



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS DE FILOGENIA MOLECULAR EN LA SUBTRIBU
PHASEOLINAE (PHASEOLEAE, LEGUMINOSAE)
SISTEMÁTICA DEL GÉNERO *MACROPTILIUM* (BENTH.)

URBAN

Tesis presentada para optar al grado de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas

Lic. Shirley Mary Espert

Director de tesis: Dra. Alicia Diana Burghardt

Grupo de Estudio de Plantas Vasculares
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Buenos Aires, 2005

**ESTUDIOS DE FILOGENIA MOLECULAR EN LA SUBTRIBU
PHASEOLINAE (PHASEOLEAE, LEGUMINOSAE)
SISTEMÁTICA DEL GÉNERO *MACROPTILIUM* (BENTH.) URBAN**

Jurado: _____

Jurado: _____

Jurado: _____

**ESTUDIOS DE FILOGENIA MOLECULAR EN LA SUBTRIBU
PHASEOLINAE (PHASEOLEAE, LEGUMINOSAE)
SISTEMÁTICA DEL GÉNERO *MACROPTILIUM* (BENTH.) URBAN**

RESUMEN

El género *Macroptilium* pertenece a la subtribu Phaseolinae (Phaseoleae, Papilionoideae, Leguminosae), compuesta por 26 géneros, que conformarían, según estudios morfológicos y de ADN de cloroplasto, un grupo monofilético. Los análisis cladísticos basados en secuencias de ADN nuclear aquí presentados apoyan la monofilia de la subtribu, y de la mayoría de los géneros americanos analizados.

A partir de datos de secuencias de ADN nuclear (regiones ITS-1 e ITS-2), ADN de cloroplasto (IGS *trnL-trnF*), proteínas seminales y caracteres morfológicos, se analizaron cladísticamente las 18 especies del género *Macroptilium*, variando las estrategias de búsqueda del árbol más parsimonioso. Los resultados obtenidos permiten sustentar la monofilia del género. La monofilia de sus dos secciones (*Macroptilium* y *Microcochle*) es apoyada por el análisis simultáneo y por los datos morfológicos, no así por los datos moleculares y bioquímicos. Sin embargo, si se transfiere la especie *M. sabaraense* a la sección *Macroptilium*, ambas subdivisiones conformarían dos grupos naturales, de acuerdo al análisis filogenético de caracteres moleculares. Los resultados de los análisis de secuencias genómicas aquí obtenidos respaldan la decisión de tratar a *M. arenarium* como especie y no como variedad de *M. prostratum*, pero no apoyan la propuesta taxonómica de considerar a *M. gracile* y *M. longepedunculatum* como especies distintas, ni tampoco la separación de *M. ecuadoriense* de *M. atropurpureum*.

Palabras Claves: *Macroptilium*, Phaseolinae, Análisis Cladístico, Regiones ITS ADNnc, IGS *trnL-trnF* ADNcp, Proteínas Seminales.

**MOLECULAR PHYLOGENETIC STUDIES IN SUBTRIBE PHASEOLINAE
(PHASEOLEAE, LEGUMINOSAE)
SYSTEMATICS OF THE GENUS *MACROPTILIUM* (BENTH.) URBAN**

ABSTRACT

The genus *Macroptilium* belongs to subtribe Phaseolinae (Phaseoleae, Papilionoideae, Leguminosae), which contains 26 genus that would formed a monophyletic group, based on morphologic and chloroplast DNA studies. Cladistic analyses performed here, based on nuclear DNA sequences, support the monophyly of the subtribe and of almost all the American genus analyzed.

Cladistic analyses based on nuclear DNA sequences (ITS-1 and ITS-2), chloroplast DNA sequences (IGS *trnL-trnF*), seed proteins and morphological characters, were performed on the 18 species of the genus *Macroptilium*, exploring several searches of the most parsimonious tree strategies. The results here obtained allow supporting the monophyly of the genus, and the monophyly of its two sections *Macroptilium* and *Microcochle* is verified by morphological and simultaneous analyses. Molecular and biochemical data, on the other hand, don't support this subdivisions. However, if the species *M. sabaraense* is included in section *Macroptilium*, the sections would become monophyletic groups, sustained by the molecular characters analyzed here. Results of analyses of the genomic sequences support the decision of treating *M. arenarium* as a single species, differentiated from *M. prostratum*. On the other hand, *M. gracile* and *M. longepedunculatum* should be considered as one species, as same as *M. atropurpureum* and *M. ecuadoriense*.

Key Words: *Macroptilium*, Phaseolinae, Cladistic Analysis, ITS ncDNA Regions, IGS *trnL-trnF* cpDNA, Seed Proteins.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que contribuyeron a la realización de esta tesis, y a las cuales estaré siempre agradecida:

A la Dra. Alicia Burghardt, mi directora, mi guía, y por sobretodo, mi amiga. Tuve mucha suerte de haber sido discípula de una persona tan dedicada y tan atenta a mi trabajo, siempre dispuesta a ayudar y solucionar los distintos obstáculos que se fueron presentando en estos años. Compartimos muchas cosas, y estoy segura que todavía nos quedan muchas más por compartir

A la Dra. Patricia Hoc, mi directora de beca, por los consejos, el apoyo constante, por sus valiosas sugerencias, y por incluirme en los subsidios que permitieron realizar el trabajo experimental de esta tesis

Al Ing. Ramón Palacios, por permitirme formar parte del Laboratorio de Plantas Vasculares, por su interés, su buena predisposición, y por incluirme en sus subsidios, permitiendo así realizar el trabajo experimental sin condicionamientos ni restricciones

A mis compañeros de laboratorio: Susana (¡gracias por prestarme “tus” *Macroptilium!*), Pablo, Magda, Marité, Cecilia y Pia (¡gracias por las “sesiones”!), quienes hicieron que el trabajo diario sea sumamente agradable, por la compañía y buena onda, y gracias por ayudarme en los momentos de crisis (laborales y personales...)

A la Dra. Lidia Poggio, quien me permitió utilizar el equipamiento de su laboratorio para poder llevar a cabo gran parte del trabajo experimental

A la Dra. María Esther Ranalli, quien también me permitió acceder al equipamiento de su laboratorio. A las Dras. Marcela Ramos y Diana Dokmetzian, por su buena predisposición

Un párrafo aparte se merecen estas tres personas, quienes desde un principio resolvieron cada inquietud que yo día a día les transmitía, por ayudarme en todo momento, por los consejos, por todo. Pepa Sede, Alex Gottlieb y Vero Lia: las quiero mucho, no podría haber realizado esta tesis sin su colaboración, gracias!!

A todos los amigos que fui encontrando en estos años, en especial a Mari Lopez, a Santi Catalano, a Marce Rodriguero, a Pao Gioffre por ayudarme con el estilo de esta tesis, a Nacho Escapa por leer parte de este trabajo y por los consejos. Y al resto, que son demasiados como para nombrarlos a todos, pero que están conmigo siempre, y es por eso que los quiero mucho.

Y por último a las tres personas que más amo en este mundo y que son todo para mí: Elisa, Rogelio y Roger. Sin ustedes nada de todo esto hubiera sido posible.

“La naturaleza benigna provee de manera que en cualquier parte halles algo que aprender”
Leonardo Da Vinci

“Hay grandeza en esta concepción de la vida... que mientras este planeta ha ido girando según la constante ley de la gravitación, se han desarrollado y se están desarrollando, a partir de un comienzo tan sencillo, infinidad de formas cada vez más bellas y maravillosas”
Charles Darwin

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
Acerca del grupo de estudio	1
Conocimiento actual de las Leguminosas y sus subfamilias	1
Sistemática de la subtribu Phaseolinae	4
La subtribu Phaseolinae en Argentina	6
Sistemática Filogenética	16
Caracteres moleculares en filogenia	17
Métodos de reconstrucción filogenética	25
Pesado de caracteres	27
Medidas de apoyo	28
¿Análisis separados o simultáneos?	29
Alternativas a los métodos cladísticos	30
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Material Vegetal	33
Métodos	42
1- Secuenciación de ADN	42
2- Electroforesis de proteínas seminales	45
Análisis numérico de los datos	47
Codificación de caracteres	47
Estudio de las regiones ITS	49
Análisis cladístico	50
RESULTADOS	53
Análisis de secuencias de ADN	53
Largo de secuencias	53
Contenido G+C	54
Energía libre y estructura secundaria	60
Alineamiento	63
Divergencia	63
Análisis cladístico	67
Subtribu Phaseolinae	67
Género <i>Macroptilium</i>	82
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	91
Análisis de secuencias de ADN: descubriendo pseudogenes	92
Largo de secuencias	92
Contenido G+C	92
Energía libre y estructura secundaria	93
Conclusiones del análisis de las secuencias	93
Divergencia entre especies a partir de sus secuencias de ADN	95
Sistemática de la subtribu Phaseolinae	96
Relación <i>Strophostyles</i> – <i>Dolichopsis</i>	96
Relación <i>Ramirezella</i> – <i>Oxyrhynchus</i>	98
El problema de <i>Vigna</i> como género	99
<i>Phaseolus</i> y su división infragenérica	103
Sistemática del género <i>Macroptilium</i>	107
La monofilia de <i>Macroptilium</i>	108

División infragenérica y relaciones interespecíficas	111
CONCLUSIONES FINALES	118
APÉNDICE A	120
APÉNDICE B	121
APÉNDICE C	131
BIBLIOGRAFÍA	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	39
Tabla 2	41
Tabla 3	54
Tabla 4	55
Tabla 5	58
Tabla 6	59
Tabla 7	63
Tabla 8	65
Tabla 9	66
Tabla 10	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	43
Figura 2	44
Figura 3	61
Figura 4	62
Figura 5	68
Figura 6	69
Figura 7	71
Figura 8	72
Figura 9	73
Figura 10	74
Figura 11	75
Figura 12	77
Figura 13	78
Figura 14	79
Figura 15	80
Figura 16	81
Figura 17	82
Figura 18	83
Figura 19	85
Figura 20	85
Figura 21	86
Figura 22	87
Figura 23	87
Figura 24	88
Figura 25	89
Figura 26	110

INTRODUCCIÓN

ACERCA DEL GRUPO DE ESTUDIO

Conocimiento actual de las Leguminosas y sus subfamilias

Por su biodiversidad e importancia económica dentro de las Angiospermas, sobresalen tres familias. La mayor en cuanto a número de especies que la componen son las Compositae, y le siguen las Orchidaceae y las **Leguminosae**. Esta última se distribuye en todos los hábitat terrestres, desde el Ecuador a los límites de desiertos cálidos y fríos, pero su mayor diversidad se centra en áreas topográficamente variables y con climas estacionales (Polhill *et al.*, 1981). La familia Leguminosae comprende 730 géneros principalmente tropicales, con más de 19400 especies en todo el mundo. Es quizás la de mayor diversidad en cuanto a hábitat y morfologías, y la segunda en cuanto a importancia económica, luego de las gramíneas. Sus especies se presentan como gigantes en bosques hasta pequeñas efímeras, con gran diversidad en los métodos de crecimiento y reproducción (Wojciechowski, 2003).

El nombre de la familia ha sido objeto de controversia, ya que existen muchos autores que prefieren usar el nombre Fabaceae Lindl. (como Miller *et al.*, 2003; Riley-Hulting *et al.*, 2004). Mucho se ha discutido además, si se deben considerar a las Leguminosas como una sola familia con tres subfamilias, o a esas subfamilias como tres familias distintas. Algunos autores, siguiendo a Cronquist (1981), consideran válida esta última posición, dándole a las familias los nombres Mimosaceae R. Br., Caesalpiniaceae R. Br. y Fabaceae Lindl. (Bailey *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2001). En una reciente revisión, Lewis & Schrire (2003) recomiendan tratar a las Leguminosas como una sola familia bajo el nombre Leguminosae, argumentando que el nombre Fabaceae no debería ser utilizado. Su uso alternativo para los niveles de familia y subfamilia lo tornan ambiguo. Estos autores basan su decisión en que la mayoría de los análisis están mostrando la monofilia de las Leguminosas, pero no de sus 3 subfamilias (Doyle *et al.*, 2000; Kaas & Wink, 1996), con lo cual el tratamiento como 3 familias por separado sería inaceptable. En el presente trabajo se seguirá el criterio sugerido por Lewis & Schrire (2003).

Bentham (1865) diferenció a las tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae, dentro de la familia Leguminosae, basándose en la estructura floral. Las Leguminosas con flores zigomórficas y prefloración imbricada descendente, fueron agrupadas dentro de las Papilionoideas; la subfamilia Caesalpinioideae incluyó a las que poseen flores más o menos zigomorfas y prefloración imbricada ascendente; por último, aquellas especies cuyas flores son actinomorfas y a menudo con mayor número de estambres, fueron ubicadas en el grupo de las Mimosoideas.

La subfamilia **Papilionoideae** se encuentra en todos los hábitat presentes en el planeta, y a menudo los domina; juega un papel ecológico sumamente importante debido a la capacidad de sus integrantes de fijar nitrógeno como consecuencia de su simbiosis con bacterias, característica que comparte con muchas otras Leguminosas. Es la más grande de las tres subfamilias de Leguminosae, con aproximadamente 476 géneros y 13860 especies distribuidas en 32 tribus según Polhill *et al.* (1981), y la más ampliamente distribuida (Wojciechowski *et al.*, 2004). Se distingue claramente de las otras dos subfamilias por sus caracteres vegetativos, florales y del fruto. Los tiempos de divergencia estimados por datos de registros fósiles y de secuencias de ADN de cloroplasto, dan como resultado una diversificación temprana y rápida de las Papilionoideas tanto en las regiones tropicales como en las templadas, contrariamente a lo que se suponía en un principio, cuando se pensaba que se habían diversificado primero en los trópicos, y más recientemente en el resto del planeta. El origen de las Papilionoideas fue estimado en el Eoceno temprano, y sus tribus más antiguas, Millettieae y Phaseoleae, en el Eoceno tardío, es decir, de 37 a 46.4 millones de años atrás (Wojciechowski, 2003).

Esta subfamilia y Mimosoideae se resuelven como monofiléticas en análisis filogenéticos realizados utilizando las secuencias de ADN como caracteres, resultando ser parafilética la subfamilia Caesalpinioideae, cuyos géneros se encuentran basales en Leguminosae. La subfamilia Mimosoideae tiene un alto soporte en los análisis moleculares, mientras que por el contrario, la subfamilia Papilionoideae tiene un bajo apoyo (Wojciechowski, *op. cit.*). Son sinapomorfias de esta última subfamilia las hojas imparipinadas, pétalos unguiculados, hilo de semilla lateral, presencia de fisura hilar e iniciación unidireccional del sépalo (Doyle *et al.*, 2000).

La subfamilia Papilionoideae incluye un grupo monofilético caracterizado por una inversión de 50 kb en el genoma del cloroplasto, que se encuentra presente sólo en este grupo de plantas, y que incluye a la mayoría de sus taxones, con casi 440 géneros y 12000

especies (Doyle *et al.*, 1996). Las únicas dos tribus que no poseen dicha inversión, Swartzieae y Sophoreae, son consideradas basales dentro de la subfamilia.

Composición taxonómica de la subfamilia Papilionoideae

GRUPOS RECONOCIDOS FILOGENÉTICAMENTE (WOJCIECHOWSKI, 2003)	TRIBUS SENSU POLHILL <i>ET AL.</i> (1981)
Clado Dalbergioide	Adesmieae Aeschynomeneae Algunos géneros de Dalbergieae Algunos géneros de Desmodieae
Grupo hermano de Dalbergioide	Amorpheae
Clado Genistoide	Genisteae Euchresteeae Thermopsidaeae Algunos géneros de Sophoreae Crotalarieae Liparieae Podalyrieae Hypocalypteae Bossiaeeae Mirbelieae Brongniartieae
Clado MPA	Millettieae Phaseoleae Abreae Desmodieae Psoraleeae Indigofereae
Clado Hologalegina	Carmichaelieae Cicereae Hedysareae Trifolieae Vicieae Loteae Coronilleae Galegeae Robinieae
Grupos basales	Swartzieae Sophoreae Dipterygeae

Sistemática de la subtribu Phaseolinae

La tribu **Phaseoleae** incluida en la subfamilia Papilionoideae, con aproximadamente 84 géneros y 1500 especies, contiene el 75% de las legumbres

comercializadas en el mundo. Entre sus representantes se encuentran especies como *Phaseolus vulgaris* L. (el poroto común), *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (“cowpea”) y *Glycine max* (L.) Merr. (la soja); además de plantas comestibles, también agrupa especies con importancia forrajera y ornamental (Broughton *et al.*, 2003). Caracteriza a esta tribu el hábito trepador y sus hojas trifolioladas, con folíolos de base asimétrica.

La tribu Phaseoleae se ubica, según estudios filogenéticos basados en secuencias de ADN, dentro de un clado monofilético compuesto además por las tribus Millettieae, Psoraleae, Abreae, y algunas subtribus de Desmodieae. Wojciechowski (2003) señala que las tribus comprendidas en el clado MPA junto con las del clado Hologalegina, constituyen los dos grupos más derivados de la subfamilia Papilionoideae. En ese mismo estudio puede observarse que Phaseoleae y varias de las mayores subtribus que la componen son polifiléticas, tal como puede apreciarse en el siguiente cuadro.

Composición taxonómica de la tribu Phaseoleae

SUBTRIBUS	ESTATUS FILOGENÉTICO
Clitoriinae Cajaninae Kenediinae Phaseolinae	Monofiléticas
Diocleinae Glycininae	Parafiléticas
Erythrinae	Polifiléticas
Ophrestiinae	Sin datos

El número de subtribus de Phaseoleae ha sido objeto de debate desde los tiempos de Bentham, a fines del siglo XIX. Lackey (1981), basándose en datos morfológicos, hace una revisión exhaustiva de la tribu; sin embargo, recién en 1995 se publica un trabajo al respecto, con base filogenética (Bruneau *et al.*, 1995), en el cual se reconocen 8 subtribus como lo propusiera Lackey (*op. cit.*): Glycininae, Kennediinae, Erythrinae, Clitoriinae, Ophrestiinae, Diocleinae, Cajaninae y **Phaseolinae**. Según los análisis filogenéticos basados en secuencias del ADN de cloroplasto, sólo cuatro de las ocho subtribus son monofiléticas, y una de ellas es la subtribu Phaseolinae, la mayor dentro de Phaseoleae con 26 géneros. Se piensa que ésta consiste en un ensamblado natural de taxones, ya que

sus géneros comparten numerosos caracteres morfológicos, a menudo asociados con especializaciones para la polinización mediada por abejas (Bruneau *et al.*, *op. cit.*). Además, se encontró una inversión de 78 kb en la región grande de copia única del ADN de cloroplasto en todos sus taxones, con la excepción de *Psophocarpus* Necker ex DC (Doyle, 1995).

Existen géneros de Phaseolinae distribuidos en todo el mundo; sólo ocho de ellos son estrictamente americanos: *Dolichopsis* Hassl., *Macroptilium* (Benth.) Urb., *Mysanthus* G. P. Lewis & A. Delgado, *Oryxis* A. Delgado & G. P. Lewis, *Oxyrhynchus* Brandeg., *Phaseolus* L., *Ramirezella* Rose y *Strophostyles* Elliot. Cabe señalar que las especies del subgénero *Sigmoidotropis* del género *Vigna* Savi circunscriptas también al continente americano. Las Phaseolinae americanas poseen representantes en todos los países del continente, excepto en Chile. Con excepción de *Strophostyles*, que se distribuye desde Canadá a México, y *Dolichopsis*, restringido al Paraguay y Norte de la República Argentina, los otros seis géneros muestran una distribución amplia con representantes en América del Norte, Central y del Sur.

El trabajo de Maréchal *et al.* (1978) constituye un aporte muy relevante al estudio de la subtribu, ya que analiza caracteres morfológicos, palinológicos y fitoquímicos en conjunto, aunque sin la intención de realizar un estudio filogenético, sino simplemente un análisis taxonómico profundo. Se describe en él una clasificación congruente con la de Verdcourt (1970), pero con el agregado de una lista de caracteres que permiten trazar un límite claro entre *Vigna* y *Phaseolus*, géneros cuya delimitación taxonómica hasta ese momento era objeto de controversias.

Otro importante aporte realizado sobre la base de estudios morfológicos de los géneros americanos es el de Lackey (1983). Caracteres tales como estilo recto, un pliegue lateral en la quilla, hilo largo, y nudos más o menos gruesos, le permitieron inferir que los géneros *Strophostyles*, *Dolichopsis* y *Oxyrhynchus* constituyen un grupo natural, pero son claramente distinguibles entre sí por varios caracteres morfológicos, así como por su distribución geográfica. Este autor incluye a las especies del género *Ramirezella* dentro del género *Vigna*. Este criterio no fue adoptado por otros investigadores (Ochoterena & Delgado Salinas, 1994).

Los géneros americanos de la subtribu Phaseolinae están caracterizados por el alto grado de especialización de la morfología floral, particularmente en cuanto al desvío de la simetría bilateral, favoreciendo la entomofilia (Lackey, 1981). *Strophostyles*, junto con

Dolichopsis, *Oryxis*, *Oxyrhynchus*, *Ramirezella micrantha* Delgado & Ochoterena-Booth y *Vigna latidenticulata* (Harms) A. Delgado, poseen una corola con simetría bilateral, salvo por el extremo distal de la quilla, que se curva hacia la derecha de la flor. En el resto de los géneros americanos, toda la quilla está curvada, al menos dando medio giro hacia la derecha (Riley Hulting *et al.*, 2004).

Si bien distintos trabajos analizan los géneros americanos de Phaseolinae mediante estudios filogenéticos sobre la base de caracteres morfológicos y moleculares (Delgado Salinas *et al.*, 1999; Goel *et al.*, 2002; Riley-Hulting *et al.*, *op. cit.*), no se encuentra en la bibliografía ningún análisis que involucre a la totalidad de los géneros de la subtribu junto con aquellos del resto mundo. Cuanto mayor es el número de taxones analizados, la conclusión sistemática a la que se arribe será más consistente.

La subtribu Phaseolinae en Argentina, algunos datos sobre su filogenia e importancia económica

De los géneros americanos de la subtribu Phaseolinae, cuatro se encuentran representados en la República Argentina: *Phaseolus*, *Vigna*, *Dolichopsis* y *Macroptilium*.

Phaseolus L.

Este género es sin duda el más importante dentro de la subtribu, tanto por el número de especies que lo componen como por su importancia económica. Consta de aproximadamente 50 especies, la mayoría distribuidas en México y Centroamérica. Cinco de ellas han sido domesticadas desde tiempos precolombinos: *Phaseolus vulgaris*, el “poroto común”; *P. lunatus* L., el “poroto lima”; *P. acutifolius* A. Gray, “poroto tepary”; *P. coccineus* L. var. *coccineus*, “poroto runner”; y *P. coccineus* L. var. *polyanthus* (Greenman) Maréchal, Mascherpa & Stainier, “poroto year” (Freitag & Debouck, 2002). La mayoría de las especies sudamericanas se distribuyen en el sistema orográfico andino, desde Venezuela a las Sierras de Córdoba (Gepts, 1996). En la República Argentina se pueden encontrar poblaciones naturales de *P. augusti* Harms, *P. lunatus* L. var. *sylvestris* Baudet y una forma silvestre relacionada a *P. vulgaris*, *P. vulgaris* L. var. *aborigineus* (Burk.) Baudet.

El análisis filogenético más exhaustivo realizado hasta el momento en este grupo es el de Delgado Salinas *et al.* (1999), quienes sobre la base de caracteres morfológicos y de secuencias de ADN nuclear elaboraron una filogenia de las 50 especies reconocidas en

Phaseolus. Sus resultados indican con un excelente soporte, casi del 100%, la monofilia del género, aunque los autores admiten que el número de especies analizadas del grupo externo es muy pequeño, y carece de representantes del Viejo Mundo. La monofilia de *Phaseolus* está soportada principalmente por el ADN, pero además por unos pocos caracteres morfológicos, como son los pétalos de la quilla estrechamente recurvados dando un giro de 360° hacia la derecha, ausencia de nectarios extraflorales en los nudos de las inflorescencias, brácteas florales persistentes y pelos uncinulados en el cuerpo de la planta. El análisis de Delgado Salinas *et al.* (*op. cit.*) no resuelve totalmente el grupo hermano de *Phaseolus*, ya que un clado *Phaseolus-Macroptilium* estaría débilmente soportado por las secuencias de ADN, y distinguido morfológicamente por caracteres crípticos, como ovarios rectos y pétalos cubiertos por microverrugas en su cara abaxial. Cabe destacar que el Índice de Consistencia resultó muy bajo (0.39) en ese análisis, lo que estaría indicando altos niveles de homoplasia.

La división infragenérica fue tratada por primera vez por De Candolle (1825), quien delimitó tres secciones: *Euphaseolus*, *Strophostyles* y una tercera a la que no le puso nombre. Bentham (1837) dividió al género en siete secciones, algunas de ellas actualmente elevadas al rango de género, como por ejemplo *Macroptilium*. Luego, Bentham y Hooker (1865) describieron seis secciones. Piper (1926), al analizar las Phaseoleae americanas, elevó ese número a ocho agrupando las 92 especies hasta ese momento aceptadas para *Phaseolus*. Urban (1928) elevó al rango de género la sección *Macroptilium* Benth.; Verdcourt (1970) redefinió al género *Phaseolus*, separando varias especies y colocándolas en el género *Vigna*. Maréchal *et al.* (1978) definieron tres secciones en el género *Phaseolus* y aclararon las diferencias entre éste y *Vigna*. Posteriormente, Lackey (1983) elaboró una descripción más restrictiva para *Phaseolus sensu stricto*, reconociendo sólo dos secciones. Delgado Salinas (1985) reconoció cuatro: *Chiapasana*, *Phaseolus*, *Minkelersia* y *Xanthotricha*. En su análisis taxonómico de los *Phaseolus* de América del Norte y Central, Freytag y Debouck (2002) proponen quince secciones basadas en características morfológicas; sin embargo, los autores admiten que estos agrupamientos también deberían reflejar afinidades filogenéticas, además de similitudes morfológicas. Delgado Salinas *et al.* (1999) realizaron una filogenia del género, agrupando a las especies en nueve subclados sin definir secciones; en este trabajo, las especies que en el sistema vigente habían sido clasificadas dentro de la sección *Phaseolus* quedaron separadas en diferentes grupos, por ejemplo, el grupo *P. vulgaris*

incluye a *P. acutifolius*, *P. coccineus*, y *P. costaricensis* Freytag & Debouck, entre otras, y en el grupo de *P. lunatus* se encuentran las especies estrictamente sudamericanas, como *P. augusti*, *P. bolivianus* Piper y *P. pachyrhizoides* Harms, entre otras. Estas tres últimas especies, que se resuelven como monofiléticas en el estudio de Delgado Salinas *et al.* (*op. cit.*), resultan estar relacionadas a *P. lunatus* al ser analizadas con marcadores AFLP (Caicedo *et al.*, 1999); los resultados de este último trabajo inducen además, a considerarlas como variantes geográficas de una misma especie.

En el noroeste de la República Argentina se cultivan diversas variedades de *P. vulgaris*, existiendo, además, una gran riqueza de cultivares primitivos. El cultivo del poroto en el noroeste argentino es, junto con el maíz, el de mayor importancia para la alimentación humana en la región, y es una de las principales fuentes de ingreso por su exportación. Se comercializan verdes o secos, y son usados como fuente de proteínas, complementando a los vegetales ricos en hidratos de carbono, como el antes mencionado maíz y el arroz (Espert, 2000). En Mesoamérica, las semillas de varias especies de *Phaseolus* formaban parte del trío de comidas de los indígenas, junto con el zapallo y el maíz. Hoy en día, además del grano, se consumen las legumbres, frescas o procesadas (Smartt, 1990).

Vigna Savi

La diferencia entre *Phaseolus* y *Vigna* se basó, inicialmente, en el grado de torsión del extremo de la quilla (Bentham, 1865). Posteriores observaciones indicaron que este carácter no resultaba útil para la delimitación de estos géneros. Las revisiones de Verdcourt (1970) y de Maréchal *et al.* (1978) delinearon un *Phaseolus* estrictamente americano, aumentando el número de especies de *Vigna*, ubicando en este género varias especies consideradas anteriormente en *Phaseolus*. Este reordenamiento permitió una mejor delimitación de *Phaseolus* pero no de *Vigna*, cuya clasificación subgenérica continuó siendo confusa. Este género persiste aún como un agrupamiento de casi 100 especies, sin caracteres que identifiquen subdivisiones menores (Delgado Salinas *et al.*, 1993). *Vigna*, descrito por Savi en 1824, es el único género de la subtribu Phaseolinae con representantes en el Viejo y Nuevo Mundo. La especie tipo es *V. luteola* (Jacq.) Benth., y la mayoría de sus especies crecen en el Viejo Mundo (Lackey, 1983).

Verdcourt (1970) reconoce la existencia de ocho subgéneros, posteriormente Maréchal *et al.* (1978) delimitan siete, que son los aceptados hoy en día: *Vigna*,

Macrorhyncha y *Haydonia* con distribución en el continente africano, *Ceratotropis* en Asia, *Plectotropis*, con representantes tanto en África como en Asia, y finalmente *Lasiospron* y *Sigmoidotropis*, con representantes en el continente americano, siendo *Lasiospron*, con sólo tres especies, exclusivamente neotropical (ver Apéndice C, pág. 134).

El subgénero *Sigmoidotropis* presenta caracteres primitivos que hacen interesante su análisis; algunas de sus especies, incluidas en la sección *Leptospron*, exhiben una elevada similitud con aquéllas de *Phaseolus*. En esta sección está incluida *Vigna adenantha* (G. Mey.) Maréchal, Mascherpa & Stainier, especie que presenta una gran afinidad morfológica con algunas especies de *Phaseolus*. La evidencia serológica justifica, sin embargo, su ubicación en el género *Vigna*. Las especies de la sección *Pedunculares* se asemejan más a aquéllas incluidas en los subgéneros del Viejo Mundo, con caracteres que parecen preservar de éstas. En un reciente trabajo realizado en base a secuencias de regiones no codificantes del ADN nuclear (Goel *et al.*, 2002), algunas especies del subgénero *Sigmoidotropis* quedaron agrupadas con especies del grupo externo. *V. adenantha* se separa de ellas, uniéndose a *Phaseolus* (Goel *et al.*, *op. cit.*). La separación de las especies del subgénero *Sigmoidotropis* del resto de las especies de *Vigna*, apoya la visión de Verdcourt (1970) acerca de la elevación a género de la sección *Sigmoidotropis*. Sin embargo, hay que aclarar que en el estudio mencionado sólo se analizaron 3 de las 13 especies del subgénero, por lo que habría que realizar nuevos análisis incluyendo un mayor número de especies para obtener conclusiones más consistentes. Goel *et al.* (*op. cit.*) consideran que sus resultados constituirían además, una evidencia de que el subgénero *Sigmoidotropis* es el descendiente directo del precursor del complejo *Phaseolus-Vigna*, y que la diferenciación genérica de ese complejo ocurrió en la región neotropical.

Para Maréchal *et al.* (1978), el subgénero *Plectotropis* ocupa una posición intermedia entre los taxones de África, en su mayoría representantes de los subgéneros *Vigna* y *Haydonia*, y de Asia, pertenecientes a los subgéneros *Sigmoidotropis* y *Ceratotropis*. Sin embargo, Goel *et al.* (*op. cit.*) señalan una mayor afinidad de este subgénero con el subgénero *Vigna*, si bien sólo analizaron dos de sus taxones. El mayor centro de variabilidad del subgénero *Plectotropis* se presenta en África, pero la existencia de dos centros de variabilidad en *V. vexillata* (L.) A. Rich. en África y en Asia, hace dudar acerca del centro de origen del subgénero (Maréchal *et al.*, *op. cit.*).

Las especies del subgénero *Ceratotropis*, restringidas al continente asiático, exhiben una alta especialización en la morfología floral. Las especies de este subgénero y las de *Plectotropis*, que también crecen en Asia, se distinguen por sus estipulas peltadas (Lackey, 1983).

En el subgénero *Vigna*, que presenta el mayor número de especies (aproximadamente 40), las especies africanas exhiben una relativa simplificación de la morfología floral, exhibiendo simetría bilateral. En varios trabajos, este subgénero aparece como polifilético, agrupándose sus secciones en clados no relacionados (Vaillancourt & Weeden, 1993; Vaillancourt *et al.*, 1993). Vaillancourt *et al.* (*op. cit.*) reportan que uno de los clados conteniendo dos secciones del subgénero *Vigna* incluye, además, dos especies del subgénero *Plectotropis*. Maréchal *et al.* (*op. cit.*) habían señalado afinidad entre los subgéneros *Plectotropis* y *Vigna*, manteniendo su diferenciación por ciertas características florales, como por ejemplo, la presencia de flor retorcida y bolsillo en uno de los lados de la quilla.

El subgénero *Haydonia*, con representantes que se distribuyen principalmente en África y relacionados con el subgénero *Vigna*, parece ser una línea evolutiva reciente (Maréchal *et al.*, *op. cit.*); presenta reversión en los estados de varios caracteres del género, como por ejemplo en características de la exina de los granos de polen, a la vez que también se observan nuevas adquisiciones. Sin embargo, esto no se refleja en el análisis realizado por Vaillancourt *et al.* (*op. cit.*) sobre la base de caracteres de sitios de restricción del genoma del cloroplasto. Este último tipo de caracteres no son de los más adecuados para inferir relaciones filogenéticas, y no existen otros estudios sobre el subgénero.

Los resultados del análisis de ADN de cloroplasto de Delgado Salinas *et al.* (1993) sostienen la polifilia del género *Vigna*, señalando dos grupos principales. Un clado incluye los subgéneros *Lasiospron*, *Vigna*, *Ceratotropis* y *Plectotropis*, y el otro es estrictamente americano, e incluye al subgénero *Sigmoidotropis* y los géneros *Ramirezella* y *Oxyrhynchus*. La conformación de este último clado depende del lugar donde se enraíce el árbol, por lo que no sería un grupo natural. Un resultado interesante de este trabajo es que la inclusión de *Ramirezella* en el grupo interno torna monofilético al género *Vigna*. Al mismo resultado arriba Gamba (2001) al analizar la morfología y los caracteres fitoquímicos de las especies argentinas. Los autores citados, sin embargo, analizaron sólo algunas especies del viejo mundo, e incluyeron pocos taxones en el grupo externo, por lo

que aún restan obtener más evidencias para poner a prueba la monofilia del género y de los grupos que lo componen.

Muchas especies de este género son importantes en la industria alimenticia, ya que se consumen, además de sus semillas, las raíces, hojas, legumbres y tallos. Los granos secos se utilizan crudos o cocidos, también se lo emplea para producir harinas, con la que se elaboran pan y galletas. Son un excelente complemento de proteínas para las dietas basadas en cereales, ya que su contenido proteico alcanza hasta un 30% del total de los componentes de las semillas. Los brotes, además, son ricos en minerales y vitaminas (Smartt, 1990). Un claro ejemplo de la importancia que ha tenido en la vida humana lo constituye *Vigna unguiculata*, que es consumida desde el año 3000 A. C. en África. Actualmente se comen sus semillas, hojas y brotes, principalmente en el sur de los Estados Unidos y México (Simpson & Ogorzaly, 1995). En algunos países asiáticos, son el único aporte proteico a la dieta humana, y se los consume en lugar de carne u otras fuentes de proteínas animales (Jain & Mehra, 1978). Además de su uso en la alimentación humana, varias especies, como *V. aconitifolia* (Jacq.) Verdc. y *V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi, son aprovechadas como forraje, constituyendo pastizales naturales (Smartt, *op. cit.*).

Dolichopsis Hassler

Este género definido por Verdcourt (1970) como monotípico a partir de la exclusión de *V. paraguarienses* Benth. del género *Vigna*, es endémico de América del Sur, y está compuesto actualmente por sólo dos especies. Éstas presentan en la quilla una morfología similar a la del género *Strophostyles*, pero se diferencian por su porte y fisonomía, así como por la vaina aplanada y torulosa, la semilla con funículo más largo y el hilo dispuesto perpendicularmente a la placenta (Maréchal *et al.*, 1978). A pesar de estas diferencias morfológicas, ambos géneros aparecen muy relacionados en estudios filogenéticos basados en caracteres moleculares (Riley Hulting *et al.*, 2004).

Las especies de *Dolichopsis* están confinadas a una pequeña región que comprende el Chaco Paraguayo, este de Bolivia, el Pantanal de Brasil y el noreste de Argentina. Esta región se distingue de otros bosques estacionales de Sudamérica y, por tener un período de heladas, no sería tan distinto ecológicamente de los bosques templados caducifolios de Norteamérica (Riley Hulting *et al.*, *op. cit.*).

Dolichopsis fue considerado un género monotípico, hasta que Delgado Salinas & Torres Colin (2004) realizaron la nueva combinación *Dolichopsis ligulata* (Piper) A. Delgado, designando basónimo a *Phaseolus ligulatus* Piper. Esta especie se distingue claramente de *Dolichopsis paraguariensis* Hassl. por la presencia de una curvatura sigmoidea en el ápice de la quilla, y por su distribución geográfica, en la zona oeste de Bolivia y Paraguay.

Macroptilium (Benth.) Urban

Este género americano es probablemente el más cercano a *Phaseolus*, con el que comparte un peculiar pliegue en la quilla. Bentham (1865) nombró *Macroptilium* a una sección de *Phaseolus*, cuyos representantes poseen flores de alas mayores que el estandarte (*macro* = grande, *ptilion* = ala). Posteriormente Urban (1928) elevó esta sección a nivel genérico luego de estudiar unas especies cubanas. La mayoría de los basónimos de las especies de *Macroptilium* tienen como primer componente del binomio al nombre *Phaseolus*; por ejemplo, la primera de ellas fue descrita por Linneo en 1763 como *Phaseolus lathyroides* (Drewes, 1995). Cuando el género fue reconocido, este taxón pasó a ser la especie tipo. En 1970 fue retomado el concepto de Urban, realizándose la inclusión en *Macroptilium* de las dos secciones de *Phaseolus*, *Macroptilium* y *Microcochle* (Maréchal, 1970), que se distinguen por el tamaño de las flores y algunos caracteres palinológicos (Drewes, 1997; Torres Colin *et al.*, 1998). A partir de los trabajos de Hutchinson (1967) y Verdcourt (1970) se adopta definitivamente el nuevo género (Drewes, 1997).

El género *Macroptilium* se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta la República Argentina. En América del Norte el centro de distribución está en México, y en Sudamérica, en Brasil y Paraguay. Entre sus aplicaciones económicas, sus especies pueden ser utilizadas como forrajeras o medicinales, para abono verde y como fijadoras de dunas (Barbosa Fevereiro, 1986).

Macroptilium es un género de especies herbáceas, la mayoría de ellas perennes, con un hábito erecto, semierecto, postrado o voluble. Se caracterizan por poseer estípulas no prolongadas más allá de su inserción, ausencia de pelos uncinulados, brácteas florales caducas, raquis de la inflorescencia con pequeños nódulos en la inserción de los pedicelos, ausencia de glándulas extraflorales en el raquis, pedicelo menor o igual al cáliz, estandarte simétrico desprovisto de callosidades, alas considerablemente más largas que el estandarte

y la quilla, quilla y estilo recurvados hacia la cima, estilo caduco, semillas pequeñas con hilo corto, legumbre no tabicada, polen tricolporado y exina finamente reticulada (Drewes, 1995).

Los taxones más cercanos a *Macroptilium* son, según los trabajos realizados hasta el momento, los neotropicales *Strophostyles*, *Dolichopsis*, *Mysanthus*, *Phaseolus*, *Oryxis*, *Oxyrhynchus*, *Ramirezella* y *Vigna* subgénero *Sigmoidotropis* (Riley-Hulting *et al.*, 2004). A pesar de que estos taxones, las Phaseolinae del nuevo mundo, forman un clado muy bien soportado, la monofilia de cada género y sus relaciones no fue analizada.

Riley-Hulting *et al.* (*op. cit.*) encuentran que *Macroptilium* está muy relacionado con *Mysanthus* debido a muchas similitudes en las estructuras florales, tales como estandartes oblicuos, alas largas, uña de la quilla delgada, rostro de la quilla abruptamente curvado. La compresión lateral de las legumbres es una característica que presenta variabilidad en *Macroptilium*, no así en *Mysanthus*, y fue adquirida independientemente en *Dolichopsis*. *Macroptilium* y *Mysanthus* presentan hilo oblanceolado, característica que parece haber sido adquirida independientemente en *Ramirezella* (Riley Hulting *et al.*, *op. cit.*). Nuevamente, el pequeño número de especies analizadas del género, otorga baja consistencia a las conclusiones.

Las subdivisiones, series y subseries propuestas por Hassler (1923), fueron basadas esencialmente en la lobulación del cáliz, carácter que es muy variable, por lo que esta clasificación carece de sustento. Maréchal *et al.* (1978) indican que *Macroptilium* constituye un grupo extremadamente homogéneo y coherente. Los índices de similitud que obtuvieron en su trabajo son relativamente elevados, y consideraron casi imposible dividir al género en grupos de valor taxonómico. Sin embargo, Lackey (1983) sí pudo hacerlo, y subdividió al género en 3 secciones: sección *Microcochle*, con flores más pequeñas, menos óvulos, estípulas no reflejas en los tallos maduros, lóbulos del cáliz libres y semillas orbiculares; sección *Macroptilium*, con flores más grandes, y mayor cantidad de óvulos; y sección *Monophyllum*, con una única especie, *M. monophyllum* (Benth.) Maréchal & Baudet, de alguna manera intermedia entre las otras dos aunque un poco más cercana a la sección *Macroptilium*, de la que se diferencia por sus hojas unifolioladas y estigma lateral.

Con posterioridad a aquellos primeros aportes, muy poco se ha realizado abarcando la totalidad de las especies de este género. Barbosa Fevereiro (*op. cit.*) estudió las especies brasileñas de *Macroptilium*, en cuanto a su morfología, atracción de

polinizadores, mecanismos de polinización, fitogeografía y usos comerciales, pero en Brasil sólo están representadas 10 de las 18 especies actualmente consideradas dentro del género. Esta autora define a la sección *Microcochle* (Bentham) Barbosa, desconociendo el trabajo de Lackey (*op. cit.*), quien ya había validado este nombre. Como bien lo señala Drewes (1997), la combinación correcta es *Macroptilium* sección *Microcochle* (Bentham) Lackey por ser la más antigua.

Considerando sólo a las especies que crecen en la República Argentina, Drewes (1995) realizó un análisis morfológico integral, observando las diferencias entre las secciones, teniendo en cuenta principalmente los caracteres palinológicos. La sección *Macroptilium* es muy homogénea, mientras que la sección *Microcochle* es altamente heterogénea, ya que los caracteres del polen exhiben diferencias a nivel específico.

El único estudio integral del género realizado hasta el momento, considera caracteres morfológicos, anatómicos, ecológicos y palinológicos de 18 especies, sin incluir a la nueva especie *M. ecuadoriense* (Hassler) L.Torres-Colin & A. Delgado (Drewes, 1996). En el mismo se convalida la división del género en las secciones *Macroptilium* y *Microcochle*, pero se indica que la sección *Monophyllum* propuesta por Lackey (*op. cit.*) no tiene sustento. El género *Macroptilium* se resuelve como monofilético, sin embargo, Drewes (*op. cit.*) sólo utilizó dos especies como grupo externo, aunque como es sabido, para probar la monofilia de un grupo es conveniente utilizar un mayor número de taxones externos, con el objeto de lograr un mejor soporte a las hipótesis (Nixon & Carpenter, 1993).

La monofilia del género *Macroptilium* y de las subdivisiones propuestas hasta el momento nunca han sido puestas a prueba con evidencia molecular. No existe en la literatura un análisis que involucre a todas las especies, y a más de una fuente de caracteres. 

SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA

El **método cladístico** es hoy el más utilizado para el estudio de las relaciones evolutivas entre los organismos, por ser el método que menos suposiciones *a priori* requiere, y por su relativa objetividad durante el proceso de reconstrucción filogenética. La objetividad es relativa ya que no hay un método único para la construcción de cladogramas, por lo que el investigador debe elegir cual usar, y en algunos casos, puede haber diferencias en la topología obtenida, según sea el método utilizado.

La aplicación de la metodología cladística para generar patrones jerárquicos en los seres vivos se denomina **Sistemática Filogenética** (Lipscomb, 1998). Esta disciplina fue impulsada por el entomólogo alemán Willi Hennig, quien fue el primero en proponer que las clasificaciones deben estar basadas en filogenias. Para ello desarrolló un método explícito para realizar el análisis filogenético, basándose en ideas desarrolladas independientemente por distintos investigadores (Goloboff, 1998). La publicación de su trabajo en inglés en 1966 derivó inmediatamente en un amplio uso de su metodología. Ésta consiste en agrupar organismos que comparten caracteres derivados, o sinapomorfias, formándose así grupos monofiléticos. Las relaciones entre estos organismos se muestran en un árbol jerárquico llamado cladograma, el cual es construido de manera que el número de cambios de un estado de carácter a otro es minimizado, dado que la cladística sigue el principio de parsimonia, es decir, elige la hipótesis genealógica que minimice las hipótesis *ad hoc* de homoplasia: paralelismos, reversiones y convergencias (Farris, 1983). Esto no significa asumir que la evolución procede parsimoniosamente, ni que la hipótesis más parsimoniosa obtenida sea la verdadera, sino que dicha hipótesis será la que proporcione la explicación más simple de las observaciones realizadas (Goloboff, *op. cit.*).

La obtención de cladogramas se realiza mediante algoritmos matemáticos computarizados, que evalúan para un grupo de datos los posibles árboles, y retienen los más cortos (Goloboff, *op. cit.*). Los caracteres pueden ser de varios tipos: morfológicos, ecológicos, etológicos, anatómicos, químicos, moleculares, etc. Puede ser utilizado cualquier tipo de atributo cuya expresión pueda medirse, contarse o ser determinada. Los únicos requisitos para los caracteres es que sean variables y heredables.

Los caracteres morfológicos han sido los más utilizados en los primeros años de desarrollo de los métodos de reconstrucción filogenética. Otro tipo de caracteres ampliamente utilizados en estudios taxonómicos, aunque su uso hoy en día está decreciendo, son los bioquímicos, especialmente las isoenzimas. Si bien la electroforesis de proteínas seminales ha sido ampliamente utilizada en la sistemática de Leguminosas (Espert & Burghardt, 2003), ninguno de los trabajos adoptó una visión cladística, sino más bien fenética de la Sistemática. Esto implicó que en los trabajos realizados con esta metodología se obtenían clasificaciones libres de inferencias genealógicas, y nada se concluía acerca de las relaciones evolutivas de los organismos. No hay en la literatura muchos antecedentes del uso de este tipo de caracteres en un análisis cladístico. Las bandas proteicas pueden ser consideradas hipótesis de homología que se ponen a prueba durante el análisis filogenético, por lo que su utilización es tan apropiada como cualquier otro tipo de carácter.

Caracteres moleculares en filogenia

El espectacular avance de la Biología Molecular en los últimos 30 años ha tenido un gran impacto en todas las ramas de la Biología, incluyendo la Sistemática (Lanteri *et al.*, 2004). En la actualidad, la mayoría de los trabajos filogenéticos incluyen datos de secuencias de ADN. El número de regiones de ADN disponibles se ha ido incrementando rápidamente, y los investigadores continúan buscando pruebas adicionales para contrastar topologías existentes (Soltis & Soltis, 1998).

