Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudios multidisciplinarios en el complejo galactia-camptosema-collaea (leguminosae)

Sede, Silvana Mabel

2005

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

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

Cita tipo APA:
Sede, Silvana Mabel. (2005). Estudios multidisciplinarios en el complejo galactia-camptosema-collaea (leguminosae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Sede, Silvana Mabel. "Estudios multidisciplinarios en el complejo galactia-camptosema-collaea (leguminosae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2005.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

ESTUDIOS MULTIDISCIPLINARIOS EN EL COMPLEJO *GALACTIA- CAMPTOSEMA- COLLAEA* (LEGUMINOSAE)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Silvana Mabel Sede

Directora: Dra. Lidia Poggio
Directora asistente: Ing. Agr. Renée H. Fortunato

Laboratorio de Citogenética y Evolución
Departamento de Ecología, Genética y Evolución
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Buenos Aires - 2005

ESTUDIOS MULTIDISCIPLINARIOS EN EL COMPLEJO *GALACTIA- CAMPTOSEMA- COLLAEA* (LEGUMINOSAE)

El género pantropical y subpantropical *Galactia*, y los géneros neotropicales *Camptosema* y *Collaea* se agrupan en un complejo basado en sus afinidades exomorfológicas. Algunos caracteres macromorfológicos diagnósticos están algunas veces presentes sin correlación en las especies de distintos géneros en la región austral de América del Sur, y es por esta razón que se han adoptado distintos criterios para delimitarlos, generando gran confusión taxonómica. El objetivo de este trabajo fue clarificar las relaciones entre las especies del complejo *Galactia- Camptosema- Collaea*. Con este propósito se analizaron las características morfológicas y citológicas de distintas especies. Se realizó además un análisis filogenético combinando caracteres moleculares y morfológicos y un análisis del patrón de bandas generado por AFLP.

La mayoría de los caracteres tradicionalmente usados como diagnósticos en la taxonomía del grupo no permiten una delimitación clara de los rangos genéricos e infragenéricos. Se evaluaron las características cromosómicas del grupo y se realizaron nuevos recuentos para las especies conflictivas. De los datos citológicos analizados, los caracteres fundamentales y de mayor relevancia para la resolución de la taxonomía conflictiva del grupo, resultaron ser el número cromosómico y la fórmula cariotípica. Las hipótesis filogenéticas propuestas en este trabajo apoyan la monofilia de *Collaea*, y no corroboran la monofilia de *Galactia* y *Camptosema*. El análisis de agrupamiento obtenido a partir de los patrones de bandas de AFLP no es consistente con la actual circunscripción de *Galactia* y *Camptosema*, corroborando los resultados obtenidos en el análisis morfológico y filogenético. Los resultados obtenidos inducen a rever la circunscripción actual del complejo genérico.

Palabras claves: *Galactia*, *Collaea*, *Camptosema*, Diocleinae, Leguminosae, citología, filogenia, morfología, AFLP.

MULTIDISCIPLINARY STUDIES IN THE *GALACTIA- CAMPTOSEMA- COLLAEA* COMPLEX (LEGUMINOSAE)

The pantropical and subpantropical genus *Galactia*, and the neotropical genera *Camptosema* and *Collaea* are grouped in a complex based on exomorphological affinities. Some diagnostic macromorphological features are sometimes present without correlation between the species of different genera in the austral region of South America, and this is the reason why different criteria have been adopted to delimit them, thus generating great taxonomic confusion. The aim of this work was to clarify the relationships of the species within the complex *Galactia- Camptosema- Collaea*. To accomplish this objective, morphological and cytological characteristics of different species were evaluated. A phylogenetic analysis combining morphological and molecular characters and the analysis of the AFLP band patterns of the species were also undertaken. Most of the characters traditionally used as diagnostic in the taxonomy of the group, do not permit a clear delimitation of the generic and infrageneric ranges.

The chromosome characteristics of the group were also evaluated and new records for the conflictive species were reported. From the cytological data analyzed, the most relevant characters were the chromosome number and the karyotype formula. The phylogenetic hypotheses proposed in this work strongly support the monophyly of *Collaea*, but do not corroborate the monophyly of *Galactia* and *Camptosema*. The clustering obtained from the analysis of the AFLP band patterns is not congruent with the current circumscription of Galactia and Camptosema, corroborating the results obtained from the morphological and phylogenetic analyses. The results obtained induce to revise the present circunscription of the genera in the complex.

Keywords: *Galactia*, *Collaea*, *Camptosema*, Diocleinae, Leguminosae, cytology, phylogeny, morphology, AFLP.

ÍNDICE

Página

INTRODUCCIÓN GENERAL.....1

OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS.....2

CAPÍTULO I – MORFOLOGÍA

INTRODUCCIÓN.....3

El complejo *Galactia-Camptosema-Collaea*.....3

Consideraciones taxonómicas.....3

Consideraciones morfológicas.....5

Consideraciones biogeográficas.....7

OBJETIVOS.....8

MATERIALES Y MÉTODOS.....9

RESULTADOS.....10

Camptosema.....10

C. coccineum.....10

C. coriaceum.....11

C. ellipticum.....12

C. paraguariense.....13

C. praeandinum.....*15*

C. rubicundum.....17

C. scarlatinum.....18

Collaea.....19

C. argentina.....*20*

C. aschersoniana.....21

C. cipoensis.....21

C. paraguariensis.....23

C. stenophylla.....24

Galactia.....25

Sección *Galactia*.....25

G. lindenii.....26

Sección *Odonia*.....27

G. benthamiana.....27
G. sp. nov......30
G. dubia.....31
G. fiebrigiana.....32
G. jussiaeana.....34
G. latisiliqua.....35
G. longifolia.....38
G. marginalis.....39
G. martii.....42
G. neesii.....43
G. striata.....44
G. texana.....46
Sección *Collaearia*.....47
G. boavista.....47
DISCUSIÓN.....50

CAPÍTULO II – ESTUDIOS CROMOSÓMICOS
INTRODUCCIÓN.....55
Objetivos.....58
MATERIALES Y MÉTODOS.....59
Material.....59
Estudios mitóticos.....59
Estudios meióticos.....61
Técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) 61
Tinción con plata de NORs.....64
RESULTADOS.....66
Análisis del cariotipo.....66
Análisis meiótico.....69
Determinación del número de zonas de ADNr.....73
Análisis de la actividad de las zonas ADNr.....73
DISCUSIÓN 76

CAPÍTULO III – FILOGENIA

INTRODUCCIÓN.....79

Estudios filogenéticos en leguminosas.....79

Caracteres moleculares en estudios filogenéticos.....81

Secuencias de ADN ribosomal nuclear.....*81*

Secuencias de ADN de cloroplasto.....82

Caracteres morfológicos en estudios filogenéticos.....83

OBJETIVOS.....84

MATERIALES Y MÉTODOS.....85

ANÁLISIS MOLECULAR.....85

Material.....85

Extracción de ADN total.....86

Cuantificación y control de la calidad del ADN.....86

Amplificación del espaciador transcripto interno (ITS) del ADNr.....86

Amplificación del espaciador intergénico IGS *trn*L-F de cloroplasto.....88

Amplificación del intrón del gen *trn*L de cloroplasto.....90

Amplificación de regiones del gen matK.....90

Purificación y secuenciación de los productos de amplificación.....91

Edición de secuencias.....92

Caracterización de secuencias de ITS.....92

Determinación de homologías primarias: construcción de la matriz de datos.....92

Codificación de gaps.....93

Análisis filogenético.....*93*

Estrategias de búsqueda.....94

Medidas de apoyo.....96

Medidas para evaluar la calidad de los cladogramas..... .97

Elección de grupo externo.....98

ANÁLISIS MORFOLÓGICO.....99

Lista de caracteres morfológicos.....100

ANÁLISIS COMBINADO.....101

RESULTADOS.....103

ANÁLISIS MOLECULAR……..103

Caracterización de secuencias del ITS.....103
Caracterización de secuencias del IGS *trn*L-F.....106
Alineamiento y gaps.....107
Secuencias del intrón *trn*L y de las dos regiones del gen *mat*K.....107
Búsquedas bajo pesos iguales.....108
Búsquedas bajo pesos implicados.....109
Búsquedas con distintos costos de transformación.....110
ANÁLISIS MORFOLÓGICO.....111
Búsquedas con pesos iguales.....111
Análisis bajo pesos implicados.....112
Evolución de caracteres.....113
ANÁLISIS COMBINADO.....115
Búsquedas con pesos iguales.....115
Análisis bajo pesos implicados.....115
DISCUSIÓN.....131

CAPÍTULO IV – ANÁLISIS DE AFLP
INTRODUCCIÓN.....135
OBJETIVOS.....136
MATERIALES Y MÉTODOS.....137
Digestión con endonucleasas de restricción- Ligación.....139
Reacciones de amplificación.....140
Separación y detección de AFLPs.....141
ANÁLISIS DE DATOS.....143
Construcción de la matriz básica de datos (MBD).....143
Construcción de la matriz de similitud.....144
Análisis de agrupamientos.....145
Generación del dendrograma.....145
RESULTADOS.....146
Análisis de agrupamiento.....147
DISCUSIÓN.....150
CONCLUSIONES.....152
BIBLIOGRAFÍA.....156
APENDICES.....167

INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia Leguminosae es la tercera familia más grande de las angiospermas luego de Orchidaceae y Asteraceae (Lewis *et al.*, 2005). Las leguminosas se distribuyen en todos los hábitats terrestres, aunque su mayor diversidad se centra en áreas con climas estacionales. Polhill (1994) reconoció un total de 671 géneros y en la actualidad se estiman en alrededor de 720 y más de 19.400 especies (Lewis *et al*., 2005). Las leguminosas son, después de las gramíneas, las plantas de mayor importancia económica y agrícola, ya que representan gran parte de los cultivos utilizados para la obtención de aceite, fibras, combustible, maderas, medicinas y químicos. Su hábito varía desde grandes árboles a hierbas anuales y se distribuyen en todas las regiones templadas y tropicales del mundo (Rundel, 1989).

La familia se divide en 3 subfamilias: Caesalpinioideae (4 tribus y ca. 2.250 especies), Mimosoideae (4 tribus y ca. 3270 especies) y Papilionoideae (28 tribus y ca. 13.800 especies) (Lewis *et al.,* 2005). Las subfamilias Caesalpinioideae y Mimosoideae son preferentemente megatérmicas predominando en regiones tropicales y subtropicales, mientras que Papilionoideae es mega, meso y microtérmica, y está bien representada en áreas templadas o templado-cálidas. El origen de esta última se estima en el Eoceno temprano y sus tribus más antiguas, Millettieae y Phaseoleae, en el Eoceno tardío (37 a 46,4 Ma) (Wojciechowski, 2003). Las papilionoideas sufrieron varios reagrupamientos genéricos; sin embargo la mayoría de las tribus continúan siendo definidas según Polhill (1994) (Apéndice 1.1). Una de sus tribus, Phaseoleae, es la que presenta no sólo el mayor número de géneros sino también los de mayor importancia económica, comparada con el resto de las tribus de la subfamilia. En ésta se encuentran los comúnmente llamados porotos: *Phaseolus* spp, *Vigna* spp, *Glycine max* y otros géneros de importancia alimenticia, forrajera y ornamental. La subtribu Diocleinae agrupa a la mayoría de las plantas leñosas no arbóreas de Phaseoleae y se caracterizan principalemente por presentar hojas 1-3-folioladas, inflorescencias frecuentemente nudosas, bractéolas, vexilo sin apéndice y anteras uniformes (Lackey, 1981). Esta subtribu comprende 14 géneros, mayoritariamente del nuevo mundo: *Dioclea, Cymbosema, Cratylia, Cleobulia, Calopogonium, Canavalia, Pachyrhizus, Macropsychanthus, Luzonia, Herpyza, Lackeya, Camptosema, Collaea y Galactia* (Lewis *et al,* 2005). No obstante, la mayoría de los caracteres morfológicos utilizados para su diferenciación no son suficientemente precisos como para establecer diferencias claras dentro de la subtribu, ya que están presentes en niveles taxonómicos diferentes (Maxwell, 1970).

En el presente trabajo se analizará el complejo genérico perteneciente a la subtribu Diocleinae: *Galactia- Camptosema- Collaea*. El enfoque de este estudio es multidisciplinario y se espera obtener resultados que ayuden a resolver la actual taxonomía conflictiva dentro del grupo.

OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS

El objetivo del presente estudio es clarificar las relaciones dentro del complejo genérico, a fin de:

- Analizar los límites genéricos e infragenéricos de *Galactia* y *Collaea*
- Aportar nueva evidencia que permita reevaluar la actual circunscripción de *Camptosema,* con especial énfasis en algunas especies conflictivas.

Se postularon las siguientes hipótesis de trabajo:

- Los caracteres morfológicos diagnósticos de los géneros no permiten establecer límites claros tanto genéricos como infragenéricos.
  Se puso a prueba a través de la observación de caracteres exomorfológicos y citológicos y el análisis comparativo de los mismos en los distintos taxones del complejo.

- Los géneros *Galactia* y *Camptosema* no son grupos naturales
  Se puso a prueba mediante el análisis filogenético combinando caracteres morfológicos y moleculares.

- El género *Collaea* posee caracteres diferenciales que lo distinguen de los restantes taxones del complejo.
  Se puso a prueba a través de los estudios morfológicos y moleculares.

CAPÍTULO I

MORFOLOGÍA

INTRODUCCIÓN

El complejo *Galactia- Camptosema- Collaea*

El género *Galactia* P. Brown consta de, aproximadamente, 50 especies de distribución pantropical, 37 de las cuales fueron citadas para Sudamérica con especial referencia en la región austral del continente (Burkart, 1971); (Fortunato, 1994.) y de ellas 14 crecen en la Argentina. El género *Collaea* D.C. posee cerca de 7 especies exclusivamente americanas (De Candolle, 1825; Bentham, 1859; Burkart, 1952, 1971; Fortunato, 1995), encontrándose 3 de ellas en el territorio argentino. Por otra parte, *Camptosema* Hook. et Arn. es un género neotropical de aproximadamente 15-18 especies, con 4 representantes en la Argentina (Burkart, 1970). El complejo es considerado dentro de la subtribu Diocleinae como uno de los grupos de especies con límites genéricos imprecisos (De Queiroz *et al*., 2003). Sobre esta base, los autores que estudiaron las especies para las distintas regiones del neotrópico adoptaron distintos criterios respecto a su delimitación genérica.

Consideraciones taxonómicas

En 1832 Hooker & Arnold describen *Galactia stenophylla,* pero si bien la asignan al género *Galactia*, señalan que posee una morfología diferente a lo hasta ese momento conocido y, que sería necesario transferirla a un nuevo género: *Platystilus.* Asimismo, en la misma contribución, tomando como base una sola especie, describen el género *Camptosema*: *Camptosema rubicundum*

Bentham (1859) distingue los siguientes caracteres para los tres géneros que forman el complejo:

- *Galactia*: cáliz campanulado, tetralobulado, con los lóbulos laterales más pequeños, androceo diadelfo y flores pequeñas a mediocres.
- *Collaea*: cáliz muy similar a *Galactia*, vexilo con las aurículas basales subinflexas, androceo pseudomonadelfo previo a la antesis, legumbre sésil y flores mediocres a especiosas.
- *Camptosema*: con cáliz tubuloso, glabro a seríceo en el interior, pétalos angostos, androceo pseudomonadelfo, legumbre estipitada y flores especiosas.

Este autor, reconoce en *Galactia* 5 especies, e incluye a los restantes taxones en el género *Collaea.* De acuerdo al criterio de Bentham (1859), *Collaea* se divide en tres secciones: 1) *Platystylus* Hook et Arn. ex Benth., (sufrútices, con vexilo pubescente en el exterior y pétalos gibosos) 2) Collaearia Benth (sufrútices, con vexilo seríceo en el exterior y pétalos nada o apenas gibosos) y 3) Galactioides Benth. (hierbas volubles, con vexilo glabro). En la primera

sección incluye a *C. stenophylla* (Hokk et Arn.) Benth, *C. virgata* y *C. speciosa* DC. (aunque esta última no presentara alas gibosas), en la segunda sección a la mayoría de las especies y en la tercera a *C. martii* Mart , *C. neesii* Mart, *C. scarlatina* Mart y *C. crassifolia* Mart. Por otra parte, con respecto al género *Camptosema*, reconoce a las especies agrupadas en dos secciones: Bionia (cáliz rojo, glabro en el interior a tenuemente adpreso puebescente y botón floral agudo a acuminado) y Macropetalum (cáliz herbáceo, seríceo pubescente en el interior y botón obtuso). En la sección Bionia incluye a *C. rubicundum* Hook et Arn., *C. coriaceum* (Nee & Mart.) Benth. y *C. coccineum* (Mart. Ex Benth.) Benth. y otras seis especies en la sección Macropetalum.

Cabe destacar que sobre la base de la definición genérica aquí citada, el mismo Bentham (1859) señala que *Collaea* está relacionado con *Camptosema* por presentar algunos caracteres intermedios, por ejemplo en *Collaea rugosa* y *Collaea scarlatina*.

