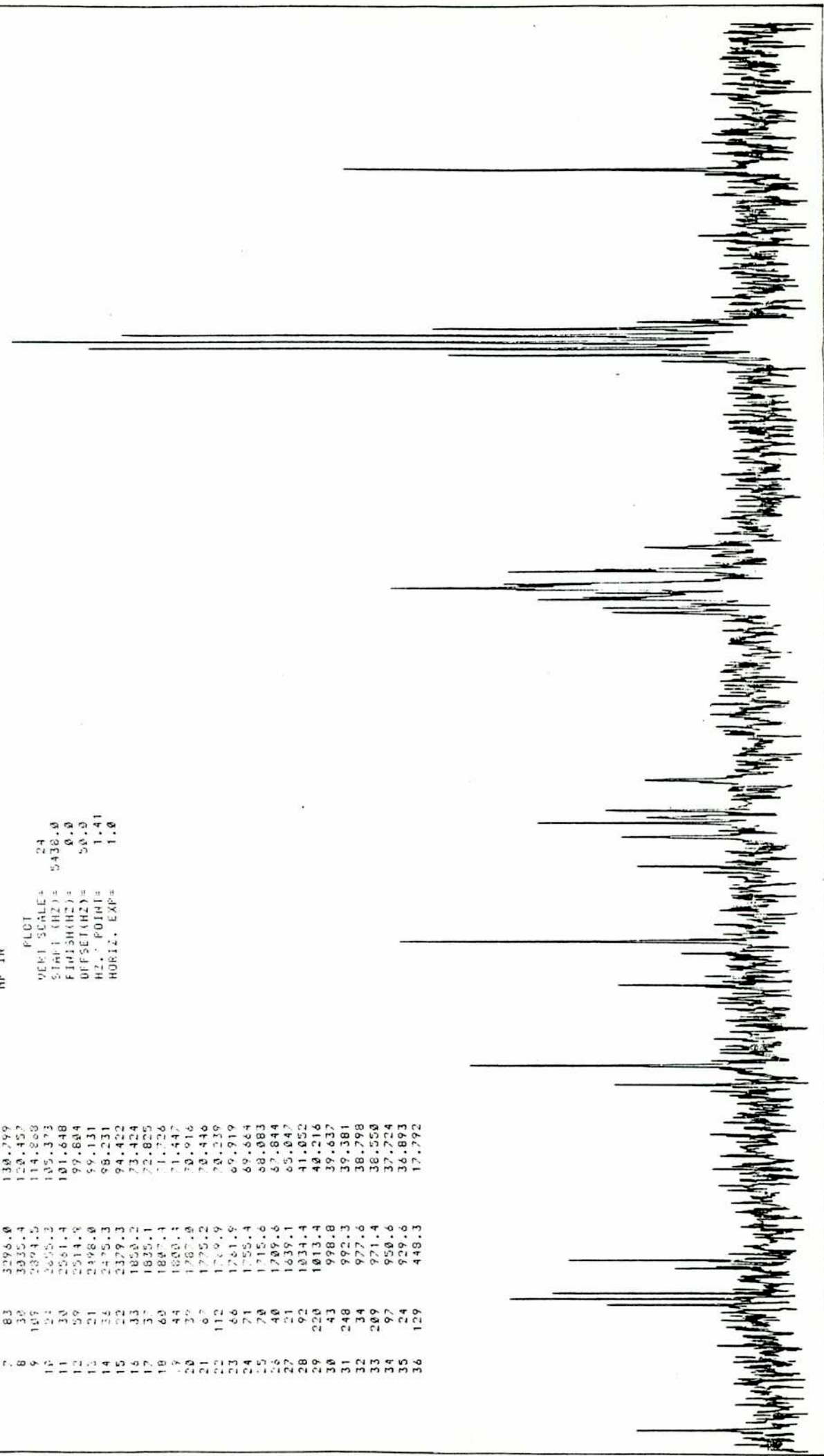
GRIN T1 C13
SFC UDT(HZ)= 5300
TRU SFC UDT= 5438
ACC TIME(S)= 0.754
PULS WID(US)= 20
K-IRANS = 15.265
DATA LENGTH= 8192
F T LENGTH= 8192
HF IN

```

```

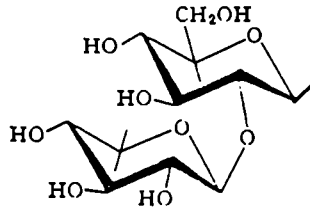
PLOT
VERT SCALE= 24
START (HZ)= 5438.0
FINISH(HZ)= 0.0
OFFSET(HZ)= 50.0
HZ. POINTS= 1.41
HORIZ. EXP= 1.0

```



12) R1 = H

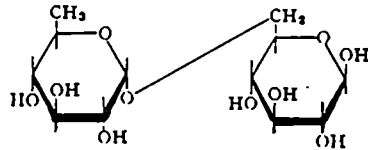
R2 =



CANFEROL-3-O- β -D-XILOPIRANOSILGLUCOPIRANOSIDO

14) R1 = H

R2 =

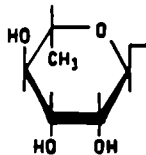


RUTINOSA

CANFEROL-3-O- β -D-GLUCOPIRANOSIL
(1 \rightarrow 6)-O- α -L-RAMNPIRANOSIDO

26) R2 = H

R1 =

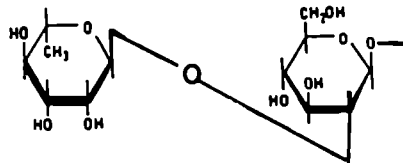


RAMNOSA

CANFEROL-7-O- α -L-RAMNOPIRANOSIDO

UV (λ max; nm) = MeOH: 254 (h), 268, 301(h), 368.

25) R1 =



R2 = H

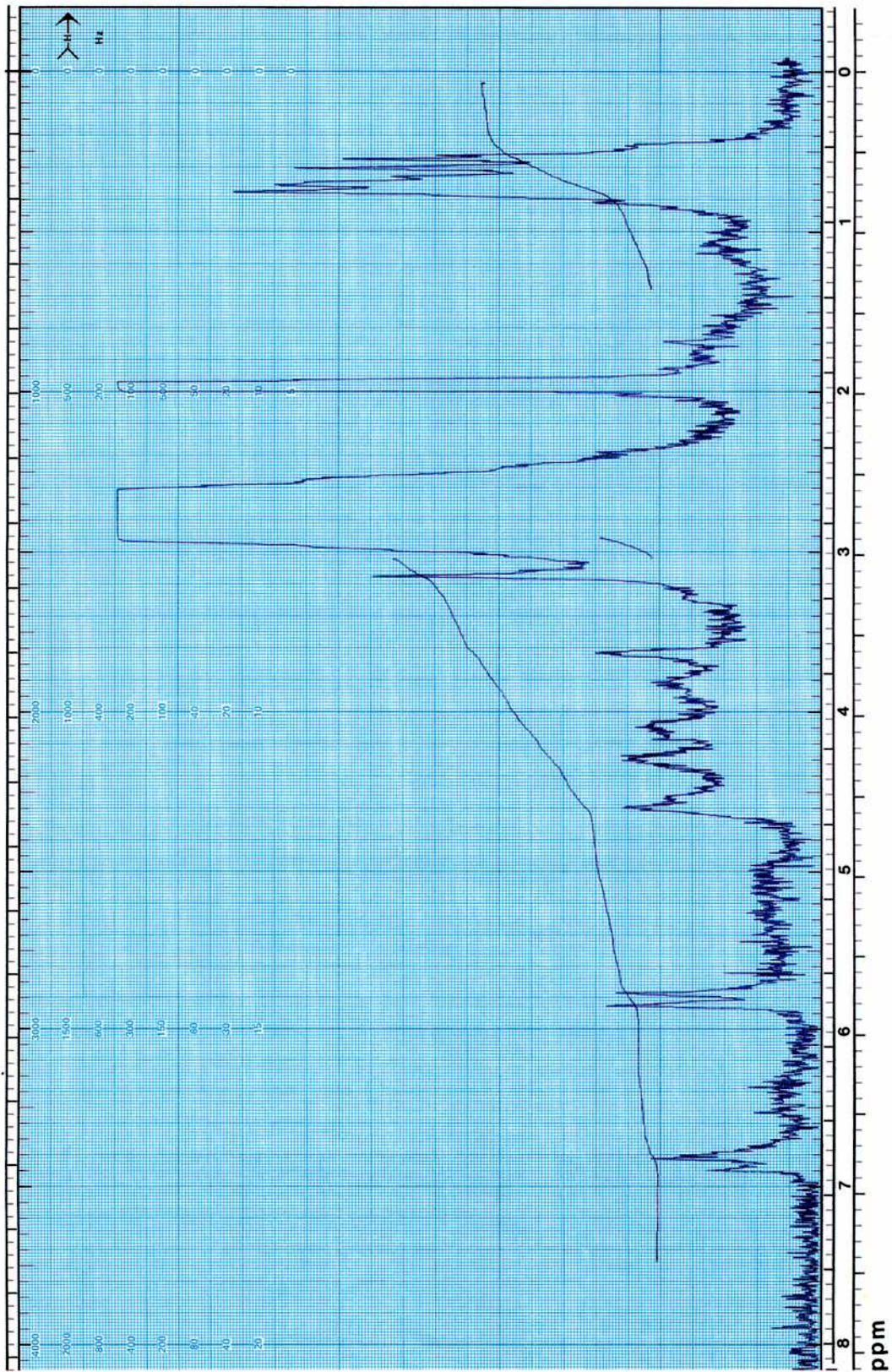
CANFEROL-7-O-[β -D-GLUCOPIRANOSIL
(1 \rightarrow 2)-O- α -L-RAMNOPIRANOSIDO]

UV (λ max, nm) = MeOH: 256, 264, 353;
MeONa: 246, 266, 400; 273, 299, 353, 400;
+HCl: 257, 265, 354; AcONa: 257, 265, 354;
+H3BO3: 257, 265, 354

^1H - RMN

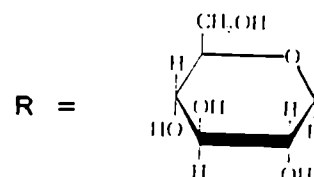
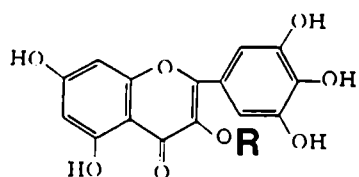
1.0	3 H, m	H-6(ramnosa)
4.35	1 H, d J=2 Hz	H-1(ramnosa)
5.45	1 H, d J=6 Hz	H-1(glucosa)
6.85	2 H, d J=9 Hz	H-3' y H-5'
8.02	2 H, d J=9 Hz	H-2' y H-6'

25 : Espectro ^1H -RMN



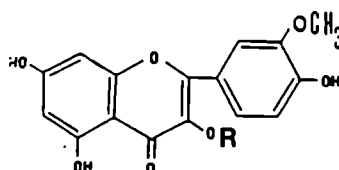
3.2.1.3. Otros flavonoles glicosidados

21)

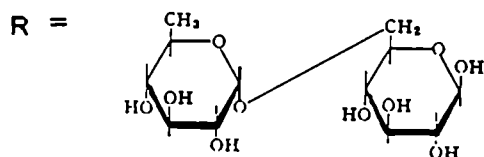


MIRICETINA-3-O-β-D-GLUCOPIRANOSIDO

UV (λ , max; nm) = MeOH: 256, 272(h); 302(h); 368



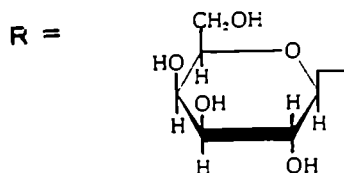
17)



UV (λ max; nm) = MeOH:
256, 268(h), 305, 353

ISORAMNETINA-3-O- [β-D-GLUCOPIRANOSIL
(1→6) -O-α-L-RAMNOPIRANOSIDO

18)

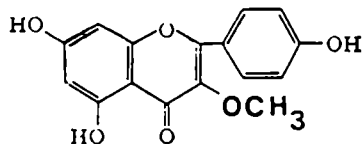


ISORAMNETINA-3-O-β-D GALACTOPIRANOSIDO

UV (λ max; nm) = MeOH: 253, 264(h), 303(h), 356; MeONa: 273, 282, 362, 410;
AlCl₃: 273, 282, 305, 360; /HCl: 273, 282, 360

3.2.1.4. Flavonoles metilados

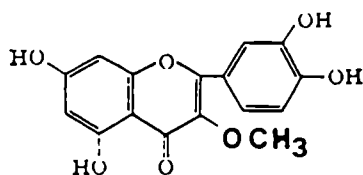
27)



CANFEROL-3-METIL-ETER

UV (λ_{\max} ; nm)= MeOH: 256, 270(h), 290(h), 358; MeONa: 272, 332, 407;
AlCl₃: 278, 300(h), 340, 440; /HCl: 270, 300(h), 360, 400;
AcONa: 272, 330, 390; /H₃BO₃: 266, 300, 378.

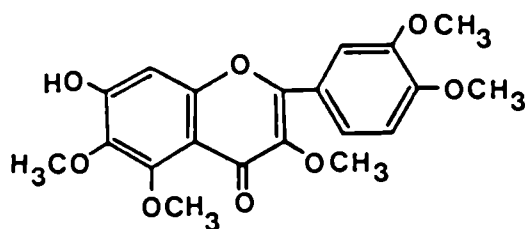
29)



QUERCETINA-3-METIL-ETER

UV (λ_{\max} , nm)= MeOH: 253 (h); 268, 301(h), 354.

31)



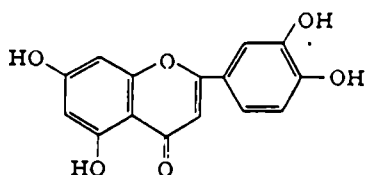
QUERCETAGEN-3,3',4',5,6-PENTAMETIL-ETER

UV (λ_{\max} , nm)= MeOH: 253(h), 263 (h), 334

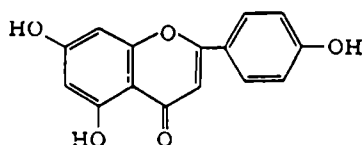
3.2.2. Flavonas

Se detectaron glicósidos de las dos flavonas más comunes en Leguminosas: luteolina y apigenina. Al contrario de lo que ocurre en flavonoles, donde se encontraron patrones de glicosidación complejos, aquí sólo se aislaron mono y diglicósidos.

Asimismo se determinó la presencia de flavonas metiladas como la diosmetina o la 3-hidroxi-4' metoxiflavona.



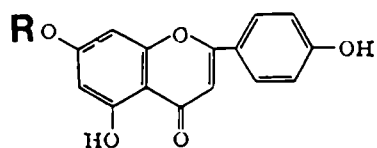
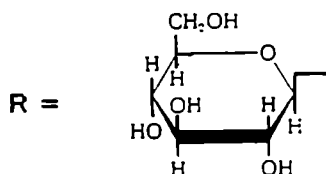
LUTEOLINA



APIGENINA

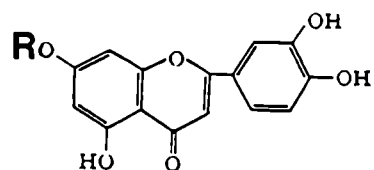
3.2.2.1. Glicósidos de luteolina y apigenina

20)



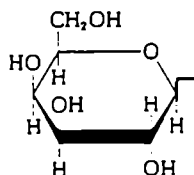
APIGENINA-7-O-β-D-GLUCOPIRANOSIDO

UV (λ max; nm) = MeOH: 268, 301(h), 338; MeONa: 269, 301(h), 386; AlCl₃: 276, 300, 348, 386; /HCl: 277; 301; 346; 384; AcONa: 258, 268(h), 388; /H₃BO₃: 268, 338.



23)

R =



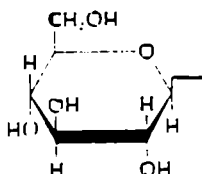
GALACTOSA

LUTEOLINA-7-O-β-D-GALACTOPIRANOSIDO

UV (λ max; nm) = MeOH: 255, 267(h), 350

43)

R =



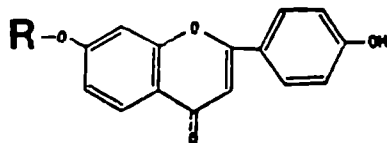
GLUCOSA

LUTEOLINA-7-O-β-D-GLUCOPIRANOSIDO

UV (λ max; nm) = MeOH: 255, 267(h), 350; MeONa: 263, 300, 405; AlCl₃: 274, 300(h), 330, 428; /HCl: 272, 294(h), 358, 385; AcONa: 259, 266(h), 365 (h), 405.

3.2.2.2. Otras flavonas

13)

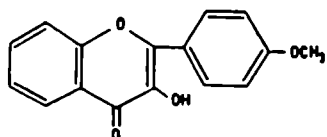


R = RAMNOSA - GLUCOSA

4',7-DIHIDROXIFLAVONA-7-O-RAMNOSILGLUCOSIDO

UV (λ_{max} ; nm) = MeOH: 255(h), 308(h), 328; MeONa: 253(h), 298, 388;
AlCl₃: 255(h), 308(h), 328; /HCl: 252, 328

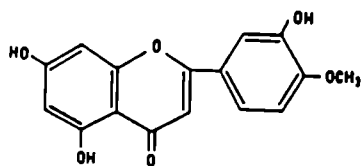
30)



3-HIDROXI-4'-METOXIFLAVONA

UV (λ_{max} , nm) = MeOH: 231, 249, 335(h), 359

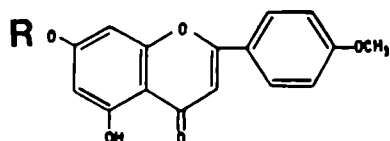
28)



DIOSMETINA

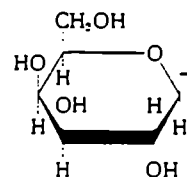
UV (λ max, nm) = MeOH: 240(h), 252, 272, 288 (h), 346.

22)



GALACTOSA

R =



ACACETINA-7-O- β -D-GALACTOPIRANOSIDO

UV (λ ,max; nm) = MeOH: 263, 320

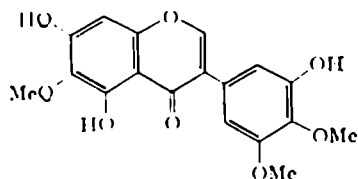
3.2.3. Otros flavonoides aislados.

3.2.3.1. Isoflavonoides

Se determinó la presencia de irigenina y daidzeína-7-glucósido en varias especies, por lo que fue considerado como un caracter para el análisis quimiotaxonómico.

La presencia de 7-OH-isoflavona fue detectada únicamente en una población de *V. peduncularis* de la provincia de Misiones (N° 32), y dado que la síntesis de este tipo de compuestos se da con frecuencia en respuesta a condiciones ambientales de infección por patógenos, no se otorgó valor taxonómico como caracter a la presencia de este isoflavonoide.

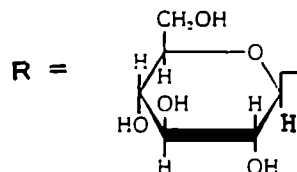
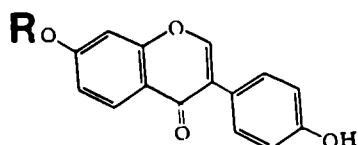
40)



IRIGENINA

UV (λ max; nm) = MeOH: 268, 336(h)

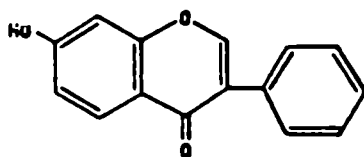
42)



DAIDZEINA 7-O-D-GLUCOPIRANOSIDO

UV (λ max; nm) = MeOH: 256, 313(h)

is)

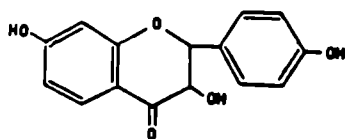


7-HIDROXI-ISOFLAVONA

UV (λ max; nm) = MeOH: 242, 301

3.2.3.2. Flavanonas

32)



GARBANZOL

UV (λ max, nm) = MeOH: 275, 300(h), 315

3.2.4. Un nuevo tipo de glicósidos de canferol: Isoramninósidos

Se aislaron dos flavonoides nuevos para la literatura : se trata de O-glicósidos de canferol (10 y 11) obtenidos de material foliar de *V. luteola*, y luego detectados en otras especies.

Se obtuvo el percolado acuoso (PA) del extracto metanólico por percolación en poliamida con CH₂Cl₂, MeOH y Agua sucesivamente.

El PA fue cromatografiado inicialmente en columna de silicagel H a mediana presión usando gradientes de CH₂Cl₂/MeOH de polaridad creciente (4:1; 39:11; 3:1; 2:1; 0:100). La fracción con flavonoides obtenida fue procesada por cromatografía de exclusión con Sephadex LH-20 utilizando MeOH como solvente, con un flujo aproximado de 0.3 ml / min.

Se obtuvo una fracción de triglicósidos que previa purificación en columna de silicagel H fue resuelta por CLAR utilizando un cromatógrafo WATERS con una columna semipreparativa μ Bondapack RP-C18, (diámetro = 7.8 mm, largo= 300 mm) y un detector UV de onda variable a $\lambda = 291$ nm. Se trabajó en condiciones isocráticas, siendo la mezcla de elución MeOH / H₂O (55:45) con un flujo de 1.5 ml / min.

Los tiempos de retención de ambos compuestos resultaron ser:

t_r 1= 10 min 50 seg , y t_r 2= 7 min 36 sec.

3.2.4.1 Espectroscopía UV

(λ máx. [nm] ; h= hombro)

	flavonoide <u>11</u>	flavonide <u>10</u>
MeOH	243(h) , 266, 352	257(h) , 266, 352
+ MeONa	244(h) , 269, 400	244(h) , 269, 400
+ AcONa	272, 301(h) , 353	266, 352
+ AcONa/H ₃ BO ₃	272, 301(h) , 353	266, 352
+ AlCl ₃	262, 354, 400	262, 354, 400
+ AlCl ₃ /HCl	262, 354, 400	262, 354, 400

3.2.4.2. Resonancia magnética nuclear protónica (¹H-RMN)
[100.1 MHz; MeOH-d₄] m=multiplete; d=doblete

Flavonoide 11 (FIGURA 3.2.4.2.A)

δ	1.10	(6 H, m : H-6 de ram= H-6'' y H-6''')
	3.00- 3.90	(m : otros protones de azúcares)
	4.40	(1 H, d, J _{ee} = 2 Hz ; H-1 ram= H-1''')
	4.90	(1 H, d, J _{ee} = 2 Hz ; H-1 ram= H-1''')
	5.16	(1 H, d, J _{aa} = 7 Hz ; H-1 gal= H-1'')
	6.42	(1 H, d, J _m = 2 Hz ; H-6)
	6.78	(1 H, d, J _m = 2 Hz ; H-8)
	6.86	(2 H, d, J = 8 Hz ; H-3'y H-5')
	8.08	(2 H, d, J = 8 Hz ; H-2'y H-6')

Flavonoide 10 (FIGURA 3.2.4.2.B)

δ	1.04	(3 H, d : J= 7 Hz ; H-6 ram)
	1.17	(3 H, d : J= 7 Hz ; H-6 ram)
	3.00- 3.90	(m : otros protones de azúcares)
	4.56	(1 H, d, J _{ee} = 2 Hz ; H-1 ram= H-1''')
	5.18	(1 H, d, J _{ee} = 2 Hz ; H-1 ram= H-1 r7)
	5.34	(1 H, d, J _{aa} = 7 Hz ; H-1 gal= H-1'')
	5.54	(1 H, d, J _{ee} = 2 Hz ; H-1 ram= H-1''')
	6.43	(1 H, d, J _m = 2 Hz ; H-6)
	6.78	(1 H, d, J _m = 2 Hz ; H-8)
	6.85	(2 H, d, J = 8 Hz ; H-3'y H-5')
	8.08	(2 H, d, J = 8 Hz ; H-2'y H-6')

3.2.4.3. Resonancia magnética nuclear de carbono 13 (¹³C-RMN)
[25.2 MHz; DMSO-d₆]

Flavonoide 11 (FIGURA 3.2.4.3.A)

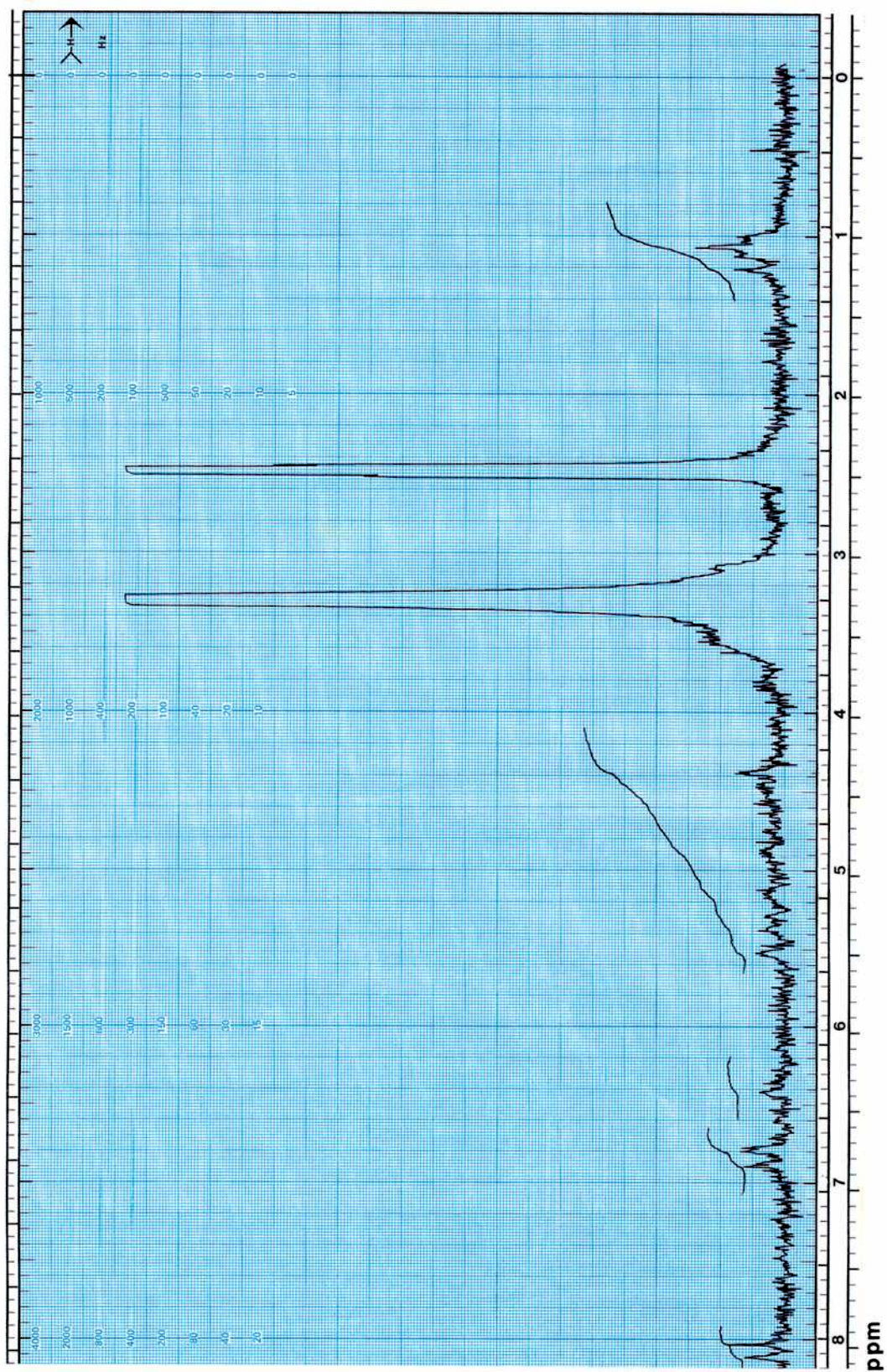
ppm 176.5	(C-4)	79.5	(C-4''')
163.4	(C-7)	73.4 ^C	(C-5'')
160.3	(C-5)	73.2 ^C	(C-3'')
159.1	(C-4')	72.3	(C-4''')
156.2	(C-9)	71.5	(C-2'')
155.4	(C-2)	71.1 ^B	(C-3''')
131.7	(C-3)	70.8 ^B	(C-3''')
130.2	(C-2')	70.7 ^B	(C-2''')
120.6	(C-1')	70.1	(C-2''')
115.4	(C-3 y C-5')	68.9 ^A	(C-5''')
103.3	(C-10)	68.6 ^A	(C-4'')
101.1	(C-1'')	68.3	(C-5''')
100.5	(C-1''')	66.2	(C-6'')
100.1	(C-1''')	18.6	(C-6''')
98.4	(C-6)	18.3	(C-6''')
92.9	(C-8)		

Flavonoide 10 (FIGURA 3.2.4.3.B)

ppm 176.5	(C-4)	73.2	(C-3'')
161.5	(C-7)	72.3	(C-4''')
160.7	(C-5)	71.9	(C-4 r7)
159.1	(C-4')	71.5	(C-2'')
157.3	(C-9)	71.1 ^B	(C-3''')
155.9	(C-2)	71.0 ^B	(C-3 r7)
131.2	(C-3)	70.8 ^B	(C-3''')
130.2	(C-2' y C-6')	70.7 ^B	(C-2''')
120.8	(C-1')	70.5 ^C	(C-2 r7)
115.5	(C-3 y C-5')	70.2 ^C	(C-5 r7)
103.5	(C-10)	70.1 ^C	(C-2''')
101.0	(C-1'')	68.9 ^A	(C-5''')
100.5	(C-1''')	68.6 ^A	(C-4'')
100.1	(C-1''')	68.3 ^A	(C-5''')
99.5	(C-1 r7)	66.2	(C-6'')
98.4	(C-6)	18.6	(C-6''')
93.2	(C-8)	18.3	(C-6''')
79.5	(C-4''')		
73.4	(C-5'')		

(Las señales con igual supraíndice pueden ser intercambiadas)
r7 = ramnosa unida por el C-7

FIGURA 3.2.4.2.A : Espectro ^1H -RMN del isoramninósido 11



FIGUR 3.2.4.2.B : Espectro ^1H -RMN del isoramninósido 10

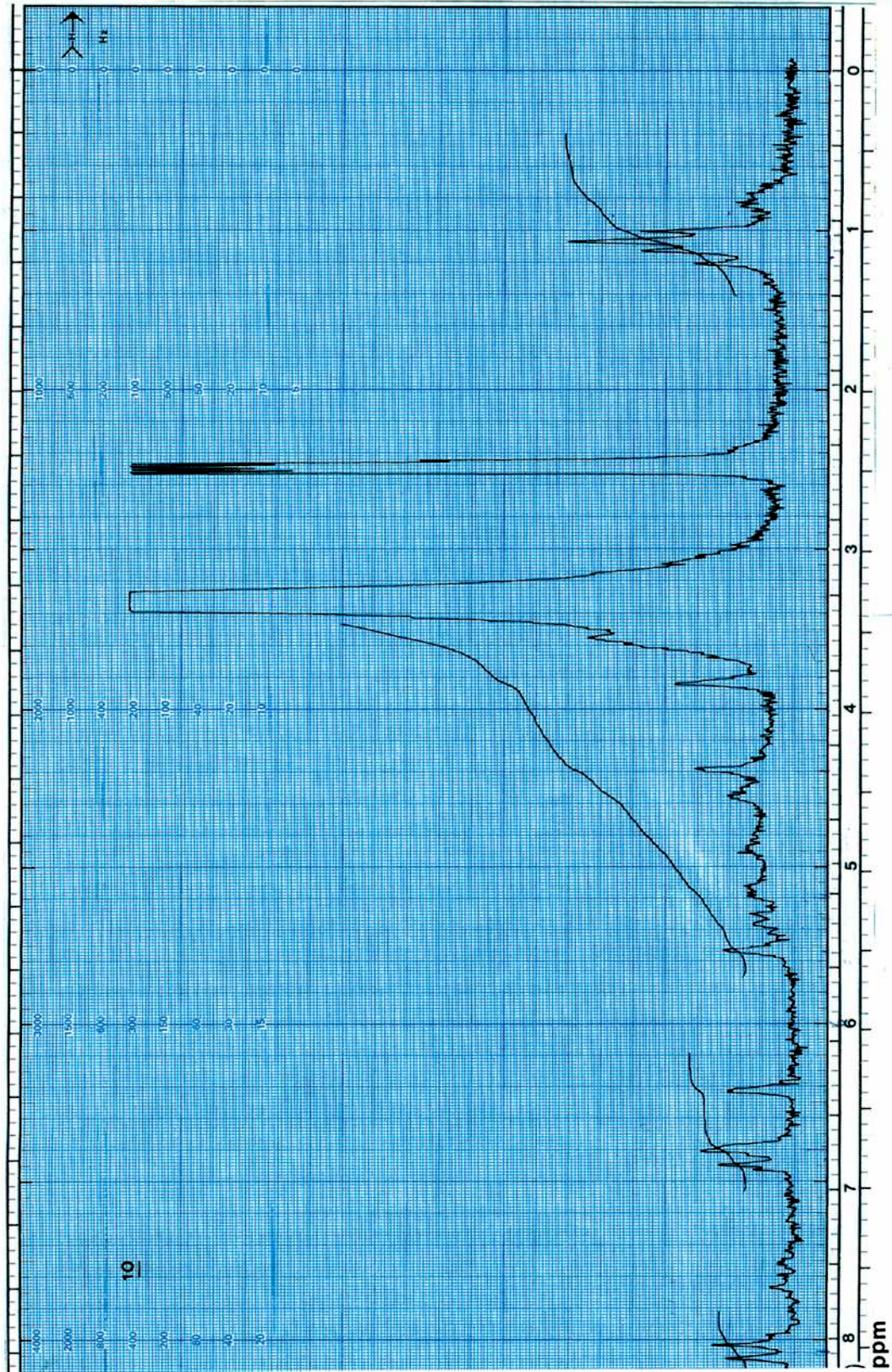
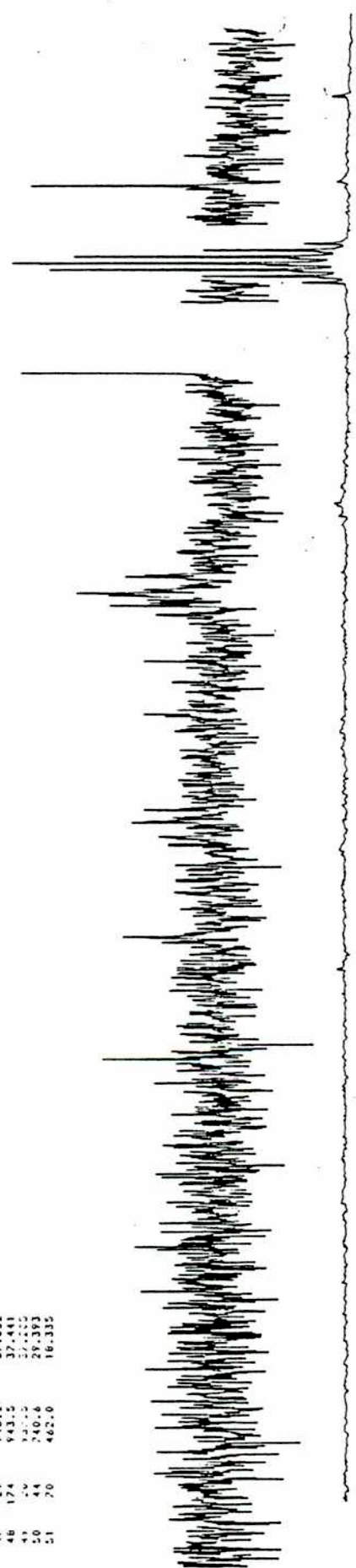


FIGURA 3.2.4.3.B : Espectro ¹³C-RMN del isoramninosido 10

68CAPS11
 SFC WD1 (HZ)= 5000
 TRU SPC WD1= 5120
 ACQ TIME(S)= 0.800
 PULS PROG(S)= 23
 K-TRANS = 175.303
 DATA LENGTH= 8192
 SER LNH (S)= 0.50
 F I LENGH= 8192
 HF IN

 FL01
 VLRT SCALE= 121
 START (HZ)= 3003.7
 FINISH(HZ)= 2116.2
 OFFSET(HZ)= 49.0
 HZ./ POINT= 1.25
 HORIZ. EXP= 1.0

INRESOLUCI*	2.0
OFFSETHZ**	49.0
RF FREQANZA*	25.2000
NO. INT.	DIFFSETHZ)
1	166.003
2	183.180
3	174.763
4	175.222
5	164.850
6	155.501
7	148.323
8	134.319
9	131.194
10	115.495
11	115.374
12	100.290
13	100.141
14	98.616
15	66.351
16	78.522
17	72.454
18	71.932
19	71.516
20	71.107
21	70.833
22	70.674
23	70.476
24	70.222
25	70.150
26	68.559
27	68.349
28	42.447
29	41.856
30	41.608
31	41.352
32	41.097
33	40.841
34	40.585
35	39.320
36	39.064
37	38.808
38	38.552
39	38.296
40	38.040
41	37.784
42	37.528
43	37.272
44	37.016
45	36.760
46	36.504
47	36.248
48	35.992
49	35.736
50	35.480
51	35.224



3.2.4.4. Determinación Estructural de Isoramninósidos

El espectro UV de ambos compuestos reveló la presencia de dos glicósidos de flavonol con un grupo hidroxilo (-OH) libre en la posición 4' del anillo B dado que la adición de NaOMe (metóxido de Sodio) causó un corrimiento batocrómico en la Banda I ($\Delta\lambda = + 48$ nm). La posición 5 ocupada por otro hidroxilo libre (hay formación de complejos ácido-estables con AlCl_3) y la ausencia de pares de hidroxilos en posición orto en los anillos A y B, dado que la adición de $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ no produjo desplazamiento batocrómico en la Banda I, son otras características comunes a ambas sustancias.