Tanto las secuencias de ADN como los sitios de restricción tienen tres características que los hacen especialmente útiles para realizar análisis filogenéticos. La primera de ellas es que son caracteres discretos, por lo tanto pueden ser codificados sin ambigüedades. Para cada taxón se pueden obtener potencialmente un alto número de caracteres. Además, proveen valiosa información acerca de la naturaleza y extensión de la divergencia entre las secuencias. A su vez, la utilización de datos obtenidos mediante secuenciación, es preferible por sobre los datos de sitios de restricción por diferentes motivos. Los métodos de secuenciación son más económicos y rápidos; esta técnica se expandió notablemente con el uso de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), mediante la cual se amplifica y no se clona, tornando la tarea mucho más sencilla. Además, la aparición de un alto número de secuenciadores automáticos facilitó la tarea de los investigadores (Jansen *et al.*, 1998).

La elección de las regiones a utilizar es una etapa crítica en el análisis filogenético, ya que de ella dependerá la inferencia de una correcta topología. Las regiones de ADN útiles en Sistemática pueden ser zonas codificantes o no codificantes, pero no zonas hipervariables, ya que estas evolucionan a tasas rápidas y constantes (Lanteri *et al.*, *op. cit.*). Cada gen tiene un rango de aplicación taxonómica típica, pero éste puede variar según el grupo (Soltis & Soltis, *op. cit.*); por ello, antes de realizar un análisis filogenético, es crítico comprobar la utilidad de cada región en el grupo de estudio. Esto se realiza analizando los sitios informativos, luego del alineamiento de las regiones candidatas.

Al evaluar la filogenia de los organismos con un sólo tipo de marcador puede haber ciertos problemas, como por ejemplo, la captura de cloroplastos, o el “lineage sorting”, es decir, la aparición de más de un linaje alélico en una misma especie, que podría derivar en filogenias incorrectas. Como esto último puede ocurrir tanto en genes de cloroplasto como nucleares, se hace imperativo el análisis de, por lo menos, dos marcadores que representen los dos genomas (Soltis & Soltis, *op. cit.*).

En las Leguminosas, la Sistemática Molecular ya es usual, especialmente a niveles taxonómicos bajos. Los datos de ADN están ayudando a elucidar relaciones interespecíficas en los grandes géneros como *Astragalus* L. o *Acacia* Mill., y también en los pequeños, como *Erythrina* L., *Lotus* L., *Phaseolus* y *Vigna* (Doyle, 1995).

- **Regiones ITS del ADN nuclear**

Una región de ADN ampliamente utilizada actualmente es la del espaciador transcrito interno (ITS) de las regiones 18S-26S del ADN ribosomal nuclear. El 66% de los trabajos de Sistemática en plantas utilizan esta región para sus análisis (Álvarez & Wendel, 2003), y sólo fue con el trabajo de Baldwin (1992) hace una década atrás que comenzó su estudio.

En sus genomas, todos los organismos poseen secuencias de ADN que codifican para ARN ribosomal, componente esencial de la síntesis de proteínas celulares. En las plantas, este ADN ribosomal se encuentra en el genoma nuclear, mitocondrial y del cloroplasto (Hamby & Zimmer, 1992). Los espaciadores transcritos internos 1 y 2 forman parte del transcrito nuclear del ADN ribosomal, pero no son incorporados en los ribosomas maduros. Sin embargo, las regiones ITS-1 e ITS-2 parecen tener una función en la maduración de los ARN nuclear ribosomales, como lo muestran los análisis en

levaduras realizados por Baldwin *et al.* (1995), quienes observaron que deleciones de regiones del ITS-1 o 2 impedían la normal maduración del ARN ribosomal.

El ADN ribosomal se ubica en las regiones organizadoras nucleolares (NOR), pudiendo disponerse en distintos cromosomas según las especies. Está menos metilado que el ADN ubicado en la heterocromatina. Los genes nucleares que codifican para el ARN ribosomal están repetidos cientos de veces dentro del genoma típico vegetal, y pueden comprender hasta un 10% del ADN total (Hamby & Zimmer, *op. cit.*), esto facilita su aislamiento y posterior secuenciación.

Las secuencias de los espaciadores transcritos internos son mucho más divergentes que las secuencias codificantes. Como los espaciadores son clivados o digeridos en el ensamblado de las subunidades ribosomales, están sujetos a presiones de selección menores que las regiones codificantes, entonces en ellos se encuentra una alta variabilidad entre diferentes taxones. Es por ello que los ITS son aconsejables para el diagnóstico de las relaciones entre géneros muy relacionados y grupos infragénicos (Hershkovitz *et al.*, 1999). Diferentes especies de Leguminosas muestran en las regiones ITS dos zonas con diferente tasa de conservación. En el ITS-1, una de estas zonas presenta entre un 16 y un 18% de divergencia nucleotídica, y la otra un 55%. En el ITS-2 también se hallaron zonas con distintas tasas de variación nucleotídica (Hamby & Zimmer, *op. cit.*). Los distintos niveles de conservación podrían estar indicando la presencia de señales de procesamiento dentro de los ITS, quizás para modificaciones post-transcripcionales. La participación de las regiones ITS-1 o 2 en la maduración del ARN ribosomal (Baldwin *et al.*, *op. cit.*) podría explicar que los ITS estén sujetos a restricciones evolutivas en cuanto a su estructura y secuencia. Su alto contenido de Guanina-Citosina, y sus porciones altamente conservadas concuerdan con esta suposición (Soltis & Soltis, *op. cit.*). El contenido GC de los ITS de las Angiospermas generalmente es mayor al 50%, y en algunos casos, excede el 75% (Hershkovitz *et al.*, *op. cit.*).

La amplia utilización de los ITS en trabajos de filogenia vegetal, puede deberse principalmente a que son fácilmente amplificados y secuenciados debido a su pequeño tamaño (menos de 700 pares de bases en las Angiospermas), y al gran desarrollo de “primers” específicos para esta región. Otras propiedades que favorecieron el uso de los ITS son su gran variación nucleotídica y la conservación de su longitud en una gran diversidad de organismos, permitiendo una buena alineación, aun en especies no muy emparentadas (Baldwin *et al.*, *op. cit.*).

A pesar de las ventajas que mencionan los trabajos para el uso de los ITS en estudios filogenéticos, hay ciertos aspectos que deberían ser tenidos en cuenta. El hecho de que los primeros primers desarrollados en hongos han podido aplicarse sin problemas en la mayoría de los organismos (White *et al.*, 1990), indica la necesidad de tener especial cuidado con la amplificación inespecífica; una buena estrategia para detectarla es comparar las secuencias obtenidas con base de datos de especies cuyas secuencias ya han sido corroboradas. Siempre se pensó que la familia génica del ADN ribosomal (incluidos los ITS) está sometida a una rápida evolución concertada por entrecruzamiento desigual y conversión génica, lo cual promueve una uniformidad intragenómica (Baldwin *et al.*, *op. cit.*); sin embargo, la aparición de trabajos en donde se analiza el mismo grupo de especies, obteniendo resultados diferentes (ver Álvarez & Wendel, *op. cit.*; Bellarosa *et al.*, 2005; Mayol & Rosselló, 2001), indica el riesgo de utilizar los ITS como única fuente de caracteres filogenéticos. El mismo Baldwin (1995) en su trabajo menciona que ante una falla de la evolución concertada, surge el problema de los parálogos, que dificultarían el correcto análisis filogenético. El autor indica que esto puede ser detectado al secuenciar, por la aparición de picos dobles en los cromatogramas (dos o más estados nucleotídicos en un mismo sitio); si además esto se repite en ambas sentidos de secuenciación, se asegura que su aparición no es consecuencia de un artefacto de la técnica. Por ello es fundamental secuenciar en ambos sentidos para detectar este tipo de fenómeno. Cabe señalar que a pesar de esta última recomendación, es común encontrar en la literatura trabajos basados exclusivamente en la región ITS, y sin ninguna mención acerca de la posible presencia de secuencias parálogas y ortólogas, o de pseudogenes.

Las secuencias que dejan de ser funcionales y no son eliminadas del genoma pasan a denominarse pseudogenes. Éstos pueden evolucionar en forma independiente a su contraparte funcional, y su posible secuenciación es un riesgo muy grande para el análisis filogenético. Sin embargo, no se justifica la remoción de datos de secuencia de un análisis, simplemente porque se haya detectado que sean pseudogenes (Bailey *et al.*, 2003).

Es necesario hacer la distinción entre parálogos “superficiales” y “profundos”. Los primeros son aquéllos surgidos por duplicación o divergencia del gen (o región) luego de la especiación. Como resultan ser monofiléticos en el árbol del gen, no afectarán la filogenia de los organismos estudiados, por lo que su inclusión no ocasionará problemas en el análisis. Por el contrario, los parálogos “profundos” sí presentan un obstáculo para descubrir la verdadera filogenia, ya que resultan de un evento de duplicación o

divergencia previo a la especiación (Bailey *et al.*, *op. cit.*). Actualmente se puede encontrar una amplia evidencia de la existencia de pseudogenes de ADN ribosomal en genomas vegetales (Álvarez & Wendel, 2003), por lo tanto es fundamental comprobar antes de comenzar el estudio filogenético, que los genes secuenciados sean los funcionales y no pseudogenes. Para ello, se puede realizar una amplia variedad de pruebas. La presencia de pseudogenes, si no es detectada durante la amplificación por dobles bandas, o en la secuenciación por los dobles picos, puede ser comprobada estudiando la estabilidad de la estructura secundaria y por la aparición de sustituciones en regiones altamente conservadas (Hershkovitz *et al.*, 1999).

Álvarez & Wendel (*op. cit.*) señalan que los ITS suelen tener alto contenido de GC y acumulan inserciones o deleciones (“indels”) de uno o más nucleótidos. Esto podría ocasionar problemas en la etapa del alineamiento, que se solucionarían haciendo un buen tratamiento de los gaps, es decir, codificándolos y utilizándolos como caracteres. Álvarez & Wendel (*op. cit.*) advierten sobre el tema de la universalidad de los primers, discutido anteriormente, e indican que los ITS tienen una mayor homoplasia que otras secuencias de ADN. A pesar de estos inconvenientes, el adecuado uso de los ITS y su combinación con otras fuentes de caracteres, permitiría un correcto estudio filogenético.

En la subfamilia Papilionoideae existen varios estudios filogenéticos analizando esta región en géneros como *Vigna* (Doi *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2002), *Wajira* Thulin (Thulin *et al.*, 2004), *Strophostyles* (Riley-Hulting *et al.*, 2004) y *Phaseolus* (Delgado Salinas *et al.*, 1999). También hay estudios en otros géneros de la tribu Phaseoleae (Ainouche & Bayer, 1999; Bena *et al.*, 1998), y en otras tribus de la misma subfamilia (Ainouche *et al.*, 2003; Allan & Porter, 2000; Hu *et al.*, 2002; Kaas & Wink, 1997).

- **Región IGS *trnL-trnF* del ADN de cloroplasto**

El genoma del cloroplasto ha sido objeto de la mayoría de los estudios de Sistemática Molecular en plantas, debido a que el cloroplasto no posee el proceso de la recombinación y duplicación génica observado en el genoma nuclear (Doyle, 1995). Es una ventaja que la mayoría de los genes del cloroplasto sean de copia única, ya que evita el problema de las familias multigénicas presentes en el genoma nuclear.

La evolución del cloroplasto es conservada en cuanto a lo estructural, y con tasa de evolución lenta respecto a la del núcleo. Aunque esta conservación no lo hace muy útil para estudios inter e intraespecíficos, la existencia de distintas tasas de evolución dentro

del mismo genoma del cloroplasto, posibilita encontrar un gen acorde al rango taxonómico que se desea estudiar (Soltis & Soltis, 1998).

Las regiones no codificantes del ADN del cloroplasto (en adelante ADNcp), pueden ser utilizadas a niveles taxonómicos bajos, ya que tienden a evolucionar más rápidamente que las codificantes, debido a la acumulación de inserciones-delecciones con una tasa casi idéntica a la de las sustituciones nucleotídicas. La desventaja de utilizar estas regiones reside en la posible presencia de largos fragmentos ricos en Timinas o Adeninas, que imposibilitan la lectura de la secuencia (Gielly & Taberlet, 1994).

Entre las secuencias no codificantes del ADNcp con potencial filogenético, encontramos el intrón *trnL* (UAA) y el espaciador intergénico entre el exón *trnL* (UAA) 3' y el gen *trnF* (GAA) (en adelante IGS). Estas regiones pueden evolucionar a tasas similares al gen *rbcL* o hasta 3 veces más rápido. Son relativamente pequeñas, variando entre 120 a 350 pb, y fáciles de amplificar y secuenciar (Soltis & Soltis, *op. cit.*).

Es recomendable antes de realizar el análisis filogenético, la comprobación de la tasa de evolución de la región del genoma en los taxones a analizar, para asegurar la presencia de sitios informativos. Esto se logra observando la divergencia entre algunos de ellos. También hay que cerciorarse que no haya regiones de poliA o poliT, que impidan la secuenciación o el alineamiento (Gielly & Taberlet, *op. cit.*).

Es posible encontrar en la literatura pocos trabajos que hayan utilizado este marcador en miembros de la familia Leguminosae. Pueden mencionarse los realizados en Polygalaceae, familia afín a las Leguminosae (Persson, 2001), en tribus de la subfamilia Papilionoideae (Ainouche *et al.*, 2003; Crisp & Cook, 2003), y también en la subfamilia Caesalpinioideae (Brouat *et al.*, 2001; Fougere -Danezan *et al.*, 2003).

- **Alineamiento**

Al igual que en otros tipos de caracteres, la asignación de homologías en los datos de secuencias de ADN es clave para el análisis filogenético. Se definen como estados homólogos a aquellos que se originan filogenéticamente unos de otros preexistentes. La homología primaria es determinada antes del análisis cladístico, y la homología secundaria se obtiene una vez realizado el análisis. Aquellos estados de carácter que se expresan como sinapomorfias en el árbol óptimo, se consideran como secundariamente homólogos (Lanteri *et al.*, 2004).

Cuando se analizan secuencias de ADN, los caracteres son las posiciones a lo largo de dichas secuencias. Los estados en aquellas secuencias que no difieren en el largo son las bases Adenina, Timina, Citosina o Guanina. Antes del **alineamiento** de secuencias con distinto largo, no hay hipótesis de homología para cada posición nucleotídica. Primero se observan los estados y luego se definen los caracteres una vez alineadas las secuencias, en forma inversa a lo que sucede con la morfología. El punto crítico de este proceso es la inserción de segmentos (en adelante “gaps”), de forma tal de recuperar las homologías entre los nucleótidos, ya que si este paso falla, se producirá una asignación incorrecta de homologías. Las diferencias observadas entre secuencias homólogas puede ser explicada por mutaciones en el largo o por reemplazo de nucleótidos, pero es imposible asegurar cuál de los procesos actuó. Por todo lo expuesto, el alineamiento es un paso crítico, porque provee las hipótesis de homología provisorias para cada estado de carácter. El rigor en los análisis subsiguientes no tendrá sentido si la homología inicial es incorrectamente inferida (Doyle & Davis, 1998).

Distintos programas han sido desarrollados para evitar el alineamiento manual de las secuencias, y en consecuencia disminuir el grado de subjetividad en este paso del análisis. Básicamente existen dos tipos de programas de alineamiento: local y global. El alineamiento local busca identificar regiones de coincidencia pequeñas, descuidando al resto de la secuencia. Los globales alinean las secuencias completas, y por lo tanto, son los más utilizados en la elaboración de filogenias. La desventaja del primer tipo es que el resultado dependerá de las secuencias iniciales, mientras que con el segundo se ve dificultado el análisis en sí, por ser computacionalmente más laborioso (Doyle & Davis, *op. cit.*).

El programa Dialign (Morgenstern *et al.*, 1998) utiliza un algoritmo que permite construir alineamientos comparando las secuencias completas e identificando similitudes locales, a pesar de que éstas estén separadas por regiones de secuencia no relacionadas de largo variable. El programa compara segmentos completos, y no residuos únicos, por lo que pertenece al tipo de programas de alineamiento global.

Los alineamientos computacionales deben ser considerados soluciones heurísticas que deben ser reevaluados para obtener una mejor evidencia, dado que, si bien el alineamiento manual ha sido criticado por su falta de objetividad, la elección de parámetros en los programas de alineamiento también es subjetiva (Hershkovitz *et al.*, 1999). Además, distintos parámetros (como la penalización de los gaps según su

longitud), pueden llegar a producir distintos alineamientos, y por lo tanto, diferentes topologías (Doyle & Davis, *op. cit.*). Un método para evitar esto fue propuesto por Wheeler *et al.* (1995) y denominado “elision”. Consiste en producir alineamientos individuales bajo un amplio rango de parámetros, y luego unirlos en una misma matriz para ser analizada filogenéticamente. Las sinapomorfias que se mantengan en los distintos alineamientos, tendrán mayor peso ya que estarán repetidas, otorgándole mayor consistencia al clado que soportan. En el mismo trabajo, los autores admiten que este método tiene varias falencias, entre ellas que está en oposición con el concepto mismo de homología. Esto se debe a que en una misma matriz, coexisten simultáneamente distintas asignaciones de homología. Otra alternativa a este método, pero con una filosofía similar, sería la de obtener topologías variando los parámetros de alineamiento, y luego calcular el consenso estricto (Goloboff, com. pers.). Los grupos mejor apoyados serán aquellos que persistan aun variando el tipo de alineamiento, y son los que tienen más posibilidades de representar la filogenia verdadera. Este método no tiene el problema de la repetición de caracteres en una misma matriz. En general, distintos estudios mostraron que los parámetros afectan al soporte de los clados, pero no a las topologías resultantes (Doyle & Davis, *op. cit.*).

Para evitar la manipulación de las secuencias antes del análisis, puede utilizarse el programa POY (Wheeler & Gladstein, 2000), que permite la optimización directa. Éste implementa varios procedimientos heurísticos para buscar el o los árboles que tengan un costo mínimo de edición para los datos observados. En el caso de datos morfológicos, el costo de edición es el largo de cada carácter en el árbol (De Laet & Wheeler, 2003). Además, las inserciones, deleciones y sustituciones nucleotídicas son incorporadas al proceso de optimización, y son minimizadas para cada árbol. POY selecciona el árbol que requiera el menor número de cambios que se ajusten a las secuencias originales (Aagesen *et al.*, 2005).

Métodos de reconstrucción filogenética

Los programas de computación desarrollados para el análisis cladístico utilizan distintos algoritmos de parsimonia para encontrar el cladograma óptimo. La primera opción es realizar una **búsqueda exhaustiva**, es decir, buscar entre todos los árboles posibles y elegir los que impliquen menos cambios evolutivos. Sin embargo, esta búsqueda sólo es aplicable a una matriz con menos de 10 taxones, ya que con 10, el

número de resoluciones dicotómicas es de 34.459.425. Calcular el largo de cada una de estas reconstrucciones es casi imposible, incluso con las mejores computadoras. Una segunda opción que también nos asegura la obtención del árbol más parsimonioso es la denominada **búsqueda exacta**, a través de la “Enumeración Implícita” o “Branch and Bound”. Esta consiste en ir construyendo cladogramas y agregando los taxones secuencialmente, desechando los subóptimos, es decir, abandona los caminos que resultan en una longitud mayor que el árbol de referencia inicial (Cigliano *et al.*, 2004). Este método sólo es aplicable en matrices con hasta 20 taxones.

Cuando el número de especies a analizar es grande, es conveniente utilizar otro tipo de búsqueda que permita obtener una solución aproximada en un tiempo computacional relativamente pequeño. Si bien no se tendrá la certeza de encontrar el árbol óptimo, se podrá luego hacer búsquedas más refinadas para acercarse lo más posible al cladograma más parsimonioso. Se trata del **método heurístico**, el que a partir de un árbol inicial, en general un árbol de Wagner (Kluge & Farris, 1969), permuta las ramas hasta encontrar topologías con menor número de pasos. Las topologías subóptimas son retenidas para comenzar una nueva ronda de permutación de ramas. Esto se repite hasta que se estabiliza el largo, que será el óptimo para los cladogramas obtenidos. Cabe señalar que, a veces, puede ser imposible llegar desde el árbol subóptimo hasta otro de longitud menor, a menos que se pase a través de árboles de longitud mayor (Goloboff, 1998). Se trata del problema de las “islas”, es decir, de la formación de conjuntos de árboles igualmente parsimoniosos, separados entre sí por una sola permutación de ramas (Swofford & Olsen, 1990). Una forma de solucionar el problema de las islas es partir de varios árboles iniciales y permutar las ramas de cada uno de ellos hasta encontrar óptimos. Los árboles que no se pueden mejorar, es decir, que su largo no puede ser reducido, se descartan y se retienen los otros. El proceso se repite varias veces hasta que el largo óptimo no mejora. Esta estrategia es denominada Multiple Sequence Additions, y es implementada tanto en Nona (Goloboff, 1996) como en TNT (Goloboff *et al.*, 2003).

Cuando el uso de caracteres moleculares se hizo rutina en los laboratorios de Sistemática, comenzaron a aparecer matrices con un alto número de caracteres. Un claro ejemplo es la matriz denominada “Zilla” (Chase *et al.*, 1993), que consiste de 500 taxones de plantas y 759 caracteres moleculares. Para el análisis de matrices de este tamaño, se necesitan estrategias que permitan encontrar el árbol óptimo, o por lo menos acercarse al óptimo lo más posible, en tiempos prudenciales. La estrategia “Ratchet” (Nixon, 1999)

permitió analizar la matriz Zilla en 3 horas, mientras que a los autores de la matriz les llevó meses, y aún así no encontraron el largo óptimo que sí se obtiene con Ratchet. La idea es saltar lateralmente en lugar de regresar al árbol de Wagner original, lo cual se logra mediante el pesado de caracteres al azar, pero manteniendo la información. Por lo tanto, las ramas más apoyadas estarán más representadas. Esta estrategia está implementada en TNT (Goloboff *et al.*, *op. cit.*), al igual que otras nuevas estrategias. Los métodos “Tree-drifting” y “Tree-Fusing”, los cuales podemos encontrar también en POY (Wheeler & Gladstein, 2000), y “Sectorial Search”, tienen todos el objetivo de acelerar las búsquedas de los árboles óptimos.

Pesado de caracteres

Hay tres formas de implementar el pesado en análisis cladísticos. La primera de ellas es el *pesado a priori*, el cual es muy criticado por ser subjetivo y arbitrario. En realidad, en todo análisis siempre está implícito un pesado, ya que aun asignando pesos iguales, estamos considerando a todos los caracteres con peso de 1, y a los que no se están incluyendo, con peso 0. Además, solo podemos determinar si un carácter es confiable después del análisis, por lo que en rigor, el pesado no estaría siendo *a priori*. Cabe aclarar que el pesado se basa en las transformaciones entre estados y no en un supuesto valor intrínseco de los caracteres en sí.

Para tratar de decidir en forma objetiva la asignación de pesos, Farris (1969) propuso usar el Índice de Consistencia. Es un tipo de pesado *a posteriori*, llamado **Pesado Sucesivo**. El método crea una matriz sin pesos, encuentra los árboles más parsimoniosos, calcula el valor promedio de los Índices de Consistencia para cada carácter, lo multiplica por 1 (que es el peso inicial) y escala los valores a 1, que pasa a ser el valor mínimo. Estos pasos se repiten hasta que la longitud y el número de árboles se estabilicen, lo que resulta en una estabilización de los pesos. Según esto, la relación entre pesos y homoplasia es lineal. No siempre el Pesado Sucesivo resulta en árboles de largo mínimo, por lo que no es un criterio para elegir entre árboles óptimos. El problema con este método es que es muy dependiente de los pesos iniciales, lo cual no se soluciona ni aún asignando pesos de 1.

El tercer método es realizado *durante el análisis*, y es el denominado **Pesado Implícito** (Goloboff, 1993). Es una modificación del Pesado Sucesivo, que permite comparar, en forma relativamente simple, dos árboles cualesquiera según los pesos que

esos mismos árboles impliquen (Goloboff, 1998). En este método, la relación peso/homoplasia no es lineal, sino que es una función cóncava cuya severidad se estipula con una constante K. Al aumentar el grado de homoplasia este carácter recibe relativamente cada vez menos peso. Este método no depende del punto de partida.

Distintos estudios han señalado que las clasificaciones producidas con métodos cladísticos de pesado de caracteres, son más estables ante la adición de nueva evidencia, que cuando se usan costos iguales (Goloboff, 1998).

Medidas de apoyo

Cuando se encuentra el árbol más parsimonioso, y se evalúan aquellos grupos monofiléticos, es deseable tener una medida de la confianza en esos clados. Esto implica saber si un grupo es apoyado por muchos caracteres y no varía si se sigue sumando información, o por el contrario, es más débil y sensible al agregado de más caracteres. Se intenta tener una noción de la cantidad de evidencia a favor y en contra de los grupos formados. Actualmente se utilizan principalmente tres medidas de ajuste, dos de ellas basadas en técnicas de remuestreo y una tercera que analiza el largo del árbol variando los grupos contenidos en él.

Los métodos de “**jackknifing**” y “**bootstrapping**” se basan en hacer alteraciones de la matriz un número dado de veces, calculando con qué frecuencia los árboles óptimos tienen un grupo dado (Goloboff, 1998). El Bootstrap (Felsenstein, 1985), previamente utilizado en estadística paramétrica, se implementa perturbando entre 100 a 1000 veces la matriz original mediante muestreos con reemplazos. De cada matriz perturbada se obtienen los cladogramas más parsimoniosos, y se observa el grado de conflicto entre ellos estimando un consenso de mayoría. Aquellos clados que aparezcan en más del 50% de los árboles obtenidos, tendrán un buen apoyo, El problema de este método es que es sensible a la presencia de caracteres no informativos, ya que su presencia reduce la probabilidad de muestrear los caracteres informativos. Una matriz con un alto número de sitios no informativos tendrá un valor de bootstrap elevado, por lo que es recomendable especificar si el apoyo es calculado incluyendo o no este tipo de caracteres.

Una método de remuestreo alternativo al Bootstrap es el de Jackknife, recreado por Lanyon (1985), y adoptado por Farris *et al.* (1996) para el análisis cladístico. La diferencia es que no se realizan reemplazos. La matriz varía de composición en cuanto al

número de caracteres o al número de taxones, resultando en un tamaño igual o menor que la original. Cada carácter tiene la misma probabilidad de ser eliminado en cada réplica. El valor de jackknife de cada clado representa su porcentaje de ocurrencia en los cladogramas resultantes de las matrices remuestreadas (Lanteri *et al.*, 2004).

El tercer método más utilizado para medir soporte de grupos es el “**Bremer Support**” o el “Soporte de Bremer” (Bremer, 1994). Consiste en ver cuantos pasos extra se necesitan para que se pierda un clado determinado. Si al ir aumentando la longitud del árbol, el grupo se mantiene, significa que está bien apoyado. En el caso de la búsqueda mediante pesos implicados, el apoyo de Bremer me indica la diferencia de ajuste de los datos al árbol óptimo y a los subóptimos.

¿Análisis separados o simultáneos?

Las hipótesis filogenéticas basadas en varias fuentes de evidencia tienen un gran poder explicativo y son las más corroboradas por los datos (Farris, 1983). El problema surge al analizar datos distintos, como por ejemplo, morfológicos y moleculares. Dos métodos principales surgieron para este problema. Uno es el denominado “Evidencia Total” o “Análisis Simultáneo” (Kluge, 1989), que combina en una sola matriz todos los caracteres recolectados y determina el árbol óptimo a partir de ella. El segundo método consiste en comparar topologías surgidas al analizar distintos set de datos, y es denominado “Congruencia Taxonómica” (Kluge, *op. cit.*). El estudio de datos diferentes bajo distintos modelos evolutivos, o la posibilidad de distintas historias evolutivas para distintos sets de datos, constituyen argumentos que avalarían el análisis de cada conjunto de datos por separado. Luego del análisis se hace un resumen de todos los caracteres en un consenso. Sin embargo, al elegir esta opción, se desprecia la influencia de cada dataset ya que sólo es observable la topología resultante. Nixon & Carpenter (1996) señalan en su trabajo que el análisis simultáneo de datos combinados maximiza la parsimonia cladística, por lo que sería el más recomendable. Es común encontrar en la literatura trabajos que, previo al análisis filogenético, miden la congruencia entre los distintos datasets y luego deciden el tipo de análisis a utilizar, si será simultáneo o no. Varios autores demostraron que estos índices de congruencia tienen muchas fallas y pueden conducir a conclusiones erróneas (ver Dolphin *et al.*, 2000; Lee, 2001).

También existen casos en los que se poseen distintos sets de datos pero no están representados los mismos taxones para todos ellos. Si se los analiza por separado, con sus cladogramas no se podría realizar un consenso, pues no contienen los mismos taxones. Se podría juntar todo en una sola matriz, pero quedarán datos faltantes para algunos taxones. La alternativa que surge es la denominada “Super-trees” y consiste en combinar los árboles, sin necesidad de volver a utilizar las matrices de datos originales. Existen varios métodos con esta filosofía, uno de ellos diseñado por Goloboff & Pol (2002) e implementado en TNT (Goloboff *et al.*, 2003), llamado “Semi-strict supertrees”, basado en lo que representa un árbol de consenso semiestricto. Consiste en crear una matriz que represente todos los grupos de los árboles originales, y luego encontrar el consenso pero sólo a partir de aquellos caracteres que no son contradichos por otro carácter o grupo de caracteres. Estos caracteres son denominados por los autores “ultra-clique”.

Alternativas a los métodos cladísticos

Existen métodos alternativos a la parsimonia, como los métodos probabilísticos. Entre ellos, los más utilizados son el análisis de Máxima Verosimilitud, o “Maximum Likelihood”, y el método Bayesiano.

El primero de ellos busca maximizar el ajuste de los datos a una hipótesis. Considera como criterio de optimalidad la probabilidad de que los datos se ajusten a una topología dado un modelo evolutivo. En oposición a la parsimonia, que es un método deductivo, el análisis de máxima verosimilitud es un método inductivo. El problema que este tipo de análisis plantea, es que uno debe *a priori* saber en detalle cómo opera la evolución, ya que los resultados son fuertemente dependientes del modelo evolutivo elegido. Esto no es deseable ya que nuestras hipótesis filogenéticas, de ser posible, deberían estar basadas sólo en las observaciones y sin presuponer mecanismos evolutivos (Farris, 1983; Goloboff, 1998).

El método Bayesiano le asigna una probabilidad de certeza a las observaciones. Al igual que la máxima verosimilitud, implica suponer modelos evolutivos, pues de otra manera no se podrían asignar probabilidades.

Es muy común encontrar en la literatura actual, trabajos sistemáticos que utilicen la parsimonia y uno de estos métodos alternativos, para tener una mejor corroboración de las topologías resultantes (Simpson *et al.*, 2004; Starr *et al.*, 2004). Sin embargo, como bien

lo menciona Brower (2000): “hacer múltiples evaluaciones del mismo conjunto de datos no provee confirmación de un resultado en forma independiente, ni aumenta la confianza en la veracidad de un resultado. Por otro lado, la no concordancia entre los resultados obtenidos por distintos métodos, no implica que la hipótesis nula deba ser ni aceptada ni rechazada. Un sólo método, bien elegido, alcanza.” 

OBJETIVOS

- Analizar las relaciones filogenéticas de los géneros americanos de la subtribu Phaseolinae, a través de un análisis cladístico de caracteres moleculares.
- Poner a prueba la monofilia de las secciones de *Phaseolus* propuestas en base a caracteres morfológicos, mediante la utilización de datos de secuencia de ADN.
- Obtener una filogenia molecular del género *Macroptilium*.
- Poner a prueba la monofilia del género *Macroptilium* y de las secciones propuestas hasta el momento, mediante el uso alternativo y simultáneo de caracteres moleculares, morfológicos y bioquímicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Los especímenes utilizados para la obtención de ADN así como también para la extracción de proteínas seminales, con el objeto de analizar relaciones filogenéticas en el género *Macroptilium*, se detallan a continuación. Ejemplares de herbario con los materiales se encuentran depositados en los Herbarios de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (BAFC), Jardín Botánico Nacional de Bélgica (NI), y en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Entre paréntesis se consigna el herbario en que cada uno de ellos se encuentra depositado utilizando las siglas propuestas por Holmgren *et al.* (1990).

Se mencionan además los ejemplares cuyas secuencias fueron obtenidas de la base de datos del GenBank, a través del sitio web www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank, indicando entre paréntesis la fuente de la que fue obtenida.

Macroptilium (Benth.) Urban

Sección *Macroptilium*

Macroptilium atropurpureum (Sessé & Moc. ex DC.) Urb.

Colombia, Prov. Tolima, Gualanday, zona de carretera. CIAT 596 (CIAT)

Macroptilium bracteatum (Nees & C. Mart.) Maréchal & Baudet

Argentina, Prov. Salta, Depto. Capital, bajada del Río San Lorenzo. R. A. Palacios 769 (BAFC)

Argentina, Prov. Entre Ríos, Depto. Concordia, Parque Rivadavia, camino bordeando el río. R. A. Palacios 1275 (BAFC); Parque Rivadavia. S. Drewes 501, 502 y 503 (BAFC).

Macroptilium ecuadoriense (Sessé & Moc. ex DC.) L. Torres-Colin & A. Delgado
Ecuador, Pichincha, Blasco. AY508736 (GenBank)

Macroptilium erythroloma (Mart. ex Benth.) Urb.

México, AF069117 (GenBank)

Argentina, Prov. Chaco, Depto. San Fernando, Colonia Resistencia, paraje del R. Tragadero, Colonia Benítez. R. A. Palacios 892 (BAFC)

Argentina, Prov. Misiones, Depto. San Ignacio, San Ignacio: camino al puerto, R. A. Palacios 1284 (BAFC); camino al río desde la calle principal del pueblo R. A. Palacios 878 y 1100 (BAFC). Depto. Candelaria, Santa Ana. R. A. Palacios 1286 (BAFC)

Macroptilium gracile (Poepp. ex Benth.) Urb.

México, Chiapas. AY508739 (GenBank)
Colombia, Prov. Vichada, Puerto Carreño, zona de carretera. CIAT 4017 (CIAT)

Macroptilium lathyroides (L.) Urb.

México, Tabasco, AY508740 (GenBank)

Paraguay, Depto. Presidente Hayes, Ruta trans Chaco, Estación Patiño. R. A. Palacios 1518 (BAFC)

Argentina, Prov. Chaco, Depto. San Fernando, a mitad del camino de acceso desde el pavimento a Colonia Benítez, antes de llegar al Río Tragadero. R. A. Palacios 891 (BAFC)

Macroptilium longepedunculatum (Mart. ex Benth.) Urb.

México, Jalisco, AY508742 (GenBank)

Panamá, Prov. Panamá, Ciudad de Panamá, Km. 69, 5 Km. al norte de Bejuco. CIAT 4169 (CIAT)

Argentina, Prov. Corrientes, Depto. Mburucuyá, Est. Santa Teresa. R. A. Palacios 910 (BAFC)

Argentina, Prov. Entre Ríos, Depto. Esquina, Ruta 27 entre Goya y Esquina. R. A. Palacios 902 y 908 (BAFC)

Macroptilium monophyllum (Benth.) Maréchal & Baudet

Solo se consideraron los caracteres morfológicos de esta especie, ya que no se consiguió material para los análisis moleculares.

Macroptilium panduratum (Mart. ex Benth.) Maréchal & Baudet

Argentina, Prov. Salta, Depto. General Güemes, Río Mojotoro, R. A. Palacios 1357 (BAFC); Playa Río Mojotoro, A. Echeverry 65 (MCNS). Depto. Chicoana, Quebrada de Escoipe, cerca de Cueva del Gigante, P. S. Hoc 341 (BAFC)

Sección *Microcochle* (Benth.) Lackey

Macroptilium arenarium (Bacigalupo) S. I. Drewes & R. A. Palacios

Argentina, Prov. Entre Ríos, Depto. Concepción del Uruguay, Médanos, cruce ruta y vías ferrocarril, P. S. Hoc 373 y 374 (BAFC). Depto. Gualeguaychú, Ruta de Ceibas a Médanos, Km. 21, R. A. Palacios 1299 (BAFC)

Macroptilium fraternum (Piper) Juárez & S. Pérez

Argentina, Prov. Jujuy, Ruta S.S. de Jujuy a El Carmen, al costado Arroyo Huaico Hondo hacia Jujuy. R. A. Palacios 1014 (BAFC)

Argentina, Prov. Salta, Depto. Capital: 7 Km. al SE de San Lorenzo, Av. Gral. Manuel Savio y Av. San Lorenzo, R. A. Palacios 773 (BAFC); bajada Río San Lorenzo, R. A. Palacios 767 y 775 (BAFC). Depto. La Caldera, 5 Km. al S de La Caldera, R. A. Palacios 781 (BAFC); Villa Urquiza, Vaqueos, A. Echeverry 60 y 66 (MCNS).

Argentina, Prov. Tucumán, Depto. Trancas, camino hacia Hualinchay, Km. 43. R. A. Palacios 1014 (BAFC)

Macroptilium gibbosifolium (Ortega) A. Delgado

México, Durango, El Salto, Ruta Durango-Mazatlan, 697 (NI)

Macroptilium martii (Benth.) Maréchal & Baudet

Solo se consideraron los caracteres morfológicos de esta especie, ya que no se consiguió material para los análisis moleculares.

Macroptilium pedatum (Rose) Maréchal & Baudet

Solo se consideraron los caracteres morfológicos de esta especie, ya que no se consiguió material para los análisis moleculares.

Macroptilium prostratum (Benth.) Urb.

Argentina, Prov. Misiones, Depto. San Javier, camino de Santa Ana a San Javier, bifurcación de caminos a Itacurari y San Javier. R. A. Palacios 1287 (BAFC)

Argentina, Prov. Corrientes, Depto. Santo Tomé, 40 Km. al E de Gobernador Virasoro, cerca del Arroyo Garabí, campo virgen con afloramiento de basalto. R. A. Palacios 1073 (BAFC)

Argentina, Prov. Entre Ríos, Depto. Colón, cruce del Arroyo El Palmar y Ruta 14, en campos altos arenosos del palmar, R. A. Palacios 1205 (BAFC); Parque Nacional El Palmar, bajada al Arroyo Palmar, R. A. Palacios 844 (BAFC). Depto. Concordia, Concordia, Parque San Martín, cerros arenosos, R. A. Palacios 856 (BAFC); Concordia, Parque Rivadavia, camino al río sobre las lomadas pedregosas, R. A. Palacios 1274 (BAFC).

Macroptilium psammodes (Lindm.) S. I. Drewes & R. A. Palacios

Argentina, Prov. Misiones, Depto. Capital, Ruta 14 al N de San José, aproximadamente 30 Km. al S de Posadas, costado de la ruta. R. A. Palacios 1282 (BAFC)

Argentina, Prov. Corrientes, Depto. Gral. Alvear: 100 Km. al SE de Gobernador Virasoro, Río Aguapey, “Ombú Chico”, campo a 2 Km. al oeste de dicho río, R. A. Palacios 1090 (BAFC); 15 Km. al N de la entrada a Alvear, R. A. Palacios 1280 (BAFC). Depto. San Martín, Ruta 14 y Arroyo Guaviraví, entre pajonales cerca del arroyo. R. A. Palacios 1279 (BAFC)

Argentina, Prov. Entre Ríos, Depto. Gualaguaychú, ruta de Ceibas a Médanos, Km. 21, población abundante. R. A. Palacios 1298 (BAFC)

Macroptilium sabaraense (Hoehne) V.P. Barbosa ex G.P. Lewis

Brasil, Minas Gerais, Rio Bicudo, 852 (NI)

Macroptilium supinum (Wiggins & Rollins) A. Delgado & L. Torres-Colín

Estados Unidos, Arizona, Cañón Sycomore, Monte Atacosa, 872 (NI)

Como grupo externo en el análisis del género *Macroptilium*, se utilizaron los siguientes ejemplares:

Phaseolus L.Sección *Paniculati**Phaseolus augusti* Harms

Perú, AF115180 (GenBank)

Argentina, Prov. Salta, Depto. Rosario de Lerma, quebrada del Toro, 1 Km. al O de Campo Quijano. P. S. Hoc 281 y 282 (BAFC)

Phaseolus lunatus L. var. *sylvester* Baudet

Colombia, Magdalena, AF115175 (GenBank)

Argentina, Prov. Jujuy, Depto. Ledesma, Río Negro I y Ruta 34 de Jujuy a Fraile Pintado. R. A. Palacios 1210 (BAFC)

Sección *Phaseoli*

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

Argentina, Prov. Jujuy, Depto. Capital, camino a Yala. R. A. Palacios 1010 (BAFC)

Argentina, Prov. Salta, Depto. Rosario de Lerma: 3.5 Km. del puente sobre el Río Rosario, camino a corralito, P. S. Hoc 349 (BAFC); 1.5 Km. del puente sobre el Río Rosario, camino a corralito, P. S. Hoc 347 (BAFC); 5 Km. del puente sobre el Río Rosario, camino a corralito, P. S. Hoc 359 y 360 (BAFC); a 10.5 Km. del puente 351 (BAFC); Quebrada del Toro, 1 Km. al O de Campo Quijano, P. S. Hoc 353 y 354 (BAFC).

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

Argentina, AF115166 (GenBank)

Vigna Savi

Subgénero *Lasiospron* (Benth.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

Vigna lasiocarpa (Mart. ex Benth.) Verdc.

Panamá, Prov. Los Santos, Pedasi-Tonosi, 5 Km. al NE del Vlle Río Tonosi. AY583522 (GenBank)

Argentina, Prov. Misiones, Depto. San Ignacio: San Ignacio, caminos al puerto, siguiendo por la bajada donde hay bañados, R. A. Palacios 1285 (BAFC); camino al puerto viejo, R. A. Palacios 1295 (BAFC).

Vigna longifolia (Benth.) Verdc.

México, AY583520 (GenBank)

Argentina, Prov. Corrientes, Depto. Paso de los Libres, 200 m al S del Hotel de Turismo, lomadas de arena rojiza. R. A. Palacios 1297 (BAFC).

Subgénero *Sigmoidotropis* (Piper) Verdc.

Vigna adenantha (G. Mey.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

México, AY583526 (GenBank)

Argentina, Prov. Jujuy, Depto. Ledesma, Río Negro I y Ruta 34 de Jujuy a Fraile Pintado. R. A. Palacios 1209 (BAFC)

Argentina, Prov. Chaco, Depto. San Fernando, Colonia Benítez, al lado del río hacia el pueblo. R. A. Palacios 896 (BAFC)

Argentina, Prov. Tucumán, Depto. Famaillá, camino a la quebrada del Río Lules. R. A. Palacios 1048 (BAFC)

Argentina, Prov. Corrientes, Depto. Gral. Alvear, 100 Km. al SE de Gobernador Virasoro, Río Aguapey, “Ombú Chico”, malezal a 1 Km. del río. R. A. Palacios 1092 (BAFC)

Argentina, Prov. Buenos Aires, Isla Talavera, puente Zárate – Brazo Largo. S. I. Drewes 507 (BAFC)

Vigna candida (Vell.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

Argentina, Prov. Misiones, Depto. San Ignacio, cantera a 6 Km. de San Ignacio, camino a Alberdi, R. A. Palacios 880 (BAFC). Depto. San Javier, camino de San Javier a Puerto Arenas, al costado del camino, R. A. Palacios 1288 y 1289 (BAFC).

Vigna caracalla (L.) Verdc.

México, Veracruz AF069124 (GenBank)

Argentina, Prov. Tucumán, Depto. Trancas, Camino a Hualinchay, pasando entrada a Colalao, R. A. Palacios 1351 (BAFC)

Argentina, Prov. Corrientes, Depto. Santo Tomé, Gobernador Virasoro, Estancia Las Marías, R. A. Palacios 1088 (BAFC)

Vigna peduncularis (Kunth) Fawc. & Rendle

México, Prov. Jalisco, AY583523 (GenBank)

Vigna peduncularis var. *clitorioides* (Mart. ex Benth.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

Argentina, Prov. Misiones, Depto. San Ignacio, cantera a 6 Km. de San Ignacio, camino a Alberdi, campo cerca del bosque, R. A. Palacios 881 (BAFC); camino hacia Oberá desde San Ignacio, parte alta con pastos, borde del camino, R. A. Palacios 1296 (BAFC). Depto. San Javier, aproximadamente 1 Km. al N de la bifurcación San Javier-Itacaruré-Pastizal y bañado al borde del camino, R. A. Palacios 1294 (BAFC).

Subgénero *Vigna*

Vigna luteola (Jacq.) Benth.

México, AY583519 (GenBank)

Argentina, Prov. Entre Ríos, Depto. Gualeguaychú: Ceibas, borde de Ruta 12 hacia Brazo Largo, R. A. Palacios 1300 (BAFC); Predelta, próximo a Ceibal, R. A. Palacios 1378 (BAFC).

Argentina, Prov. Buenos Aires, Delta, canal Las Rosas entre Río Lujan y Paraná de las Palmas. R. A. Palacios 956 (BAFC)

Dolichopsis Hassl.

Dolichopsis paraguariensis Hassl.

Paraguay, Depto. Presidente Hayes, 66 Km. al este de Pozo Colorado, R. A. Palacios 1513 (BAFC)

Argentina, Prov. Corrientes, AY508744 (GenBank)

Dolichopsis ligulata (Piper) A. Delgado

Bolivia, AY508743, (GenBank)

Mysanthus GP Lewis & A. Delgado.

Mysanthus uleanus (Harms) G.P. Lewis & A. Delgado
Brasil, AF069125 (GenBank)

Ramirezella Rose

Ramirezella micrantha Delgado & Ochotorena Booth
México, Jalisco, AF115139 (GenBank)

Strophostyles Elliot

Strophostyles umbellata (Willd.) Britton
Estados Unidos, Carolina del Sur, AF069115 (GenBank)

Strophostyles helvula (L.) Elliot
Estados Unidos, Texas, AF115137 (GenBank)

Para el análisis filogenético molecular de la subtribu Phaseolinae y de sus géneros, se analizaron secuencias del ADN nuclear. Además de las mencionadas anteriormente, se utilizaron las secuencias depositadas en el GenBank, cuya lista aparece en la Tabla 1 (pág. 39) y Tabla 2 (pág. 42).