Taubert (1894) propuso sinonimizar *Collaea* con *Galactia* y dividió a este último género en dos secciones: Secc. Eugalactia Taub. (flores pequeñas con pétalos estrechos y androceo diadelfo), representada sólo por 3 especies: *G. marginalis, G. jussiaeana* y *G. tenuiflora*; y la sección Collaea DC. (flores medianas a grandes con pétalos amplios y androceo pseudomonadelfo). En esta sección reconoce 3 subsecciones: 2 ya propuestas por Bentham como secciones de *Collaea* (Platystylus Benth. y Collaearia Benth.) y describe Galactiaria Taub. Además acepta al género *Camptosema*.

Grisebach (1874) restringe el género *Collaea* a *C. speciosa* DC. y a las especies de la sección Platystylus Benth., si bien considera que el género está cercanamente relacionado a *Galactia y Camptosema,* lo diferencia por presentar pétalos callosos.

Burkart (1971), en su tratamiento del género para América del Sur, divide a *Galactia* en tres secciones: Sect. Galactia (sólo un representante en Sudamérica, de flores grandes, pétalos angostos, androceo diadelfo, ovario estipitado a subsésil), Sect. Odonia (Bert.) Burkart (21 especies, 13 en Argentina, de flores mediocres, corola glabra, androceo diadelfo y a veces pseudomonadelfo) y Sect. Collaearia (Benth.) Burkart (15 especies, 1 en Argentina, de flores mediocres, pétalos anchos, estandarte pubescente en la cara externa, estambres a menudo pseudomonadelfos, ovario sésil a subsésil). Este autor mantiene separado al género *Collaea,* de acuerdo a la definición de Grisebach (1874) y, lo diferencia de *Galactia* por presentar brácteas amplias y racimos no nudosos; considera el porte arbustivo, el androceo pseudomonadelfo y las hojas sésiles como caracteres que comparte con *Galactia* Sect. Collaearia.

Referente a *Camptosema*, Burkart (1970) cita para Argentina y países limítrofes a *C. rubicundum* Hook et Arn. y a *C. paraguariense* (Chodat et Hassl.) Hassl.; propone a *C. scarlatinum* (Benth.) Burkart (= *Collaea scarlatina*) y *a C. ellipticum* (Desv.) Burkart y describe a *C. praeandinum* Burkart.

Más recientemente, Lackey (1981) separó a *Collaea* de *Galactia* sólo por presentar hojas digitado-trifolioladas, pero dicho carácter es encontrado en varias especies de *Galactia*, principalmente de la sección Collaearia (Benth.) Burkart. Asimismo, diferenció a *Camptosema* de *Galactia* únicamente por la presencia de ovario largamente estipitado.

Consideraciones morfológicas de las especies estudiadas del complejo genérico

Hábito. Las especies de *Galactia* son plantas herbáceas a subleñosas; completamente volubles (ej. *G. striata*) o sólo volubles en los ápices (ej. *G. latisiliqua*); erectas (ej. *G. jussiaeana*) o postradas (ej. *G. fiebriegiana*). En *Collaea* las especies son siempre sufrútices (arbustos/ subarbustos) erectos, leñosos a subleñosos. Las especies de *Camptosema* se caracterizan por ser trepadoras, leñosas o semileñosas, o arbustos poco ramificados.

Hoja. Si bien todas las especies de *Galactia* y *Camptosema* aquí estudiadas presentan hojas pinnado-3-folioladas o 1-folioladas, existen representantes de Galactia que comparten con las especies de *Collaea* la presencia de hojas digitado-3-folioladas.

Inflorescencia. En las especies de *Galactia* aquí estudiadas, la inflorescencia se dispone en racimos axilares, salvo en *G. jussiaeana* que presenta racimos axilares y terminales. En la disposición de las flores existe variación, pudiendo estar dispuesta en forma apical (racimos umbeliformes o corimbiformes), desde la mitad o desde el tercio inferior. El largo del racimo varía con respecto a la hoja adyacente. También existe variación en el braquiblasto florífero en cuanto a forma y número de flores, pudiendo ser desde vestigial y 2-floro en *Camptosema scarlatinum* a ovoide-alargado y 3-12-floro en *Camptosema rubicundum*.

Flor. El tamaño de las flores es de mediocre a pequeño en las especies de *Galactia* sección Odonia y Collaearia y relativamente más grandes y vistosas en la sección Galactia de *Galactia,* en *Camptosema y Collaea*. El largo del pedicelo es un carácter importante en la delimitación de las especies de *Collaea* y no existe gran variación entre las especies de

Galactia y Camptosema. En estos dos últimos géneros, las brácteas y las bractéolas son pequeñas, aunque varían en forma y largo con respecto al tubo calicinal.

Corola. Los pétalos de *Camptosema*, la mayoría de las especies de *Collaea* y de *Galactia* sección Galactia son alargados. El indumento en los pétalos, particularmente en el vexilo, es un carácter importante dentro del complejo; está ausente en todas las especies de *Camptosema* y de *Galactia* sección Odonia. Cabe señalar que en esta sección hay representantes que a veces poseen una leve pilosidad en el borde del vexilo.

Cáliz. El cáliz puede ser campanulado como en la mayoría de las especies de *Galactia* y *Collaea* o tubular como en *Camptosema*, aunque *C. ellipticum* presenta un cáliz de forma intermedia, y en *C. praeandinum* y *C. paraguariense* es campanulado.

Androceo. Se presenta en dos formas: completamente diadelfo como en *Galactia* o pseudomonadelfo como en *Camptosema* y *Collaea*. El estambre vexilar nunca está completamente unido sino que existe variación en el grado de unión al tubo estaminal.

Gineceo. Todos los gineceos presentan un disco nectarífero en su base. Sus características diagnósticas más importantes son la forma (cilíndrico, cónico, piramidal), el margen (irregular, lobulado) y la consistencia (laminar, carnosa). A veces este disco se encuentra fusionado al androceo. El ovario puede ser sésil/subsésil como en las especies de *Galactia* (salvo *G. marginalis*) a largamente estipitado como en *Camptosema* s.s., *Camptosema paraguariense* y *Collaea cipoensis*.

Por lo anteriormente expuesto, se observa gran diversidad morfológica dentro y entre los géneros en cuestión:

Camptosema posee flores con cáliz tubuloso, vexilo ovado a oblongo, androceo pseudomonadelfo y ovario estipitado. Aunque estos caracteres fueron considerados diferenciales de *Galactia,* están presentes principalmente en algunas especies de la sección *Galactia,* de la cual sólo se diferencia por presentar androceo seudomonadelfo.

Collaea posee hojas digitado-trifolioladas, brácteas estrobiliformes, inflorescencias umbeliformes, corola pilosa, vexilo con áreas callosas, androceo pseudomonadelfo a monadelfo. Salvo las brácteas estrobiliformes, el vexilo con áreas callosas y los lóbulos del cáliz, los restantes caracteres diferenciales se encuentran en especies de *Galactia* (hojas

digitado trifolioladas, inflorescencias umbeliformes, corola pilosa) y *Camptosema* (androceo pseudomonadelfo).

Galactia presenta gran variación en los caracteres exomorfológicos: algunas especies de la sección Galactia posee caracteres diferenciales que comparte con *Camptosema* s.s (flores de corola grande, pétalos angostos y ovario estipitado) y la sección Collaearia presenta corola pilosa y androceo pseudomonadelfo, caracteres que comparte con *Collaea*.

Consideraciones biogeográficas

Galactia es un género de distribución pantropical, mientras que *Camptosema* y *Collaea* son exclusivamente americanos.

Las especies de *Camptosema* crecen principalmente en el noreste y centro de Brasil en cerrados, campos rupestres o campos bajos y arcillosos y, selvas marginales de ríos y arroyos. En la Argentina, las especies del género *Camptosema* se distribuyen desde el NE y NO hasta Buenos Aires.

El género *Galactia,* de acuerdo a la división infragenérica actual, posee representantes de la sección Odonia en el paleotrópico (en América del Norte hasta Argentina, África, Asia y Oceanía). Las especies crecen en campos altos, graminosos, con suelos secos y pedregosos o en bajos anegadizos, arcillosos; en palmares, cerrados, selvas marginales o laderas andinas o subandinas. En la Argentina, se distribuyen desde el NE y NO hasta el centro del país. La sección Collaearia es exclusivamente sudamericana y las especies se encuentran principalmente en cerrados y campos rupestres de Brasil.La sección Galactia del género se restringe al Caribe, salvo por *G. lindenii* que se encuentra exclusivamente en Colombia.

Los representantes de *Collaea* se distribuyen desde Perú hasta el norte de la provincia de Buenos Aires, en serranías, campos rupestres, suelos arenosos y bañados.

OBJETIVOS

- Analizar y describir las características exomorfológicas en especies del complejo genérico presentes principalmente en la región austral de América del Sur.

- Evaluar y definir los caracteres morfológicos que permitan diferenciar y relacionar los taxones entre sí y esclarecer los grupos infragenéricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron viajes de colección a las regiones fitogeográficas donde crecen las especies estudiadas: Paranaense, Yungas y Chaqueña. Los viajes de colección fueron hechos durante la época estival, siendo este el período en que las plantas se hallan en floración y fructificación. Los ejemplares se identificaron y depositaron en el herbario del Instituto de Recursos Biológicos, INTA, Castelar (BAB).

Se analizaron los caracteres vegetativos y reproductivos, sobre la base de la revisión de material de herbario, los que se utilizaron para diferenciar y comparar los taxones y realizar nuevas descripciones de los mismos. Algunas especies fueron cultivadas en el invernáculo del Instituto de Floricultura (INTA, Castelar) para la observación de caracteres *in vivo*.

El material se evaluó mediante la metodología clásica de caracterización de los órganos utilizando un microscopio estereoscópico. Las flores de los ejemplares herborizados se trataron con agua a 100 ºC durante dos minutos para facilitar su observación. Se consultó además el material depositado en los herbarios con ejemplares recolectados en el área de incumbencia y regiones limítrofes: Bolivia, Paraguay y Brasil: AS, BAB, CORD, CTES, FCQ, G, K, LIL, LP, MO, MOV, SI, SP. Las abreviaturas de los herbarios se extrajeron del Index Herbariorum disponible en http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp.

El listado de las especies seleccionadas para el estudio morfológico se encuentra detallado al final de cada descripción.

RESULTADOS

Camptosema **Hook. & Arn.** *Bot. Misc.* 3: 201, 1833.

Bionia Mart. ex Benth., *Comm. Leg. Gen.*: 66, 1837. Especie tipo: *Camptosema rubicundum* Hook. & Arn.

Plantas trepadoras leñosas o semileñosas o arbustos, poco ramificados, con o sin rizomas. Hojas 1-3- folioladas; estípulas persistentes. Inflorescencias en racimos axilares, nudosos, con braquiblastos capitados, globosos a alargados, 2-9-floros. Botones acuminados en el ápice. Flores grandes, vistosas, 2,5 – 4 cm; brácteas caducas; bracteolas 2 semipersistentes o persistentes. Cáliz tubular generalmente rojo, glabro a densamente pubescente. Corola con vexilo elíptico a oblongo, recto o reflexo a la antesis, con callos vestigiales o ausentes, aurículas rectas, inflexas o ausentes; alas angostas, oblongo-lineares; quilla angosta. Androceo pseudomonadelfo, recto; anteras elípticas, dorsifijas, glabras, uniformes. Gineceo estipitado; ovario recto, seríceo a estrigoso, 7-12-ovulado; estilo recto, glabro; estigma truncado. Legumbre estipitada con dehiscencia elástica, recta, coriácea o leñosa, base cuneada a obtusa, con rostro recurvado en el ápice, margen recto u ondulado , endocarpo con tabiques translúcidos rodeando a las semillas. Semillas compresas, lenticulares, ovoides, obovoides, globosas o de contorno oblongo; tegumento coriáceo, liso; hilo oblongo a elíptico, subterminal.

Camptosema coccineum **(Mart. ex Benth.) Benth.** *Fl. Bras.* 15(1): 154, 1859.

Bionia coccinea Mart. ex Benth. *Comm. Legum. Gen.*: 66, 1837.

Arbusto erecto, de 0,4-2 m, tallos jóvenes leñosos, glabros a densamente pubérulos, tricomas erectos, cortos, ferrugíneos. Hojas 1-folioladas, sésiles; estípulas deltadas a veces acuminadas, de 1,5-4 x 1-2 mm, pubescentes; estipelas ausentes; folíolo elíptico, suborbicular a oblongo-linear, de 7-10 x (2,2-) 3-7 cm, coriáceo, apiculado, cordado a obtuso en la base, glabro a pubérulo en la cara adaxial y glabro a seríceo, raro velutino en la abaxial, con pelos plateados, adpresos. Racimos con 4-6 (-11) braquiblastos, capitados, 6-9-floros. Flores de 2,6-4,1 cm; pedicelos de 2-4 mm; brácteas caducas; bracteolas semipersistentes, angostamente ovadas, de 1-2 x 1-2 mm. Cáliz tubular, cartáceo, glabro a ralamente piloso con pelos adpresos, ferrugíneos o plateados, internamente glabro; lóbulo vexilar ovado, de (-3) 7-10 x 2-

4 mm, los laterales ovados, de (-3) 4-7 x 2-4 mm, el carinal lanceolado, acuminado, de 6-7 (-11) x 3-4 mm; tubo de 6-10 x 4-6 mm. Corola con vexilo elíptico, ápice redondeado, de 1,9-3 x 1,4-2,2 cm, aurículas inflexas, uña de 0,7-1,1 cm long; alas oblongo-lineares, de 1,3-1,8 x 0,3-0,5 cm; quilla linear-elíptica, de 1,9-2,2 x 0,4-0,7 cm, uña de 1-1,9 cm. Androceo con tubo de 1,4-2,3 cm, Gineceo con disco cónico, de margen truncada, lateralmente liso, de 1,5-3 x 1,5-2 mm; estípite de 7-14 mm; ovario de 10-14 mm long, densamente seríceo, canescente a ferrugíneo, 9-11-ovulado; estilo de 10-12 mm long. Legumbre cuneada en la base, de 6,7- 8 x 1,3-1,6 cm, leñosas, ligeramente constricta entre las semillas, seríceo-canescente con pelos adpresos; semillas 6-10, de contorno oblongo, de 7-8 x 4-5 x 1,5 mm.

Área de distribución- hábitat: Brasil, especie característica de la Serra do Espinhaço, estado de Minas Gerais. Habita principalmente en cerrados y campos rupestres.

Material seleccionado: **BRASIL. MINAS GERAIS**. Mun Datas, Ligaçao Rod. BR-259 a Costa Sena, Corrego Água Limpia, 18 marzo 1987, (fl), G. Hatschbach 51096 (MBM; BAB); 4 km de Sopa en direcc. a S. Joao da Chapada, 18° 11' S 43° 42' O, 1314 m, campo rupestre, R. Fortunato 8452 (BAB); Serra do Cipó, subida dos Esclavos, Cachoeira Véu da Noiva, cerrado, (fl), 4 abril 2004, R. Fortunato 8433 (BAB); Mun. Joaquín Felício, Serra do Cabral, início da subida, G. Hatschbach 64677 (MBM; BAB)

Camptosema coriaceum **(Nees & Mart.) Benth.** *Fl. Bras.* 15 (1): 155, 1859.

Arbusto erecto, raro postrado, poco ramificado, de 0,7-3 m de altura, ramas glabras a pubérulas. Hojas pinnado- trifolioladas, menos frecuentemente unifolioladas, a veces los dos tipos de hoja en la misma planta; estípulas ovado-lanceoladas, de 2,5-6 x 1,5-2 mm, pubérulas; pecíolos de (0,6) 1,5-6,5 cm, glabros; raquis de 0,6-2,9 cm; estipelas rígidas, subuladas, de 2-5 mm; folíolos oblongo-lineares a suborbiculares, de 5-11 x 2,4-5,7 cm, coriáceos, rígidos, conduplicados, agudos a obtusos, de base redondeada, truncada o cordada, concoloros, glabros a finamente pubérulos sobre nervaduras primaria y secundarias. Racimos con raquis de 6-12 cm, braquiblastos capitados, 6-8 floros, pedúnculo de 3- 7 cm, glabros. Flores de 2,5-4,5 cm; brácteas deltoides a oblongas, de 1-2,5- mm, pubescentes; bracteolas semipersistentes, suborbiculares a lanceoladas, de 1-2,5 mm, pubescente; pedicelos de 3-5 mm. Cáliz tubular, cartáceo, carnoso, glabro en el exterior o ralamente adpreso-pubérulo,

internamente glabro; lóbulo vexilar ovado-deltoide, obtuso, 5-8 x 4-9 mm, lóbulos laterales ovados, agudos a acuminados, 3-6 mm x 1, 5-3 mm, lóbulo carinal lanceolado-acuminado, 4,5-7 x 1,5-3 mm; tubo de 7-11 x 5-7 mm. Corola con vexilo elíptico, ápice redondeado, base obtusa a truncada, de 2-3 cm long x 1-1,5 cm lat., aurículas inflexas, uña de 0,7-1,8 cm long; alas oblongo-lineares a lanceoladas, de 1,5-2,2 x 0,4-0,5 cm; quilla elíptico-linear, de 1,2-2,4 x 0,4-0,6 cm, uña de 1-1,4 cm; Androceo con tubo de 2-2,5 cm. Gineceo con disco cónico, de margen truncada, lateralmente liso, 0,8-1,3 x 1-1,5 mm; estípite de 7-14 mm; ovario de 10-13 mm, densamente seríceo, 9-12-ovulado; estilo de 10-15 mm. Legumbre de 8-10,8 x 1,1-1,5 cm, leñosa, ligeramente constricta entre las semillas, con estípite de 1,2-1,5 cm, ralamente ocráceo-pubérula. Semillas 5-11, oblongas, de contorno oblongo, de 6-8 x 4-6 x 2 mm, castañas.