Solamente el isoramninósido **11** presentó un corrimiento batocrómico en la Banda II con AcONa $\Delta\lambda = + 6$ nm, indicando la existencia de un -OH libre en posición 7 del anillo A.

Estos resultados indican que los azúcares están unidos a la estructura fenólica en el C-3 en el compuesto **11**, y en C-3 y C-7 en el compuesto **10**.

La hidrólisis ácida de ambos glicósidos produjo la misma aglicona, la cual fue identificada como canferol por co-cromatografía en placa delgada de sílica gel de alta resolución (HPTLC) con un testigo.

Los azúcares determinados fueron galactosa y ramnosa, utilizando el mismo procedimiento pero con placas HPTLC-celulosa.

Ambos glicósidos, **11** y **10** se descompusieron en DMSO produciendo canferol 3-O- β - robinobiósido y canferol 3-O- β - robinobiósido- 7-O- α -ramnósido (robinina) respectivamente [robinobiosa= 6-O- α -L-ramnopiranosil-D-galactopiranososa].

Los productos de descomposición fueron caracterizados por co-cromatografía contra testigos en placas HPTLC de silicagel.

Estos resultados indican que la galactosa está unida por un grupo hemiacetalico a la aglicona por el C-3 mientras que otras dos ramnosas se unen sucesivamente a esta galactosa, ya que no se hallan unidas a la aglicona. El compuesto **10** además presenta una tercera ramnosa en posición -7 unida al canferol.

Los espectros de RMN protónica permitieron confirmar la secuencia de unión de la galactosa a la aglicona y conocer su configuración.

El espectro ^1H -RMN de ambos glicósidos mostró las mismas señales para la aglicona: dos dobletes centrados a δ 6.86 y δ 8.08 con una constante de acoplamiento $J = 8$ Hz asignable a una sustitución de tipo para en el anillo B: el doblete hacia campos altos (δ 6.86) corresponde a el H-3' y el H-5', mientras que el otro doblete corresponde al H-2' y el H-6'.

Dos dobletes adicionales centrados a δ 6.42 y δ 6.78 con un acoplamiento *meta* ($J=2$ Hz) son asignados al H-6 y el H-8, respectivamente, probando la disustitución 5,7 del anillo A. Todas estas señales están de acuerdo con las correspondientes al canferol.

Tres señales derivadas de los protones anoméricos pueden verse en el espectro de **11**. El doblete a δ 5.16 con un acoplamiento diaxial ($J=7$ Hz) que puede corresponder al H-1" o al H-2" es asignado al protón anomérico de la D-galactopiranososa (H-1") unido en unión β al -OH del C-3 del canferol.

Las otras dos señales a δ 4.40 y δ 4.90 con un acoplamiento diecuatorial ($J= 2$ Hz) pueden asignarse a los protones anoméricos de ambas L-ramnopiranosas (H-1'" y H-1''") unidos en forma α a la galactosa y a la segunda ramnosa respectivamente.

Esto se corrobora con los desplazamientos químicos de los carbonos.

La forma piranososa de los azúcares y la unión interglicosídica se determinaron por ^{13}C -RMN.

La presencia de una señal a 131.7 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN de **11** está de acuerdo con la glicosidación en C-3 con un desplazamiento de unas 4.0 ppm a campos altos (el C-3 de canferol corresponde a 135.6 ppm).

Las posiciones adyacentes C-2 y C-4 sufren consecuentemente desplazamiento hacia campos bajos, de + 8.6 ppm y + 0.6 ppm respectivamente. Obviamente el gran efecto orto sobre el C-2 se debe a la glicosidación en 3 (Markham y Ternai, 1976; Markham et al., 1978).

Las tres señales de los carbonos anoméricos de los azúcares se observan a 101.1, 100.5, 100.1 ppm. Las restantes señales de los azúcares son características de las piranosas (Gorin y Mazurek, 1975; Ritchie et al., 1975) y aparecen en el rango entre 79.5 y 18.3 ppm.

La comparación entre las señales de la galactosa con respecto a las de la metil- β -D-galactopiranososa presenta para el C-1 de la galactosa (C-1") un desplazamiento a campos altos (-3.8 ppm) indicando que este carbono está unido a la aglicona.

Está ya citado en la literatura (Breitmaier et al., 1971) que el carbono anomérico de los aril-glicósidos provoca desplazamientos mayores (unas -2 ppm) respecto a los metil-glicósidos.

Por el contrario, el C-6" está desplazado a campos bajos (+ 4.1 ppm) lo que sugiere una unión 1 \rightarrow 6 a la ramnosa. Este desplazamiento debido a una unión interglicosídica es esperable, y está de acuerdo con lo citado previamente en la literatura (Yamoaka et al., 1971). Simultáneamente, el C-5" tiene un

desplazamiento de -2.8 ppm.

Todos estos desplazamientos en el galactoramnósido aislado son compatibles parcialmente con los de un robinobiósido (Buschi y Pomilio, 1982), excepto para el C-4 de la ramnosa (C-4'') que se desplaza a campos bajos sugiriendo que la ramnosa terminal está unida por el C-4 a la ramnosa intermedia. La variación es de + 6.4 ppm en relación al C-4 de la metil- α -L- ramnopiranosil, que corresponde a 73.1 ppm. Esta señal a 79.5 ppm puede distinguirse perfectamente de las correspondientes a los restantes carbonos de los azúcares. Finalmente, las señales atribuidas a los carbonos de la ramnosa intermedia son bastante compatibles con los valores informados previamente (Riess-Maurer et al., 1979).

De acuerdo a todas estas evidencias se identificó al compuesto **11** como el **canferol-3-O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O]- β -D-galactopiranosido** (= canferol-3-O- β -D- isoramninósido) [FIGURA 3.2.4.4.A]

El espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **10** evidencia que todos los azúcares se hallan en forma piranósica y que el canferol se halla glicosidado en C-3 y C-7. Se observa un desplazamiento a campos altos de la señal del C-3 ($\Delta \delta = -4.4$ ppm) respecto a la del canferol (C-3 = 135.6 ppm), indicando que un azúcar distinto a la ramnosa se halla unido en este carbono.

Los valores observados para el C-2, con un desplazamiento de + 9.1 ppm (correspondiente a un efecto orto), y para el C-4, que es de + 0.6 ppm, son acordes a los descriptos para otros 3-O-glicósidos de canferol (Markham et al., 1978).

El desplazamiento de -2.4 ppm del C-7 está indicando la existencia de un 7-O-ramnósido.

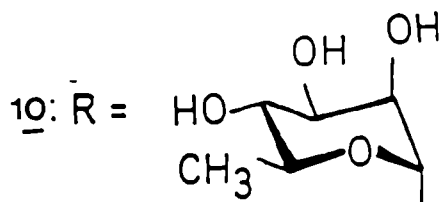
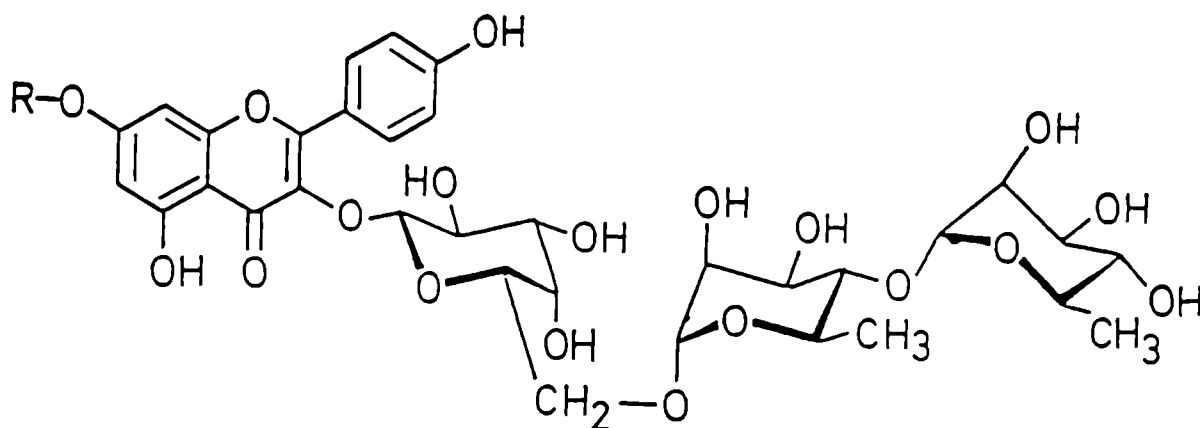
Se observan también desplazamientos para las señales de los carbonos en posiciones orto y para del anillo A (C-6, C-8 y C-10): el desplazamiento para el C-10, en para, es de +0.4 ppm.

En el anillo B, las señales de los carbonos C-1' (-0.9 ppm), C-2' y C-6' (+0.7 ppm) se hallan también desplazadas.

El resto de las señales corresponde en líneas generales a las observadas para el compuesto **11**.

De esta forma, el compuesto **10** fue identificado como el **canferol-3-O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O]- β -D-galactopiranosido-7-O- α -L-ramnopiranosido** (= canferol-3-O- β -D- isoramninósido 7-O- α -L-ramnósido) [FIGURA 3.2.4.4.A]

FIGURA 3.2.4.4. A: Determinación Estructural de los Isoramminósidos



CANFEROL-3-O-β-D-ISORAMNINOSIDO-7-O-α-L-RAMNOSIDO

(CANFEROL-3-O-[α-L-RAMNOPIRANOSIL-(1→4)-O-α-L-RAMNOPIRANOSIL-(1→6)-O]-β-D-GALACTOPIRANOSIDO-7-O-α-L-RAMNOPIRANOSIDO)

11: R = H

CANFEROL-3-O-β-D-ISORAMNINOSIDO

(CANFEROL-3-O-[α-L-RAMNOPIRANOSIL-(1→4)-O-α-L-RAMNOPIRANOSIL-(1→6)-O]-β-D-GALACTOPIRANOSIDO)

3.2.5. Perfil químico de la subtribu Phaseolinae en Argentina

De acuerdo al criterio de Harborne (1978) se consideraron los niveles estructurales correspondientes a los flavonoles y flavonas determinados (FIGURA 3.2.5.A) con un sentido de evolución biosintética en base a los patrones de oxigenación de los anillos A y B y las correspondientes posiciones de glicosidación.

Se observa que la mayor parte de los flavonoides son glicósidos de canferol y quercetina, es decir que predominan los niveles de oxidación en el anillo B de mediano a bajo (dos grupos -OH en posiciones 3' y 4' para la quercetina y un solo -OH en posición 4' para el canferol), observándose un solo caso de trihidroxilación del anillo B (en 2', 3' y 4') en un glicósido de miricetina (21). Del mismo modo, las posiciones de glicosidación corresponden, con preferencia a un patrón 3,7- o bien 3-, resultando que existen pocos 7-O-glicósidos en comparación (sólo uno de quercetina y dos de canferol), y existen glicósidos complejos como los isoramninósidos y tri-O-glicósidos en posición 3.

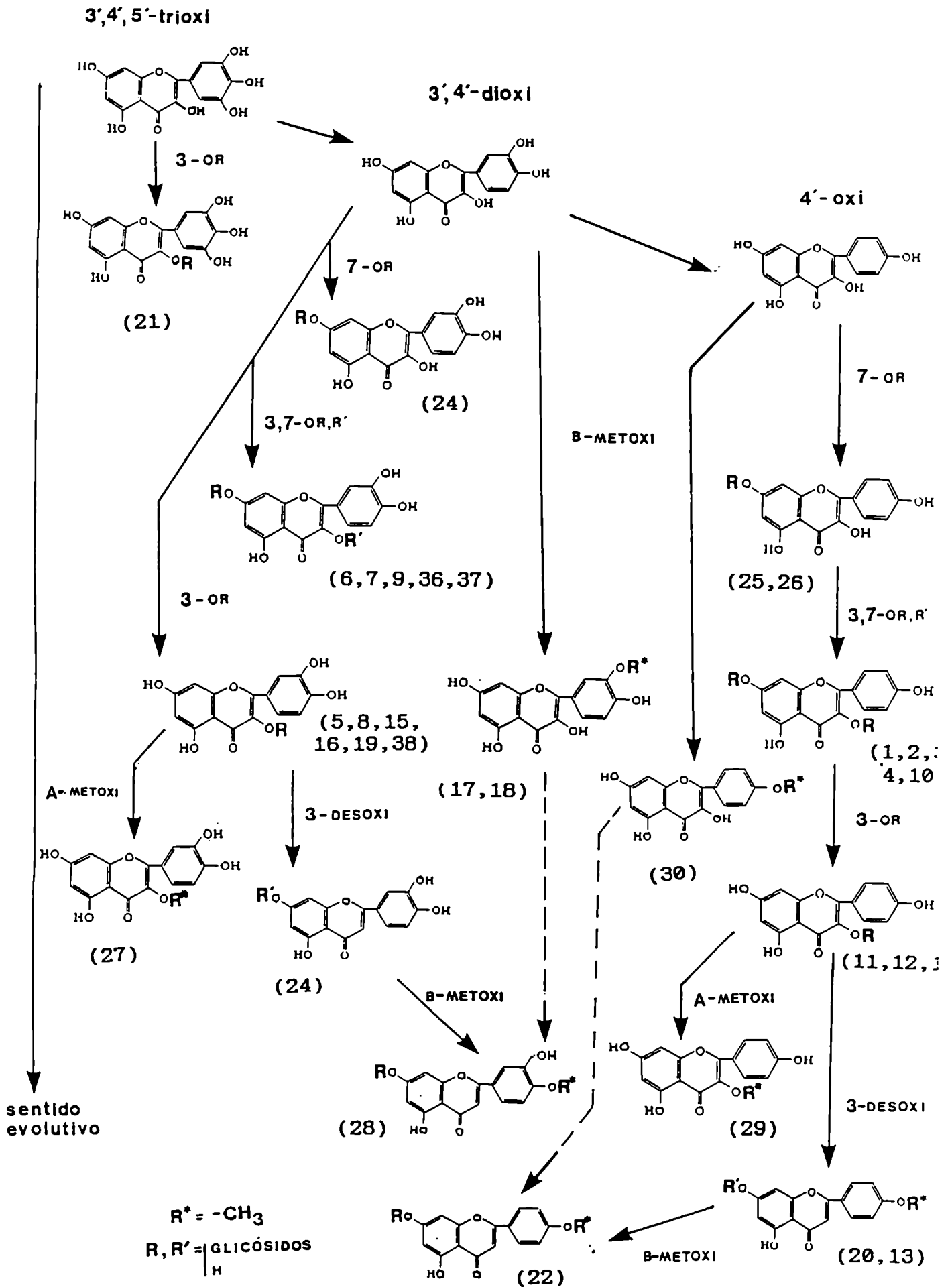
En ambos casos, estas características están señalando un patrón evolutivo intermedio para los flavonoides del grupo.

Respecto a las flavonas, existen 7 flavonas determinadas y si bien su número es relativamente bajo respecto a flavonoles, la presencia de dichas flavonas está indicando la posición más avanzada de la subtribu Phaseolinae dentro de la subfamilia Papilionoideae en general, dado que otros grupos suelen presentar una frecuencia mucho menor de estos compuestos (Gomes et al., 1981).

En cuanto a los patrones de metilación en el anillo A, la posición de preferencia siempre es en 3, aunque se detectó como un compuesto bastante frecuente quercetagetina-penta-metil-éter que presenta además grupos -OCH₃ en posición 5 y 6 del anillo A, un patrón que no se da en otros flavonoides del grupo, y que constituye un caracter bastante avanzado, aunque el patrón del anillo B con metilos en 3'y 4' es relativamente menos evolucionado. Este patrón de sustitución es el más frecuente en el anillo B, dado que sólo se detectó un derivado de canferol metilado (4'-OCH₃).

En base a todas estas evidencias puede concluirse que el perfil químico de este grupo es bastante avanzado en relación a la subfamilia Papilionoideae (Gomes et al.,1981) lo cual se correlaciona perfectamente con la presencia de caracteres muy

FIGURA 3.2.5. A: Evolución estructural de flavonoides en Phaseolinae



evolucionados en cuanto a la morfología y estructura floral que son típicos de las *Phaseolinae*, aunque la ausencia de C-glicósidos y la ausencia de un patrón de sustitución distinto al 3,7 para el anillo A indican claramente que, en términos generales, se trata de un patrón evolutivo intermedio.