TABLA 1

Otras especies de la subtribu Phaseolinae cuyos datos fueron obtenidos del GenBank. Las subdivisiones de *Phaseolus* son según Freytag & Debouck (2002), y las de *Vigna* siguen a Maréchal *et al.* (1978)

GÉNERO	SUBGÉNERO (SECCIÓN)	ESPECIE	Nº GENBANK	PAÍS DE ORIGEN	
<i>Dipogon</i>		<i>D. lignosus</i>	AY583515	Cultivada	
<i>Dolichos</i>		<i>D. trilobus</i>	AY583525	Arabia Saudita	
<i>Lablab</i>		<i>L. purpureus</i>	AY583516	Estados Unidos	
<i>Macrotyloma</i>		<i>M. uniflorum</i>	AY583527	Australia	
<i>Oxyrhynchus</i>		<i>O. trinervius</i> <i>O. volubilis</i>	AF115135 AF069114	México México	
<i>Phaseolus</i>	(Acutifoli) (Brevilegumeni)	<i>P. acutifolius</i>	AF069126	México	
		<i>P. oligospermus</i>	AF115234	México	
		<i>P. tuerckheimii</i>	AF115248	México	
	(Coccinei)	<i>P. coccineus</i>	AF115160	México	
		(Digitati)	<i>P. neglectus</i>	AF115236	México
			(Falcati)	<i>P. leptostachyus</i>	AF115204
	(Minkelersia)	<i>P. micranthus</i>	AF115208	México	
		<i>P. macvaughii</i>	AF115200	México	
		<i>P. pluriflorus</i>	AF115214	México	
		<i>P. nelsonii</i>	AF115212	México	
		<i>P. tenellus</i>	AF115219	México	
		<i>P. parvulus</i>	AF115211	México	
		<i>P. plagiocylis</i>	AF115215	México	
		<i>P. amblyosepalus</i>	AF115218	México	
		<i>P. perplexus</i>	AF115221	México	
		<i>P. pauciflorus</i>	AF115216	México	
		(Paniculati)	<i>P. lunatus</i>	AF115175	Colombia
			<i>P. bolivianus</i>	AF115181	Perú
			<i>P. pachyrhizoides</i>	AF115178	Perú
			<i>P. polystachyus</i>	AF115196	México
			<i>P. salicifolius</i>	AF115182	México
	<i>P. jaliscanus</i>		AF115199	México	
	<i>P. sonorensis</i>		AF115183	México	
	<i>P. xolocotzii</i>		AF115247	México	
	<i>P. marechalii</i>		AF115198	México	
	<i>P. juquilensis</i>		AF115192	México	
	(Pedicellati)	<i>P. lignosus</i>	AF115177	Bermudas	
		<i>P. mollis</i>	AF115170	Ecuador	
		<i>P. sinuatus</i>	AF115194	EE.UU.	
		<i>P. smilacifolius</i>	AF115193	EE.UU.	
		<i>P. pedicellatus</i>	AF115239	México	
		<i>P. oaxacanus</i>	AF115243	México	
		<i>P. grayanus</i>	AF115241	México	
(Phaseoli)		<i>P. costaricensis</i>	AF115147	Costa Rica	
		<i>P. albescens</i>	AF115152	México	
(Rugosi)		<i>P. polyanthus</i>	AF115151	Perú	
	<i>P. microcarpus</i>	AF115210	México		
	<i>P. angustissimus</i>	AF115208	EE.UU.		
(Xantotricha)	<i>P. filiformis</i>	AF115207	México		
	<i>P. hintonii</i>	AF115226	México		
	<i>P. xantotrichus</i>	AF115225	Guatemala		
	<i>P. zimapanensis</i>	AF115230	México		
Sin sección asignada	<i>P. glabellus</i>	AF115244	México		
	<i>P. ritensis</i>	AF115185	México		

TABLA 1 (Continuación)

GÉNERO	SUBGÉNERO (SECCIÓN)	ESPECIE	Nº GENBANK	PAÍS DE ORIGEN
<i>Physostigma</i>		<i>P. venenosum</i>	AY583517	Ghana
<i>Ramirezella</i>		<i>R. strobilophora</i>	AF069120	México
<i>Sphenostylis</i>		<i>S. angustifolia</i>	AY583502	Sudáfrica
<i>Strophostyles</i>		<i>S. leiosperma</i>	AY508806	EE.UU.
<i>Vigna</i>	<i>Vigna</i> (<i>Vigna</i>)	<i>V. oblongifolia</i>	Y19424-Y19444	Kenya
		<i>V. parviflora</i>	Y19464	India
		<i>V. kirkii</i>	Y19418-Y19436	Zaire
		<i>V. racemosa</i>	Y19414-Y19433	Zaire
		<i>V. hosei</i>	Y19409-Y19435	Australia
		<i>V. multinervis</i>	Y19419-Y19437	C. Marfil
		<i>V. membranacea</i>	Y19420-Y19452	Etiopía
		<i>V. unguiculata</i>	AY583518	Kenya
	<i>Sigmoidotropis</i>	<i>V. speciosa</i>	Y19455-Y19470	Brasil
		<i>V. linearis</i>	AF069123	México
		<i>V. gentryi</i>	AF069118	México
	<i>Plectotropis</i>	<i>V. vexillata</i>	Y19405-Y19441	Sudáfrica
		<i>V. lobatifolia</i>	Y19406-Y19465	Namibia
	<i>Ceratotropis</i>	<i>V. radiata</i>	Y19422-Y19438	India
		<i>V. sublobata</i>	AB059855 AB060105	India
		<i>V. glabrescens</i>	Y19408-Y19448	Filipinas
		<i>V. umbellata</i>	Y19417-Y19434	India
		<i>V. trilobata</i>	Y19429-Y19439	India
		<i>V. minima</i>	Y19410-Y19449	Tailandia
		<i>V. mungo</i>	Y19411-Y19450	India
<i>V. silvestris</i>		Y19412-Y19460	India	
<i>V. angularis</i>		Y19426-Y19462	Japón	
<i>V. aconitifolia</i>		Y18551-Y19431	India	
<i>Haydonia</i>	<i>V. triphylla</i>	Y19413-Y19451	Zaire	
Especie no asignada	<i>V. populnea</i>	AF115136	México	
<i>Wajira</i>		<i>W. praecox</i>	AY583514	Kenya

TABLA 2

Especies utilizadas como grupo externo. Se indican entre paréntesis los números correspondientes a las secuencias de ADN de cloroplasto. El resto corresponde a ADN nuclear.

TRIBU	SUBTRIBU	ESPECIE	Nº GENBANK	PAÍS DE ORIGEN
<i>Phaseoleae</i>	<i>Clitoriinae</i>	<i>Clitoria ternatea</i>	AF467038	Brasil
	<i>Diocleinae</i>	<i>Galactia striata</i>	AF467049	R. Dominicana
		<i>Pachyrhizus erosus</i>	AY293846	Brasil
	<i>Erythrinae</i>	<i>Apios americana</i>	AF467019	EE. Unidos
	<i>Glycininae</i>	<i>Glycine max</i>	U60551	Cultivada
	<i>Ophrestiinae</i>	<i>Ophrestia radicata</i>	AF467484	Zambia
<i>Abreae</i>		<i>Abrus precatorius</i>	AF467015	Taiwan
<i>Desmodieae</i>		<i>Brya ebenus</i>	AF068142	Cuba
<i>Galegeae</i>		<i>Caragana</i>	AY626915	China
		<i>microphylla</i>	(AY633701)	China
<i>Genisteae</i>		<i>Lupinus</i>	AF007476	Brasil
		<i>paraguariensis</i>	(AF538709)	Brasil
		<i>Chamaespartium</i>	AF443630	Cultivada
		<i>sagittale</i>	(AF538711)	Cultivada
<i>Indigoferae</i>		<i>Indigofera</i>	AF521769	Cultivada
		<i>heterantha</i>		
<i>Milletieae</i>		<i>Milletia thonningii</i>	AF467481	Ghana
<i>Trifolieae</i>		<i>Medicago lupulina</i>	U50865-6	EE. Unidos

MÉTODOS

1- SECUENCIACIÓN DE ADN

1.1- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL

Para la obtención del ADN genómico total se pusieron a germinar semillas en cajas de Petri a temperatura ambiente, en una mesada cercana a una ventana de manera de recibir la luz solar. Para la secuenciación de regiones de ADN nuclear y de ADN de cloroplasto, se utilizó el mismo protocolo de extracción con CTAB, siguiendo a Milligan (1998). Las composiciones de los reactivos utilizados se detallan en el Apéndice A (pág. 123).

Se molieron las hojas cotiledonares en nitrógeno líquido. Luego, la molienda fue colocada en el buffer de extracción e incubada a 60° C por 1 hora, mezclando cada 15 minutos. Se centrifugó la muestra por 5 minutos a 13000 rpm.

El sobrenadante fue pasado a un tubo limpio, al cual se le agregó cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó el tiempo necesario hasta obtener dos fases separadas. La fase superior fue pipeteada a nuevos tubos.

Se agregaron ½ volumen NaCl 5M e isopropanol a 40%, dejando reposar la mezcla 20 minutos a -20°C. Se centrifugó 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se agregó Alcohol 70% para lavar el precipitado. Luego se volvió a centrifugar por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó el tubo invirtiéndolo sobre un papel secante, asegurándose que no queden trazas de alcohol, ya que esto podría afectar la posterior amplificación.

Una vez seco, se le agregó al extracto buffer TE, se resuspendió el ADN, y se lo dejó reposar en heladera toda la noche.

Al día siguiente, se agregó 1 ul de RNAsa e incubó a 37°C por 1 hora, para eliminar trazas de ARN que dificultarían la amplificación.

1.2- CUANTIFICACIÓN

Para cuantificar la cantidad de ADN extraído y la calidad del mismo, se corrieron las muestras en un gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, por 20 minutos. Para poder sembrar las muestras, se agregaron 2 ul de loading buffer.

Luego, el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador UV. Por comparación con un marcador Lambda HindIII/EcoRI (Productos Biológicos, Universidad de Quilmes), se cuantificó la cantidad de ADN obtenido.

1.3- AMPLIFICACIÓN

1.3.a- ESPACIADOR TRANSCRIPTO INTERNO DEL ADN RIBOSOMAL (ITS-1 Y 2)

Esta región del ADN nuclear forma parte del transcrito del ADN ribosomal, pero no es incorporado en los ribosomas. Tuvo una amplia difusión para análisis filogenéticos, ya que los “primers” diseñados por White *et al.* (1990) pueden ser usados en casi todos los organismos vegetales, además de los hongos, para los que fueron diseñados en primer lugar.

La Figura 1 muestra un esquema de la región, y el lugar de hibridación de los primers de amplificación.

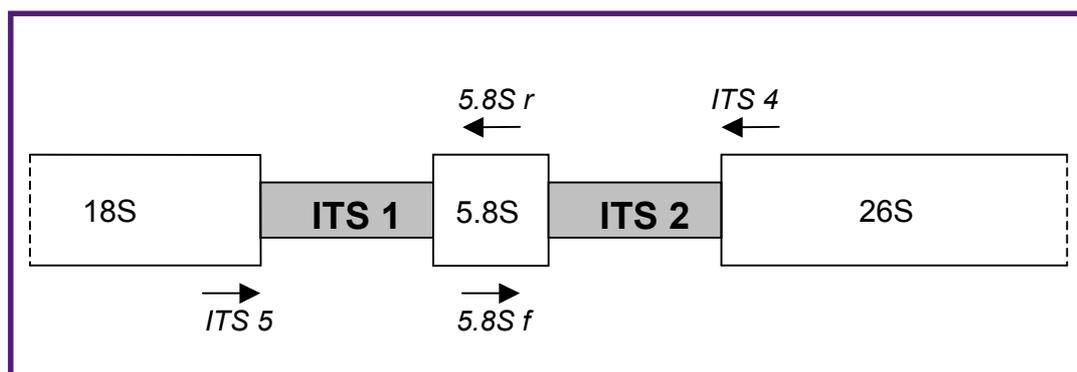


FIGURA 1

Esquema de la región repetida del ADN nuclear, mostrando los espaciadores ITS-1 e ITS-2, y los primers de amplificación utilizados (White *et al.*, 1990).

Primers:

ITS-5: 5' GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G 3'

ITS-4: 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'

5.8S f: 5' GCT GCG TTC TTC ATC G 3'

5.8S r: 5' TCG ATG AAG AAC GCA GC 3'

Protocolo utilizado: se amplificaron entre 30 a 80 ng. de ADN en una mezcla de reacción conteniendo 0.225 mM dNTP, 10 % Buffer de amplificación, 0.8 mM Cl₂Mg, 5 x 10⁻⁷ mM primers, 0.5 unidades Taq Polimerasa (Invitrogen).

Ciclo de amplificación: 94° C por 4 minutos, 30 ciclos de 30'' 94° C, 1' 58° C y 1' 72° C, ciclo final de 7' a 72° C.

1.3.b- REGIÓN INTERGÉNICA TRNL-TRNF

Las regiones no codificantes del ADN de cloroplasto tienen un gran potencial filogenético (Soltis & Soltis, 1998). Entre ellas, el espaciador que se encuentra entre el exón del gen *trnL* (UAA) y el gen *trnF* (GAA) ha tenido un gran crecimiento en cuanto a su aplicación sistemática en los últimos años. La figura 2 muestra un esquema del genoma del cloroplasto, junto con las regiones de amplificación utilizadas para obtener el IGS *trnL-trnF* (diseñadas por Gielly & Taberlet, 1994). Éste se encuentra en la región grande de copia única.

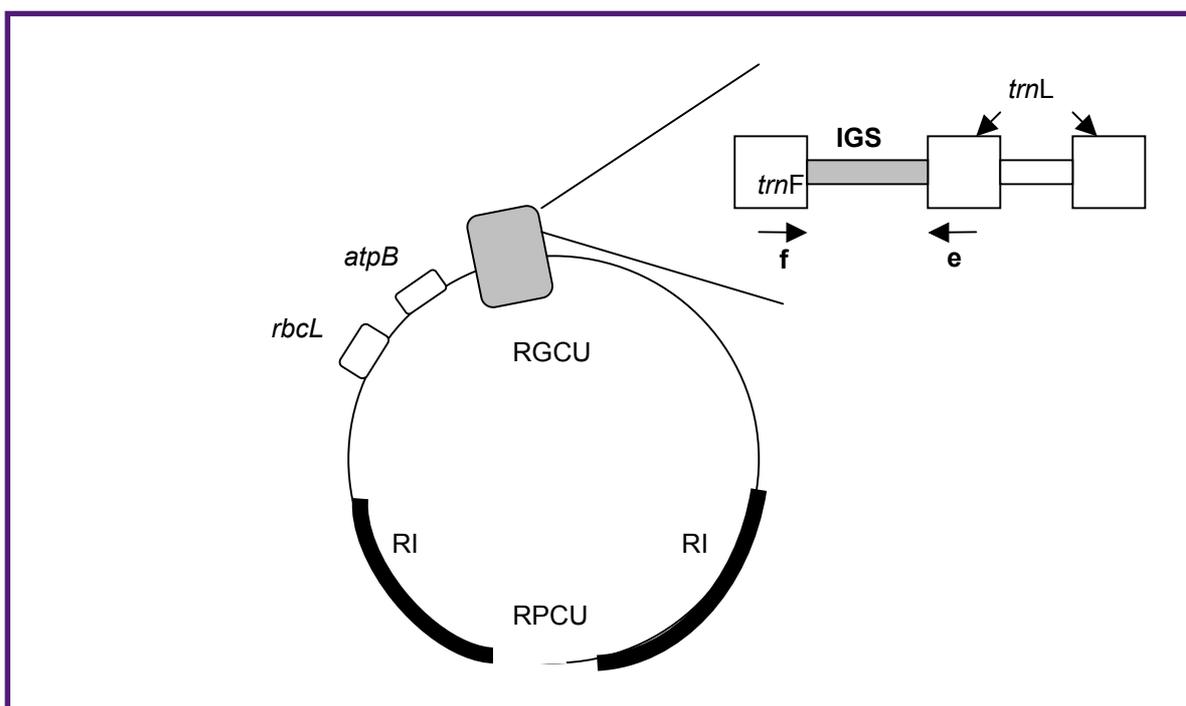


FIGURA 2

Esquema del genoma del ADN de cloroplasto, indicando la región analizada. Las flechas indican la posición de hibridación de los primers (Gielly & Taberlet, 1994).

RI: repetición invertida; RGPU: región grande de copia única; RPCU: región pequeña de copia única.

Primers:

e: 5' GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC 3'

f: 5' ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG 3'

Protocolo utilizado: se amplificaron entre 30 a 80 ng. de ADN en una mezcla de reacción que contenía 0.200 mM dNTP, 10 % Buffer de amplificación, 2.5 mM Cl_2Mg , 1 uM de cada primer, 0,5 unidades Taq polimerasa (Invitrogen).

Ciclo de amplificación: un ciclo inicial de 94° C por 150 segundos, 30 ciclos de 1' 94° C, 45'' 52° C y 1' 72° C, y un ciclo final de 4' a 72° C.

Todas las amplificaciones fueron llevadas a cabo en termocicladores provistos por la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

1.4- PURIFICACIÓN

Finalizadas las amplificaciones, se corrió una alícuota de cada muestra para comprobar la presencia de producto. En los casos en donde la PCR fue efectiva, se acumularon entre 200 a 350 μ l para la purificación. El total de producto amplificado fue sembrado en geles de agarosa 2.5% en buffer TE. La banda de ADN visualizada en el gel fue removida y colocada en un tubo Eppendorf, que luego fue guardado a -20° C hasta el momento de la purificación. Luego se siguieron las instrucciones del protocolo establecido por el kit de purificación de Qiagen.

Finalizado los pasos de purificación, se cuantificó y constató la pureza de cada muestra, en geles de agarosa 1% en buffer TE. Si la muestra resultó adecuada para secuenciar, se la liofilizó y se la reservó a temperatura ambiente en oscuridad hasta el momento del envío al servicio de secuenciación.

1.5- SECUENCIACIÓN

Las muestras liofilizadas fueron enviadas a las unidades de secuenciación de la Universidad de Alcalá (España) y a la empresa MacroGen (Corea del Sur). Los primers de secuenciación fueron los mismos que los de amplificación.

2- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SEMINALES

La técnica utilizada fue la de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) vertical, en un sistema discontinuo de buffers, según Laemmli (1970). La corrida se realizó en condiciones desnaturizantes, usando para ello dodecil sulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico que desnaturiza las proteínas al envolver al esqueleto polipeptídico. El SDS le confiere una carga negativa al polipéptido proporcional a su longitud, por lo que la migración de las moléculas se da en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico, y su movimiento está determinado por el peso molecular de las mismas.

2.1-EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS SEMINALES

Las proteínas fueron extraídas en una solución de ClNa, por lo que se obtuvieron proteínas solubles en agua (albúminas) y en sal (globulinas). Las semillas se molieron en un mortero de porcelana, y la molienda se mezcló con ClNa 0.5 M. Para 100 mg. de muestra se usó 0.4 ml. de solución salina. La mezcla se dejó reposar por dos horas a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 10 minutos a 10000 RPM, y el sobrenadante fue mezclado con igual volumen de buffer de tratamiento. La mezcla se incubó a 100° C por 2 minutos.

2.2-CORRIDA ELECTROFORÉTICA

Para la corrida electroforética se utilizó una cuba vertical modelo Protean II xi Cell, marca BioRad. Una alícuota de 100 ul de cada muestra fue sembrada en cada una de las muescas del gel dejadas por el peine. Para el gel separador se utilizó una concentración de poliacrilamida de 15% y 4,5% para el concentrador. La composición de los buffers se detalla en el Apéndice A (pág. 123).

La corrida electroforética fue conducida durante 3 a 5 horas a 40 mA y 120 V, o hasta que el indicador de frente señaló una migración de 15 cm desde el punto de siembra. Finalizada la corrida, los geles fueron teñidos con una solución de Azul de Coomasie para la visualización de las bandas. 

ANÁLISIS NUMÉRICO DE LOS DATOS

CODIFICACIÓN DE CARACTERES

Caracteres no moleculares: los caracteres morfológicos que se analizaron en este trabajo han sido obtenidos y revisados de la literatura, principalmente de los trabajos de Delgado Salinas *et al.* (1999) y de Espert & Drewes (2004). El análisis morfológico incluyó características vegetativas, florales y del fruto, palinológicas y ecológicas. Todos los caracteres fueron tratados como no aditivos o desordenados, es decir, que el número de pasos entre los distintos estados es siempre 1. Los caracteres, las respectivas codificaciones de sus estados y la matriz morfológica construida se detallan en el Apéndice B (pág. 124).

Caracteres de proteínas seminales: las nuevas corridas electroforéticas fueron conducidas en el presente análisis, para obtener los patrones polipeptídicos. Cada especie tiene un patrón de bandas característico, el cual es comparable con el de otras especies. Éstos se ven como conjuntos de bandas de color azul intenso, que corresponden a los diversos polipéptidos que han tomado distintas posiciones en el gel, por haber sido sujetos a una diferencia de potencial eléctrico. Cada banda del electroforegrama corresponde a por lo menos un polipéptido. Las bandas proteicas fueron identificadas y numeradas en orden creciente, comenzando por la fracción de menor movilidad. Se estableció un patrón de presencia/ausencia de bandas para cada especie, considerándose como presentes las bandas que se encontraron en más del 5% de los individuos, en aquellos casos en que se encontró variabilidad individual. No se consideraron para la confección de los patrones aquellas bandas que no pudieron ser inequívocamente identificadas. Con el fin de establecer la identidad de las bandas, se realizaron numerosas corridas para comprobar si las mismas aparecían siempre a igual distancia del lugar de siembra. Parte de los datos han sido publicados en Espert & Burghardt (2003).

Cada banda en el electroforegrama constituyó un carácter. Los caracteres presentan dos posibles estados, presencia o ausencia. La matriz elaborada se presenta en el Apéndice B (pág. 124).

Caracteres de secuencias de ADN: antes de comenzar el análisis, las secuencias obtenidas fueron comparadas con bases de datos de secuencias conocidas, para evitar la

presencia de contaminantes o de amplificación inespecífica. Esto se llevó a cabo con la herramienta Blast, a disposición de cualquier usuario en la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

Para determinar la homología primaria de los datos moleculares, se realizó el alineamiento de las secuencias con el programa Dialign (Morgenstern *et al.*, 1998). El programa utiliza un algoritmo que detecta similitudes locales, a pesar de que éstas estén separadas por regiones de secuencia no relacionadas, grandes o cortas, lo cual simula los principios básicos de la evolución de secuencias. Compara segmentos completos, y no residuos únicos. Los alineamientos están compuestos por pares de segmentos sin gaps, llamadas diagonales. El programa busca las diagonales que cumplan ciertos criterios de consistencia, como ser que no haya conflictos ni entrecruzamientos entre los residuos y asigna peso a cada diagonal posible. Luego busca una colección consistente de diagonales que maximicen el peso. Los gaps no son considerados al asignar el costo del alineamiento.

Para un alineamiento múltiple, el programa primero forma todos los pares de alineamientos óptimos. Luego agrupan las diagonales según sus pesos y según su solapamiento, y se prefieren regiones con más de un par de secuencias involucradas. La lista resultante se usa para un alineamiento múltiple, comenzando por la diagonal de peso máximo. Luego se chequea la consistencia de esta diagonal con la siguiente de la lista, y si es consistente se agrega al alineamiento. Esto se repite hasta utilizar todas las diagonales. Finalmente, el programa inserta los gaps.

Al programa Dialign se le puede especificar un valor de umbral tal que los pesos menores a éste sean ignorados, asegurándose así que regiones de poca similitud no sean examinadas. Se realizaron distintos alineamientos variando el valor, y observando su influencia en las topologías resultantes. Los valores utilizados fueron de 0, donde no hay discriminación entre regiones de poca o mucha similitud, 5 y 10, donde la discriminación es máxima.

La edición de secuencias fue realizada usando el programa Bioedit (Hall, 1999).

ESTUDIO DE LAS REGIONES ITS

Si bien en Leguminosas todavía no hay registros de la presencia de pseudogenes de ITS, en el presente trabajo se llevaron a cabo todas las pruebas para evitar este inconveniente. Para evaluar la funcionalidad de estas regiones y analizar la probable presencia de parálogos, se hicieron comparaciones del largo de las secuencias y del contenido G+C. Además, se buscaron regiones conservadas, como la “Angiosperm Universal Core” (Liu & Schardl, 1994), en el ITS-1, que consiste en la secuencia: GGCRY-(n)₄ 7-GYGYCAAGGAA. El ITS-2 fue examinado para encontrar los dominios conservados C1-C6 y los variables V1-V6 (según Hershkovitz & Zimmer, 1996).

Las estructuras secundarias de los transcritos de RNA ITS-1 y del ITS-2 fueron estimadas con el programa RnaStructure (Mathews *et al.*, 1996-2002). La temperatura de plegamiento fue de 37°C, y las búsquedas se realizaron dentro de un intervalo del 5% del óptimo termodinámico. Las estructuras estimadas fueron visualizadas con el programa RnaViz 2.0 (De Rijk *et al.*, 2003).

La divergencia genética de las secuencias de las regiones ITS en el género *Macroptilium* y en algunas especies de *Phaseolus*, fueron calculadas mediante el programa Dnadist (Felsenstein, 1986-1993), utilizando el modelo evolutivo de Kimura 2 parámetros. Este modelo se basa en la observación de que las tasas de ocurrencia de las transiciones y las transversiones son distintas, por lo que crea una matriz de dos parámetros con probabilidades distintas (Page & Holmes, 1998).

ANÁLISIS CLADÍSTICO

Se examinaron distintas estrategias de búsqueda de árboles, todas basadas en el criterio de la parsimonia, con el objetivo de conseguir filogenias confiables y sustentadas por la mayor cantidad de datos que se puedan disponer. Se analizaron los datos morfológicos, bioquímicos y moleculares en conjunto y en forma separada, tanto con pesos iguales como variando los mismos.

Búsquedas: para encontrar los árboles más parsimoniosos, se utilizaron los programas TNT (Goloboff *et al.*, 2003) y POY (Wheeler & Gladstein, 2000).

Búsquedas realizadas en TNT: las matrices alineadas y las no nucleotídicas fueron analizadas con el programa TNT, con el que se hicieron búsquedas con pesos iguales y con pesos implicados. En ambos casos, la estrategia de búsqueda utilizada fue la siguiente:

- I. Combinación de Búsqueda Sectorial y Fusión de Árboles (Sectorial Search y Tree-Fusing, en TNT). La primera realiza un árbol de Wagner seguido de un intercambio de ramas (TBR), en donde se eligen sectores del árbol al azar, creándose un dataset reducido. Se siguen permutando las ramas, hasta que encuentra una configuración mejor, luego de lo cual inserta esta configuración en el árbol original y se elige otro sector. Esto prosigue hasta haber cubierto toda la topología. La Fusión de Árboles consiste en obtener varios árboles partiendo de un árbol de Wagner seguido de TBR, con ellos se construye un consenso estricto y se evalúan todos los intercambios de grupos presentes en este consenso. Sólo se retienen los que mejoren el largo del árbol. Con este primer paso obtenemos uno o varios árboles óptimos.
- II. Combinación de Ratchet y Fusión de Árboles a partir de los árboles obtenidos en el paso anterior. La estrategia ratchet (se puede traducir como de piñón o matraca), implementada por Nixon (1999), consiste en reasignar pesos en forma aleatoria, calcular nuevos árboles óptimos, resetear los pesos, y si se encuentra un árbol más corto se reserva y se sigue con otra ronda de asignación de pesos. Esta exploración permite evitar el conflicto de caracteres, causante del problema de las islas. En ambos casos, los parámetros usados fueron los implementados por TNT por defecto. Este paso se repite dos o más veces, hasta observar que la longitud de los árboles se

estabilice.

- III. En los casos en donde el resultado de las búsquedas arrojó más de un árbol más parsimonioso, se realizó un cladograma de consenso estricto. Sobre éste se calcularon los Índices de Consistencia y de Retención.
- IV. Por último se calcularon los apoyos de Bremer, buscando árboles hasta 10 pasos más largos que el óptimo (comando de TNT: sub 10; mult; bb=fillonly; bsup;). También se calcularon los valores Jackknife, realizando 1000 pseudoréplicas, obteniendo los árboles más parsimoniosos a partir de éstas y calculando la frecuencia de aparición de los nodos en el total de cladogramas obtenidos.

Cuando se hicieron búsquedas con pesos implicados, se le indicó al programa la concavidad, y luego se comenzó por el paso I. Se probaron varias concavidades, para observar su influencia en la topología resultante.

Para analizar la posible subdivisión del género *Macroptilium* en las secciones *Macroptilium* y *Microcochle*, sobre las matrices que no soportaban la monofilia de una o de ambas secciones se realizó una búsqueda heurística forzando ésta última. Luego se compararon los largos o los ajustes de los árboles obtenidos sin forzar la monofilia de las secciones contra los forzados.

Búsquedas realizadas en POY: implementa varios procedimientos heurísticos para buscar el o los árboles que tengan un costo mínimo de edición para los datos observados. En el caso de datos morfológicos, el costo de edición es el largo de cada carácter en el árbol (De Laet & Wheeler, 2003). El programa permite la optimización directa, evitando así la manipulación de las secuencias antes del análisis. Además, las inserciones, deleciones y sustituciones nucleotídicas son incorporadas al proceso de optimización, y son minimizadas para cada árbol. POY selecciona el árbol que requiera el menor número de cambios que se ajusten a las secuencias originales (Aagesen *et al.*, 2005). Se exploraron distintas combinaciones de costos para gaps, transiciones y transversiones, y se compararon las topologías resultantes. La siguiente estrategia de búsqueda fue la utilizada: -replicates 10 -norandomizeoutgroup -tbr -stopat 4 -minstop 10 -maxtrees 5. Esta línea de comando le indica al programa que utilice el primer taxon como grupo externo funcional. El programa construye un árbol de Wagner, le realiza un intercambio de ramas del tipo TBR reteniendo un máximo de 5 árboles, repitiendo esta operación 10

veces. Cuando el programa encuentra el largo óptimo 4 veces, la búsqueda se detiene, siempre y cuando un mínimo de 10 búsquedas se hayan realizado. Para evaluar el apoyo de los clados, se realizó el remuestreo Jackknife, mediante la siguiente línea de comando: - jackboot -replicates 100 -notbr.

Los árboles obtenidos fueron visualizados con el programa Winclada (Nixon, 2002). Cuando los árboles resultantes fueron más de uno, el mismo programa fue utilizado para calcular el consenso estricto. 

RESULTADOS

ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADN

Las secuencias de las regiones ITS-1, ITS-2 e IGS *trnL-trnF* fueron editadas y comparadas en la base de datos BLAST, para excluir la posibilidad de analizar secuencias de organismos contaminantes. En todos los casos, las búsquedas dieron como resultado alta similitud con especies de la misma subtribu que las analizadas.

Los límites de las tres regiones aquí analizadas fueron determinados por comparación con secuencias conocidas obtenidas de la base de datos GenBank.

Largo de secuencias

En Angiospermas, el largo de las secuencias de ITS varía entre 187 y 298 pb para la región ITS-1, y entre 187 y 252 pb para los ITS-2 (Baldwin *et al.*, 1995). La mayoría de las especies analizadas en el presente trabajo posee secuencias con el largo dentro del rango señalado (Tablas 3, 4 y 5; pág. 55, 56 y 59). La región ITS-1 resultó, en general, más larga que la ITS-2. Las únicas excepciones son las especies *Macrotyloma uniflorum* y *Sphenostylis angustifolia* (Tabla 4, pág. 56), que exceden el rango señalado para la región ITS-2, con un largo de 91 pb para la primera y de 270 pb para la última de ellas.

En el género *Macroptilium*, el rango de variación en la longitud de las dos regiones se ve acotado ya que el ITS-1 presenta una longitud entre 217 a 231 pb, y el ITS-2 entre 207 a 220 (Tabla 5, pág. 59).

El gen 5.8s presenta en casi todas las especies estudiadas 168 pb. Sólo algunas pocas especies de *Vigna* y del grupo externo presentan un largo de 169 pb. Asimismo, se observaron escasos o nulos cambios nucleotídicos. La gran conservación de este gen motivó su exclusión de los análisis.

En la Tabla 6 (pág. 60) se presentan las longitudes de las regiones IGS *trnL-trnF* del ADN de cloroplasto.

Contenido G+C

El contenido G+C observado en las especies aquí estudiadas, varía en promedio entre 54.5 y 62.4% (Tablas 3, 4 y 5, pág. 55, 56 y 59). En el género *Macroptilium*, la región ITS-1 presenta un contenido G+C de 62.4% en promedio, oscilando entre 56 y 66%, mientras que la ITS-2 varía entre 50 y 62%, con un promedio de 58.6% (Tabla 5, pág. 59). Ambos promedios no son significativamente diferentes ($p < 0.01$).

En el resto de las especies estudiadas de la subtribu Phaseolinae, se encontró que 15 de las 33 especies del género *Vigna*, cuyas secuencias fueron obtenidas del GenBank, presentan un contenido G+C menor que el observado en Angiospermas (Tabla 4, pág. 56). Esto mismo se observa en las especies *Physostigma venenosum*, *Phaseolus tenellus* y *P. nelsonii*. En el grupo externo, solo *Clitoria ternatea* tiene un contenido G+C por debajo del rango esperado (Tabla 3, pág. 55).

En la Tabla 6 (pág. 60) se indica el contenido G+C de la región IGS. En esta región se observa un mayor contenido de Adenina-Timina, siendo el contenido G+C menor al 30%.

TABLA 3
Características de las secuencias, parámetros termodinámicos y estructura secundaria de las regiones ITS de las especies del Grupo Externo analizadas.

ESPECIE	ITS-1				ITS-2		
	LARGO	% G+C	MODELO DE 6 HÉLICES	REGIÓN CONSERVADA	LARGO	% G+C	MODELO DE 4 HÉLICES
<i>Abrus precatorius</i>	235	54,04	Si (-79,6)	Si (21)	208	52,88	No (-71,6) ^o
<i>Apios americana</i>	233	62,66	Si (-101,9)	Si (21)	210	58,57	Si (-82,4)
<i>Brya ebenus</i>	232	52,5	No (-92,8)	Si (21)	214	64,49	Si (-88,8)
<i>Caragana microphylla</i>	229	57,64	Si (-98)	Si (21)	221	49,32	No (-68,9) ^o
<i>Chamaespartium sagittale</i>	231	57,58	Si (-87,5)	Si (21)	216	56,02	Si (-80,1)
<i>Clitoria ternatea</i>	230	47,39	No (-82,7)	Si (21)	208	47,12	No (-72,5) ^o
<i>Galactia striata</i>	227	51,98	No (-70,8)	Si (21)	214	56,54	No (-75,2)
<i>Glycine max</i>	215	61,4	No (-92,8)	Si (21)	209	56,94	No (-78,8) ^o
<i>Indigofera heterantha</i>	235	51,49	No (-89,9)*	Si (21)	213	45,07	Si (-70,9)
<i>Lupinus paraguariensis</i>	232	58,19	No (-84)	No (21)	217	58,99	Si (-82,3)
<i>Medicago lupulina</i>	233	48,93	No (-78,9)	Si (21)	217	46,54	Si (-67,6)
<i>Milletia thonningii</i>	228	58,33	No (-90,7)*	Si (21)	220	56,82	No (-75,7) ^o
<i>Ophrestia radicata</i>	224	57,59	No (-83,8)*	Si (21)	205	57,56	No (-84,5) ^o
<i>Pachyrhizus erosus</i>	260	56,15	No (-111,8)*	Si (21)	208	56,25	Si (-86,8)

*Estructuras con 5 o 7 hélices ^o Estructuras con 5 hélices

TABLA 4
Características de las secuencias, parámetros termodinámicos y estructura secundaria de las regiones ITS de las especies de la subtribu Phaseolinae analizadas.

ESPECIE	ITS-1				ITS-2		
	LARGO	% G+C	MODELO DE 6 HÉLICES	REGIÓN CONSERVADA	LARGO	% G+C	MODELO DE 4 HÉLICES
<i>Dipogon lignosus</i>	199	59,3	No (-77,4)	Si (21)	214	56,54	Si (-73,2)
<i>Dolichos trilobus</i>	206	59,22	No (-83,2)	Si (21)	213	60,09	Si (-87,8)
<i>Dolichopsis paraguariensis</i>	233	63,09	No (-103,8)	No (22)	207	58,45	No (-82)
<i>D. ligulata</i>	235	62,55	No (-96,4)	Si (22)	206	58,74	Si (-83,8)
<i>Lablab purpureus</i>	222	46,4	Si (-64,1)	No (21)	217	58,99	Si (-77,4)
<i>Macrotyloma uniflorum</i>	215	54,88	No (-77,8)	Si (21)	91	59,34	No (-26)
<i>Mysanthus uleanus</i>	224	55,8	No (-83,4)*	Si (21)	216	51,85	Si (-74,3)
<i>Oxyrhynchus trinervius</i>	241	57,68	No (-87,6)*	Si (21)	206	55,34	Si (-70,2)
<i>O. volubilis</i>	237	56,12	No (-88,1)	Si (21)	206	54,37	Si (-62,8)
<i>Phaseolus acutifolius</i>	262	64,89	No (-114,8)	No (21)	231	59,74	Si (-92,7)
<i>P. albescens</i>	267	63,67	No (-111,8)	Si (21)	242	56,61	Si (-98,6)
<i>P. amblyosepalus</i>	244	61,48	No (-108,1)*	Si (21)	241	54,77	Si (-89,7)
<i>P. angustisimus</i>	287	62,37	No (-117,8)	Si (21)	231	61,47	Si (-89,9)
<i>P. augusti</i>	245	62,45	No (-103,8)*	Si (21)	221	59,28	Si (-83,1)
<i>P. bolivianus</i>	248	63,31	No (-114,1)	Si (21)	224	59,38	Si (-83,1)
<i>P. coccineus</i>	270	62,22	No (-107,7)*	Si (21)	231	55,41	No (-81,7) ^o
<i>P. costaricensis</i>	271	65,31	No (-121,4)	Si (21)	237	57,38	Si (-93,2)
<i>P. filiformis</i>	292	66,78	No (-119,2)	Si (21)	240	61,67	No (-103,7) ^o
<i>P. glabellus</i>	237	63,71	No (-86,3)	Si (21)	237	59,92	No (-88,5) ^o
<i>P. grayanus</i>	218	60,09	No (-77,7)	Si (21)	234	58,12	No (-83,5)
<i>P. hintonii</i>	240	60	No (-98,8)*	Si (22)	235	55,32	Si (-81,8)
<i>P. jaliscanus</i>	247	62,35	No (-92,3)*	Si (21)	232	56,47	Si (-95,4)
<i>P. juquilensis</i>	246	62,6	No (-93,3)	No (21)	231	57,14	Si (-90,6)
<i>P. leptostachyus</i>	250	60,4	Si (-95,2)	Si (21)	232	56,03	Si (-91,3)
<i>P. lignosus</i>	250	63,2	No (-109,4)*	Si (21)	225	58,22	Si (-79,2)
<i>P. lunatus</i>	252	63,49	No (-110)*	Si (21)	225	59,11	Si (-85,4)
<i>P. macvaughii</i>	248	54,44	No (-99)*	Si (21)	230	56,52	Si (-89)
<i>P. marechalii</i>	245	62,04	No (-93,1)	Si (21)	232	56,47	Si (-87,4)
<i>P. micranthus</i>	250	60,8	No (-90,9)	Si (21)	232	56,03	Si (-84,8)
<i>P. microcarpus</i>	235	61,28	No (-100,5)	Si (21)	242	59,92	No (-100,2)
<i>P. mollis</i>	243	62,96	No (-109,6)*	Si (21)	225	57,78	Si (-90)
<i>P. neglectus</i>	212	60,85	No (-89,6)*	Si (21)	234	59,83	No (-89,7) ^o
<i>P. nelsonii</i>	218	46,79	No (-62,2)*	No ¹	234	54,7	Si (-75,9)
<i>P. oaxacanus</i>	229	62,45	No (-96,4)*	Si (21)	234	59,83	No (-85)
<i>P. oligospermus</i>	241	60,17	No (-103,6)*	Si (22)	233	58,37	No (-85)
<i>P. pachyrhizoides</i>	248	62,9	No (-106,2)*	Si (21)	221	59,28	Si (-84,7)
<i>P. parvulus</i>	241	60,17	No (-104)*	Si (21)	235	54,47	No (-90,6) ^o

*Estructuras con 5 o 7 hélices

^o Estructuras con 5 hélices

¹ Datos faltantes

TABLA 4 (continuación)

ESPECIE	ITS-1				ITS-2		
	Largo	% G+C	Modelo de 6 hélices	Región conservada	Largo	% G+C	Modelo de 4 hélices
<i>P. parvulus</i>	241	60,17	No (-104)*	Si (21)	235	54,47	No (-90,6) ^o
<i>P. pauciflorus</i>	240	59,58	No (-92,3)*	Si (21)	234	51,71	Si (-89,8)
<i>P. pedicellatus</i>	208	60,58	No (-87,6)*	Si (21)	234	59,4	Si (-85,9)
<i>P. perplexus</i>	249	61,85	No (-96,5)*	Si (21)	234	54,27	Si (-78,7)
<i>P. plagiocylis</i>	241	51,04	No (-65)*	No ¹	233	55,79	Si (-82,4)
<i>P. pluriflorus</i>	241	62,66	No (-106)*	Si (21)	240	53,75	Si (-96,5)
<i>P. polyanthus</i>	271	66,42	No (-120)	Si (21)	240	58,75	SI (-97)
<i>P. polystachyus</i>	246	62,6	No (-88,9)	Si (21)	232	56,9	Si (-88,2)
<i>P. ritensis</i>	245	60,82	No (-94,6)	Si (21)	233	56,22	SI (-89)
<i>P. salicifolius</i>	246	63,01	No (-89,1)	Si (21)	232	56,47	Si (-90,2)
<i>P. sinuatus</i>	246	61,79	No (-93)*	Si (21)	232	56,47	Si (-89,9)
<i>P. smilacifolius</i>	246	63,01	No (-88,9)	Si (21)	232	56,9	Si (-88,2)
<i>P. sonorensis</i>	245	61,22	No (-94,3)	Si (21)	232	56,9	Si (-93,7)
<i>P. tenellus</i>	247	46,15	No (-51,3)	Si (21)	235	54,47	No (-90,6)
<i>P. tuerckheimii</i>	242	61,57	No (-107,5)*	Si (22)	234	58,55	Si (-93,7)
<i>P. vulgaris</i>	261	59	No (-92,2)	Si (21)	231	57,58	Si (-89)
<i>P. xantotrichus</i>	238	60,08	No (-101)*	Si (22)	240	55,83	Si (-85)
<i>P. xolocotzii</i>	232	63,66	No (-91,3)*	Si (21)	232	56,47	Si (-90,2)
<i>P. zimapanensis</i>	238	59,24	No (-99,8)	Si (22)	234	54,7	Si (-78,3)
<i>Physostigma venenosum</i>	212	57,08	No (-62,5)	No	211	48,34	No (-54)
<i>Ramirezella micrantha</i>	218	62,84	No (-92,9)	Si (21)	214	58,41	Si (-84,9)
<i>R. strobilophora</i>	222	62,61	No (-91,4)	Si (21)	215	61,4	Si (-85,5)
<i>Sphenostylis angustifolia</i>	225	54,67	No (-85,5)*	Si (21)	270	56,67	No (-106,2) ^o
<i>Strophostyles helvula</i>	234	58,12	No (-91,4)*	Si (22)	220	54,09	Si (-83,1)
<i>S. leioperma</i>	234	56,84	No (-91,9)*	Si (22)	218	57,8	Si (-66,7)
<i>S. umbellata</i>	233	59,23	No (-98,7)	Si (22)	217	57,14	No (-83,6) ^o
<i>Vigna aconitifolia</i>	189	53,97	No (-58,9)	No	210	52,38	No (-72,2)
<i>V. adenantha</i>	241	62,24	No (-91,6)	Si (21)	213	62,91	Si (-85,9)
<i>V. angularis</i>	188	59,04	Si (-60,8)	No (20)	205	55,61	No (-70,9)
<i>V. candida</i>	239	63,6	No (-101,2)	Si (21)	216	53,7	Si (-67,6)
<i>V. caracalla</i>	221	62,44	No (-83,1)*	Si (21)	213	60,56	Si (-89,4)
<i>V. gentryi</i>	241	62,66	No (-87,6)	Si (21)	213	62,4	Si (-86,3)
<i>V. glabrescens</i>	189	58,2	No (-60,1)	No (20)	206	56,8	No (-72,9)
<i>V. hosei</i>	191	46,07	No (-51,2)	No (20)	219	44,29	No (-58,3)
<i>V. kirkii</i>	212	57,55	No (-70,2)	No (17)	211	56,87	No (-81,8)
<i>V. lasiocarpa</i>	191	46,6	No (-47,5)	No (20)	219	42,92	Si (-57,9)
<i>V. linearis</i>	230	56,96	No (-84,5)	Si (21)	214	54,67	Si (-80,1)
<i>V. lobatifolia</i>	197	50,76	No (-61,3)	No (20)	188	46,28	Si (-56,2)

*Estructuras con 5 o 7 hélices

^o Estructuras con 5 hélices¹ Datos faltantes

TABLA 4 (continuación)

ESPECIE	ITS-1				ITS-2		
	LARGO	% G+C	MODELO DE 6 HÉLICES	REGIÓN CONSERVADA	LARGO	% G+C	MODELO DE 4 HÉLICES
<i>V. lobatifolia</i>	197	50,76	No (-61,3)	No (20)	188	46,28	Si (-56,2)
<i>V. longifolia</i>	208	50,96	No (-71)	No (20)	209	46,41	Si (-66,7)
<i>V. luteola</i>	192	44,79	No (-49,5)	No (19)	215	44,65	Si (-65,9)
<i>V. membranacea</i>	203	45,32	No (-62,6)	No (20)	187	42,25	No (-48,7)
<i>V. minima</i>	190	60	No (-62,4)	No (20)	205	56,1	No (-74,1)
<i>V. multinervis</i>	204	43,14	No (-56,5)	No (19)	214	45,33	No (-62,3)
<i>V. mungo</i>	191	56,02	No (-64,5)	No (20)	211	58,77	No (-72,9)
<i>V. oblongifolia</i>	203	39,41	No (-44,5)	No (20)	215	42,79	Si (-61,8)
<i>V. parviflora</i>	204	39,71	No (-41)	No (20)	215	43,72	Si (-62)
<i>V. peduncularis</i>	237	53,59	No (-72,4)	Si (21)	213	45,07	No (-45,8)
<i>V. populnea</i>	235	57,45	No (-91)*	Si (21)	205	56,1	Si (-68,4)
<i>V. racemosa</i>	196	47,96	No (-57,2)*	No (20)	212	48,11	No (-59,8)
<i>V. radiata</i>	201	60,2	No (-81,4)	No (19)	218	58,72	No (-78,7)
<i>V. reticulata</i>	201	44,28	No (-60,7)	No (20)	190	44,74	No (-52,3)
<i>V. silvestris</i>	188	55,32	No (-62,9)	No (20)	211	58,77	No (-72,9)
<i>V. speciosa</i>	238	56,3	No (-86,6)*	Si (21)	212	50,47	Si (-78,5)
<i>V. sublobata</i>	205	60,98	No (-86,7)	No (19)	218	58,26	No (-76,4)
<i>V. trilobata</i>	187	54,01	No (-53,1)	No (19)	212	56,6	No (-74,2)
<i>V. triphylla</i>	204	48,53	No (-53,4)	No (19)	211	42,65	No (-54,2)
<i>V. umbellata</i>	188	58,51	No (-55,7)	No (19)	206	56,8	No (-72,1)
<i>V. unguiculata</i>	207	46,38	No (-61,4)	No (20)	212	45,28	Si (-71,4)
<i>V. vexillata</i>	210	52,86	No (-61,7)	No (20)	190	46,32	Si (-52,7)
<i>Wajira praecox</i>	215	58,14	No (-83,9)*	Si (21)	212	57,08	Si (-78,2)

*Estructuras con 5 o 7 hélices

° Estructuras con 5 hélices

¹ Datos faltantes

TABLA 5
Características de las secuencias, parámetros termodinámicos y estructura secundaria de las regiones ITS de las especies de *Macropodium* analizadas.