Área de distribución- hábitat: Brasil, desde el sur de Maranhao hasta el estado de Minas Gerais, pasando por los estados de Goiás y Bahía. Hay un registro de esta especie para el estado de Pernambuco.
Hábitat: principalmente en cerrados y campos rupestres.

Material seleccionado: BRASIL. BAHÍA. Río Paraguaçú, 3 km al sur de Andaraí, camino a Mucuge, aprox. 12° 50’ S 41° 19’ O, 400-500 m, campo rupestre, (fl), 20 enero 1997, M. Arbo et al 7540 (CTES, BAB). **GOIÁS.** Colinas do Sul, Río Jacaré, (fl), margen del río, 15 junio 1993, M. Hatschbach et al 59569 (MBM). **MINAS GERAIS.** Cabecera del Río Jequitinhoa, a 427 km en direcc. a Diamantina, 4 abril de 2004, R. Fortunato 8444 (BAB).

Camptosema ellipticum (Desv.) **Burkart.** *Darwiniana* 16: 210, 1970.
Rudolphia elliptica Desv.

Planta trepadora. Tallos cilíndricos, tomentosos a glabrescentes en ramas adultas. Hojas pinnado-trifolioladas; estípulas triangular-lanceoladas, 2-2,5 x 1-1,5 mm, estriadas, seríceas; pecíolos de 2-3,5 cm long, glabros a pubérulos; raquis de 0,8-1,3 cm long; estipelas filiformes, de 1-2 mm long; folíolos elípticos, a elíptico-obovados, de 5,5-8,4 x 2-4,5 cm, cartáceos, emarginados a obtusos, mucronulados, cara adaxial glabra y abaxial pubérula. Racimos floríferos en el tercio apical; raquis de 0,5-3 (-24) cm, con 3-8 (-21) braquiblastos, globosos a capitados, 2-8-floros; pedúnculo de 6,8 -8 (-19) cm, seríceo-estrigoso; Flores de

2,2-3 cm; bractéolas lanceoladas a elípticas, de 1,5 x 1,5-2 mm, seríceo-estrigosas, menores que el tubo calicinal; pedicelos de 3-4 mm long, estrigosos. Cáliz seríceo a ralamente estrigoso, pubérulo en el interior de los lóbulos; lóbulo vexilar oblongo a elíptico, de 0,7-1,4 x 0,4-0,6 cm; los laterales lanceolados a oblongos, de 0,6-0,9 x 0,25-0,3 cm; lóbulo carinal lanceolado, de 0,8-1,7 x 0,3-0,5 cm, tubo de 7-9 mm long. Corola con vexilo oblongo a elíptico, agudo, de 2,4-2,5 x 1,2-1,4 cm, seríceo-estrigoso en la cara externa con 2 áreas callosas vestigiales en el tercio inferior, 2 aurículas basales no inflexas, con uña de 6-8 mm; alas y quillas alargadas, de 2 x 0,5-0,6 cm lat, con uña de 0,7-1,1 cm. Gineceo con disco cilíndrico, carnoso, lobulado en el margen, menor de 0,5 cm; estípite de 4-5 mm, ovario seríceo-estrigoso; estilo recto, glabro. Legumbre no vista.

Área de distribución- hábitat: Crece en el borde de selvas en el Centro y Sureste de Brasil y Noreste de Paraguay.

Material seleccionado:

BRASIL. SAN PABLO. Mogi Guaçu, Pádua Sales, Fazenda Campininha, 650 m, 22 septiembre 1980, en cerrado, (fl), E. Forero et al 8196 (SP; BAB).

PARAGUAY. AMAMBAY. 2 km de ruta 5, desvío a Cnia. Serena, cerca del Pque. Nac. Cerro Corá, 22° 40' S 56° 03' O, borde de selva, (fl), 5 mayo 1989, R. Fortunato et al 1136 (BAB).

Camptosema paraguariense* (Chodat et Hassl.) Hassl. var *paraguariense

Hassler in Fedde, Repert. Spec. Nov. 16: 228. 1919

Galactia paraguariensis Chodat et Hassl. Bull. Herb. Boissier ser. 2, 4: 900. 1904.

Sufrútice postrado, rastrero y trepador. Rizomas y raíces negruzcas. Tallos cilíndricos, delgados, pubescentes a casi glabros. Hojas pinnado-trifolioladas; estípulas lanceoladas; pecíolos de (-1,2) 2,3-3,2 cm, pilosos; raquis de 0,7-1,2 cm; estipelas setáceas, de 0,5-2 mm long.; folíolos elípticos, de 4-5,5 (-6,8) x 1,6-3,2 (-3,6) cm, subcoriáceos a cartáceos, retusos, glabros, nervadura central bien marcada, las laterales difusas. Racimos erguidos, gráciles, de ejes delgados; raquis de 1,5-14 cm con 4-13 braquiblastos 1-4-floros; pedúnculo de 6-12 cm, ralamente estrigoso a pubérulo. Flores de 1,2-1,6 cm; brácteas y bractéolas, lanceoladas, de 2-3 x 1-2 mm, estrigosas; pedicelos de 2 a 3,5 mm,seríceos. Cáliz campanulado, seríceo-

estrigoso en el exterior, cara interna de los lóbulos ralamente estrigosa; lóbulo vexilar ovado-lanceolado, de 2,5-3,5. x 2-3 mm, los restantes lanceolados, de 2-3. x 1,5-2 mm; tubo de 2,5-3,5 mm. Corola rosada o lila a violácea; vexilo obovado, retuso a obtuso, reflexo a la antesis, de 0,9-1,4 x 0,4-0,9 cm, con aurículas pequeñas y uña de 1-1,5 mm; alas y quilla de 1,2-1,4. x 0,3-0,4 cm, con uña de 1,5 mm. Androceo con anteras pilosas en todo su contorno o en el ápice y en la base. Gineceo con disco tubular, de margen irregular, menor a 1 mm; estipite de 2-3 mm; ovario 8-10-ovulado; estilo incurvo en el medio y en el ápice. Hay flores masculinas por atrofia del ovario. Legumbre levemente incurva, de 4-4,3 x 0,8-0,9 cm, estrigosa-pubérula; semillas de 4-4,5 x 2,5 mm, marmoladas, compresas, con hilo elíptico de 1mm, estrofíolo sólo en la porción distal.

Área de distribución- hábitat: Norte de Brasil (Pará), Paraguay y NE de Argentina. En campos bajos, arcillosos, con pajonal.

Material seleccionado:

ARGENTINA. SANTA FÉ. Dpto. Garay, Colonia Mascías, 24- 30 noviembre 1942, R. Spegazzini 64528 (BAB).

BRASIL. Queimadas, em beira do Rio Sao Francisco, quasi frente a Xique-Xique, lugar arenoso, com dunas, grande quantidade de Cnidoscolus, 12 octubre 1990, Freire-Fierro 1919 (SFP).

PARAGUAY. ALTO PARAGUAY. Fortín Patria, 1 diciembre 2002, L Pérez 7605; L Pérez 7578; L Pérez 7582 (FCQ, BAB).

***Camptosema paraguariense* (Chodat et Hassl.) Hassl. var *parviflorum* Hassl.**

Hassler in Fedde, Repert. Spec. Nov. 16: 228. 1919

La variedad *parviflorum* se diferencia de la variedad *paraguariense* por poseer: folíolos oblongos a lineares, obtusos, acorazonados en la base, retusos, apiculados, de 4,5- 12 x 0,9-1,2 cm; flores más pequeñas, de 0,8-1,1 cm long; corola rosada a violácea; legumbre más angosta, de 4,5 x 0,5 cm, ralamente estrigosa; semillas globosas, de 3,5 x 2,5 mm..

Área de distribución- hábitat: Presenta la misma distribución y hábitat que la variedad típica: Mato Groso, Paraguay y Argentina.

Material seleccionado:

ARGENTINA. CHACO. Dpto. General Quemes, entre Colonia Castelli y Ftín. Lavalle, 19 enero 1949, Ragonese 7025 (BAB). **FORMOSA**. Dpto Patiño, 20 km al O de Las Lomitas, por ruta nac. 81. 24º 35' S 60º 45' O, en estero, 27 noviembre 2000, R. Fortunato 6805 (BAB); al sur de Arroyo Yacú, a 200 m por camino lateral de ruta G. Belgrano-San Carlos, 17 noviembre 1991, R. Fortunato 2419 (BAB, SI, MO, G); Dpto Pirané, Ruta 23, 5 km al sur de Palo Santo, 16 enero 1981, Petetín 1168 (BAB); Dpto. Pilcomayo, Pque. Nac. Pilcomayo, Estero Poí, alrededores de Puesto Algarrobo, 18 marzo 1992, R. Fortunato 2869 (BAB, MO); alrededores de Puesto algarrobo, Estero Poí, en monte y pastizal con caranday, sotobosque, 10 noviembre 1991, R. Fortunato 2181 (BAB, SI, MO, G); Ea. Bouvier, a 3 km del casco en dirección al riacho negro por el camino viejo, 30 marzo 1993, R. Fortunato 4185 (BAB); Dpto Formosa, 59 km de Clorinda por ruta 11, en dirección sur, 13 marzo 1992, R. Fortunato 2661 (BAB); entre Pozo del tigre y Laguna San Luis, 25 febrero 1951, Castiglioni 7929 (BAB). **PARAGUAY**. **BOQUERÓN.** Estancia Loma Pyta., 4 abril 1974, P. Arenas 571 (BAB). **PRESIDENTE HAYES**. Km 54 de ruta Nac. 9, Carlos Antonio López, en dirección a Filadelfia, (fl), 9 marzo 2005, R. Fortunato 8563 (BAB, FCQ).

Camptosema praeandinum **Burkart** *Darviniana 16: 205, 1970*

Dioclea lasiophylla auc nom Mart. ex Benth: Burkart, 1970.

Sufrútice postrado o erecto y subvoluble en los ápices, de 40 cm a 1,50 m. Raíz leñosa a subleñosa. Tallos cilíndricos, brevemente tomentosos. Hojas pinnado-trifolioladas; estípulas lanceoladas, de 3 x 1,5 mm, estrigosas; pecíolo de (1,5-) 3-7 cm; raquis de 0,8-3 cm; estipelas setáceas, de 1,5-2 mm long, glabras; folíolos elípticos, de 6,2-8,5 x 3,3-5,5 cm, cartáceos, retusos, mucronulados, discoloros, cara adaxial serícea y abaxial villosa, con nervaduras bien marcadas y pubescentes. Racimos con raquis de 3,5-18 cm; braquiblastos de 6 a13, 1-8-floros; pedúnculo de 3-37 cm long., villoso, estrigoso. Flores de 1,8-2,8 cm; brácteas y bracteolas elíptico-lanceoladas, de 1,5-3 x 1-2 mm, seríceo-estrigosas; pedicelos de 2,5-4 mm long, seríceo-estrigosos. Cáliz campanulado, seríceo-estrigoso, cara interna de los lóbulos pubérula; lóbulo vexilar elíptico-lanceolado, de 5,5-8 x 4-5 mm, los restantes lanceolados, de 5-9 x 2-2,5 mm; tubo de 3,5-6 mm. Corola roja; vexilo elíptico, obtuso, levemente acuminado, de 1,8-2,5 x 1-1,4 cm, seríceo, más denso en el margen, reflexo a la antesis, con aurículas pequeñas y

uña de 4-5,5 mm; alas y quilla de 1,6-2,2 x 0,4-0,5 cm, las alas pubérulas en el margen. Androceo pseudomonadelfo a diadelfo. Gineceo con disco tubuloso, de aprox.1 mm, de margen irregular; ovario 14-18 ovulado, subestipitado; estípite de 1,2-2 mm; estilo recto, un poco incurvo en el ápice. Hay flores masculinas no funcionales por aborto del gineceo. Legumbre ascendente, sésil, mucronada, de 6-8,5 x 8-9,5 mm, coriácea, 10-12-seminada; semillas ovoides-subcuadradas, marmoladas, de 4,5-6,5 x 4 mm, hilo elíptico-oblongo de 1,5-2 mm, subapical, con estrofíolo en el extremo distal.

Àrea de distribución- hábitat: preandina, extendiéndose sobre las laderas orientales de los Andes, a través de una larga franja de norte a sur, desde Bolivia hasta Jujuy, Salta y Tucumán, aproximadamente a lo largo del meridiano 64 O, a 1000-1500 m snm, en parajes montanos bastante húmedos, próximos a la selva subtropical.

Material seleccionado:

ARGENTINA. JUJUY. Dpto. Capital, San Salvador de Jujuy, 1200 m snm, 19 febrero 1953, J. Hunziker 6120. (BAB, SI); Mina 9 de octubre, entre 1580 y 1620 m snm, 7 abril 1971, N. Correa 4574 (BAB); camino a Tiraxi, 1,6 km antes de la escuela, 19 septiembre 1997, G. Seijo 1108 (CTES; BAB); Villa turística, Serranía de Zapla ex 9 de Octubre, Cerro de la cruz, 24º 40' S 65º 20' O, 1490 m snm, 24 marzo 2003, R. Fortunato et al 8096 (BAB); Dpto Manuel Belgrano, 5 km al Sur de Laguna Yala en dirección a Termas de Reyes, 1940 m snm, 1º mayo 1992, R. Fortunato 3606 (BAB). **SALTA**. Dpto. La Caldera, Alto de la Sierra, ruta 9 km 1647 a 1600 mts de Abra Sta. Laura, 3 abril 1971, N. Correa 4416 (BAB); 25 km camino de cornisa??, a Jujuy, 15 noviembre 1947, J. Dawson 2039 (BAB, SI); Dpto Rosario de Lerma, Quebrada del Toro, a 4 km al N del ingreso a la quebrada en dirección a S. A. de los Cobres, 14 noviembre 2001, R. Fortunato 7271 (BAB, ARIZ; UN_PAT; MO, G, NY, CTES); 7 km al N de Campo Quijano ingresando a la quebrada, 24º 53' S 65º 41' O, 1661 m snm, al costado del cerro por ruta Nac. 51, 6 marzo 2001,R. Fortunato 6936 (BAB); Dpto. Chicoana, 21 km al O de la ruta Nac 68 en dirección a Cachi, por ruta Prov. 33. 25º 09' S 65º 38' O, (fl), 12 diciembre 2002, R. Fortunato et al 7696 (BAB). **TUCUMÁN**. Dpto Famailla, Villa Nougues, 1000 m snm, 21 octubre 1921, S Venturi 1379 (SI, BAB, LI); Dpto Trancas, Hualinchay, 1350 m snm, 29 abril 1992, R. Fortunato 3570 (BAB; CTES)

BOLIVIA. SANTA CRUZ. Velasco. Campamento El Refugio, a 100 m al sur de la casa. 14º 46' S 61º 02' O, 28 abril 1995, R. Guillén 2047 (MO; BAB).

***Camptosema rubicundum* Hook. et Arn.** *Bot. Misc.* 3: 201, 1833.

Planta trepadora, leñosa. Tallos jóvenes volubles, los adultos hasta 2-3 cm de diám. Hojas pinnado-trifolioladas; pecíolos de 1,5 –5,5 cm, finamente pubérulos; raquis de 0,5-2,1 cm; estipelas filiformes, de 1-4,5 mm, glabras, folíolos elípticos a ovado-elípticos, de 3,2-6 x 1-3,4 cm, subcoriáceos, obtusos a retusos, glabros en ambas caras, nervadura central bien marcada y laterales difusas. Racimos simples (o "rara vez en la base bi o trifurcados, a veces naciendo de tallos viejos defoliados, desnudos o en la base foliados"); raquis de 2-7,5 cm; braquiblastos 3 a 13, ovoides a alargados, 3-12-floros; pedúnculo de 2,5-10 cm, pubérulo. Flores de 2,2-3 cm; brácteas y bracteolas lanceoladas de 1-2,5 x 0,5-1,5 mm, seríceo-estrigosas; pedicelos de 2,5-4 mm, pubérulos a finamente seríceo-estrigosos. Cáliz ralamente seríceo-estrigoso a glabrescente, interior de los dientes finamente seríceo- estrigoso; diente vexilar ovado-triangular, acuminado, de 3,5-4 x 5-5,5 mm, los restantes triangulares, de 2,5-3 x 2,5-3 mm; tubo de 0,5-0,7 cm. Corola con vexilo obovado-elíptico, obtuso a retuso, reflexo a la antesis, de 2,4-2,6 x 1,2-1,4 cm, con aurículas basales, uña de 0,6 cm long; alas y quilla de 2,3-2,5 x 0,4-0,5 cm. Gineceo con disco trapezoidal, de margen irregular, de 1-2 mm long, ovario estipitado, 7-10-ovulado; estípite de 4 mm. Legumbre estipitada, acuminada, de 5,5-7 x 1-1,2 cm, finamente seríceo-estrigosa, con constricciones laterales (muchas veces deformadas por pocas o una sola semilla bien maduras). Semillas 2-7, de 8-8,5 x 4,5-5 mm, ovoides, a menudo irregularmente angulosas, de color uniforme, con hilo de 2 mm, rodeado por el estrofíolo.