3.3. Análisis Numérico Multivariante

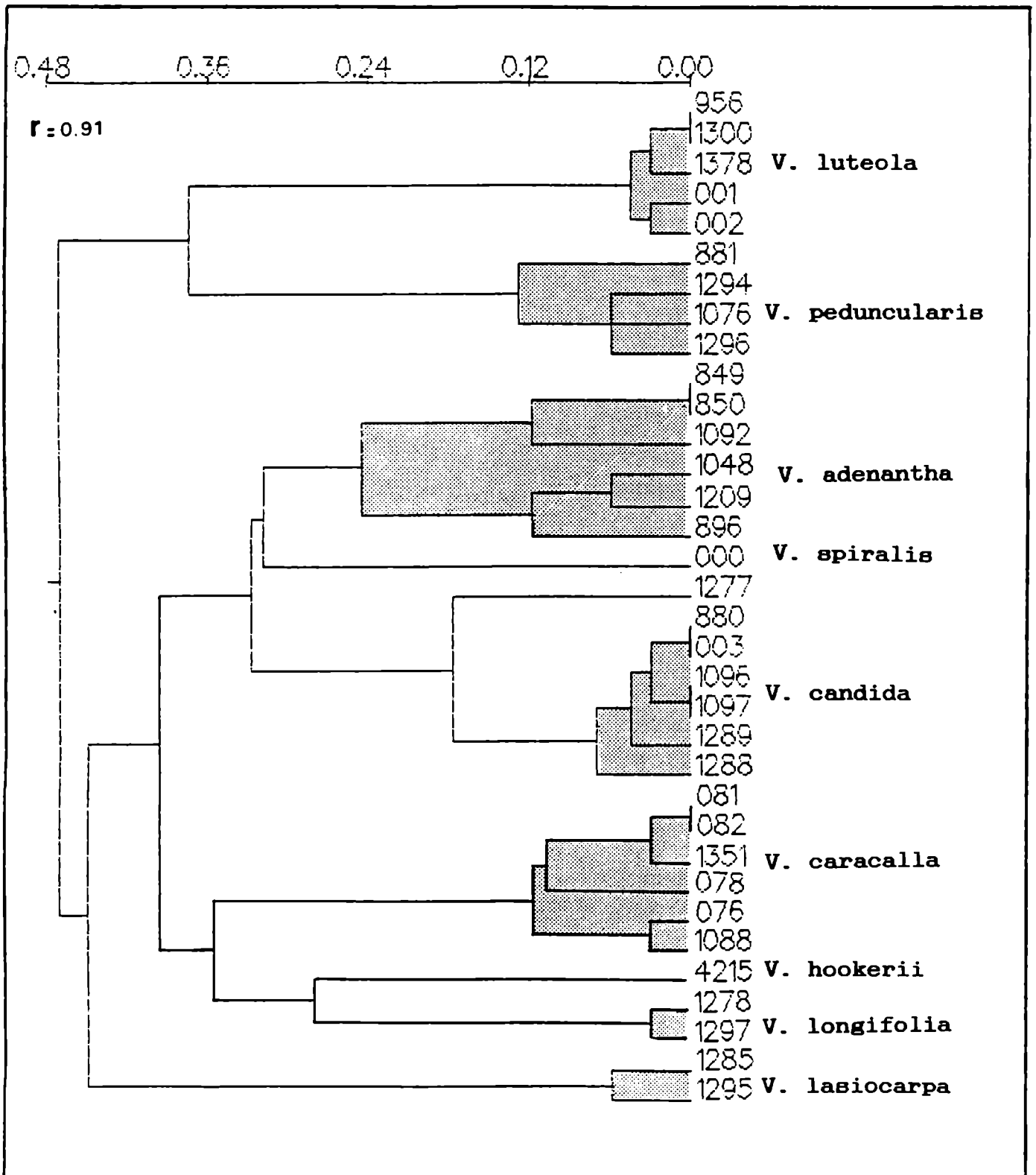
3.3.1. Género *Vigna*

3.3.1.1. Matriz Básica de Datos

	NUMERO DE OTU									
	V. luteola	V. adenantha			V. candida	V. longifolia	V. lasiocarpa	V. hookeri	V. caracalla	
NUMERO DE FLAVON.	9 1 1 0 0 5 3 3 0 0 6 0 7 1 2 0 8	8 8 1 0 1 1 1 4 5 0 0 0 2 2 9 0 4 6 9 0 7 8 2 9 7	8 1 1 1 1 0 8 0 0 2 2 0 9 9 8 8 3 6 7 8 9	1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 7 9 0 9 1 8 7 5 5 5	1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 0 3 7 7 8 8 8 1	4 1 1 0 0 0 0 0 3 7 7 8 8 0 5 6 8 1 2	8 1 1 1 1 0 8 2 2 0 0 1 9 9 7 0 4 6 6			
1	0 0 0 0 0	1 1 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1
2	1 1 1 1 1	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	1 1 0 0 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1
3	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
4	1 1 1 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 0 0 1 1	1 0 0 1 1
5	0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	0 0 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
6	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 0	0 0 0 0 0 0	1 1 0 0 1	1 1 0 0 1	1 0 1 0 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1
7	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1
8	0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 0 1 1	1 1 0 0 0	1 1 0 0 0	1 1 0 0 0	1 1 0 0 0	1 1 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
9	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
10	1 1 1 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
11	1 1 1 0 0	1 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	1 1 1 0 1	1 0 0 0 0	1 0 0 0 0	1 0 0 0 0	1 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
12	1 1 1 1 1	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	1 1 0 0 1	1 0 0 0 1	1 0 0 0 0	1 0 0 0 0	1 0 0 0 0	1 0 1 1 0	1 0 1 1 0
13	1 1 1 1 1	1 1 0 0 0 0 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
14	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1
15	0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1
16	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 1 1 0	1 0 1 0 0	1 0 1 0 0	1 0 1 0 0	1 0 1 0 0	1 1 1 1 0	1 1 1 1 0
17	0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1 0	0 0 0 0 0 0	0 0 1 1 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
18	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1	0 0 0 0 0	1 1 1 0 0	1 1 1 0 0	1 1 1 0 0	1 1 1 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
19	0 0 0 0 0	0 0 0 1 0 1 1	1 1 1 1 1 1	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	1 1 0 1 0	1 1 0 1 0
20	1 1 1 1 1	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 1 1 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 1 1 1 0	0 1 1 1 0
21	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 1 1 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 1 1 1 0	0 1 1 1 0
22	1 1 1 1 1	0 0 0 0 0 0 1	1 1 1 0 0 1	0 0 1 1 0	1 0 0 1 0	1 0 0 0 0	1 0 0 0 0	1 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
23	1 1 1 1 1	1 1 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1
24	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 0	1 1 1 1 0	1 1 1 1 0	1 1 1 1 0	1 1 1 1 0	1 1 1 1 0	1 1 1 1 0
26	1 1 1 1 1	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
27	1 1 1 1 1	0 0 0 0 0 1 1	1 1 1 1 1 1	0 0 0 0 0	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1
28	1 1 1 1 1	1 1 1 0 1 1 0	1 1 1 1 1 1	0 1 0 1 1	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 1 1 1 1	0 1 1 1 1
29	0 0 0 0 0	1 1 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 0	1 1 1 1 0	1 1 1 1 0	1 1 1 1 0	1 1 1 1 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
30	1 1 1 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1
31	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1	0 0 0 0 0 0	0 0 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1
32	0 0 0 0 0	1 1 0 1 1 0 0	1 1 1 1 1 1	1 1 0 0 1	1 0 1 1 1	1 0 1 1 1	1 0 1 1 1	1 0 1 1 1	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
40	0 0 1 1 0	1 1 0 1 1 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1	1 0 1 0 1	1 0 1 0 1	1 0 1 0 1	1 0 1 0 1	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
42	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 1 1 0 1 0	1 1 0 0 1	1 0 0 0 0	1 0 0 0 0	1 0 0 0 0	1 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
44	1 1 1 1 1	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0

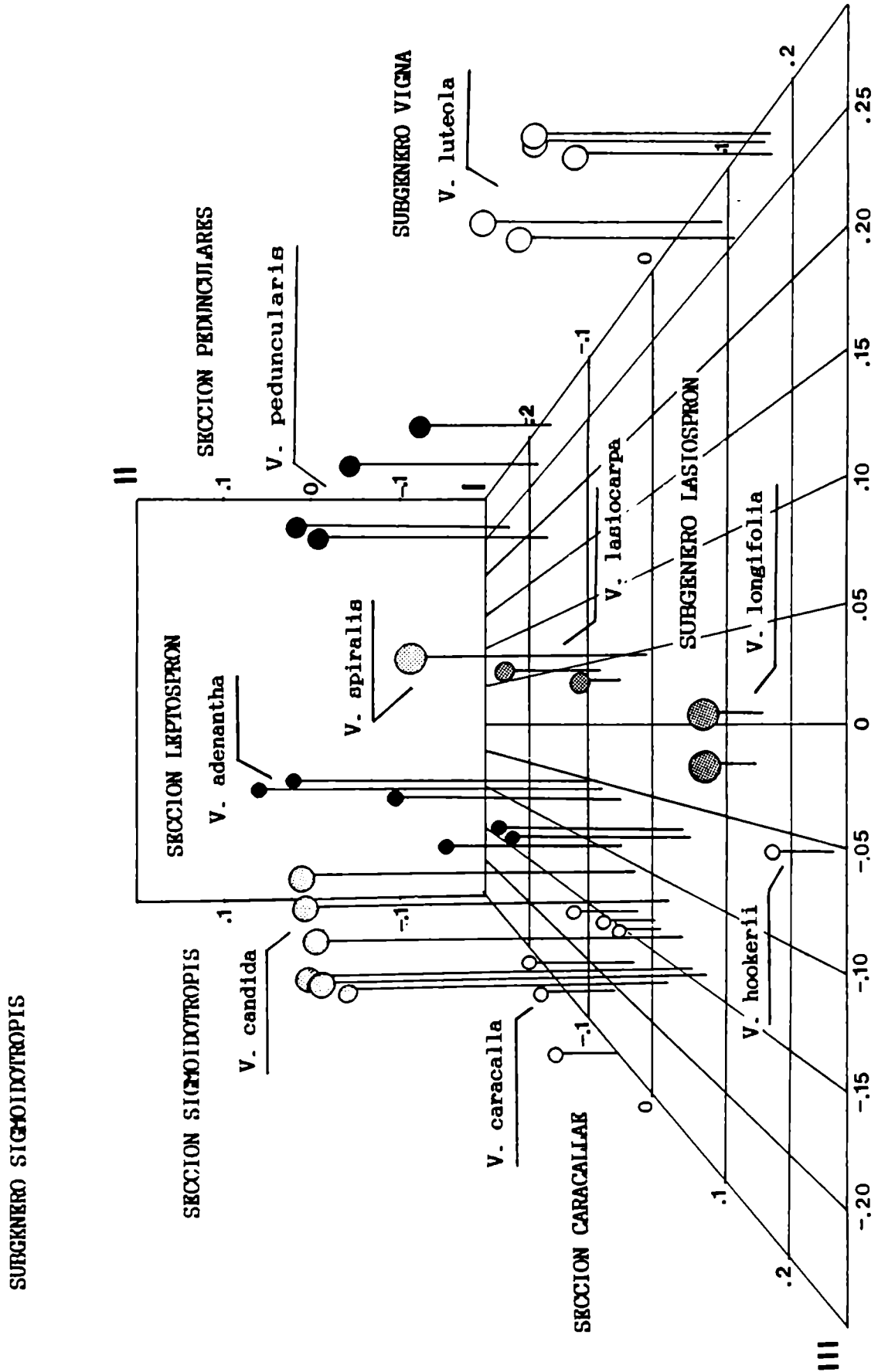
(1 = PRESENCIA ; 0 = AUSENCIA)

3.3.1.3. Análisis de agrupamiento (UPGMA/MCD)

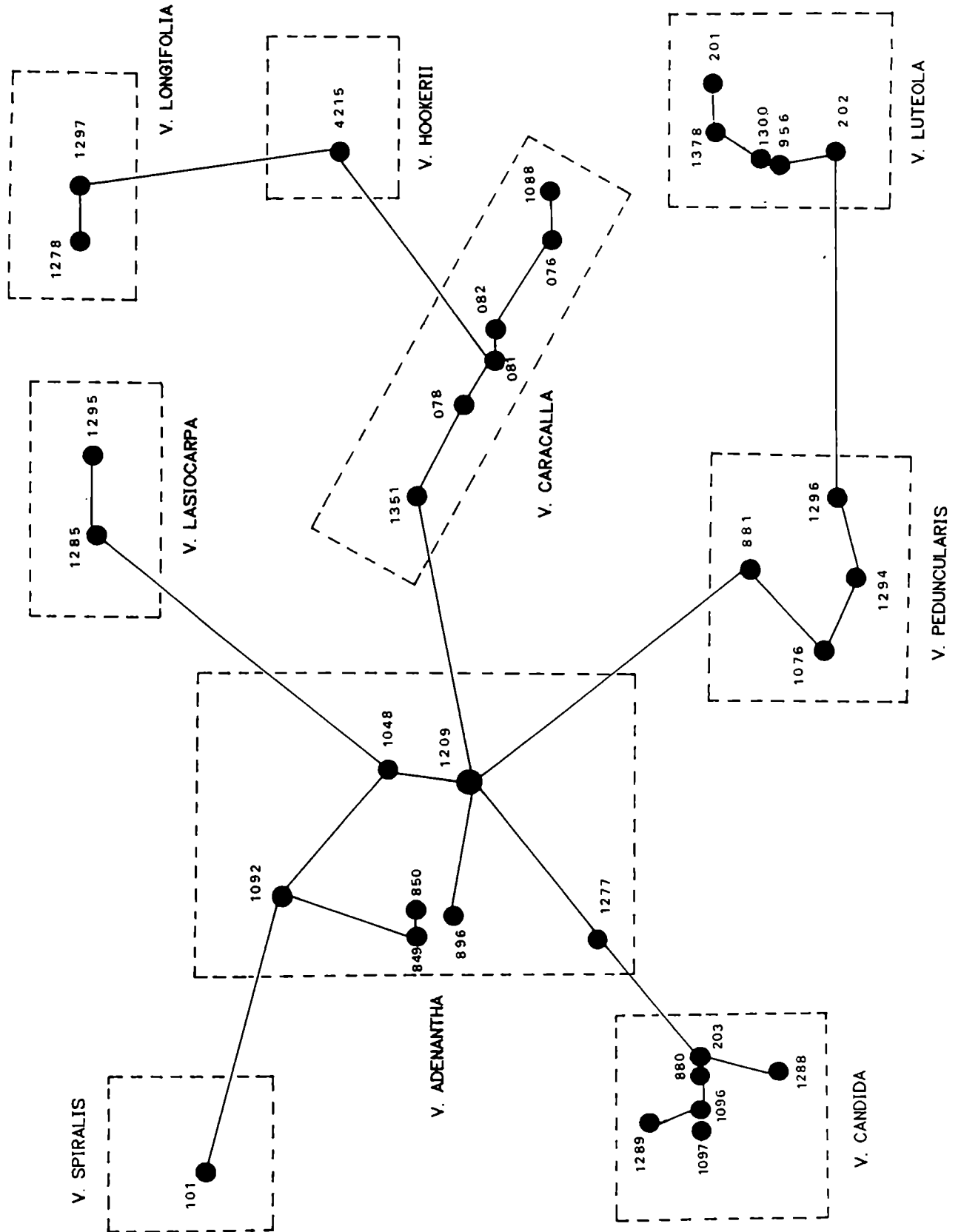


3.3.1.4. Análisis de Coordenadas Principales

(Variabilidad expresada por cada componente: I= 35.2 %, II= 21.2% y III= 16.1%)



3.3.1.5. Red Mínima



3.3.2. Géneros *Phaseolus* y *Dolichopsis*

3.3.2.1. Matriz Básica de Datos

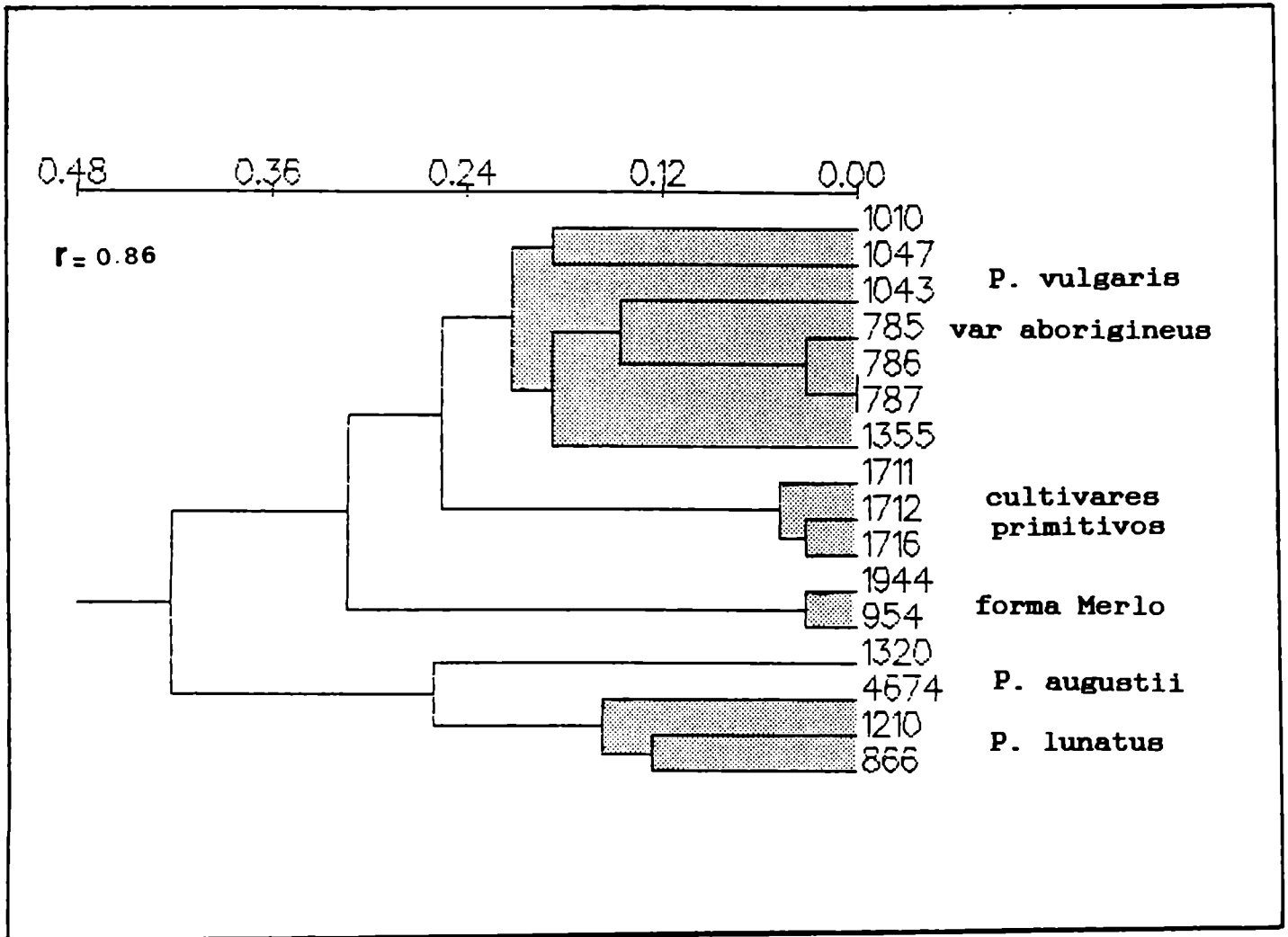
	NUMERO DE OTU																
	P. vulgaris var aborigineus			forma Merlo		cultivares primitivos			P. augustii	P. lunatus			D. paraguay.				
NUMERO DE FLAVON.	1 0 1 0	1 0 4 7	1 0 4 3	1 3 5 5	7 8 5	7 8 6	7 8 7	1 9 4 4	1 9 5 4	1 7 1 1	1 7 1 2	1 7 1 3	1 3 2 0	4 6 7 4	1 3 2 0	8 6 6 0	1 5 1 3
2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
4	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
5	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
6	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
7	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
13	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
17	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
22	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
23	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
27	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
28	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
29	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
31	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
41	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
42	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0

(1 = PRESENCIA ; 0 = AUSENCIA)

3.3.2.2. Matriz de Distancia (MCD)

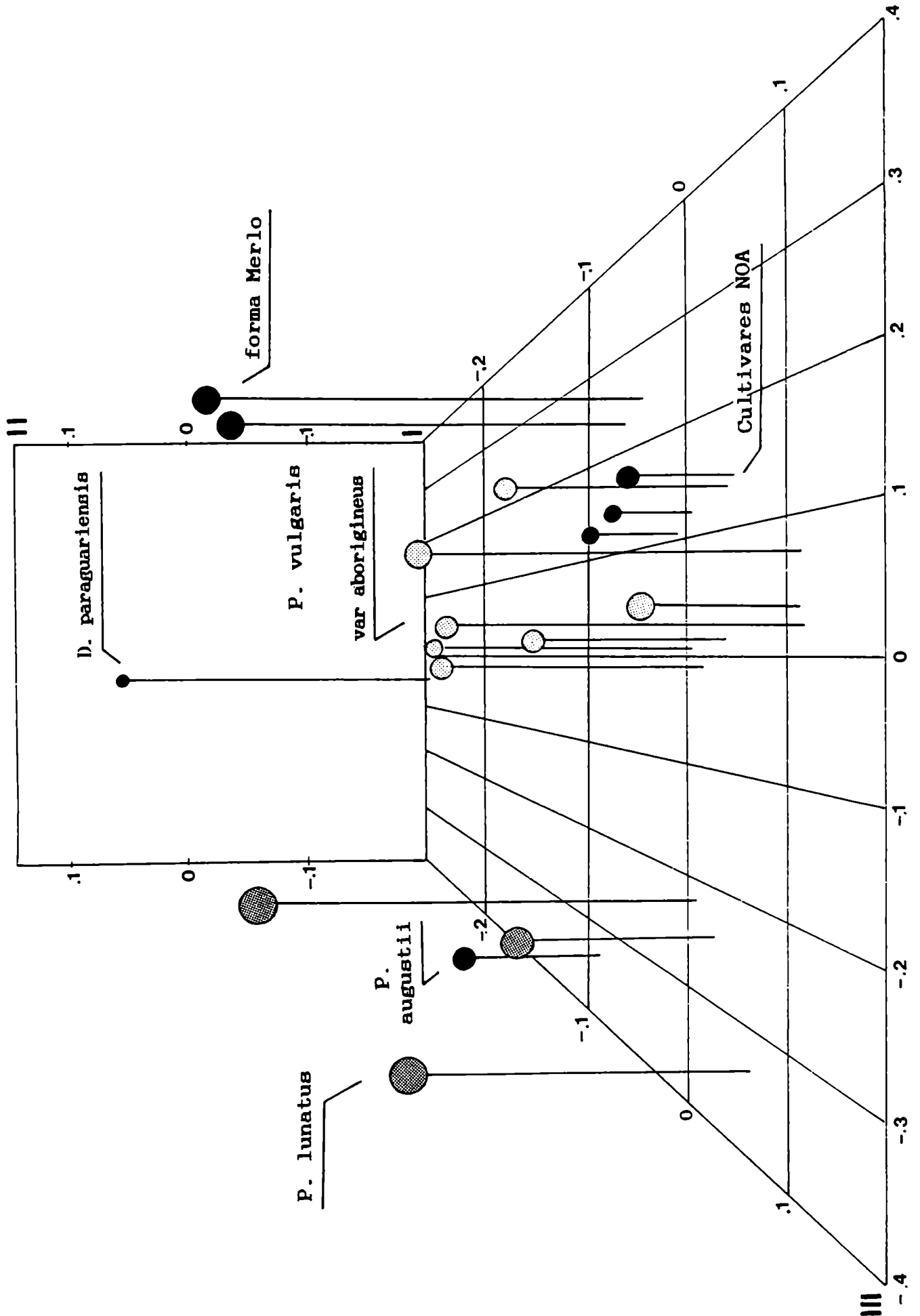
	1010	1047	1043	1355	785	786	787	1944	954	1320	4674	1216	866	1711	1712	1714
1010	0.000															
1047	0.188	0.000														
1043	0.188	0.250	0.000													
1355	0.250	0.188	0.250	0.000												
785	0.188	0.188	0.125	0.188	0.000											
786	0.219	0.219	0.156	0.156	0.031	0.000										
787	0.219	0.219	0.156	0.156	0.031	0.000	0.000									
1944	0.281	0.281	0.406	0.281	0.344	0.313	0.281	0.000								
954	0.250	0.313	0.375	0.250	0.313	0.281	0.313	0.625	0.000							
1320	0.531	0.531	0.406	0.469	0.344	0.313	0.313	0.594	0.594	0.000						
4674	0.500	0.438	0.438	0.313	0.375	0.344	0.344	0.594	0.563	0.219	0.000					
1218	0.344	0.406	0.344	0.344	0.281	0.313	0.313	0.563	0.531	0.250	0.156	0.000				
866	0.406	0.344	0.406	0.281	0.344	0.313	0.313	0.438	0.449	0.313	0.156	0.125	0.000			
1711	0.219	0.344	0.219	0.344	0.219	0.250	0.250	0.344	0.344	0.500	0.531	0.375	0.500	0.000		
1712	0.250	0.375	0.250	0.313	0.250	0.219	0.219	0.344	0.313	0.469	0.500	0.406	0.469	0.031	0.000	
1714	0.219	0.344	0.219	0.281	0.219	0.188	0.188	0.313	0.281	0.438	0.469	0.375	0.438	0.063	0.031	0.000

3.3.2.3. Análisis de agrupamiento (UPGMA/MCD)

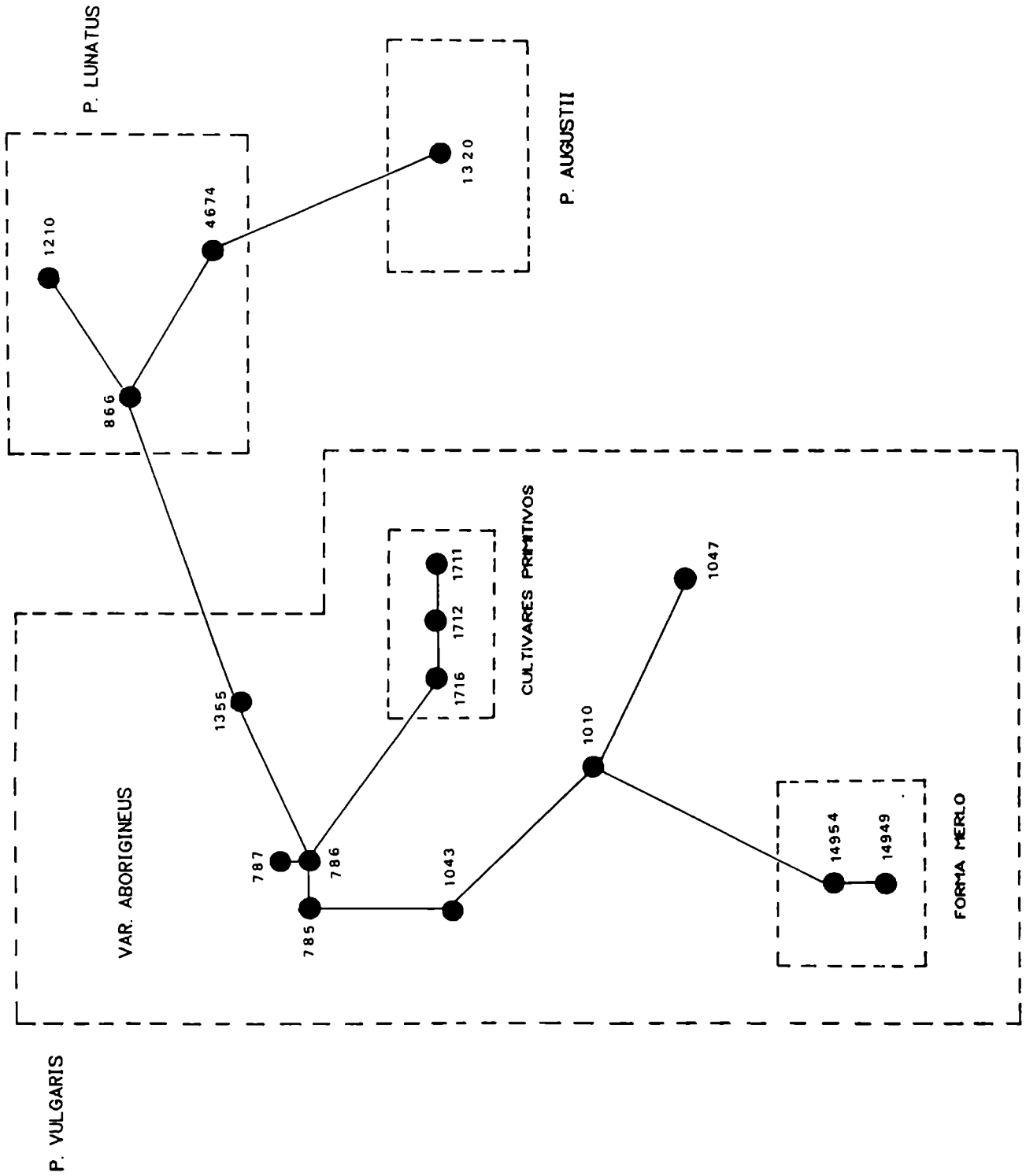


3.3.2.4. Análisis de Coordenadas Principales

(Variabilidad expresada por cada componente: I= 50.0 %, II= 20.8% y III= 12.3%)



3.3.2.5. Red Mínima



3.3.3. Género *Macroptilium*

3.3.3.1. Matriz Básica de Datos

NUMERO DE OTU	NUMERO DE FLAVONOIDE																																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	33	36	37	38	40	41	42						
<i>M. erythroloma</i>	0862	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	0867	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	0892	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
	1100	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
	1102	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1283	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
	1284	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
	1285	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1290	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	0879	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
<i>M. bracteatum</i>	0769	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	0921	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	1208	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
	1275	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	0222	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>M. fraternum</i>	1011	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1				
	1014	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1				
	1025	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	1046	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	0059	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1				
	0072	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	0073	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1				
	0079	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1				
	0080	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>M. prostratum</i>	0857	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0				
	0882	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0				
	1006	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0				
	1073	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0				
	1205	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0				
	1274	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	1287	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0				
	1291	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0			
	0844	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0			
<i>M. psammodes</i>	1282	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1				
	0900	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1					
	0909	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1					
	1071	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1					
	1083	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1					
	1090	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1					
	1009	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1					
	4163	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1					
	1279	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1					
1280	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1						
<i>M. lath. longe.</i>	0902	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0						
	0909	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0					
	0910	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0					
<i>M. pand.</i>	1325	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0						
	1493	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0					
	0066	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0					
<i>M. lath.</i>	0891	0	0	0	1																																					

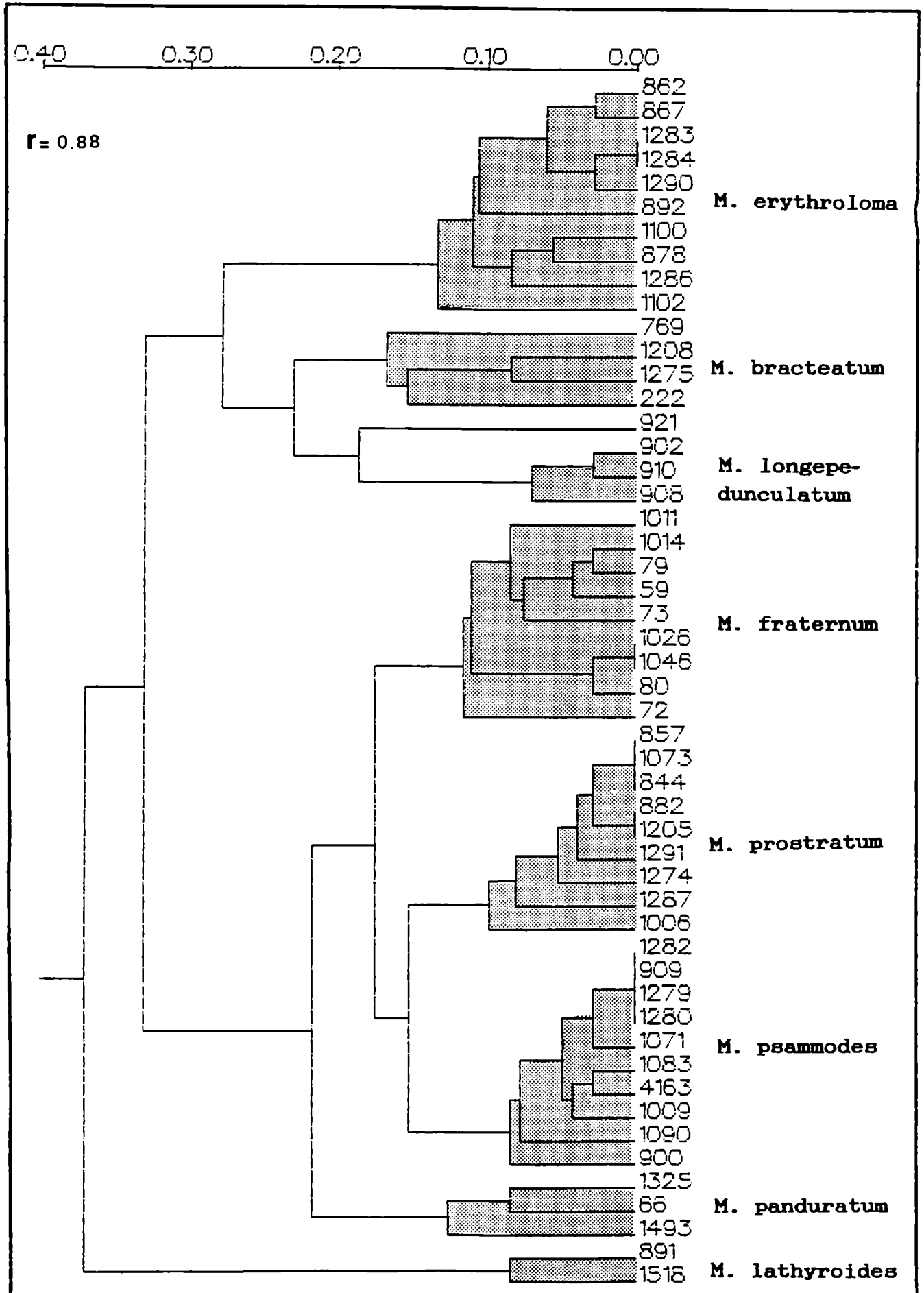
3.3.3.2. Matriz de Distancia (MCD)

	862	867	892	1100	1102	1263	1284	1286	1290	87E	769	921	1208	1275	222	1011	1014
862	0.000																
867	0.028	0.000															
892	0.139	0.139	0.000														
1100	0.167	0.167	0.167	0.000													
1102	0.083	0.083	0.083	0.139	0.000												
1263	0.056	0.056	0.056	0.111	0.139	0.000											
1284	0.083	0.083	0.083	0.111	0.139	0.083	0.000										
1286	0.056	0.056	0.056	0.111	0.139	0.056	0.083	0.000									
1290	0.083	0.083	0.083	0.111	0.139	0.083	0.056	0.056	0.000								
87E	0.062	0.062	0.062	0.111	0.139	0.062	0.083	0.083	0.083	0.000							
769	0.062	0.062	0.062	0.111	0.139	0.062	0.083	0.083	0.083	0.060	0.000						
921	0.194	0.194	0.194	0.250	0.278	0.194	0.222	0.222	0.222	0.250	0.250	0.000					
1208	0.167	0.167	0.167	0.222	0.250	0.167	0.194	0.194	0.194	0.222	0.222	0.063	0.000				
1275	0.167	0.167	0.167	0.222	0.250	0.167	0.194	0.194	0.194	0.222	0.222	0.063	0.063	0.000			
222	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.000		
1011	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.333	0.040	0.000
1014	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.389	0.056	0.111
1026	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.278	0.111	0.111
1046	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.278	0.111	0.111
59	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.111	0.056
72	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.278	0.167	0.111
73	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.306	0.083	0.083
79	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.361	0.083	0.083
80	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.361	0.139	0.139
857	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.306	0.194	0.250
882	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.278	0.167	0.222
1066	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.250	0.194	0.250
1073	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.306	0.194	0.250
1265	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.278	0.167	0.222
1274	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.361	0.250	0.194	0.250
1287	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.278	0.167	0.222
1291	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.278	0.167	0.222
844	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.306	0.194	0.250
1282	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.389	0.167	0.167
900	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.417	0.139	0.083
909	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.389	0.167	0.167
1071	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.361	0.184	0.194
1083	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.361	0.167	0.167
1090	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.111	0.111
1089	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.389	0.333	0.167	0.167
4163	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.361	0.139	0.139
1279	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.389	0.167	0.167
1280	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.444	0.389	0.167	0.167
902	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.167	0.167
908	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.250	0.250	0.250
910	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.194	0.194	0.194
1325	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.222	0.222	0.222
1493	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250
66	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.361	0.361	0.361
891	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.361	0.361	0.361
1518	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.361	0.361	0.361

	1026	1046	59	72	73	79	80	857	882	1006	1073	1205	1274	1287	1291	844	1292
1026	0.000																
1046	0.000	0.000															
59	0.111	0.111	0.000														
72	0.111	0.056	0.000														
73	0.083	0.083	0.056	0.000													
79	0.083	0.028	0.028	0.083	0.056	0.000											
80	0.028	0.139	0.139	0.139	0.111	0.000	0.000										
857	0.167	0.167	0.167	0.194	0.194	0.194	0.194	0.000									
882	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000	0.000								
1006	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.000	0.000	0.000							
1073	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000						
1205	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
1274	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
1287	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
1291	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
844	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
1282	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
900	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
1071	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
1083	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
1090	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
4163	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
1279	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
1280	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
902	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
908	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
910	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
1325	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
1493	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
66	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
891	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
1518	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.306	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

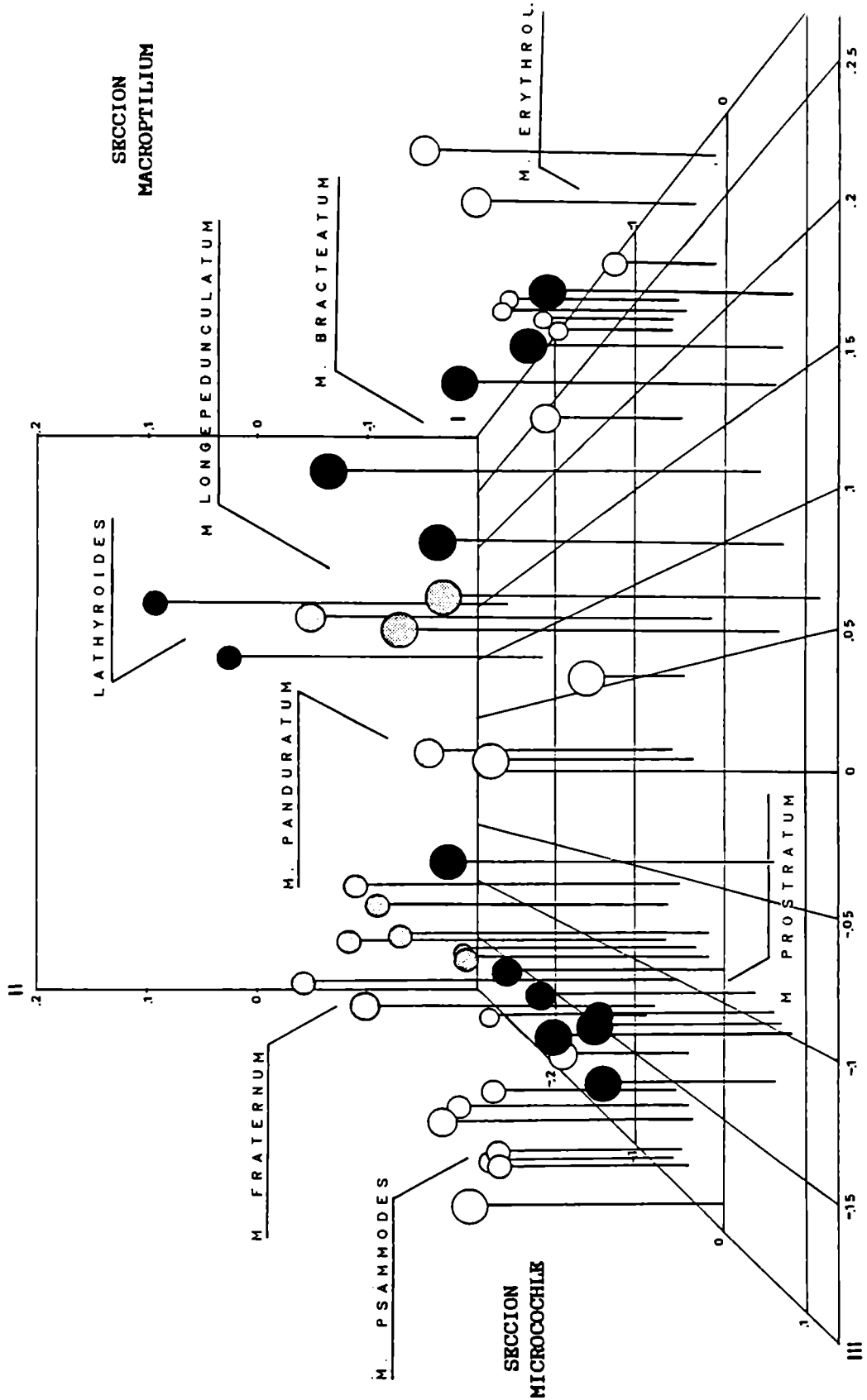
	900	909	1071	1083	1090	1099	4163	1279	1280	902	908	910	1325	1493	66	891	1518
900	0.000																
909	0.083	0.000															
1071	0.111	0.028	0.000														
1083	0.083	0.056	0.083	0.000													
1090	0.083	0.056	0.083	0.111	0.000												
4163	0.056	0.028	0.056	0.028	0.056	0.000	0.000										
1279	0.083	0.000	0.028	0.028	0.056	0.056	0.028	0.000									
1280	0.083	0.000	0.028	0.028	0.056	0.056	0.028	0.000	0.000								
902	0.250	0.333	0.361	0.333	0.278	0.333	0.306	0.333	0.333	0.000							
908	0.278	0.361	0.309	0.361	0.306	0.361	0.361	0.361	0.361	0.083	0.000						
910	0.278	0.361	0.309	0.361	0.306	0.361	0.361	0.361	0.361	0.083	0.000	0.000					
1325	0.194	0.167	0.194	0.167	0.222	0.167	0.139	0.167	0.167	0.167	0.194	0.194	0.000				
1493	0.278	0.250	0.222	0.250	0.306	0.250	0.222	0.250	0.250	0.306	0.333	0.333	0.139	0.000			
66	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.000		
891	0.389	0.361	0.306	0.389	0.361	0.306	0.389	0.389	0.361	0.389	0.389	0.361	0.333	0.361	0.417	0.389	
1518	0.472	0.444	0.472	0.389	0.444	0.444	0.417	0.444	0.444	0.333	0.417	0.361	0.278	0.361	0.500	0.472	0.000

3.3.3.3. Análisis de agrupamiento (UPGMA/MCD)

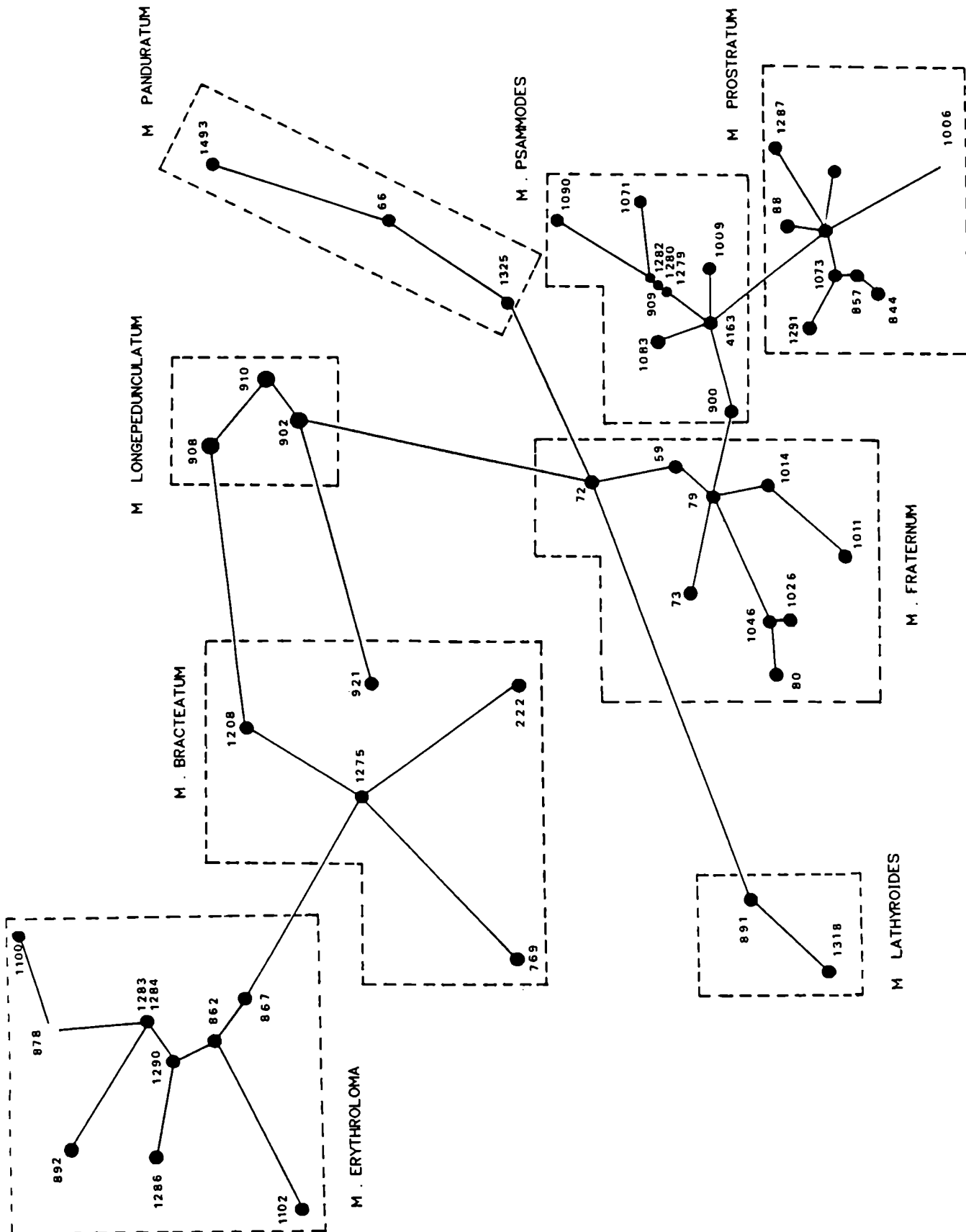


3.3.3.4. Análisis de Coordenadas Principales

(Variabilidad expresada por cada componente: I= 55.49 %, II= 21.95% y III= 14.42%)



3.3.3.5. Red Mínima



CAPITULO 4

DISCUSION

4.1. El género *Vigna* : discusión particular

4.1.1. Subgénero *Vigna*

Las principales características de este grupo están dadas por la presencia de estípulas bilobadas, prolongadas debajo del punto de inserción, y la simetría bilateral de la flor. Las flores presentan la quilla poco o nada curvada, sin bolsillos en el costado izquierdo, y el estilo presenta su porción engrosada recta o curvada (no más de 360°). El rostro de la quilla es inexistente, o bien muy corto. En este último caso, las flores pueden ser ligeramente asimétricas porque existe una ligera torsión del rostro que va acompañada por el estilo, aunque no es comparable a la gran asimetría que se observa en los otros subgéneros. El polen presenta las características típicas de *Vigna*, es decir una exina reticulada en forma de una malla de lúmenes amplios.

Es el subgénero más rico en especies, con una distribución esencialmente africano-malgache, aunque se considera que algunas especies devinieron secundariamente pantropicales (Maréchal et al., 1978a).

V. luteola, pantropical y único representante de este grupo en América, es una especie que en la Argentina crece desde el noreste del país hasta el área rioplatense, vegetando en terrenos pantanosos o inundables, aunque su distribución en el neotrópico se extiende hasta la costa de Florida, en Norteamérica.

De todas las especies de *Vigna* no cultivadas que pueden encontrarse en el continente americano se trata de la más próxima a los miembros del Viejo Mundo, dado que el subgénero **Vigna** abarca unas 38 especies (de las cuales 37 son paleotropicales) agrupadas en 6 secciones (Maréchal et al., 1978a).