ESPECIE	ITS-1				ITS-2		
	LARGO	% G+C	MODELO DE 6 HÉLICES	REGIÓN CONSERVADA	LARGO	% G+C	MODELO DE 4 HÉLICES
<i>M. arenarium</i>	229	65,5	Si (-100,1)	Si (21)	207	61,84	Si (-78,2)
<i>M. atropurpureum</i>	226	60,62	Si (-91,8)	Si (21)	213	55,87	Si (-78,9)
<i>M. bracteatum</i>	226	57,96	Si (-99,7)	Si (21)	212	56,13	Si (-77,7)
<i>M. ecuatoriense</i>	226	60,62	Si (-91,8)	Si (21)	212	55,66	Si (-75,8)
<i>M. erythroloma</i>	227	58,15	Si (-82,2)	Si (21)	214	57,94	Si (-75,8)
<i>M. fraternum</i>	229	65,94	Si (-105,4)	Si (21)	207	60,87	No (-79,3) ^o
<i>M. gibbosifolium</i>	229	66,38	Si (-94,5)	Si (21)	207	59,9	Si (-78,2)
<i>M. gracile</i>	219	63,01	Si (-91,3)	Si (21)	212	60,85	Si (-80,5)
<i>M. lathyroides</i>	227	61,67	Si (-97,2)	Si (21)	208	59,62	No (-71,7) ^o
<i>M. longepedunculatum</i>	217	63,59	Si (-91,4)	Si (21)	212	60,85	Si (-80,5)
<i>M. panduratum</i>	227	62,12	Si (-97,3)	Si (21)	212	57,55	Si (-82,5)
<i>M. prostratum</i>	230	63,64	No (-102,2)*	Si (21)	207	61,35	Si (-74,8)
<i>M. psammodes</i>	230	65,65	Si (-99,3)	Si (21)	207	61,35	Si (-78,2)
<i>M. sabaraense</i>	225	56	Si (-72,9)	Si (21)	220	50,45	Si (-67,8)
<i>M. supinum</i>	231	64,5	Si (-87,4)	Si (21)	207	59,42	No (-78,7) ^o

*Estructuras con 5 o 7 hélices

^o Estructuras con 5 hélices

¹ Datos faltantes

TABLA 6
Características de las secuencias de la región IGS *trnL-trnF*.

ESPECIE	LARGO	% G+C
<i>Caragana microphylla</i>	432	31,25
<i>Chamaespartium sagittale</i>	350	24,29
<i>Lupinus paraguariensis</i>	400	25,25
<i>Phaseolus vulgaris</i>	484	27,07
<i>Macroptilium arenarium</i>	454	24,45
<i>M. atropurpureum</i>	472	29,24
<i>M. bracteatum</i>	404	24,5
<i>M. fraternum</i>	486	29,22
<i>M. gibbosifolium</i>	476	27,94
<i>M. lathyroides</i>	482	29,05
<i>M. longepedunculatum</i>	497	28,17
<i>M. panduratum</i>	482	27,8
<i>M. prostratum</i>	476	29,2
<i>M. psammodes</i>	466	27,9
<i>M. sabaraense</i>	476	27,94
<i>M. supinum</i>	498	28,71

Energía libre y estructura secundaria de las regiones ITS-1 e ITS-2

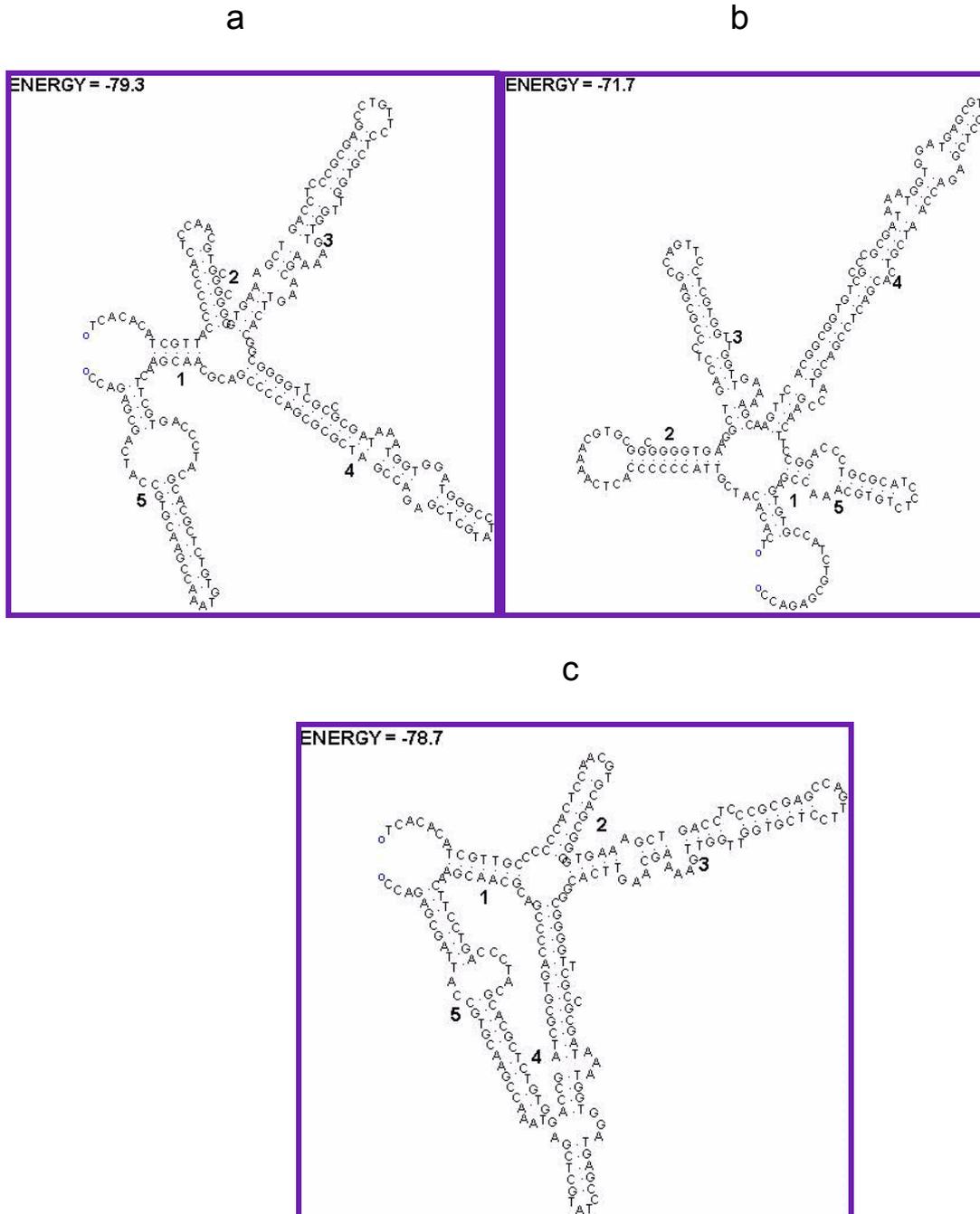
Las Tablas 3, 4 y 5 (pág. 55, 56 y 59) muestran los valores de energía libre de las estructuras secundarias de los transcritos de las regiones ITS-1 e ITS-2. Asimismo, se indica en las mismas tablas si cada región cumple con los modelos de estructura secundaria propuestos por Mayol & Rosselló (2001). La secuencia conservada “Angiosperm Universal Core” (Liu & Schardl, 1994), presente en la región ITS-1, está formada por los siguientes nucleótidos: GGCRY-(4 a 7 n)-GYGYCAAGGAA. La mayoría de las especies estudiadas muestran esta secuencia conservada, aunque varias de las especies de Phaseolinae, en su mayoría pertenecientes al género *Vigna*, presentan variaciones en esta región (Tabla 4, pág. 56). Todas las especies de *Macroptilium* poseen la secuencia conservada (Tabla 5, pág. 59).

El modelo de 6 hélices propuesto para la región ITS-1 pudo observarse en la mayoría de las especies del género *Macroptilium*. La única especie que no presenta este modelo de 6 hélices es *M. prostratum*, la cual presenta 7 (Fig. 3, pág.62). En cuanto al resto de las especies estudiadas, presentaron estructuras más estables de 5 o 7 hélices, a excepción del género *Vigna*, cuyas secuencias tienen una baja estabilidad termodinámica y una estructura secundaria altamente inestable.

Para la región ITS-2, el modelo de 4 hélices (Mai & Coleman, 1997) se observa en la mayor parte de las especies estudiadas. *M. fraternum*, *M. lathyroides* y *M. supinum* muestran 5 hélices en lugar de 4 (Fig. 4, pág. 63), al igual que muchas especies del grupo externo (ver Tabla 3, pág.55).

FIGURA 4

Modelo de la estructura secundaria de la región ITS-2 de las especies *Macropodium fraternum* (a), *M. lathyroides* (b) y *M. supinum* (c).



Alineamiento

Para determinar la homología primaria de los datos moleculares, se realizó el alineamiento de las secuencias con el programa DIALIGN (Morgenstern *et al.*, 1998). Luego de realizar los alineamientos con umbrales de 0, 5 y 10, se hizo una búsqueda heurística de cada matriz, y se observaron las topologías resultantes para decidir el parámetro de alineamiento a utilizar. Los árboles más resueltos fueron obtenidos con un umbral de 10. Además, las matrices alineadas con este valor arrojaron mayor número de sitios informativos. Las mismas pueden verse en el Apéndice B (pág. 124).

	LARGO (PB)	SITIOS INFORMATIVOS	PORCENTAJE DE SITIOS INFORMATIVOS
ITS-1 COMPLETA	653	296	45,33
ITS-2 COMPLETA	502	215	42,83
ITS-1 PHASEOLINAE	551	269	48,80
ITS-2 PHASEOLINAE	441	200	45,35
IGS <i>trnL-trnF</i>	607	132	22,57

TABLA 7
Sitios informativos de las matrices

Luego del alineamiento con un umbral de 10, se observaron los sitios que contienen información filogenética para cada región (Tabla 7, pág. 64). El porcentaje de sitios informativos es similar en las regiones ITS-1 e ITS-2, lo cual estaría revelando una tasa de evolución similar en ambas regiones. Esto indicaría que podrían estar sujetas a restricciones evolutivas en cuanto a su estructura y secuencia, debido a su función en la maduración del ARN ribosomal (Baldwin *et al.*, 1995).

Divergencia

Se calcularon los valores de divergencia genética entre las especies del género *Macroptilium* para las regiones genómicas analizadas. Dichos valores son similares para las regiones ITS, variando entre 0 a 0.365 para el ITS-1, y entre 0 a 0.221 para el ITS-2 (Tabla 8, pág. 66). En cambio, para la región IGS *trnL-trnF* el rango de variación es de 0.0193 a 0.1178 (Tabla 9, pág. 67). El promedio de divergencia para la región ITS-1 es de 0.203, el del ITS-2 es de 0.119, y para la región IGS del cloroplasto el promedio es 0.0571. Se resaltan en las mismas Tablas los bajos valores obtenidos entre algunas especies. Por ejemplo, la divergencia entre las especies *M. arenarium* y *M. psammodes* es

de 0.004 y 0.005 para cada una de las dos regiones nucleares, y entre *M. gracile* y *M. longepedunculatum* los valores son de 0.009 y 0.

ESPECIES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>M. arenarium (1)</i>	0	0,1446	0,1532	0,1313	0,1446	0,0328	0,0232	0,0884	0,1502	0,0884	0,1201	0,0573	0,0046	0,215	0,0374
<i>M. atropurpureum (2)</i>	0,1954	0	0,1238	0,0572	0,1259	0,1451	0,1331	0,123	0,1629	0,123	0,1122	0,1331	0,1446	0,1572	0,1276
<i>M. bracteatum (3)</i>	0,2315	0,1443	0	0,106	0,1344	0,1537	0,1309	0,127	0,1369	0,127	0,0853	0,1482	0,1532	0,1555	0,1309
<i>M. ecuadoriense (4)</i>	0,1954	0	0,1443	0	0,1084	0,1317	0,1201	0,1009	0,1433	0,1009	0,0801	0,13	0,1313	0,1195	0,1148
<i>M. erythroloma (5)</i>	0,2613	0,1272	0,2044	0,1272	0	0,1461	0,1395	0,1185	0,1339	0,1185	0,1025	0,1678	0,1446	0,1422	0,1507
<i>M. fraternum (6)</i>	0,03	0,2137	0,2315	0,2137	0,2692	0	0,028	0,099	0,1507	0,099	0,1259	0,0625	0,0281	0,2095	0,0327
<i>M. gibbosifolium (7)</i>	0,0211	0,2122	0,2255	0,2122	0,2613	0,0212	0	0,0779	0,1441	0,0779	0,0987	0,0425	0,0185	0,1955	0,0138
<i>M. gracile (8)</i>	0,2102	0,1345	0,2149	0,1345	0,2127	0,2116	0,2102	0	0,1161	0	0,0754	0,0881	0,0884	0,1838	0,0932
<i>M. lathyroides (9)</i>	0,2507	0,138	0,2589	0,138	0,146	0,2585	0,2566	0,1897	0	0,1161	0,1429	0,1497	0,1502	0,2021	0,1497
<i>M. longepedunculatum (10)</i>	0,2172	0,1234	0,2018	0,1234	0,1998	0,2188	0,2172	0,0088	0,1829	0	0,0754	0,0881	0,0884	0,1838	0,0932
<i>M. panduratum (11)</i>	0,2566	0,1431	0,2529	0,1431	0,1511	0,2645	0,2627	0,1954	0,0042	0,1885	0	0,1092	0,1201	0,1597	0,1039
<i>M. prostratum (12)</i>	0,0433	0,1844	0,2079	0,1844	0,2426	0,048	0,0477	0,2043	0,2263	0,2113	0,2321	0	0,0524	0,2206	0,0572
<i>M. psammodes (13)</i>	0,0042	0,1893	0,2247	0,1893	0,2544	0,0256	0,0168	0,2036	0,2439	0,2105	0,2498	0,0387	0	0,215	0,0326
<i>M. sabaraense (14)</i>	0,2452	0,1698	0,2145	0,1698	0,1723	0,2675	0,2655	0,276	0,2259	0,2617	0,2317	0,2391	0,2522	0	0,1832
<i>M. supinum (15)</i>	0,1042	0,2795	0,3178	0,2795	0,3356	0,1098	0,0947	0,2933	0,3579	0,3017	0,3648	0,1255	0,0992	0,3564	0

TABLA 8

Divergencia genética de las regiones ITS en las especies del género *Macroptilium*. La matriz inferior corresponde a la región ITS-1, y la superior a la región ITS-2. Se resaltan los valores de divergencia cercanos a 0.

ESPECIES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>M. arenarium</i> (1)	0											
<i>M. atropurpureum</i> (2)	0,0813	0										
<i>M. bracteatum</i> (3)	0,0529	0,0366	0									
<i>M. fraternum</i> (4)	0,0722	0,1104	0,0593	0								
<i>M. gibbosifolium</i> (5)	0,0731	0,058	0,0558	0,0599	0							
<i>M. lathyroides</i> (6)	0,1134	0,0588	0,0484	0,0948	0,0518	0						
<i>M. longepedunculatum</i> (7)	0,1178	0,0475	0,04	0,1105	0,0446	0,0621	0					
<i>M. panduratum</i> (8)	0,1073	0,0365	0,0313	0,0761	0,0286	0,0491	0,0443	0				
<i>M. prostratum</i> (9)	0,108	0,0496	0,0395	0,0593	0,0451	0,0524	0,0591	0,0498	0			
<i>M. psammodes</i> (10)	0,0269	0,0632	0,0559	0,0906	0,0319	0,0619	0,0651	0,0394	0,0449	0		
<i>M. sabaraense</i> (11)	0,0862	0,0553	0,0318	0,1112	0,0626	0,0624	0,0515	0,0339	0,0543	0,0655	0	
<i>M. supinum</i> (12)	0,0941	0,0542	0,0558	0,0753	0,0193	0,0742	0,0696	0,0479	0,0512	0,0287	0,056	0

TABLA 9

Divergencia genética de las regiones IGS *trnL-trnF* en las especies del género *Macropodium*. Se resaltan los valores de divergencia cercanos a 0.

ANÁLISIS CLADÍSTICO

Subtribu Phaseolinae

La matriz elaborada en base a secuencias de ADN nuclear, en particular de las regiones ITS-1 e ITS-2, contiene 125 taxones, de los cuales 14 pertenecen al grupo externo formado por especies de diferentes subtribus y tribus afines a Phaseolinae. Luego del alineamiento, se obtuvieron 1158 caracteres, de los cuales 512 resultaron con información filogenética; los 646 restantes fueron removidos del análisis. Se realizó una búsqueda con el programa TNT (Goloboff *et al.*, 2003) bajo pesos iguales y, dado que en general se observa que las transiciones, es decir, los cambios de una purina a otra purina, o de una pirimidina a otra pirimidina, son más comunes que las transversiones, que son los cambios de purinas a pirimidinas y viceversa (Page & Holmes, 1998), se realizó una segunda búsqueda con un costo de transición/transversión de 2/1. La tasa de sustitución diferencial ha sido observada principalmente en regiones génicas, sin embargo, se quiso comprobar si la aplicación de un costo diferencial puede afectar a la filogenia basada en una región no codificante, como lo es el ITS.

Bajos pesos iguales se obtuvieron 12 cladogramas óptimos de 5081 pasos, siendo el Índice de Consistencia (en adelante, IC) 0.241 y el Índice de Retención (en adelante, IR) de 0.67. En todos los cladogramas presentados en este trabajo, los valores de apoyo Jackknife y Bremer son indicados por arriba y por debajo de cada nodo, respectivamente. Además, en todos los árboles, las especies del género *Macroptilium* pertenecientes a la sección *Microcochle* son resaltadas de color rosado, y las de la sección *Macroptilium* en color violeta. El árbol consenso obtenido a partir de los 12 árboles más parsimoniosos, de longitud 5098, se representa en la Figura 5 (pág. 69). La búsqueda realizada con un set de costos de 2/1 para las transiciones/transversiones sobre la misma matriz resultó en 10 árboles óptimos, de longitud 8781, IC de 0.199 e IR 0.665. En la Figura 6 (pág. 71) se muestra el consenso de estos 10 cladogramas, cuyo largo es 8792.

Figura 5

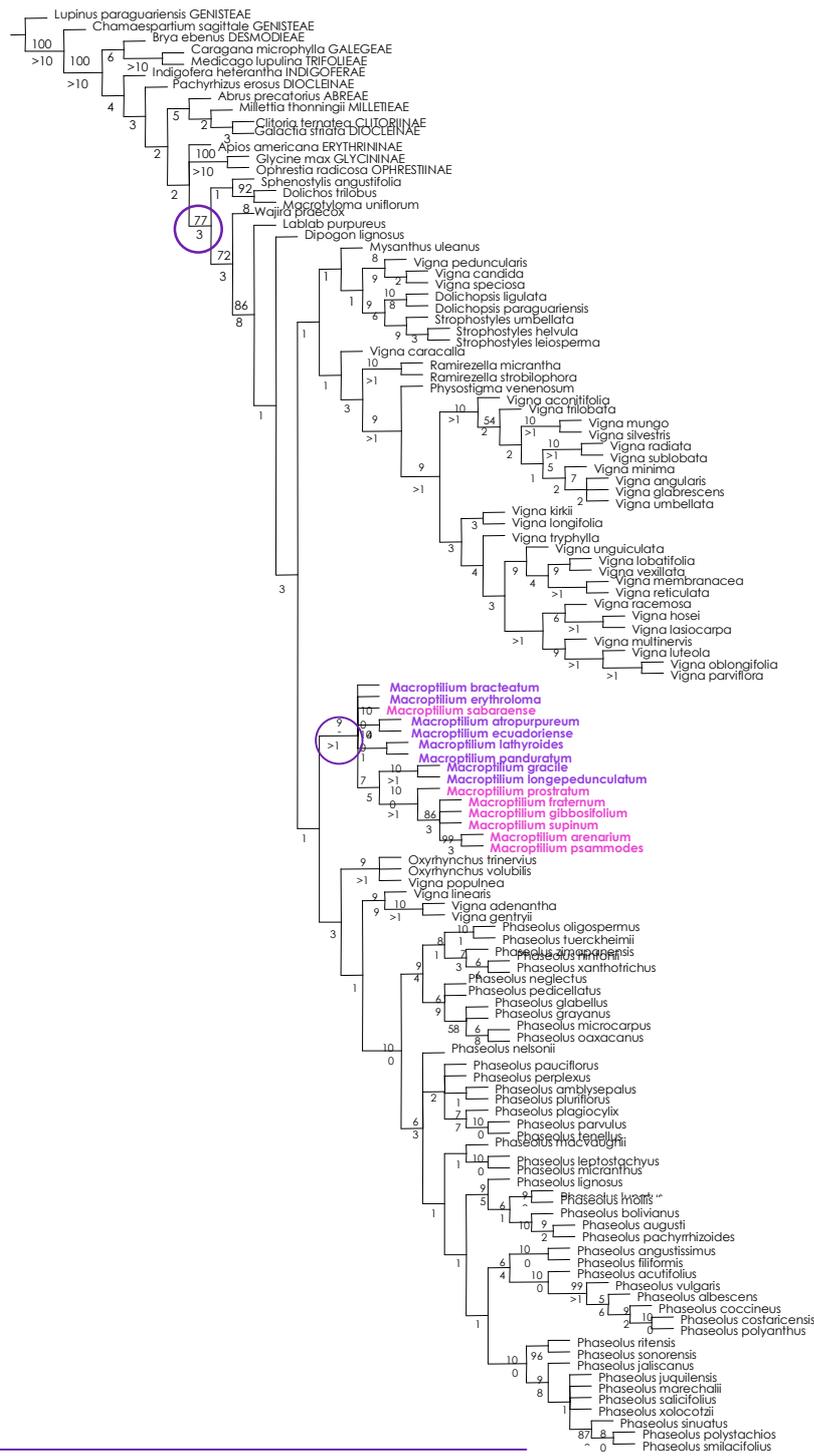


Figura 5: cladograma consenso obtenido en la búsqueda de la matriz de 125 taxones, bajo pesos iguales. L=5098 IC=0,241 IR=0,67

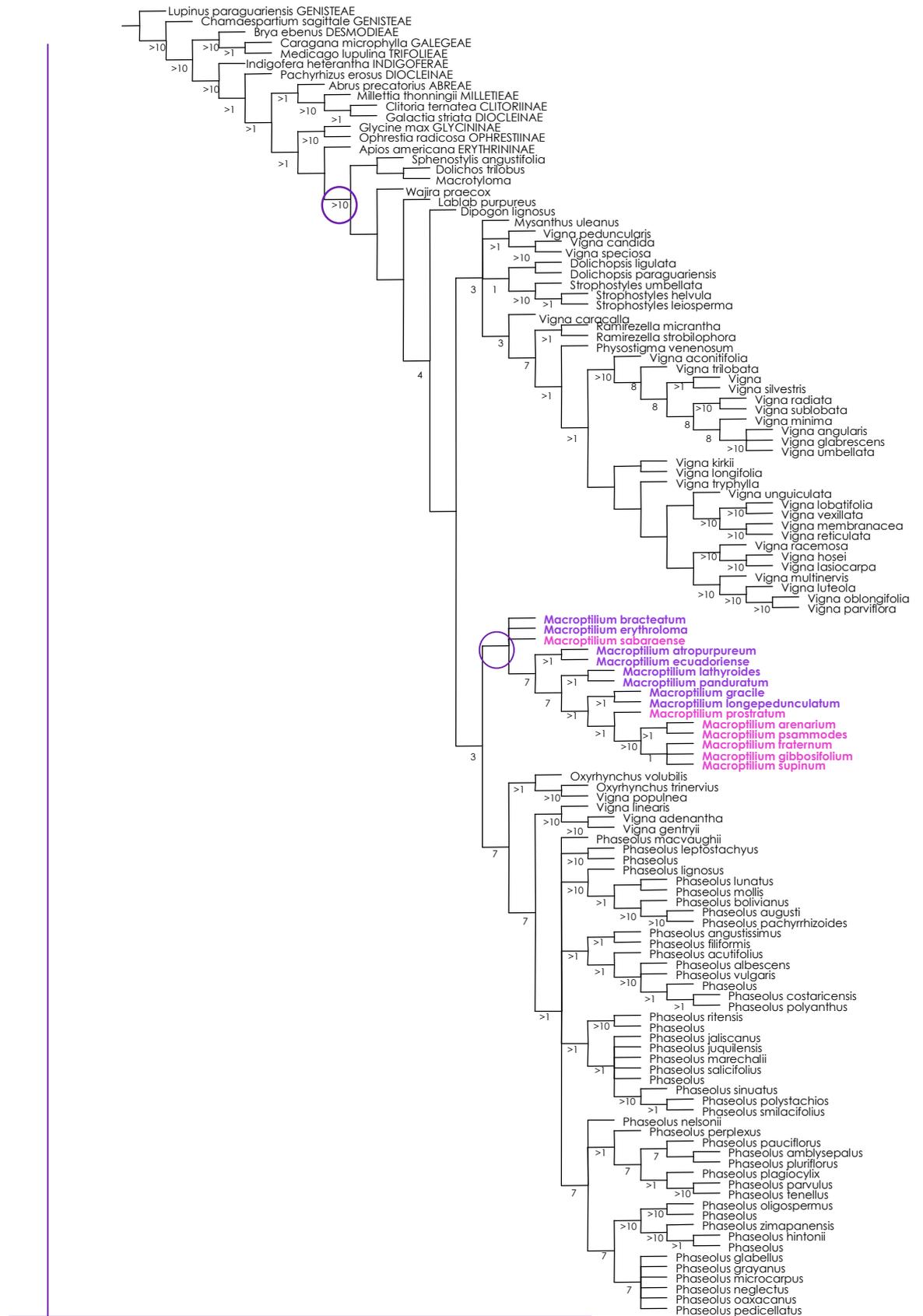


Figura 6: cladograma consenso obtenido en la búsqueda de la matriz de 125 taxones, otorgándole un peso de 2 a las transiciones. L=8792 IC=0,199 IR=0,665

Figura 6

Luego de corroborar la monofilia de la subtribu Phaseolinae en los cladogramas arriba mencionados, se construyó una matriz excluyendo las especies que no pertenecen a esta subtribu. El objetivo de este análisis es el de comprobar, con un nuevo alineamiento, la relación entre los géneros y las especies del grupo interno. La matriz de 111 taxones alineada resultó en 995 caracteres, 470 de ellos informativos. Luego de desactivar estos últimos, se realizaron distintas búsquedas variando los parámetros. En todas ellas, se utilizó a *Sphenostylis angustifolia* como grupo externo funcional, es decir, como el taxón usado para enraizar el árbol, debido a su posición en el cladograma de la Figura 5 (pág.69).

En primer lugar, se corrió la matriz bajo pesos iguales con el programa TNT. Se obtuvieron 7 árboles óptimos de largo 3654, IC de 0.292 e IR de 0.728. El consenso, de largo 3684, se muestra en la Figura 7 (pág. 72).

La segunda búsqueda fue realizada otorgándole a las transiciones un costo de 2, mientras que a las transversiones se les dio un costo de 1. El resultado de la búsqueda fueron 3 árboles de 6352 pasos, IC= 0.239 e IR= 0.714. El cladograma consenso tiene un largo de 6363 (Fig. 8, pág. 74).

Para la tercera búsqueda realizada con TNT, se eligió la opción de pesos implicados. Se probaron distintas constantes de concavidad (k) y se observó que entre valores de 3 y 7 la topología obtenida era la misma, por lo que se decidió utilizar el valor intermedio de k=5. El árbol resultante se presenta en la Figura 9 (pág. 76).

Con la matriz de secuencias sin alinear, se realizó una búsqueda con el programa POY (Wheeler & Gladstein, 2000) usando costos iguales para las tasas de sustitución, y un costo de 2 para los gaps. Se obtuvieron 5 árboles de 5243 pasos, y el consenso se muestra en la Figura 10 (pág. 77). En una segunda búsqueda se les asignó un costo de 2 a las tasas de transición, manteniendo el mismo costo para los gaps. Este análisis resultó en 5 árboles de largo 5231. La Figura 11 (pág. 78) muestra el consenso.

Figura 7

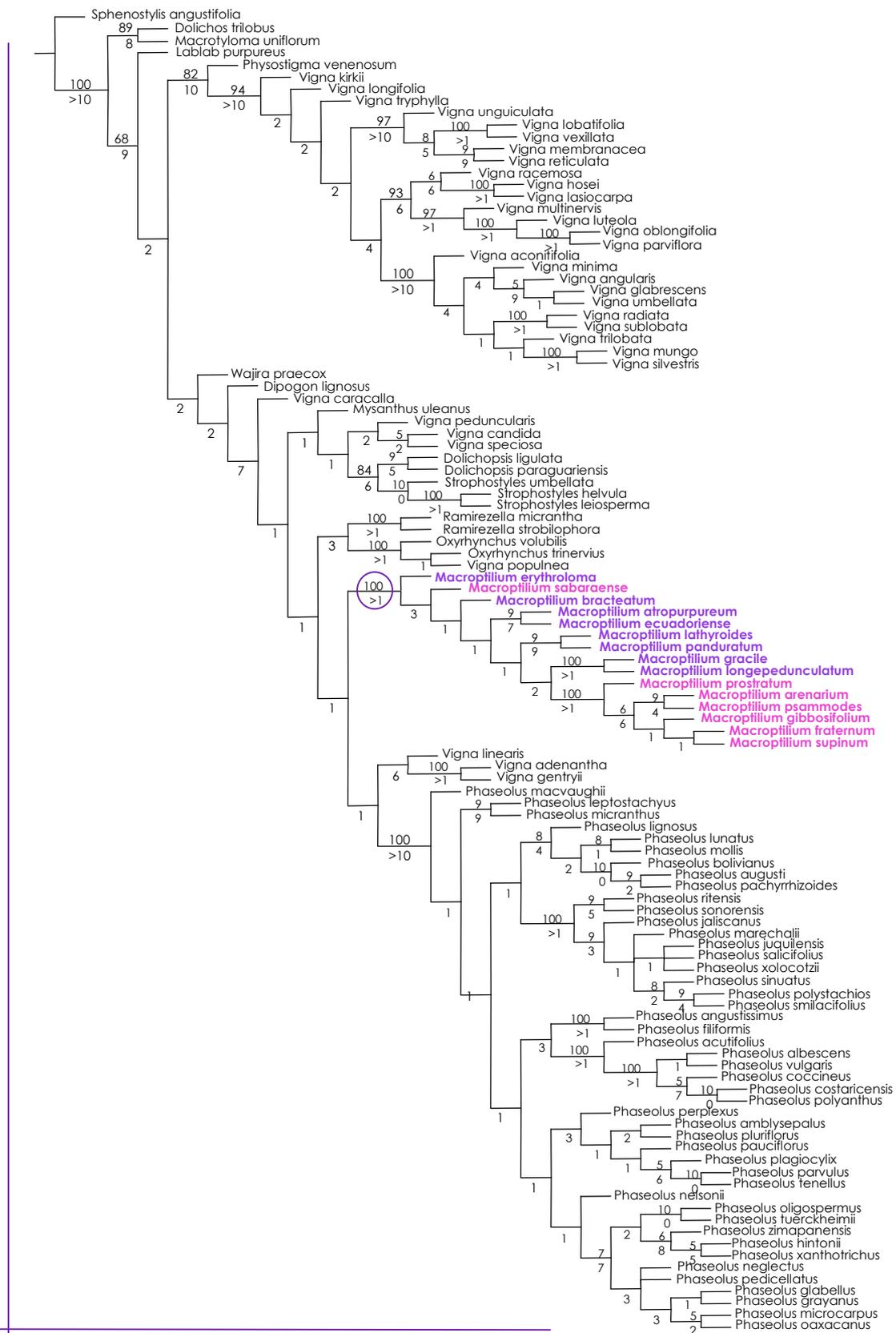


Figura 7: cladograma consenso obtenido a partir de la matriz de especies de Phaseolinae, bajo pesos iguales. L=3684 IC=0,292 IR=0,728

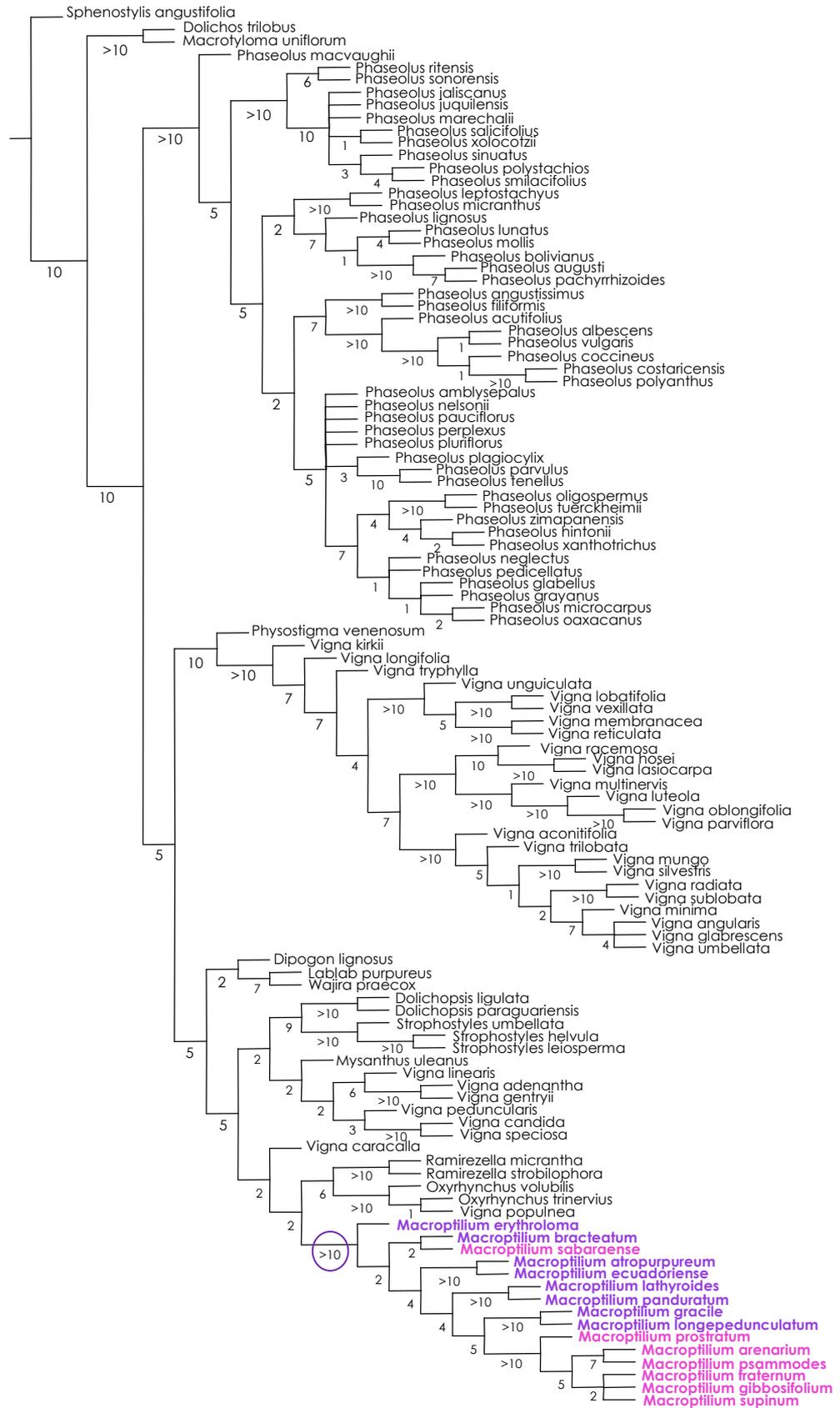


Figura 8: cladograma consenso obtenido a partir de la matriz de especies de Phaseolinae, asignando a las transiciones un peso de 2. L=6363 IC=0,239 IR=0,714

Figura 8

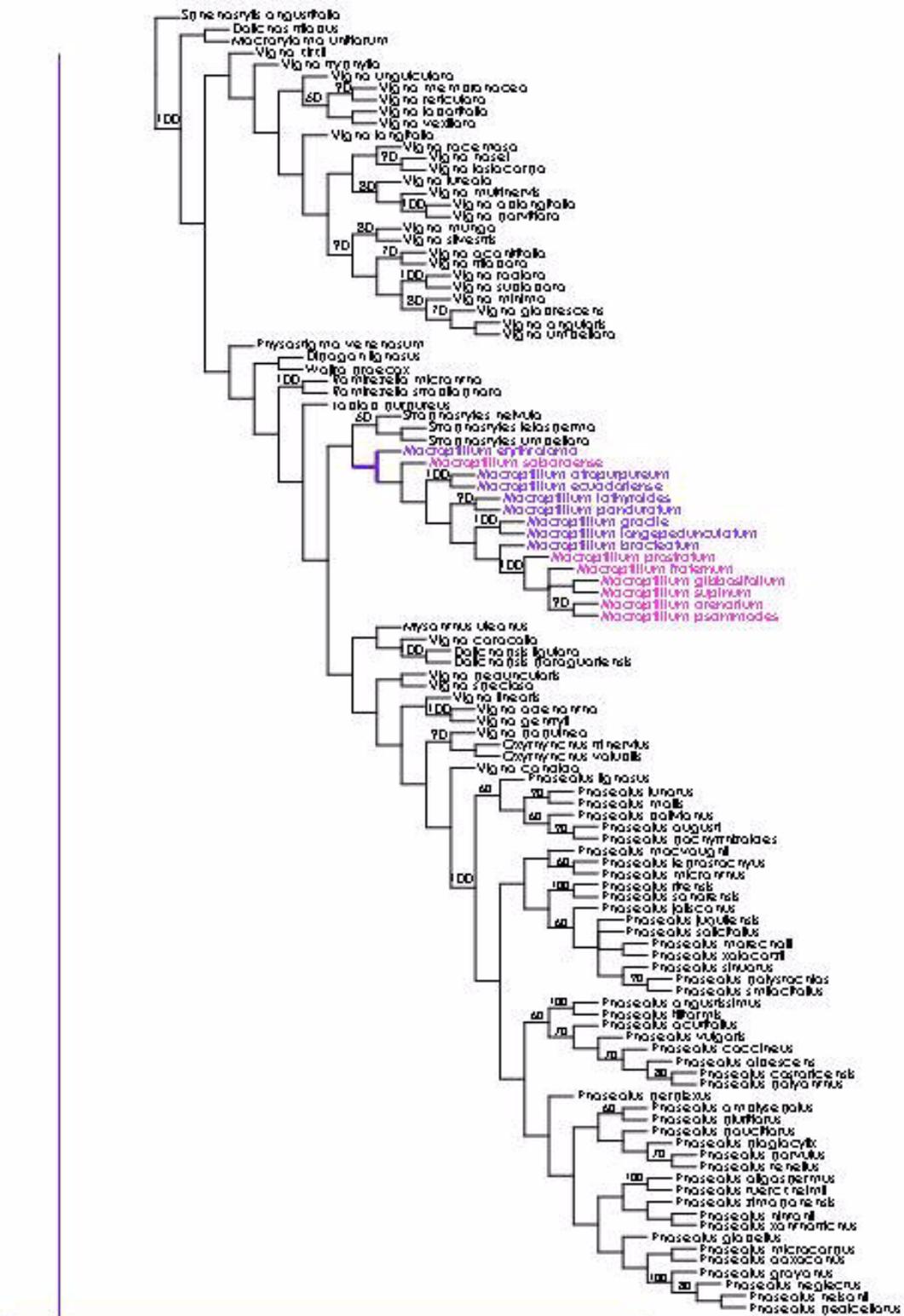


FIGURA 10: cladograma obtenido a partir de la matriz de especies de Phaseolinae, mediante optimización directa, costos iguales. L=5243

FIGURA 10

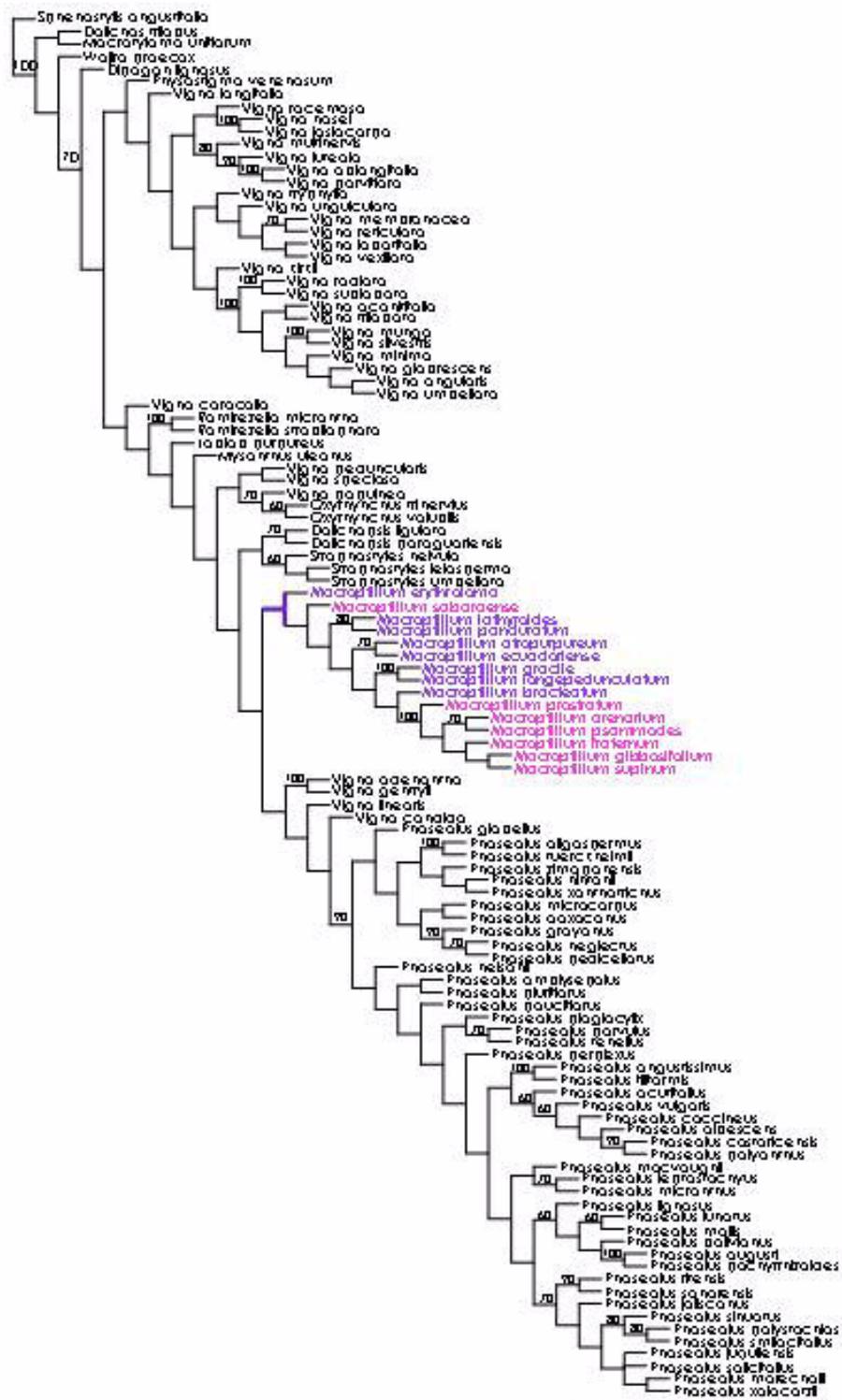


FIGURA 11: cladograma obtenido a partir de la matriz de especies de Phaeoliales, mediante optimización directa, costos de transición 2, transversión 1. L=5231

FIGURA 11

El análisis de secuencias de ADN sugirió que en muchas de las especies del género *Vigna*, así como en *Macrotyloma uniflorum* y *Physostigma venenosum*, las regiones analizadas son posibles pseudogenes. Esto condujo a la construcción de una matriz de la subtribu Phaseolinae, removiendo a todas esas especies. La matriz resultante consta de 76 taxones y 841 caracteres luego de la etapa del alineamiento, de los cuales 360 son filogenéticamente informativos: 203 (43, 84%) corresponden a sitios de la región ITS-1 y 157 (41,65%) al ITS-2. La búsqueda en TNT bajo pesos iguales resultó en 48 árboles de 1851 pasos, IC de 0.384 e IR de 0.756, cuyo consenso, de largo 1863, se puede observar en la Figura 12 (pág. 80). La exploración, otorgándole un costo de 2 a las transiciones y de 1 a transversiones, arrojó 8 árboles de longitud 3246 (IC de 0.321 e IR=0.734), y su consenso tiene 3295 pasos (Fig. 13, pág. 81). A continuación se realizó una búsqueda bajo pesos implicados, variando la constante de concavidad entre 2 y 6. Las topologías obtenidas con las distintas constantes fueron concordantes, por lo que una de ellas, en este caso la de constante 5, se presenta en la Figura 14 (pág. 79). El ajuste de los datos a este árbol es de 116,534, IC de 0,418 e IR de 0,755. Finalmente, la búsqueda por optimización directa con el programa POY elaborada bajo costos iguales para las sustituciones resultó en un árbol consenso de largo 3426, que se esquematiza en la Figura 15 (pág. 80). El árbol consenso resultante de una segunda búsqueda dándole el doble de peso a las transiciones, de largo 3394, se representa en la Figura 16 (pág. 81).