Área de distribución- hábitat. Cuenca de los ríos Uruguay y de la Plata, en Brasil: Río Grande do Sul; Uruguay, Paraguay oriental y nordeste de Argentina (región Paranaense, Entre Ríos, Isla Martín García, ribera del Plata en el norte de Buenos Aires). En selva marginal subtropical, que acompaña ríos y arroyos, en suelos altos, arcillosos y arenosos y también pedregosos. Es la especie más austral del género y de área y abundancia bastante restringidas.

Material seleccionado:

ARGENTINA. BUENOS AIRES. Isla Martín García, cerca de la entrada al camino a Punta La Gata, 25 enero 1997, J. Hurrell 3445 (BAB); alrededores de Casa de Bombas, 6 abril

2002, S. Sede 17 (BAB); camino al monumento próximo a Pta. La Gata, Marzo 2000, J. Greppi 25 (BAB); cerca de la cantera, 8 enero 1995, J. Hurrell et al 2250 (BAB); Isla M García, (fl, fr), 4 abril 1954, V. Mazzucconi 609 (BAB); Dpto. Ensenada, Pta. Lara, (fl), 18 marzo 1954, V. Mazzucconi 546 (BAB; CTES). **CORRIENTES.** Dpto. Mercedes, 10 febrero 1925, Millán 434 (BAB); Dpto. Monte Caseros, ruta 127 y Ao. Curuzú Cuatiá, (fl), 20 febrero 1979, A. Schinini et al 17424 (CTES; BAB). **ENTRE RÍOS**. Dpto. Concordia, selva marginal, balneario Tortuga alegre, al Norte de Concordia, 13 enero 1990, N. Bacigalupo 1287 (SI; BAB); al costado del camino que une Pto. Yeruá con Nueva Escocia, a 200 m del Arroyo Yeruá, S. Sede 85 (BAB); Dpto. Federación, entre Federación y Chajarí, río Mandisoví, (fl), 18 marzo 1948, A. Ragonese & B. Piccinini 6449 (BAB); Dpto. Gualeguaychú, Gualeguaychú, Pque. Unzué, camino de la costa al 700, 1 marzo 2001, s/ col. (BAB 92102).

PARAGUAY. ALTO PARAGUAY. Fortín Patria, 3 diciembre 2002, L. Pérez 7578, 7592, 7605 (FCQ, BAB).

URUGUAY. RIVERA. Bajada de Pena, ruta 30 km 253, 31º 08' S 55º 54' O, 262 m snm, (fl), 26 noviembre 2001, G. Seijo et al 2495 (CTES; BAB).

***Camptosema scarlatinum* (Mart. ex Benth.) Burkart.** *Darwiniana* 16 (1-2): 198, 1970.

Collaea scarlatina Benth. Ann. Mus. Vindob. 2,2: 129.1838. Comm. Legum. Gen.:65, 1837.

Planta voluble. Raíz pivotante cilíndrica, negruzca, profunda. Tallos cilíndricos, delgados, retrorso-pubescentes a glabrescentes. Hojas pinnado-trifolioladas; estípulas lanceoladas de 1,5-2,5 x 0,5-1 mm, estrigosas; pecíolos de 1,2 – 2,4 cm long., subvillosos a pubérulo-estrigulosos; raquis, 0,2-0,6 cm; estipelas setáceas de 2-4 mm, glabras; folíolos elíptico-oblongos, obtusos a retusos, subcoriáceos, glabros en la cara adaxial y la abaxial seríceo-estrigulosa; nervadura media prominente en el hipofilo. Racimos con raquis de 1,5-2,8 cm, braquiblastos 3-8, 2-floros; pedúnculo de 1,9-4,5 cm, estrigoso. Flores de 2,2-3 cm; brácteas triangulares, de1,1-2,3 x 0,6-1,5 mm; bractéolas triangular-lanceoladas, de 4-6 x 1-2 mm, estrigosas; pedicelos de 3-7 mm, seríceo-estrigosos. Cáliz tubular-campanulado, finamente estrigoso; lóbulo vexilar elíptico-lanceolado, 0,7-1,4 x 5 mm; los restantes lanceolados, de 7-14 x 2,5-4 mm, pubérulos en su interior; tubo de 5-6 m. Corola roja; vexilo elíptico-oblongo, retuso, reflexo a la antesis, de 2,2-2,6 x 1,1-1,2 cm, con aurículas pequeñas, uña de 0,5-0,8 mm long., alas y quilla de 2-2,5 x 0,4-0,5 cm, glabras. Gineceo con disco trapezoidal, de 1-2 mm, con margen irregular; ovario con ca. 16 óvulos, estipitado; estípite de 2-2,5 mm; estilo

recto. Legumbre brevemente estipitada a sésil, de (3-) 4-6,5 x 0,7-0,9 mm, mucronada, pubescente. Semillas ovoides, de 4,5-5 mm long., castañas, con hilo oblongo breve de 2 mm.

Área de distribución- hábitat: Brasil, desde Goiás y Mato Grosso al norte de Río Grande do sul; Paraguay oriental; Argentina: Misiones. En campos y matorrales o a orillas de la selva.

Material seleccionado:

ARGENTINA. MISIONES. Dpto. Candelaria, 400 m por camino lateral a mano derecha, a 3 km al N de Bonpland por ruta 4, 27º 27' S 55º 29' O, febrero de 2003, R. Fortunato 8003 (BAB); Bonpland, P. Jorgensen 249 (BAB); Dpto. Santa Ana, A. de Llamas 826 (BAB).

BRASIL. MINAS GERAIS. Sabará, Tapera, 4 febrero 1933, M. Barreto 5688 (SP); Sao Francisco dos Campos, Delfín Moreira, 8 junio 1950, M. Kuhlman 2457 (SP).

***Collaea* DC.** *Ann Sc. Nat. Ser*. I. 4: 96, 1825.

Especie tipo: *Collaea speciosa* DC. Mem. Leg. 6: 245

Arbustos subleñosos a leñosos. Raíces principales profundas. Rizomas presentes. Hojas digitado-trifolioladas, raro unifolioladas, subsésiles a sésiles. Inflorescencias en racimos axilares, racimos breves, fasciculados, 1-6-floros. Flores vistosas, blanco-lilacinas, azul-violáceas o rojas, pecioladas; brácteas y bracteolas caedizas, a veces persistentes, las brácteas estrobiliformes en inflorescencias jóvenes. Cáliz campanulado, 4-lobado, seríceo-estrigoso, finamente seríceo en el interior de los lóbulos. Corola pilosa en la cara abaxial del vexilo, con 2 áreas callosas en la porción media de la cara interna del vexilo; alas y quilla unguiculadas. Androceo pseudomonadelfo a monadelfo, tubo inflexo en el ápice. Gineceo con ovario recto a geniculado, seríceo-estrigoso; estilo filiforme, exserto a la quilla, glabro; estigma puntiforme. Legumbre recta, plano-compresa, dehiscencia elástica, pluriseminada con tabiques translúcidos rodeando a las semilla; semillas castaño oscuras a marmoladas, hilo con estrofíolo.

***Collaea argentina* Griseb.** *Plant. Lorentzianae* 77, 1874.

Subarbusto de 1-2 m de altura. **Tallos** castaños a negruzcos, los juveniles pubescentes, grisáceos. **Hojas** con pecíolos y peciólulos de 1-4 (5) mm, seríceo-estrigosos; folíolos elíptico-lanceolados, de (-4,2) 5,2-8 x 0,7-1,2 cm, cartáceos, apiculados, cara adaxial glabra, a veces levemente pilosos sobre la nervadura central, cara abaxial seríceo-estrigosa, con la nervadura central bien prominente. **Racimos** sésiles, umbeliformes, menores que la hoja adyacente. **Flores** de 2-2,8 cm; bractéolas lanceoladas, de 0,8 –1,1 x 0,3-0,4 cm, seríceo-estrigosas, más largas que el tubo calicinal; pedicelos de (-1) 1,3-2,1 cm, estrigosos, híspidos. **Cáliz** con lóbulos lanceolados, el vexilar de 0,7-1 x 0,6-0,8 cm; los restantes de 0,7-1,1 x 0,4-0,6 cm; tubo de 0,5-0,6 cm. **Corola** violácea; vexilo orbicular-obovado, obtuso a emarginado, de 2,2-2,8 x 2 cm, reflexo, seríceo-estrigoso en el exterior, aurículas no inflexas, áreas callosas pubescentes, uña de 0,5-0,7 cm; alas de 2-2,2 x 1-1,7 cm, con repliegue lateral, glabras; quilla de 1,8-2,5 x 0,9-1,7 cm, glabra. **Androceo** pseudomonadelfo. **Gineceo** con disco cilíndrico, carnoso, lobulado en el margen, de aprox. 1 mm, seríceo, fusionado al androceo; ovario 16-18-ovulado, recto a levemente incurvo en la base, estipitado, estípite de 3 mm. **Legumbre** de 7,5-7,8 x 1 cm, seríceo-aplicada, 10-seminada; apículo sublateral. **Semillas** marmoladas, compresas, de 5,5-6 x 3-3,5 mm; hilo oblongo-elíptico de 3 mm, con estrofíolo presente en la porción distal.

Área de distribución-hábitat: Bolivia. En Argentina: Córdoba, San Luis, Tucumán, Salta, en las sierras.

Material seleccionado:

ARGENTINA. **CÓRDOBA**. Dpto. Punilla, La Falda, borde del camino a la Sierra, en macizos, 23 agosto 1926, A.Millón 858 (BAB); 1 km antes de Copino y el primer puente por ruta prov. 14, 31º 33’ S 64º 42’ O, 14 marzo 1996, R. Fortunato 5333 (BAB); s/loc, R. Spegazzini & Girola s/n (BAB 18429). **SALTA**. Dpto Capital, San Lorenzo, noviembre de 1912, F. Devoto 240 (BAB). **TUCUMÁN**. Dpto.Tafí, Pta. San Javier, 900 m snm, 2 noviembre 1943, S. Venturi 2489 (BAB); Las Criollas, 1 junio 1913, Jorgensen s/n (BAB); Dpto. San Javier, Sierra San Javier, entre La Hostería y Villa Nougués, 20 octubre 1948, Krapovickas 4980 (BAB).

***Collaea aschersoniana* (Taub.) Burkart** *Las Legum. Arg.* Ed. 2: 413, 1952.

Galactia aschersoniana Taub.

Subarbusto. **Tallos** seríceo-adpresos. **Hojas** con folíolos elípticos, emarginados, alargados, de 5,3-7,4 x 0,7-1,2 cm, cartáceos, cara adaxial glabra y abaxial densamente serícea; nervadura central bien prominente en cara abaxial e impresa en la adaxial. **Racimo** corimbiforme, menor que la hoja adyacente, 5-6-floro; pedúnculo de 4-5 mm, seríceo-adpreso. **Flores** de 2 cm; brácteas primarias triangulares, de 3,5 x 3 mm, las secundarias elíptico-triangulares, 7 x 3,5 mm, seríceas; bractéolas lanceoladas, de 7 x 1,5-2 mm, seríceas; pedicelos de 0,7-1,4 cm, seríceos. **Cáliz** con lóbulo vexilar elíptico, de 7 x 7 mm, los restantes lanceolados, los laterales de 7 x 5 mm, el carinal de 12 x 5 mm,; tubo de 0,5 cm. **Corola** rosa; vexilo orbicular, emarginado, reflexo a la antesis, de 1,9 x 1,8 cm, seríceo-plateado en toda la lámina, más densamente en el tercio superior, aurículas basales inflexas, uña de 2 mm; alas de 1,7 x 0,9 cm, glabras; quilla obtusa, de 1,5 x 0,6 cm, glabra. **Androceo** pseudomonadelfo. **Gineceo** sésil, 18-20-ovulado con disco cilíndrico, de margen irregular, laminar, de aprox. 1 mm; ovario recto.

Área de distribución-hábitat: Sur de Brasil.
Material examinado:

***Collaea cipoensis* Fortunato.** *Kew Bull. 50(4): 795, 1995*

Subarbusto de hasta 2 m de altura. Tallos erectos o ascendentes, teretes, mas o menos angulares en el ápice, levemente estriados, pilosos o glabrescentes en ramas viejas, pelos cortos, adpresos, antrorsos, amarillentos a cuprosos. Hojas con estípulas angostamente triangulares a lanceoladas, 5-5,5 x 0,75-1 mm, seríceo-pubescentes, glabras en la superficie inferior, caducas; pecíolo de 2-4 mm, pubescente; folíolos linearmente lanceolados a oblongo-elípticos o elípticos, de 4,7-7,2 x 0,3-0,8 (-1,4) cm, finamente coriáceos a coriáceos, levemente obtusos y apiculados en el ápice, algunas veces emarginados, discoloros, con una única nervadura central, glabros en la cara adaxial (a levemente pubescentes sobre la vena media), seríceo-pubescentes con pelos cuprosos en la cara abaxial, venas secundarias incospicuas. Racimos corimbiformes o umbeliformes, menores que la hoja caulinar, 2-6-floros; pedúnculo de 0,9 - 2,5 cm, seríceo-cuproso. Flores de 3-3,5 cm; brácteas ovadas, ovadas-lanceoladas a elípticas, 4,5-7 x 3-3,5 mm, seríceo-pubescentes, cuprosas, caducas; pedicelos de 1,5-3,5 cm, seríceo-pubescentes; bracteolas de 6,5-7,5 x 2-2,5 mm, angostamente

ovadas a lanceoladas, igual o más cortas que el tubo del cáliz (raramente más largas). Cáliz de 1,7-2 cm con lóbulo vexilar elíptico-lanceolado a ovado-lanceolado, de 1-1,2 x 0,6-0,7 cm; lóbulo carinal lanceolado, de 1,1-1,3 x 0,35-0,4 cm; tubo de 6,5-7 mm long. Corola roja a rojo-anaranjada, con una pinta blanca en el centro de la superficie interior del vexilo; vexilo subrómbico a elíptico, angostado en el tercio basal, reflejo a la antesis, 2,8-3,5 x 1,5-1,7 cm, agudo a subagudo, apiculado, pubescente dorsalmente, con áreas callosas pubescente en la mitad inferior de la superficie interior, uña de 5-6 mm; alas oblongas-oblicuas, 2,7-3,2 x 0,6-0,7 cm, cortamente pilosas a lo largo del margen inferior de la parte apical, uña de 6-7 mm; quilla oblonga a angostamente elíptica-oblicua, 2,8-3,4 x 0,7-0,8 cm, subaguda a obtusa, uña de 6-7 mm. Androceo pseudomonadelfo o monadelfo, 2,8-3,4 cm. Gineceo estipitado, de 2,7-3,3 cm; disco basal cilíndrico, de aprox. 1,5 mm, carnoso, pubescente, de margen lobulado, fusionado al androceo; estípite de 5-6 mm; ovario velutino-sedoso, 12-20 ovulado; estilo levemente curvado, con el ápice engrosado terminando en un estigma capitado. Legumbre oblonga a angostamente obovoide, de 8-10 x 0,9-1 cm, velutino-cuprosa, 12-18- seminada. Semillas ovoides a elipsoides, 5-6 x 3-3,5 mm.

Área de distribución-hábitat: Brasil, Minas Gerais, Cerra do Cipó.

Material seleccionado:

BRASIL. MINAS GERAIS. Serra do Cipó, Municipio de Santana do Riacho, km 124 ao longo da Rodovia Belo Horizonte-Conceiçao do Mato Dentro, 25 agosto 1986, Chukr et al CFSC 9841 (SPF 43921) (BAB!, SPF!); antiguo kilómetro 108, campo rupestre, (fl), 3 abril 2004, R. Fortunato 8411 (BAB); bifurcaçao para Morro do Pilar, entre estátua do Juca e Córrego 2 Pontinhas, 9 octubre de 1987, V. Abbud et al CFSC 10782 (SFP 66749; BAB).

***Collaea paraguariensis* (Hassl.) R. García**. *Bol. Soc. Argent. Bot*. 26(1): 136, 1989.

Galactia speciosa (DC.) . Britt. var *acutisepala* Hassl. f. *paraguariensis* Hassl. Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 8: 127, 1910.