El perfil cromatográfico de esta especie presentó como características únicas entre todas las estudiadas en este trabajo dentro de las Phaseolíneas argentinas, la presencia de un flavanonol que no pudo determinarse (44) y la ausencia de rutina (15).

Por lo demás, los flavonoides presentes resultaron correlacionables

con los encontrados en los otros grupos, aunque algunos son bastante poco frecuentes en *Vigna*, como la apigenina-7-O-Glucósido (20), o bien no se dan en ninguna otra especie del género pero sí en *Macroptilium*, como el canferol-7-O-ramnósido (26). Del mismo modo, es llamativa la ausencia de quercetina-3-O-soforósido (5), bastante común en *Vigna*.

Por lo demás, el perfil exhibe otros flavonoides característicos encontrados para todas las especies de Phaseolíneas: 3-hidroxi-4'-metoxiflavona (30) y quercetagetin-penta-metil-eter (31), aunque está ausente el garbanzol (32), una flavanona muy común en las especies americanas de *Phaseolus* y *Vigna*. Igualmente, la presencia de un grado de glicosidación complejo, dado por la presencia de isoramnínósidos (10 y 11), y la ocurrencia de flavonoides metilados como el mencionado (31) y los derivados de canferol y quercetina (27,29) determinan un perfil relativamente evolucionado con respecto al nivel general de las especies americanas del género, lo cual está de acuerdo con la posición taxonómica de este grupo básicamente paleotropical (Maréchal et al., 1978a).

4.1.2. Subgénero *Lasiospron*

Morfológicamente se diferencia por las estípulas apendiculadas o desigualmente bilobuladas en la base, poco prolongadas debajo del punto de inserción. Las flores presentan una quilla rostrada curvada en 270° (o al menos más de 180°), el estilo (no rostrado) presenta la porción engrosada curvada en 180°, y es escasamente barbado debajo del estigma, que es prácticamente terminal.

El polen es triporado, y presenta la exina en retículo formando amplias mallas.

El subgénero *Lasiospron* comprende tres especies: *V. lasiocarpa*, *V. longifolia* y *V. juruana*. La primera de ellas es neotropical mientras que las restantes crecen en el oeste de África y la zona este del Neotrópico. En nuestro país tienen su área más austral *V. longifolia* y *V. lasiocarpa*, que crecen a lo largo de pajonales pertenecientes a la Provincia Paranaense.

(correspondiendo a *V. juruana* (Harms) Verdcourt una distribución que abarca sólo el norte de Sudamérica desde Guyana a Brasil, y el oeste de África).

La principal característica cromatográfica resultó la presencia de quercetina-7-O-glucósido (24) en altas concentraciones, además de la existencia de glicósidos complejos como quercetina-3,7-di-O-glucurónico (9) y los isoramnínósidos (10 y 11), y también el mismo tipo de flavonol metilado (canferol 3-O Me).

Por lo demás, ambas especies poseen perfiles bastante diferenciados, lo que determina una cierta inconsistencia en su agrupamiento.

Tanto en el análisis de cluster [3.3.1.3.], como en el ordenamiento por PCO [3.3.1.4.] existe un grado diferente de distancia respecto al subgénero **Sigmoidotropis**: mientras *V. longifolia* presenta una mayor proximidad a *V. hookeri* (sección **Caracallae**), *V. lasiocarpa* presenta un perfil más distante respecto a este subgénero típicamente americano.

Maréchal et al.(1978a), basados en caracteres morfológicos y palinológicos crearon este subgénero (al que consideran americano) separándolo del subgénero **Vigna**, donde había sido incluido por Verdcourt (1970a) como una sección del mismo. Sin embargo, reconocen que se trataría de un grupo neotropical muy afín a especies de *Vigna* del Viejo Mundo, en particular a miembros de los subgéneros **Plectotropis** y **Ceratotropis**, que presentan una quilla rostrada netamente asimétrica, un carácter muy marcado también en *V. lasiocarpa*.

Lackey (1983) en su redefinición del género *Vigna*, estableció nuevamente la inclusión de **Lasiospron** dentro del subgénero **Vigna**, señalando la mayor afinidad con las especies del Viejo Mundo.

En todo caso, las evidencias químicas señalarían que la relación es bastante más compleja, dado que no parece haber demasiada similitud con el único representante del subgénero **Vigna** (*V. luteola*) aquí estudiado, aunque debe tenerse en cuenta que la especie estudiada, *V. luteola*, pertenece a la sección **Vigna**, la más primitiva de ese subgénero. Por lo tanto, creemos que resulta conveniente por el momento seguir considerando **Lasiospron** como un grupo distinto al subgénero **Vigna**. En particular, considerando que los perfiles de flavonoides indican una afinidad cierta y diferencial respecto a las secciones de **Sigmoidotropis**.

Incluso los resultados observados en los agrupamientos sugerirían la conveniencia de establecer dos secciones en **Lasiospron**, que comprendieran a *V. lasiocarpa* por un lado, y a *V. longifolia* y *V. juruana* por el otro. Ya Maréchal et al.(1978a) habían señalado en base a los coeficientes de similitud resultantes de su análisis multivariante, que existe una menor afinidad entre *V. lasiocarpa* y las otras dos especies, mucho más próximas entre sí, aunque no consideraron una división en secciones.

Aunque es particularmente llamativa la falta de correlación existente en este caso entre los caracteres morfológicos y los bioquímicos, resultaría necesario relevar un número de individuos más significativo ampliando el muestreo de poblaciones, para sacar

conclusiones respecto al estatus taxonómico de estas especies en base a los flavonoides, y desde ya, encarar un estudio similar respecto a las especies africanas y asiáticas, en particular de los subgéneros *Vigna*, *Plectotropis* y *Ceratotropis*.

4.1.3. Subgénero *Sigmoidotropis*

4.1.3.1. Sección *Sigmoidotropis*

Las especies argentinas correspondientes a esta sección son *V. candida* y *V. spiralis*.

La primera de ellas es una enredadera con flores grandes, muy vistosas, de color blanco y violáceo, que se agrupan en racimos alargados de nudos engrosados, y que crece en el NE argentino, Paraguay y Brasil.

Respecto a *V. spiralis*, es una especie descrita originalmente por Piper (1926) bajo *Phaseolus*, cuya presencia en la flora argentina era dudosa (Burkart, 1952). Sin embargo, el material aquí estudiado confirma la presencia de esta especie en nuestro país, y fue determinado a partir de un ejemplar de Ahumada (N°4623) coleccionado en la provincia de Jujuy, inicialmente catalogado como *V. candida* por el autor (P. Hoc, comunicación personal).

Este grupo se caracteriza por las estípulas no prolongadas por debajo de su punto de inserción. Las flores presentan una quilla rostrada, laxamente curvada semejando una letra S, sin completar un círculo completo. La porción engrosada del estilo está curvada 180°, y es fuertemente barbado debajo del estigma. Este es no rostrado, y tiene una posición lateral a subterminal.

El polen es típicamente triporado, con una exina reticulada, con lúmenes amplios, irregulares.

El perfil cromatográfico de *V. candida* resulta particular por la presencia de isoramnetina-3-O-galactósido (18) y quercetina-3-O-galactósido (19), como por la abundancia de garbanzol (32), características presentes en *Phaseolus*.

En *V. spiralis* resalta la ausencia de canferol-3-O-rutinósido (14) como principal característica, además de la presencia de canferol-3-O-rutinósido-7-O-glucurónico (1), un carácter también compartido por *V. adenantha* y *V. peduncularis*.

Los perfiles cromatográficos obtenidos permitieron corroborar que se trataba de dos especies diferentes, aunque bastante afines.

Maréchal et al. (1978a) restringieron la sección **Sigmoidotropis** de Piper (1926), separando la sección **Pedunculares** y pasando un par de especies (*P. vignoides* y *P. linearis*) a **Caracallae**.

Lackey (1983) mantiene el criterio de Piper respecto a sostener una gran sección **Sigmoidotropis**, que incluya *V. peduncularis*.

En este caso, el análisis de agrupamiento pone de manifiesto la afinidad existente entre *V. candida*, *V. caracalla* y *V. adenantha*, pero resulta incontrastable, desde el punto de vista de los caracteres bioquímicos, que *V. peduncularis* es un grupo distinto a los otros, tal como sostienen Maréchal et al. (1978a).

Respecto a la sección **Sigmoidotropis** resulta interesante el hecho que presente una afinidad diferencial respecto a **Caracallae** y **Leptospron**: de acuerdo al análisis de agrupamiento [3.6.1.3.], *V. adenantha* se asocia a *V. spiralis* y a este núcleo se incorpora *V. candida*, aunque la distancia es muy breve. En cualquier caso, resulta evidente la mayor afinidad de **Sigmoidotropis** con **Leptospron**, y las evidencias químicas no validarían, como sostiene Lackey (1983), mantener el subgénero **Cochliasanthus** abarcando a *V. caracalla* y *V. adenantha*. El análisis por PCO sugiere las mismas conclusiones, dado que puede observarse [3.3.1.4.] la mayor afinidad entre *V. candida* y *V. adenantha* respecto a *V. caracalla* y *V. hookeri*.

4.1.3.2. Sección **Caracallae**

V. caracalla y *V. hookeri* son especies con una distribución muy disímil en nuestro país. Mientras la primera es relativamente abundante en las selvas del noroeste y el noreste, la segunda ha sido hallada en muy contadas oportunidades en las selvas marginales del río Uruguay, en el sur de la provincia de Entre Ríos o en la ribera del Río de la Plata (Burkart*, 1987).

Desde el punto de vista de su morfología la sección se caracteriza por la presencia de estípulas no prolongadas debajo del punto de inserción, las flores con una quilla espiralada en su extremo, dando 5 a 7 vueltas completas (1800° a 2500°) y sin bolsillos. El estilo presenta su porción engrosada incurvada en 180-340°, es no rostrado, y el estigma es terminal.

Ambas especies se diferencian bien por el tamaño y color de las flores (*V. caracalla* presenta flores grandes violáceas y blancas, muy perfumadas, mientras que las de *V. hookeri* son amarillas y más reducidas) y por la forma de los folíolos (trilobulados en *V.*

hookerii).

El polen tri o biporado presenta una exina reticulada en forma de amplias mallas, con muros altos, típica de este grupo (Stainier y Horvat, 1978).

Si bien la sección **Caracallae** fue fundada por De Candolle (1825) bajo *Phaseolus*, Verdcourt (1970a) en su revisión de las **Phaseolinae** decidió su traspaso al género *Vigna*, como un nuevo subgénero que denominó **Cochlianthus** manteniendo la denominación utilizada por Piper (1926).

El análisis de agrupamiento en base a los caracteres químicos indica una clara afinidad, dada por toda una serie de di y triglicósidos en común (2,4,5,6,9,10,14,15), como asimismo por la presencia de 3-hidroxi-4'-metoxiflavona (30), quercetagetin-penta-metil-éter (31), garbanzol (32) y el isoflavonoide irigenina (40). Una de las características más notables de este grupo resultó la presencia de Canferol-3-O-triglucósido-7-O-ramnósido (3), un flavonoide que prácticamente no fue hallado en otros miembros de la subtribu **Phaseolinae**, salvo en algunos individuos de *Macroptilium bracteatum*.

Resulta igualmente de interés la presencia en *V. caracalla* de Isoramnetina-3-O-galactósido (18), un flavonoide que está presente solamente en las especies de *Phaseolus* y en *Macroptilium erythroloma*, y sólo en *V. candida* dentro de éste género.

El análisis numérico presentó, según la metodología, resultados variables respecto a la distancia entre *V. caracalla* y *V. hookeri*, pero en ambos métodos fue bastante alta, un hecho que se correlaciona fácilmente con las diferencias existentes a nivel de la morfología floral entre estas dos especies.

Asimismo queda evidenciada una relativa afinidad entre *V. hookeri* y *V. longifolia*, es decir entre los subgéneros **Lasiospron** y **Sigmoidotropis**, a través de este nexa que sería *V. longifolia*.

4.1.3.3. Sección Pedunculares

Como se mencionó anteriormente [4.1.3.1.], Maréchal et al. (1978b) crearon esta sección restringiendo la sección **Sigmoidotropis**.

Se basaron en la longitud del estandarte (no mayor a los 2 cm), la curvatura del rostro de la carena, próxima a 180° y la prolongación del estilo por encima del estigma en un pico corto y recto. El polen presenta características particulares: es tricolporado, y la exina forma un retículo de lúmenes pequeños.

El perfil de flavonoides de *V. peduncularis* presenta como característica diferencial la presencia de quercetina-3-O-

genciobiósido (16). Otros rasgos remarcables son la abundancia de quercetina-3-O-glucósido-7-O-rutinósido y la presencia de quercetina-7-O-glucósido (24), como también quercetina-3-O-galactósido (19), apigenina-7-O-glucósido (20), canferol-3-O-xilosilglucósido (12), canferol-3-O-rutinósido-7-O-glucurónico (1) y miricetina-3-O-glucósido (21), un flavonoide tri-hidroxilado en el anillo B que es muy poco frecuente entre las especies aquí estudiadas.

El análisis de agrupamiento presenta a *V. peduncularis* como la especie más afín a *V. luteola*, aunque a una distancia relativamente alta. Esto se ve reforzado por la posición que alcanza en la distribución de PCO, donde aparece como un grupo muy bien definido y distante de las otras secciones de **Sigmoidotropis**.

Tal como afirman Maréchal et al. (1978) **Pedunculares** sería la sección americana más próxima a las secciones africanas y asiáticas de **Sigmoidotropis**, aunque puede separarse bien de **Ceratotropis** y **Plectotropis** por la forma de la carena, la prolongación del estilo y la contracción del raquis de la inflorescencia. Aunque sería necesario encarar un estudio similar de las secciones paleotropicales para comprobar estas afirmaciones, tanto el hecho de mantener una posición en el extremo de la distribución del subgénero **Sigmoidotropis**, como su llamativo agrupamiento en las proximidades del subgénero **Vigna**, un grupo típicamente del Viejo Mundo aquí representado por *V. luteola*, permiten suponer que, en efecto, existen dichas relaciones.

4.1.3.4. Sección **Leptospron**

V. adenantha, una de las especies más conflictivas en cuanto a su inserción dentro del complejo *Vigna-Phaseolus*, es la única especie que conforma esta sección.

Es una enredadera selvática, neotropical, de flores medianas blanco-amarillentas, que habita en las selvas del NO y NE de la Argentina, con su límite sur de distribución en las costas de Buenos Aires y el Uruguay.

Las flores, asimétricas, tienen el rostro de la quilla y el estilo estrechamente espiralados, formando una vuelta casi completa (270° a 360°). La quilla presenta bolsillos en el costado izquierdo, mientras que el estigma es terminal y está rodeado por un anillo de pelos estilares.

El polen, tricolporado, presenta una exina verrucada, sin la típica ornamentación reticulada de **Sigmoidotropis**, y del género *Vigna*.

La sección *Leptospron* Bentham para el género *Phaseolus*, que Verdcourt (1970a) había dejado en ese género, fue sin embargo transferida por Maréchal et al. (1978b) a *Vigna*, por considerar estos autores que existían caracteres comunes a *Sigmoidotropis*, más allá del polen y la forma del estilo, bastante próximos a *Phaseolus*.

La presencia de glándulas en el raquis de la inflorescencia, la existencia de brácteas y bracteolas caducas, la formación de un engrosamiento lateral, las alas relativamente alargadas, la espiralización muy larga del rostro de la quilla y del estilo, fueron algunos de los caracteres de más peso tenidos en cuenta para trasladar *Leptospron* al género *Vigna*.

Este cambio fue aceptado por autores posteriores (Lackey, 1983) aunque sin coincidir en cuanto al nivel de sección propuesto inicialmente.

El perfil cromatográfico de *V. adenantha* evidencia algunas características de *Phaseolus*, como la presencia de quercetina-3-O-galactósido (19), la flavanona garbanzol (32) o la presencia de isoramnetina-3-rutinósido (17).

Sin embargo, en líneas generales, su perfil corresponde a *Vigna*. En efecto, (19) es raro dentro de *Vigna*, pero se da también en *V. peduncularis* y *V. candida*, y por otro lado presenta una frecuencia menor al 25 % en *V. adenantha*.

Respecto a (32) es bastante frecuente en *Vigna*, aunque no en tan alta concentración como en *Phaseolus*, detectándose en el caso de *V. adenantha* valores en un rango intermedio.

(17) es un glicósido presente en *P. augustii* y *P. vulgaris*, pero también bastante común en el género *Macroptilium*.

El análisis de agrupamiento [3.3.1.3.] demostró una alta variabilidad intraespecífica, y como se mencionó anteriormente [4.1.3.1.] la mayor afinidad corresponde a la interrelación con la sección *Sigmoidotropis*.

En cuanto a su posición respecto a las otras secciones de *Vigna*, y sobre todo a *Phaseolus*, será discutido más adelante en [4.1.4.] y [4.4.4.] respectivamente.

4.1.4. Interrelaciones a nivel infragenérico en *Vigna*

A partir del análisis mediante técnicas numéricas efectuado para todas las OTU's correspondientes a las nueve especies que se han descrito para el género *Vigna* en nuestro país, puede considerarse que en líneas generales, los resultados son consistentes con el esquema propuesto por Maréchal et al. (1978a).

Los datos bioquímicos permiten probar la validez de dicha clasificación en cuanto a los taxones comprendidos en el presente estudio, aunque no podemos dejar de considerar que se trata de un aporte parcial, dada la amplia distribución mundial del género y el alto número de especies que no son oriundas del país.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante el análisis de agrupamiento y a partir de la distribución de PCO, se evidencian los puntos de contacto con la clasificación en subgéneros y secciones de Maréchal et al. (1978a) en los aspectos que a continuación se discuten.

Dentro del gran subgénero americano **Sigmoidotropis**, las secciones estudiadas presentaron afinidades diferenciales en el agrupamiento. Se observan tres grupos: **Pedunculares**, el más alejado y con afinidades químicas con el subgénero **Vigna**, típicamente africano. En segundo término, **Leptospron** (*V. adenantha*) que resulta más próximo a la sección **Sigmoidotropis** (*V. candida* y *V. spiralis*), y por último, la sección **Caracallae**, que presentó una mayor distancia respecto a **Sigmoidotropis**, en particular *V. caracalla*, que ocupa un extremo distante de la distribución.

Por otra parte, el subgénero **Lasiospron** (y en particular *V. longifolia*) a una distancia más próxima a **Sigmoidotropis** que el subgénero **Vigna**.

Observando el esquema obtenido por Maréchal et al. (1981) donde representan las relaciones infragenéricas en *Vigna* [FIGURA 4.4.3.A] puede concluirse que los resultados obtenidos, en particular la distribución de PCO, llevan prácticamente a las mismas conclusiones. Sin embargo, en el caso del agrupamiento por UPGMA hay dos detalles interesantes que quedan resaltados: dentro de **Lasiospron** existe una marcada diferencia entre las dos especies estudiadas en cuanto a la afinidad con **Sigmoidotropis**, dado que *V. longifolia* llega incluso a integrarse en este grupo a poca distancia con *V. hookeri*, y por otro lado, es notoria la diferencia en la posición de *V. peduncularis* respecto a las otras secciones del subgénero **Sigmoidotropis**, un hecho que se destaca por su agrupamiento en el dendrograma junto a *V. luteola*.

Si bien esto último está de acuerdo con los resultados de Maréchal et al. (1978a) respecto a la posición de *V. peduncularis* en relación a los grupos del Viejo Mundo, en el primer caso la situación aparece como más compleja de explicar.