FIGURA 12

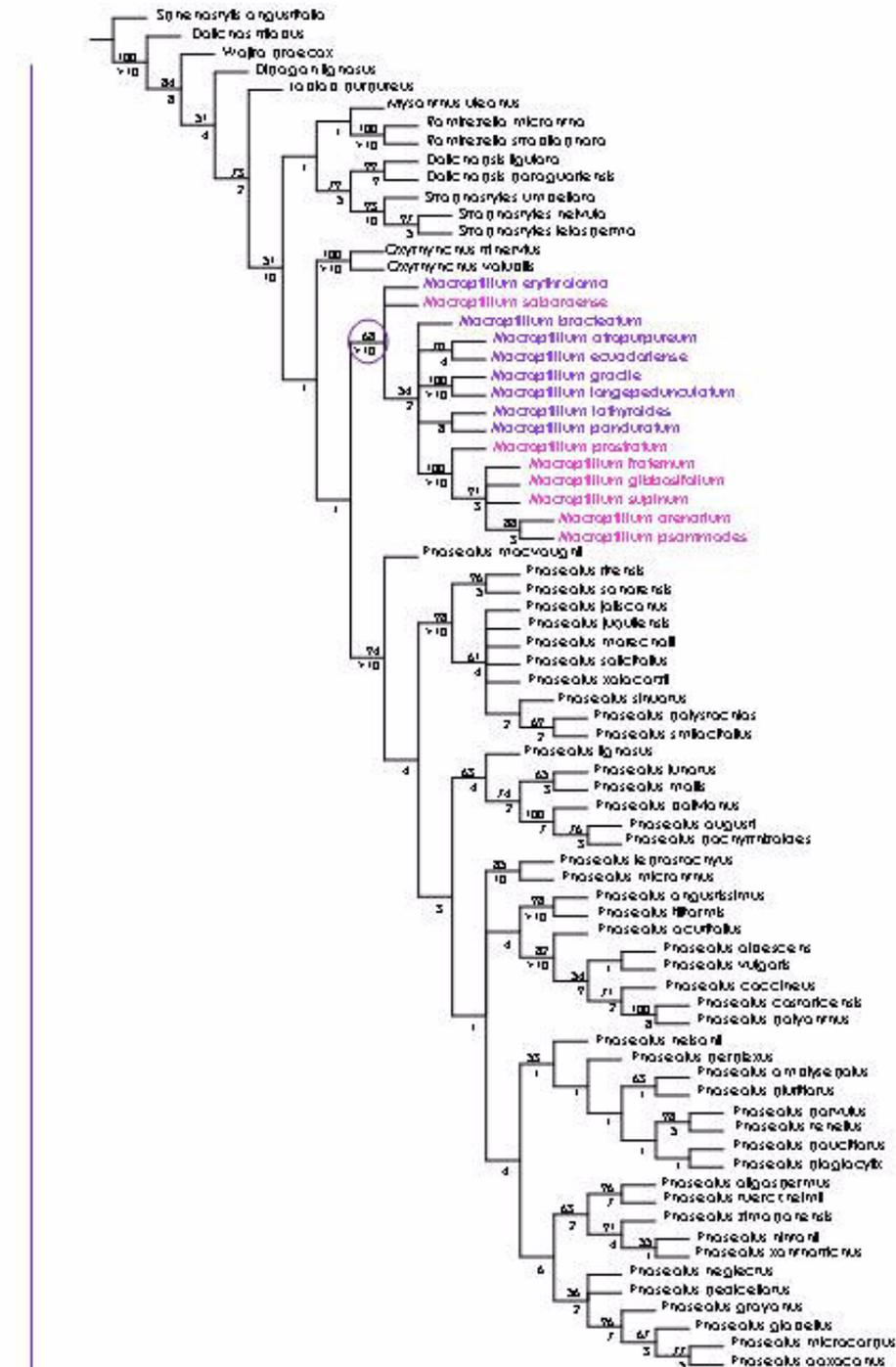


FIGURA 12: cladograma obtenido a partir de la matriz construida excluyendo al género *Vigna*, bajo pesos iguales. L=1263 IC=0,324 IR=0,756

FIGURA 13

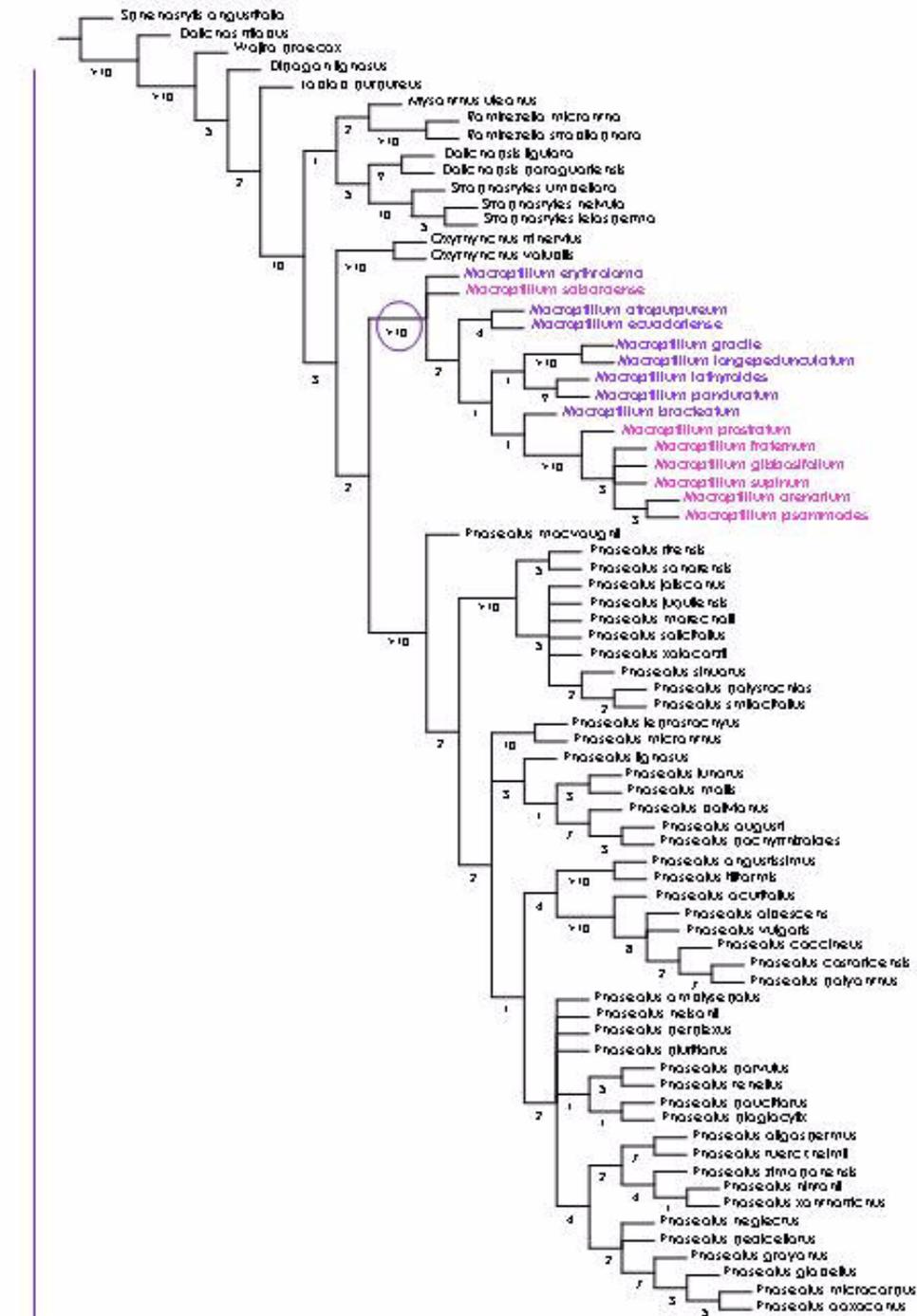


FIGURA 13: cladograma obtenido a partir de la matriz construida excluyendo al género *Vigna*, pesando a las transiciones dos veces más que las transversiones. L=3295 IC=0,321 IR=0,734.

FIGURA 14

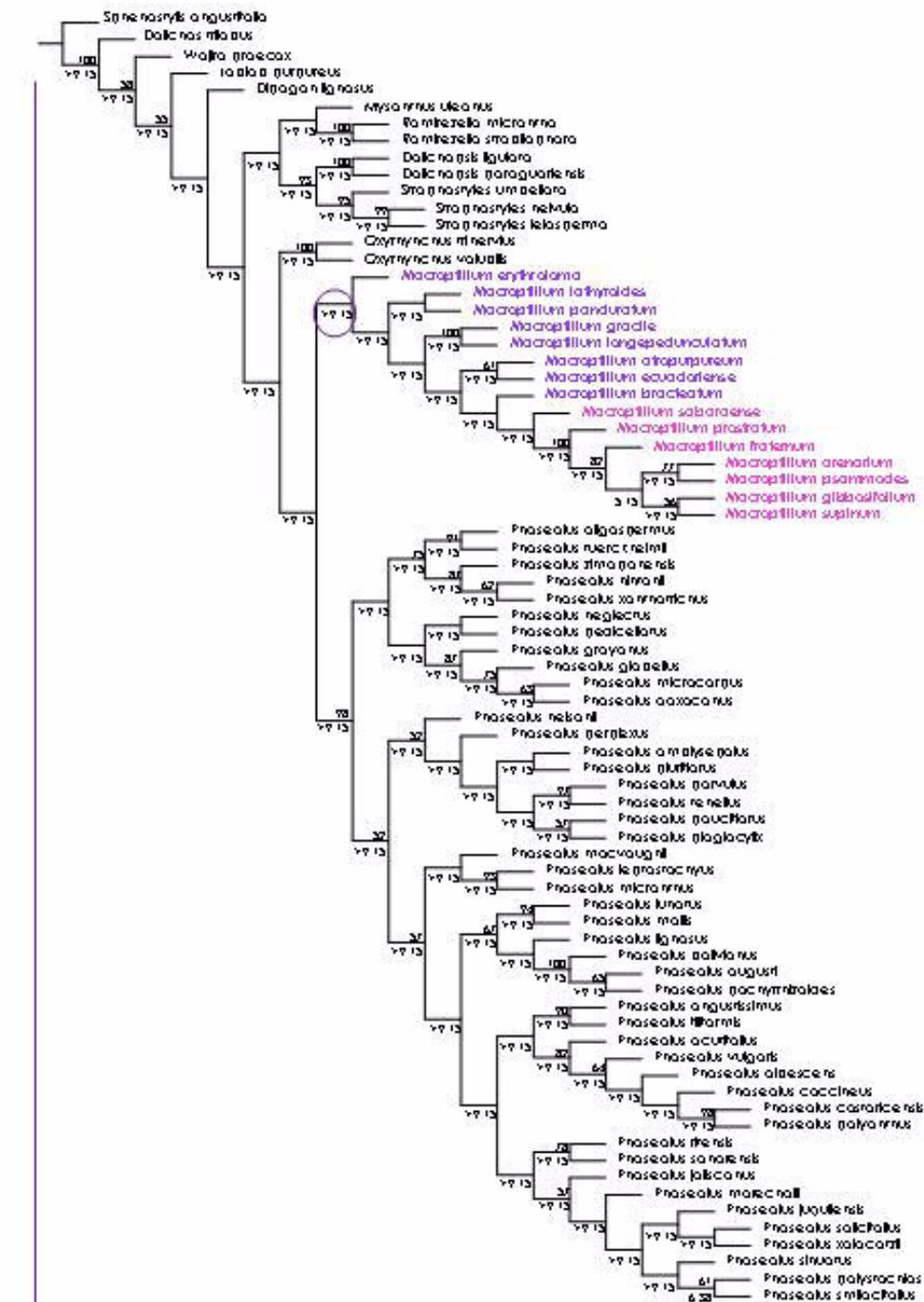


FIGURA 14: cladograma obtenido a partir de la matriz construida excluyendo al género *Vigna*, mediante peso implícito. L=116,5 IC=0,418 IR=0,755

FIGURA 15

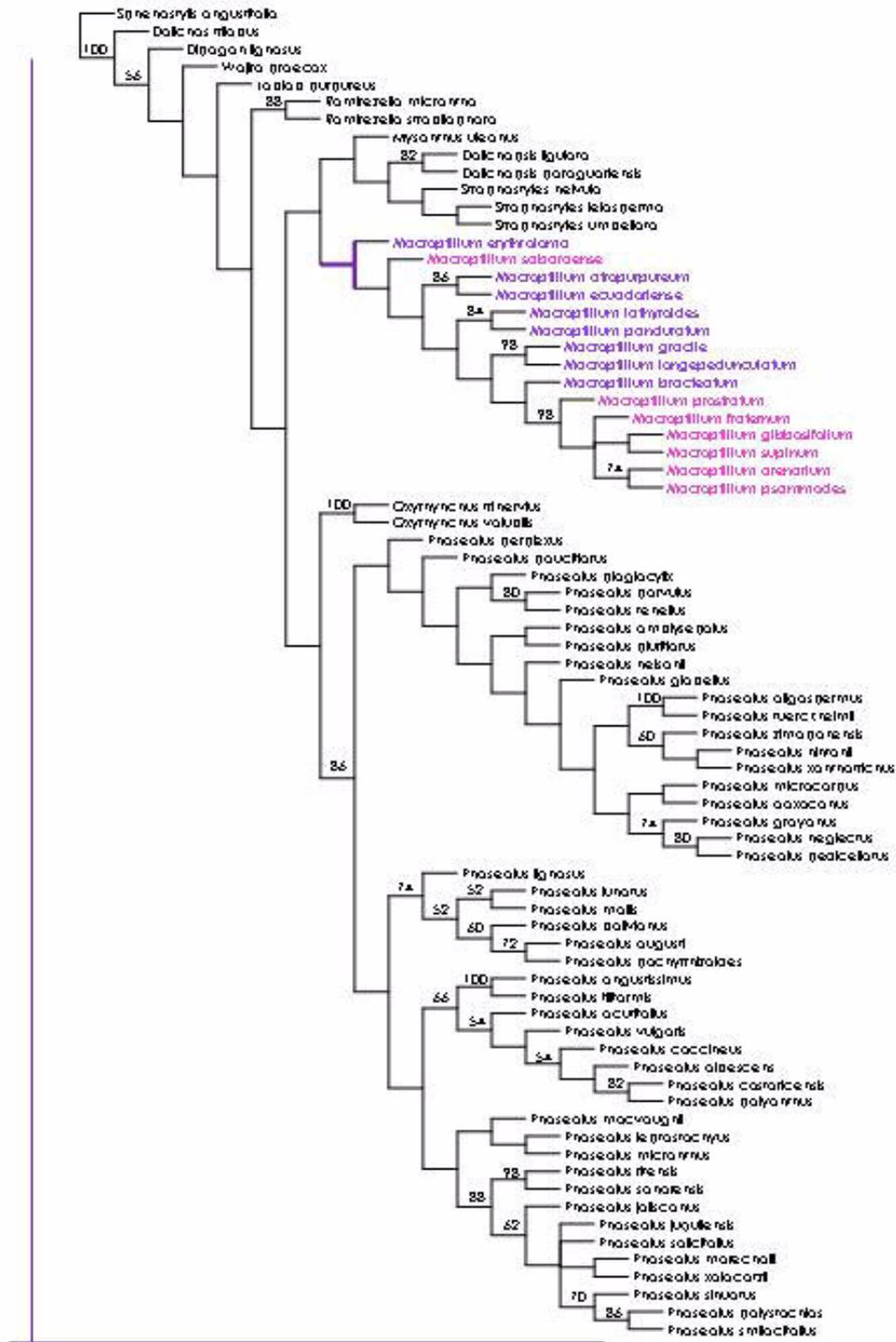


FIGURA 15: cladograma obtenido a partir de la matriz construida excluyendo al género *Vigna*, mediante optimización directa con costos iguales. L= 3426

FIGURA 16

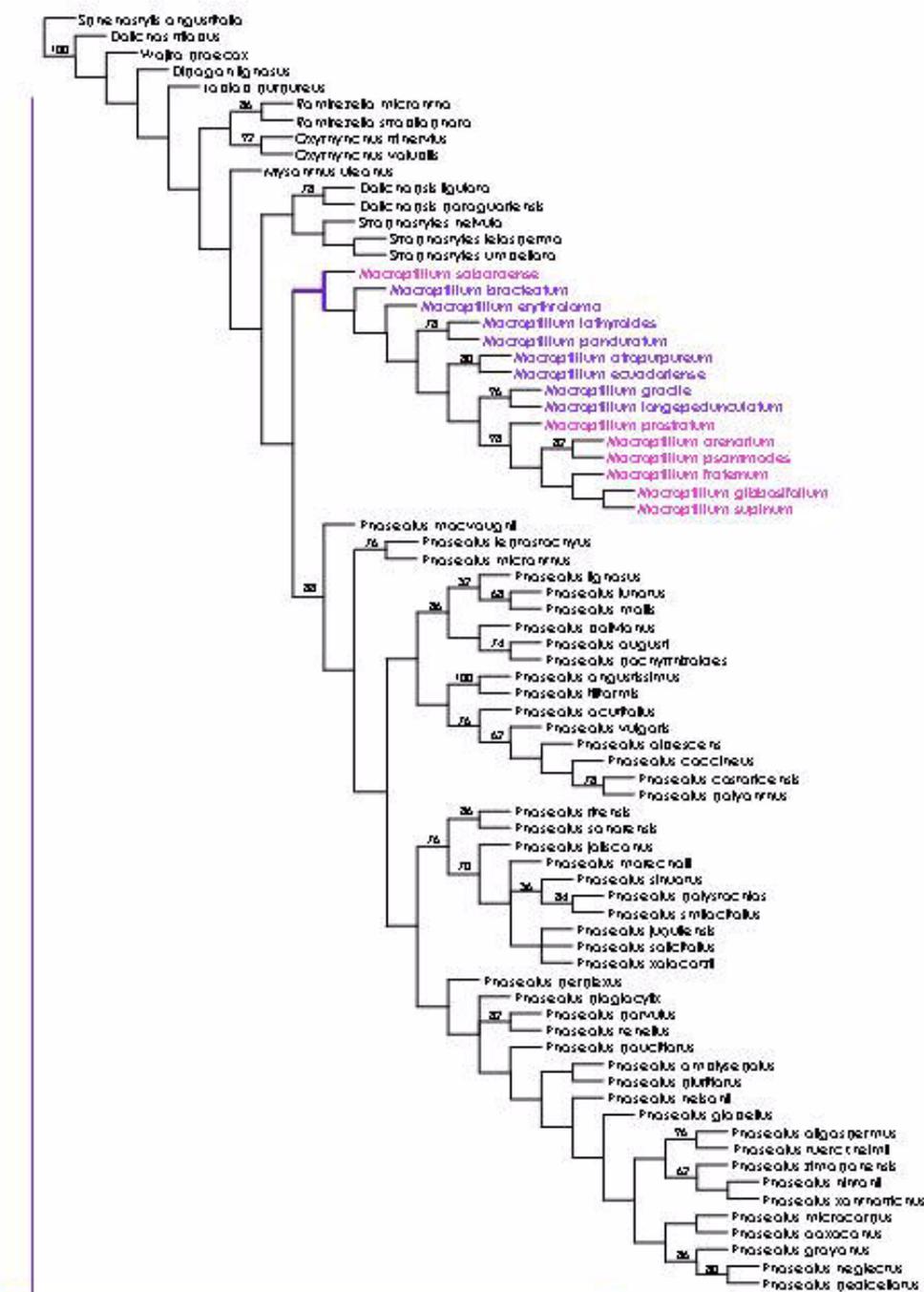


FIGURA 10: cladograma obtenido a partir de la matriz construida excluyendo al género *Vigna*, mediante optimización directa con costos de transición 2. L= 3394

Género *Macroptilium*

- Caracteres morfológicos

La matriz morfológica que se muestra en el Apéndice B (pág. 124) fue sometida a dos estrategias de búsqueda efectuadas con el programa TNT. La matriz consta de 26 taxones y 45 caracteres, todos ellos filogenéticamente informativos. La primera de las búsquedas fue realizada bajo costos iguales, y dio por resultado 58 árboles más parsimoniosos de longitud 119, Índice de Consistencia de 0.437 e Índice de Retención 0.748. En la Figura 17 (pág. 82) se muestra el consenso de esos árboles, cuyo largo es 145, en el cual se señalan los apoyos de Jackknife y Bremer. La segunda búsqueda fue realizada con el método de pesado implícito, obteniéndose la misma topología para las constantes de concavidad 2 a 6. La Figura 18 (pág.83) muestra el árbol obtenido con una constante k de 5.

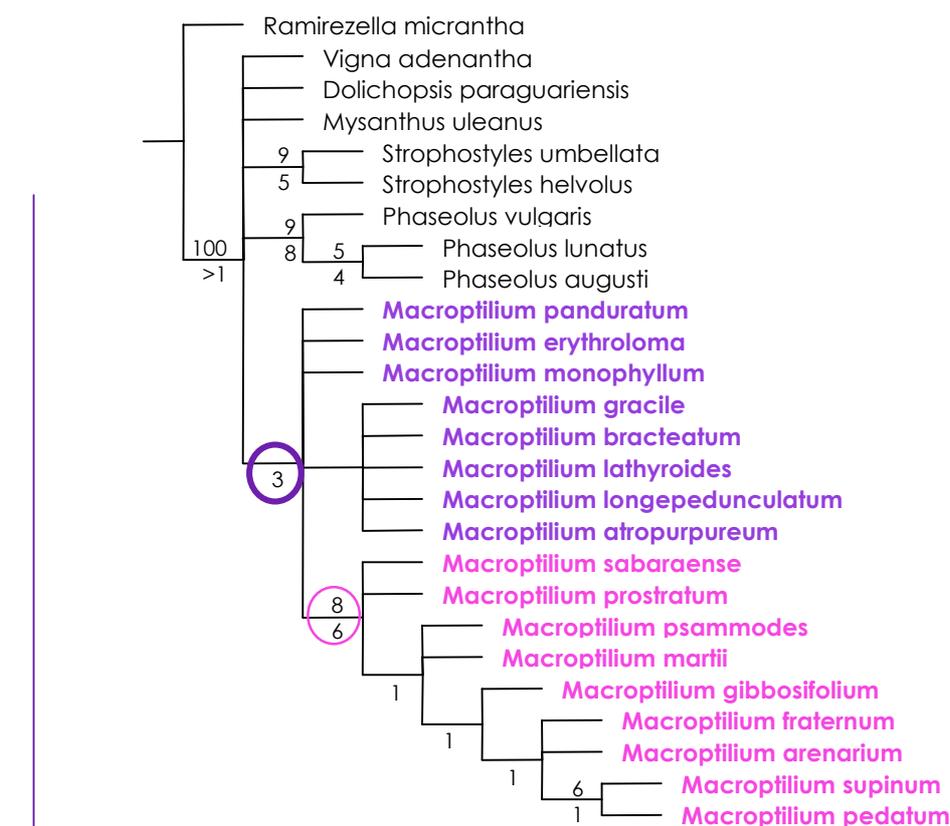


FIGURA 17: cladograma consenso obtenido a partir de la matriz morfológica. Se resaltan los valores de soporte del género *Macroptilium* y de la sección *Microcochle*

FIGURA 17

FIGURA 18

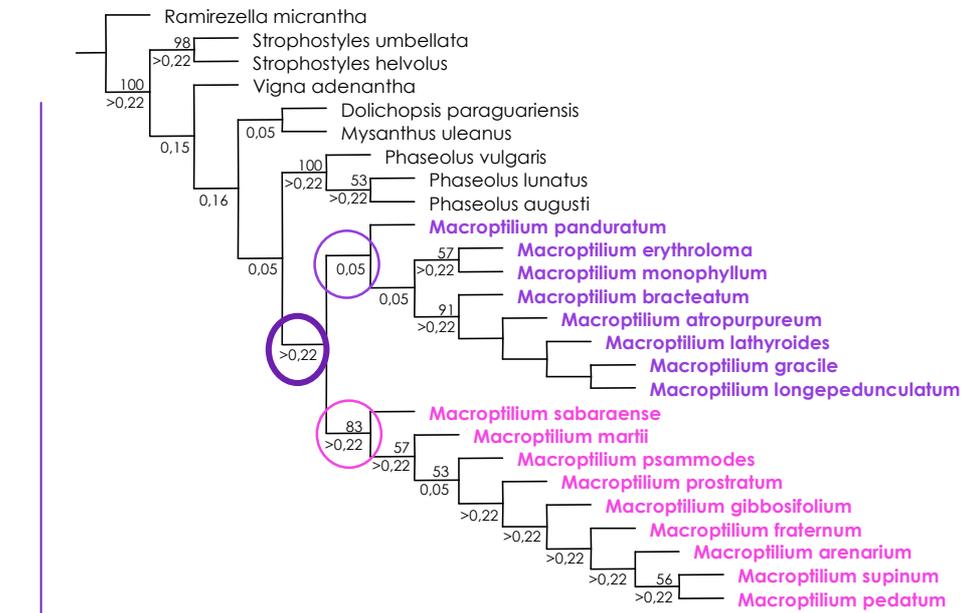


FIGURA 18: cladograma obtenido a partir de la matriz morfológica mediante pesos implicados. Se resaltan los valores de soporte del género *Macroptilium* y de sus secciones.

- **Caracteres de proteínas seminales**

La matriz de presencia-ausencia de bandas proteicas (Apéndice B, pág. 124), está conformada por 19 especies y 141 caracteres, 40 de ellos informativos. Luego de desactivar los caracteres que no aportan información filogenética, el análisis bajo costos iguales resultó en 42 árboles de largo mínimo 60. El Índice de Consistencia es 0.66 y el de Retención 0.78. El cladograma consenso de 74 pasos puede verse en la Figura 19 (pág.85), junto con los soportes de los nodos. En la Figura 20 (pág. 88) se representa el cladograma obtenido bajo pesos implicados con $k=5$ (IC= 0.66, IR= 0.78). La topología fue la misma aún cambiando las constantes de concavidad entre los valores 2 a 7.

FIGURA 19

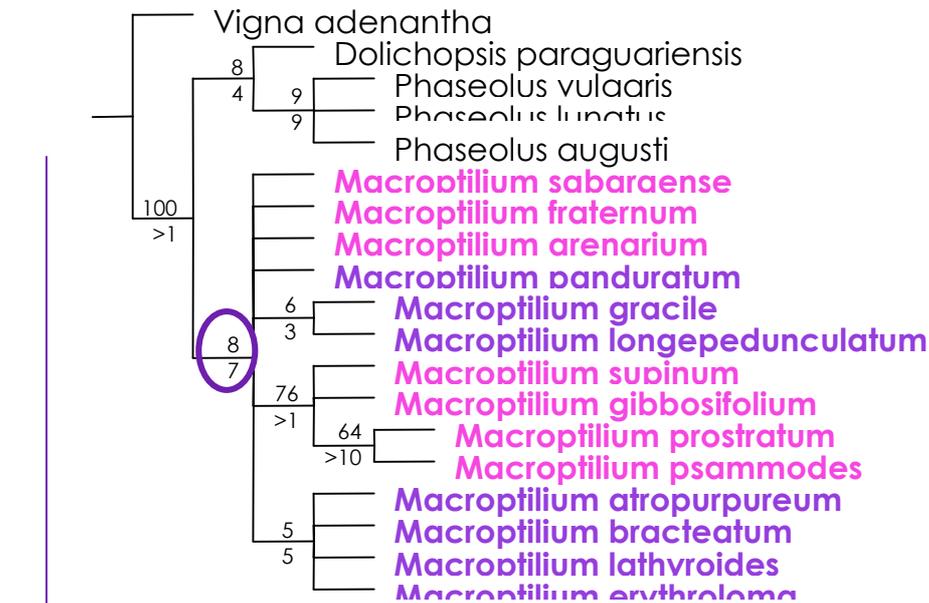


FIGURA 19: cladograma consenso de los árboles óptimos obtenidos a partir de la matriz de proteínas seminales. Se resaltan los valores de soporte del género *Macroptilium*. L=74 IC=0,66 IR= 0,78

FIGURA 20

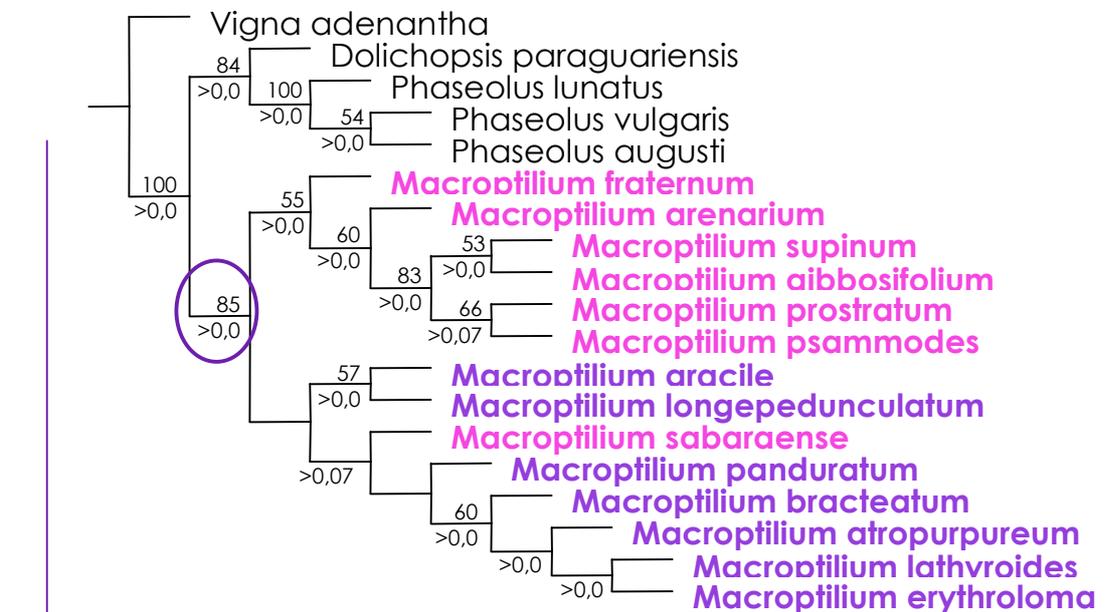


FIGURA 20: cladograma obtenido a partir de la matriz de proteínas seminales, mediante pesado implícito. Se resaltan los valores de soporte del género *Macroptilium*. L= 2,98 IC= 0,667 IR= 0,785

- Caracteres de secuencias de ADN

Los resultados del análisis de las regiones ITS del ADN nuclear para el género *Macroptilium*, pueden visualizarse en las Figuras 5 a 16.

La matriz construida sobre la base de los caracteres de la región IGS *trnL-trnF* posee 16 taxones con 607 caracteres nucleotídicos, 132 de ellos informativos. El análisis cladístico bajo pesos iguales dio como resultado 9 árboles de largo óptimo 242, IC= 0.744 e IR= 0.743. El consenso de longitud 261, con sus respectivos soportes, se muestra en la Figura 21 (pág. 86). El análisis bajo pesos implicados no arrojó una topología constante al variar los parámetros de búsqueda, por lo que se muestra un consenso de los cladogramas obtenidos con constantes de concavidad 2 a 7 (Fig. 22, pág. 87). Luego se realizó una búsqueda otorgándole un costo de 2 a las transiciones y de 1 a las transversiones, resultando en 4 árboles óptimos de largo 421, IC= 0.696 e IR= 0.724. El consenso de longitud 456 junto con los valores de apoyo Jackknife se presenta en la Figura 23 (pág. 90). No se pudieron calcular los apoyos de Bremer para esta topología.

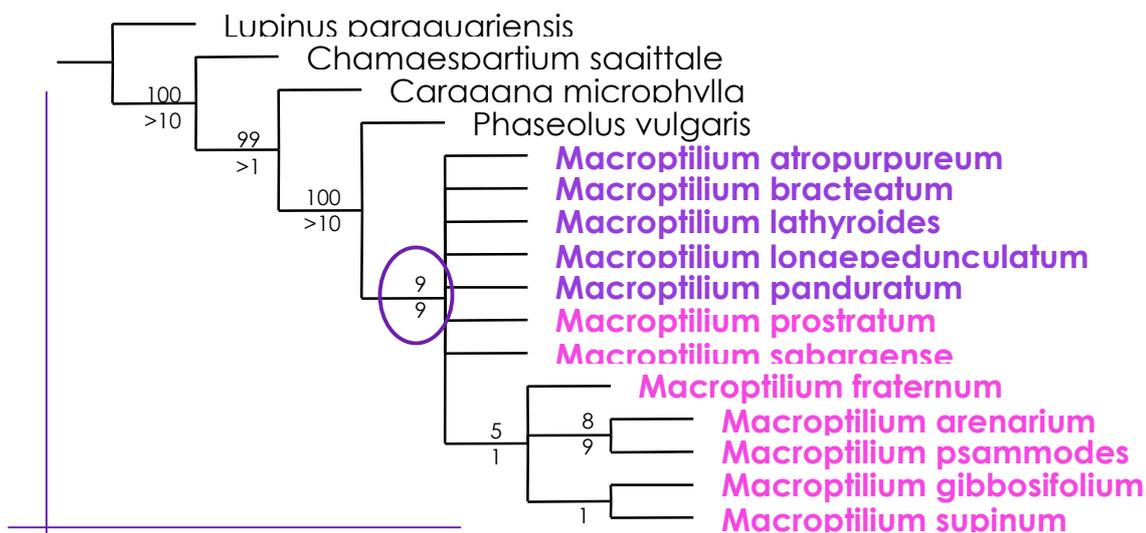


FIGURA 21: cladograma consenso obtenido a partir de los árboles óptimos resultante del análisis de la matriz de secuencias IGS. Se resaltan los valores de soporte del género *Macroptilium*.

FIGURA 22

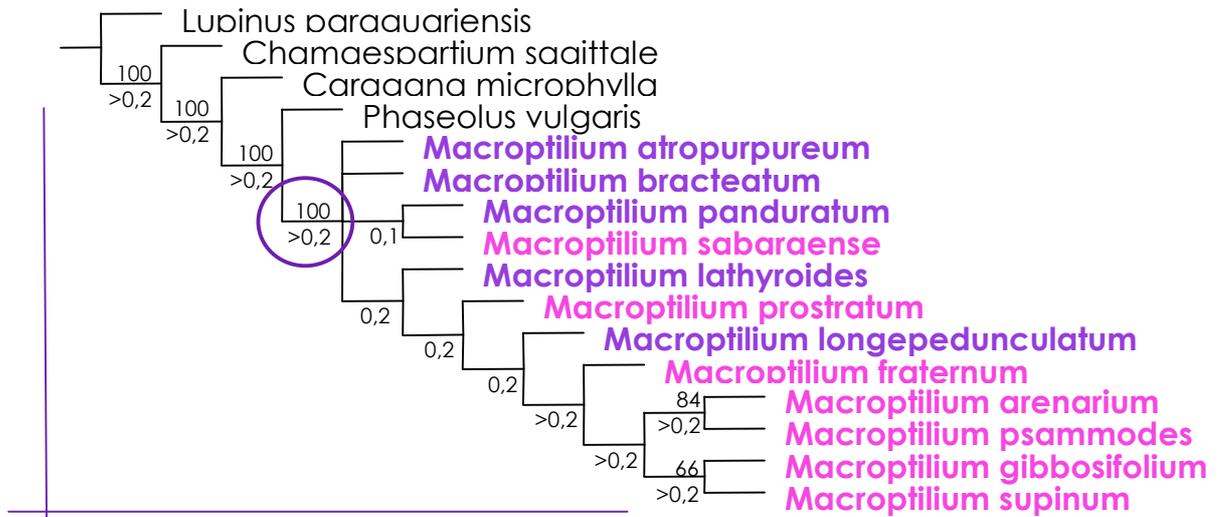


FIGURA 22: cladograma consenso obtenido a partir de los árboles resultantes de la búsqueda con pesos implicados de la matriz de secuencias IGS. Se resaltan los valores de soporte del género *Macroptilium*.

FIGURA 23

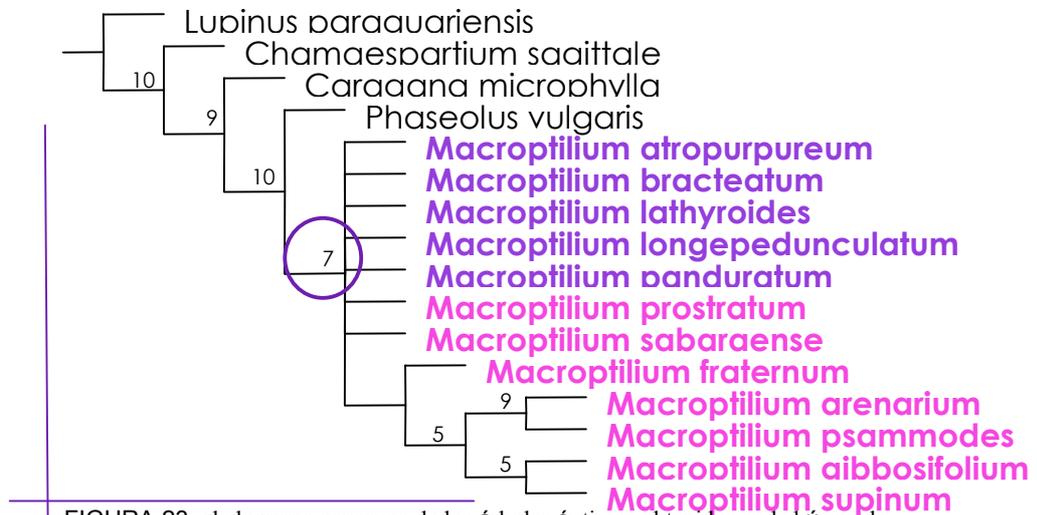


FIGURA 23: cladograma consenso de los árboles óptimos obtenidos en la búsqueda realizada sobre la matriz de secuencias de IGS, con costos de 2 a las transiciones. Se resalta el valor de soporte del género *Macroptilium*.

• Análisis simultáneo

Con los datos de caracteres morfológicos, proteínas seminales y secuencias de ADN nuclear y de cloroplasto, se construyó una matriz conteniendo todas las especies de *Macroptilium* aquí estudiadas y cinco especies relacionadas como grupo externo: *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus*, *P. augusti*, *Dolichopsis paraguarienses* y *Vigna adenantha*. Ésta última actuó como grupo externo funcional. Se realizaron dos estrategias de búsqueda con el programa TNT, una de ellas con costos iguales y otra mediante pesado implícito. Ambas se efectuaron sobre la matriz de 770 caracteres, 263 de ellos con información filogenética. En el primer caso, se obtuvieron once árboles de longitud mínima 661, con Índice de Consistencia 0.548 y un Índice de Retención de 0.705. El consenso que se muestra con sus respectivos apoyos, tiene una longitud de 675 pasos (Fig. 24, pág. 88).

FIGURA 24

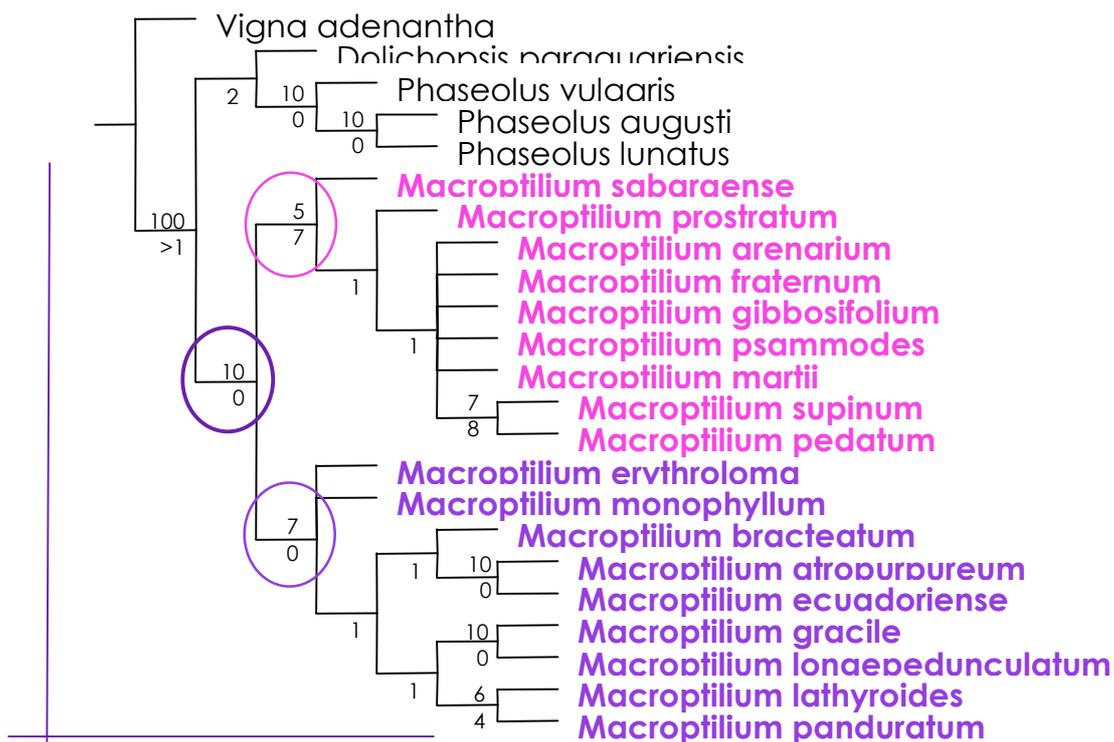


FIGURA 24: cladograma consenso de los árboles óptimos obtenidos en la búsqueda realizada sobre la matriz simultánea. Se resalta el valor de soporte del género *Macroptilium*.

La búsqueda realizada con el procedimiento de pesado implícito, arrojó un árbol por cada constante de concavidad aplicada. Dado que la topología fue diferente para cada concavidad, se obtuvo un consenso entre todos los árboles óptimos, que se presenta en la Figura 25 (pág. 89), junto con los apoyos Jackknife y de Bremer. El Índice de Consistencia es de 0,546 y el Índice de Retención 0,703, para todas las topologías obtenidas.

FIGURA 25

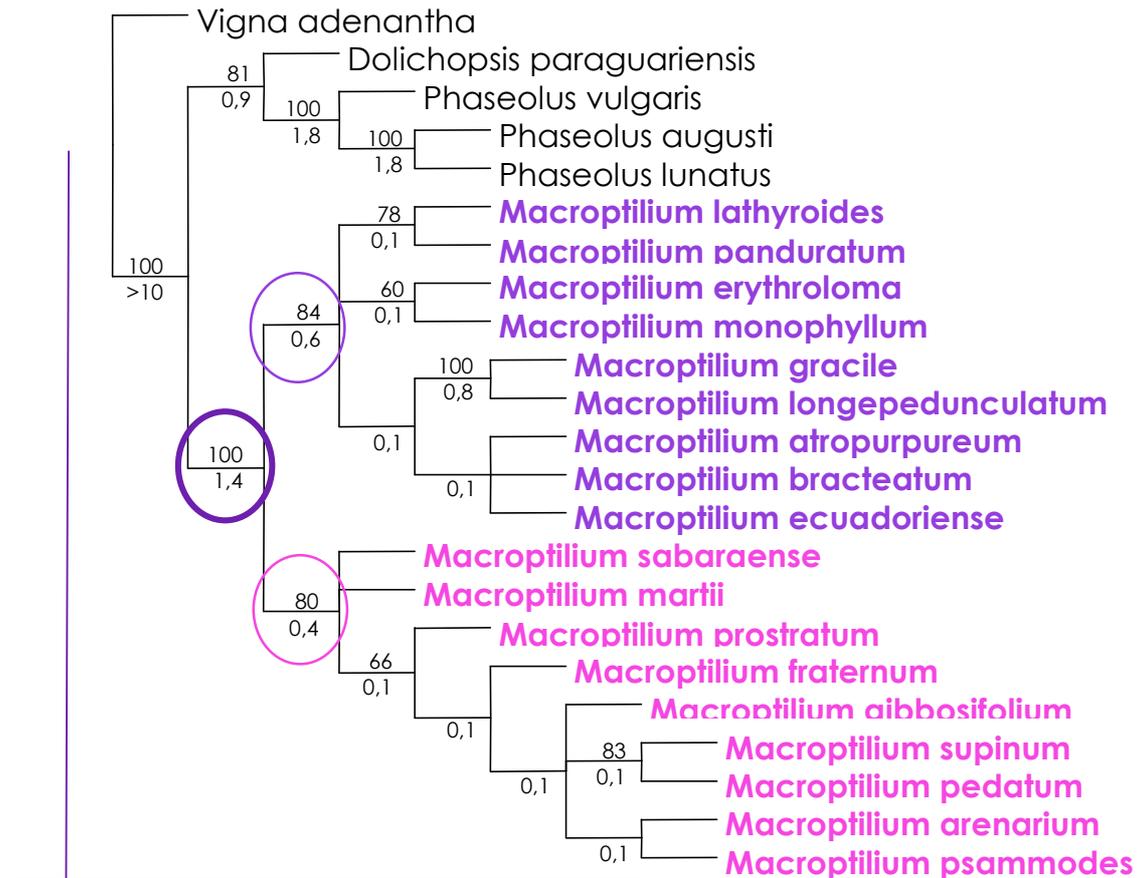


FIGURA 25: cladograma consenso de los árboles obtenidos en las búsqueda realizadas sobre la matriz simultánea, variando la constante de concavidad de 3 a 7. Se resalta el valor de soporte del género Macroptilium y de sus secciones..

- **Análisis de las secciones propuestas para *Macroptilium***

Para cada set de datos no morfológicos, se volvieron a realizar búsquedas heurísticas, pero forzando la monofilia de las secciones no soportadas por las distintas matrices.

En el caso de la matriz morfológica, no es necesario forzar la monofilia de la sección *Microcochle* ya que ésta está apoyada con un valor del Jackknife de 86% y un soporte de Bremer de 2. Si bien en el consenso no aparece la sección *Macroptilium* como monofilética, 10 de los 58 árboles más parsimoniosos obtenidos apoyan la monofilia de este grupo. En cuanto al análisis realizado sobre la misma matriz bajo pesos implicados, ambas secciones aparecen como monofiléticas, pero es la sección *Microcochle* la de mayor apoyo (Fig. 18, pág. 83).

Al forzar la monofilia en el análisis de la matriz de datos de proteínas seminales bajo pesos iguales, los cladogramas obtenidos con ambas secciones monofiléticas resultaron en un paso más largo que el óptimo (61 pasos contra 60). Al analizar bajo pesos implicados, el forzar la monofilia de las dos secciones hace aumentar el ajuste de los datos al cladograma óptimo de 4.32 a 4.55.

En el análisis de la matriz de secuencias de la región IGS *trnL-trnF* del ADN de cloroplasto, el forzar la monofilia en los tres tipos de búsqueda realizados, hizo aumentar el ajuste de los datos. En el caso del análisis con pesos iguales, se aumentó en 7 el largo de los árboles obtenidos. En la búsqueda con pesado implícito el ajuste óptimo fue de 15.42, contra 13.92 del cladograma sin constreñir. Por último, cuando el análisis consistió en otorgarle a las transiciones un costo de 2, los cladogramas óptimos forzando la monofilia de ambas secciones resultaron en una longitud de 433, 12 pasos más que los obtenidos sin la restricción.

El análisis de la matriz de regiones ITS de los 111 taxones de la subtribu Phaseolinae, bajo pesos iguales, forzando la monofilia de la sección *Macroptilium*, resultó en cladogramas 7 pasos más largos que los óptimos, obtenidos sin forzar el agrupamiento. 

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El campo de la Sistemática ha recibido un gran aporte en las últimas décadas por parte de la Biología Molecular, ya que el avance en las técnicas de análisis del ADN permitió que la mayoría de los laboratorios de investigación accedieran a datos de sitios de restricción y secuencias de ADN de manera relativamente sencilla y económica. Esto permitió sumar nuevas evidencias para la inferencia de las filogenias de los organismos. Sin embargo, varios aspectos deben ser puntualizados a la hora de evaluar la utilidad de las secuencias analizadas. Por un lado, la necesidad de utilizar más de un marcador molecular en el estudio cladístico de un grupo de organismos para evitar el problema de confundir la filogenia del gen con la filogenia de los taxones estudiados. Además, es común encontrar en ciertas regiones del genoma, pseudogenes y secuencias parálogas junto con las ortólogas que dificultan el acceso a los genes verdaderamente útiles para el estudio filogenético; el asegurar la utilización de genes ortólogos para la reconstrucción de la filogenia es indispensable.

En la familia Leguminosae, los datos de secuencia de ADN ya han sido utilizados para dilucidar algunas relaciones interespecíficas e intergenéricas (Ainouche & Bayer, 1999; Ainouche *et al.*, 2003; Allan & Porter, 2000; Bruneau *et al.*, 1995; Doyle, 1995). El uso de este tipo de caracteres, conjuntamente con los morfológicos, permiten evaluar en forma más rigurosa la filogenia de los organismos. Por ello, en este estudio se utilizaron distintas fuentes de caracteres para arribar a una hipótesis filogenética sobre el género *Macroptilium*, cuyo estudio hasta el momento nunca fue abordado mediante el análisis de caracteres moleculares. A su vez, las relaciones genealógicas de otros géneros de la subtribu Phaseolinae (Phaseoleae, Leguminosae) también fueron evaluadas variando las estrategias de búsqueda de las hipótesis más parsimoniosas.

Las regiones genómicas aquí estudiadas fueron el espaciador transcrito interno (ITS) de las regiones 18S-26S del ADN ribosomal nuclear, y el espaciador intergénico entre el exón *trnL* (UAA) 3' y el gen *trnF* (GAA), abreviado como IGS. La secuenciación de estas dos regiones, características morfológicas y de proteínas seminales, proveyeron los caracteres con los que se construyó una matriz de datos para el análisis de las relaciones filogenéticas en el género *Macroptilium*.

ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADN: DESCUBRIENDO PSEUDOGENES

El espaciador transcripto interno (ITS) de las regiones 18S-26S del ADN ribosomal nuclear es ampliamente utilizado en estudios de Sistemática Vegetal. Sin embargo, pueden surgir ciertos problemas si no se analiza previamente la posible presencia de pseudogenes, o de secuencias ortólogas y parálogas que no fueron homogeneizadas por evolución concertada (Álvarez & Wendel, 2003). En todas las secuencias obtenidas, tanto de ITS como de la región del cloroplasto IGS *trnL-trnF*, se revisaron los cromatogramas para observar la aparición de dobles picos, lo cual estaría indicando la presencia de pseudogenes, o de dos linajes alélicos para estas regiones. En ninguna de las secuencias se observó esta característica. Además, se realizó una comparación con una base de datos de secuencias conocidas, como lo es el Blast, con la cual se comprobó la afinidad de los datos con especies emparentadas de la misma subtribu.