Arbusto de 2 m de altura. Tallos erectos, ascendentes. Hojas con pecíolos de 3 mm, seríceo-ocráceo; folíolos elíptico-lanceolados, de 5,5-8 x 0,6-0,9 cm, cartáceos, glabros en la cara adaxial, seríceo-ocráceos en la cara abaxial, nervadura media bien marcada en la cara abaxial e impresa en la adaxial. Racimos axilares umbeliformes, menores que las hojas que los

subtienden, con 4-5 flores densamente agrupadas en el ápice; pedúnculo de 4-4,5 cm long, seríceo; bracteolas lanceoladas, de 1 x 0,2 cm, seríceas, más largas que el tubo del cáliz; pedicelos de (-1,2) 1,5-3,5 cm, seríceos. Flores de 2,5-3,5 cm long. Cáliz campanulado, seríceo bien aplicado en el exterior, plateado, pubérulo a seríceo aplicado en el interior; lóbulo vexilar lanceolado a triangular-lanceolado, de 1-1,2 x 0,7-0,8 cm, el lóbulo carinal lanceolado, de 1,5 x 0,5 cm, los laterales de 1-1,1 x 0,3-0,4 cm; tubo de 0,4-0,9 cm long. Corola roja; estandarte elíptico, obtuso a brevemente agudo, emarginado, reflejo en antesis, 3 x 1,6-1,7 cm, seríceo a seríceo estrigoso en todo su exterior, aurículas basales inflexas, dos pequeñas áreas callosas, uña de 0,6-0,7 cm; alas de 2,5-2,9 x 0,6-0,8 cm, con repliegue basal, pubescentes en el margen, uña de 0,6 cm; quilla de 2,7-2,8 x 0,8 cm, pubescente en el margen, uña de 0,5-0,6 cm. Androceo pseudomonadelfo, recto, levemente inflexo en el ápice. Disco tubular, de margen lobulado, consistencia carnosa, menor a 1 mm long. Gineceo estipitado, estípite de 3 mm; ovario recto, seríceo estrigoso; estilo inflexo en el ápice. Legumbre recta, de 6,5 x 0,8 cm, pubescencia serícea ocrácea, apículo subapical.

Área de distribución- hábitat: savanas inundadas, bajos pantanosos.

Material examinado:

ARGENTINA. MISIONES. Campo San Juan, Pajonal húmedo, a orilla de un arroyo, (fl), 26 noviembre 1984, J. Fontana 5089 (CTES; BAB); Dpto. Candelaria, Bonpland, 17 diciembre 1909, P. Jorgensen 578 (BAB 31361); Co. Santa Ana, frente a la escuela provincial 166, al borde de un arroyo pequeño, 23 febrero 1989, (fl), J. Fontana 633 (CTES; BAB); Dpto Cainguás, pastizal degradado a 2,5 km al N de Campo Grande por ruta prov. 8, 27º 11' S 54º 59' O, 580 m, (fl), R. Fortunato et al 8043 (BAB).

PARAGUAY. ALTO PARANÁ. Estancia Río Bonito, south of Forest III, 25º 38' S 54º 49' O, E. Zardini & F. Vieira 41984 (MO; PY; BAB). **CAAGUAZÚ**. 8 km al N de Caaguazú, camino a Yhú, 25º 23' S 56º 00' O, (fl), 19 octubre 1994, A. Krapovickas et al 45738 (CTES; BAB). **SAN PEDRO**. Santa Rosa-Santa Bárbara, en cerrado, 23º 50' S 56º 23' O, 26 mayo de 1997, E Zardini 46662 (MO; AS; BAB).

***Collaea stenophylla* (Hook. et Arn) Benth**. *Fl. Bras*. 15(1): 146, 1859

Galactia stenophylla Hook. et Arn. Bot. Misc. 3: 182, 1832 ,"1833".

Arbustos o subarbustos, de hasta 2 m. Raíces gruesas, cilíndricas, de 2-2,5 cm diám, oscuras. Tallos angostos, subglabros. Hojas sésiles; estípulas triangulares, de 1-1,5 x 1 mm, seríceas, oscuras, caducas; folíolos oblongo-lanceolados, obtusos, mucronados, de 2,5-7,5 x 0,4-0,8 cm., cartáceos a coriáceos, de base cuneada, aplicado-seríceos en la cara adaxial, y más ralamente seríceos y con nervaduras bien prominentes en la abaxial. Racimos con pedúnculo de 1-2,5 cm, estrigoso; raquis de 2-3 mm, con braquiblastos muy próximos, 2-3-floros. Flores de 1,7-1,8 cm; brácteas triangulares a ovales, de 1 x 1 mm, seríceo-estrigosas; bracteolas elípticas, de 1,8-2 x 1,2-1,5 mm, seríceo-estrigosas, plateadas; pedicelos de 0,7-1,2 cm, seríceo-estrigosos. Cáliz con lóbulo vexilar triangular, de 4 x 6 mm, los restantes triangulares a elíptico-lanceolados, de 4 x 2,5-3,5 mm; tubo de 4 mm. Corola celeste-azulada a violácea; vexilo depreso-ovado, emarginado, reflexo a la antesis, de1,5 x 1,2 cm, pubescente en el exterior, con 2 áreas callosas, aurículas basales inflexas; uña de 2,5 mm; alas obovadas, de 1,2-1,4 x 0,9 cm, pilosas en el exterior, con repliegue; quilla obtusa, de 1-1,1 x 0,5 mm. Androceo pseudomonadelfo, incurvo en la base y ápice. Gineceo con disco tubular, de margen irregular, de aprox. 0,5 mm; ovario sésil, incurvo, seríceo-estrigoso, 10-14-ovulado; estilo corto, ca 2 mm, grueso en la base y curvado hacia el ápice. Legumbre de 4,5-6,5 x 0,8-0,8 cm, serícea. Semillas, 7 a 11, ovoides, castañas, de 3,5-5 x 3-4,5 mm; hilo elíptico, rodeado por completo por el estrofíolo.

Área de distribución-hábitat: especie de América subtropical y tropical. En América del Sur se distribuye desde la Mesopotamia Argentina a Paraguay, sur de Brasil y Uruguay, en campos arenosos, graminosos, zonas pedregosas y bañados.

Material examinado:

ARGENTINA. CORRIENTES. Dpto. Ituzaingó, Playadito, Diciembre 1949, R. Crovetto 6301 (BAB; CTES). **MISIONES**. Dpto. Santa Ana, Cerro Santa Ana, en la base del cerro, zona abierta e inundable, 3 marzo 2002, S. Sede & F. Fernández 1 (BAB); camino al cerro Santa Ana, ingresando por entrada en ruta 12, 4 marzo 2002. S. Sede & F. Fernández 6 (BAB); Dpto. San Ignacio, Gobernador Roca (BAB 8957); Dpto. Candelaria, Loreto, al costado del camino que sale a la derecha del Penal, 3 marzo 2002, S. Sede & F. Fernández 3 (BAB); Loreto, 21 septiembre 1932, A Muniez (BAB).

***Galactia* P. Brown** *Civ. Nat. Hist. Jamaica: 298, 1756*

Plantas herbáceas o subleñosas. Rizomas presentes o con raíces principales, a veces una única raíz axonomorfa. Hojas pinnado-trifolioladas a unifolioladas; estipelas filiformes. Inflorescencias en racimos simples, axilares y/o terminales, nudosos, pedunculados ó sésiles a subsésiles. Flores vistosas, pecioladas, perfectas, a veces perfectas y estaminadas con gineceo rudimentario; bráctea y bractéolas generalmente persistentes. Cáliz campanulado, 4-dentado a 4-lobado, diente o lóbulo vexilar connado por soldadura de los superiores. Corola glabra a pilosa en el tercio superior de la cara abaxial del vexilo, blanco-verdoso a violáceo, rosado a lilacino. Androceo diadelfo a pseudomonadelfo; anteras uniformes, elípticas, dorsifijas. Gineceo con ovario recto, seríceo-estrigoso, pluriovulado; estilo glabro, incurvo, raro levemente recto; estigma capitado, punctiforme, inconspicuo. Legumbre recta a falcada, plano-compresa, ascendente, con dehiscencia elástica, pauci- a pluriseminada con tabiques interseminales membranáceos; semillas negras a castaño moteadas; hilo elíptico con estrofíolo.

Sección Galactia

Especie tipo: *Galactia pendula* Pers. Fawcett et Rendle, *Flora of Jamaica* 4: 55

Plantas herbáceas, volubles. Hojas trifolioladas. Flores de corola grande, de 1,6-2,6 cm, pétalos angostos. Androceo diadelfo. Gineceo con ovario estipitado o subsésil.

***Galactia lindenii* Burk**. *Darwiniana* 16 (3-4): 673, 1971.

Planta herbácea, voluble, hasta 2 m de altura; tallos largos, cilíndricos, pubescentes. Hojas pinnado-trifolioladas; estípulas lanceoladas, alargadas, de 4,5 x 1 mm, densamente seríceo-estrigosas; pecíolos de 1,5-5 cm, villosos, híspidos; raquis de 2-7 mm; estipelas de 1,5-2 mm, pubescentes; folíolos ovado-elípticos, el apical de 2-5 x 1,5-3 cm, obtusos a emarginados, de base redondeada, cartáceos, glabros y lustrosos en la cara adaxial, densamente seríceo-estrigosos en la cara abaxial, grisáceo-pálidos, discoloros, con nervaduras bien prominentes en la cara abaxial. Racimos axilares; raquis de 3,5-10 cm, con 8-22 braquiblastos globosos, 1-3-floros; pedúnculo de 3-7,5 cm, velutino-estrigoso, híspido. Flores de 1,8-2,3 cm; brácteas y bracteolas lanceoladas, de 4-6 x 1-2 mm, villosas, las primeras un poco menores que las segundas; pedicelos de 4-7 mm, seríceo-estrigosos, subvillosos. Cáliz seríceo-estrigo

aplicado, finamente seríceo en el interior de los lóbulos; lóbulo vexilar ovado-lanceolado, de 5 x 4 mm; lóbulos carinales lanceolados, de 4-5 x 2 mm; el inferior lanceolado, de 6 x 2,5-2,8 mm; tubo de 5 mm. Corola roja; vexilo obovado-elíptico, de 2-2,2 x 1,4-1,9 cm, retuso, con algunos pelos en el tercio superior de la cara externa, aurículas basales inflexas, uña de 1,5 mm; alas angostamente oblongas, con algunos pelos en el margen, obtusas, de 1,8-2,1 x 0,4-0,5 cm, rectas; quilla de pétalos similares, 1,8-2 x 0,45-0,55 cm, recta, glabra, uña de 4 mm. Androceo diadelfo, tubo recto. Gineceo con disco cilíndrico, de margen irregular, menor a 0,5 mm; ovario subsésil con estípite brevísimo de 1 mm, 12-14-ovulado. Legumbre patente a erecta, sésil, ligeramente falcado-incurva, de 7-8 x 0,9-1,2 cm, seríceo-estrigosa, 10-seminada. Semillas ovoides, compresas, marmoladas, de 5,5 x 3,5 mm; hilo elíptico-oblongo, de 1,5 mm, con estrofíolo en la porción distal.

Área de distribución- hábitat: Colombia, piso medio andino

Material seleccionado:

COLOMBIA. CUNDINAMARCA. Municipio de Fúquene, vereda Chisaque, sitio Guatancuy, alrededores de la Laguna de Fúquene, 2500 m snm, 13 marzo 2004, L. Ruiz 2; L. Ruiz 3 (COL; BAB).

Sección Odonia (Bertol.) Burkart *Darwiniana* 16(3-4): 666, 1971.

Odonia Bertoloni. Lucubrat. Re Herbar.: 35. Bonnae, 1822.

Especie tipo: *Odonia tomentosa* Bertol. Lucubrat. Re Herbar.: 35. Bonnae, 1822. *(= G. striata (Jacq.) Urban)*

Plantas herbáceas, volubles, postradas, ascendentes o erectas, con o sin rizomas. Hojas 1-3-folioladas, membranáceas a subcoriáceas. Flores mediocres, de menor tamaño que las de la sección *Galactia*. Corola glabra. Androceo diadelfo, rara vez pseudomonadelfo.

Galactia benthamiana **Mich. Symbol.** *Flor. Brasil Central,* Videnskabel. Medelelser f. Naturhist. Forening. Kjöbenhavn 7: 81, 1875.

Planta herbácea, de ca. 20-100 cm de altura, postrada, voluble en los ápices caulinares. Raíz axonomorfa, cilíndrica, no engrosada, medianamente ramosa. Rizomas nulos o presentes y entonces delgados, no mayores de 10 cm, radicantes; corona pequeña de la que parten los tallos postrados o volubles, no radicantes, delgados, de 0,6-1,8 mm diám, densamente pubescentes sobre todo en partes jóvenes, patentes, no retrorsos. Hojas 1-folioladas; estípulas lanceolado-subuladas, de 2-6 mm; pecíolo de 3-15 mm, estrigoso-híspido; estipelas de 1-1,5 mm, pubérulas; folíolo elíptico-ovalado, de base redondeada a un poco acorazonada, obtusos, de 2-11 x 1,2-5,5 cm, cartáceo, herbáceo, pubérulo a glabrescente en la cara adaxial, ralamente estrigoso-híspido en la cara abaxial, pubescencia más densa sobre las nervaduras prominentes. Racimos axilares, erguidos; raquis de 0,3-6 cm, con 1-5 braquiblastos vestigiales en el tercio superior, 1-4-floros; pedúnculos de 1,5-12 cm, estrigoso-híspidos. Flores de 0,8-1,5 cm; brácteas lanceoladas, estriadas, de 3-3,5 x 1-1,5 mm; pedicelos de 1, 5-4,5 cm, densamente seríceos; bracteolas lanceolado-subuladas, de 1,5-2,5 x 0,8-1 mm, estrigosas, a 1mm de distancia de la base del cáliz. Cáliz estrigoso, cara interna de los lóbulos pubérula; lóbulo vexilar elíptico-lanceolado, de 6 x 3 mm; lóbulo inferior de 5,5 x 2 mm y los

Galactia benthamiana Mich.

carinales lanceolados y de 5 –5,5 x 1,5-2 mm; tubo de 3 mm. Corola rosada, lila, azul; vexilo obovado, de 1 x 0,7-0,8 cm, emarginado, glabro, uña de 2 mm; alas y quilla obtusas, de 0,8-0,9 x 0,3 cm, glabras, uña de 2,5-3 mm long. Androceo diadelfo, tubo recto. Gineceo con disco cilíndrico, laminar, de margen irregular, menor a 0,5 mm; ovario sésil, 9-13-ovulado; estigma capitado. Legumbre recta o un poco arqueada, sésil, mucronada, de 2,5-5,5 x 4-5,5 mm; semillas ovoides, marmoladas, de 3,5-4 x 2,5-3 mm; hilo oblongo de 1,5 mm, rodeado completamente por el estrofíolo.

Área de distribución-hábitat: desde Brasil central a Paraguay y Uruguay; en la Argentina, en todo el nordeste y parte del centro. Planta campestre muy dispersa, más bien rara.

Material seleccionado:

ARGENTINA. **CORRIENTES**: Dpto. Santo Tomé, Colonia Liebig, sobre ruta a Garruchos, M Crovetto 8809 (BAB); 7 km al SE de Virasoro por Ruta provincial 37 en dirección a Garruchos, 28º 01' S 55º 56' O, 1 marzo 2002, R. Fortunato 7539 (BAB); confluencia entre las rutas prov. 37 y 94, sobre R prov. 94 en dirección Sur, 28º 07' S 55º 42' O, 1 marzo 2002, R. Fortunato7552 (BAB); ruta provincial 37: 3,2 km al Norte de la confluencia con ruta prov. 94, 28º 09' S 55º 37' O, 7 febrero 2003, R. Fortunato 8073 (BAB); 2,6 km al sur de Garruchos, por ruta prov. 94, 27º 54' S 55º 49' O, pastizal al costado del camino,7 febrero 2003, R. Fortunato 8065 (BAB). **ENTRE RÍOS:** Dpto. Concordia, Yuquerí, 4 km al NE de la entrada en dirección a la ruta por campo interno del INTA, 31º 52' S, 58º 12' O, lomada, 30 enero 2003, R. Fortunato 7886 (BAB).**MISIONES**: Dpto. Capital, Posadas, enero 1957, M. Crovetto 8538 (BAB); febrero 1960, M. Crovetto 8860 **STA. FÉ**: Dpto. 9 de Julio, entre Antonio Pini y Pozo Borrado, 12 enero 1949, A. Ragonese 6832 (BAB); Dpto. Vera, 16 km de Calchaquí hacia Santa Fe.15/11/1983. RH Fortunato 714. (BAB); (BAB); Dpto. Santa Ana, Santa Ana, febrero 1911, B. Zamboni 34767 (SI; BAB).

PARAGUAY. CANINDEYÚ: Reserva Natural de Mbaracayú, administrada por la Fundación Moisés Bertoni, Zona de pastizal de Lagunita, (fr), 24º 08' S 55º 25' O, 14 mayo de 2003, S. Sede 68 (FCQ; BAB).