Sin embargo estos autores ya habían señalado la existencia de una marcada diferencia dentro del subgénero **Lasiospron** entre *V. lasiocarpa* y *V. longifolia*: en términos generales, las evidencias químicas confirman esta presunción, aunque en este caso el valor obtenido es bastante más alto, al punto que permitirían sugerir la

posibilidad de introducir aquí una categorización en secciones. De esta forma, la relación de *Lasiospron* con *Sigmoidotropis* no sería a través de la sección **Pedunculares** como representa el esquema de Maréchal et al. antes mencionado, sino a través de *V. longifolia*. Si se tiene en cuenta la afinidad de esta última con *V. hookeri*, resulta factible buscar aquí el nexo entre estos dos subgéneros.

Por último, es necesario efectuar una aclaración respecto a la sección **Condylostylis** (Piper) Maréchal, Mascherpa y Stainier (1978b) y su probable presencia en nuestro país. Si bien existe una cita de un ejemplar de *V. venusta* (Piper) Maréchal, Mascherpa y Stainier (1978a y b) para la República Argentina (T.M. Pedersen 473 [BR]) la revisión de un duplicado de dicho ejemplar remitido por el colector permitió determinarlo como *V. candida* (R. Palacios, com. pers.), por lo que consideramos que *V. venusta* no ha sido hallada en la Argentina hasta el presente.

4.2. El género *Phaseolus* : discusión particular

4.2.1. *Phaseolus vulgaris*

La especie tipo del género *Phaseolus* se caracteriza por ser una planta anual, con flores blancas, rosadas o violáceas que se distinguen por presentar bracteolas de gran tamaño que cubren el cáliz completamente, siendo persistentes en el fruto.

La variedad silvestre descrita por Burkart (1953) es una planta voluble, de floración tardía, con frutos más pequeños y muy dehiscentes, que habita en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy.

Los perfiles cromatográficos de las poblaciones relevadas de *P. vulgaris* var *aborigineus* resultaron bastante homogéneos, como puede deducirse del hecho de que no existen flavonoides con frecuencias de presencia inferiores al 25%, siendo que la mayor parte de los compuestos están presentes en un 60 a 100% de los individuos [3.2.2.].

La principal característica de esta especie está dada por la presencia de canferol-3-O-rutinósido (14), rutina (15), isoramnetina-3-O-galactósido (18) y quercetina-3-O-galactósido (19), además de una alta concentración de garbanzol (32), un carácter distintivo del género.

Aunque se ha citado para esta especie la presencia de Canferol-3-O-xilosilglucósido (Harborne, 1967), este flavonoide no pudo ser detectado en ninguna de las muestras analizadas, por lo que sería un caracter sólo estabilizado en algunas variedades cultivables pero ausente en las formas silvestres.

Otra característica importante de esta especie es la ausencia de flavonoides con alto grado de glicosidación y de isoramninósidos, que sí pueden hallarse en *P. lunatus* o *P. augustii*.

Dado que se trata de una especie compleja por su relación con la actividad humana, sobre todo considerando que se viene manejando con cierto sentido genético desde épocas pre-hispánicas, se encaró un estudio comparativo con líneas de cultivares primitivos obtenidos en el NOA. Simultáneamente, la existencia de una cita para la localidad de Merlo (Pcia. de San Luis) presenta un gran desplazamiento hacia el sur, muy alejada de los valles húmedos de las laderas orientales de la Cordillera de los Andes que constituyen el centro de distribución de la variedad *aborigineus*. Esta situación planteó interrogantes acerca de la jerarquía taxonómica de estas procedencias y su relación con los cultivares primitivos del NOA.

El análisis cromatográfico de los flavonoides foliares de la forma de Merlo y de los cultivares primitivos del NOA demostró la existencia de diferencias respecto a la variedad silvestre, aunque en ambos casos se mantuvieron las características antes mencionadas para la especie, esto es la presencia de 18, 19 y 32.

El perfil de los cultivares primitivos puede considerarse bastante afín al de la var. *aborigineus*, aunque aparecen dos nuevos flavonoides, luteolina-7-O-glucósido (43) y el isoflavonoide irigenina (40), y no se detectó quercetina-3-O-glucósido (7), luteolina-7-O-galactósido (23), canferol-3-OMe (29), daidzeína-7-O-glucósido (42) ni la flavanona 41, siendo la mayor parte de estos flavonoides de frecuencia intermedia en la variedad *aborigineus*. De este modo, tal como evidencia el análisis de agrupamiento los cultivares del NOA resultan un grupo más próximo a la variedad *aborigineus* que la forma de Merlo, que se une a mayor distancia [3.3.2.3.].

Del mismo modo, el ordenamiento por PCO [3.3.2.4.] indica claramente la posición relativa entre los tres grupos, donde los cultivares primitivos quedan evidentemente más próximos a los silvestres, y las procedencias de Merlo parecen distanciarse hacia un extremo de la distribución.

El perfil característico de las formas de Merlo es bastante distinto respecto al de la variedad *aborigineus*, tanto por la aparición de flavonoides diferentes, como isoramnetina-3-rutinósido

(17), 4',7-dihidroxi-flavona-7-O-ramnogluco-sido (13), o por la alta concentración de canferol-3-OMe (29), como por la pérdida de otros muy comunes en este grupo tales como robinina (4), quercetina-3-OMe (27), diosmetina (28), quercetina-3-O-glucósido-7-O-rutinósido (7), acacetina-7-O-galactósido (22), luteolina-7-O-galactósido (23) o la flavanona 41.

Sin embargo, observando los perfiles cromatográficos resulta claro que la procedencia de Merlo deriva de la variedad silvestre y que su relación con los cultivares primitivos es más lejana, como queda representado en el diagrama de árbol mínimo [3.3.2.5.], aunque resultaría, a diferencia de lo que sostuvo Burkart (1952) una entidad taxonómica diferente a la var. *aborigineus*.

Debe destacarse el hecho de que tanto los cultivares primitivos como la forma de Merlo presentan una disminución en cuanto al número de flavonoides respecto a la variedad silvestre, algo explicable por la pérdida de variabilidad que acompaña los procesos de selección de líneas de cultivo.

Por otro lado es notable la modificación del perfil en las procedencias de Merlo, lo que puede correlacionarse con las distintas condiciones ecológicas de la zona, en particular la adaptación fotoperiódica requerida en una latitud más alta.

Estudios relativos a la morfología foliar y de las semillas, como del polimorfismo electroforético de las proteínas seminales también evidenciaron que la forma de Merlo presenta características diferenciales respecto a los cultivares primitivos del NOA y con la variedad *aborigineus* (Menéndez Sevillano et al., 1992a y 1992b) aunque parecen ubicarla en una posición más equidistante que los caracteres químicos.

Según estas conclusiones, la forma de Merlo podría corresponder a los tipos asilvestrados de poroto común, ya mencionados para otros centros de origen (Toro et al., 1990).

4.2.2. *Phaseolus lunatus* y *Phaseolus augustii*

P. lunatus y *P. augustii* son dos especies vecinas que completan la distribución del género *Phaseolus* en la Argentina, aunque no son tan conocidas como la anterior, siendo mucho menos abundantes en las colecciones y en el campo.

P. lunatus presenta flores blanco-verdosas agrupadas en racimos cortos, con bracteolas calicinales caducas y pequeñas. Es una especie cuya distribución geográfica no está muy bien definida.

Su habitat estaría enmarcado en el bosque de transición, bosque verde en verano o bosque pedemontano micrófilo (Vervoorst, 1982) que en las provincias de Salta y Jujuy se conoce como **bosque de palo blanco**, o como **cebilar** en el sur de Salta y Tucumán (Palacios y Vilela, 1991). Pese a ser un tipo de formación vegetal que está desapareciendo rápidamente para el uso agrícola del terreno, y considerando la importancia económica de esta especie, el material genético silvestre (*P. lunatus* var *sylvester*) ha recibido muy poca atención de parte de los fitomejoradores de poroto en nuestro país (Palacios y Vilela, 1991), resultando prácticamente desconocido en los bancos de germoplasma.

Por otra parte, *P. augustii*, es una liana bianual o perenne, pubescente, de hojas grandes, con folíolos ovalados y flores de un color violáceo oscuro, las cuales se agrupan en racimos pedunculados y bastante largos (de unos 30 a 40 cm), siendo estas características las que permiten diferenciarla bien de la especie anterior, además de los frutos hirsutos.

Se trata de una especie de la cual se conocen muy pocos ejemplares de herbario en la Argentina (Palacios y Vilela, 1991).

El análisis cromatográfico de los flavonoides foliares permitió elaborar el perfil de cada especie [3.2.2.].

Ambos resultaron bastante afines entre sí, como distantes de *P. vulgaris* var *aborigineus*.

La ausencia de isoramnetina-3-galactósido (18) y la presencia de quercetina-3-O-genciobiósido (16) junto con la aparición de otros glicósidos más complejos en las dos especies, como quercetina-3,7-O-diglucurónico (9) y un isoramninósido (11), marcan la diferencia con *P. vulgaris*.

Aunque es evidente la afinidad de estas dos especies entre sí, se puede considerar que la mayor riqueza de *P. augustii* [que presenta canferol-3-O-diglucósido-7-O-glucósido (2), canferol-7-O-glucosilramnósido (25) e isoramnetina-3-O-rutinósido (17)], indica que estamos en presencia de dos especies distintas, pero muy relacionadas, probablemente por un origen común y un proceso de especiación bastante reciente.

De hecho, se ha mencionado la posibilidad que ambas especies tendrían de formar híbridos fértiles en cruzamientos artificiales (Fehleisen, com. per., Fac. Agr., Jujuy, citado en Palacios y Vilela, 1991), algo que no ocurre en la naturaleza dado que no comparten un mismo habitat.

Respecto a su distribución geográfica, *P. augustii* se extiende a lo largo de las laderas andinas, superponiéndose espacialmente con *P. vulgaris* var *aborigineus*, aunque en general tiende a ocupar lugares más altos y secos.

A lo largo del proceso de especiación, esta adaptación permitió disminuir la competencia interespecífica, y llevó a la selección de caracteres morfológicos tales como un mayor número de flores y semillas, o la adquisición de una pubescencia densa (útil para prevenir la desecación en condiciones de baja humedad y alta insolación). Estos cambios también tuvieron su correlato en el aspecto bioquímico respecto a la producción de metabolitos secundarios que, como en el caso de los flavonoides, determinan un patrón cromatográfico bastante modificado respecto a la variedad *aborigineus*.

El análisis de agrupamiento [3.3.2.3.] pone de relieve la distancia entre el grupo que conforman *P. augustii* y *P. lunatus* respecto al conglomerado de *P. vulgaris*.

La representación tridimensional de PCO [3.3.2.4.] para los tres primeros componentes (representan más del 90% de la variabilidad total) evidencia la dispar relación de afinidad entre las tres especies, lo mismo que la representación de árbol mínimo [3.3.2.5.].

4.3. El género *Macroptilium* : discusión particular

4.3.1. Las secciones *Microcochle* y *Macroptilium*

El análisis de agrupamiento de las 51 OTU's resultó en la reunión de las mismas de acuerdo a las 8 especies consideradas. Se calculó la matriz cofenética para conocer el grado de ajuste obtenido respecto a la MD, resultando un $r = 0.881$, lo que representa un valor aceptable.

Como puede observarse en el dendrograma resultante [3.3.3.3.], existen 2 grupos de especies bien definidos: por un lado *M. fraternum*, *M. psammodes* y *M. prostratum* forman un grupo muy homogéneo (cada especie presenta muy baja variabilidad intraespecífica) que se agrupa junto a *M. panduratum*, una especie no muy afín a éstas, pero que de todos modos se asocia a una distancia mucho mayor.

Por otro lado, *M. longepedunculatum*, *M. bracteatum* y, algo más aislado, *M. erythroloma* son especies con mayor variación intraespecífica -en particular los dos últimos- que conforman el segundo grupo.

Por último, *M. lathyroides* resulta desde el punto de vista químico bastante distinto, lo que la excluye de estos grupos, aunque es necesario señalar que el material estudiado para esta especie fue

escaso (sólo se dispuso de 2 ejemplares) y por ende no se puede estimar apropiadamente la variación intraespecífica.

En el caso de *M. bracteatum* encontramos la mayor variabilidad entre OTU's, al punto que para un ejemplar (Nº 921) se vuelve dudosa su incorporación al núcleo de la especie. Este hecho puede explicarse, probablemente, si se tiene en cuenta que las 4 poblaciones representadas se extienden sobre un área geográfica muy amplia que abarca desde la provincia de Jujuy hasta la de Entre Ríos.

El análisis de coordenadas principales [3.3.3.4] representa la distribución de las OTU's proyectadas en perspectiva en un espacio tridimensional donde los ejes corresponden a los tres primeros factores (I,II y III) que explican el 91.86% de la variabilidad (con un 55,49%, un 21,95% y un 14,42%, respectivamente).

En líneas generales se confirma la presencia de los dos grupos, pero se puede observar con mayor nitidez la posición intermedia de *M. panduratum* y de *M. longepedunculatum*.

M. lathyroides aunque en un extremo de la distribución ocupa ahora una posición central, mejor definida respecto a los otros grupos, observándose ahora una menor distancia respecto a *M. longepedunculatum*, *M. bracteatum* y *M. erythroloma*.

De hecho, esta distribución de las especies argentinas constituye una buena representación de su ubicación taxonómica en relación a las características morfológicas y ecológicas que los autores vienen considerando para su clasificación.

M. lathyroides resulta ser la única especie anual (Burkart, 1952) entre las estudiadas, lo que desde el punto de vista ecofisiológico puede explicar la presencia de un perfil cromatográfico muy diferente, donde la presencia de isoramnínosidos (único caso en *Macroptilium*) va acompañada por flavonoides característicos de esta especie como quercetina-3,7-O-diglucósido (36), quercetina-3-O-glucósido-7-O-ramnósido (37) y quercetina-3-O-ramnosildiglucósido (38).

Aunque todas las demás especies son perennes, aparece una segunda característica diferencial: mientras *M. fraternum*, *M. psammodes* y *M. prostratum* son de hábito postrado, el resto de las especies -correspondiente al segundo grupo señalado- son plantas volubles, a excepción de *M. panduratum* que también comparte dicha característica.

El grupo formado por esas tres especies presenta un perfil muy homogéneo, que se caracteriza por la presencia de canferol-3-O-rutinósido-7-O-glucurónico (1), robinina (4), quercetina-3-robinobiosido-7-ramnósido (6), quercetina-3-O-glucósido-7-O-rutinósido (7), canferol-3-O-xilosilglucósido (12), luteolina 7-O-galactosido (23) y canferol-7-O-ramnósido (26) como principales

caracteres diferenciales, siendo ocasional la presencia de quercetina-3-O-galactósido (19) y de irigenina (40).

M. fraternum y *M. psammodes* (que Maréchal et al. [1978a] incluyeron dentro de *M. heterophyllum*, considerándolos la misma especie), resultan especies afines y próximas pero se diferencian químicamente como entidades distintas de acuerdo a los índices de distancia calculados.

Esto se correlaciona con la distribución geográfica y el ambiente asociado a esas dos especies: *M. fraternum* habita el NO argentino y tiene un hábito ecológico diferente de *M. psammodes*, que es propio de la mesopotamia argentina, Uruguay y sur de Brasil, y es psamófilo, diferenciándose morfológicamente además por ser más hirsuto (Burkart, 1952).

Las evidencias químicas, en particular la presencia de 19 y de canferol-3-OMe (29), como también las variaciones en las frecuencias de ocurrencia de quercetina-3-Ome (27), acacetina-7-O-gal (22) y quercetina-7-O-glucósido (24), refuerzan la idea de que se trata de especies distintas, tal como fueron reconocidas por Piper (1926) y Lackey (1983).

Desde el punto de vista de sus perfiles cromatográficos *M. psammodes* parece ocupar una posición intermedia entre *M. fraternum* y *M. prostratum*. Esta última se diferencia de aquellas dos por la presencia de quercetina-3-O-diglucósido (8) en lugar de 7, y por la ausencia tanto de quercetina-7-O-glucósido (24) (muy abundante y característico de aquellas) como de quercetina-3-OMe (27), resultando también notoria la presencia de canferol-7-O-glucosilramnosido (25) y de la flavanona 41, aunque *M. psammodes* y *M. prostratum* presentan isoramnetina-3-O-rutinósido (17) y quercetina-3-O-galactósido (19), dos flavonoides ausentes en *M. fraternum*.

El grupo conformado por estas tres especies en base a los caracteres cromatográficos evaluados concuerda en líneas generales con la sección **Microcochle** de Piper (1926) para *Phaseolus*, basada morfológicamente en la presencia de flores pequeñas y el cáliz 5-lobulado.

Aunque Piper no trató a *P. panduratus* - hoy *M. panduratum* - porque no figuraba en las colecciones por él revisadas, esta especie descrita por Bentham (1839) sí fue considerada por los autores posteriores, existiendo dudas respecto a su posición taxonómica. Márechal et al. (1978a) consideraron, como ya se mencionara, que tanto *M. fraternum* como *M. panduratum* eran sinónimos de *M. heterophyllum*, y efectuaron nuevas recombinaciones.

Sin embargo, Lackey (1983) no validó este criterio y sostuvo *M. panduratum* y *M. fraternum* como especies distintas de *M.*

heterophyllum, considerando además que estaban en secciones distintas.

Fevereiro (1987), que también sostiene la identidad diferente de *M. panduratum*, sigue en cambio a Maréchal et al. (1978a) respecto a *M. fraternum* y *M. psammodes*, incluyéndolos en *M. heterophyllum*, y ubicando a *M. panduratum* en la sección **Microcochle**.

Más allá de estas controversias respecto a la posición de estos taxones, las evidencias aquí presentadas parecen indicar que sólo *M. fraternum*, *M. psammodes* y *M. prostratum* conforman un núcleo homogéneo y muy emparentado, que correspondería a la sección **Microcochle**, mientras que *M. panduratum* presenta características tanto químicas como morfológicas, que lo ubican en una posición intermedia entre la sección **Microcochle** y la sección **Macroptilium**. Esta última incluye entonces a las otras especies aquí consideradas, que se caracterizan por las flores de mayor tamaño. De acuerdo a los perfiles cromatográficos obtenidos [3.1.3.] *M. erythroloma* se presenta como una especie con una distribución amplia y afín a *M. bracteatum*.

Sin embargo resulta notable la mayor variabilidad y diversificación en el perfil de *M. bracteatum*. Incluso la aparición de flavonoides como canferol-3-O-triglucósido-7-O-ramnósido (3) y 4',7-dihidroxi-flavona-7-O-ramnosilglucósido (13) sugieren una mayor afinidad con el género *Vigna*.

El perfil de *M. longepedunculatum*, en cambio, resultó mucho más simple y con caracteres intermedios próximos a *M. panduratum*, y lo que es la sección **Microcochle**, tales como la presencia de quercetina-7-O-glucósido (24) y quercetina-3-OMe (27) junto a la de apigenina-7-O-glucósido (20) y acacetina-7-O-galactósido (22).

M. lathyroides presenta respecto al resto del grupo una afinidad relativa mucho menor. Los caracteres morfológicos relativos al tipo y forma de fruto, flor y aspecto vegetativo sugieren sin embargo una afinidad mucho más amplia que la evidenciada en los perfiles cromatográficos estudiados. Esto sugiere de algún modo un proceso de divergencia temprana, probablemente asociado al cambio adaptativo que condujo a un ciclo de vida anual para esta especie. El diagrama de árbol mínimo [3.3.3.5.] calculado a partir de la MDD [3.3.3.2.], permite observar los dos grupos mencionados y las posiciones intermedias de *M. longepedunculatum* (asociado a *M. bracteatum*, es decir a la sección **Macroptilium**), de *M. lathyroides* (hacia un extremo de la distribución) y de *M. panduratum*, la especie más próxima a la sección **Microcochle**, conformada por las tres especies restantes.

En síntesis, las evidencias cromatográficas respaldan la existencia de dos grupos en **Macroptilium**. Dado que *M. monophyllum*

(Benth.) Maréchal y Baudet fue incluido en una tercera sección para el género por el carácter, bastante notable, de presentar hojas unifolioladas a la madurez (Lackey, 1983), y considerando que no pertenece a la flora argentina, no puede opinarse acerca de la existencia de esta sección o de su relación respecto a las secciones aquí representadas.

Sin embargo, las secciones **Macroptilium** y **Microcochle**, que ya fueron morfológicamente reconocidas por Bentham (1837) y Piper (1926), y que Lackey (1983) redefiniera, pueden considerarse en base a sus perfiles cromatográficos como grupos naturales con límites definidos.

Si bien es cierto que se trata de un género bastante homogéneo, en particular si se lo compara con *Vigna* (tal como concluyen Maréchal et al. (1978a) a partir de su extenso trabajo de análisis numérico), la evidencia química parece apoyar en términos generales la clasificación en secciones introducida por Lackey (1983), salvo en la posición de *M. panduratum*.

Fevereiro (1987), que no cita los trabajos previos de Lackey, llegó a conclusiones similares en su estudio de las especies brasileñas del género: mantiene ambas secciones, pero incluye *M. panduratum* dentro de **Microcochle**.

4.4. Discusión General

Maréchal, Mascherpa y Stainier (1981:pág.335) sintetizaron sus conclusiones acerca de las interrelaciones probables entre los distintos grupos a nivel de secciones, subgéneros y géneros de **Phaseolinae** a través del gráfico que aquí se reproduce en la FIGURA 4.4.3.A.

De acuerdo a sus resultados, y tomando en cuenta los aportes de Verdcourt (1970a) en cuanto a la restricción de *Phaseolus* al continente americano, lo mismo que *Macroptilium*, resulta claro que el subgénero **Sigmoidotropis** es el grupo americano preponderante dentro del género *Vigna*, y el que se hallaría más relacionado a aquellos dos.

Siguiendo este esquema, **Pedunculares** resultaría el nexa con las especies del Viejo Mundo, y **Lasiospron** un pequeño grupo relacionado a éste. Por último, **Leptospron** (*V. adenantha*) en la frontera entre *Vigna* y *Phaseolus* resulta el taxón más conflictivo en cuanto a su delimitación genérica.

Sin embargo, Lackey (1983) en su último trabajo sobre este grupo esbozó una serie de discrepancias con la clasificación de Maréchal,

Mascherpa y Stainier (1978a,1981). En síntesis, este autor propuso diferenciar 3 subgéneros americanos para *Vigna*:

- a) **Sigmoidotropis**, donde incluyó a las secciones de Maréchal, Mascherpa y Stainier (1978b): **Sigmoidotropis** y **Pedunculares**
- b) **Cochliasanthus**, donde incluyó **Leptospron** y **Caracallae**, y
- c) **Vigna**, donde reunió con *V. luteola* al subgénero **Lasiospron**.

Antes de pasar a discutir la validez de estos cambios y las implicancias evolutivas de ambos sistemas, se hizo necesario conocer en base a los datos bioquímicos del perfil cromatográfico de cada especie cual es la relación entre ellas a nivel intergénérico. De esta forma, se aplicaron métodos de taxonomía numérica para analizar las distancias relativas dentro de la subtribu **Phaseolinae**.

4.4.1. Análisis de agrupamiento para el complejo supragenérico *Vigna-Phaseolus-Macroptilium*

El análisis de la distribución de PCO [FIGURA 4.4.1.A] presenta tres grupos de especies, correspondientes a *Phaseolus*, *Vigna* y *Macroptilium*.

Resulta bastante sorprendente la posición de *V. luteola* y *V. peduncularis*, que hacia un extremo de la distribución del género *Vigna*, prácticamente se superponen con la sección **Microcochle** de *Macroptilium*.

En tanto, *V. adenantha* presenta una posición central, muy próxima a *Dolichopsis*, y aunque tiene cierta proximidad a *Phaseolus*, se ubica claramente entre las especies de *Vigna*.

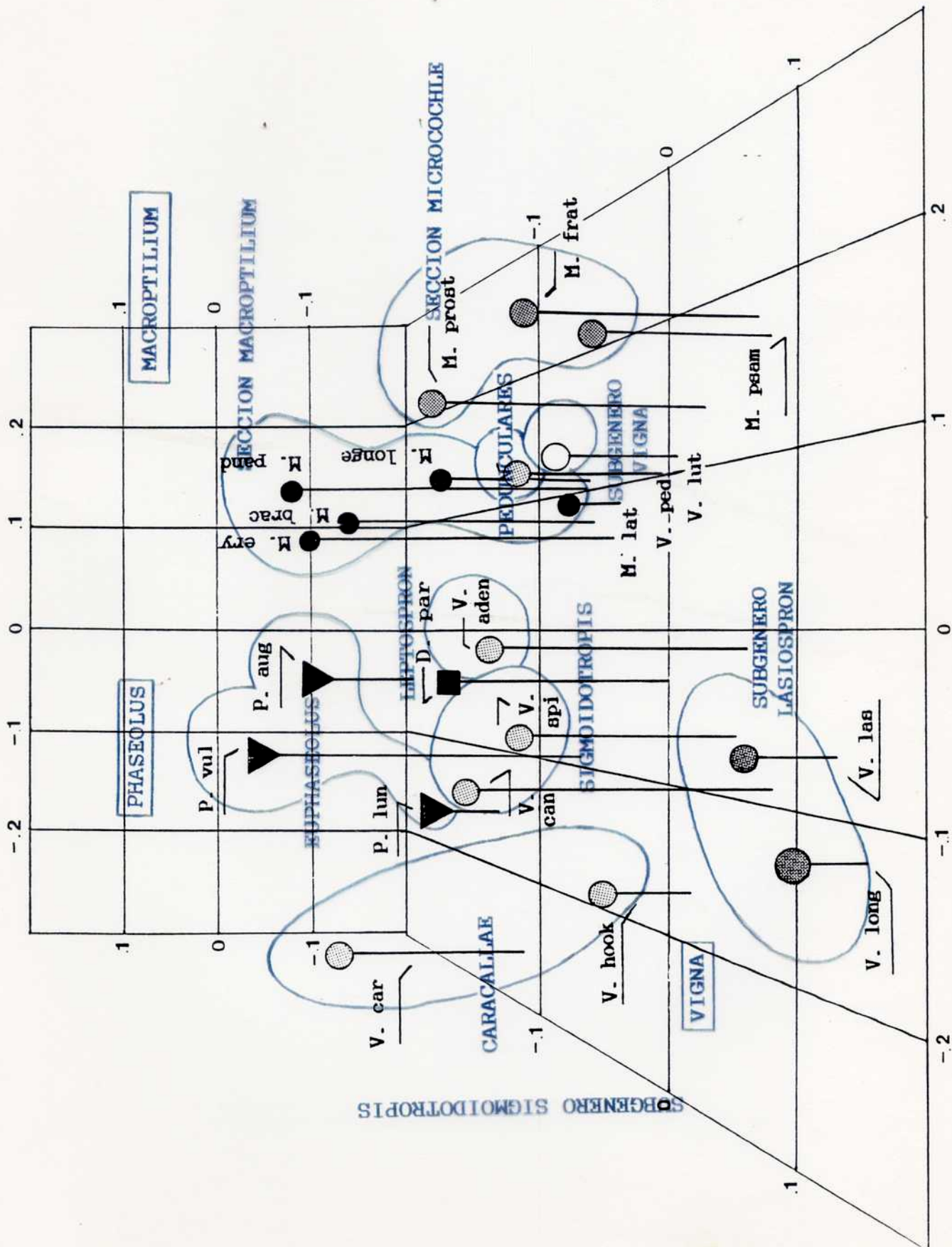
V. candida y *V. spiralis* (sec. **Sigmoidotropis**) también se ubican en una posición central próxima a *V. adenantha*, mientras la sección **Caracallae** ocupa un extremo distante de la distribución.

Por su parte, el subgénero **Lasiospron** presenta una posición definida, y se diferencia claramente del resto.

Asimismo, el agrupamiento en *Macroptilium* conserva la estructuración de ambas secciones, aunque la variabilidad interespecífica es mayor en la sec. **Macroptilium** que en **Microcochle**.

El género *Phaseolus* ocupa un sector definido dentro de la distribución, y se conserva la distancia entre *P. vulgaris* y las otras dos especies, *P. augustii* y *P. lunatus*, más afines entre sí. Se han indicado mediante un sobreimpreso transparente los grupos de sección, subgénero y género, mientras que las especies se indican en el diagrama general.

FIGURA 4.4.1.A: Distribución de PCO para las especies argentinas de Phaseolinae, que representa el 77.0 % de la variabilidad total (I= 34.9 % , II= 24.6 % y III= 17.5 %).



4.4.2. Análisis discriminante: segregación de los grupos

El análisis discriminante utilizando variables canónicas (SDA) aplicado al total de las OTU's estudiadas permitió comprobar la homogeneidad de todos los grupos (especies). La distribución obtenida se presenta en la FIGURA 4.4.2.A, donde sólo se han representado los centroides correspondientes a la distribución de cada especie.

Se observa que existe una sectorización en cuanto a la ubicación de los grupos de acuerdo al género, pero ahora se evidencian interrelaciones más complejas.

V. adenantha conserva una posición próxima al núcleo central de *Phaseolus*, aunque *P. vulgaris* se ha desplazado considerablemente hacia un extremo de la distribución.