Distintos análisis pueden ser realizados sobre las secuencias de ADN para revelar parálogos o pseudogenes, y así evitar el uso indebido de este tipo de caracteres. En este trabajo se analizaron los largos de secuencias, el contenido de guanina y citosina, la estructura secundaria y la energía libre de las regiones ITS-1 e ITS-2.

Largo de secuencias

Casi todas las especies analizadas tienen un largo de ITS-1 e ITS-2 dentro del rango esperado para las Angiospermas (Tablas 3 a 5, pág. 55, 56 y 59), a excepción de *Macrotyloma uniflorum* y *Sphenostylis angustifolia*.

Las longitudes de las regiones IGS del ADN de cloroplasto varían, en el género *Macrotylimum*, entre 404 a 498 (Tabla 6, pág. 60), valores similares a los observados en especies de la tribu Genisteae (Leguminosae) (Pardo *et al.*, 2004).

Contenido G+C

El contenido de guanina y citosina (G+C) en la totalidad de la región ITS varía, en Angiospermas, entre un 50 a un 75% (Baldwin *et al.*, 1995). Un rango similar pudo ser observado en la mayoría de las especies aquí estudiadas (Tablas 3 a 5, pág. 55, 56 y 59),

pero *Physostigma venenosum*, *Clitoria ternatea*, *Phaseolus tenellus*, *P. nelsonii* y algunas especies del género *Vigna*, tienen un contenido G+C por debajo del rango esperado.

En la región IGS *trnL-trnF* se observa un mayor contenido de Adenina-Timina, siendo el contenido G+C menor al 30% (Tabla 6, pág. 59). En otros géneros de Phaseoleae relacionados se observaron estos mismos valores (Pardo *et al.*, *op. cit.*).

Energía libre y estructura secundaria de las regiones ITS-1 e ITS-2

Estas características son las más utilizadas para distinguir entre secuencias potencialmente funcionales de las que no lo son, es decir, de pseudogenes. Según Bailey *et al.* (2003), ambos factores pueden ser representativos del grado de restricción funcional a la que las regiones están siendo sometidas. Los mismos autores consideran que la molécula tendrá mayor estabilidad si su energía libre se encuentra en el rango de -90 a -107 kcal/mol.

Para descartar posibles pseudogenes, en la región ITS-1 se recomienda observar la presencia de la región conservada apareada en el brazo mas largo de la molécula, verificar el cumplimiento del modelo de 6 hélices, y además realizar el cálculo de la energía libre. En el ITS-2, por otro lado, debe constatarse una estructura de 4 hélices, junto con el cálculo de la energía libre (Mayol & Rosselló, 2001).

La mayoría de las especies analizadas muestran la secuencia conservada “Angiosperm Universal Core” (Tablas 3 a 5, pág. 55, 56 y 59), aunque varias especies de Phaseolinae, en especial las del género *Vigna*, presentan variaciones en esta región. Además, las secuencias de estas especies (obtenidas del GenBank) tienen una baja estabilidad termodinámica y una estructura secundaria altamente inestable.

Conclusiones del análisis de las secuencias

Las secuencias de las especies del género *Macroptilium* no poseen ninguna de las características que las hagan candidatas a pseudogenes. El resto de las secuencias analizadas parecen representar regiones funcionales, de acuerdo a los parámetros estudiados. Sin embargo, se observaron algunas anomalías en las secuencias obtenidas del GenBank. En el grupo externo, sólo la especie *Clitoria ternatea* presenta características que hacen dudosa su funcionalidad, ya que posee menor contenido G+C de lo esperado

para las Angiospermas y su estructura secundaria no se asemeja al modelo propuesto por Mayol & Roselló (*op. cit.*). De las especies de la subtribu Phaseolinae (cuyas secuencias fueron obtenidas del GenBank), *Dolichopsis paraguariensis* no presenta las estructuras secundarias esperadas, pero su largo y contenido G+C entran en el rango adecuado. *Macrotyloma uniflorum* posee un ITS-2 sorprendentemente corto, de 91 pb, probablemente debido a un error en la secuenciación, ya que esta gran delección nunca fue informada para las regiones ITS. La estructura secundaria del ITS-1 de la especie *Physostigma venenosum* no se corresponde con lo esperado, ni tampoco el contenido G+C del ITS-2. Dentro del género *Phaseolus*, las especies *P. nelsonii* y *P. tenellus* presentan en el ITS-1 un contenido G+C menor al 50%, y una estructura secundaria sin la presencia de las 6 hélices. Los registros del género *Vigna* son los que más anormalidades presentan, ya que 11 de las especies tienen un contenido G+C menor que el rango observado en el resto de los taxones, siendo sus estructuras secundarias inestables, y no presentan la configuración propuesta para estas regiones.

Las secuencias registradas en el GenBank de todas las especies mencionadas corresponderían a potenciales pseudogenes, por lo que debería evaluarse la pertinencia de su utilización en el análisis filogenético. Como lo señalan Bailey *et al.* (2003), los pseudogenes deberían ser removidos de un estudio ya que éstos podrían ser parálogos profundos respecto a los funcionales, provocando interferencia en la reconstrucción de la filogenia de las especies, además de poseer tasas de evolución elevadas. Sin embargo, los pseudogenes pueden ser parálogos superficiales y, por lo tanto, no afectar a la inferencia filogenética. Si la remoción de las secuencias candidatas a pseudogenes no influye en la topología final respecto a un análisis realizado incluyendo estas secuencias, su remoción sería injustificada. En el presente trabajo se realizaron análisis cladísticos incluyendo y excluyendo a las secuencias candidatas a pseudogenes, sin obtener diferencias en las topologías resultantes. 

DIVERGENCIA ENTRE ESPECIES A PARTIR DE SUS SECUENCIAS DE ADN

Los valores de divergencia genética calculados a partir de las regiones ITS y de la región del ADN de cloroplasto IGS *trnL-trnF*, en el género *Macroptilium* (Tablas 8 y 9, pág. 66 y 67), concuerdan con los hallados en varias familias de Angiospermas (Baldwin *et al.*, 1995). El promedio de divergencia para la región ITS-1 es de 0.203, y la del ITS-2 es de 0.119, valores similares a los obtenidos en los géneros relacionados *Vigna* y *Phaseolus* (Delgado Salinas *et al.*, 1999; Doi *et al.*, 2002). Al analizar la región IGS del cloroplasto el promedio de divergencia entre especies es de 0.0571, valor inferior al obtenido considerando los ITS. Esta observación indicaría una menor tasa de evolución en la región del cloroplasto con respecto a la zona del genoma nuclear aquí analizada. El menor número de sitios con información filogenética coincide con esta afirmación.

Algunos de los valores de divergencia son extremadamente pequeños. Entre *Macroptilium arenarium* y *M. psammodes* la divergencia en las regiones ITS es de 0.004 y 0.005, indicando una gran afinidad entre ellas (Tabla 8, pág. 66). Lo mismo se observa en la región IGS, con un valor de 0.0269 (Tabla 9, pág. 67). Entre *M. gracile* y *M. longepedunculatum* los valores de divergencia observados son de 0.009 y 0 para el ITS-1 y el ITS-2, respectivamente (Tabla 8, pág. 66). El estatus taxonómico de ambas especies está aun en discusión (Pengelly & Eagles, 1995). El otro par de especies con valores de divergencia bajos es *M. atropurpureum* y *M. ecuadoriense*. Para el ITS-1 el valor calculado es de 0, y de 0.057 en el ITS-2 (Tabla 8, pág. 66). Cabe señalar que Delgado Salinas & Torres Colin (2004) realizaron una nueva combinación: *Macroptilium ecuadoriense* (Hassler) L. Torres-Colín & A. Delgado elevando de rango a *Phaseolus atropurpureus* Sessé & Mociño ex DC. var. *ecuadoriense* Hassler. La poca divergencia hallada no justificaría esta nueva combinación. 

SISTEMÁTICA DE LA SUBTRIBU PHASEOLINAE

La subtribu Phaseolinae, con 26 géneros, es la mayor de las ocho subtribus que componen la tribu Phaseoleae de la subfamilia Papilionoideae. Debido al gran número de características morfológicas que comparten sus especies, es considerada un grupo natural, es decir, un grupo monofilético (Bruneau *et al.*, 1995). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, los taxones de la subtribu Phaseolinae forman un grupo monofilético bien soportado (Fig. 5 y 6, pág. 68 y 69), como lo señalaban estudios previos basados en otro tipo de caracteres (Bruneau *et al.*, *op. cit.*; Doyle, 1995). Como especies hermanas aparecen *Apios americana*, *Glycine max* y *Ophrestia radicosapert* pertenecientes a otras subtribus de la tribu Phaseoleae. El género *Pachyrhizus*, que en un principio formaba parte de la subtribu Phaseolinae, fue removido de la misma por Lackey (1977) y colocado en Diocleinae, aunque con ciertas reservas. Maréchal *et al.* (1978) concordaron con este cambio, ya que, en su análisis numérico, el género aparece separado por una distancia taxonómica considerable debido principalmente a las características de la inflorescencia, flor y fruto, muy diferentes al resto de los géneros de la subtribu. La posición de *Pachyrhizus erosus* en los árboles obtenidos variando la estrategia de búsqueda, sobre la base de caracteres moleculares, soporta la exclusión del género *Pachyrhizus* de la subtribu Phaseolinae (Fig. 5 y 6, pág. 68 y 69).

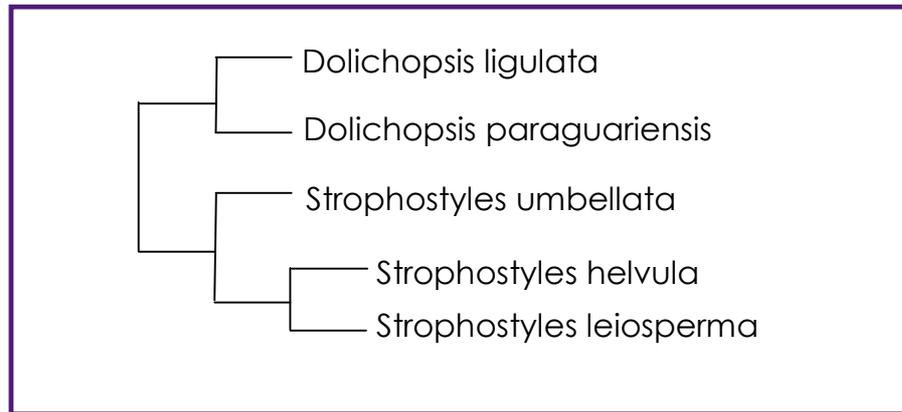
Dada la monofilia de la subtribu Phaseolinae, el análisis de la matriz en donde se incluyeron sólo los taxones de la subtribu permitió inferir ciertas relaciones apoyadas por los resultados de las distintas estrategias de búsqueda, mediante un estudio detallado de la topología de los árboles de consenso obtenidos (Figuras 7 a 16).

Algunas consideraciones derivadas de ese estudio se presentan a continuación.

Relación *Strophostyles* – *Dolichopsis*

El género *Strophostyles* está compuesto por tres especies, y el género *Dolichopsis* por dos, todas ellas analizadas en el presente trabajo. Las especies de estos géneros forman un grupo monofilético en la mayoría de los cladogramas, con un alto soporte, confirmando lo observado por Riley-Hulting *et al.* (2004). Las únicas excepciones lo constituyen el cladograma obtenido mediante optimización directa y costos iguales (Fig. 10, pág. 74), y los árboles obtenidos en el análisis morfológico (Fig. 17 y 18, pág. 82 y

83), en donde ambos géneros aparecen en clados separados. Cabe señalar que en el análisis morfológico no se incluyeron todas las especies, ya que ni *Dolichopsis ligulata* ni *Strophostyles helvula* fueron estudiadas para esos caracteres. A continuación, se muestra el agrupamiento de las especies en la mayoría de los cladogramas aquí obtenidos (cfr. Figuras 5 a 16).



Ambos grupos presentan ciertas características morfológicas similares, como las señaladas por Maréchal *et al.* (*op. cit.*), especialmente en cuanto a los pétalos que forman la quilla: su ápice se inclina hacia la derecha de la flor sin curvarse, mientras que en el resto de los géneros americanos, la quilla se curva por lo menos media vuelta. Además, en *Strophostyles* y *Dolichopsis*, los márgenes superiores de los pétalos de la quilla forman una protuberancia cerca del extremo distal, lo cual le provee mayor resistencia a la actividad de los polinizadores (Riley-Hulting *et al.*, *op. cit.*). También Lackey (1983) reportó una mayor afinidad de estos géneros entre sí que con los otros taxones americanos, debido a su aspecto general y por compartir un estilo angostado distalmente. Ambos géneros son estrictamente americanos, distribuyéndose *Strophostyles* desde Canadá a México, y estando *Dolichopsis* restringido al sudeste de Sudamérica. El resto de los géneros americanos se distribuyen a lo largo de todo el continente. A pesar de sus distribuciones disyuntas, *Strophostyles* y *Dolichopsis* parecen estar altamente emparentados morfológicamente y también a nivel molecular. Riley-Hulting *et al.* (*op. cit.*) proponen, sobre la base de otros ejemplos en Leguminosas, que los bosques templados de América del Norte podrían formar parte de una metacomunidad global, junto con bosques estacionales del resto de América. Estos dos géneros formarían parte de esa comunidad.

La posición del clado formado por estos dos géneros varía en los distintos árboles filogenéticos, aunque en general, muestra una mayor relación con *Mysanthus uleanus* y algunas especies de *Vigna* (ver Figuras 6, 8 y 15). La relación con estos géneros queda aún por dilucidar.

Relación *Ramirezella* – *Oxyrhynchus*

Maréchal *et al.* (1978) señalan en su estudio morfológico que *Oxyrhynchus* muestra una mayor afinidad con *Ramirezella*, *Strophostyles* y algunas especies del género *Vigna*. En el presente trabajo, la monofilia de estos dos géneros agrupados sólo es soportada por tres de los árboles analizados (Fig. 7, 8 y 16, pág. 71, 72 y 81), con bajo niveles de apoyo. Maréchal *et al.* (*op. cit.*) también señalan una gran similitud con el género *Lablab*; esta última relación tampoco se observa en los cladogramas obtenidos en el presente estudio. Por el contrario, Verdcourt (1970) expresa que *Oxyrhynchus* es más similar morfológicamente a *Dolichopsis* y *Dipogon*, lo cual tampoco es avalado por el presente estudio, dado que cuando no forman un grupo monofilético, *Ramirezella* y *Oxyrhynchus* aparecen relacionados con especies del género *Vigna* en la mayoría de los cladogramas y no con *Dolichopsis* y *Dipogon* (Fig. 5, 6, 9, 10 y 11, pág. 68, 69, 73, 74 y 75). Análisis de sitios de restricción de ADN del cloroplasto soportan la relación entre *Ramirezella* y *Oxyrhynchus* (Delgado Salinas *et al.*, 1993), además, sus especies aparecen emparentadas con taxones de *Vigna*, y separadas de otros géneros americanos como *Macroptilium* y *Phaseolus*. Sin embargo, en ciertas filogenias aquí obtenidas, el grupo hermano del clado *Ramirezella* - *Oxyrhynchus* es el género *Macroptilium* (Fig. 8, pág. 72) o éste junto con el género *Phaseolus* (Fig. 7, pág. 71). Para clarificar la relación entre estos géneros sería interesante analizar un mayor número de especies y obtener caracteres de nuevas fuentes.

Lackey (1983) propuso la inclusión de *Ramirezella* en el género *Vigna*, esta opinión no es compartida por Maréchal *et al.* (*op. cit.*) ni por el presente estudio, ya que las dos especies de *Ramirezella* analizadas (sobre un total de 7 que tiene el género) conforman un clado bien soportado, en general más relacionado con *Oxyrhynchus*, a pesar de que en algunos árboles muestra una cierta afinidad con especies de *Vigna* (ver Fig. 9, pág. 73). Además, el género *Ramirezella* presenta varias sinapomorfias morfológicas, como ser presencia de brácteas estériles en los primeros nudos florales, más de seis flores

por inflorescencia, alas de tamaño similar a la quilla y quilla no espiralada (Ochoterena & Delgado Salinas, 1994), que justificarían su estatus genérico.

Se puede observar en todas las topologías obtenidas para el género *Oxyrhynchus*, la inclusión de la especie *Vigna populnea* (Fig. 5 a 11). Esta especie mejicana, asignada al género *Vigna* por la morfología de su fruto, presenta una gran similitud floral con el género *Oxyrhynchus* (Delgado Salinas *et al.*, *op. cit.*). Sin embargo, se la sigue considerando como perteneciente al género *Vigna*, aunque no fue asignada a ninguno de sus subgéneros. El único autor que propuso su traspaso a *Oxyrhynchus* fue Lackey (*op. cit.*), pero no realizó formalmente el cambio. Las características morfológicas, los datos de sitios de restricción del ADN de cloroplasto y las secuencias de ADN nucleares justificarían la inclusión de *V. populnea* en el género *Oxyrhynchus*.

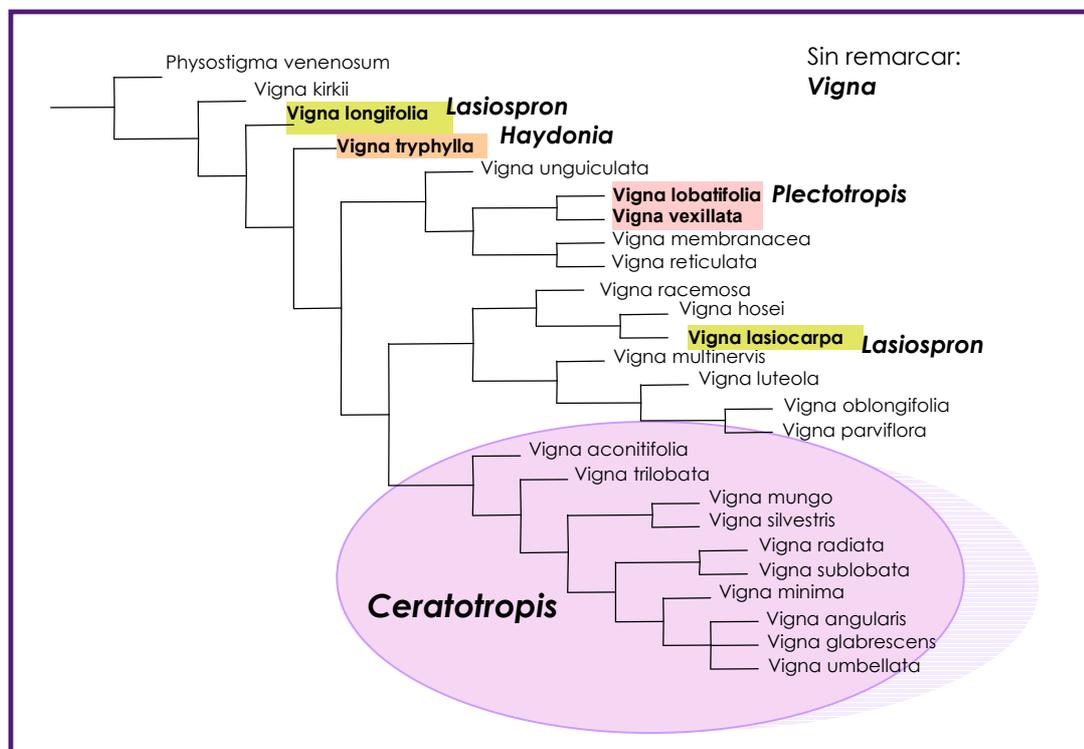
El problema de *Vigna* como género

Durante mucho tiempo, las especies de *Phaseolus* y *Vigna* fueron consideradas como parte de un complejo, dada su elevada afinidad. Fue a partir de los trabajos de Verdcourt (1970) y Maréchal *et al.* (1978) que ambos géneros comenzaron a tratarse en forma separada. Sin embargo, el alto número de especies consideradas como parte del género *Vigna*, hizo que su tratamiento infragenérico resultara sumamente confuso. No existen caracteres morfológicos que identifiquen todas las subdivisiones menores (Delgado Salinas *et al.*, 1993); ni tampoco los caracteres moleculares aquí estudiados pueden ser usados como diagnósticos de esas divisiones.

En todos los cladogramas aquí obtenidos, el género *Vigna* aparece como polifilético (Figuras 5 a 11). Por un lado es posible observar un clado compuesto por las mismas especies en todos los cladogramas, con *Physostigma venenosum* como taxón basal. El género africano *Physostigma* tiene muchas características similares a *Vigna*, como la quilla semejante a la de los subgéneros *Ceratotropis* y *Plectotropis*, o la presencia de una extensión del cáliz por sobre la base de la quilla que lo asemeja a la sección *Condylostilis* y a *V. speciosa* del subgénero *Sigmoidotropis*. *Physostigma*, sin embargo presenta una particularidad en cuanto al raquis de la inflorescencia que lo asemeja, por un lado, al género *Phaseolus*, ya que algunas de sus especies tienen los nodos del raquis inflados y glandulosos (como puede verse en *Physostigmavenenosum*), característica presente en todas las especies de *Phaseolus*. Sin embargo, otras especies de *Physostigma* muestran raquis no inflados y sin glándulas, característica compartida con especies de

Vigna. Estas variaciones en los nodos del ráquis llevaron a Maréchal *et al.* (*op. cit.*) a sugerir el mantenimiento de *Physostigma* como género separado de *Vigna*. Los cladogramas obtenidos en el presente trabajo muestran a *P. venenosum* como grupo hermano de las especies de *Vigna* del Viejo Mundo, o bien totalmente desvinculado de la mismas, avalando lo propuesto por Maréchal *et al.* (*op. cit.*).

El clado conformado por la mayor parte de las especies de *Vigna* analizadas, muestra en todos los casos un muy alto soporte. Un clado similar fue obtenido por Delgado Salinas *et al.* (*op. cit.*) sobre la base de caracteres del ADN de cloroplasto. A continuación se representa este clado, que forma parte del árbol filogenético de la Figura 8 (pág. 72).



Este clado está compuesto por dos grupos; uno de ellos monofilético con el máximo soporte en todas las hipótesis, formado por las especies del subgénero *Ceratotropis*, estrictamente asiático. Un resultado similar fue hallado en los trabajos de Goel *et al.* (2002), sobre la base de los mismos datos moleculares pero utilizando estrategias de búsqueda distintas que las aquí empleadas, y por Verdcourt (1970) y

Maréchal *et al.* (1981) quienes, observando la morfología, señalaron la alta homogeneidad del subgénero.

El segundo grupo constituye un ensamblado parafilético de especies, conformado por taxones de los subgéneros *Vigna*, *Lasiospron*, *Haydonia* y *Plectotropis*. Uno de los subclados de este grupo está formado por *V. lobatifolia* y *V. vexillata*, del subgénero *Plectotropis*, y por especies de la sección *Catiang* (*V. unguiculata*) y *Reticulae* (*V. reticulata*) del subgénero *Vigna*. Vaillancourt *et al.* (1993) propusieron colocar estas últimas especies en el subgénero *Plectotropis*, basándose en caracteres de ADN del cloroplasto. Los resultados aquí presentados apoyarían esta proposición sólo si se incluye también a la especie *V. membranacea* de la sección *Macrodontae* del subgénero *Vigna*. Sin embargo, en el trabajo de Vaillancourt *et al.* (*op. cit.*) esta especie aparece en otro clado junto con especies del subgénero *Vigna*, por lo tanto, nuevos análisis deberían llevarse a cabo antes de realizar los cambios, pues la evidencia molecular disponible no es concluyente al respecto.

Dentro del mismo grupo parafilético aparecen especies americanas del subgénero *Lasiospron*, definido como tal por Maréchal *et al.* (1978) a partir de una sección del subgénero *Vigna*, sobre la base de caracteres morfológicos. Los datos de secuencia de ADN nuclear muestran a *V. lasiocarpa* y *V. longifolia* como afines a especies del subgénero *Vigna*, por lo tanto no es soportada la elevación a subgénero propuesta por Maréchal *et al.* (*op. cit.*).

Las restantes especies del género *Vigna*, todas pertenecientes al subgénero *Sigmoidotropis* y con distribución en el continente americano, se ubican en forma dispersa en los cladogramas (Fig. 5 a 11), por lo que los datos de secuencias de ITS no apoyan la monofilia del subgénero, y por lo tanto, la subdivisión en secciones, propuesta por Maréchal *et al.* (*op. cit.*) no tendría sentido. Es posible, igualmente, distinguir algunos subclados monofiléticos, como el formado por *V. adenantha*, *V. gentryi* y *V. linearis*, las dos primeras asignadas a la sección *Leptospron* y la última a la sección *Caracallae*, aunque aún no hay otros caracteres que reflejen esta afinidad. En la última revisión de la Flora de Nicaragua (Stevens *et al.*, 2001), los autores mencionan que debido a sus múltiples formas, la especie *Vigna adenantha* cuenta con muchos sinónimos, y que algunas formas pequeñas de esta especie han sido denominadas *Vigna gentryi*. Los resultados del presente trabajo avalarían el tratamiento de *V. gentryi* como sinónimo de *V. adenantha*. La otra especie de la sección *Caracallae*, *V. caracalla*, ocupa posiciones

diversas en los distintos cladogramas. Este último resultado concuerda con lo observado por Jaaska (2001) en su estudio isoenzimático de las especies americanas del género *Vigna*. Otro subclado es el formado por las especies *V. candida*, *V. speciosa* (sección *Sigmoidotropis*) y *V. peduncularis* (sección *Pedunculares*). Este último también es apoyado por datos de sitios de restricción del ADN de cloroplasto (Delgado Salinas *et al.*, 1993), pero no por caracteres isoenzimáticos (Jaaska, *op. cit.*).

El análisis de sitios de restricción del ADN de cloroplasto de Delgado Salinas *et al.* (*op. cit.*) resulta en la separación del género *Vigna* en dos clados, uno conformado por especies del subgénero *Sigmoidotropis* y otro con el resto de las especies del género. Contrariamente, en el presente estudio, con mayor número de especies analizadas, pudo observarse que el subgénero *Sigmoidotropis* no conforma un grupo monofilético, y su afinidad con el resto de las especies americanas de la subtribu Phaseolinae es aún incierta.

Es importante señalar en este punto, que el análisis de las secuencias de ITS de las especies del género *Vigna* obtenidas de la base de datos GenBank, indicó una alta probabilidad de que las mismas correspondan a secuencias parálogas o a pseudogenes. Es por esto que las conclusiones obtenidas deben ser tomadas con cautela. Cabe recordar que la mayoría de los trabajos encontrados en la bibliografía disponible fueron realizados sobre la base de este tipo de marcadores, por lo que no sería recomendable realizar cambios en el sistema clasificatorio, hasta tanto no sean incorporados otros tipos de caracteres, como por ejemplo las secuencias de otras regiones del genoma nuclear y del cloroplasto, para arribar a conclusiones más robustas y confiables.

Sin embargo, claramente el género *Vigna* debe ser redefinido para que conforme un grupo natural, ya que un taxón que excluya a las especies hoy asignadas al subgénero *Sigmoidotropis* sería apoyado con varias sinapomorfías por datos morfológicos, de ADN nuclear y de cloroplasto. Un análisis con mayor número de especies americanas de los distintos géneros de Phaseolinae permitiría reubicar a las especies de *Sigmoidotropis* en grupos monofiléticos ya existentes, o en nuevos agrupamientos.

Phaseolus y su división infragenérica

En todos los cladogramas aquí obtenidos, el género *Phaseolus* aparece como monofilético, con un muy buen soporte (Fig. 5 a 16), corroborando lo obtenido por Delgado Salinas *et al.* (1999). Cabe señalar que en el presente trabajo, la inclusión de

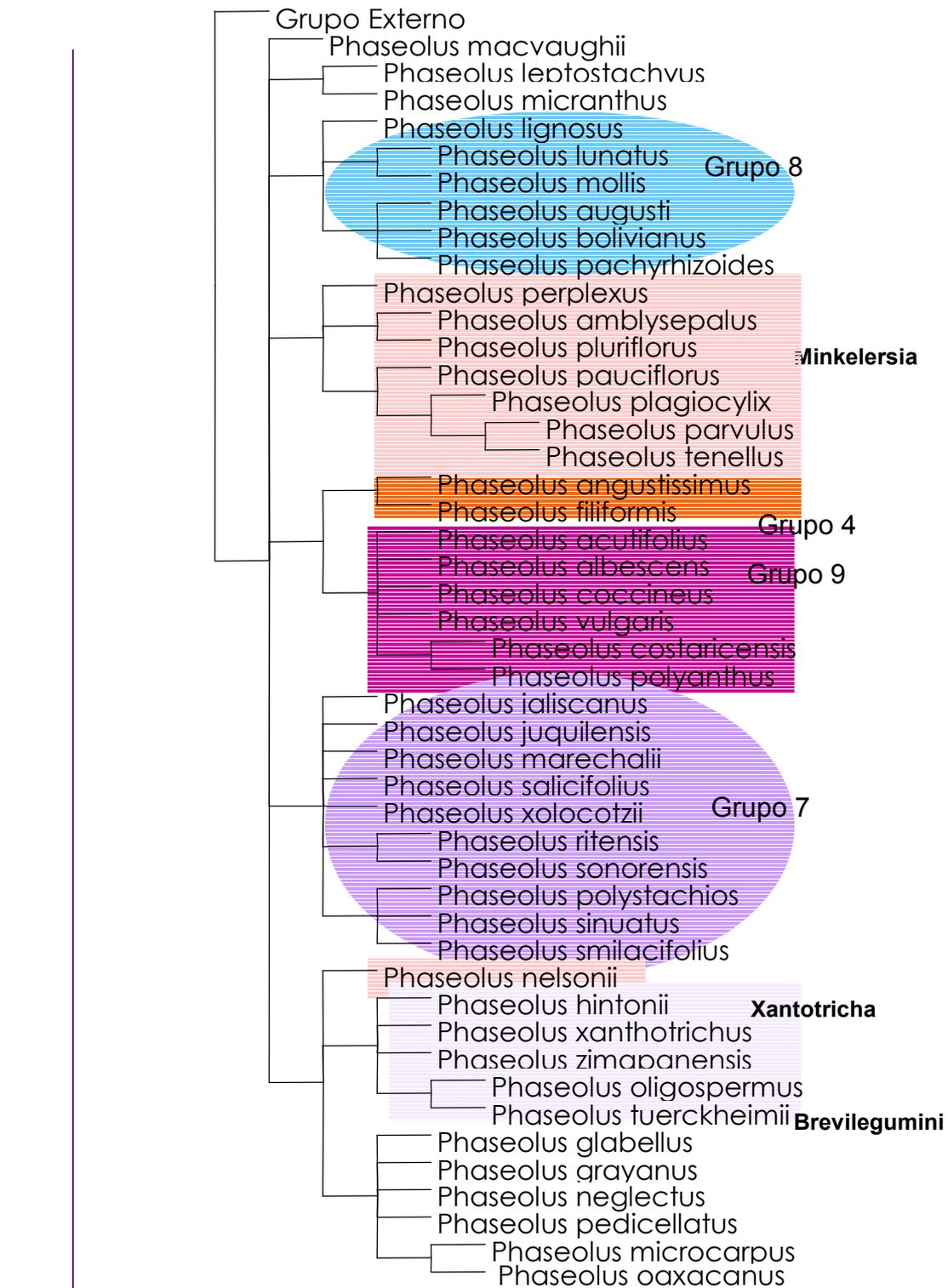
mayor número de especies como grupo externo hace más robusta la hipótesis de monofilia del género. Son sinapomorfias morfológicas de *Phaseolus* la torsión de la quilla, la ausencia de nectarios extraflorales en los nodos de la inflorescencia, la presencia de brácteas florales persistentes y los pelos uncinulados del tallo. El grupo hermano del género no está totalmente resuelto, ya que en algunos cladogramas aparece como tal el género *Macroptilium* (Fig. 9, 12, 13, 14 y 16), en otros algunas especies americanas del género *Vigna* (Fig. 7 y 11, pág. 71 y 75), o éstas junto con *Oxyrhynchus* (Fig. 5, 6 y 10, pág. 68, 69 y 74). En el cladograma de la Figura 15 (pág. 80) las especies de *Oxyrhynchus* son el grupo hermano de *Phaseolus*, mientras que en el árbol filogenético de la Figura 8 (pág. 72), es *Phaseolus* el que aparece como grupo hermano de un clado formado por la mayoría de las especies de Phaseolinae analizadas. Los análisis morfológicos realizados por Delgado Salinas *et al.* (*op. cit.*) tampoco resuelven al grupo hermano del género *Phaseolus*.

Si bien el género *Phaseolus* se comporta como monofilético con un buen soporte, no está claro cuál de sus especies podría ser basal en el grupo, ya que en cada cladograma obtenido esta posición es ocupada por distintas especies o grupos de especies. Delgado Salinas *et al.* (*op. cit.*) consideran a *P. microcarpus* como la rama más antigua del género, sin embargo en el presente trabajo, esta especie siempre aparece formando parte de otro grupo, el compuesto por las especies *P. neglectus*, *P. grayanus*, *P. pedicellatus*, *P. oaxacanus* y *P. glabellus*, y nunca aparece en la base del grupo *Phaseolus* (ver el árbol consenso representado en la pág. 105).

Los dos últimos tratamientos taxonómicos del género proponen distintas subdivisiones: Delgado Salinas *et al.* (*op. cit.*) la dividen en 9 grupos sobre la base de datos morfológicos y moleculares, mientras que Freytag & Debouck (2002) proponen una subdivisión en quince secciones sobre la base de caracteres morfológicos. De las secciones propuestas por Freytag & Debouck (*op. cit.*), sólo *Brevilegumini* resultó monofilética en el presente estudio; *Xantotricha*, por otro lado, aparece en todos los cladogramas como su grupo hermano. Los resultados aquí presentados están en mayor concordancia con lo sugerido por Delgado Salinas *et al.* (*op. cit.*) quienes las consideraron como un solo grupo, aunque el mismo no esté soportado por sinapomorfias morfológicas.

Minkelersia es una de las secciones que más tempranamente fue reconocida en el género *Phaseolus* (Lackey, 1983; Maréchal *et al.*, 1978), y está caracterizada por varios caracteres morfológicos, como por ejemplo flores con pétalos prolongados y tubulares,

superficie interna del cáliz cubierta con pelos uncinulados y semillas menores a 2,5 mm (Delgado Salinas *et al.*, *op. cit.*). Esta sección resultó monofilética en tres de los análisis realizados luego de alinear las secuencias (Fig. 9, 12 y 14, pág. 73, 77 y 79), mientras que en el resto aparece como parafilética (Fig. 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 15 y 16). Esta condición es debida a la posición de *P. nelsonii* en los cladogramas de las Figuras 5, 6 y 7 (pág. **¡Error! Marcador no definido.**, **¡Error! Marcador no definido.** y 71) y en la representación de la pág. 105, pero es oportuno recordar que la secuencia de esta especie probablemente no sea ortóloga, como se ha discutido en el análisis de las secuencias (pág. 92).



Representación de las relaciones observadas en los cladogramas obtenidos con secuencias de ADN nuclear

Las restantes 12 secciones propuestas por Freytag & Debouck (*op. cit.*) aparecen en los cladogramas como parafiléticas o polifiléticas, por lo que un análisis con nuevos

caracteres debería realizarse para poder arribar a mejores hipótesis de clasificación en el género.

Los grupos *Phaseolus filiformis* (número 4), *P. polystachios* (nº 7), *P. lunatus* (nº 8) y *P. vulgaris* (nº 9), definidos según Delgado Salinas *et al.* (*op. cit.*), son monofiléticos en todos los cladogramas obtenidos. Sin embargo, no hay características morfológicas que distingan a estos grupos, soportados solamente por datos de secuencias de ADN.

Las especies estrictamente sudamericanas *P. augusti*, *P. pachyrhizoides* y *P. bolivianus*, son tratados como variantes de una misma especie en un estudio con marcadores AFLP (“polimorfismo en el largo de fragmentos amplificados”) (Caicedo *et al.*, 1999). En todas las filogenias aquí obtenidas estas especies conforman un grupo monofilético con buen apoyo. Calculando las distancias genéticas entre sus secuencias (Tabla 10), se pudo verificar la escasa divergencia existente entre estas especies, en particular entre *P. augusti* y *P. pachyrhizoides*, por lo que los datos de análisis de secuencias apoyarían la hipótesis de Caicedo *et al.* (*op. cit.*) (una sola especie con tres variantes), o bien podrían ser consideradas como dos especies, una de ellas formadas por *P. augusti* y *P. pachyrhizoides*.

	<i>P. augusti</i>	<i>P. bolivianus</i>	<i>P. pachyrhizoides</i>
<i>P. augusti</i>	0	0,0399	0,0086
<i>P. bolivianus</i>	0,0277	0	0,040
<i>P. pachyrhizoides</i>	0,0078	0,0195	0

TABLA 10

Distancias genéticas basadas en datos de secuencias de las regiones ITS-1 (matriz inferior) e ITS-2 (matriz superior)

Las especies arriba mencionadas, junto con *P. lunatus*, habrían surgido por especiación simpátrica en la zona andina, de acuerdo a lo observado por Fofana *et al.* (1999) sobre la base de estudios de RFLP (“polimorfismo en el largo de fragmentos de restricción”) en ADN del cloroplasto. En el presente análisis cladístico, *P. lunatus* aparece más relacionada genéticamente a *P. mollis*, especie restringida a las Islas Galápagos, y este clado es hermano del clado formado por las tres especies estrictamente sudamericanas arriba mencionadas. Basada en estas evidencias, una explicación alternativa a la propuesta por Fofana *et al.* (*op. cit.*) sería la de un origen y evolución de *P. lunatus* en Mesoamérica, y una posterior migración hacia Sudamérica, en donde *P. augusti*, *P. bolivianus* y *P. pachyrhizoides* podrían haber evolucionado en forma simpátrica. 

SISTEMÁTICA DEL GÉNERO *MACROPTILIUM*

Varias especies de *Phaseolus* descritas por botánicos como Linneo (1763) y Bentham (1865), y asignadas a sus secciones *Macroptilium* y *Microcochle*, se distinguían morfológicamente del resto del género, por lo que Urban (1928) propuso un nuevo género *Macroptilium* en el que las incluyó. Tuvieron que pasar muchos años hasta que su propuesta tuviera amplia aceptación (Hutchinson, 1967; Maréchal, 1970; Verdcourt, 1970). El género *Macroptilium* (Benth.) Urban es estrictamente americano, sus especies son herbáceas, y puede ser distinguido de otros géneros de la subtribu Phaseolinae por varios caracteres morfológicos, como sus estípulas no prolongadas por debajo del punto de inserción, ausencia de pelos uncinulados, brácteas florales caducas, raquis de la inflorescencia con pequeños nódulos en la inserción de los pedicelos, ausencia de glándulas extraflorales en el raquis, pedicelo menor o igual al cáliz, estandarte simétrico desprovisto de callosidades, alas considerablemente más largas que el estandarte y la quilla, estilo y quilla recurvados hacia el ápice, estilo caduco, semillas pequeñas con hilo corto, legumbre no tabicada, polen tricolporado y exina finamente reticulada (Drewes, 1995).

La hipótesis de monofilia del género ha sido puesta a prueba pocas veces, y los escasos trabajos realizados al respecto se basaron únicamente en caracteres morfológicos y con un grupo externo muy reducido (Drewes, 1995, 1996). En ellos, *Macroptilium* aparece como género monofilético relacionado al género *Phaseolus*, esta última hipótesis también es apoyada por otros trabajos cladísticos que no abordaban el estudio específico del género *Macroptilium* (Delgado Salinas *et al.*, 1999; Goel *et al.*, 2002).

Con el objetivo de corroborar la monofilia del género se realizó un análisis cladístico basado en cuatro conjuntos de caracteres: datos morfológicos, datos de proteínas seminales, datos de secuencias de ADN nuclear y datos de secuencias de ADN de cloroplasto. Estos tres últimos tipos de caracteres fueron especialmente obtenidos para el presente estudio. Se realizaron dos estrategias de búsqueda de árboles óptimos, la primera basada en el análisis de cada conjunto de datos por separado, y la segunda considerando todos los caracteres en forma simultánea. Si bien este último tipo de análisis es el indicado en casos donde se puede suponer que los set de datos son estimas independientes de la filogenia, y además, tiene la ventaja que maximiza la parsimonia cladística (Nixon & Carpenter, 1996), como las matrices construidas con los distintos

caracteres no concuerdan en cuanto a su composición taxonómica, se decidió efectuar el análisis por separado, y a continuación realizar un análisis simultáneo con aquellas especies de las cuales se poseían los cuatro conjuntos de caracteres.

En total se analizaron las 18 especies aceptadas para el género. Algunas de las especies que aparecen en la bibliografía pero no fueron aquí estudiadas, son en realidad sinonimias:

- *Macroptilium brachycalyx* (Hassl.) Maréchal & Baudet es sinónimo de *M. sabaraense* (Hoehne) V.P. Barbosa ex G.P. Lewis.
- *M. domingense* Urb. y *M. eKm.anianum* Urb. son nombres provisorios, y fueron citados por última vez por Urban (1928).
- *M. geophilum* (Burkart) Debouck, Juarez & Perez es sinónimo de *M. panduratum* (Benth.) Maréchal & Baudet.
- *M. heterophyllum* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Maréchal & Baudet es sinónimo de *M. gibbosifolium* (Ortega) A. Delgado.

La monofilia de *Macroptilium*

En todos los análisis aquí realizados, el género *Macroptilium* resultó monofilético, en general con un muy buen soporte. Una de las excepciones a este buen apoyo lo constituye el análisis morfológico, ya que los dos árboles consenso obtenidos apoyan la monofilia del género, pero con un soporte relativamente bajo (ver Figuras 17 y 18, pág. 82 y 83).

El resultado del análisis cladístico de los datos de proteínas seminales corrobora la hipótesis de monofilia del género *Macroptilium* con un muy buen apoyo tanto en las búsquedas con pesos iguales (Fig. 19, pág. 85) como con pesos implicados (Fig. 20, pág. 88). Si bien las isoenzimas han sido ampliamente utilizadas en la inferencia de relaciones filogenéticas (Murphy *et al.*, 1996), las proteínas seminales también han mostrado ser de suma utilidad en estudios de Sistemática Vegetal, en especial en la familia Leguminosae (Fofana *et al.*, 1999; Maquet *et al.*, 1999; Przybylska, 1995). Como todos los caracteres utilizados en análisis cladísticos, las proteínas seminales pueden ser usadas para definir hipótesis de homologías, basadas en la movilidad que muestran en un campo eléctrico, ya que según su tamaño y carga neta, cada polipéptido migra de forma diferencial. Los

supuestos sobre los que se basan las hipótesis de homología son que las fracciones proteicas de igual movilidad poseen la misma secuencia de aminoácidos, por lo que provienen de una misma región genómica, y que son caracteres heredables.

El análisis filogenético de las dos regiones genómicas estudiadas corrobora la hipótesis de monofilia de *Macroptilium*. Los valores de apoyo son en general máximos, a excepción de los cladogramas presentados en las Figuras 9, 10, 11, 15, 16 y 23 (pág. 73, 74, 75, 80, 81 y 87).

El análisis simultáneo, si bien cuenta con un grupo externo reducido, apoya la monofilia de *Macroptilium* con un soporte Jackknife del 100%, y un índice de Bremer de 6 (Fig. 24, pág. 88). Las siguientes características son sinapomorfias morfológicas del género: en la flor, las alas poseen un tamaño mayor al estandarte; los dientes superiores del cáliz se encuentran libres; y se observa una rotación apical por debajo del estigma. Al observar la optimización de caracteres morfológicos en el cladograma obtenido en el análisis simultáneo (Fig. 26, pág. 113), aparecen como sinapomorfias además, la sección circular de la legumbre y la sección apical del estilo igual a su base. Sin embargo, estos dos caracteres aparecen también en las especies del género *Strophostyles* y el último de ellos en *Mysanthus uleanus*. Como en el análisis simultáneo estas especies no fueron incluidas, los caracteres podrían ser erróneamente inferidos como sinapomorfias de *Macroptilium*, pero el estudio de la matriz morfológica permitió descubrir la naturaleza homoplásica de estos estados de carácter.

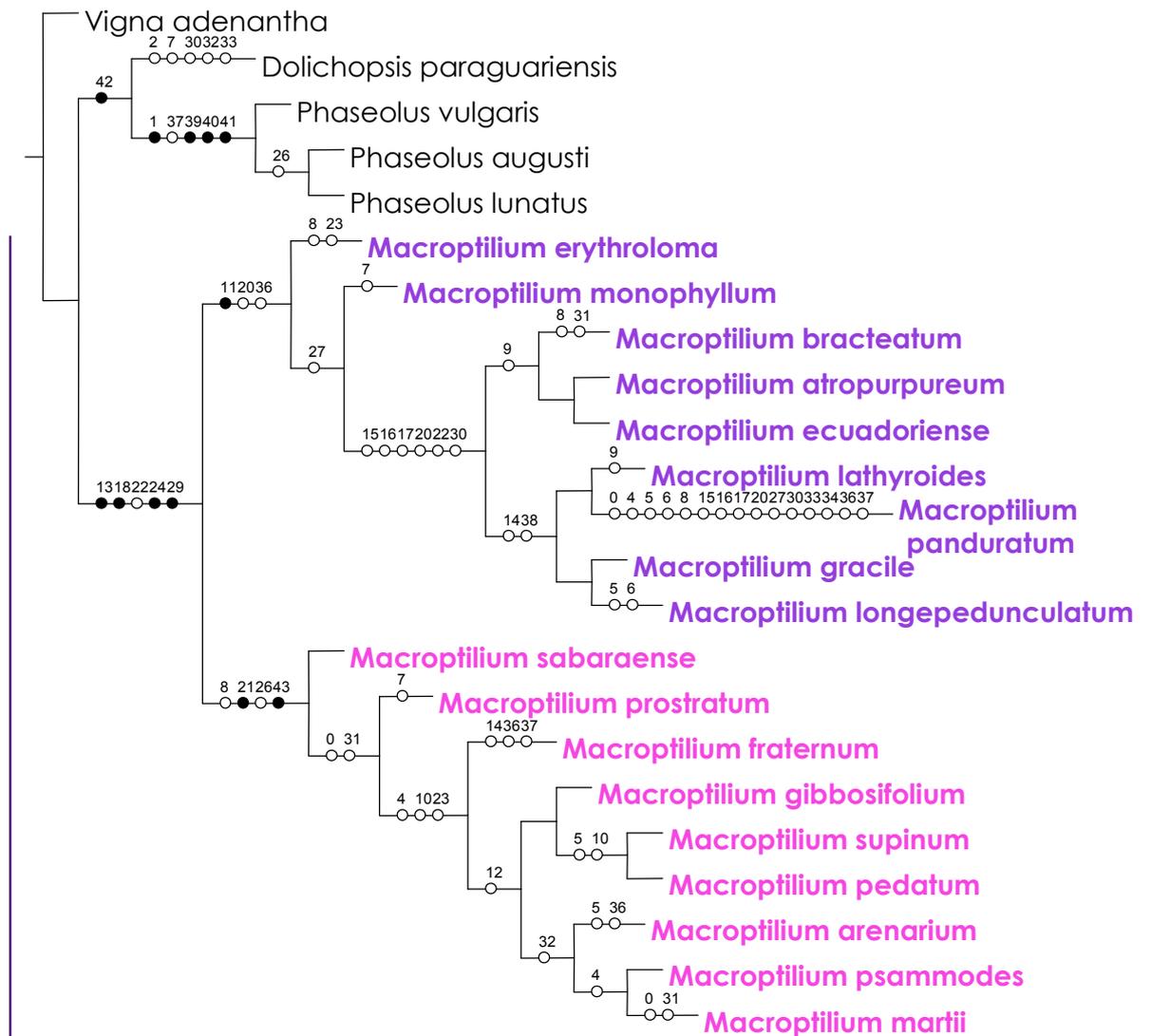


FIGURA 26

Uno de los cladogramas obtenidos en el análisis simultáneo, mostrando la optimización de los caracteres morfológicos. Los círculos negros representan homologías y los blancos, homoplasias. La numeración de los caracteres se presenta en el Apéndice B (pág. 124).