***Galactia sp. nov*.**

Sufrútice de 50 cm de altura, con pocas ramas desde la base, leñosa. Rizomas cortos con raíces extendidas, divergentes y fusiformes. Tallos arcendentes a suberectos, algunas veces erectos, más o menos angulares en el ápice, 1-2,5 mm diám, tomentosos a seríceos, pubescentes en ramas viejas, con pelos dispersos, amarillentos a blanco marfil. Hojas pinnado-trifolioladas en la porción distal, algunas veces también en la proximal y unifolioladas en el medio y porción proximal, o solamente en la proximal, algunas veces 2-folioladas por reducción; todas las hojas de plantas jóvenes generalmente unifolioladas; estípulas de 1-10 x 1-2,5 mm, angostamente triangular-lanceoladas, longitudunalmente estriadas, pubescentes; pecíolo en ambos tipos de hojas, de 2,5-7 mm long, pubescentes; raquis de 3-6 mm, levemente caniculado; estipelas de 1-3 mm; folíolos de 2,7-12 x 2-5,6 cm, elípticos a ovados, algunas veces el proximal obcordado, cartáceos a finamente coriáceos, obtusos o emarginados y mucronados en el ápice, raramente agudo-acuminados, concoloros, ambas superficies tomentoso-pubescentes. Racimos axilares, subumbeliformes, más o menos curvado-ascendentes; braquiblastos vestigiales 2-3-floros; algunas veces el raquis elongado con braquiblastos en el tercio apical separados en 1-2 fascículos; pedúnculo de 1,5-12,7 cm, pubescente, mayor o igual de largo que la hoja adyacente. Flores de 13-15 mm; brácteas y bracteolas de 4-4,5 x 0,75-1 mm, angostamente ovadas, lanceoladas, acuminadas, pilosas, estriadas; pedicelos 1-2 mm, seríceo-pubescentes; bracteolas persistentes, más largas que el tubo calicinal. Cáliz 11,5- 14 mm, tomentoso pubescente, de 0,75-1,5 mm; lóbulos pilosos en la superficie interior, el vexilar de 8-,5 mm, elípico-lanceolado, el carinal de 10-11 mm, ovado lanceolado; tubo de 3-3,5 mm, glabro en la superficie interior. Corola verde-azulada pálido, celeste a rosa lilacino; vexilo de 13-15 x 7,5-10 mm, ovado a obovado, emarginado, glabro, no reflejo en la antesis, uña de 1,5-2,5 mm; alas y quilla de 12,75-14,5 x 4-4,75 mm, glabras. Androceo diadelfo, tubo estaminal falcado. Gineceo con disco cilíndrico, laminar de margen irregular; ovario sésil o subsésil. Legumbre de 2-4, x 0,45-0,6 cm., angostamente oblonga, velutino a tomentoso-pilosa, 4-9-seminada. Semillas de 3,5-4 x 2,5-2,75 mm, subelipsoides, anguloso-elipsoides a ovoides, rojo amarronadas a moteadas en la madurez; hilo elíptico, de 1,5-1,75 x 0,5 mm; estrofíolo en la porción distal del hilo.

Área de distriución- hábitat: en campos graminosos de la provincia fitogeográfica Paranaense (Cabrera, 1994) hasta 220 m snm.

Material seleccionado:

ARGENTINA. CORRIENTES: Dpto. Santo Tomé, 7 km al SE de Virasoro por ruta prov. 37 en dirección a Garruchos, 135 m, 28º 01´S, 55º 56´O, 1 Mar 2002 (fl, fr), R. Fortunato & M.Luckow 7539 (BAB); Ruta prov. 37, 3,2 km al N de la confluencia con ruta prov. 94, 220 m, 28º 09´S, 55º 37´O (fr), R. Fortunato et al. 8071 (BAB); Empalme de rutas provs. 37-94, 100 m al S por ruta prov. 94, 220 m, 28º 07´S, 55º 42´O (fl, fr), R. Fortunato et al. 8076 (BAB); Ea. Garruchos, 8 Feb 1972 (fl, fr juv), A. Krapovickas et al. 21343 (CTES); Ea. Timbó, Ayo. Ciriaco y ruta 40, 27 Feb 1983 (fl, fr juv), A. Schinini et al. 23466 (CTES); 2 km al S de Garruchos por ruta 94, en dirección a Santo Tomé, 14 Feb 1993 (fr), R. Fortunato et al. 3833 (BAB).

MISIONES: Dpto. Capital, Garupá. 18 Apr. 1979 (fr), Royo 676 (CTES). Dpto. San Javier, Itacaruaré, Jan 1957 (fr), Martínez Crovetto 8757 (BAB).

***Galactia dubia* DC.** *Prodrom. Syst. Nat*. 2: 238, 1825.

Planta herbácea, ascendente o procumbente, baja, no mayor de 80 cm, de base erecta con ápice subvoluble o más difusa y voluble. Tallos delgados, pubescentes a subglabros. Hojas pinnado-trifolioladas; pecíolos de 0,7-2,5 cm, ralamente estrigosos; raquis de 0,3-1 cm; estipelas de 1-1,5 mm; folíolos elíptico-ovados, a veces oblongo- lineales, de 1,5-4 x (0,5-) 0,8-1,8 cm, papiráceos, obtusos a emarginados con un pequeño mucrón, pubérulos en la cara adaxial y ralamente estrigosos en la cara abaxial. Racimos axilares, subsésiles; raquis de 7-12(-23) mm con 2-4 braquiblastos vestigiales 2-3-floros; pedúnculo de 4-6 (-9) mm, pubérulo. Flores de 1-1,5 cm; brácteas y bracteolas, elíptico-lanceoladas de 2-3 x 1-1,5 mm, estrigosas; pedicelos de 2-5 mm, estrigosos. Cáliz estrigoso, lóbulos pubérulos en la superficie interior; lóbulo vexilar elíptico-lanceolado, de 6 x 3,5 mm; lóbulos carinales lanceolados, de 4,5 x 2 mm; lóbulo inferior de 6,5 x 2,5 mm; tubo de 3 mm long. Corola violácea a rojo-violácea; vexilo ovobado a suborbicular, emarginado, de 1-1,4 x 0,9-1 cm, glabro, uña de 1,5 mm; alas y quilla de 0,9-1 x 0,4-0,5 cm, glabras. Androceo diadelfo, tubo recto. Gineceo con disco cilíndrico, laminar, de margen irregular, menor a 1 mm; ovario sésil, seríceo-estrigoso. Legumbre erguida o patente, rara vez casi péndula, sésil, de 3,5-5 x 4,5-5,5 mm, subserícea a glabrescente. Semillas compresas, de 3-3,5 x 2,5 mm, marmoladas, con hilo elíptico de 1 mm long rodeado completamente por el estrofíolo.

Área de distribución-hábitat: Perú. Brasil septentrional, Bolivia y norte de Argentina: Salta y Jujuy. Es una planta de altura, crece en los cerros entre rocas y en terrenos aluvionales.

Material seleccionado: **ARGENTINA**. **JUJUY**. Dpto. Tumbaya, Volcán Chilcayo, camino a Abra Morada, 2400-2500 m snm, 26 febrero 1985, R. Kiesling 5714 (SI). **SALTA**. Dpto. Rosario de Lerma: Campo Quijano, pastizal modificado, 24º 52º S 65º 32º O, 15 marzo 2001, R. Fortunato et al 7175 (BAB); La Silleta, 1,3 km al sudoeste por ruta Nac.51 en direcc. a R. de Lerma, 15 marzo 2001, R. Fortunato et al 7170 (BAB).
BOLIVIA. LA PAZ. Larecaja, sobre el pueblo de Sorata, 18 enero 1985, G. Beck 11081, (Herbario Nacional de Bolivia; BAB); Inquisivi, Rio Khatu Bridge, 16º 53º S 67º 09º O, 12 marzo 1988, M. Lewis et al 8885, (MO, BAB).

***Galactia fiebrigiana* var *fiebrigiana* Burk.** *Darwiniana* 16 (3-4): 695, 1971.

Planta postrada, no voluble. Raiz principal axonomorfa profunda, vertical, subleñosa, hasta 9 mm diám, poco ramosa. Tallos débiles, 30-60 cm, no radicantes, cilíndricos, de aprox. 1-2 mm diám, pubescente-vellosos. Hojas pinnado-trifolioladas; estípulas lanceolado-subuladas, de 3-5 mm, pilosas, estriadas; pecíolo de 0,4-1,5 cm, velloso; raquis de 0,3-0,7 cm; estipelas de 0,8-2,5 mm, pilosas; folíolos elíptico-ovados a orbiculares, el apical de 1,2-3,6 x 1-2,6 cm, cartáceos, obtusos, mucronados, de base redondeada, concoloros, verde-grisáceos, seríceos en la cara adaxial y seríceos a pilosos en la cara abaxial, especialmente en las nervaduras. Racimos axilares, subcorimbosos; pedúnculo de 2-9 cm, villoso a híspido; raquis con braquiblastos globosos, 3-4-floros. Flores de 1,2-1,8 (-2) cm; brácteas triangular-lanceoladas, de 1,5-2,5 x 0,8-1 mm, villosas; pedicelos de 1,5-2 mm, híspidos. Cáliz seríceo, lóbulos pubérulos en la superficie interior; lóbulo vexilar elíptico-lanceolado, 8 x 4 mm, los carinales lanceolados de 7-8 x 2,5-3 mm, el inferior lanceolado de 8-9 x 3 mm; tubo de 3 mm. Corola rojo-violácea a rosado-lila; vexilo obovado, obtuso, de 1,2-1,3 x 9-10 mm, glabro, aurículas poco visibles, no inflexas, uña de 1,5 mm; alas y quilla de 0,9 x 0,3-0,35 cm, glabras, uña de 2,5 mm long. Androceo diadelfo, tubo recto. Gineceo con disco cilíndrico, laminar, de margen irregular, de 0,5-0,8 mm; ovario sésil. Legumbre recta, sésil, de 2-4 x 4,5-6,5 mm, seríceo-pubescente, mucrón apical recurvo, 5-7 seminada. Semillas ovoides, marmoladas, de 3,6-4,5 x 3 mm, hilo elíptico subapical, de 1 mm, con estrofíolo en el extremo distal.

Area de distribución-hábitat: faldas orientales de los Andes, desde Bolivia a Salta y Tucumán, a 2000-2600 m snm, en praderas alpinas, entre rocas.

Material seleccionado:

ARGENTINA.. **SALTA**. Dpto. Santa Victoria, alrededores de Las Huertas, 23° 02' S 65° 49' O, 2700 m snm, (fl), 26 marzo 2003, R. Fortunato 8167 (BAB). **TUCUMÁN**. Dpto Tafí Del Valle, Tafí del Valle, Cerro Pelado, ladera norte, (fr), 16 marzo 2002, S. Sede 12 (BAB).

Var. *sericophylla* Burk. *Darwiniana* 16 (3-4): 700, 1971.

La variedad sericophylla se diferencia de la variedad fiebrigiana por los folíolos más elípticos u obovados, los apicales de 1,5-5 x 1,2-2,7 cm, obtusos a emarginados, mucronulados, densamente seríceos en ambas caras, especialmente sobre las nervaduras. Racimos iguales o menores que las hojas adyacentes, subcorimbosos, con 1-2 braquiblastos 1-5-floros. Legumbres de 4-4,5 x 6 mm, subserícea.

Área de distribución-hábitat: Argentina, Salta, faldas andinas a 2000 m snm; Bolivia.

Material seleccionado:

ARGENTINA.. **SALTA**. Dpto Guachipas, 18 km al sur de Guachipas, cuesta del Lajar, 25° 40' S 65° 29' O, 1780 m snm, (fl), 8 marzo 2002, R. Fortunato 7665 (BAB).

Var *correntina* Burk. *Darwiniana* 16 (3-4): 701, 1971.

La variedad correntina se diferencia de la variedad fiebrigiana por los folíolos elípticos a obovados, seríceos y por los racimos más alargados, de 6-15 (-22) cm, floríferos en su mitad o tercio apical, con 8-10 braquiblastos 1-3-floros; pedicelos de 1,5-3 mm.

Área de distribución-hábitat: Argentina, en Corrientes y Entre Ríos, en suelos arenosos, palmares y sabanas graminosas.

Material seleccionado:

ARGENTINA. ENTRE RÍOS. Dpto. Federación, Santa Ana, balneario, 31° 26' S 58° 05' O, pastizal, (fl), 30 enero 2003, R. Fortunato 7894 (BAB).

Galactia jussiaeana **Kunth** *Nova Gen. et Spec. Plant.* 6: 336, 1823

Sufrútice erecto, duro. Rizoma corto, rastrero o nulo. Tallos cilíndricos, seríceo-estrigosos, rígidos. Hojas pinnado-trifolioladas; estípulas lanceoladas, 2-3 x 0,5- 1 mm, seríceo-tomentosas; pecíolos de 0,5-2,5 cm, estrigosos; raquis de 0,3-1,3 cm; estipelas de 1 mm, pubescentes; folíolos ovados, lanceolados, de 1,5-6 x 1,3-3 cm, subcoriáceos, obtusos, apiculados, densamente seríceo-estrigosos, tomentosos en ambas caras, con la nervadura central un poco prominente en el hipofilo. Racimos axilares o terminales y axilares, menores que las hojas adyacentes; pedúnculo de 0,2 – 1,2 cm, estrigoso; raquis 1,8-5,8 cm, estrigoso, con 5-9 braquiblastos globosos-claviformes 3-6-floros. Flores de 1,3 – 1,5 cm; brácteas y bractéolas triangular-lanceoladas, de 1,2-2,5 x 0,5-1 mm, seríceas; pedicelos de 2-5 mm, seríceos. Cáliz seríceo-hirsuto; lóbulos seríceos en la superficie interna, lóbulo vexilar ovado a elíptico-lanceolado, de 3,5-6 x 2-2,5 mm, los restantes lanceolados, de 3,5 –7 x 1,5-2mm; tubo de 2,5-3,5 mm. Corola rosada, roja, azul-lilacina a violácea; vexilo obovado a elíptico, obtuso, de 1–1,35 x 0,6-0,8 cm, glabro, con 2 pequeñas aurículas, uña de 1,5-2,7 mm; alas y quilla de 1-1,5 x 0,2-0,3 cm, glabras. Androceo diadelfo, tubo estaminal levemente incurvo en el ápice. Gineceo con disco cilíndrico, laminar, con margen irregular, de 1 mm long; ovario sésil. Hay flores masculinas por atrofia del ovario. Legumbre recta, erecta o patente, sésil, de 3,5-6,5 x 0,6–1 cm, seríceo-pubescente. Semillas ovoides, de 4-5 x 2,5-3 mm, castaño marmoladas, hilo elíptico en la porción distal.

Área de distribución- hábitat. Especie tropical sudamericana, que habita en sabanas y campos graminosos con periódicas sequías. Venezuela, Colombia, Cuba y otras islas del Caribe, Guayanas y Brasil.

Material seleccionado:

BRASIL. BAHÍA. Jacobina, Serra da Jacobina, Morro do Cruceiro, 600 m, 23 diciembre 1984, A. Furlan 36546 (SPF 36546; CFCR 7546).

COLOMBIA. Rincón Hondo,Valle Magdalena, sabana, (fl), 2 agosto 1924, C. Allen 207 (MBG).

VENEZUELA. **AMAZONAS.** carretera del Pto. Ayacucho –Samariapo, selva en galería sobre el río Cataniapo, 21 febrero 1986, B. Stergios & G. Aymard 8960 (PORT; NYBG);

Dpto Atures, al sur de Cerro Camani, 5° 18' N 66° 16' O, 600 m, 10 octubre 1979, O. Huber 4614 (VEN). **GUÁRICO**. Cabruta, 5 km al sur de Sta. Rita, carretera las Mercedes, 60 m, 8° 6' N 66° 15' O, 23 febrero 1997, R. Ortiz & M. Ramia 3709 (VEN). **PEDRO CAMEJO**. Pque. Nac. Santos Luzardo, sobre el río Capanaparo 6° 33° S 67° 07°, 40 m, Castillo 3117 (MO).

Galactia latisiliqua **Desv.** *Annal. Scien. Nat*. 9: 414, 1826.

Planta herbácea, de menos de 1 m de alto, rara vez subarbustiva, erecta o ascendente, apicalmente más o menos voluble pero nunca muy voluble. Raíz principal axonomorfa, vertical poco profunda pero no engrosada, cilíndrica y no ramosa debajo del cuello, de 3-7 mm diám. Rizomas ausentes. Tallos poco ramificados, cilíndricos, de hasta 3-3,5 mm diám., pubescentes. Hojas pinnado-trifolioladas; estípulas triangular-lanceoladas, de 0,5-1 x 2-3,2 mm, longitudinalmente estriadas, hirsutas; pecíolos 1,7- 2,5 cm, híspidos, ralamente estrigosos; raquis de 0,5-1,2 cm; estipelas de 0,6-2 mm; folíolos elíptico-ovados, de 2-5 (-7) x 1,5-3,5 (-5) cm, cartáceos, obtusos, mucronulados a emarginados, concoloros, más o menos tomentosos en ambas caras. Racimos axilares; pedúnculo 1,5 – 6 (-7) cm, híspido, villoso; raquis de (-0,5) 1,2- 3 (-5) cm, híspido a subvilloso, estrigoso, con 2-5 braquiblastos globosos 2-4-floros. Flores de 7-12 mm; brácteas y bracteolas ovadas, lanceoladas, 0,5-1 x 1,5-3 mm, estrigosas; pedicelos de 2 mm, híspidos. Cáliz velutino-estrigoso; lóbulos pubérulos en la superficie interior; lóbulo vexilar oblongo-elíptico, lanceolado, de 4 x 2 mm; los restantes, de 5-6 mm; tubo de 2,5-3 mm. Corola rosado-blanca a violáceo-lila o celeste; vexilo obovado, emarginado, obtuso, no reflejo en antesis, de 7,5-8 x 5-6 mm, con pequeñas aurículas no inflexas, uña de 1,5-1,7 mm; alas y quilla de 6,5-10 x 2-2,3 mm, uña de 2,5 mm. Androceo diadelfo, tubo estaminal levemente incurvo en el ápice. Gineceo con disco cilíndrico, de margen irregular, menor o igual a 0,5 mm; ovario sésil, 6-10-ovulado. Legumbre recta a levemente incurva en el ápice, subsésil, brevemente recurvo-rostrada, de 3,5-5 x 5,5-7 mm, villosa, hirsuta, con leves constricciones oblicuas entre las semillas. Semillas 6-10, ovoides, compresas, de 4-5 x 3 mm, marmoladas, con el hilo elíptico de 1 mm, rodeado completamente por el estrofíolo.