V. luteola y *V. peduncularis* parecen conservar una posición próxima a *Macroptilium*, pero se han separado entre sí.

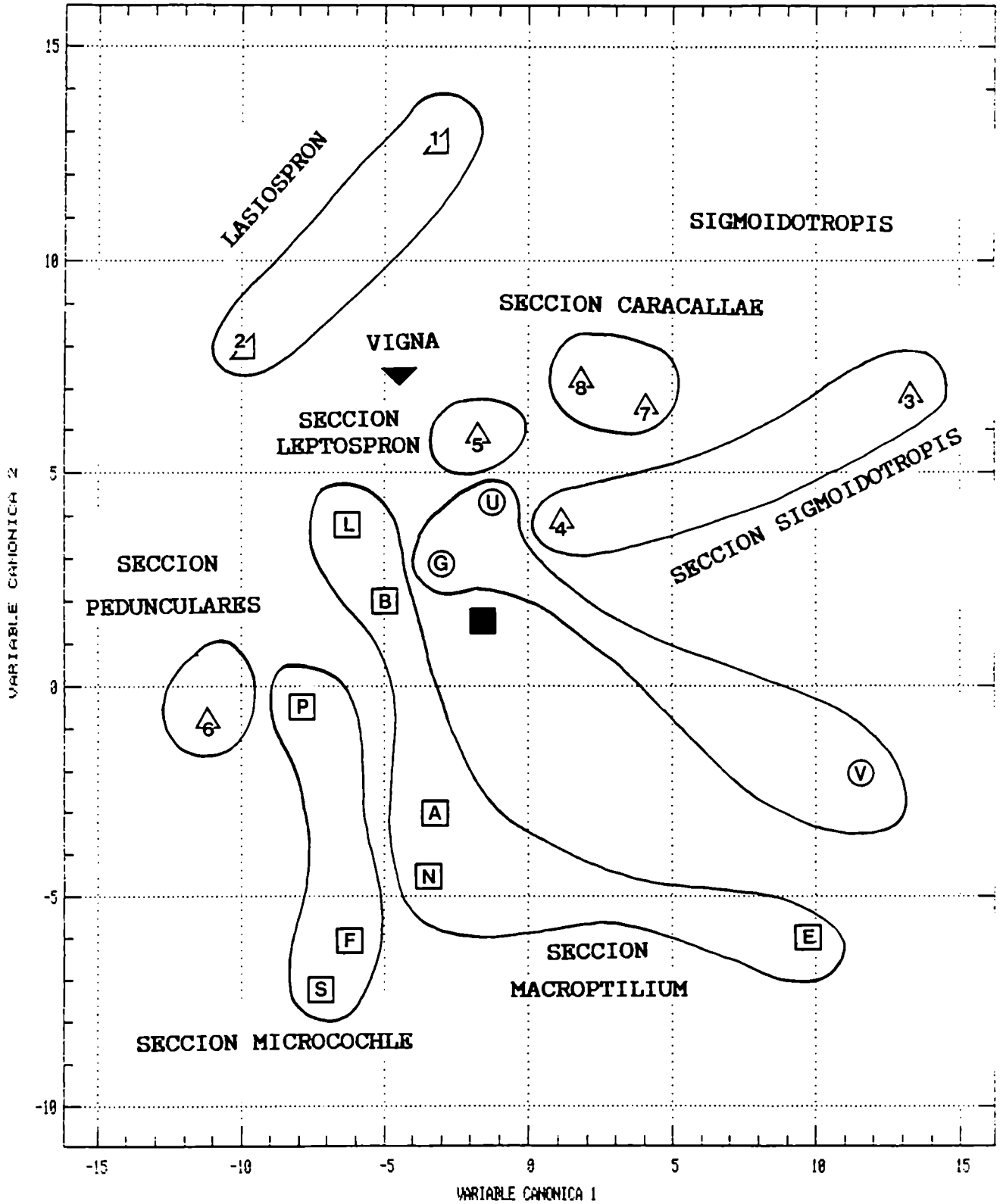
Dentro de **Sigmoidotropis** se evidencia una distribución en dirección centrífuga, donde *V. candida* ahora ocupa un extremo más distante respecto a *V. adenantha*.

Dolichopsis paraguariensis mantiene una posición central, próxima a *Vigna* y *Phaseolus*. Asimismo, el subgénero **Lasiospron** se mantiene como un grupo discreto y resalta la distancia entre *V. lasiocarpa* y *V. longifolia*, ocupando la primera una posición más cercana a los grupos afines a las especies del Viejo Mundo (**Pedunculares** y **Vigna**) de acuerdo a Marechal et al. (1981), mientras que *V. longifolia* evidencia una distancia menor a las especies del subgénero **Sigmoidotropis**, tal como se evidenció en el análisis particular del género *Vigna*.

Respecto a *Macroptilium* llama la atención la polarización que presenta la sección **Macroptilium**, donde *M. erythroloma* sufre un gran distanciamiento hacia un extremo de la distribución, y *M. longepedunculatum* y *M. bracteatum*, hacia el lado opuesto, se acercan mucho a *Vigna*, y al núcleo central de la subtribu *Phaseolinae*.

M. lathyroides y *M. panduratum*, ocupan una posición intermedia y más próxima a la sección **Microcochle**, constituyendo el centro de la distribución de éste género.

FIGURA 4.4.1.A : Análisis Discriminante (SDA)



- | | | | | |
|-----------|------------------------|------------------------|-------------|--------------|
| ▼ V. lut | △ ₃ V. cand | △ ₇ V. car | ⊙ P. aug | □ B M. brac |
| 1 V. long | △ ₄ V. spi | △ ₈ V. hook | □ F M. frat | □ L M. longe |
| 2 V. las | △ ₅ V. aden | ⊙ V P. vulg | □ P M. pros | □ A M. lat |
| D. par | △ ₆ V. ped | ⊙ U P. lun | □ S M. psam | □ N M. pan |
| | | | | □ E M. ery |

4.4.3. Subtribu Phaseolinae: posición sistemática de los grupos estudiados en relación a las evidencias bioquímicas

De acuerdo a las conclusiones de Maréchal et al. (1978a) y tal como se desprende del esquema por ellos propuesto que aquí se reproduce en la FIGURA 4.4.3.A (Maréchal et al., 1981: pág.335), resulta claro que para estos autores los géneros *Macroptilium* y *Phaseolus*, exclusivamente americanos, estarían relacionados con los miembros americanos del género *Vigna* próximos a lo que hoy consideramos el subgénero **Sigmoidotropis**, en particular las secciones **Sigmoidotropis** y **Leptospron**.

Aunque, como señala Lackey (1983), el estudio filogenético de este grupo es altamente especulativo dadas las escasas evidencias tangibles que poseemos, sólo puede inferirse a través de los resultados bioquímicos aquí presentados que el esquema propuesto por Maréchal et al. es válido en líneas generales, salvo en lo referente a *Macroptilium*.

En su examen del problema, Lackey (1983) propone una metodología similar a la aplicada por Barneby (1977) para estudiar la filogenia de las **Amorpheae** (Leguminosae), basándose en la categorización de los caracteres en básicos o primitivos y derivados o avanzados. Aplicando este criterio, las **Phaseolinae** del Nuevo Mundo constituirían un grupo intermedio o de transición entre las formas poco especializadas que hoy están representadas por la subtribu **Dioclineae** hacia las mucho más especializadas y diversificadas **Phaseolinae** del Viejo Mundo, donde encontramos el grueso de las especies de *Vigna*.

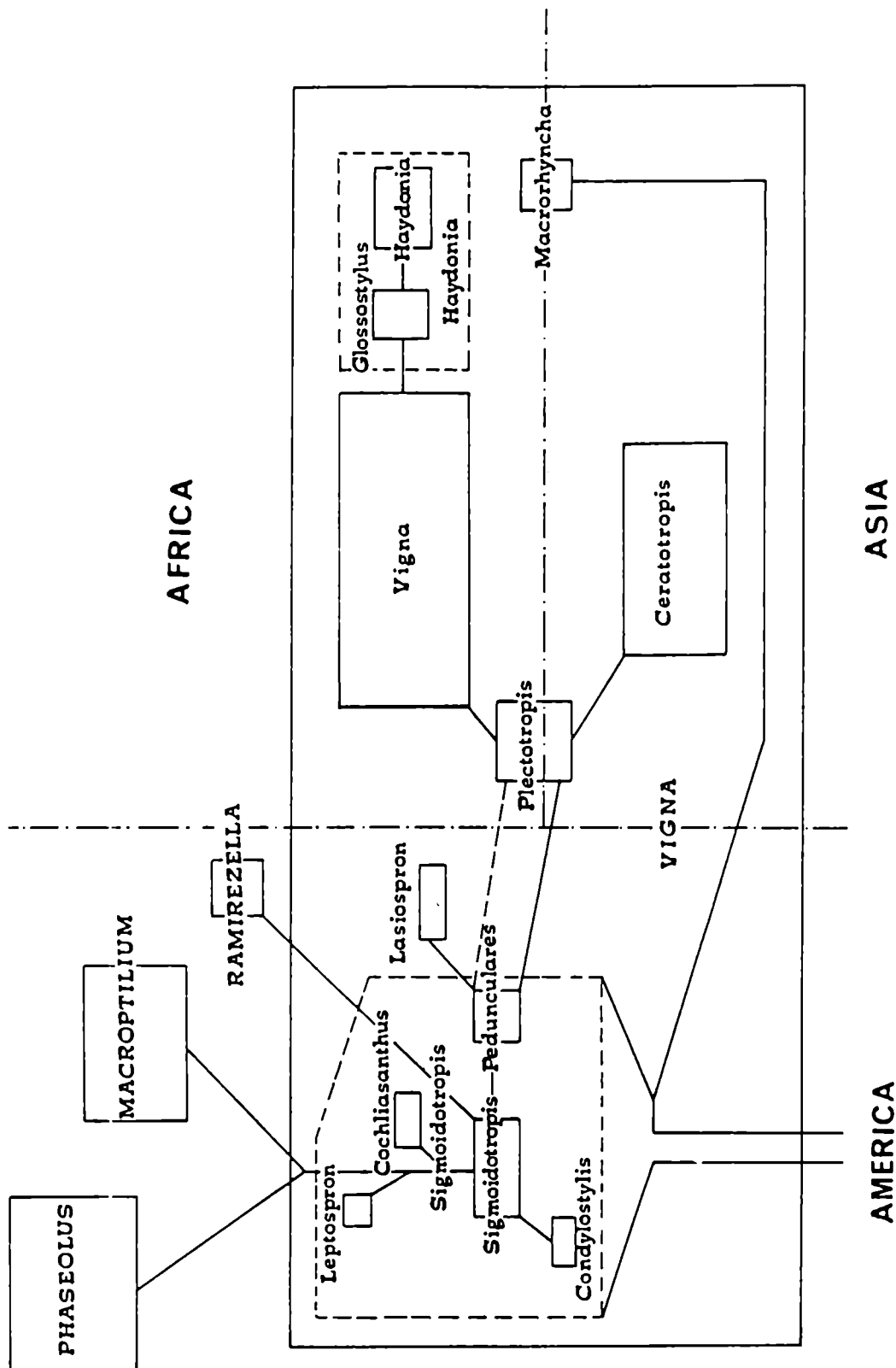
La diferenciación clara entre las **Phaseolinae** americanas respecto a las **Dioclineae** está dada por la presencia en la semilla de estructuras que cubren el hilo, y por una serie de caracteres generales que se consideran en estudios filogenéticos de este tipo, tales como el pasaje de formas arbóreas a formas herbáceas, la presencia de brácteas y bracteolas caducas respecto a las persistentes, el acortamiento en la longitud del hilo, el tipo de estilo erecto, más primitivo que el estilo en gancho, sigmoide o espiralado de las Faseolíneas y la posición terminal del estigma respecto a su lateralización.

De acuerdo a estos criterios, el género *Oxyrinchus* casi no presenta estados avanzados (estando entonces muy próximo a las Dioclíneas), mientras que *Dolichopsis* es sólo un poco más avanzado que éste por presentar formas prácticamente no leñosas y un hilo corto.

Pero sin dudas *Macroptilium*, y especialmente *Phaseolus* son los que presentan dentro del grupo los caracteres más avanzados.

El primero por la presencia de un estilo en forma de gancho y

FIGURA 4.4.4.A : Relaciones intergrupales obtenidas en base a los coeficientes de correlación para el complejo Phaseolus-Vigna (Maréchal, Mascherpa y Stainier, 1981)



el hilo corto en la semilla. *Phaseolus*, porque reúne el mayor número de caracteres avanzados, o "estados derivados" en la terminología de Barneby, tales como el estilo espiralado, los pelos uncinulados y las brácteas persistentes.

En este contexto, las especies americanas de *Vigna* aparecen como bastante más especializadas que *Oxyrhinchus* pero siguiendo una vía diferente respecto a *Macroptilium* o *Phaseolus* en cuanto a la forma del estilo, los estigmas lateralizados o la forma del hilo, algo particularmente notable en los representantes del Viejo Mundo.

El análisis de PCO efectuado parece indicar que las evidencias bioquímicas guardan correlación con la evolución de los caracteres morfológicos.

Los resultados obtenidos a partir del análisis numérico de los perfiles cromatográficos sugieren en forma bastante directa que *Phaseolus* y *Macroptilium* están relacionados evolutivamente con el subgénero **Sigmoidotropis**, pero siguen distintas líneas.

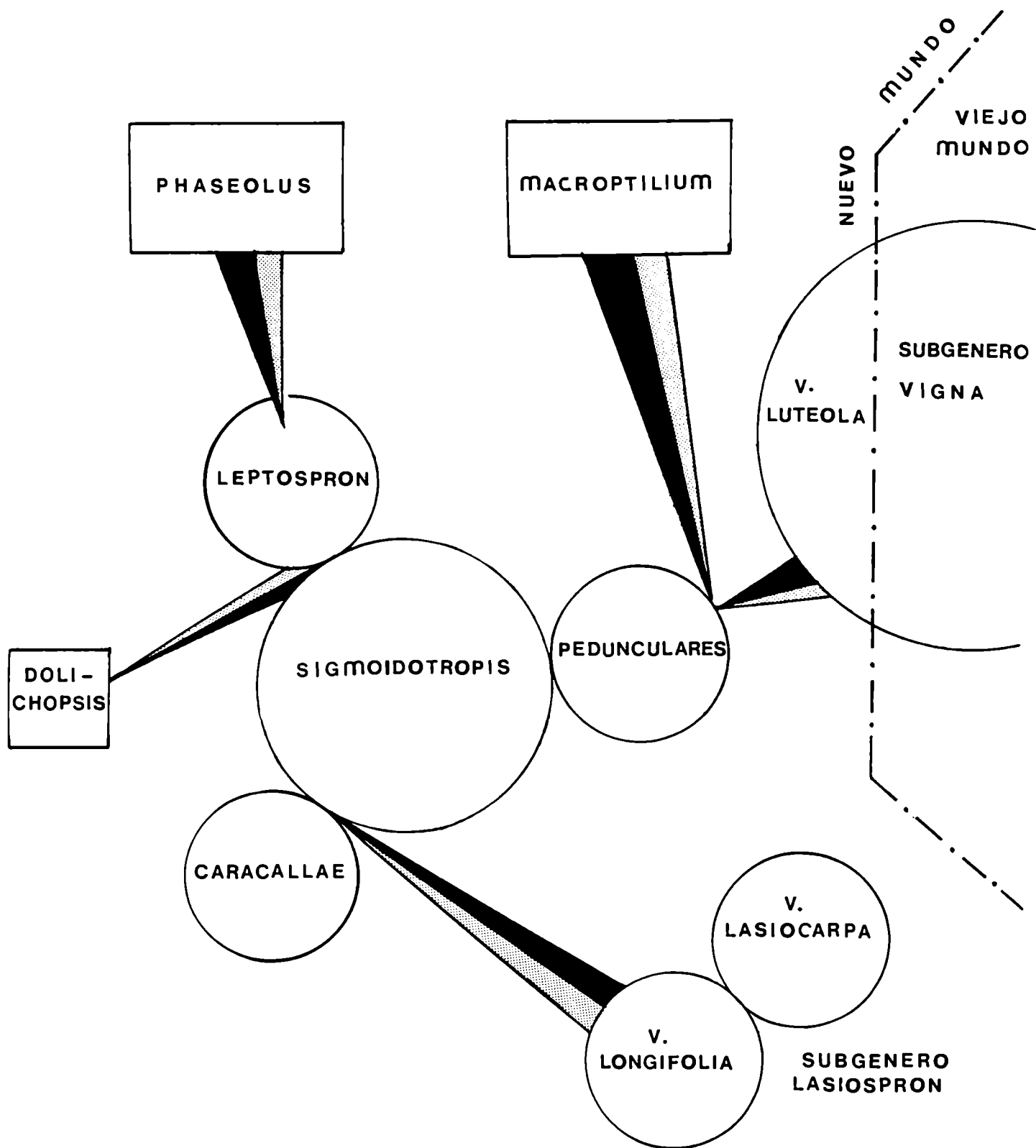
Las distintas técnicas numéricas empleadas coinciden en el hecho de que las especies de *Macroptilium* presentan una afinidad diferencial muy marcada con las especies americanas de *Vigna* más próximas al tronco paleotropical originario de este género.

En efecto, **Pedunculares** es dentro de **Sigmoidotropis** la sección más afín al grupo de especies de *Vigna* más primitivas del Viejo Mundo (la sección **Vigna**, del subgénero **Vigna**, donde se ubica *V. luteola*), por lo que resulta claro que *Macroptilium* guarda relaciones de parentesco más próximas con este grupo que podríamos considerar emparentado a los orígenes del género. Además, resulta interesante comprobar que existe una afinidad diferencial entre las secciones: la sección **Macroptilium** presentó una menor distancia taxonómica respecto al subgénero **Vigna** (típico del Viejo Mundo, y representado aquí por *V. luteola*) mientras que la sección **Microcochle** resultó más próxima a *V. peduncularis*, representante de la sección **Pedunculares** del subgénero **Sigmoidotropis**.

Phaseolus, en cambio, evidenció en los agrupamientos una afinidad indudable con el subgénero **Sigmoidotropis** de *Vigna*, y en particular con la sección **Leptospron** (*V. adenantha*). Este hecho, en el que todos los autores están prácticamente de acuerdo plantea dudas acerca del verdadero límite genérico entre estos grupos.

Sin embargo, la posición de *V. adenantha* y su pertenencia al género *Vigna* resulta congruente con los datos químicos obtenidos. Si bien este aporte puede considerarse de interés respecto a la elucidación del problema que plantea la posición taxonómica de esta especie, no pueden obviarse dos puntos importantes: los caracteres químicos tienden a ser más conservativos respecto al proceso evolutivo que

FIGURA 4.4.4.B : Representación de las relaciones intergrupales obtenidas en base al análisis numérico de los patrones cromatográficos de flavonoides foliares para las especies argentinas de la subtribu Phaseolinae.



los caracteres morfológicos, y por otro lado, existen a nivel de la ultraestructura del aparato estilar y de la exina del grano de polen (P. Hoc, com.pers.) características morfológicas que sugieren la inclusión en *Phaseolus* de esta especie. Otro hecho de peso en este sentido está dado por el tipo de germinación de la semilla, que en *V. adenantha* es epigea como en *Phaseolus* (Vercourt, 1970a) Por último, la posición de *Dolichopsis paraguariensis* más afín a *Vigna* resulta congruente con la posición taxonómica de este pequeño género monotípico, el cual indudablemente está emparentado con la línea *Vigna-Phaseolus*, y no con las especies de *Macroptilium*. Tal como señala Lackey (1983) *Dolichopsis* debe haber evolucionado tempranamente del tronco principal, y conserva actualmente una serie de caracteres morfológicos poco avanzados o intermedios, como las brácteas florales caducas, el estigma terminal o el estilo ligeramente engrosado en el centro. De acuerdo a Maréchal et al. (1978a) presenta afinidades relativamnte altas con *Strophostyles* y más lejanas con *Dysolobium* y *Vigna*, aunque los dos primeros no existen en la flora argentina, y *D. paraguariensis* es una especie endémica del NE argentino y Paraguay.

En términos generales, la FIGURA 4.4.3.B resume las relaciones probables entre los grupos estudiados, siempre en base a sus perfiles de flavonoides foliares, y sin considerar caracteres morfológicos o palinológicos.

Nótese que este esquema presenta pocas variaciones respecto al propuesto por Maréchal et al. (1981) [FIGURA 4.4.3.A] obtenido en base al análisis numérico de 139 caracteres cromosómicos, anatómicos, de la inflorescencia, la morfología floral y seminales, y 27 caracteres palinológicos.

De esta forma, es altamente probable que el proceso de diferenciación genérica se haya originado en el área Neotropical. A partir del grupo que hoy comprende al subgénero *Sigmoidotropis*, donde aparecen en mayor grado los caracteres menos evolucionados (Maréchal et al., 1978a), se diferenciaron en América los géneros *Phaseolus* y *Macroptilium*, y se produjo la penetración hacia el Viejo Mundo, probablemente a través de África. Este continente presenta hoy el mayor centro de variabilidad de *Vigna*, aunque el hecho que *V. vexillata* (subgénero *Plectotropis*) posea dos centros de variabilidad, uno en África y otro en Asia, deja todavía lugar a algún tipo de dudas respecto al lugar por donde se produjo la penetración del grupo originario de América (Maréchal et al., 1978a).

Respecto a las *Vigna* del Viejo Mundo, parecen existir dos tendencias evolutivas diferentes: mientras en Asia ocurrió una diferenciación hacia un modelo altamente especializado, que dió

lugar al muy homogéneo subgénero **Ceratotropis**, en Africa la especiación dió lugar a una relativa simplificación de la morfología floral, con un pasaje a la simetría bilateral (subgénero **Vigna**), y la aparición en los grupos más recientes (subgénero **Haydonia**) de caracteres nuevos, como glándulas estaminales o polen sin ornamentación y esférico, junto a la pérdida progresiva de características típicas del género *Vigna*, como la exina reticulada.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

La subtribu **Phaseolinae** (Phaseoleae-Papilionoideae-Leguminosae) es, desde casi todos los puntos de vista desde los cuales pueda enfocarse el problema, un grupo complejo.

Desde hace más de 150 años los botánicos que han centrado su interés, y a veces todo su talento, en alcanzar un sistema de clasificación apropiado, no han alcanzado a ponerse totalmente de acuerdo respecto a cuales serían los caracteres más útiles a tal fin, o incluso las delimitaciones genéricas aceptables.

A partir de las últimas tres décadas, con el rápido avance de las ciencias biológicas en general, y de la biosistemática vegetal en particular, este objetivo se vió favorecido no sólo por las nuevas herramientas tecnológicas disponibles para la generación y tratamiento de los datos, sino también por la mayor rigurosidad en el enfoque taxonómico, los nuevos criterios para la clasificación, y, en tercer término pero no menos importante, el mayor contacto entre los investigadores y la tendencia creciente a un trabajo interdisciplinario.

En base al monumental trabajo de autores como Bentham, Hassler o Piper, los autores actuales como Verdcourt, Baudet, Maréchal, Mascherpa, Stainier o Lackey han sentado las bases para un sistema clasificatorio genuino, ya no solamente basado en la morfología del vástago o de la flor, sino ampliando el conocimiento del grupo en todas las líneas posibles, como la anatomía del aparato estilar, la ultraestructura del polen, la biología floral y reproductiva de cada especie o los aspectos químicos y bioquímicos relativos a semillas, hojas y flores.

Desde este punto de vista global, el presente trabajo pretende constituirse en un aporte más, que aunque enfoca parcialmente el problema limitándolo a la flora de un sólo país, no deja de poner a prueba las principales hipótesis sustentadas en las clasificaciones debidas a aquellos autores, e indirectamente, nos permite (en la medida de nuestras limitaciones) sugerir la conveniencia de nuevos puntos de vista desde un ángulo poco

explorado dentro del grupo, como es la quimiotaxonomía de flavonoides.

5.1. Aspectos químicos

En términos generales, puede decirse que el perfil de flavonoides hallado para todas las especies argentinas de **Phaseolinae** corresponde a un nivel evolutivo intermedio, de acuerdo a los parámetros de Harborne (1977) [1.2.3.1].

Este hecho está en un todo de acuerdo con los resultados observados hasta ahora en la subfamilia Papilionoideae, confirmando la posición relativamente avanzada de las **Phaseoleae**, junto a las **Tephrosieae** y **Robinieae**, en cuanto a los patrones de oxigenación observados en los flavonoles presentes y las correspondientes flavonas derivadas (Gomes et al., 1981).

La mayor parte de los compuestos aislados (70 %) correspondieron a O-glicósidos de flavonoles, principalmente de quercetina (40 %) y de canferol (24%), y sólo en un caso la aglicona resultó miricetina, que corresponde a un patrón de hidroxilación del anillo B más primitivo.

La presencia de flavonas e hidroxiflavonas (15 %) resulta un carácter bastante estabilizado en el grupo, y se corresponde con lo observado anteriormente por Bate-Smith (1962) respecto a la transición evolutiva desde las formas leñosas hacia las herbáceas dentro de las Dicotiledóneas, aunque en el caso de la subtribu **Phaseolinae** vemos que el porcentaje de flavonoles resulta todavía muy alto en relación. Esto implica por un lado, un carácter conservativo respecto a las vías de síntesis metabólica más primitivas, y por otra parte una gran diversificación respecto a los patrones de glicosidación que probablemente se han ido acumulando a lo largo del proceso evolutivo. De hecho, encontramos en las distintas especies de **Phaseolinae** aquí estudiadas una gran variación respecto a mono-, di-, tri- e incluso tetra-O-glicósidos, pero siempre en relación a las posiciones 3 y 7 del anillo A. Tal como señalaran Gomes et al. (1981), la presencia de caracteres avanzados como la glicosidación o isoprenilación en posiciones 6 y 8, o la presencia de C-glicosilflavonas son un hecho muy difuso dentro de las Papilionoideae en general, lo que determina, respecto a los flavonoides, un perfil bastante primitivo para este

gran grupo de Leguminosas [1.2.3.2].

Confirmando este principio, dentro de las 18 especies aquí estudiadas, correspondientes a cuatro géneros diferentes de **Phaseolinae** (uno de los grupos más avanzados dentro de las Papilionoideas), no se pudo aislar ninguno de esos compuestos, entre más de 40 flavonoides determinados.

Del mismo modo, la presencia en las especies estudiadas de flavonoides O-metilados, un caracter relativamente avanzado (Harborne, 1977) resulta de una frecuencia bastante baja (15 % del total de flavonoides presentes) y mantiene los patrones mencionados para los respectivos flavonoles y flavonas.

Respecto a la presencia de isoflavonoides (5 %), si bien la presencia de estos compuestos representa, a la inversa de lo que ocurre en el caso de los flavonoides, una característica singular de las Papilionoideae que es considerada bastante más avanzada evolutivamente, no pueden pasarse por alto dos puntos: en primer lugar, su valor sistemático es muy relativo, pues no pueden diferenciarse los isoflavonoides constitutivos de los inducidos por infección (Gomes et al.,1981), y en segundo término, es absolutamente escasa la presencia de estos compuestos (en forma constitutiva) reportada en la literatura para las **Phaseoleae**, donde sólo se ha citado la presencia de rotenoides como isoflavonoides constitutivos (Harborne 1967, 1971; Gomes et al.,1981).

Una vez más, los resultados encontrados respecto a las especies argentinas demuestran esta tendencia, por lo que el criterio seguido fue que cuando algún isoflavonoide detectado se consideró como producto de un estado de infección particular (sólo encontrado en un ejemplar aislado, como en el caso de la isoflavona hallada en una *V. peduncularis* procedente de Misiones) no se le otorgó caracter taxonómico. En cambio, se procedió a la inversa cuando por la frecuencia de presencia en distintas poblaciones o especies, se consideró un isoflavonoide como constitutivo, resultando entonces incluido en el perfil correspondiente como un flavonoide más, tal el caso de

la irigenina o la daidzeína-7-O-glucósido.

En términos generales, podría considerarse que las **Phaseoleae** contienen la información apropiada para la biosíntesis de estos compuestos, y probablemente exista una alta variabilidad

genética, tal como lo sugieren las investigaciones sobre inducción artificial en *Phaseolus* (Biggs, 1975; Woodward, 1979), pero a lo largo de la evolución se han ido seleccionando mecanismos de regulación que mantienen estos genes reprimidos, disparándose el proceso de producción de isoflavonoides frente a la invasión de un agente externo (Ingham y Harborne, 1977), de modo que los isoflavonoides constitutivos son cada vez menos frecuentes a medida que pasamos de las tribus más primitivas de Papilionoideas hacia las más evolucionadas, como es el caso de las **Phaseoleae**. La posible utilidad taxonómica de muestrear este potencial genotípico mediante técnicas de inducción *in vitro* en forma sistemática y estadísticamente representativa escapa desde ya a los fines de este trabajo, y no deja de ser una interesante posibilidad a considerar en el futuro, pero creemos que sería la única forma válida de poder incorporar en lo que hace a la quimiotaxonomía de este grupo los perfiles de isoflavonoides de cada especie.

5.2. Aspectos taxonómicos

Las evidencias químicas derivadas del análisis de los perfiles cromatográficos de flavonoides foliares para las Phaseolíneas argentinas revelaron, mediante técnicas de taxonomía numérica aplicadas al tratamiento de los datos, que en términos generales el sistema propuesto por Maréchal, Mascherpa y Stainier (1978a) resulta válido.

Las especies argentinas del gran subgénero americano **Sigmoidotropis**, correspondiente al género *Vigna*, presentan un agrupamiento en base a los caracteres químicos aquí estudiados que resulta coincidente con las secciones propuestas por dichos autores para este grupo, en base a caracteres morfológicos, citológicos y palinológicos.

De las secciones comprendidas en nuestro país, la sección **Pedunculares** (*V. peduncularis*) resultó la más afín químicamente a la única especie americana y pantropical representante del gran subgénero paleotropical **Vigna**, *V. luteola*.

La sección **Sigmoidotropis** (*V. candida* y *V. spiralis*) representa el núcleo central del subgénero homónimo y mantiene una proximidad relativa diferencial con las otras secciones del

grupo: es intermedia respecto a la sección **Leptospron** (*V. adenantha*), mientras que se hace mayor, hacia extremos opuestos de su distribución, respecto a las secciones **Caracallae** y **Pedunculares**.

La sección **Caracallae** (*V. caracalla* y *V. hookeri*) presentó una alta variabilidad interespecífica entre los perfiles, ocupando *V. caracalla* un extremo distal respecto a la sección **Sigmoidotropis** y *V. hookeri* una posición intermedia.

Por otra parte, resultó dentro del subgénero **Sigmoidotropis** la sección más afín al pequeño subgénero americano **Lasiospron**.

En particular, de las dos especies argentinas que integran **Lasiospron**, *V. longifolia* y *V. lasiocarpa*, la primera de ellas resultó considerablemente más próxima a **Sigmoidotropis**, dado que presentó una distancia baja de agrupamiento con *V. hookeri*.

En base a estos resultados, y considerando que el subgénero **Lasiospron** sólo abarca 3 especies (incluyendo a *V. juruana*, muy afín a *V. longifolia* y ambas con distribución en América y África) resulta aceptable sugerir la posibilidad de establecer dos secciones dentro **Lasiospron**. Esta idea resulta avalada por las evidencias químicas aquí presentadas que parecen corroborar una relación diferencial de parentesco dentro de **Lasiospron** respecto al núcleo central del género *Vigna* en el Nuevo Mundo, donde *V. longifolia* aparece como nexa.

Por otro lado, estos resultados justifican la existencia de **Lasiospron** como un subgénero aparte, desvirtuando la redefinición de Lackey (1983) donde incluye este grupo dentro del gran subgénero **Vigna** (típico del Viejo Mundo). Si bien sería necesario un estudio adecuado de los flavonoides foliares de las especies africanas de *Vigna* para dilucidar completamente este punto, las evidencias parciales hasta aquí reunidas, sostienen la posición de Maréchal et al. (1978a) respecto a la entidad de **Lasiospron** como subgénero, y aunque no parece existir proximidad alguna respecto al perfil cromatográfico entre *V. luteola* y *V. lasiocarpa*, existen a nivel palinológico y de la estructura estilar una convergencia del grupo respecto a los caracteres observados para las especies africanas, en particular para los grupos más especializados.