División infragenérica y relaciones interespecíficas en el género *Macroptilium*

Las secciones *Macroptilium* y *Microcochle* fueron definidas dentro de *Phaseolus* por Bentham (1865) sobre la base de características florales de un cierto grupo de especies. Cuando estas especies fueron transferidas al género *Macroptilium* por Urban (1928), no se consideró la subdivisión. Recién en el trabajo de Lackey (1983) surge la propuesta de subdividir al género, aunque este autor consideró tres secciones, incluyendo la sección *Monophyllum*, compuesta solamente por la especie *M. monophyllum*, morfológicamente intermedia entre los taxones de las otras dos secciones. Pocos trabajos han analizado la división infragenérica de *Macroptilium* desde un punto de vista cladístico (Drewes, 1995, 1996), éstos soportan la subdivisión de las mismas en sólo dos secciones: *Macroptilium* y *Microcochle*.

Sección *Microcochle*

En el presente análisis, la sección *Microcochle* aparece como polifilética en la mayoría de los cladogramas obtenidos a partir de datos de ITS y de proteínas seminales, principalmente debido a la posición errática de *Macroptilium sabaraense*. Si esta especie es removida del análisis, casi todos los resultados apoyan la monofilia de la sección, con excepción de los caracteres de ADN de cloroplasto. Los únicos dos análisis en los que el consenso muestra a *Microcochle* monofilética incluyendo en el muestreo a *M. sabaraense*, son el estudio morfológico y el análisis simultáneo (Figuras 17, 18, 24 y 25, pág. 82, 83, 88 y 89), en los cuales esta especie aparece basal en el grupo. En el análisis morfológico, los cladogramas consenso obtenidos con la búsqueda con pesos iguales y con pesos implicados (Fig. 17 y 18, pág. 82 y 83) muestran un buen apoyo para esta sección, ya que sus valores de Jackknife son superiores al 80%.

Los caracteres de secuencias de ADN nuclear apoyarían la monofilia de la sección si no se incluyera en ésta a *M. sabaraense* (Fig. 5 a 16). El clado que contiene a la mayoría de las especies de la sección *Microcochle* tiene un soporte Jackknife de 100% y un Índice de Bremer mayor a 10 en casi todas las filogenias. Los caracteres de secuencias de ADN de cloroplasto no apoyan la monofilia de la sección *Microcochle* (Fig. 21, 22 y 23, pág. 86 y 87), la cual sería monofilética sobre la base de estos datos, si se excluyeran de la sección las especies *M. sabaraense* y *M. prostratum*. El análisis de las proteínas seminales

tampoco resuelve la monofilia de la sección, pero al realizar la búsqueda mediante pesos implicados (Fig. 20, pág. 88), la exclusión de la especie *M. sabaraense* resultaría en un agrupamiento natural del resto de las especies de *Microcochle*.

Las sinapomorfias morfológicas que definirían un grupo monofilético conformado por las especies de *Microcochle* (cfr. Fig. 17 y 18, pág. 82 y 83) son: el estigma no globoso y su posición lateral. El pequeño tamaño de las flores del grupo de especies de *Microcochle* (en general menores a 12 mm), característica que llevó a Bentham (1865) a ubicarlas en conjunto en una misma sección del género *Phaseolus*, no constituye una sinapomorfia del grupo en los árboles obtenidos, ya que flores del mismo tamaño se observan en las especies del género *Strophostyles*. El cáliz campanulado, descrito por Piper (1926) como característico del grupo, aparece en todas las especies de la sección, pero como también se observa en el grupo hermano del género, no es un carácter sinapomórfico.

Los análisis de secuencias del ADN nuclear y del cloroplasto apoyan la relación de *M. arenarium* con *M. psammodes*, y de *M. gibbosifolium* con *M. supinum* (Fig. 5 a 16 y 21 a 23). En el primer caso, la divergencia genética calculada para este par de especies resultó ser cercana a 0 para ambas regiones analizadas (Tablas 8 y 9, pág. 66 y 67). El análisis cladístico además, apoya con un valor Jackknife mayor al 95% el agrupamiento de estas dos especies. El primero de estos taxones fue considerada inicialmente como variedad de *M. prostratum* (Troncoso de Burkart & Bacigalupo, 1987). *M. prostratum* var. *arenarium* difiere de *M. prostratum* por formar raíces adventicias en los nudos caulinares e inflorescencias subterráneas con flores cleistógamas y frutos subterráneos, además de las inflorescencias aéreas. La posición en los cladogramas de *M. arenarium* separado de *M. prostratum*, además de los valores de divergencia genética hallados (0,0433; 0,0573 y 0,108) (cfr. Tablas 8 y 9, pág. 66 y 67), avalan la elevación a especie de la primera, realizada por Drewes & Palacios (1994b). *M. psammodes*, por otro lado, fue transferida al género *Macroptilium* (Drewes & Palacios, 1994a), ya que en un principio era considerada una especie del género *Phaseolus*. Los datos moleculares aquí presentados apoyan esa nueva combinación. En los análisis morfológicos y de proteínas seminales, *M. psammodes* aparece más relacionada con *M. prostratum* (Fig. 17 a 20, pág. 82, 83 y 88). Sin embargo, los valores de divergencia hallados sobre la base de caracteres moleculares entre *M. prostratum* y *M. psammodes* (0,0387; 0,0524 y 0,0449) son del mismo orden que los hallados entre *M. prostratum* y *M. arenarium* (0,0042; 0,0046 y 0,0269) (cfr. Tablas 8 y 9,

pág. 66 y 67), además, son mayores que los hallados entre cualquier otro par de especies. Los bajos valores de divergencia hallados entre *M. arenarium* y *M. psammodes* podrían estar indicando una especiación reciente de ambos taxones, o bien permiten considerar la posibilidad de que *M. psammodes* y *M. arenarium* constituyan una única especie. Estos resultados no contradicen la posibilidad de considerar a *M. arenarium* como la especie de más reciente aparición, hipótesis soportada por su distribución geográfica más restringida. Esta especie posee representantes solamente en las provincias argentinas de Corrientes, Entre Ríos y Santa Fé, asociada preferentemente a suelos arenosos; mientras que *M. psammodes* se encuentra, además, en Brasil, Paraguay y Uruguay (Drewes, 1997).

La agrupación de *M. supinum* con *M. gibbosifolium* está sustentada por los datos de secuencias genómicas y de proteínas seminales (Fig. 5 a 16, 19 a 23), pero en el análisis morfológico *M. supinum* aparece relacionada a *M. pedatum* y no a *M. gibbosifolium* (Fig. 17 y 18, pág. 82 y 86), si bien debe considerarse que la relación entre *M. supinum* y *M. pedatum* no está apoyada por caracteres únicos, y además no tiene un buen soporte estadístico. Las tres especies crecen en México, mientras que el resto de las especies de la sección *Microcochle* habitan en la región más austral del continente Americano, es decir, en localidades de Brasil, Bolivia, Argentina y Paraguay.

Es evidente que la posición de la especie *Macroptilium sabaraense* en esta sección es problemática. El análisis de sus secuencias, tanto nucleares como cloroplásticas, muestra una mayor afinidad con especies de la sección *Macroptilium* (Tablas 8 y 9, pág. 66 y 67). Morfológicamente, muchos de los caracteres que posee esta especie están también presentes en el resto de las especies de la sección *Microcochle*, pero su estambre vexilar ensanchado y la forma de sus semillas la relacionan con la otra sección. Además, es interesante destacar que dentro de la lista de sinonimias de esta especie, figura *Phaseolus prostratus* Bentham var. *longepedunculatus* Micheli, que también aparece en la lista de sinonimias de *Macroptilium longepedunculatum*, especie asignada a la sección *Macroptilium*. Lamentablemente, no se poseen registros palinológicos de *M. sabaraense*, los cuales podrían clarificar su posición en el género, dado que palinológicamente las dos secciones son fácilmente diferenciables (Torres Colin *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren la transferencia de *M. sabaraense* a la sección *Macroptilium*, lo cual debería ser avalado por la evidencia palinológica o nuevos caracteres moleculares.

Sección *Macroptilium*

Con excepción del análisis simultáneo (Fig. 24 y 25, pág. 88 y 89) y del análisis morfológico (Fig. 17 y 18, pág. 82 y 83), la sección *Macroptilium* aparece como parafilética o polifilética en todas las búsquedas aquí realizadas. Utilizando la matriz de caracteres morfológicos, la sección sólo es sustentada como un grupo monofilético por el análisis realizado con pesos implicados (Fig. 18, pág. 83). Sin embargo, sus valores de apoyo Jackknife y Bremer son demasiado bajos (menores al 50% y 0,05 respectivamente) como para que la hipótesis de monofilia sea robusta. Los caracteres morfológicos que aparecen como sinapomorfias en este cladograma son el cáliz tubuloso y la proyección lateral del disco nectarífero. En el cladograma consenso obtenido con costos de transformación iguales aplicados a la misma matriz, la sección *Macroptilium* no se resuelve (Fig. 17, pág. 82). Si se realiza la búsqueda con pesos iguales forzando la monofilia de la sección sobre la matriz morfológica, el largo de los árboles óptimos no cambia, aunque debe considerarse que en sólo 10 de los 58 cladogramas, la sección *Macroptilium* aparece como monofilética. Si bien en el consenso no se resuelve este grupo, alguna de las topologías óptimas sí apoyan el clado, por lo que la hipótesis de monofilia de la sección no es totalmente refutada por los datos morfológicos.

Las proteínas seminales parecen no apoyar la monofilia de esta sección (Fig. 19 y 20, pág. 88). Sin embargo, examinando los árboles óptimos obtenidos bajo pesos iguales y el obtenido bajo pesos implicados, se puede observar que la sección queda parafilética debido a la posición de *Macroptilium sabaraense*. Cuando el análisis cladístico se realizó forzando la monofilia de la sección, el largo de los árboles óptimos aumentó en un paso, debido a la posición de *M. sabaraense* por afuera del clado *Macroptilium*.

Algo similar ocurre con los datos de secuencia, ya que en ninguna de las búsquedas la sección *Macroptilium* aparece como monofilética (Fig. 5 a 16, 21 y 22). Al forzar la monofilia de la sección, los árboles óptimos obtenidos son algunos pasos más largos que en las búsquedas sin la restricción, por lo que estos caracteres no podrían considerarse una evidencia definitiva que soporte esta subdivisión.

Por último, el análisis realizado sobre la matriz con todos los caracteres estudiados en conjunto sustenta la hipótesis de monofilia de la sección *Macroptilium*, apoyada con un 70% según el valor Jackknife, y un soporte de Bremer de 3 (Fig. 24, pág. 88) en la búsqueda con pesos iguales. El análisis de la misma matriz con pesos implicados, también

apoya la monofilia de la sección, con apoyos de 84% y 0,61 (Fig. 25, pág. 89). Además de los caracteres morfológicos arriba mencionados, tres sitios nucleotídicos de la región ITS y uno de la región IGS son sinapomorfias de la sección.

Es interesante destacar la relación entre algunas de las especies asignadas a esta sección. *M. longepedunculatum* y *M. gracile* forman en todos los cladogramas un clado monofilético, con un apoyo Jackknife de 100% y un Bremer de 10 o más. Las secuencias de la región ITS muestran un valor de divergencia cercano a 0 para el ITS-1 y de 0 para el ITS-2 (Tabla 8, pág. 66), indicando la alta afinidad genética de ambos taxones. Sus perfiles proteicos, además, son casi indistinguibles. El tratamiento taxonómico de estas entidades ha sido confuso, debido a su gran similitud morfológica. Piper (1926) consideró que *M. gracile* y *M. longepedunculatum* (en ese momento asignadas al género *Phaseolus*) son formas extremas de una misma especie, solo distinguibles por la forma de la lámina foliar, existiendo muchos ejemplares intermedios. El autor señala que *Phaseolus gracilis* tiene prioridad, por haber sido descrita antes que *P. longepedunculatus*. Maréchal *et al.* (1978) consideran a ambos taxones como especies distintas. Si bien estos autores comentan la visión de Piper (*op. cit.*), y no la contradicen ya que según su análisis morfológico, el índice de similitud de estas dos especies es del 88%, deciden considerarlas como entidades separadas, y proponen realizar un estudio bioquímico para aclarar la afinidad entre ellas. En su análisis de las especies brasileñas del género *Macroptilium*, Barbosa Fevereiro (1986) considera estos dos taxones como sinónimos, utilizando el nombre *M. gracile* como lo propusiera Piper (*op. cit.*), describiendo una especie con una amplia distribución y morfológicamente muy diversa. La última referencia a estas especies en la literatura la realizaron Pengelly & Eagles (1995), quienes hicieron un análisis morfológico y geográfico, y observaron dos grupos en *M. gracile* (*sensu* Piper) caracterizados por la presencia o no de anficarpía, largo del internodo y forma del folíolo primordial, entre otros atributos. Los autores sugieren considerar dos especies, diferenciadas principalmente por la presencia y ausencia de flores cleistógamas. En el trabajo que originó la presente tesis, se consideraron dos especies precisamente diferenciadas por la anficarpía y por los racimos geófilos, ambas características presentes en *M. longepedunculatum* y ausentes en *M. gracile*; sin embargo, el análisis de los caracteres moleculares apoyaría el tratamiento de ambas entidades como una misma especie.

Las especies *M. atropurpureum* y *M. ecuadoriense*, también de la sección *Macroptilium*, presentan una similitud de la región genómica ITS muy alta, siendo idénticas en cuanto a la región ITS-1 (Tabla 8, pág. 66). En todos los cladogramas obtenidos con estas secuencias, las especies conforman un grupo monofilético con alto soporte (Figuras 5 a 16). La elevada afinidad genómica representada por una divergencia cercana a 0 para los ITS soporta su tratamiento como parte de una misma especie. Recién en 2004 se realizó la elevación de *M. ecuadoriense* a especie a partir de una variedad de *M. atropurpureum* (Delgado Salinas & Torres Colin, 2004). Los autores sustentan esta propuesta en características florales: *M. ecuadoriense* posee pétalos rojos con pelos claramente distinguibles en las alas y cáliz tubular (este último carácter de la sección *Microcochle*), mientras que *M. atropurpureum* presenta pétalos florales de color granate oscuro, alas glabras y cáliz campanulado, como el resto de las especies de la sección *Macroptilium*. Sin embargo, la propuesta de los autores aún no ha sido formalmente aceptada. Hasta el momento, la existencia de ambos taxones como especies distintas no está sustentada por los datos de secuencia de ADN.

Las relaciones entre las otras especies de la sección *Macroptilium* varían de acuerdo a los datos utilizados para los análisis cladísticos. *M. lathyroides* y *M. panduratum* presentan una gran similitud en cuanto a las secuencias de las regiones ITS-1 e ITS-2 (Tabla 8, pág. 66), por lo que en los cladogramas obtenidos a partir de estos caracteres, ambos taxones aparecen unidos formando un clado monofilético con alto apoyo (Figuras 5 a 16). Sin embargo, esta afinidad no aparece en los otros análisis. En el estudio morfológico, *M. lathyroides* se presenta formando un grupo monofilético en el consenso de la búsqueda bajo pesos iguales y bajo pesos implicados (Fig. 17 y 18, pág. 82 y 83) junto con *M. bracteatum*, *M. atropurpureum*, *M. gracile* y *M. longepedunculatum*. Este clado está soportado por caracteres relacionados con el estandarte floral, ya que su forma oblonga, su uña poco diferenciada y su aurícula pequeña aparecen como sinapomorfias en ambos tratamientos. Las especies que no quedan agrupadas en este clado son *M. erythroloma*, *M. monophyllum* y *M. panduratum*, ya que se diferencian del resto en cuanto a su estandarte, cuya forma es suborbicular, con aurículas prominentes y uña claramente diferenciada. El análisis de las proteínas seminales muestra una mayor afinidad de *M. lathyroides* con *M. erythroloma*, *M. atropurpureum* y *M. bracteatum* (Fig. 19 y 20, pág. 85).

La especie *Macroptilium monophyllum* fue asignada a la sección *Monophyllum* por Lackey (1983) debido a su aspecto intermedio entre las especies de las otras dos secciones. Esta especie tiene la particularidad de poseer hojas unifolioladas, característica única en el género *Macroptilium* y géneros relacionados, ya que en general en la subtribu *Phaseolinae* las hojas son trifolioladas. Los únicos datos analizados de la especie en el presente estudio fueron los morfológicos. Según estos caracteres, *M. monophyllum* parece estar más relacionada con *M. erythroloma*, con quien comparte la posición del estigma, que es subterminal (Fig. 18, pág. 83). Hassler (1923) describió a lo que hoy se considera *M. erythroloma* como una variedad de *Phaseolus monophyllus* Benth. (sinónimo de *M. monophyllum*). La ubicación de *M. monophyllum* en una sección distinta de *Macroptilium* y *Microcochle* no es soportada por el presente análisis, ya que la especie aparece incluida dentro del clado con la mayoría de las especies de la sección *Macroptilium*, por lo que su tratamiento dentro de este grupo sería lo más conveniente. 

CONCLUSIONES FINALES

El extensivo muestreo de especies de la subtribu Phaseolinae (Phaseoleae, Leguminosae) y de subtribus y tribus afines en el presente estudio, permitieron sustentar la monofilia de varios de sus géneros. Se pudo corroborar la monofilia del género *Phaseolus* y de *Macroptilium*, y se observó la gran afinidad entre dos géneros de distribución disyunta, como *Strophostyles* y *Dolichopsis*.

Este trabajo soportan al género *Vigna* como monofilético, si se remueve del grupo a las especies del subgénero *Sigmoidotropis*, que, por su posición dispersa en los cladogramas, hacen dudar acerca de su agrupación en una misma categoría taxonómica. Las especies de *Vigna* del Viejo Mundo, junto con *V. lasiocarpa* y *V. longifolia*, conforman un clado monofilético con excelente apoyo estadístico. Del presente estudio surge, además, la recomendación de transferir la especie *Vigna populnea* al género *Oxyrhynchus*.

La subdivisión del género *Phaseolus* es aún incierta, debiéndose agregar un mayor número de caracteres moleculares a los morfológicos, para poder respaldar las secciones o grupos propuestos hasta el momento. El estatus específico de *P. augusti*, *P. bolivianus* y *P. pachyrhizoides*, debería ser revisado de acuerdo a los resultados del presente y otros aportes.

Con respecto al género *Macroptilium*, su monofilia es apoyada por todos los caracteres aquí estudiados, y por todas las estrategias de búsqueda ensayadas. Las alas florales mayores al estandarte, los dientes superiores del cáliz libres, y la rotación apical por debajo del estigma, son sinapomorfías morfológicas.

Por el contrario, su subdivisión en dos secciones no está del todo resuelta, apoyándose en este estudio más fuertemente a la sección *Microcochle*. Debería ser reevaluada la posición de la especie *Macroptilium* sabaraense, la que posee una mayor afinidad genética con las especies de la sección *Macroptilium*, dado que si se la considera parte de esta sección, la mayoría de los análisis soportarían la subdivisión del género en dos secciones monofiléticas. El estigma no globoso y su posición lateral aparecen como sinapomorfías morfológicas de la sección *Microcochle*, mientras que el cáliz tubuloso y la proyección lateral del disco nectarífero definen a una sección *Macroptilium* monofilética.

Los resultados aquí presentados no concuerdan con lo propuesto por Lackey (1983) al considerar a *M. monophyllum* como parte de una sección diferente de las otras dos.

Dentro de la sección *Microcochle*, el presente trabajo confirma la reciente elevación al rango de especie de *M. arenarium* a partir de *M. prostratum*. La primera especie y *M. psammodes* aparecen aquí muy relacionadas, indicando probablemente una especiación reciente.

Las tres especies mexicanas de la sección, *M. supinum*, *M. gibbosifolium* y *M. pedatum* aparecen en un mismo clado, confirmando la asociación geográfica con caracteres morfológicos y moleculares.

En cuanto a las especies asignadas a la sección *Macroptilium*, el análisis de los caracteres moleculares sustenta el tratamiento de *M. gracile* y *M. longepedunculatum* como una misma especie. La reciente elevación a especie de la variedad *ecuadoriense* de *M. atropurpureum*, no es soportada por los resultados del presente estudio.

Un análisis exhaustivo de los caracteres moleculares, morfológicos y bioquímicos, variando las estrategias de búsqueda, permitió arribar a conclusiones acerca de la monofilia de los géneros aquí estudiados y de sus divisiones infragenéricas con un alto grado de confiabilidad. Por último, en este trabajo se remarca la importancia de evaluar las homologías de los datos de secuencias moleculares como paso previo a un análisis filogenético, con el fin de tener una mayor confianza en los resultados y así poder realizar aportes a un sistema de clasificación más robusto. 

APÉNDICE A

SECUENCIACIÓN DE ADN

Buffer de extracción

0.1 M TrisHCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2 % CTAB, 1 % PVP, 0.2 % beta-mercaptoetanol.

Buffer TE

10 mM Tris, 1 mM EDTA.

Buffer TAE 1X

0.1 M Tris, 0.1 % Ácido acético glacial, 1 mM EDTA.

Loading buffer 10X

50% Glicerol, 0.25 % Azul de Coomasie, 0.25 % XyleneCianol, 0.5X buffer TAE.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SEMINALES

Buffer de tratamiento

0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% m/v SDS, 20% m/v Glicerol, 10% m/v 2-mercaptoetanol, 0.001% m/v azul de bromofenol.

Buffer gel separador

1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% m/v SDS, 0.05% m/v persulfato de amonio, 0.005% m/v TEMED.

Buffer gel concentrador

0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% m/v SDS, 0.005% m/v persulfato de amonio, 0.001% m/v TEMED.

Buffer de electrodo

0.025 M Tris, 0.192 M Glicina pH 8.3, 0.1% m/v SDS.

Solución de Azul de Coomasie

0.05% m/v Azul de Coomasie, 12% m/v ácido tricloroacético.

Remoción de la solución colorante

Lavado en 7% v/v ácido acético.

APÉNDICE B

CARACTERES MORFOLÓGICOS

0. Hábito: variado (0), nunca voluble (1)
1. Pelos uncinulados en el indumento de la planta: ausentes (0), presentes (1)
2. Estructura del tallo: macizo (0), hueco (1)
3. Raíces tuberosas: ausentes (0), presentes (1)
4. Posibilidad de enraizar en nudos: ausente (0), presente (1)
5. Racimos geófilos: ausentes (0), presentes (1)
6. Flores cleistógamas: ausentes (0), presentes (1)
7. Consistencia de los folíolos: cartácea-coriácea (0), membranosa-papirácea (1)
8. Pedúnculo de la inflorescencia: sin bracteas (0), con bracteas en la inserción (1), con brácteas a cierta distancia (2)
9. Apice de la inflorescencia: no comoso (0), comoso (1)
10. Capullos: ocupando varios nudos distantes entre si (0), agrupados en nudos cercanos (1)
11. Forma del cáliz: campanulado (0), tubuloso (1)
12. Dientes del cáliz: menores que el tubo (0), iguales o mayores que el tubo (1)
13. Dientes superiores del cáliz: fusionados total o parcialmente (0), libres (1)
14. Estandarte: emarginado (0), recto o levemente hendido (1)
15. Forma de la lámina del estandarte: orbicular (0), aovada a oblonga (1)
16. Uña del estandarte: corta y bien diferenciada (0), poco diferenciada (1)
17. Aurículas del estandarte: prominentes (0), pequeñas (1)
18. Alas: iguales o menores que el estandarte (0), mayores que el estandarte (1)
19. Base del estambre vexilar: geniculado (0), ensanchado (1)
20. Disco nectarífero: aneliforme (0), con proyección lateral escasa (1), con gran proyección lateral (2)
21. Forma del estigma: globoso (0), no globoso (1)
22. Posición del estigma: terminal (0), lateral (1), lateral a subterminal (2)
23. Anillos de pelos estigmaticos: completo (0), incompleto (1), ausente (2)
24. Porción apical del estilo: ensanchada con respecto a la base (0), de igual tamaño que la base (1)
25. Rotación apical debajo del estigma: ausente (0), presente (1)
26. Número de óvulos: 6 o más, considerado abundante (0), escasos, menos de 6 (1)
27. Forma de la legumbre: falcada (0), recta (1)
28. Ángulo de la legumbre respecto al tallo: no patentes (0), patentes (1)
29. Sección de la legumbre: aplanada (0), circular (1)
30. Dehiscencia de la legumbre: no en espiral (0), en espiral (1)
31. Forma de las semillas: oblonga a elíptica (0), aovada (1), orbicular (2)
32. Modo de germinación: epígea (0), hipógea (1)
33. Estípulas primordiales: enteras (0), bífidas (1), dobles (2)
34. Forma del grano de polen: no esferoidales (0), esferoidales (1)
35. Amb (contorno del polen en vista polar): circular (0), subtriangular_a triangular (1)
36. Margo (zona periférica de las puntuaciones areoladas de la pared celular): ancho (0), angosto (1), ausente (2)
37. Apertura del grano de polen: tricolporado con colpo largo (0), tricolporado con colpo breve (1), porado (2)
38. Esculturación de los polos del grano de polen: reticulada (0), microreticulada (1), lisa, perforada, verrucosa u otra (2)
39. Nodos de la inflorescencia: nectaríferos (0), no nectaríferos (1)
40. Brácteas florales: persistentes (0), caducas (1)
41. Relación longitud pedicelo/cáliz (en antésis): pedicelo más corto (0), pedicelo más largo (1)
42. Bracteolas: persistentes (0), caducas (1)
43. Tamaño de las flores: mayor a 12 mm (0), menor a 12 mm (1)
44. Vestidura de la semilla: glabra (0), pubescente (1)

MATRIZ DE SECUENCIAS DE LAS REGIONES ITS-1 E ITS-2

Alineamiento de las especies usadas en el análisis simultáneo

	0	59
<i>Vigna adenantha</i>	TCATTGTCGATGCCTA-AA-CCAACCAGTTTGACCCG-TGAACCCGT-CCAC--ATC--C	
<i>Phaseolus augusti</i>	TCATTGTCGATGCCTC-AA-CCAACCAGTTGACCTG-CGAATCCGTATCAA--ACA--C	
<i>P. lunatus</i>	TCATTGTCGATGCCTC-AA-CCAACCAGTTGACCCG-CGAATCCGTATCAA--ACA--C	
<i>P. vulgaris</i>	TCATTGTCGATGCCTC-AA-ACAA----TCCACCCG-CGAATACGTACCAA--ACA--C	
<i>D. paraguariensis</i>	TCATTGTCGATGCCTC-AA-CCAACCAGTTTGACCCG-CGAATCTGT-CCAT--GTC--C	
<i>M. arenarium</i>	TCATTGTCGATACCTCAA-CCAACCAGTTTGACCCG-CGAACGCGT-ACAC--ATC--C	
<i>M. atropurpureum</i>	TCATTGTCGATGCCTC-AA-ACAACCAGTTGACCCG-TGAACGCGT-TCAC--ATC--C	
<i>M. bracteatum</i>	TCATTGTCGATGCCTC-AA-ACAACCAGTTTGACCCG-TGAACGCGT-TCAC--ATC--C	
<i>M. ecuadoriensis</i>	TCATTGTCGATGCCTC-AA-ACAACCAGTTGACCCG-TGAACGCGT-TCAC--ATC--C	
<i>M. erythroloma</i>	TCATTGTCGATGCCTC-AA-ACAACCAGTTTGACCCG-TGAACGCGT-TCAC--AAA--C	
<i>M. fraternum</i>	TCATTGTCGATACCTCAA-CAAACCAGTTTGACCCG-CGAACGCGT-TCAC--CTC--C	
<i>M. gibbosifolium</i>	TCATTGTCGATACCTCAA-CCAACCAGTTTGACCCG-CGAACGCGT-TCAC--ATC--C	
<i>M. gracile</i>	TCATTGTCGATGCCTCAAAAACAACCAGTTGACCCG-TGAACAAGT-TCAC--ATC--C	
<i>M. lathyroides</i>	TCATTGTCGAAACCCC-AA-ACAACCAGTTGACCCG-TGAACGCGT-TCAC--ATC--C	
<i>M. longepedunculatum</i>	TCATTGTCGATGCCTC-AA-ACAACCAGTTGACCCG-TGAACGCGT-TCAC--ATC--C	
<i>M. panduratum</i>	TCATTGTCGAAACCCC-AA-ACAACCAGTTGACCCG-TGAACGCGT-TCAC--ATC--C	
<i>M. prostratum</i>	TCATTGTCGATACCTCAA?CCAACCAGTTTGACCCGGAGAAGCGT-TCAC--ATC--C	
<i>M. psammodes</i>	TCATTGTCGATACCTCAA-CCAACCAGTTTGACCCG-CGAACGCGT-TCAC--ATC--C	
<i>M. sabaraense</i>	TCATTGTCGATGCCTC-AA-ACAACCAGTTGACTCG-AGAACGCGT-ACACAAATA--A	
<i>M. supinum</i>	TCATTGTCGATACCTCAA-CCAACCAGTTTGACCCG-CGAACGCGT-TCAC--ATC--C	
	60	119
<i>Vigna adenantha</i>	ACA-----ACGCAA---GGGTC-TG--GCTCGT--CCTCTCCCCTGCGGGT	
<i>Phaseolus augusti</i>	TGCACAACGGCTGG-----GG-----CTC--GTCCTCCCCTGTGCGT	
<i>P. lunatus</i>	ACA-----ACGACAACGGCTG-GG--GCTCGT--CCCCTCCCCTGTGCGT	
<i>P. vulgaris</i>	ACAACAACGCGCAAGGCCAGCGG---GGCACGCAAGTTCTC--CCACGACCAAGTGCCT	
<i>D. paraguariensis</i>	ACA-----CCGCAA---GGTCTGG-----CTC--GTCCTCCCTTGTGCGT	
<i>M. arenarium</i>	ACT-----CCGCAG---GGATCCGG--GCTCGC--GTCCGCCCTGCGGGT	
<i>M. atropurpureum</i>	ACA-----CCGCAA---GGCCCGG-----CTCT-GTCCGCCCTTGTGCGT	
<i>M. bracteatum</i>	ACA-----CCACAG---GGTCCGG-----CTCTCGTCCGCCCTGTGTGT	
<i>M. ecuadoriensis</i>	ACA-----CCGCAA---GGCCCGG-----CTCT-GTCCGCCCTTGTGCGT	
<i>M. erythroloma</i>	ACA-----CTGCAG---GGTCTGG-----TTC--GTCCGCCCTTGTGCGT	
<i>M. fraternum</i>	ACA-----CCGCAG---GGATCCGG--GCTCGC--GTCCGCCCTGCGGGT	
<i>M. gibbosifolium</i>	ACT-----CCGCGG---GGATCCGG--GCTCGC--GTCCGCCCTGCGGGT	
<i>M. gracile</i>	ACA-----CCGCAG---GGTCCG-----CCC--CCGCGCTCGA-----	
<i>M. lathyroides</i>	ACA-----CCGCAA---GGTCCG-----CCGAG---GCCGCCCTCGTGCCT	
<i>M. longepedunculatum</i>	ACA-----CCGCAG---GGTCCG-----CCC--CCGCGCTCGA-----	
<i>M. panduratum</i>	ACA-----CCGCAA---GGTCCGG--CCGAG---GCCGCCCTCGTGCCT	
<i>M. prostratum</i>	ACA-----CCGCAG---GGATCCGG--GCTCGC--GTCCGCCCTGCGAGT	
<i>M. psammodes</i>	ACT-----CCGCAG---GGATCCGG--GCTCGC--GTCCGCCCTGCGGGT	
<i>M. sabaraense</i>	ACA-----ACGCAA---GGATCCGG-----CTC--GTCCGCCCTTGTGCGT	
<i>M. supinum</i>	ACT-----CTGCAG---GGATCCGG--GCTCGC--GTCCGCCCTGCGAGT	
	120	
	179	
<i>Vigna adenantha</i>	C-----GAGTGGGAGGGGTCAT-----CATGCCTC---GTGCAGGTGGCC----A	
<i>Phaseolus augusti</i>	C-----GTCGAGAGGGCGGGCGGGCGACTCGGTGCCTC---GTGCATCCGGTCGCAAG	
<i>P. lunatus</i>	C-----GTCGAGAGGGCGGGCGGGCGACTCGGTGCCCC---GTGCATCCGGTCGCAAG	
<i>P. vulgaris</i>	TGTCGAGAGCGGGGTTGGCGTCTT-----GATGCCTT---GTGCATCCGGTCGCAAA	
<i>D. paraguariensis</i>	C-----GGGGGGAGGGGCGGT-----TGCCCGTGAACCTG-GTCCAG---	
<i>M. arenarium</i>	C-----GAGAGGGAGCGTGGCAG-----GCCCC---GTGCCG-GCACGA---	
<i>M. atropurpureum</i>	C-----GAGAGGGAGCGTGCCAC-----GCCTC---GTGCAGTCGGTCCG---	
<i>M. bracteatum</i>	C-----GTGAGGGAGCGTGCCAT-----GCCTC---GC---ATCGCACGG---	
<i>M. ecuadoriensis</i>	C-----GAGAGGGAGCGTGCCAC-----GCCTC---GTGCAGTCGGTCCG---	
<i>M. erythroloma</i>	C-----GAGAGGGAGGGCGCCAC-----GCCTC---GTGCCATCCGTCAA---	
<i>M. fraternum</i>	C-----GAGCGGGAGCGTGGCAG-----GCCCC---GTGCCG-GCACGA---	
<i>M. gibbosifolium</i>	C-----GAGCGGGAGCGTGGCAG-----GCCCC---GTGCCG-GCACGA---	
<i>M. gracile</i>	-----GAGGGGAGCGTGCCAC-----GCCCC---GTGCTGTGGTCCG---	
<i>M. athyroides</i>	C-----GAGAGGGACGGCGCCAC-----GCCCC---GTGCTATCGGCGAA---	
<i>M. longepedunculatum</i>	-----GAGGGGAGCGTGCCAC-----GCCCC---GTGCTGTGGTCCG---	
<i>M. panduratum</i>	C-----GAGAGGGACGGCGCCAC-----GCCCC---GCGCTATCGGCGAA---	
<i>M. prostratum</i>	C-----GAGAGGGAGCGTGCCG-----GCCCC---GTGCCG-GCACGA---	
<i>M. psammodes</i>	C-----GAGAGGGAGCGTGGCAG-----GCCCC---GTGCCG-GCACGA---	
<i>M. sabaraense</i>	C-----GAGAGGGAGGGTGCCAT-----GCCTA---GTGCAACCGGTGCA---	
<i>M. supinum</i>	C-----GAGGGGAGCGTGGCAG-----GCCTC---GTGCCG-GCSCGG---	

180 239

Vigna adenantha CCCGTCTCCCTCGGCCAAACACTAACCCCGGCGCTTGAC-GCGCCAAGGAATCTAAAGCT
Phaseolus augusti CCCGTGTCTCCCGACAAAACACTAACCCCGGCGCTTCAT-GCGCCAAGGAATACGAAGCT
P. lunatus CCCGTGTCTCCCGACAAAACACTAACCCCGGCGCTTCAT-GCGCCAAGGAATACGAAGCT
P. vulgaris CCCGTGTCTCCC-GACAAAAACTAACCCCGGCGTTTTAC-GCGCCAAGGAAAACGAAGCT
D. paraguariensis ---CTCTCTCCCGACGAAAACACTAACCCCGGCGCTTCAAAGCGCCATGGAACCGAAAGCT
M. arenarium ---CCCGTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAC-GCGCCAAGGAATTCAAAATT
M. atropurpureum ---CTCTCTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAT-GCGCCAAGGAATTTAAGATT
M. bracteatum ---CTCCCTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAT-GCGCCAAGGAATTTAAAATT
M. ecuadoriensis ---CTCTCTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAT-GCGCCAAGGAATTTAAGATT
M. erythroloma ---GTCTCTCTCGACAAAACACTAACCCCGGCGCTTCAT-GCGCCAAGGAATCTCAAGTT
M. fraternum ---CCCGTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAC-GCGCCAAGGAATTCAAAATT
M. gibbosifolium ---CCCGTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAC-GCGCCAAGGAATTCAAAATT
M. gracile ---CCCTCTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAC-GCGCCAAGGAATCTAAAACT
M. lathyroides ---GTCTCTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAT-GCGCCAAGGAATTTAAAGCT
M. longepedunculatum ---CCCTCTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAC-GCGCCAAGGAATCTAAAACT
M. panduratum ---GTCTCTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAT-GCGCCAAGGAATTTAAAGCT
M. prostratum ---CCCGTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAG-GCGCCAAGGAATTCAAAATT
M. psammodes ---CCCGTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAC-GCGCCAAGGAATTCAAAATT
M. sabaraense ---GTCCCTCGAGACAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAC-GCGCCAAGGAATTTAAGTT
M. supinum ---CCCGTCTCGGCCAAAACCTAACCCCGGCGCTTCAC-GCGCCAAGGAATTCAAAATT

240 299

Vigna adenantha GTGTTAGGTGCA-CCACCCGGGGACGGCGTCCACGGGCGTGTGCACGC-ACTACAAGTCA
Phaseolus augusti G---TAGGTGAG-GCAACCGAGGGACGTGTCCC---GCGGGTGCCCTTC-ACGACGACATG
P. lunatus GT--TAGGTGAG-GCAGCCGAGGGACGTGTCCC---GCGGGTGCCCTTC-ACGACGACATG
P. vulgaris GT--TAGGTGAG-GCAAACGGGGGACGTGTCCC---GCGGGCGCCTTC-ACGACGACATG
D. paraguariensis GT--TAGGTGCGGCACTCG-GGGACGGCGTCCC---GCGGGTGCCGTC-ACGACATGTTA
M. arenarium GA--TAGGTGCA-CGCCCG-GGGGACATGTCCC---GCGGGCGCTGTG-ACGTCAAGTCA
M. atropurpureum GA--TAGGTGCG-CACCC--AGGGACATGTCCC---ACGGGTGTCGTC-ACGTCAAGTCA
M. bracteatum GA--TAGGTGCA-CGCC--AGGGACATGTCCC---ACGGGTGTTGTG-ACGTCAAGTCA
M. ecuadoriensis GA--TAGGTGCG-CACCC--AGGGACATGTCCC---ACGGGTGTCGTC-ACGTCAAGTCA
M. erythroloma GA--TAGGTGCA-CACACCCGGGACGTGTCCC---ACGGGTGTCGTC-ACGTCAAGTCA
M. fraternum GA--TAGGTGCA-CGCCCG-GGGGACCTGTCCC---GCGGGCGCTGTG-ACGTCAAGTCA
M. gibbosifolium GA--TAGGTGCA-CGCCCG-GGGGACGTGTCCC---GCGGGCGCTGTG-ACGTCAAGTCA
M. gracile GA--TAGGTGCG-CGCC--AGGGACATGTCCC---ACGGGCGTCGTC-ACGTCAAGTCA
M. lathyroides GA--TAGGTGCG-CACGC--AGGGACATGTCCC---ATGGGTGTCGTC-ACGTCAAGTCA
M. longepedunculatum GA--TAGGTGCG-CGCC--AGGGACATGTCCC---ACGGGCGTCGTC-ACGTCAAGTCA
M. panduratum GA--TAGGTGCG-CACGC--AGGGACATGTCCC---ATGGGTGTCGTC-ACGTCAAGTCA
M. prostratum GA--TAGGTGCA-CGCCCG-GGGGACATGTCCC---GCGGGCGCTGTG-ACGTCAAGTCA
M. psammodes GA--TAGGTGCA-CGCCCGGGGGGACATGTCCC---GCGGGCGCTGTG-ACGTCAAGTCA
M. sabaraense GA--TAGGTGCA-CGCC--GGGACATGTCCC---G-GGGTGTGTC-ACGTCAAGTCA
M. supinum GA--TAGGTGCA-CGCTCGGGGGACGTGTCCC---GCGGGCGCTGTCTACGTCAAGCCA

300 359

Vigna adenantha TATGTAA-----TCACACATCGCCACCCCCC--ACGCCGAAAC-----
Phaseolus augusti TTATGTAA-----TCACACATCGTACCCCTT--TGCCC--GCCACACTTAACCAATTA
P. lunatus TTATGTAA-----TCACACATCGTCCCCCCC--TGCCC--GCCACACTTAACCAATTA
P. vulgaris TTATGTAA-----TCACACATCGTACCCCTT--CCTCC--A---CACTTAACCAATTA
D. paraguariensis TTACGTAA-----TCACACATCGTTACCCCCC-ACTCA--AAC-----
M. arenarium TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--ACTCC--AAC-----
M. atropurpureum TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--ACTCA--AAC-----
M. bracteatum TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--ACCAA--AAT-----
M. ecuadoriensis TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--ACTCA--AAC-----
M. erythroloma TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCCCACTCA--AAC-----
M. fraternum TGTAAAAATGTAA-TCACACATCGTTACCCCCC--ACTCC--AAC-----
M. gibbosifolium TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--ACTCC--AAC-----
M. gracile TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--ACTCA--AAC-----
M. lathyroides TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--ACTCA--AAC-----
M. longepedunculatum TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--ACTCA--AAC-----
M. panduratum TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--ACTCA--AAC-----
M. prostratum TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--ACTCC--AAC-----
M. psammodes TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--ACTCC--AAC-----
M. sabaraense TGTA-----TCACACATCGTTACCCCCC--CACTC-----CCACTTC
M. supinum TGTA-----TCACACATCGTTGCCCCC--ACTCC--AAC-----

	360		419
<i>Vigna adenantha</i>	---GTGCGGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>Phaseolus augusti</i>	AATGTGCAGCAGG--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGACC--TCCTCGTGGTT	
<i>P. lunatus</i>	AATGTGCAGC--A--GGGGTGTTGGAAGTTGACCTCCC	CGCAGACC--TCCTCGTGGTT	
<i>P. vulgaris</i>	AATGTGAGGC--AGTG-----GGTGAAAGTTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>D. paraguariensis</i>	---GTGCAGT--GG--G-----GGTGAAAGTTGACTTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. arenarium</i>	---GTGCTGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCGGTTCTCGTGGTT	
<i>M. atropurpureum</i>	---GTGCAGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. bracteatum</i>	---GTGCAGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACTTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. ecuadoriensis</i>	---GTGCAGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. erythroloma</i>	---GTGCTGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. fraternum</i>	---GTGCGGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCGTTCTCGTGGTT	
<i>M. gibbosifolium</i>	---GTGCAGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. gracile</i>	---GTGCAGC--G--G-----GGCGGAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. lathyroides</i>	---GTGCGGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. longepedunculatum</i>	---GTGCAGC--G--G-----GGCGGAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. panduratum</i>	---GTGCAGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. prostratum</i>	---GTGCAGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. psammodes</i>	---GTGCTGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCGGTTCTCGTGGTT	
<i>M. sabaraense</i>	AAAGTGCAGC--G--G-----GGTGAAAGTTGACTTCCC	CGCAGCTAGTTCTCGTGGTT	
<i>M. supinum</i>	---GTGCAGC--G--G-----GGTGAAAGCTGACCTCCC	CGCAGCCAGTTCTCGTGGTT	
	420		479
<i>Vigna adenantha</i>	GGTTGAAAAGTAAGTTCACGGTGGAGTCCCCCGGATAAA	-GGTGGATGGGCG-ACGCC	
<i>Phaseolus augusti</i>	GGTTGAAAAGCAGGTTCCGGACGGAGTCT-CCGACGATA	AACGGTGGATGAGCCCACGCTC	
<i>P. lunatus</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCGGGAAGGAGTCT-CCCGGATA	TCCGGTGGATGAGCCCACGCTC	
<i>P. vulgaris</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCGGGGCGGAGTCCCCACGATAA	-CGGTGGATGAGCCCACGCTC	
<i>D. paraguariensis</i>	GGTTGAAAAGGAAGTTCACGGCGGAGTTCCCCCGGATA	AATGGTGGATGAGCG-ATGCTC	
<i>M. arenarium</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGCGGGGTTCCCGCGATA	AATGGTGGATGAGCCCATGCTC	
<i>M. atropurpureum</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGTGGAGTTCGCGCGATA	AAATGGTGGATGAGCG-ATGCTC	
<i>M. bracteatum</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGTGGAGTTCGCGCGATA	AAATGGTGGATGAGCA-ATGCTC	
<i>M. ecuadoriensis</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGTGGAGTTCGCGCGATA	AAATGGTGGATGAGCG-ATGCTC	
<i>M. erythroloma</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGTGGAGTTCGCGCGATA	AAATGGTGGATGGGCG-ATGCTC	
<i>M. fraternum</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGCGGGGTTCCCGCGATA	AAATGGTGGATGGCCTATGCTC	
<i>M. gibbosifolium</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGCGGGGTTCCCGCGATA	AAATGGTGGATGAGCCTATGCTC	
<i>M. gracile</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGCGGAGTCCCGCGATA	AAACGGTGGATGAGCG-ATGCTC	
<i>M. lathyroides</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGCGGGTTCGCGCGATA	AAATGGTGGATGAGCG-ATGCTC	
<i>M. longepedunculatum</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGCGGAGTCCCGCGATA	AAACGGTGGATGAGCG-ATGCTC	
<i>M. panduratum</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGTGGAGTTCGCGCGATA	AAATGGTGGATGAGCG-ACGCTC	
<i>M. prostratum</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGCGGGGTTCCGTCGCG	ATAAATGGTGGATGAGCCTCCGCTC	
<i>M. psammodes</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGCGGGGTTCCCGCGATA	AAATGGTGGATGAGCCTATGCTC	
<i>M. sabaraense</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGTGGAGTTCGCCACGATA	AAATGGTGGATGAGTG-ATTCTC	
<i>M. supinum</i>	GGTTGAAAAGCAAGTTCACGGCGGGGTTCCCGCGATA	AAATGGTGGATGAGCCTATGCTC	
	480		539
<i>Vigna adenantha</i>	GAGACCAATCGTGC--G-GTGC-----GACTCC-AAC	GATATCGGACTTGTGTTGACCCA	
<i>Phaseolus augusti</i>	GAGACCAATCG-----TGCCTGCGGGACTCCCGAC	GTAATGGACTTACTGAC-CCCA	
<i>P. lunatus</i>	GAGACCAATCG-----TGGCTGTGGGACTCCGGAC	GTAATGGACTTACTGAC-CCCA	
<i>P. vulgaris</i>	GAGACCAATCG-----TGCCTGTGGGACTCC-GAC	GTAACGGACTTATCGAC-CCCA	
<i>D. paraguariensis</i>	GAGACCGATCGTGTGTTGTTGTT-----GACTCC	-GGCGTATGGAAC-----CGTA	
<i>M. arenarium</i>	GAGACCGATCG-----CGC-----GACCCC	-GACGCAACGAACTTCCCGAC-CCTA	
<i>M. atropurpureum</i>	GAGACCAATCGTGC--CTGTGT-----GACTCC	-AACGTGTTGAACTTCTGAC-CCTG	
<i>M. bracteatum</i>	GAGACCAATCGTGC--CTGCGT-----GACTCC	-AACGTAGAGAACTTCTGGAC-CCCA	
<i>M. ecuadoriensis</i>	GAGACCAATCGTGC--GTGTGT-----GACTGC	-AACGTGTTGAACTTCTGAC-CCTG	
<i>M. erythroloma</i>	GAGACCAATCGTGC--CCGTGC-----GACTCC	-AACGCACAGAACTTCTCCAC-CCTG	
<i>M. fraternum</i>	GAGACCGATCG-----CGC-----GACCCC	-GACGCAACGAACTTCTGAC-CCTA	
<i>M. gibbosifolium</i>	GAGACCGATCG-----CGC-----GACCCC	-GACGCAACGAACTTCCCGAC-CCTA	
<i>M. gracile</i>	GAGACCAATCGTGC--CTGCGC-----GACTCC	-GACGTACCGAACTTCCCGAC-CCTA	
<i>M. lathyroides</i>	GAGACCAATCGT-----CAC-----GACTCC	-GACGTACCGAACTTCCGGAC-CCTG	
<i>M. longepedunculatum</i>	GAGACCAATCGTGC--CTGCGC-----GACTCC	-GACGTACCGAACTTCCCGAC-CCTA	
<i>M. panduratum</i>	GAGACCAATCGTGC--CCGCGT-----GACTCC	-AACCTACCGAACTTCTCGAC-CCTA	
<i>M. prostratum</i>	GAGACCGATCG-----CGC-----GACCAC	-GACGTACCGAACTTCCCGAC-CCTA	
<i>M. psammodes</i>	GAGACCGATCG-----CGC-----GACCCC	-GACGCAACGAACTTCCCGAC-CCTA	
<i>M. sabaraense</i>	GAGACCAATCGTGC--GTGTGTTT-----ACTCC	-AACGTATTCAACTTCTTGAC-CCTA	
<i>M. supinum</i>	GAGACCGATCG-----CGT-----GACCCC	-GACGCAACGAACTTCTGAC-CCTA	