Área de distribución- hábitat. Especie sudamericana de área extensa en el norte (Guayanas) hasta el centro de Argentina y Uruguay. Hábitat: campestre o en montes xerófilos, suelos secos y pedregosos, en barrancas arcillosas o cerros bajos.

Material seleccionado:

ARGENTINA. CÓRDOBA. Dpto. Capital, Terreno baldío en el barrio Urca a ½ cuadra del río Suquía, (fr), 12 abril 1995, A Lamarque 38 (BAB 91934). **CORRIENTES.** Dpto. Empedrado, Ao. Riachuelo y ruta 12, 1º marzo 1995, S. Cáceres 428 (CTES, BAB); Dpto. Lavalle, 1,4 km de Yataity, calle por ruta Prov. 120 en direcc O a RN 12, 29° 01' S 58° 53' O, 31 enero 2003, R. Fortunato et al 7916 (BAB). **ENTRE RÍOS.** Dpto. Concordia, puente Alvear sobre ruta 14, bajos del Yuquerí, 11 enero 1990, N Bacigalupo et al 1243 (SI, BAB); Ayuí II, borde del camino, 15 enero 1990, N Bacigalupo et al 1345 (SI, BAB); Pque San Carlos, a 50 m de la costa del río Uruguay, camino al lado de la boite, suelo arenoso, porte erecto, 18 febrero 2002, S. Sede & C Laporta SC5 (BAB); en los alrededores del Cristo, sobre la barranca, 18 febrero 2002, S Sede & C Laporta SC5 (BAB); cerca del hotel San Carlos, 2 marzo 2002, (BAB 92101); 1 km al oeste de ruta Nac. 14 en dirección a Nueva Escocia, 31° 37’ S 58° 11’ O, 60 m, 28 febrero 2002, R. Fortunato et al 7527 (BAB). **FORMOSA.** Dpto. Patiño, 1 km al sur de Las Lomitas por ruta provincial 18, 24° 44’ S 60° 37’ O, 29 noviembre 2000, R. Fortunato et al 6843 (BAB; UN_PAT, ARIZ, NY; MO; G; CTES); 12 km al sur de las Lomitas por ruta prov. 28, 2 diciembre 2000, R. Fortunato et al 6840 (BAB); 17 km al sur de las Lomitas por ruta nac 81, 24° 37’ S 60° 37’ O, 28 noviembre 2000, R. Fortunato et al 6825 (BAB); 9,9 km al SE de Pozo del Tigre por ruta Prov, 26, 24° 58’ S, 60° 21’ O, 29 noviembre 2000, R. Fortunato et al 6861 (BAB); Dpto Bermejo, 28 km al E de Ing. Juárez por ruta Nac 81, 24° 01' 61° 35' O, 26 noviembre 2000, R. Fortunato et al 6785 (BAB). **SALTA**: Dpto. Oran, 3,65 km al O de Orán por camino vecinal en dirección a Santa María, 23° 11' S 64° 20' O, 490 m, 17 diciembre 2002, R. Fortunato et al 7855 (BAB); 2 km al SO de la entrada de Orán, desvío a Sta. María, 23° 10' S 64° 20' O, 320 m, 15 noviembre 2001, R. Fortunato et al 7309 (BAB); Dpto. Guachipas, 1 km al S de Guachipas en dirección a El Cebillar, 25° 32' S 65° 30' O, 16 marzo 2001, R. Fortunato et al 7223 (BAB, CTES , MO); Dpto. San Martín, campo de La Noche (15 km al E de ruta 34 sobre ruta 81) 300 m, 12 marzo 1992, C Saravia Toledo & R Neumann 10735 (BAB).

BOLIVIA. CHUQUISACA. El Salvador –Cimboc, 750 m snm, 23 febrero 1992, C. Saravia Toledo & J Joaquín 10869 (BAB). **PARAGUAY. ALTO PARAGUAY**: Fortín Patria, 1 diciembre 2002, L. Pérez 7550 (BAB, FCQ).

Galactia aff latisiliqua

Algunos ejemplares analizados de *G. latisiliqua* coinciden con los caracteres de esta especie salvo por: el hábito erecto, subarbustivo; racimos breves, de 1,3-2,1 cm, menores que la hoja adyacente; pedúnculos de 0,3- 0,9 (-1,2) cm.

Área de distribución- hábitat. Esta forma se encuentra principalmente en el Chaco paraguayo. Suelos arenosos.

Material seleccionado:

BOLIVIA. STA. CRUZ. Río Perdis, en arenales a 400 m snm, Steinbach 6629 (Kew)

PARAGUAY. **ALTO PARAGUAY.** Pque. Defensores del Chaco, F. Mereles 8935 (FCQ, BAB). **BOQUERÓN.** Proyecto Tagua, camino a Fortín Toledo, 22° 21' S, 60° 20'O, 18 febrero 2002, M. Luckow et al 4500 (FCQ, BAB,); entre Parque Nac Teniente Agripino Enciso y Nueva Asunción, en dunas, 20° 54'S 61° 50' O, 27 enero 1995, E. Zardini & A. Acosta 42253 (MO AS BAB); Parque Nac. Médanos del Chaco, 20° 41' S 61° 57' O, 12 diciembre 1998, E. Zardini 49651 (MO AS BAB); 20° 54' S 50° 34' O, E. Zardini 49713 (BAB, MO). **CHACO**. Línea 3 (oeste) km 60, 19° 42' S 61° 13' O, 53 km al este de la pista de aviación Cabrera, noviembre 1992, L. Ramella 2942 (BAB, G); km 50, 19° 42' S 61° 18' O, 44 km al este de la pista de aviación Cabrera, 9 noviembre 1992, L. Ramella et al 2923 (BAB, G). **PARAGUARÍ.** Estancia Lago Ypoá: Cerro Lima, 26° 02' S 57° 24' O, E. Zardini 37630 (MO; AS); **SANTÍSIMA TRINIDAD.** Jardín Botánico, Archer 4713. (USNM).

***Galactia longifolia* (Jacq.) Benth.** *Ann. Mus. Vindobon.* 2 (2): 127, 1838.

Galega longifolia Jacq. Collectan. Ad Bot. Spect.2: 349. Vindobonae, 1788.

Planta herbácea. Raiz principal delgada, corta, a veces ramosa. Tallos largos y delgados, cilíndricos, duros, abajo postrado-erectos, arriba volubles. Hojas pinnado-trifolioladas; estípulas triangular-subuladas, escariosas, de 2-5 x 1-2 mm, pilosas; pecíolo de 1-9 mm, seríceo; raquis de 2-10 mm, seríceo; estipelas de aprox. 2 mm; folíolos oblongo-lineares, el apical de (2,5-) 3-9,7 x 0,6-1,9 cm, cartáceos subcoriáceos, bordes lisos (a veces un poco recurvos), obtusos en ambos extremos, mucronados y a veces emarginados en el ápice, seríceo-estrigosos, plateados, más densamente pubescentes en la cara abaxial, nervadura central impresa en cara adaxial y bien prominente en cara abaxial; folíolos laterales un poco menores. Racimos axilares; raquis de 0,5-3 cm, con 1-3 braquiblastos vestigiales 1-3-floros; pedúnculo de 3-14 cm, seríceo. Flores de 1 cm; brácteas escariosas, pilosas, triangulares, agudas, de 1,5-2,3 mm; bracteólas lanceoladas, de 1-3 x 0,5-1 mm, pilosas; pedicelo de 1-2,5 mm, seríceo. Cáliz densamente seríceo-estrigoso; lóbulos seríceos en la superficie interior; el vexilar elíptico-lanceolado a oblongo, 4,5-6 x 2,8-3 mm; los demás lanceolados, de 3,5-6 x 1,5-2 mm; tubo de 2-3,5 mm. Corola rosado-celeste a morado pálida-lila; vexilo obovado, obtuso, de 0,8-1,1 x 0,6 cm, glabro, pequeñas aurículas basales inflexas, uña de 1,5 mm; alas y quilla obtusas, de 8-9 x 3-3,5 mm, glabras. Androceo diadelfo, tubo recto, levemente incurvo en el ápice. Gineceo con disco cilíndrico, laminar, de margen irregular, de 0,5 mm; ovario sésil, 8-10 ovulado. Legumbre recta, sésil, de 2,5-4,5 x 4-6 mm, serícea, con el ápice recurvo-mucronado. Semillas ovoide-elípticas, de 3,5-4,5 x 2 mm, marmoladas, con hilo elíptico, en posición lateral, rodeado por completo por el estrofíolo.

Área de distribución-hábitat: América cálida: Estados Unidos (Texas), islas del Caribe y en el sur, el Gran Chaco argentino-paraguayo, hasta el norte de Santa Fé y Entre Ríos, en la Argentina. De dudosa presencia en Brasil. Suelos bajos, fértiles, pajonales anegadizos o también en campos altos, trepando sobre gramíneas.

Material seleccionado: **ARGENTINA. ENTRE RÍOS**. Dpto. La Paz, 0,9 km de ruta Nacional 12 por ruta A02 en dirección a Santa Elena, cerca del Ao. Quebracho, 30° 58' S 59° 40' O, alrededores de Policía rural e Islas, (fl), 31 enero 2003, R. Fortunato et al 7907 (BAB). **CHACO**. Dpto. 12 de Octubre, El Palmar, camino entre Tres Isletas y Fortín Lavalle, 17 enero 1949, A. Ragonese & Castiglioni 6977 (BAB); Dpto. San Fernando, Basail, campo alto

turboso, suelo fértil, 23 enero 1964, Schulz 12766 (fl) (BAB); Ea. La Dorila, zona Basail, campo alto pastizal de *Elyonorus*, 6 febrero 1964, Schulz 13138 (fr) (BAB); Dpto. Patiño, Bartolomé de las Casas, pajal bordeando estero, anegado temporariamente, (fl, fr), 14 diciembre 1970, Schulz 17745 (BAB); Dpto. General Donovan, por ruta 16, 2 km al O de Makalle, (fl, fr), 15 noviembre 1983, R. Fortunato et al 669 (BAB); Isla del Cerrito, febrero 2003, R. Fortunato et al s/n (BAB). **FORMOSA**. Dpto Pilcomayo, Pque. Nac. Pilcomayo, Gil Cué, NO del Puesto Santa María, alrededores de 3 lagunas, selva en galería bordeando el río Pilcomayo, 10 noviembre 1991, (fl), R. Fortunato et al 2151 (BAB); alrededor del puesto de gendarmería La Ángela, selva en galería, pequeño brazo del río Pilcomayo, 18 febrero 1992, R. Fortunato et al 2797 (BAB); Dpto. Pirané, El Colorado, Est. Exp. INTA, campo alto, (fl), 15 octubre 1968, Schulz 16421 (BAB).
PARAGUAY. ITAPUA. Reserva de la Isla Yacyretá, camino a Aña Cuá, 27° 24' S 56° 41' O, 8 diciembre 2002, E. Zardini & R Gamarra 59586 (MO; AS; BAB).

Observaciones: Bentham (1859) la sinonimizó con *G. tenuiflora* var eriocarpa. No debe confundirese *G. longifolia* (Jacq.) Benth, con el homónimo posterior no válido *G. longifolia* (Benth.) Hoehne 1922, basado en *Collaea* longifolia Benth., que es sinónimo de *G. hoehnei* Burk.
La especie más afín en la Argentina es G. striata, pero se diferencia de esta por presentar hojas subsésiles, folíolos oblongo-lineares, de bordes casi paralelos, con indumento seríceo-estrigoso plateado, bien denso en la cara abaxial, hábito menos voluble y hábitat diferente. También presenta afinidad en la morfología con *C. paraguariense*, con la que comparte el área de distribución en América del Sur (Chaco paraguayo y Argentina). Sin embargo, *C. paraguariense* presenta folíolos glabros y nunca oblongos.
Presenta un área de distribución tricéntrica: Texas (EEUU), Antillas y el Gran Chaco.

***Galactia marginalis* Benth.** *De Legum. Gen. Annal. Mus. Vindob*. 2 (2): 126, 1838.

Planta herbácea, de 19-50 cm de altura, ascendente, recta, no voluble. Rizomas horizontales, hasta 15 cm de long y 1-2,5 mm diam, raíz primaria napiforme profunda, subleñosa, simple, de 2-6 cm long, con xilopodio. Tallos de menos de 1 mm de diám, rígidos, a veces flexuosos, un poco retrorso-pilosos. Hojas 1-folioladas; estípulas linear-lanceoladas, caducas; pecíolo de 0,2-0,8 (1,5-)cm, pubérulo; estipelas de 1-3 mm; folíolos anisomorfos: inferiores elíptico a

ovado-lanceolados de 1-2,5 x 0,5-1 cm, los superiores oblongo-lanceolados, de 3-10 x 2-10 mm, subcoriáceos, rígidos, subglabros, obtusos o subagudos, mucronados, de borde liso, con nervadura marginal tan prominente como la central. Racimos axilares, sésiles, braquiblastos vestigiales 1-3-floros. Flores de 1,3-1,9 cm; brácteas subuladas, de 0,8-3,5 mm, pubérulas; pedicelos hasta 5 mm long, pubérulos; bracteolas lanceoladas, 2-2,5 x 0,5-0,8 mm, pubérulas, distanciadas da la base del cáliz por 1-2 mm. Cáliz estrigoso; lóbulos glabros en la superficie interior; el vexilar elíptico-lanceolado, de 3,5 x 4 mm, los carinales lanceolados de 3-3,5 x 2 mm, el inferior lanceolado, de 4,5 x 1,5 mm; tubo de 3,5-4 mm. Corola rosada a violácea; vexilo obovado a suborbicular, de 1,3-1,4 x 1-1,2 cm, emarginado, glabro, uña de 2 mm; alas y quilla obtusas, de 1,1-1,3 x 0,45-0,5 cm, glabras, uña de 2,5-3 mm. Androceo diadelfo, tubo recto. Gineceo con disco cilíndrico, laminar, de margen irregular, de 1,5 mm; ovario cortamente estipitado, de aprox. 2-3 mm, 10-15-ovulado; estigma apical dilatado, deprimido, capitelado. Legumbre erecta, de 2-3 x 0,5-0,6 cm, subsésil a estipitada, estípite de 3-5 mm, pubérula a estrigosa, glabrescente, con breve rostro; semillas ovaladas a romboides, pardas con manchas negras, 3-4 x 3-3,5 mm; hilo elíptico, de 1 mm, con estrofíolo sólo en el extremo distal.

Área de distribución-hábitat: Áreas disyuntas. En Argentina se distribuye en su mitad norte. Brasil: Rio Grande do Sul. Uruguay. Sudoeste de EEUU y América del Sur extratropical. Campos altos o cerros bajos, en suelos arcillosos, calcáreos o pedregosos, secos.

Material seleccionado: **ARGENTINA**. **CÓRDOBA**. Manti, asociada con *H. allionis*, (fl), 14 diciembre 1963, A. Ragonese & Piccinini 9557 (BAB). **CORRIENTES**. Dpto. Paso de los Libres, Bonpland, diciembre 1956, R. Crovetto 8649 (BAB). **ENTRE RÍOS.** Dpto. La Paz, 0,9 km de RN 12 por ruta A02 en direcc. a Santa Elena, cerca del Ayo. Quebracho, 30° 58' S, 59° 40' O, alrededores de Policía Rural e Islas, 31 enero 2003, R. Fortunato et al 7908 (BAB). **SALTA.** Dpto. Guachipas, 14 km al S de Guachipas en direcc. a Pampa Grande, 25° 39'S, 65° 29' O, 16 marzo 2001, R. Fortunato et al 7185 (BAB). **SAN LUIS**. Dpto. Cnel. Pringles: sierras al O del destacamento policial de El Durazno, (fl), 5 enero 1980, Rossow & Canale 13 (BAB).

Galactia martii* DC. var *martii. *Prodrom. Syst. Nat*. 2: 238, 1825.