Respecto al género **Dolichopsis**, los resultados obtenidos a nivel de los flavonoides foliares son coincidentes con la posición taxonómica aceptada, que lo ubica como próximo a *Vigna*. De acuerdo a Lackey (1983) **Dolichopsis** sería un género que abarca dos especies (*D. paraguariensis* y *D. monticola*) aunque el tratamiento taxonómico habitual lo considera monotípico (*D. paraguariensis*) y

endémico de Paraguay y NE de Argentina.

El resultado del agrupamiento en base a los datos químicos presenta una mínima distancia respecto a la sección **Sigmoidotropis** de *Vigna*. Maréchal et al. (1978a) consideran que es una entidad cercana a *Vigna*, aunque su mayor afinidad sería respecto a *Strophostyles*, si bien este género por no estar comprendido en la flora argentina, no fue abarcado en el presente estudio.

En cuanto al género *Phaseolus*, se encontraron, como era de esperar, las mayores afinidades entre la sección **Leptospron** de *Vigna* (*V. adenantha*) y *P. vulgaris* var *aborigineus*.

Sin duda la posición taxonómica de *V. adenantha* es uno de los problemas más difíciles a considerar cuando se emprende el estudio de las **Phaseolinae**. De acuerdo a todos los autores hasta Verdcourt (1970a) esta especie fue incluida dentro de *Phaseolus*.

Maréchal et al. (1978a) en base a caracteres de la morfología floral y de la inflorescencia, forma del estandarte, la presencia de bracteolas caducas y la forma espiralada del estilo y la carena, propusieron su inclusión en *Vigna*, aún cuando existen caracteres palinológicos que hacen a la estructura de la exina que no están presentes en esta especie (del tipo laxamente reticulada, un carácter que consideran propio de *Vigna*). En términos generales, consideran de acuerdo a los resultados del análisis numérico para más de 170 caracteres que las distancias taxonómicas son mucho más lejanas respecto a *Phaseolus* que a las *Vigna* americanas (Subgénero **Sigmoidotropis**), y por lo tanto proponen la nueva combinación de **Leptospron** como sección de **Sigmoidotropis** (Maréchal et al., 1978b). Posteriormente, Verdcourt (1980) y también Lackey (1983) aceptaron este cambio.

De acuerdo a los perfiles cromatográficos aquí obtenidos y a partir del procesamiento de los datos por distintas técnicas de análisis numérico, se llega a conclusiones prácticamente similares. De hecho, tanto en el agrupamiento como en el método discriminante, *V. adenantha* presentó una menor distancia taxonómica respecto a la sección **Sigmoidotropis** de *Vigna* que respecto a *Phaseolus*. Del mismo modo, resulta clara la relación de afinidad entre dichos grupos: pueden quedar muy pocas dudas en cuanto a que filogenéticamente estos grupos están vinculados en forma no demasiado lejana (aunque todavía existe espacio para discutir la fijación del límite intergenérico, en particular de acuerdo al peso que pretenda darse a las evidencias morfológicas, etológicas y palinológicas, bastante contundentes en cuanto a la exclusión de *V. adenantha* del subgénero *Sigmoidotropis*).

Más allá de la relación evolutiva entre *Phaseolus* y **Sigmoidotropis**, resulta bastante evidente que el género *Phaseolus* es un grupo natural americano que ha sufrido una fuerte especiación y dispersión a lo largo del continente. De las tres especies analizadas en este estudio, *P. vulgaris* var *aborigineus* resultó la más próxima al subgénero **Sigmoidotropis** de *Vigna*.

P. lunatus y *P. augustii* aunque conservaron características propias que las separan netamente de *P. vulgaris*, resultaron con una menor distancia taxonómica entre sí.

Este resultado está de acuerdo con lo observado por Maréchal et al. (1978a) respecto a la homogeneidad de la sección **Phaseolus** del género, aunque en este caso las distancias de *P. lunatus* hacia las otras dos especies resulta mayor que la obtenida para los caracteres químicos.

El estudio de flavonoides para variedades cultivadas y material asilvestrado proveniente del centro-oeste de la Argentina, en una latitud inusual para la distribución del género, permitió establecer a partir de los perfiles cromatográficos el carácter intermedio de esta forma de Merlo (Pcia. de San Luis) derivada de la variedad silvestre del poroto común *P. vulgaris* var *aborigineus* y sometida, probablemente, a una presión de selección debida a la necesidad de adaptación a un fotoperíodo diferente. Los caracteres químicos pudieron correlacionarse con caracteres morfológicos de las plantas (tamaño del folíolo, longitud de la hoja, y otros) y con caracteres de las semillas, como peso, coloración y textura (Menéndez Sevillano et al., 1992a y b).

Por último, el análisis de los perfiles cromatográficos del género *Macroptilium* puso de manifiesto que las especies podían agruparse en 2 secciones, tal como fue propuesto por Lackey (1983) y, en forma independiente, por Fevereiro (1987) estudiando las especies brasileñas.

Maréchal et al. (1978a), sin embargo, habían sostenido que el género resultaba demasiado homogéneo, y dado que el resultado de su análisis numérico implicaba bajas distancias entre las especies se habían abstenido de mantener las tradicionales secciones **Microcochle** y **Macroptilium**, anteriores incluso a la creación del género.

El resultado del agrupamiento en base a caracteres químicos, presentó dos grupos de especies bien definidos: *M. psammodes*, *M. prostratum* y *M. fraternum* por un lado, y *M. erythroloma*, *M. bracteatum*, *M. lathyroides*, *M. longepedunculatum* y *M. panduratum* por el otro. Dentro de este segundo grupo, que corresponde a la sección **Macroptilium**, *M. longepedunculatum* y, en particular, *M. panduratum*

resultaron las especies más próximas a la sección **Microcochle** (representada en la flora argentina por las tres especies mencionadas en primer término).

Con respecto a la interrelación entre *Vigna* y *Macroptilium*, las evidencias químicas aquí presentadas indicarían que *Macroptilium*, en términos generales, es un grupo mucho más afín a los grupos americanos de *Vigna* más próximos a los representantes paleotropicales del género, que al núcleo típicamente americano del subgénero **Sigmoidotropis**.

En efecto, los distintos métodos de análisis numérico empleados coinciden en señalar una distancia taxonómica mucho menor entre las especies de *Macroptilium* y la sección **Pedunculares** (el grupo del subgénero americano **Sigmoidotropis** más afín a las *Vigna* del Viejo Mundo) y *V. luteola* (única representante americana del gran subgénero paleotropical *Vigna*). En el caso particular de la distribución resultante del análisis de coordenadas principales puede apreciarse claramente como estas dos especies de *Vigna* (*V. peduncularis* y *V. luteola*), ocupan un extremo de la distribución de dicho género, claramente en dirección a *Macroptilium* y prácticamente superponiéndose con éste.

Si bien globalmente *Phaseolus* y *Macroptilium* se consideraban como géneros muy vinculados en cuanto a su origen al grupo americano de *Vigna*, es decir el gran subgénero **Sigmoidotropis**, los datos cromatográficos obtenidos parecen sugerir que existen a partir de **Sigmoidotropis**, y dentro de las especies americanas de *Vigna* en general, dos líneas principales: por una parte, la sección **Leptospron** (*V. adenantha*) que presenta una menor distancia con *Phaseolus*, y en segundo término, las especies más próximas a los grupos de *Vigna* del Viejo Mundo, como la sección **Pedunculares** y *V. luteola* del subgénero **Vigna**, respecto a las cuales se establecen las mayores afinidades con *Macroptilium*.

Todo esto sugeriría, siempre desde una perspectiva basada en las evidencias cromatográficas, que a lo largo de la evolución estos dos géneros, *Phaseolus* y *Macroptilium*, se habrían originado a partir de antecesores relacionados al subgénero **Sigmoidotropis**, pero siguiendo líneas distintas, o bien en dos momentos más espaciados en el tiempo.

5.3. Perspectivas

Si bien el presente estudio pretendió enfocar la problemática de la subtribu **Phaseolinae** desde un punto de vista distinto (para el grupo) como es la quimiotaxonomía empleando compuestos fenólicos (flavonoides) como marcadores, el hecho de limitar la cantidad de especies estudiadas a las que están representadas en la flora argentina hace que se trate de un estudio parcial. Sin embargo, dado que las mayores controversias giran en torno a muchas de estas especies, creemos que este trabajo puede resultar valioso en la medida que establece un punto de partida para encarar el estudio de los grupos restantes tanto americanos como del resto del mundo.

En particular creemos que, para el futuro, se imponen dos líneas a seguir: por un lado, establecer los perfiles cromatográficos de los flavonoides foliares de las principales especies de *Vigna* del Viejo Mundo, en particular de los subgéneros *Vigna* (africano) y sobre todo, el subgénero **Plectotropis**, considerado como el verdadero nexo entre las *Vigna* del Nuevo y del Viejo Mundo. Esta etapa también debería abarcar el estudio comparativo de los pequeños géneros americanos como *Ramirezella*, *Strophostyles*, *Pachyrhizus* y *Oxyrhynchus* respecto a los principales, como *Vigna*, *Phaseolus* y *Macroptilium*.

En segundo término, y en esta tarea nos hallamos ya empeñados, es fundamental la correlación de la información química obtenida con los datos de la morfología, la palinología y los estudios a nivel de la ultraestructura del aparato estilar para establecer, en un análisis conjunto de todos los datos, un esquema verdaderamente representativo a nivel filogenético.

En particular, la reconstrucción del árbol filogenético mediante técnicas numéricas aplicando los conceptos del cladismo requiere un universo de caracteres que no puede limitarse solamente a los aspectos químicos, sobre todo en un grupo como las **Phaseolinae** donde el alto grado de especialización alcanzado está muy relacionado a los aspectos de la biología floral y al desarrollo de las estructuras del gineceo y otras partes de la flor.

Estos aspectos morfológicos, no siempre se han prestado a interpretaciones homogéneas respecto a su carácter funcional y evolutivo, por lo que la ampliación y diversificación de los caracteres, como la correcta elección y ponderación de los mismos no es un asunto menor en un análisis de este tipo.

Así, aunque a lo largo del tiempo se han sucedido diversas tendencias en cuanto al enfoque taxonómico con que se encaró el

estudio de las **Phaseolinae**, creemos que en los últimos 20 años los conocimientos biosistemáticos acerca del grupo han comenzado a alcanzar una masa crítica suficiente como para ir ya adquiriendo una comprensión global del mismo.

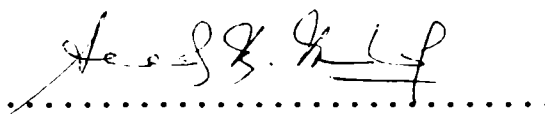
Este proceso, que obviamente no puede considerarse clausurado o acabado todavía, requerirá seguramente del esfuerzo de nuevos botánicos, e incluso de otros especialistas, capaces de reconstruir paso a paso el largo camino que la Naturaleza ya ha recorrido.



Lic. Enrique Mario Zallocchi



Prof. Ing. Agr. Ramón Antonio Palacios
[Director]



Prof. Dra. Alicia Beatriz Pomilio
[Co-Director]

CAPITULO 6

BIBLIOGRAFIA

AGRAWAL, P.K. y R.P. RASTOGI, 1981. ^{13}C NMR spectroscopy of flavonoids. *Heterocycles* 16 (12) : 2181-2236

ASEN, S. y R. GRISEBACH 1983. HPLC analysis of flavonoids in geranium florets: an adjunct for cultivar identification *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 108 (5) : 845-850

ARMAND, J., M. DE FORNI, G. RECONDO, L. CALS, E. CVITKOVIC y J. MUNCK, 1988. Flavonoids: a new class of anticancer agents? Preclinical and clinical data of flavone acetic acid. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 235-241, Alan R. Liss Inc. New York.

BACON, J.D., 1978. Taxonomy of *Nerisyrenia* (Cruciferae). *Rhodora* 80 : 159-227

BATE-SMITH, E.C., 1962. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. *J. Linn. Soc. Bot.* 58 : 95-173

-----, 1973. Chemotaxonomy of *Geranium*. *J. Linn. Soc. Bot.* 67 : 347-359

BAUDET, J.C. 1973. Intérêt taxonomique des caracteres épidermiques dans le complexe *Phaseolus-Vigna*. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique* 106 : 53-59

----- 1974. Signification taxonomique des caracteres blastogéniques dans la tribu des Papilionaceae Phaseoleae. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 44 : 259-293.

----- 1977. Origine et classification des espèces cultivées du genre *Phaseolus*. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* 110 : 65-76

----- 1978. Prodrôme d'une classification générique des Papilionaceae-Phaseoleae. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 48: 183-220

----- y R. MARECHAL, 1976. Signification taxonomique de la présence de poils uncinulés chez certains genres de

Phaseoleae et d'Hedysareae (Papilionaceae). *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 46 : 419-426

----- y M. TORCK, 1978. Essai sur la signification taxonomique des flavonoides. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 125 : 479-483

BECKER, H. y G. WILKING, 1977. Separation of glycoflavones by high-pressure liquid chromatography *J. Chromatogr.* 136 : 174-175

BELL, E.A., 1971. Comparative biochemistry of non-protein aminoacides. In: J.B. Harborne, D. Boulter & B.L. Turner Ed. "*Chemotaxonomy of the Leguminosae*" , pp. 179-206 , Academic Press, London - New York.

BENTHAM, G. 1837. *Commentationes de leguminosarum generibus.* Vindobonae. Typis J.P. Sollingeri, Viena

----- 1839. De Leguminosarum generibus commentations. *Ann. Wiener Mus. Naturgesch.* 2 : 61-142

----- 1859. Leguminosae. In: K.F.P. Von Martius, *Flora Brasiliensis*, vol. 15, part. I. Lipsiae.

----- y F.J.D. HOOKER 1865. Leguminosae. In: *Genera Plantarum* 1 : 434-600

BERETZ, A., R. ANTON y J.P. CAZENAVE, 1986. The effects of flavonoids on cyclic nucleotide phosphodiesterases. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 281-296, Alan R. Liss Inc. New York.

----- y J.P. CAZENAVE, 1988. The effect of flavonoids on blood-vessel wall interactions. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 187-200, Alan R. Liss Inc. New York.

BERG, P.A. y P.T. DANIEL, 1988. Effects of flavonoid compounds on the inmune response. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 157-171, Alan R. Liss Inc. New York.

BESSION, E., G. DALLAMONICA, J. CHOPIN, K.R. MARKHAM, M. KIM, H.S. KOH y H. FUKAMI 1985. C-glycosilflavones from *Oryza sativa*. *Phytochemistry* 24: 1061

BIANCHINI, J.P. 1980. Separation of polymethoxylated flavones by straight-phase high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr.* 190 : 233-236

BIBBY, M.C., J. DOUBLE, R. PHILLIPS, P. LOADMAN y J. GUMMER, 1988. Experimental; anti-tumor effects of flavone acetic acid (LM975). In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 243-246, Alan R. Liss Inc. New York.

BIGGS, R. 1975. Post-infectional compounds from the french bean *Phaseolus vulgaris*; isolation and identification of genistein and 2',4',5,7,-tetrahydroxyisoflavone. *Aust. J. Chem.* 28 : 1389-1392

BIRCH, A.J. y F.W. DONOVAN, 1953. *Austral. J. Chem.* 6 : 360-368

BLACKITH, R.E. y R.A. REYMENT, 1971. *Multivariate morphometrics*. Academic Press, London.

BOHM, B.A., 1987. Infraespecific flavonoid variation. *Bot. Rev.* 53 : 197-219

-----, K.W. NICHOLLS y R. ORNDUFF, 1986. Flavonoids of Menyanthaceae: intra- and interfamilial relationships. *Amer. J. Bot.* 73 (2) : 204-213

BOKKENHEUSER, V.D. y J. WINTER, 1988. Hydrolysis of flavonoids by human intestinal bacteria. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 143-146, Alan R. Liss Inc. New York.

BOUTLER, L.G., J.C. ROEGLER, H. MEHANSHO y D.M. CARLSON, 1986. Dietary effects of tannins. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 141-157, Alan R. Liss Inc. New York.

BOURDILLAT, B., D. DELAUTIER, C. LABAT, J. BENVENISTE, P. POTIER y C. BRINK, 1988. Mechanism of action of hispidulin, a natural flavone, on human platelets. In: "**Plant flavonoids in Biology and**

Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties" , pp. 211-214, Alan R. Liss Inc. New York.

BRACKE, M., R. VAN CAUWENBERGE, M. MAREEL, V. CASTRONOVO y J.M. FOIDART, 1986. Flavonoids: tools for the study of tumor invasion in vitro. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships"** , pp. 441-444, Alan R. Liss Inc. New York.

-----, G. DE PESTEL, V. CASTRONOVO, B. VYNCKE, J. FOIDART, L. VAKAET y M. MARCEL, 1988. Flavonoids inhibit malignant tumor invasion in vitro. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties"** , pp. 219-233, Alan R. Liss Inc. New York.

BRAGG, L.H., J.D. BACON, C. MC MILLAN y T.J. MABRY, 1978. Flavonoid patterns in the *Prosopis juliflora* complex. *Biochem. Syst. and Ecolog.* 6 : 113-116

BRANDEGEE, C., 1912. *Plantae mexicanae purpusianae IV. Univ. Califor. Publ. Bot.* 4 : 269-281

BREITMEIER, E., W. VOELTER, G. JUNG & C. TANZER 1971. *Chem. Ber.* 104 : 1147

BROUILLARD, R. y A. CHEMINANT, 1988. Flavonoids and plant color. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties"** , pp. 93-106, Alan R. Liss Inc. New York.

BROWN, G.B., J.R. DEAKIN y J.C. HOFFMAN 1971. Identification of snap bean cultivars by paper chromatography of flavonoids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96 (4) : 447-481

BURKART, A. 1941. Sobre la existencia de razas silvestres de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus lunatus* en el norte argentino. Resoluc. y Resúmenes. Botánica, *Primera Reunión Argentina de Agronomía* : 52

----- 1944. Tres nuevas leguminosas del Paraguay. *Darwiniana* 6 (3) : 477-493

----- 1952. *Las Leguminosas argentinas silvestres y cultivadas.* Edit. Acme, Buenos Aires. 546 pág.

----- y H. BRUCHER 1953. *Phaseolus aborigineus* Burkart die mutmebliche andine stammform der Kulturbohne. *Der Züchter* 23 (3) : 65-72

BUSCHI, C.A. 1982. **Estudio químico de *Gomphrena martiana* Moquin (Flia. Amarantacea)**- Fac. Cs. Exactas y Nat.-UBA. Tesis Doctoral

----- y A.B. POMILIO, 1982. Isorhamnetin 3-O-robinobioside from *Gomphrena martiana*. *J. Nat. Prod.* 45 : 557-61

CAGNIN, M.H.A. y GOTTLIEB, O.R., 1978. Isoflavonoids as systematic markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 6 : 225-238

CANDOLLE, A.P. De, 1825. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Vol.2.-Paris, Strasbourg, London.

CARLSON, R.E. y D. DOLPHIN 1980. High-performance liquid chromatography method for the analysis of isoflavones. *J.Chromatogr.* 198 : 193-197

CARMAN, N.J., 1973. **Systematic and ecological investigations in the genus *Prosopis* (Mimosaceae) emphasizing the natural products chemistry**. PhD. Thesis, Univ. Texas at Austin.

----- y T.J. MABRY, 1975. Disjunction of *Prosopis reptans* and the origin of the North American populations. *Biochem. Syst.* 3 : 19-23

CARMONA, C. 1988. Quimiotaxonomía en el género *Oxalis*. Fac. Cs. Exactas y Nat. UBA- Tesis Doctoral.

CASTEELE, K.V., H. GEIGER y C.F. VAN SUMERE 1982. Separation of flavonoids by reverse-phase high-performance liquid chromatography *J.Chromatogr.* 240:81-94

CLAUSEN, R.T. 1944. A botanical study of the yam beans (*Pachyrizus*). *New York Agric. Exp. Sta.* 268 , 38 pp.

CODY, V. 1988. Crystal and molecular structures of flavonoids. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 29-44, Alan R. Liss Inc. New York.

-----, J. KOEHRLE, M. AUFMKOLK y R. HESCH, 1986. Structure-activity relationships of flavonoid deiodinase inhibitors and

enzyme active-site models. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships" , pp. 373-382, Alan R. Liss Inc. New York.

COURT, W.A. 1977. High-performance reverse-phase liquid chromatography of naturally occurring phenolic compounds *J.Chromatogr.* 130 : 287-291

COURTOIS, J.E. y F. PERCHERON, 1971. Distribution des monosaccharides, oligosaccharides et polyols. In: J.B. Harborne, D. Boulter & B.L. Turner Ed. " *Chemotaxonomy of the Leguminosae*" , pp. 207-230 , Academic Press, London - New York.

CRAWFORD, D.J. 1978. Flavonoid chemistry and angiosperm evolution. *Bot. Rev.* 44 (4) : 431-456

CRISCI, J. V. y M.F. LOPEZ ARMENGOL, 1983. *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Monografía N° 26 - serie de Biología- Sec.Gral.de la OEA

CUADRAS AVELLANA, C.M. 1981. *Métodos de análisis multivariante*. Colección Laboratorio de Cálculo, No. 23, 642 pág., EUNIBAR, Barcelona.

DAIGLE, D.J. y E.J. CONKERTON 1982. High-performance liquid chromatography of 34 selected flavonoids *J.Chromatogr.* 240 : 202-205

DELLA LOGGIA, R., A. TUBARO, P. DRI, C. ZILLI y P. DEL NEGRO , 1986. The role of flavonoids in the antiinflammatory activity of *Chamomilla recutita*. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships" , pp. 481-484, Alan R. Liss Inc. New York.

DEL PERO MARTINEZ, M.A. y D. DE AZKUE, 1984. Flavonoides en especies de *Oxalis*: su interpretación taxonómica y filogenética. *Parodiána* 3 (1) : 151-167

----- y T. SWAIN, 1985. Flavonoids and chemotaxonomy of Commelinaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 13 : 387-391

DIXON, W.J. 1983. *BMDP Statistical Software Package*. Berkeley University of California Press.

DORR, K.K. y D.I. GUEST 1987. Rapid, sensitive high-performance liquid chromatography assay for isoflavonoids from cowpea (*Vigna unguiculata*) *J.Chromatogr.* 387 : 536-540

ELLIOT, S. 1822. A sketch of the botany of the South Carolina and Georgia. *Sketch* 2 : 229

ENGELHARDT, H. 1979. *High performance liquid chromatography (Chemical laboratory practice)*- 248 pp- Springer Verlag (Berlin-Heidelberg-N.York)

EVANS, A. 1980. Structure, variation, evolution and classification in *Phaseolus*. In: R.J. Summerfield & A.H. Bunting (Ed): "**Advances in Legume Science**", pp. 337-347.

FAWCETT, A. y A. RENDLE, 1920. "**Flora of Jamaica**" 4 62-71 (London)

FEVEREIRO, V.P.B. 1987. *Macroptilium* (Benth.) Urban do Brasil *Arq. Jard. Bot. R. Jan.* XXVIII: 109-180

FIRMIN, J.L., K.E. WILSON, L. ROSSEN y A.W. JOHNSTON 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature* 324 : 90

FORD, C.W. 1971. Flavonoids from *Phaseolus atropurpureus*. *Phytochemistry* 10 : 2807-2810

FUJIKI, H., T. HORIUCHI, K. YAMASHITA, H. HAKII, M. SUGANUMA, H. NISHINO, A. IWASHIMA, Y. HIRATA y T. SAGIMURA, 1986. Inhibition of tumor promotion by flavonoids. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 429-440, Alan R. Liss Inc. New York.

GABOR, M. 1986. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of flavonoids. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 471-480, Alan R. Liss Inc. New York.

----- 1988. Szent-Györgyi and the bioflavonoids: new results and perspectives of pharmacological research into benzo-pyrone derivatives. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 1-15, Alan R. Liss Inc. New York.

GAGNEPAIN, F. 1915. *Phaseolus, Vigna, Dysolobium, Dolichos* : étude critique. *Bull. Soc. Bot. France* 62: 225

----- 1916. Papilionaceae. In: H. Leconte, *Flore Générale de l'Indo-Chine* 2: 218-248 Paris.

GAITAN, E., R. LYNDSEY, R. COOKSEY, J. HILL, R. REICHERT y S. INGBAR, 1988. The thyroid effects of C-glycosilflavonoids in Millet. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 349-363, Alan R. Liss Inc. New York.

GALENSA, R. y K. HERRMAN 1980. Analysis of flavonoids by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 189 : 217-224

GAUDEMER, A. y E. LEDERER 1964. Presence du methoxy-4' flavane dans le castoreum. *C. R. Acad. Sci. Paris* 259: 4167 (citado en J.B. Harborne, 1986, pag. 23)

GEISSMANN, T.A. y J.B. HARBORNE 1955. *Arch. Biochem. Biophys.* 55 : 447-454 (citado por Harborne, J.B., 1986)

GIANNASI, D.E. 1978. Systematic aspects of flavonoid biosynthesis and evolution. *Bot. Rev.* 44 (4) : 399-430

----- 1980. Flavonoid evidence for generic lines in selected Gymnogramnoid ferns. *Bull. Torrey Bot. Club* 107 (2) : 128-133

----- y K.J. NIKLAS, 1977. Flavonoid and other chemical constituents of fossil miocene *Celtis* and *Ulmus* (Succor Creek flora). *Science* 197 : 765-767

GILLET, J. B. 1964. Citado en Verdcourt, B. 1970.: Studies in the Leguminosae Papilionoideae for the "*Flora of tropical East Africa*" IV. *Kew Bull.* 24: 507-509

GLORIES, Y. 1988. Anthocyanin and tannins from wine: organoleptic properties. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 123-134, Alan R. Liss Inc. New York.

GLUSKER, J.P. y M. ROSSI, 1986. Molecular aspects of chemical carcinogens and bioflavonoids. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships" , pp. 395-410, Alan R. Liss Inc. New York.

GRAZIANI, Y., 1986. The effect of quercetin on pp60-v-src kinase activities. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships" , pp. 301-313, Alan R. Liss Inc. New York.

GOMES, C.M.R., O.R. GOTTLIEB, R.C. GOTTLIEB, & A. SALATINO, 1981. Phytochemistry in perspective: chemosystematics of the Papilionoideae. In: R.M. Polhill and P.H. Raven (Ed.) " Advance in Legume Systematics", Part I, pp 301-327. Royal Bot. Garden - Kew England.

GORIN, P.A.J. y M. MAZUREK 1975. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Can. J. Chem.* 53 (8): 1212-1223

GORNALL, R.J. y B.A. BOHM, 1978. Angiosperm flavonoid evolution: a reappraisal. *Syst. Bot. Ecol.* 3 : 353-368

GOTTLIEB, O.R. 1986. Phytochemical Evolution. *Rev. Acad. Col. Cs. Ex. Nat.* XVI (61) : 39-45

GROULLIER, A. 1965. Application de la résonance magnétique nucléaire a la détermination de structures des composés flavoniques.

GOWER, J.C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53 : 325-338

----- y G.J.S. ROSS, 1969. Minimum spanning tree and single linkage cluster analysis. *Appl. Statist.* 18 : 54-64

----- 1971. Statistical methods of comparing different multivariate analyses of the same data. In: F. Hodson, D. Kendall y P. Tautu Eds., "Mathematics in the archological and historical sciences", pp. 138-149, Edinburgh Univ. Press., Edinburgh.

GUMBINGER, H.G., H. WINTERHOFF, A. SOSA y R. WYLDE, 1988. Investigations of the structure-function relationships of flavonoid

compounds with antigonadotropic activity. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties"** , pp. 345-348, Alan R. Liss Inc. New York.

HACKETT, A. 1986. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and structure-activity relationships"** , pp. 177-194, Alan R. Liss Inc. New York.

HALBROCK, K. y H. GRISEBACH, 1975. Biosynthesis of flavonoids. In J.B. Harborne, T.J. Mabry & H. Mabry Eds.: **"The Flavonoids- Part 2"**, pp. 886-915. Academic Press- New York.

HAMILTON, R.J. y P.A. SEWELL 1982. *Introduction to high performance liquid chromatography* -248 pp. -2nd. Ed.-Chapman & Hall (N.York-London)

HARBORNE, J.B. 1967. **"Comparative Biochemistry of the flavonoids"** Academic Press- London, . New York. 383 pp.

----- 1971a. Distribution of flavonoid in the Leguminosae. In: J.B. Harborne, D. Boulter & B.L. Turner Ed. **"Chemotaxonomy of the Leguminosae"** , pp. 31-72 , Academic Press, London - New York.

----- 1971b. Terpenoid and other molecular weigh sustances of systematic interest in the leguminosae. In: J.B. Harborne, D. Boulter & B.L. Turner Ed. **" Chemotaxonomy of the Leguminosae"** , pp. 257-284 , Academic Press, London - New York.

----- 1972. Evolution and function of flavonoids in plants. *Rec. Adv. Phytochem.* 4 : 107-141

----- 1977. Flavonoids and the evolution of the Angiosperms. *Biochem. Syst. Ecol.* 5 : 7-22

----- 1982. **"Introduction to ecological biochemystry"**. 2nd. Ed.. Academic Press. London.

----- 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and structure-activity relationships"** , pp. 15-24, Alan R. Liss Inc. New York.

----- 1987. Natural fungitoxins. *Proc. Phytochem. Soc. Europe* 27 : 145-155

----- 1988a. "Flavonoids: advances in research - Volume 2" Chapman & Hill- London

----- 1988b. Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties" , pp. 17-27, Alan R. Liss Inc. New York.

----- y M. BOARDLEY 1983. Trisubstituted flavonol glycosides in *Coronilla emerus* flowers. *Phytochemistry* 22 (2): 622-625

----- 1984. Use of high-performance liquid chromatography in the separation of flavonol glycosides and flavonol sulphates. *J.Chromatogr.* 299:377-385

----- y B.L. TURNER, 1984. *Plant Chemosystematics*. Academic Press, London.

HASLAM, E. y T. LILLEY 1986. Interactions of natural phenols with macromolecules. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and structure-activity relationships" , pp. 53-65, Alan R. Liss Inc. New York.