	540	582
<i>Vigna adenantha</i>	CGCGTC--CCG-TGTGCAAACCGAGGGCGCCATCTGCGAGACC	
<i>Phaseolus augusti</i>	CAAGCGCC-TC-TGTGC-----GCTACGTACGAGACC	
<i>P. lunatus</i>	CACGCGCCCTC-TGTGC-----GCTATCCACGAGACC	
<i>P. vulgaris</i>	CACGCGCCCTC-TGTGCAAACCGAGTGTGCCATCTACGAGACC	
<i>D. paraguariensis</i>	CGCGTC--CTC-GGGGGAAACCGAGGGTGCCATCAGCGAGACC	
<i>M. arenarium</i>	CGCACG--CTC-CGTGTAAACCGAACGTGCCATCAGCGAGACC	
<i>M. atropurpureum</i>	TGCATC--CTCTTGTGAAAACCGAGCGTGCCATCAGCGAGACC	
<i>M. bracteatum</i>	CGCATC--CTC-TGTGAAAACCGAGTGTGCCATTAGCGAGACC	
<i>M. ecuadoriensis</i>	TGCATC--CTC-TGTGAAAACCGAGCGTGCCATCATCGAGACC	
<i>M. erythroloma</i>	TGCATC--CTC-TGTGAAAACCGAGTGTGCGATNAGCNAGACC	
<i>M. fraternum</i>	CGCACG--CTC-TGTGTAAACCGAACGTGCCATCAGCGAGACC	
<i>M. gibbosifolium</i>	CGCACG--CTC-TGTGTAAACCGAACGTGCCATTAGCGAGACC	
<i>M. gracile</i>	CGCAAG--CTC-TGTGAAAACCGAGCGTGCCATCAGCGAGACC	
<i>M. lathyroides</i>	CGCATC--CTC-TGTGCAAACCGAGTGTGCCATCTGCGAGACC	
<i>M. longepedunculatum</i>	CGCAAG--CTC-TGTGAAAACCGAGCGTGCCATCAGCGAGACC	
<i>M. panduratum</i>	CGCATC--CTC-TGTGAAAACCGAGCGTGCATTAGCGAGACC	
<i>M. prostratum</i>	CGCACG--CTC-TGTGAAAACCGACGTGCCATCAGCGAGACC	
<i>M. psammodes</i>	CGCACG--CTC-CGTGTAAACCGAACGTGCCATCAGCGAGACC	
<i>M. sabaraense</i>	TGCATC--CTC-TGTGAAAACCGAGTGTGCC-----	
<i>M. supinum</i>	CGCACG--CTC-TGTGTAAACCGAACGTGCCATTAGCGAGACC	

MATRIZ DE SECUENCIAS DE LA REGIÓN IGS *TRNL-TRNF*

Alineamiento de las especies usadas en el análisis simultáneo

	0	59
Phaseolus vulgaris	--GGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAACCTGTTT-CACTTTCT-AA-TTTTTTC---	
M.arenarium	CATATAATTTTT--TGAATGAGAAAGGTATAAATGA-ATATATTC-TATTTTTTTC---	
M.atropurpureum	-----CAAGAAGCCCGTTT-CCCCTTCCGAGTTTTTTTCCCTA	
M.bracteatum	-----TTC---	
M.fraternum	-----CCAAAAAGCCCGTTG-CCCTTTCT-AATTTTTTTC---	
M.gibbosifolium	-----CCTCTATCCCCAAAAAGCCTGTTT-CACTTTCT-AATTTTTTTC---	
M.lathyroides	----GGTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAAGCCTGGTT-CCCTTTCT-AATTTTTTTC---	
M.longepedunculatum	--GGTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAAGCCTGTTT-CACTTTCT-AATTTTTTTCCTA	
M.panduratum	---GGTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAAGCCTGTTT-CACTTTCT-AATTTTTTTC---	
M.prostratum	TTGGGTGAAGNCCCGTATGCCACAAAGCCTTTTT-CCCTTTCT-AATTTTTTTC---	
M.psammodes	-----TCCCACGTTCT-AATTTTTTTC---	
M.sabaraense	-----CCAAAAAGCCTGTTCCACCTTTTCG-TATTTTTTTC---	
M.supinum	--GGTCAAGTCCCTCTGATCCCCAAAAAGCCTGTTT-CCCTTTCT-AATTTTTTTC---	
	60	119
P.vulgaris	-CTATACCCTCTCTATCTTTAAGTGGTTATTTATGTGTTTTATTTCGAATTTATTCTTTCC	
M.arenarium	-CTATCTCCTCTCTATCTTTAAGTCGTTATTTATGTGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
M.atropurpureum	TCTGTCTCCTCTCTATCTTTAAGTCGTTATTTATATGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
M.bracteatum	-CTATCTCCTCTCTATCTTTAAGTCGTTATTTATATGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
M.fraternum	-CTATCTCCTCTCTATCTTTAAGTCGTTATTTATGTGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
M.gibbosifolium	-CTATCTCCTCTCTATCTTTAAGTCGTTATTTATGTGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
M.lathyroides	-CTATCTCCTCTCTATCTTTAAGTCGTTATTTATGTGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
M.longepedunculatum	TCTATCTCCTCTCTATCTTTAAGTCGTTATTTATATGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
M.panduratum	-CTATCTCCTCTCTATCTTTAAGTGGTTATTTATATGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
M.prostratum	-CTATCTCCTCTCTATCTTTAAGTCGTTATTTATGTGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
M.psammodes	-CTATCTCCTCTCTATCTTTAAGTCGTTATTTATGTGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
M.sabaraense	-CTATCTCCTCTCTATCTTTAAGTCGTTATTTATATGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
M.supinum	-CTATCTCCTCTCTATCTTTAAGTCGTTATTTATGTGTTTTATTTCGA-TTTATTCTTTCC	
	120	179
P.vulgaris	CAACTAAATTGGAATTTTTATTTTCATCAATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.arenarium	CAACTAAATTGTAATTTTTATTTTCATCCATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.atropurpureum	CAACTAAATTGTAATTTTTATTTTCATCAATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.bracteatum	CAACTAAATTGTAATTTTTATTTTCATCAATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.fraternum	CAACTAAATTTTAATTTTTATTTTCATCAATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.gibbosifolium	CAACTAAATTGTAATTTTTATTTTCATCAATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.lathyroides	CAACTAAATTGTAATTTTTATGTTTCATCAATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.longepedunculatum	CAACTAAATTGTAATTTTTAGTTTCATCAATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.panduratum	CAACTAAATTGTAATTTTTATTTTCATCAATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.prostratum	CAACTAAATTGTAATTTTTATTTTCATCAATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.psammodes	CAACTAAATTGTAATTTTTATTTTCATCCATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.sabaraense	CAACTAAATTGTAATTTTTATTTTCATCAATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
M.supinum	CAACTAAATTGTAATTTTTATTTTCATCAATTTCCCTATCTATCATAATTTCTTACATAA	
	180	239
P.vulgaris	TCACAAGTCACTAGTTTTGGAATATATA----TATA--GATAGATATATA--TGTGAAAC	
M.arenarium	TGACAAGTCACTAGTTTTGGAATATCTA----TATA--GATAG--ATATA--TGTGAAAC	
M.atropurpureum	TGACAAGTCACTAGTTTTGGAATATATA----T-----ATAGATAGATA--TGTGAAAC	
M.bracteatum	TGACAAGTCACTAGTTTTGGAATATATA----TATATAGATAGATATATA--TGTGAAAC	
M.fraternum	TGACAAGTCACTAGTTTTGGAATATCTA----TATA--GATAG--ATATA--TGTGAAAC	
M.gibbosifolium	TGACAAGTCACTAGTTTTGGAATATCTA----TATA--GATAG--ATATA--TGTGAAAC	
M.lathyroides	TGACAAGTCACTAGTTTTGGAATATCTA----TATA--GATAT--A--TA--TGTGAAAC	
M.longepedunculatum	TGACAAGTCACTAATTTGGAATATATA----GATA--GATAG--A--TA--TGTGAAAC	
M.panduratum	TGACAAGTCACTAGTTTTGGAATATATATATATATA--GATAG--A--TA--TGTGAAAC	
M.prostratum	TGACAAGTCACTAGTTTTGGAATATCTA----TATA--GATAG--ATATA--TGTGAAAC	
M.psammodes	TGACAAGTCACTAGTTTTGGAATATCTA----TATA--GATAG--ATATA--TGTGAAAC	
M.sabaraense	TGACAAGTCACTAGTTTTGGAATATATA----TATA--GATAG--ATATATATGTGAAAC	
M.supinum	TGACAAGTCACTAGTTTTGGAATATCTA----TATA--GATAG--ATATA--TGTGAAAC	

240 299

P. vulgaris ACATATAAAAATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATTAATATCTTA-TTTTTAGCAAAGA
M. arenarium ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATGAATATATTCTTTTTTAGCAAGGA
M. atropurpureum ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATGAATATCTTCTTTTTTAGCAAGGA
M. bracteatum ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAATGTATAAATTAATATCTTATTTTTTAGCAAGGA
M. fraternum ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATGAATATCTTCTTTTTTAGCAAGGA
M. gibbosifolium ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATGAATATCTTCTTTTTTAGCAAGGA
M. lathyroides ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATTAATATCTTCTTTTTTACCAAGGA
M. longepedunculatum ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATAAATATCTTCTTTTTTAGCAAGGA
M. panduratum ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATTAATATCTTCTTTTTTAGCAAGGA
M. prostratum ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATAAATATCTTCTTTTTTAGCAAGGA
M. psammodes ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATGAATATATTCTTTTTTAGCAAGGA
M. sabaraense ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATTAATATCTTATTTTTTAGCAAGGA
M. supinum ACATAT--AATTTTTTTGAATGAGAAAGGTATAAATGAATATCTTCTTTTTTAGCAAGGA

300 359

P. vulgaris ATTTGAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATA-AAAGAATTATTACTACG-GAAACTC
M. arenarium ATTTAAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATA-AAAGAATTATTCTACG-GAAACTC
M. atropurpureum ATTTGAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATA-AAAGAATTATTCTACG-GAAACTA
M. bracteatum ATTTGAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATAGAAAGATTATTCTACGCGGAAACTA
M. fraternum ATTTAAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATA-AAAGAATTATTCTACG-GAAACTC
M. gibbosifolium ATTTAAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATA-AAAGAATGATTCTTACG-GAAACTC
M. lathyroides ATTTGAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATA-AAAGAATTATTCTACG-GAAACTA
M. longepedunculatum ATTTGAATATGCGTAATTAACGATTAACAATAGA-AAAGAATTATTCTACG-GAAACTA
M. panduratum ATTTGAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATA-AAAGAATTATTCTACG-GAAACTA
M. prostratum ATTTGAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATA-AAAGAATTATTCTACG-GAAACTA
M. psammodes ATTTAAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATA-AAAGAATTATTCTACG-GAAACTC
M. sabaraense ATTTGAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATA-AAAGAATTATTCTACG-GAAACTA
M. supinum ATTTAAATATGCGTAATTAACGATTAACAATATA-AAAGAATTATTCTTACG-GAAACTC

360 419

P. vulgaris ACTTACAA-----AC-TT---TTTT---TTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. arenarium ACTTACAAGTACAAACTTT---TTTT---TTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. atropurpureum ACT-----TACAAACTTT---TTTT---TTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. bracteatum ACT-----TACAAACTTT---TTTT---TTTTACTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. fraternum ACTTACAAGTACAAAC--T---TTTT---TTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. gibbosifolium ACTTACAAGTACAAAC-TT---TTTT---TTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. lathyroides AGTTACAA-----AC-TT---TTTTTTTTTTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. longepedunculatum ACTTACAA-----AC-TT---T-TTTTTTTTTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. panduratum ACTTACAA-----AC-TT---TTTT---TTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. prostratum ACTTACAA-----ATACAAACTTTT---TTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. psammodes ACTTACAAGTACAAAC-TT---TTTT---TTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. sabaraense ACTTACAA-----ACTTT---TTTT---TTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC
M. supinum ACTTACAAGTACAAAC-TT---TTTT---TTTT-CTTAGTTGATATAGATTCATTTAC

420 479

P. vulgaris ATATATTCCAATAATTTTTCAAATAAAAATCTTAAAGCTGCAAAATGGTCGGGATAGCT
M. arenarium ATATATTCAAAAATGTTTTCAAATCAAAGCTTAAAGCTGTAAGAATGGTCGGGATAGCT
M. atropurpureum ATATATTCCAATAATCTTTTTCAAATCAAAGTTTTACGCTGCAAGAATGGTCGGGATAGCT
M. bracteatum ATATATTCCAATAATCTTTTTCAAACCAAAGCTTACGCTGCAAGAATGGTCGGGATAAGC
M. fraternum ATATATTCCAAAAATATTTTTCAAATCAAAGCTTAAAGCTGTAAGAATGGTCGGGATAGCT
M. gibbosifolium ATCTATTCCAAAAATATTTTTCAAATCAAAGCTTAAAGCTGTAAGAATGGTCGGGATAGCT
M. lathyroides ATATATTCCAATAATCTTTTTCAAATCAAAGCTTAAAGCTGTAAGAATGGTCGGGATAGCT
M. longepedunculatum ATATATTCCAATAATATTTTTCAAATCAAAGCTTACGCTGCAAGAATGGTCGGGATAGCT
M. panduratum ATATATTCCAAAAATATTTTTCAAATCAAAGCTTACGCTGCAAGAATGGTCGGGATAGCT
M. prostratum ATATATTCCAATAATCTTGTCAAATCAAAGCTTAAAGCTGTAAGAATGGTCGGGATAGCT
M. psammodes ATATATTCCAAAAATGTTTTCAAATCAAAGCTTAAAGCTGTAAGAATGGTCGGGATAGCT
M. sabaraense ATATATTCCAATAATATTTTTCAAATAAAAGCTTACGCTGCAAGAATGGTCGGGATAGCT
M. supinum ATCTATTCCAAAAATATTTTTCAAATCAAAGCTTAAAGCTGTAAGAATGGTCGGGATAGCT

	480	539
<i>P.vulgaris</i>	CAGTTGGT-AGA-----G--CA-GAGGACTGAAAATC-CTCGTGTACC-----	
<i>M.arenarium</i>	CAGT--G-----	
<i>M.atropurpureum</i>	CAGT--GA-GGA-----G--CA-GAGGACTGAAAATC-CTCGGGTCACCGGTTCAAATA--	
<i>M.bracteatum</i>	TGGA-----	
<i>M.fraternum</i>	CATG--TTGGTAGGAGCAG--AG-GGACTGAAGAAGCC-GTCGTGGCACCCTTCAAATAG	
<i>M.gibbosifolium</i>	CAGT--TG-GTA-----GAGCARGAGGACTGAAAATC-CTCGTGTACC-----	
<i>M.lathyroides</i>	CAGT--GTGGTA-----AAGCA-AAGGACTGAAAATC-CCCGGGTCCCC-----	
<i>M.longepeduncula</i>	CAGT--GA-GTA-----RAGCA-AAGGACTGAAAATC-CTCGKGTCCCAGTTTCAAAAAA-	
<i>M.panduratum</i>	CAGTT-GG-T-A-----GAGCA-GAGGACTGAAAATC-CTCGTGTACC-----	
<i>M.prostratum</i>	CAGT--GG-G-A-----GAGCA-GAGGAGWGAAAAGC-C-----	
<i>M.psammodes</i>	CAGTT-GG-T-A-----GAGCA-GAGGACTGAACATCTCTCGTGTCCCCAGTTCAAATA--	
<i>M.sabaraense</i>	CAGT--GG-T-A-----GAGCA-GAGGACTGAGAATC-CGCGTGGCACCAGTTCAAATAA-	
<i>M.supinum</i>	CAGTT-GG-T-A-----GAGCA-GAGGACTGAAAATC-CTCGTGTACCAGTTCAAATAA-	

APÉNDICE C

SUBDIVISIONES PROPUESTAS PARA LOS GÉNEROS TRATADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO

Género *Macroptilium* (Bentham) Urban

Sección *Macroptilium*

- Macroptilium atropurpureum* (Sessé & Moc. ex DC.) Urb.
- Macroptilium bracteatum* (Nees & C. Mart.) Maréchal & Baudet
- Macroptilium ecuadoriense* (Sessé & Moc. ex DC.) L. Torres-Colin & A. Delgado
- Macroptilium erythroloma* (Mart. ex Benth.) Urb.
- Macroptilium gracile* (Poepp. ex Benth.) Urb.
- Macroptilium lathyroides* (L.) Urb.
- Macroptilium longepedunculatum* (Mart. ex Benth.) Urb.
- Macroptilium monophyllum* (Benth.) Maréchal & Baudet
- Macroptilium panduratum* (Benth.) Maréchal & Baudet

Sección *Microcochle* (Benth.) Lackey

- Macroptilium arenarium* (Bacigalupo) S.I. Drewes & R.A. Palacios
- Macroptilium fraternum* Juárez & S. Pérez
- Macroptilium gibbosifolium* (Ortega) A. Delgado
- Macroptilium martii* (Benth.) Maréchal & Baudet
- Macroptilium pedatum* (Rose) Maréchal & Baudet
- Macroptilium prostratum* (Benth.) Urb.
- Macroptilium psammodes* (Lindm.) S. I. Drewes & R. A. Palacios
- Macroptilium sabaraense* (Hoehne) V.P. Barbosa ex G.P. Lewis
- Macroptilium supinum* (Wiggins & Rollins) A. Delgado & L. Torres-Colin

Género *Phaseolus* L.

Sección *Acutifoli* Freytag

- Phaseolus acutifolius* A. Gray

Sección *Brevilegumeni* Freytag

- Phaseolus oligospermus* Piper
- Phaseolus tuerckheimii* Donnell-Smith

Sección *Coccinei* (L.) Freytag

- Phaseolus coccineus* L.

Sección *Digitati* Freytag

- Phaseolus neglectus* Hermann

Sección *Falcati* Freytag

- Phaseolus leptostachyus* Benth.
- Phaseolus micranthus* Hook. & Arn.
- Phaseolus macvaughii* Delgado

Sección *Minkeliersia* (Mart. & Gal.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

- Phaseolus amblyosepalus* (Piper) Morton
- Phaseolus nelsonii* Maréchal, Mascherpa & Stainier
- Phaseolus parvulus* Greene
- Phaseolus pauciflorus* Sessé & Mociño ex G. Don
- Phaseolus perplexus* Delgado
- Phaseolus plagiocylix* Harms
- Phaseolus pluriflorus* Maréchal, Mascherpa & Stainier
- Phaseolus tenellus* Piper

Sección *Paniculati* Freytag

Phaseolus augusti Harms
Phaseolus bolivianus Piper
Phaseolus jaliscanus Piper
Phaseolus juquilensis Delgado
Phaseolus lignosus Britton
Phaseolus lunatus L.
Phaseolus marechalii Delgado
Phaseolus mollis Hook.
Phaseolus pachyrhizoides Harms
Phaseolus polystachyus (L.) Britt., Sterns & Pogg.
Phaseolus salicifolius Piper
Phaseolus sinuatus Nutt. Ex Torr. & Gray
Phaseolus smilacifolius Pollard
Phaseolus sonorensis Standl.
Phaseolus xolocotzii Delgado

Sección *Pedicellati* (Benth.) Freytag

P. grayanus Wooton & Standl.
P. oaxacanus Rose
P. pedicellatus Benth.

Sección *Phaseoli* DC

P. albescens McVaugh ex Ramirez & Delgado
P. costaricensis Freytag & Debouck
P. polyanthus Greenm.
Phaseolus vulgaris L. var. *aborigineus* (Burkart) Baudet
Phaseolus vulgaris L. var. *vulgaris* (Burkart) Baudet

Sección *Rugosi* Freytag

P. angustissimus Gray
P. filiformis Benth.
P. microcarpus Mart.

Sección *Xantotricha* Delgado

P. hintonii Delgado
P. xantotrichus Piper
P. zimapanensis Delgado

Sin sección asignada

P. glabellus Piper
P. ritensis M.Jones

Género *Vigna* SaviSubgénero *Ceratotropis* (Piper) Verdc.

V. aconitifolia (Jacq.) Verdc.
V. angularis (Willd.) Ohwi & H. Ohashi
V. glabrescens Maréchal, Mascherpa & Stainier
V. minima (Roxb.) Ohwi & H. Ohashi
V. mungo (L.) Hepper
V. radiata (L.) R. Wilczek
V. silvestris Lukoki, Marechal & Otoul
V. sublobata (Roxb.) Bairig. *et al.*
V. trilobata (L.) Verdc.
V. umbellata (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi

Subgénero *Haydonia* (R. Wilczek) Verdc.

V. triphylla (R. Wilczek) Verdc.

Subgénero *Lasiospron* (Benth.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

V. lasiocarpa (Mart. ex Benth.) Verdc.

V. longifolia (Benth.) Verdc.

Subgénero *Plectotropis* (Schumacher) Baker

V. lobatifolia Baker

V. vexillata (L.) A. Rich.

Subgénero *Sigmoidotropis* (Piper) Verdc.

Sección Caracallae

V. caracalla (L.) Verdc.

V. linearis (Kunth) Maréchal, Mascherpa & Stainier

Sección Leptospron

V. adenantha (G. Mey.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

Sección Pedunculares

V. peduncularis (Kunth) Fawc. & Rendle

V. peduncularis var. *clitorioides* (Mart. ex Benth.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

Sección Sigmoidotropis

V. candida (Vell.) Maréchal, Mascherpa & Stainier

V. speciosa (Kunth) Verdc.

V. gentryi (Standl.) Stainier & F. Horvat

Subgénero *Vigna*

Sección Vigna

V. hosei (Craib) Backer

V. kirkii (Baker) J.B. Gillett

V. luteola (Jacq.) Benth.

V. oblongifolia A. Rich.

V. parviflora Ridl.

V. racemosa (G. Don) Hutch. & Dalziel

Sección Condylostylus

V. multinervis Hutch. & Dalziel

Sección Macrodontae

V. membranacea A. Rich.

Sección Catiang

V. unguiculata (L.) Walp.

Sección Reticulatae

V. reticulata Hook.

BIBLIOGRAFÍA

- AAGESEN, L., D. MEDAN, J. KELLERMAN & H. HILGER. 2005. Phylogeny of the tribe Colletieae (Rhamnaceae) – a sensitivity analysis of the plastid region trnL-trnF combined with morphology. *Plant Systematics and Evolution* 250: 197-214.
- AINOUCHE, A. K. & R. J. BAYER. 1999. Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae: Papilionoideae) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 86: 590-607.
- AINOUCHE, A. K., R. J. BAYER, P. CUBAS & M. T. MISSET. 2003. Phylogenetic relationships within tribe Genisteae (Papilionoideae) with special reference to genus *Ulex*. In B. B. Klitgaard & A. Bruneau [eds.], *Advances in Legume Systematics, Part 10*, 239-252. Royal Botanic Gardens, Kew.
- ALLAN, G. J. & J. M. PORTER. 2000. Tribal delimitation and phylogenetic relationships of tribes Loteae and Coronilleae (Faboideae: Fabaceae) with special reference to *Lotus*: evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. *American Journal of Botany* 87: 1871-1881.
- ÁLVAREZ, I. & J. F. WENDEL. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.
- BAILEY, C. D., C. HUGHES & S. HARRIS. 2004. Using RAPDs to identify sequence loci for species level phylogeny reconstruction: an example from *Leucaena* (Fabaceae). *Systematic Botany* 29: 4-14.
- BAILEY, C. D., T. G. CARR, S. HARRIS & C. HUGHES. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 435-455.
- BALDWIN, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3-16.
- BALDWIN, B. G., M. SANDERSON, J. M. PORTER, M. F. WOJCIECHOWSKI, C. S. CAMPBELL & M. J. DONOGHUE. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals Missouri Botanical Gardens* 82: 247-277.
- BARBOSA FEVEREIRO, V. P. 1986. *Macroptilium* (Benth) Urban do Brasil (Leguminosae - Faboideae - Phaseoleae - Phaseolinae). *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 28: 109-180.
- BELLAROSA, R., M. C. SIMEONE, A. PAPINI & B. SCHIRONE. 2005. Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 355-370.
- BENA, G., M. JUBIER, I. OLIVIERI & B. LEJEUNE. 1998. Ribosomal external and internal transcribed spacers: combined use in the phylogenetic analysis of *Medicago* (Leguminosae). *Journal of Molecular Evolution* 46: 299-306.
- BENTHAM, G. 1837. Commentationes de leguminosarum generibus, 72-78. Sollingeri, Vienna.
- _____. 1865. Leguminosae. In G. Bentham & J. D. Hooker [eds.], *Genera Plantarum*, 434-600. Reeve and Co., London.
- BENTHAM, G. & J. D. HOOKER. 1865. *Genera plantarum*, Vol. 1, 434-600. Reeve & Co., London.
- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.
- BROUAT, C., L. GIELLY & D. MCKEY. 2001. Phylogenetic relationships in the genus *Leonardoxa* (Leguminosae: Caesalpinioideae) inferred from chloroplast trnL intron and trnL-trnF intergenic spacer sequences. *American Journal of Botany* 88: 143-149.

- BROUGHTON, W. J., G. HERNANDEZ, M. BLAIR, S. BEEBE, P. GEPTS & J. VANDERLEYDEN. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55-128.
- BROWER, A. V. Z. 2000. Evolution is not a necessary assumption of cladistics. *Cladistics* 16: 143-154.
- BRUNEAU, A., J. J. DOYLE & J. L. DOYLE. 1995. Phylogenetic relationships in Phaseoleae: evidence from chloroplast DNA restriction site characters. In M. D. Crisp & J. J. Doyle [eds.], *Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny*, 309-330. Royal Botanic Gardens, Kew.
- CAICEDO, A. L., E. GAITÁN, M. C. DUQUE, O. TORO CHICA, D. G. DEBOUCK & J. TOHME. 1999. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Science* 39: 1497-1507.
- CHASE, M. W., D. E. SOLTIS, R. G. OLMSTEAD, D. MORGAN, D. H. LES, B. MISHLER, M. DUVAL, R. PRICE, H. HILLS, Y. QIU, K. KRON, J. REUIG, E. CONTI, J. PALMER, J. MANHART, K. SYTSMA, H. MICHAELS, W. KRESS, K. KAROL, W. CLARK, M. HEDREN, B. GAUT, R. K. JANSEN, K. KIM, C. WIMPEE, J. SMITH, G. FURNIER, S. STRAUSS, Q. XIANG, G. PLUNKETT, P. S. SOLTIS, S. SWENSEN, S. WILLIAMS, P. GADEK, C. QUINN, L. EGUIARTE, E. GOLENBERG, G. LEARN, S. GRAHAM, S. BARRET, S. DAYANANDAN & V. ALBERT. 1993. Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals Missouri Botanical Gardens* 80: 528-580.
- CIGLIANO, M. M., M. S. FERNÁNDEZ & A. LANTERI. 2004. Cladística: métodos cuantitativos. In A. Lanteri & M. M. Cigliano [eds.], *Sistemática Biológica: fundamentos teóricos y ejercicios*, 137-154. Editorial de la Universidad de La Plata, La Plata.
- CRISP, M. D. & L. COOK. 2003. Phylogeny and embryo sac evolution in the endemic australasian Papilionoid tribes Mirbelieae and Bossiaeeae. In B. B. Klitgaard & A. Bruneau [eds.], *Advances in Legume Systematics*, part 10, 253-268. Royal Botanic Gardens, Kew.
- CRONQUIST, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York.
- DE CANDOLLE, A. P. 1825. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis* 2, Paris, Strasbourg and London.
- DE LAET, J. & W. WHEELER. 2003. POY version 3.0.11 (Wheeler, Gladstein and De Laet, May 6 2003). Command line documentation.
- DE RIJK, P., J. WUYTS & R. DE WACHTER 2003. RnaViz2: an improved representation of RNA secondary structure. *Bioinformatics* 19: 299-300.
- DELGADO SALINAS, A. 1985. Systematics of the genus *Phaseolus* (Leguminosae) in North and Central America. Ph. D. Thesis, Univ. of Texas-Austin, Texas.
- DELGADO SALINAS, A. & L. TORRES COLIN. 2004. New Combinations in South American Phaseolinae: *Dolichopsis* and *Macroptilium* (Fabaceae: Phaseoleae). *Novon* 14: 424-427.
- DELGADO SALINAS, A., A. BRUNEAU & J. DOYLE. 1993. Chloroplast DNA phylogenetic studies en New World Phaseolinae (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). *Systematic Botany* 18: 6-17.
- DELGADO SALINAS, A., T. TURLEY, A. RICHMAN & M. LAVIN. 1999. Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic Botany* 24: 438-460.
- DOI, K., A. KAGA, N. TOMOOKA & D. VAUGHAN. 2002. Molecular phylogeny of genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* based on rDNA ITS and *atpB-rbcL* intergenic spacer of cpDNA sequences. *Genetica* 114: 129-145.

- DOLPHIN, K., R. BELSHAW, C. ORME & D. QUICKE. 2000. Noise and incongruence: Interpreting results of the incongruence length difference test. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17: 401-406.
- DOYLE, J. J. 1995. DNA data and legume phylogeny: a progress report. In M. D. Crisp & J. J. Doyle [eds.], *Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny*, 11-30. Royal Botanic Gardens, Kew.
- DOYLE, J. J. & J. I. DAVIS. 1998. Homology in molecular phylogenetics: a parsimony perspective. In D. E. Soltis, P. S. Soltis & J. J. Doyle [eds.], *Molecular Systematics of Plants II: DNA sequencing*, 101-131. Kluwer Academic Publishers.
- DOYLE, J. J., J. J. DOYLE, J. BALLENGER & J. PALMER. 1996. The distribution and phylogenetic significance of a 50-kb chloroplast DNA inversion in the flowering plant family Leguminosae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 429-438.
- DOYLE, J. J., J. A. CHAPPILL, C. DONOVAN BAILEY & T. KAJITA. 2000. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In P. S. H. a. A. Bruneau [ed.], *Advances in Legume Systematics*, part 9, 1-20. Royal Botanic Gardens, Kew.
- DREWES, S. I. 1995. Revisión de las especies argentinas del género *Macroptilium* (Benth.) Urban (Leguminosae-Phaseolinae). Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires.
- _____. 1996. Análisis cladístico de *Macroptilium* (Fabaceae). XXV Jornadas Argentinas de Botánica, Mendoza, Argentina: 165.
- _____. 1997. El género *Macroptilium* (Fabaceae) en la flora argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 32: 195-216.
- DREWES, S. I. & R. A. PALACIOS. 1994a. Nueva combinación en el género *Macroptilium* (Benth.) Urban (Leguminosae-Phaseoleae): *Macroptilium psammodes* (Lindm.). *Candollea* 49: 256-257.
- _____. 1994b. Notas sobre el género *Macroptilium* (Fabaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 30: 187-191.
- ESPERT, S. M. 2000. Análisis electroforético de proteínas seminales en la subtribu Phaseolinae (Leguminosae). Tesis para optar al grado de Licenciada en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires.
- ESPERT, S. M. & A. D. BURGHARDT. 2003. Electrophoretic analysis of seed proteins in argentinean species of Phaseolinae (Fabaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 38: 311-317.
- ESPERT, S. M. & S. I. DREWES. 2004. Análisis filogenético basado en datos morfológicos y moleculares en el género *Macroptilium* (Fabaceae). V Reunión Argentina de Cladística y Biogeografía, Salta: 8.
- FARRIS, J. 1969. A successive approximations approach to character weighting. *Systematic Zoology* 18: 374-385.
- _____. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. In N. Platnick & V. Funck [eds.], *Advances in Cladistics*, 7-36. Columbia Uni. Press, New York.
- FARRIS, J., V. ALBERT, M. KÄLLERSJÖ, D. LIPSCOMB & A. KLUGE. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- _____. 1986-1993. DNADIST version 3.5c-- Program to compute distance matrix from nucleotide sequences.

- FOFANA, B., J. BADOUIN, X. VEKEMANS, D. DEBOUCK & P. DU JARDIN. 1999. Molecular evidence for an andean origin and a secondary gene pool for the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 202-212.
- FOUGERE-DANEZAN, M., S. MAUMONT & A. BRUNEAU. 2003. Phylogenetic relationships in resin-producing Detarieae inferred from molecular data and preliminary results for a biogeographic hypothesis. In B. B. Klitgaard & A. Bruneau [eds.], *Advances in Legume Systematics*, part 10, 161-180. Royal Botanic Gardens, Kew.
- FREYTAG, G. & D. DEBOUCK. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. Botanical Research Institute of Texas, Texas.
- GAMBA, C. 2001. Revisión de las especies argentinas del género *Vigna* (Fabaceae). Un enfoque filogenético. Tesis para optar al grado de Licenciada en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires.
- GEPTS, P. 1996. Origin and evolution of cultivated *Phaseolus* species. In B. Pickersgill & J. Lock [eds.], *Advances in Legume Systematics 8: Legumes of Economic Importance*, 65-74. Royal Botanic Gardens, Kew.
- GIELLY, L. & P. TABERLET. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11: 769-777.
- GOEL, S., S. RAINA & Y. OGIHARA. 2002. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA in the *Phaseolus-Vigna* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 1-19.
- GOLOBOFF, P. & D. POL. 2002. Semi-strict supertrees. *Cladistics* 18: 514-525.
- GOLOBOFF, P. A. 1993. Estimating character weights during tree search. *Cladistics* 9: 83-91.
- _____. 1996. NONA ver 2.0. INSUE, Fundación e Instituto Miguel Lillo, S. M. de Tucumán.
- _____. 1998. Principios básicos de la cladística. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires.
- GOLOBOFF, P. A., J. FARRIS & K. C. NIXON. 2003. T. N. T.: Tree Analysis Using New Technology.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- HAMBY, R. K. & E. ZIMMER. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In P. S. Soltis, D. E. Soltis & J. J. Doyle [eds.], *Molecular Systematics of Plants*, 50-91. Chapman and Hall.
- HASSLER, E. 1923. Revisio specierum austro-americanum generis *Phaseolis* L. *Candollea* 1: 417-472.
- HERSHKOVITZ, M. A. & E. ZIMMER. 1996. Conservation patterns in angiosperm rDNA-ITS region. *Nucleic Acids Research* 24: 2857-2876.
- HERSHKOVITZ, M. A., E. ZIMMER & W. J. HAHN. 1999. Ribosomal DNA sequences and angiosperm systematics. In P. Hollingsworth, R. Bateman & R. Gornall [eds.], *Molecular Systematics and Plant Evolution*, 268-326. Taylor & Francis, London.
- HOLMGREN, P., N. HOLMGREN & L. BARNETT. 1990. Index Herbariorum: Part I: The Herbaria of the World. New York Botanical Garden, New York.
- HU, J., M. LAVIN, M. F. WOJCIECHOWSKI & M. SANDERSON. 2002. Phylogenetic analysis of nuclear ribosomal ITS/5.8 S sequences in the tribe Millettieae (Fabaceae): *Poecilanthus-Cyclolobium*, the core Millettieae, and the *Callerya* group. *Systematic Botany* 27: 722-733.

- HUTCHINSON, J. 1967. Fabaceae, The genera of flowering plants, 297-489. Clarendon Press, Oxford.
- JAASKA, V. 2001. Isoenzyme diversity and phylogenetic relationships among the American beans of the genus *Vigna* Savi (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 1153-1173.
- JAIN, H. & K. MEHRA. 1978. Evolution, adaptation, relationships and uses of the species of *Vigna* cultivated in India. In R. Summerfield & A. Bunting [eds.], *Advances in Legume Sciences*, 459-468.
- JANSEN, R. K., J. L. WEE & D. MILLIE. 1998. Comparative utility of chloroplast DNA restriction site and DNA sequence data for phylogenetic studies in plants. In D. E. Soltis, P. S. Soltis & J. J. Doyle [eds.], *Molecular Systematics of Plants II: DNA sequencing*, 87-100. Kluwer Academic Publishers.
- KAAS, E. & M. WINK. 1996. Molecular evolution of the Leguminosae: phylogeny of the three subfamilies based on rbc-L sequences. *Biochemical Systematics and Ecology* 24: 365-378.
- _____. 1997. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (Family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbc-L) and ncDNA (ITS1 and 2). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 65-88.
- KLUGE, A. 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis for relationships among *Epicrates* (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology* 38: 1-25.
- KLUGE, A. & J. FARRIS. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* 18: 1-32.
- LACKEY, J. A. 1977. A synopsis of Phaseoleae (Leguminosae - Papilionoideae), Iowa State University.
- _____. 1981. Phaseoleae. In R. M. P. a. P. H. Raven [ed.], *Advances in Legume Systematics*, part 1, 301-327. Royal Botanic Gardens, Kew.
- _____. 1983. A review of generic concepts in american Phaseolinae (Fabaceae, Faboideae). *Iselya* 2: 21-64.
- LAEMMLI, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LANTERI, A., M. M. CIGLIANO & C. MARGARÍA. 2004. Análisis filogenético de datos moleculares. Congruencia taxonómica. Soporte y confianza estadística de grupos y árboles. In A. Lanteri & M. M. Cigliano [eds.], *Sistemática Biológica: fundamentos teóricos y ejercicios*, 155-173. Editorial de la Universidad de La Plata, La Plata.
- LANYON, S. 1985. Detecting internal inconsistencies in distance data. *Systematic Zoology* 34: 397-403.
- LEE, M. 2001. Uninformative Characters and Apparent Conflict Between Molecules and Morphology. *Molecular Biology and Evolution* 18: 676-680.
- LEWIS, G. P. & B. D. SCHRIRE. 2003. Leguminosae or Fabaceae? In B. B. Klitgaard & A. Bruneau [eds.], *Advances in Legume Systematics*, part 10, 1-3. Royal Botanic Gardens, Kew.
- LINNAEUS, C. 1763. *Species Plantarum*, Stockholm.
- LIPSCOMB, D. 1998. *Basics of Cladistic Analysis*. George Washington University, Washington D.C.
- LIU, J. & C. SCHARDL. 1994. A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. *Plant Molecular Biology* 26: 775-778.

- MAI, J. C. & A. W. COLEMAN. 1997. The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green *Algae* and flowering plants. *Journal of Molecular Evolution* 44: 258-271.
- MAQUET, A., X. VEKEMANS & J. P. BAUDOIN. 1999. Phylogenetic study on wild allies of Lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin. *Plant Systematics and Evolution* 218: 43-54.
- MARECHAL, R. 1970. Données cytologiques sur les espèces de la sous-tribu des Papilionaceae-Phaseoleae-Phaseolinae. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 40: 307 - 348.
- MARECHAL, R., J. MASCHERPA & F. STAINIER. 1978. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28: 1-273.
- _____. 1981. Taxonomic study of the *Phaseolus* - *Vigna* complex and related genera. In R. M. Polhill & P. H. Raven [eds.], *Advances in Legume Systematics*, 301-327. Royal Botanic Gardens, Kew.
- MATHEWS, D., M. ZUKER & D. TURNER. 1996-2002. RNAstructure.
- MAYOL, M. & J. A. ROSSELLÓ. 2001. Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 167-176.
- MILLER, J., J. GRIMES, D. MURPHY, R. J. BAYER & P. LADIGES. 2003. A phylogenetic analysis of the Acacieae and Ingeae (Mimosoideae: Fabaceae) based on the trnK, matK, psbA-trnH and trnL/trnF sequence data. *Systematic Botany* 28: 558-566.
- MILLIGAN, B. G. 1998. Molecular genetic analysis of populations "A practical approach".
- MORGENSTERN, B., K. FRECH, A. DRESS & T. WERNER. 1998. DIALIGN: Finding local similarities by multiple sequence alignment. *Bioinformatics* 14: 290-294.
- MURPHY, R., J. SITES, D. BUTH & C. HAUFLER. 1996. Proteins: Isozyme Electrophoresis. In D. Hillis, C. Moritz & B. Mable [eds.], *Molecular Systematics*, 51-120. Sinauer Associates, Massachusetts.
- NIXON, K. C. 1999. The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407-414.
- _____. 2002. WinClada ver. 1.00.08. Nixon, K.C., Ithaca, NY.
- NIXON, K. C. & J. M. CARPENTER. 1993. On outgroups. *Cladistics* 9: 413-426.
- _____. 1996. On simultaneous analysis. *Cladistics* 12: 221-241.
- OCHOTERENA, H. & A. DELGADO SALINAS. 1994. Contribuciones a la taxonomía de *Ramirezella* (Leguminosae, Papilionoideae). *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Auton. Mexico, Ser. Bot.* 65: 7-19.
- PAGE, R. & E. HOLMES. 1998. *Molecular evolution. A phylogenetic approach*. Blackwell Science, Oxford.
- PARDO, C., P. CUBAS & H. TAHIRI. 2004. Molecular phylogeny and systematics of *Genista* (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (trnL-trnF intergenic spacer). *Plant Systematics and Evolution* 244: 93-119.
- PENGELLY, B. C. & D. A. EAGLES. 1995. Geographical distribution and diversity in a collection of the tropical legume *Macropodium gracile* (Poeppigia ex Benth) Urban. *Australian Journal Agric. Research* 46: 569-580.
- PERSSON, C. 2001. Phylogenetic relationships in Polygalaceae based on plastid DNA sequences from the trnL-trnF region. *Taxon* 50: 763-779.

- PIPER, C. 1926. Studies in American Phaseolinae. *Contributions from the National Herbarium* 22: 663-701.
- POLHILL, R. M., P. H. RAVEN & C. H. STIRTON. 1981. Evolution and systematics of the leguminosae. In R. M. Polhill & P. H. Raven [eds.], *Advances in Legume Systematics*, Part 1, 1-26. Royal Botanic Gardens, Kew.
- PRZYBYLSKA, J. 1995. Some examples of the use of electrophoretic protein analysis in taxonomic investigations of leguminous plants. *Journal of Applied Genetics* 36: 255-271.
- RILEY-HULTING, E., A. DELGADO SALINAS & M. LAVIN. 2004. Phylogenetic systematics of *Strophostyles* (Fabaceae): a North American temperate genus within a neotropical diversification. *Systematic Botany* 29: 627-653.
- SIMPSON, B. & M. OGORZALY. 1995. *Plants in our world*. Mc Graw Hill Inc., Texas, Austin.
- SIMPSON, B., J. TATE & A. WEEKS. 2004. Phylogeny and character evolution of *Hoffmannseggia* (Caesalpinieae: Caesalpinioideae: Leguminosae). *Systematic Botany* 29: 933-946.
- SMARTT, J. 1990. *Grain legumes: evolution and genetic resources*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- SOLTIS, D. E. & P. S. SOLTIS. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In D. E. Soltis, P. S. Soltis & J. J. Doyle [eds.], *Molecular Systematics of Plants II: DNA sequencing*, 1-42. Kluwer Academic Publishers.
- STARR, J., S. HARRIS & D. SIMPSON. 2004. Phylogeny of the unispicate taxa in Cyperaceae Tribe Cariceae I: generic relationships and evolutionary scenarios. *Systematic Botany* 29: 528-544.
- STEVENS, W., C. ULLOA, A. POOL & O. MONTIEL. 2001. *Flora de Nicaragua*. Missouri Botanical Garden, Missouri.
- SWOFFORD, D. L. & G. J. OLSEN. 1990. Phylogeny reconstruction. In D. Hillis & C. Moritz [eds.], *Molecular Systematics*, 411-501. Sinauer, Sunderland.
- THOMPSON, I., P. LADIGES & J. ROSS. 2001. Phylogenetic studies of the tribe Brogniartieae (Fabaceae) using nuclear DNA (ITS-1) and morphological data. *Systematic Botany* 26: 557-570.
- THULIN, M., M. LAVIN, R. PASQUET & A. DELGADO SALINAS. 2004. Phylogeny and biogeography of *Wajira* (Leguminosae): a monophyletic segregate of *Vigna* centered in the horn of Africa region. *Systematic Botany* 29: 903-920.
- TORRES COLIN, L., S. FUENTES SORIANO & A. DELGADO SALINAS. 1998. Estudio palinológico en el género *Macroptilium* (Fabaceae: Phaseolinae) en México y Centroamérica. VII Congreso Latinoamericano de Botánica, Ciudad de México: 269.
- TRONCOSO DE BURKART, N. & N. BACIGALUPO. 1987. *Flora Ilustrada de Entre Ríos*, Buenos Aires.
- URBAN, I. 1928. *Plantae cubenses novae vel rariores*. L. Elkmann lectae. IV. *Symbol. Antill.* 9: 433-543.
- VAILLANCOURT, R. & N. WEEDEN. 1993. Lack of isozyme similarity between *Vigna unguiculata* and other species of subgenus *Vigna* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany* 71: 586-591.
- VAILLANCOURT, R., N. WEEDEN, A. BRUNEAU & J. DOYLE. 1993. Chloroplast DNA phylogeny of Old World *Vigna* (Leguminosae). *Systematic Botany* 18: 642-651.
- VERDCOURT, B. 1970. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the "Flora of Tropical East Africa": IV. *Kew Bulletin* 24: 507-570.

- WHEELER, W. & D. GLADSTEIN. 2000. POY: the optimization of alignment characters. American Museum of Natural History, New York.
- WHEELER, W., J. GATESY & R. DESALLE. 1995. Ellision: a method for accommodating multiple molecular sequence alignments with alignment-ambiguous sites. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 1-9.
- WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE & J. TAYLOR. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* M. Innis, D. Gelfand, J. Sminsky & T. White [eds.], PCR protocols: a guide to methods and applications, 315-322. Academic Press, San Diego, California.
- WOJCIECHOWSKI, M. F. 2003. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. *In* B. B. Klitgaard & A. Bruneau [eds.], Advances in Legume Systematics, part 10, 5-35. Royal Botanic Gardens, Kew.
- WOJCIECHOWSKI, M. F., M. LAVIN & M. SANDERSON. 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* 91: 1846-1862.