HASSLER, E. 1907. *Dolicopsis* (Benth.) Hassl. nov. gen. *Bull. Herb. Boissier.* ser.2, 7: 161

----- 1923. Revisio speciarum austro-americanarum generis *Phaseoli* L. *Candollea* 1: 417-472

HEDIN, P.A. y S.K. WAAGE 1986. Role of flavonoids in plants resistance to insects. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and structure-activity relationships" , pp. 87-100, Alan R. Liss Inc. New York.

HELLER,W. 1986. Flavonoid biosynthesis, an overview. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and structure-activity relationships" , pp. 25-42, Alan R. Liss Inc. New York.

- HENNIG, W., 1968. "Elementos de una sistemática filogenética". Eudeba, serie Manuales, 353 páginas, Buenos Aires.
- HEYWOOD, V.H. 1971. The leguminosae: A systematic purview. In: J.B. Harborne, D. Boulter & B.L. Turner Ed. " *Chemotaxonomy of the Leguminosae*" , pp. 1-29 , Academic Press, London - New York.
- HEPPER, F. N. 1956. New taxa of Papilionaceae from West Tropical Africa. *Kew Bull.* 11: 113-134
- 1958. Papilionaceae. In: J. Hutchinson & J.M. Dalziel Ed., *Flora of tropical West Africa*, ed. 2, 1:505-586
- HODNICK, W., W. ROETTGER, S. KUNG, W. BOHMONT y R. PARDINI, 1986. Inhibition of mitochondrial respiration and acid production of superoxide and hidrogen peroxide by flavonoids: a structure activity study. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and structure-activity relationships" , pp. 249-252, Alan R. Liss Inc. New York.
- HONDA, K. 1986. Flavanone glycosides as ovoposition stimulants in a papilionid butterfly *Papilio protenor*. *J. Chem. Ecol.* 10 : 1999
- HUMPRIES, H. y P. RICHARDSON, 1980. Hennig's method and phytochemistry. In F.A. Bisby, J.G. Vaughan & C.A. Wright Eds.: "Chemosystematics : principles and practice", pp. 353-378, Academic Press, London.
- HUTCHINSON, J. 1967. Fabaceae In "The genera of Flowering Plants". 2nd. Ed.- Part 1:297-489 Clarendon Press, Oxford.
- INGHAM, J.L. y J.B. HARBORNE, 1977. Phytoalexin induction as a new dynamic approach to the study of systematic relationships among higher plants. *Nature* 260 : 241-243
- ISHIKURA, M. , IWATA, M. & MIYAZAKI, S. 1981. Flavonoids of some *Vigna* plants in Leguminosae. *Bot. Mag.* 94 : 197-205
- IWU, M. 1986. Bioflavanones of *Garcinia* : pharmacological and biological activities. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships" , pp. 485-488, Alan R. Liss Inc. New York.

JENNRICH, R. y P. SAMPSON, 1983. Stepwise Discriminant Analysis. In : Dixon, W.J. " *BMDP Statistical Software Package*", Berkeley University of California Press.

JOSEPH-NATAN, P. 1982. **Resonancia magnética nuclear de hidrógeno-1 y de carbono-13**. Monografía número 9, serie de Química, Sec. Gral. de la Org. de Estados Americanos, 164 pág., Washington DC.

JUAREZ, F. y S. PEREZ, 1986. Nueva combinación en el género *Macroptilium* (Fabaceae). **Kurtziana** 18 : 155

-----, 1987. El género *Macroptilium* (Fabaceae) en la provincia de Salta, Argentina. **Anales Inta Salta** 1 : 31-42

KINGHORN, A.D. y S.J. SMOLENSKY, 1981. Alkaloids of Caesalpinoideae and Mimosoideae. In: R.M. Polhill and P.H. Raven Ed. " *Advance in Legume Systematics*", Part II, pp 585-598. Royal Bot. Garden-Kew. England

KLOZ, J. 1971. Serology of the Leguminosae. In: J.B. Harborne, D. Boulter & B.L. Turner Ed. " *Chemotaxonomy of the Leguminosae*" , pp. 309-366, Academic Press, London - New York

KOHRLE, J. , M. AUFMKOLK, M. SPANKA, K. IRMSCHER, V. CODY y R. HESCH, 1986. Iodothyronine deiodinase is inhibited by plant flavonoids. In: " **Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 537-558, Alan R. Liss Inc. New York.

----- , M. SPANKA, K. IRMSCHER y R. HESCH, 1988. Flavonoid effects on transport, metabolism and action of thyroid hormones. In: " **Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 323-340, Alan R. Liss Inc. New York.

KRAUSS, G. y H. REINBOTHE, 1973. Free aminoacids in Mimosaceae seeds. *Phytochem.* 12 (1) : 125-142

KRUSKAL, J.B. 1964. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika* 29 : 115-129.

LACKEY, J. A., 1977. A revised clasification of the tribe Phaseoleae (Leguminosae-Papilionoideae) and its relation to canavanine distribution. *Bot. J. Linn. Soc.* 74 : 163-178

-----, 1978. Leaflet anatomy of Phaseolinae (Leguminosae: Papilionoideae) and its relation to taxonomy. *Bot. Gaz.* 139 (4) : 436-446

-----, 1981. Tribe 10. Phaseoleae D.C. (1825). In: R.M. Polhill and P.H. Raven Ed. "*Advance in Legume Systematics*", Part I, pp 301-327. Royal Bot. Garden-Kew.England

-----, 1983. A review of generic concepts in American Phaseolinae (Fabaceae, Faboideae). *ISELYA* 2 (2) : 21-64

LANGENHEIM, J.H. 1981. Terpenoids in the Leguminosae. In: R.M. Polhill and P.H. Raven Ed. "*Advance in Legume Systematics*", Part II, pp 627-655. Royal Bot. Garden-Kew.England

LARDY, C., M.L. BOULLIANT y J. CHOPIN 1984. Separation de C-glycosylflavones isomeres par chromatographie liquide a haute performance en phase inverse *J. Chromatogr.* 291 : 307-315

LAW, K.H. y N.P. DAS 1988. Initiation and maintenance of callus tissue culture of *Uncaria elliptica* for flavonoid production. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 67-70, Alan R. Liss Inc. New York.

LAWRENCE, W., S. BLAS y P. DAVIS, 1986. Sex-specific effect of quercetin on rabbit reticulocyte membrane Ca^{2+} - ATPase activity. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 273-276, Alan R. Liss Inc. New York.

LAYCHOCK, S.G. 1986. The biochemistry of cell activation as related to the putative actions of flavonoids. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 215-229, Alan R. Liss Inc, New York.

LINDMAN, C.A., 1898. Leguminosae Austro-Americanae. Bihang Till K. Sv. Vet.- Akad. Handl. Band 24, afd. III, n° 7: 1-61

LINNAEUS, C. 1763. *Phaseolus lathyroides*. En: **Species Plantarum**, 2 ,pp. 1018, 2da. edición, Stockholm..

LIPTAK, A. y P. NANASI 1975. A convenient synthesis of O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D galactopyranose nona-acetate. *Carbohydr. Res.* 44: 313-316

-----, A. NESZMELYI y H. WAGNER 1979. Unambiguous synthesis of (1 \rightarrow 2) and (1 \rightarrow 5) rhamnopyranosyl-rhamno-pyranose derivatives and their ^{13}C -NMR study. *Tetrahedron Lett.* 8 : 741-744

LUNTE, S.M. 1987. Structural classification of flavonoids in beverages by liquid chromatography with ultraviolet-visible and electrochemical detection *J. Chromatogr.* 384 : 371-382

MABRY, T.J., K.R. MARKHAM y M.B. THOMAS, 1970. *The Systematic Identification of flavonoids.* 354 pp., 325 figures. Springer Verlag, N. York.

MACGREGOR, J.T., 1986. Mutagenic and carcinogenic effects of flavonoids. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships" , pp. 441-424, Alan R. Liss Inc. New York.

MAEKAWA, F. 1955. Topo-morphological and taxonomical studies in Phaseoleae, Leguminosae. *Jap. J. Bot.* 15 : 103-116

MARECHAL, R. 1969. Données cytologiques sur les espèces de la sous-tribu des Papilionaceae-Phaseoleae-Phaseolinae. *Bull. Bot. Nat. Belg.* 39 : 65-125

-----, 1970. Données cytologiques sur les espèces de la sous-tribu des Papilionaceae-Phaseoleae-Phaseolinae. *Bull. Bot. Nat. Belg.* 40 : 307-348

----- y J.C. BAUDET, 1974. Deux combinaisons nouvelles dans le genre *Macroptilium* (Urban) Papilionaceae. *Bull. Jard. Bot. Natl. Belg.* 44 : 443-44

-----, 1977. Combinaisons nouvelles dans le genre *Macroptilium* (Benth) Urban (Fabaceae). *Bull. Jard. Bot. Natl. Belg.* 47 : 257

-----, J.M. MASCHERPA y F. STAINIER 1978a. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique.

-----, 1978b. *Taxon* 27:201

-----, 1981. Taxonomic study of the Phaseolus-Vigna complex and related genera. In: R.M.Polhill and P.H.Raven Ed. " *Advance in Legume Systematics*", Part I, pp. 329-335. Royal Bot. Garden-Kew.England

MARKHAM, K.R. 1975. In: J.B.Harborne, T.J. Mabry y H.M. Mabry Ed. " *The Flavonoids*", Chapman & Hall. pag.37

----- y T.J. MABRY, 1968. The identification of twenty-three 5-deoxy and ten 5-hydroxy flavonoids from *Baptisia lecontei* (Leguminosae) *Phytochemistry* 7 : 791-801

----- y T.W. SWIFT, 1968. New isoflavones from the genus *Baptisia* (Leguminosae). *Phytochemistry* 7:803-808

-----, 1970. Distribution of flavonoids in the genus *Baptisia* (Leguminosae) *Phytochemistry* 9 : 2359-2364

----- y B. TERNAI, 1976. ¹³C NMR of flavonoids- Part II. Flavonoids, other than flavone and flavonol aglicones. *Tetrahedron* 32 (21) : 2607-2612

-----, R. STANLEY, H. GEIGER & T.J. MABRY 1978. Carbon-13 NMR studies of flavonoids - III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 34 (9) : 1389-1398.

MEARS, J.A. & T.J. MABRY 1971. Alkaloids in the Leguminosae. In: J.B. Harborne, D. Boulter & B.L. Turner Ed. " *Chemotaxonomy of the Leguminosae*" , pp. 73-178 , Academic Press, London - New York.

MENENDEZ SEVILLANO, M., R. PALACIOS, E. ZALLOCCI y M. BRIZUELA 1992a. Preliminary observations on the argentinian wild forms of common bean *P. vulgaris* var *aborigineus* (Burk.) Baudet. *An. Rep. BIC* 35 : 211-212

-----,
1992b. *Phaseolus vulgaris* L.: estudio comparativo entre las formas silvestres y los cultivares primitivos. (en preparación)

MEURER, B., R. WIERMANN y D. STRACK 1988. Phenylpropanoid patterns in Fagales and their phylogenetic relevance. *Phytochemistry* 27 (3) : 823-828

MIDDLETON, E. 1986. Effect of flavonoids on basophil histamine release and other secretory systems. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 493-506, Alan R. Liss Inc. New York.

----- y P. FERRIOLA, 1988. Effect of flavonoids on protein kinase C: relationships to inhibition of human basophil histamine release. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 251-266, Alan R. Liss Inc. New York.

MOOKERJEE, B., T. LEE, G. LOGUE, H. LIPPES y E. MIDDLETON 1986. The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 511-520, Alan R. Liss Inc. New York.

MORRIS, S.J. y R.H. THOMSON, 1963. The flavonoid pigments of the Marbled White, *Malanargia galathea*. *J. Insect. Physiol.* 9 : 391

MOSS, W.W. 1967. Some new analytic and graphic approaches to numerical taxonomy with an example from the Dermanyssidae (Acari) *Syst. Zool.* 16 : 177-207

NARANJO, C.A., L. POGGIO y S. ENUS ZEIGER, 1984. Phenol chromatography, morphology and cytogenetics in three species and natural hybrids of *Prosopis* (Leguminosae-Mimosoideae). *Plant Syst. Evol.* 144 : 257-276

NEES & MARTIUS, 1824. *Phaseolus bracteatus* in Wied-Neuwied, Beitrag zur Flora Brasiliens. *Nova Acta Acad. Caes. Leop. Carol. Nat. Cur.* 12 (1) : 27-28

NICKLAS, K.J., D.E. GIANNASI y N.L. BAGHAI, 1985. Paleobiochemistry of North American fossil *Liriodendron* sp. *Biochem. Syst. Ecol.* 13 : 1-5

NIELSEN, J.K., L.M. LARSEN y H. SORENSEN 1979. Host plant selection of the horseradish flea beetle: two flavonol glycosides stimulating feeding. *Ent. Exp. & Appl.* 26: 40

NIEMANN, G.J. y J.V. BREDERODE 1978. Separation of glycoflavones and their glycosides by high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr.* 152:523-527

NISHIDA, R., T. OHSUGI, S. KOKUBO y H. FUKAMI 1987. Ovoposition stimulants of a citrus-feeding swallowtail butterfly *Papilio xuthus*. *Experientia* 43 : 342

NOMURA, T., T. FUKAI, Y. HANO, S. YOSHIZAWA, M. SUGANUMA y H. FUJIKI, 1988. Chemistry and anti-tumor promoting activity of *Morus* flavonoids. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties" , pp. 267-281, Alan R. Liss Inc. New York.

OHWI, J. 1953. *Flora of Japan* 690 (citado en Maréchal et al., 1978a)

----- y H. OHASHI 1969. Adzuki beans of Asia. *Jap. J. Bot.* 44 : 29-31

OKKER, R.J., H.P. SPAINKK, S.A. ZAAT, C.A. WIJFFELMANN y B.J. LUGTENBERG 1988. Flavonoids in the *Rhizobium*-Legume symbiosis. In: "Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties" , pp. 71-76, Alan R. Liss Inc. New York.

PALACIOS, R.A. y L.D. BRAVO, 1981. Hibridación natural en *Prosopis* (Leguminosae) en la región chaqueña argentina. Evidencias morfológicas y cromatográficas. *Darwiniana* 23 (1): 3-35

----- , M.M. BRIZUELA, A.D. BURGHARDT, E.M. ZALLOCCI y M.P. MOM, 1991. *Prosopis burkartii* and its possible hybrid origin. *Bull. IGSM* 19 : 146-161

----- y A.E. VILELA, 1991. Las especies argentinas de *Phaseolus* (un recurso genético que necesita protección). **Actas del II° Simposio Latinoamericano sobre Recursos Genéticos de Especies Hortícolas y XIV Congreso Argentino de Horticultura- Septiembre de 1991- Mar del Plata (En prensa)**

PETERS, N.K., J.W. FROST y S.R. LONG 1988. A plant flavone luteolin induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233 : 977

PIELOU, E. C. 1984. *The interpretation of ecological data: a primer on classification and ordenation*. Wiley Interscience Publication, 263 pp. J. Wiley & Sons.

PIERPOINT, W.S., 1986. Flavonoids in the human diet. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships"** , pp. 125-140, Alan R. Liss Inc. New York.

PIPER, C. V. 1920. A new genus (*Monoplegma*) of Leguminosae. *J. Wash. Acad. Sci.* 10 : 432-433

----- 1924. The genus *Oxyrhynchus* Brandegee. *J. Wash. Acad. Sci.* 14: 46-49

----- 1926. Studies in american Phaseolinae. *Contr. U.S. Nat. Herb.* 22: 663-701

PRAIN, D. 1897. Noviciae Indicae 15. *J. Asiat. Soc. Bengal* 66 : 347-519

PRICE, R. y E. MIDDLETON, 1986. Interaction of flavonoids with model membranes. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships"** , pp. 507-509, Alan R. Liss Inc. New York.

POMILIO, A. B. y E.M. ZALLOCCI, 1989. Two new isorhamninosides from *Vigna luteola*. *J. Nat. Prod.* 52 (3) : 511-515

RACKER, E., 1986. Effect of quercetin on ATP-driven pumps and glycolysis. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships"** , pp. 257-271, Alan R. Liss Inc. New York.

REDMONT, J.W., M. BATLEY, M.A. DJORDJEVIC, R.W. INNES, P.L. KUEMPEL y B.G. ROLFE 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323 : 632

RICHARD, A. 1847. *Tent. Fl. Abyss.* I:216 (citado por Verdcourt, 1970a)

RICHARDSON, M.P. y D. YOUNG, 1982. The phylogenetic content of flavonoid point scores. *Biochem. Syst. and Ecol.* 10 : 251-257

RIESS-MAURER, I., H. WAGNER y A. LIPTAK 1979. Synthese und ¹³C-NMR Untersuchung von Flavonol-3-O-(dirhamnosyl)-galactosiden der Xanthorhamnin-, Catharticin- und Alaterin-Reihe. *Tetrahedron Lett.* 39 : 3695-3698

RITCHIE, R.G., N. CYR, B. KORSCH, H.I. KOCH y A. S. PERLIN 1975. Carbon-13 chemical shifts of furanosides and cyclopentanols. Configurational and conformational influences. *Can. J. Chem.* 53 (10) : 1424

ROBINSON, R. 1936. Formation of Anthocyanins in plants. *Nature* 137 : 172-173

ROHLF, F. J. 1968. Stereograms in numerical taxonomy. *Syst. Zool.* 17 : 246-255

----- 1973. Algorithm 67 : Hierarchical clustering using the minimum spanning tree. *Computer J.* 16 : 93-95

ROSE, J.N., 1903. Studies in Mexican and Central American plants N# 3. *Contr. U.S. Natl. Herb.* 8 : 1-55

ROSS, G.J.S., 1969. Algorithm AS 13-15. *Appl. Statist.* 18 : 103-110

ROTHSCHILD, M. ; H. ALBORN y G. STENHAGEN 1987. A cardenolide ovoposition deterrent from siberian wallflower *Cheirantus x allionii*. *Phytochemistry* 26:

ROUSSEF, R.L. y S.V. TING 1979. Quantitation of polymethoxylated flavones in orange juice by high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr.* 176:75-87

RUDD, V.E. 1967. *Oxyrhynchus* y *Monoplegma* (Leguminosae). *Phytologia* 15 : 289-294

SAVI, F. 1824. Mem. *Phaseolus & Dolichos*. *Pisa Nuovo Giorn. Lett.* ser. 3, 8 : 113.

SCHMID, R.D., P. VARENNE y R. PARIS 1972. Mass spectrometry of flavonoid trisaccharides. *Tetrahedron* 28 : 5037-5048

SCHTEINGART, C.D. 1983. *Estudio químico de Wedelia glauca (Ort) Hoffmann ex Hicken y Wedelia bupthalmiflora Lorentz (Flia. Compositae)*. Tesis Doctoral, FCEN-UBA. 258 pp.

SELIGMANN, O. y H. WAGNER. Massenspektrometrie von Flavonoid-O-glycosiden II. *Tetrahedron* 34 (22) : 3299-3303

SELWAY, J.W.T. 1986. Antiviral activity of flavones and flavans. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships"** , pp. 521-536, Alan R. Liss Inc. New York.

SHARMA, R.D., 1979a. Isoflavones and hypercholesterolemia in rats. *Lipids* 14 (6) : 535-540

-----, 1979b. Effect of various isoflavones on lipid levels in triton-treated rats. *Atherosclerosis* 33 (3) : 371-375

SHEPARD, R.N. 1962. The analysis of proximities: multidimensional scaling with an unknown distance function. *Psychometrika* 27 : 125-140 (part I) y 219-246 (part II)

SHORE, L. y R. LYTTLE, 1986. Interactions of isoflavones, zearalenone and des with rat uterine peroxidase enzyme. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships"** , pp. 253-256, Alan R. Liss Inc. New York

SMITH, D.A. y S. W. BANKS 1988. Formation and biological properties of isoflavonoids phytoalexins. In: **"Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties"** , pp. 113-124, Alan R. Liss Inc. New York.

SMOLENSKY, S.J. y A.D. KINGHORN, 1981. Alkaloids of Caesalpinoideae and Mimosoideae. In: R.M. Polhill and P.H. Raven Ed. **" Advance in Legume Systematics"**, Part II, pp 579-584. Royal Bot. Garden-Kew. England

SNEATH, P. H. & R.R. SOKAL, 1973. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. Freeman (Ed.) S. Francisco. 573 pp.

SOSA, F. y F. PERCHERON, 1969. Le kaempferol 3-O-rhamno-di-glucoside, nouvel heteroside du pollen de *Populus yunnanensis*.

Phytochemistry 9 : 441-446

SPAINK, H.P., C.A. WIJFFELMAN, E. PEES, R. OKKER y B. LUGTENBERG 1987. *Rhizobium* nodulation gene nod D as a determinant of host specificity. *Nature* 328 : 337

SRIVASTAVA, A.K. y J.L. CHIASSON, 1986. Effect of quercetin on serine/treonine and tyrosine protein kinases. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 315-318, Alan R. Liss Inc. New York.

STAINIER, F. y F. HORVAT, 1978. L'étude de l'exine du pollen dans le complexe Phaseolus-Vigna et dans genres apparentés. *Pollen et Spores* 22 : 195-214

STUESSY, T.F., 1980. Cladistics and plant systematics: problems and prospects. *Syst. Bot.* 5 : 109-111

SWAIN, T., 1975. Evolution of flavonoid compounds. In J.B. Harborne, T.J. Mabry & H. Mabry Eds.: "**The Flavonoids**", pp. 1086-1126. Chapman and Hall. London.

-----, 1986. The evolution of flavonoids. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 1-14, Alan R. Liss Inc. New York.

TERNAI, B. y K.R. MARKHAM, 1976. Carbon-13 NMR studies of flavonoids- Part I. Flavones and flavonols aglicones. *Tetrahedron* 32 (5) : 565-570

TIMBERLAKE, C.F. y HENRY, B.S., 1988. Anthocyanins as natural food colorants. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 107-121, Alan R. Liss Inc. New York.

TINDALE, M.D. y D.G. ROUX, 1969. A phytochemical survey of the Australian species of *Acacia*. *Phytochemistry* 8 : 1713-1727

TOMAS-BARBERAN, F.A., M. MAILLARD y K. HOSTETTMANN, 1988. Antifungal flavonoids from the leaf surfaces of *Helichrysum nitens* and from the stem bark of *Erythrina berteroana*. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and**

medicinal properties" , pp. 61-66, Alan R. Liss Inc. New York.

-----, J.D. MSONTHI y K. HOSTETTMANN 1988.
Antifungal epicuticular methylated flavonoids from *Helichrysum nitens*. *Phytochemistry* 27 : 753-755

TORCK, M. 1976. Revue de phytochimie: les flavonoides des Legumineuses. *Fitoterapia* 47:195-242

----- , L. BEZANGER-BEAUQUENSE, y M. PINKAS 1971a. Recherche sur les flavonoids des Legumineuses. *Ann. Pharm. Francais* 29 (3) : 201-210

----- , L. BEZANGER-BEAUQUENSE y A. ROBELET 1971b. Recherche sur les flavonoids des Legumineuses. *Ann. Pharm. Francais* 29 (4) : 297-304

TORGERSON, W.S. 1952. Multidimensional scaling: I. Theory and method. *Psychometrika* 17 : 401-419

TORO, O., J. THOME y D. DEBOUCK, 1990. **Wild bean (*Phaseolus vulgaris* L.): description and distribution.** International Board for Plant Genetic Resource (IBPGR) and Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 106 pp.

TOURNER, B. L. 1971. Implications of the biochemical data: a summing up. In: J.B. Harborne, D. Boulter & B.L. Turner Ed. "*Chemotaxonomy of the Leguminosae*" , pp. 549-558, Academic Press, London - New York

URBAN, I. 1928. Plantae cubenses novae vel rariores. L. Elkman lectae. IV. *Symbol. Antill.* 9: 433-543

VANHAELEN, M. y R. VANHAELEN-FASTRE 1980. High-performance liquid, gas-liquid and thin-layer chromatography of naturally occurring flavonoids, phenolic and related compounds *J. Chromatogr.* 187 : 255-260

VARMA, S.D., 1986. Inhibition of aldose reductase by flavonoids: possible attenuation of diabetic complications. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 343-358, Alan R. Liss Inc. New York.

VERDCOURT, B. 1970a. Studies in the Leguminosae Papilionoideae for the "Flora of tropical East Africa" IV. *Kew Bull.* 24 : 507-569

----- . 1970b. Proposal for the retypification of 3910 *Dolichos* L. by *Dolichos trilobus* L. pro parte. *Taxon* 19:297-298

----- . 1971. Phaseoleae. In: E. Milne-Redhead & R. M. Polhill, *Flora of Tropical East Africa*, Leguminosae (Part. IV), Papilionoideae (2). London.

----- . 1980. The classification of *Dolichos* L. emend. Verdcourt, *Lablab* Adans., *Phaseolus* L., *Vigna* Savi and their allies. In: R.J. Summerfield & A.H. Bunting (Ed): " **Advances in Legume Science**"

VLIETINCK, A., D. VANDEN BERGHE, L. VAN HOOF, R. VRIJSEN y A. BOEYE 1986. Antiviral activity of 3-methoxyflavones. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 537-540, Alan R. Liss Inc. New York.

-----, ----- y A. HAEMERS, 1988. Present status and prospects of flavonoids as anti-viral agents. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 283-299, Alan R. Liss Inc. New York.

VERVOORST, F., 1982. Simposio "Conservación de la Vegetación Natural en la República Argentina", NOROESTE. XVIII Jornadas Argentinas de Botánica, Tucumán, Argentina. Pág.: 9-28.

WAGNER, H. 1986. Antihepatotoxic flavonoids. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**" , pp. 545-558, Alan R. Liss Inc. New York.

-----, M. ERTAN y O. SELIGMANN 1974. The effect of kinetin in relation to photocontrol of anthocyanidin biosynthesis in Brassica oleraceae. **Phytochemistry** 13 : 1389-99

WAGNER, W.H., 1980. Origin and phylosophy of the ground-plan divergence method of cladistic. *Syst. Bot.* 5 (2) : 173-193

WEST, L.G., P.M. BIRAC y D.E. PRATT 1978. Separation of the isomeric isoflavones from soybeans by high-performance liquid

chromatography. *J. Chromatogr.* 150:266-268

WESTPHAL, E. 1974. Pulses in Etiopia: their taxonomy and agriculture significance. *Agric. Res. Rep. Wageningen* 815 : 99-101

WILCZEK, R. 1954. Phaseolinae. In : *Flore du Congo belge et du Rwanda-Urundi* 6 : 260-409

WILDEMAN, D. 1902. Etudes sur la Flore du Katanga. *Ann. Mus. Congo* serie 4, 1: 71

WILSON, A. 1983. Flavonoid pigments in butterflies. Ph. D. Thesis (citada en J.B. Harborne, 1986, pag. 24)

WOLF, S.J. y K.E. DENFORD, 1984. *Arnica gracilis* (Compositae) a natural hybrid between *A. latifolia* and *A. cordifolia*. *Syst. Bot.* 9 (1) : 12-16

WOLFF, I.A. y W.F. KWOLEK, 1971. Lypids of the Leguminosae. In: J.B. Harborne, D. Boulter & B.L. Turner Ed. "*Chemotaxonomy of the Leguminosae*" , pp. 231-256 , Academic Press, London - New York.

WOODWARD, M. 1979. New isoflavonoids related to kievitone from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 18 : 2007-2010

WULF, L.W. y C.W. NAGEL 1976. Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography *J. Chromatogr.* 116 : 271-279

YAMOAKA, N., T. USUI, K. MATSUDA, K. TUZIMURA, H. SUGIYAMA y S. SETO 1971. ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of glucobioses. *Tetrahedron Lett.* 23 : 2047-2048

YASUKAWA, K., M. TAKIDO, M. TAKEUCHI y K. NITTA, 1988. Effect of flavonoids on tumor promoter's activity. In: "**Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties**" , pp. 247-250, Alan R. Liss Inc. New York.

ZALLOCCHI, E.M., 1988. Quimiotaxonomía: síntesis de los principales marcadores fenólicos conocidos. En: "**Prosopis en Argentina**", UNC-UBA-FAO Editores. Pág.99 a 114.

-----, R.A. PALACIOS y M.M. BRIZUELA, 1990.

Interpopulational variation in *Prosopis flexuosa* from northern Chile. *Bull IGSM* 18 : 135-149

-----, A.B. POMILIO y R.A. PALACIOS 1990. Bases de aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en quimiotaxonomía de flavonoides. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 26 (3-4) : 163-172

APENDICE : SINOPSIS TAXONOMICA

A1. Género *Vigna Savi*

SUBGENERO	SECCION	No SP	ESPECIES ARGENTINAS	DISTRIBUCION
VIGNA	VIGNA	20	V. luteola	Africa y cosmopol.
	COMOSAE	2		Africa
	MACRODONTAE	2		
	RETICULATAE	9		
	LIEBRECHTSIA	2		
	CATIANG	2		
HAYDONIA (R. Wilczek) Verdcourt	HAYDONIA	3		Africa
	MICROSPERMAE	3		
	GLOSSOSTYLUS	2		
PLECTOTROPIS (Schumach.) Baker	PLECTOTROPIS	4		Pantropical y Africa
	PSEUDOLIEBRECHTSIA	3		Africa
CERATOTROPIS (Piper) Verdcourt		11		Asia
LASIOSPRON (Benth. emend. Piper) Maréchal Mascherpa y Stainier		3	V. lasiocarpa V. longifolia	América Tropical (Africa)
SIGMOIDOTROPIS (Piper) Verdcourt emend Maréchal, Mascherpa & Stainier	SIGMOIDOTROPIS	5	V. candida	América Tropical
	PEDUNCULARES	2	V. peduncularis	
	CARACALLAE	4	V. caracalla V. hookerii	
	CONDYLOSTYLIS	1		
	LEPTOSPRON	1	V. adenantha	
MACRORHYNCHYA Verdcourt		1		Africa Asia

A.2. Género Phaseolus L.

SECCION	No SP.	ESPECIES ARGENTINAS	DISTRIBUCION
PHASEOLUS	23	P. vulgaris P. lunatus P. augustii	México-USA Centroamérica Sudamérica
MINKELERSIA (Mart. y Gal.) Maréchal, Mascherpa y Stainier	7		México USA

A.3. Género Macroptilium (Benth.) Urban

SECCION	No SP	ESPECIES ARGENTINAS	DISTRIBUCION
MACROPTILIUM	7	M. bracteatum M. lathyroides M. panduratum M. longepedunculatum	América Tropical y Subtropical
MICROCOCHLE (Bentham) Lackey	9	M. fraternum M. psammodes M. prostratum	América Tropical y Subtropical
MONOPHYLLUM Lackey	1		Sudamérica