Planta herbácea, postrada, no voluble. Rizomas negruzcos, alargados. Tallos acostados, delgados, de unos 30-80 cm long., duros, cilíndricos, finamente retrorso seríceo-estrigulosos a glabrescentes. Hojas digitado-trifolioladas unilateralmente orientadas; estípulas lanceoladas, de 3-3,5 x 1mm, estriadas, pubérulas a glabras; pecíolos de 1,4 –3,2 cm, pubérulos, estriados; estipelas de 0,8-2,5 mm; folíolos elíptico-lanceolados, oblongos hasta oblongo-ovados, de 2-7,3 x 0,25-1,5 cm, rígidos, coriáceos, más o menos péndulos, oscurecidos en seco, conduplicados, obtusos a subobtusos y mucronulados, glabros en la cara adaxial, seríceo aplicado adpreso en la cara abaxial. Racimos axilares umbeliformes; raquis de 0,8-3,5 mm, con braquiblastos vestigiales 2-4-floros; pedúnculo de 2-6 cm, seríceo-ocráceo aplicado. Flores de 1,3-1,6 cm; brácteas y bracteolas subuladas-lanceoladas, de 4 x 1 mm, estriadas, seríceo-estrigosas; pedicelos de 2-5 mm, estrigoso-híspidos. Cáliz seríceo; lóbulos pubérulos en el interior; el vexilar oblongo-lanceolado a elíptico, de 8-9 x 3-5,5 mm; lóbulos carinales lanceolados, de 7-7,5 x 2-3 mm; lóbulo inferior lanceolado, de 10 x 3-4 mm; tubo de 3-4 mm. Corola lilacina, magenta-azulada o rosado oscura; vexilo obovado-elíptico, de 1,4-1,5 x 1 cm, emarginado, glabro, con 2 aurículas inflexas en la base, uña de 2 mm; alas de 1,1-1,5 x 3-4 mm, glabras, uña de 3 mm; quilla de 1,2-1,3 x 3-4,5 mm. Androceo pseudomonadelfo; tubo levemente incurvo en la base y en el ápice. Gineceo con disco piramidal, de 1 mm, laminar, de margen irregular; ovario sésil, 10-14-ovulado. Legumbre recta, de 4,5 x 0,8 cm, oscura, lisa, subglabra, pluriseminada.

Área de distribución-hábitat: Brasil. En campos altos, secos.

Material seleccionado: BRASIL. BAHÍA. NA. BR 020, 29 mayo 1978, J. de Souza Silva 691 (SP); Itaguacu, Barra da Estiva, a 8 km de Serra da Estiva, Morro do Ouro, (fl), 19 junio 1981, A. Giullietti (SPF18171) CFCR1262; Ibiquara, 25 mayo 1986, G. Hatschbach 47543 (MBM); Municipio de Piata, proximo a Serra do Gentio (Gerais-entre Piata e Serra do Tromba), 21 diciembre 1984, G. Lewis (SPF 37159) CFCR 7359; Ma. Mucuge, Estrada de Mucuge-Guiné, a 5 km de Mucuge, 7 septiembre 1981, A. Furlan et al (SPF18766) CFCR1971. **MINAS GERAIS**. Ouro Preto, Saramemba, diciembre 1981, A. Macedo 2734 (SP); Municipio do Caeté, Serra da Piedade, 19° 49° S 43° 40° O, 11 enero 1996, V. Souza et al 10094 (ESA).

Galactia neesii* DC. var *neesii *Prodrom. Syst. Nat*. 2: 238, 1825.

Planta herbácea, erecta a postrada. Rizoma viajero, de hasta 20 cm. Tallos tendidos de 40 cm hasta casi 2 m de long, ascendentes en el ápice, muy pubescentes, glabrescentes en la madurez. Hojas digitado a pinnado-trifolioladas; pecíolos de 1,2-4 cm, tomentosos a villosos; raquis ausente o hasta 1 cm, tomentoso, villoso; estipelas de 2,5-3 mm, villosas; folíolos elíptico-ovados, de ápice obtuso a emarginado, mucronados, de 3,5-7,2 x 2-3,6 mm, seríceos en la cara adaxial, densamente tomentosos a villosos en la cara abaxial, cartáceos. Racimos axilares, subumbeliformes, raquis de 1,5-3 cm, con 2-4 braquiblastos vestigiales 2-3-floros; pedúnculo de 6-14 cm, villoso-híspido. Flores de 1,3-1,6 cm; brácteas de 4,5-7 x 1,5-2,5 mm, ralamente tomentosas, estriadas; bractéolas elíptico-lanceoladas, de 4,5-5 x 1,5 mm, densamente tomentosas; pedicelos de 2,5-3 mm, tomentosos a villosos. Cáliz tomentoso a seríceo, subvilloso; lóbulos seríceo-adpresos en la superficie interior; el vexilar oblongo-lanceolado, de 8 x 3-3,5 mm; los carinales lanceolados, de 6-7 x 2 mm; el inferior lanceolado, de 9-10 x 2,5mm; tubo de 3 mm. Corola celeste; vexilo obovado, emarginado, de 1,3-1,4 x 1,1-1,2 cm, glabro, con 2 pequeñas aurículas inflexas, uña de 3 mm; alas y quillas alargadas, subobtusas, de 1,1-1,2 x 0,5-0,6 cm, glabras. Androceo pseudomonadelfo, tubo levemente incurvo. Gineceo con disco cilíndrico, laminar, con margen irregular, de 0,5-0,8 mm; ovario sésil. Legumbre recta, de 2,5 x 0,6 cm, laxamente villosa. Semillas de 5-6 x 3 mm, ovoides, oscuras; hilo elíptico de 1,5 mm long rodeado completamente por el estrofíolo.

Área de distriución-hábitat: Brasil. En campos, cerrados, suelos arenosos.

Material seleccionado:

BRASIL. **GOIAS**. Rod. GO-118, 20-30 km ao Sul de Sao Joao da Alianza, 14 octubre 1990, M. Hatschbach 54517 (MBM). **SAN PABLO.** Sao Paulo, Vila Moraes, 18 enero 1944, O. Handro s/n (SP); nativa do Jardim Botanico, abril 1944, O. Handro s/n (SP); Santo Andre, 19 noviembre 1949, G. Hashimoto 658 (SP); Itaquera, 18 enero 1942, P. Goncalves (SP 46297); Campos do Jordao, Umuarama, 22 noviembre 1949, E Kuhn 2053 (SP 46095).

***Galactia striata* (Jacq.) Urban**. *Symbolae Antillanae* 2: 320, 1900.

Glycine striata Jacq. Hort. Bot. Vindobonensis seu Plant. Rarior 1: 32, tab. 76 Vindobonae, 1771 ("1770").

Planta herbácea, voluble. Raíz axonomorfa, breve, poco ramosa, no muy engrosada; rizomas y raíces adventicias ausentes. Tallos delgados, cilíndricos, de 2 mm diám, retrorso-pubescentes a villosos, a veces glabros. Hojas pinnado-trifolioladas; estípulas triangulares, agudas a subuladas, de 2 x 0,5 mm, estrigosas, estriadas; pecíolos de 2-5,5 cm, piloso-tomentosos; raquis de 0,8-1,7 cm; estipelas de 1-1,5 mm, pilosas; folíolos elípticos a ovado-lanceolados, emarginados, obtusos a subagudos, mucronados, el apical de (2-) 4-9 x (1-) 1,6-3,7 cm, los laterales un poco menores, glabros a pilosos, principalmente sobre la nervadura central en la cara adaxial y densamente pubérulos a seríceos en la cara abaxial. Racimos axilares, erectos; raquis de 7,5-24 cm, con 10-15 braquiblastos globosos 1-3-floros; pedúnculo de 1,5-7 cm, tomentoso a subglabro. Flores de 1-1,7 cm brácteas triangular-lanceoladas, de 1,5-3 x 1-1,5 mm, tomentosas; pedicelos de 2-3 mm, pubérulos. Cáliz piloso, lóbulos pubérulo en la superficie interior; el vexilar elíptico-lanceolado, de 4,5-5,5 x 2-2,5 mm; los carinales lanceolados, de 4-4,5 x 1-1,5 mm; el inferior lanceolado, de 4,5-6 x 1,2-1,5 mm; tubo de 2-3 mm. Corola rosado-violácea a azul-morada; vexilo ovobado, emarginado, de 7-15 x 7-12 mm, glabro, uña de 2-3 mm, con dos aurículas inflexas en la base, reflejo en antesis; alas y quilla de 6-13 x 2,2 4 mm, glabras. Androceo diadelfo, tubo recto. Gineceo con disco cilíndrico, laminar, de margen irregular, menor a 1mm; ovario sésil. Legumbre recta, levemente incurva en el ápice, sésil, más angosta en la base, brevemente mucronada, 6-12-seminada, de 4,5-8 x 5-10 mm, estrigosa. Semillas ovoides, de 5,5-6 x 4 mm, marmoladas; hilo elíptico de 1,5 mm, con estrofíolo rodeando la porción distal.

Área de distribución-hábitat: Pantropical??ocupa un área extensa en América cálida, desde el sudeste de Estados Unidos (Florida) hasta Argentina (Entre Ríos). Crece en la orilla de selvas y bosques, trepando sobre arbustos o árboles menores.

Material seleccionado:

ARGENTINA. CORRIENTES. Dpto. Capital, Molina Punta, en quebrachal degradado, (fl), 4 marzo 1998, S. Tressens & Schinini 5969 (CTES; BAB). **ENTRE RÍOS.** Dpto. Federación, común a orillas del Río Uruguay, febrero 1947, (fl), Martínez Crovetto & Grondona 4429

(BAB); Dpto. Concordia, Parque Rivadavia, a 100 m de la costa del Río Uruguay, 22 febrero 2000, (BAB 92096), (BAB 92099); balneario Tortuga Alegre, al norte de Concordia, en selva marginal, (fl), 13 enero 1990, N. Bacigalupo et al 1302 (BAB). **MISIONES**. Dpto. San Ignacio, camino al Peñón del Parque provincial Teyucuaré, trepando sobre arbustos (fl, fr), 5 febrero 2002, S. Sede & F. Fernández 9 (BAB); 2,6 km al O de Gendarmería en dirección al Pque Prov. Teyúcuaré, 27° 20' S 55° 39' O, pastizal, 330 m snm, 4 febrero 2003, R. Fortunato et al 8037 (BAB); cerca de la ciudad de San Ignacio, (fr),14 septiembre 1985, M. Múlgura et al 614 (BAB); Dpto Iguazú, Pque Nacional Iguazú, Islas del Paseo Superior, interior de selva, sobre curso de agua, (fl), 29 febrero 1996, Vanni et al 3542 (CTES; BAB); Dpto. 25 de Mayo, 3,8 km al N de 25 de Mayo por ruta prov. 8 en dirección a Campo Grande, 27° 10' S 54° 58' O, 390 m snm, al costado de selva marginal, (fl, fr), 6 febrero 2003, R. Fortunato et al 8050 (BAB); Dpto. Candelaria, 1,2 km al E de Cerro Corá por ruta prov. 207 en dirección a Bonpland, 27° 35' S 55° 34' O, (fl), 3 marzo 2003, R. Fortunato et al 7992 (BAB).

***Galactia texana* (Scheele) A. Gray.** *Boston Journ. Nat. Hist.* 6: 170, 1850.

Lablab texanus Scheele. *Linnaea* 21: 467, 1848.

Planta herbácea, erecta, de hasta 70 cm. Raíz axonomorfa, cilíndrica, dura, poco engrosada, de 5-6 mm de diám. Rizomas ausentes. Tallos ascendentes o erectos, de base subleñosa, naciendo en corona del cuello de la raíz principal, hacia el ápice tenues y volubles.Hojas pinnado-trifolioladas; estípulas caducas; pecíolos de 0,5-1,6 cm, villosos; raquis de 0,3-1 cm; estipelas de 0,5-1 mm; folíolos elípticos a ovado-elípticos, obtusos o emarginados, mucronados, subagudos; folíolo apical de 2,5-3,3 (4-) x 1,1-2,3 (3-) cm, papiráceo, pubérulo a seríceos, más densamente sobre las nervaduras en la cara abaxial; los laterales de menor tamaño. Racimos axilares, muy breves, de 0,4-1 cm entre pedúnculo y raquis, seríceos, con pocos braquiblastos vestigiales 1-2-floros. Flores de 1-1,4 cm; brácteas lanceoladas de 1,5-3 mm, seríceas; pedicelos de 2,8-5 mm, híspidos; bracteolas triangulares de 1,5-2 x 1 mm, un poco distanciadas de la base del cáliz, seríceo-estrigosas. Cáliz subestrigoso; lóbulos pubérulos en el interior; el vexilar elíptico-lanceolado, de 6 x 3 mm, los otros lanceolados, de 4,5-6 x 2 mm; tubo de 2-3 mm. Corola rojo-violácea a lilacina; vexilo obovado, de 1-1,3 x 0,7-0,8 cm, con aurículas inflexas, glabro, uña de 1,2 mm; alas de 1 x 0,3-0,4 cm, glabras. Androceo diadelfo, tubo recto. Gineceo con disco cilíndrico, laminar, de margen irregular,

Galactia striata (Jacq.) Urban.

menor a 1 mm; ovario sésil, 7-9 ovulado; estigma apical globuloso. Legumbre falcado-incurvada, péndula, densamente pubescente, grisácea, 8-9(-11)-seminada, con curvatura mayor en la mitad distal, de 4-5 x 4,5-5,5 mm. Semillas ovoides oscuras, marmoladas, de 4,5 x 3,5 mm, subcompresas, con hilo elíptico, de 1 mm, con estrofíolo en el extremo distal.

Área de distribución-hábitat: Áreas disyuntas. Sur de América del Norte (el tipo fue descripto en Texas) y en el Noroeste de la Argentina: desde Salta hasta Córdoba y San Luis y en la llanura Chaqueña. Crece en serranías bajas, entre rocas.

Material seleccionado:

ARGENTINA. SAN JUAN. Dpto. Valle Fértil, 600 m de la ruta prov 510, por el costado de la costa del río Tucuma, 30° 51' S 67° 19' O, 905 m snm, 12 marzo 1998, R. Fortunato 5997 (BAB); 7 km del desvío de ruta provincial 510, en dirección a Los Bretes, 30° 45' S 67° 26' O, 900 m snm, 11 marzo 1998, R. Fortunato 5953 (BAB).

Sección *Collaearia* (Benth.) Burk.

Collaea DC. sect. *Collaearia* Benth. Fl. Bras. 15 (1): 147, 1859.

Especie tipo: *Galactia peduncularis* (Benth.) Taubert. *Annal. Mus. Vindob*. 2, 2: 128, 1838.

Plantas erectas, sufruticosas. Hojas 1-3-folioladas, subcoriáceas o membranáceas. Flores mediocres con pétalos anchos; vexilo pubescente en el exterior, al menos en el ápice. Androceo pseudomonadelfo, incurvo. Gineceo con ovario sésil a subsésil.

***Galactia boavista* (Vell.) Burk.** *Darwiniana* 16 (3-4): 783, 1971.

Cytisus boavista Vellozo. Florae Flumin. Descr.: 309, 1825.

Planta herbácea, menor de 1m de altura, postrada, ascendente o erecta, no voluble. Rizoma breve de nudos aproximados, suberecto a horizontal, hasta 5 cm long, con varias raíces divergentes, no verticales, largas y cilíndricas, a veces un poco engrosadas, fusiformes, subleñosas, de 2 mm hasta 1,4 cm diam. Tallos erguidos o postrados, no radicantes, pubescentes. Hojas 1-folioladas; estípulas lanceolado-subuladas, de 5-9 x 2-3 mm, híspidas; pecíolo y pecíolo juntos de 3-8 mm, densamente híspidos; folíolo de forma variable: elíptico, ovado, oblanceolado de base cuneada y ápice obtuso, a elíptico-lanceolado subobtuso, obtuso

o emarginado, en hojas basales menores, a veces casi orbicular, (3-) 5-15 (-18,8) x 2-11,6 cm, cartáceo, densamente seríceo en la cara abaxial, principalmente sobre las nervaduras, subseríceo en cara adaxial, concoloro, nervadura central prominente en la cara abaxial. Racimos axilares, erectos; raquis de 3,5-15 cm, con 6-17 braquiblastos globosos en el tercio o medio superior, 1-3-floros; pedúnculo de 5-20 cm, villoso, estriado. Flores de 1,5-2 cm; brácteas triangular-lanceoladas, de 2,5-3 x 1-1,2 mm, seríceas; pedicelos de 1-5 mm, estrigosos, híspidos; bracteolas elíptico-lanceoladas, de 2,2-2,5 x 1 mm, estrigosas, híspidas. Cáliz híspido, estrigoso-patente, cara interna de los lóbulos serícea; lóbulo vexilar elíptico lanceolado, de 4 x 3,5-4 mm lat, lóbulo inferior lanceolado, 5-7 x 1,5-2 mm, los carinales lanceolados de 3,5-5 x 1,5-2,3 mm; tubo de 3 mm. Corola violeta, rosado lila a lilacina; vexilo obovado a suborbicular, emarginado, de 1,5-1,7 x 1,3-1,4 cm, pubescente en el tercio superior de la cara externa, con aurículas basales inflexas, uña de 1,5-2; alas de 0,8-1,4 x 2,5-5,5 mm, glabra o con algunos pelos en el margen; quilla de 0,8-1,4 x 3-6 mm. Androceo diadelfo, tubo un poco recurvado en la base y en el medio. Gineceo con disco cilíndrico, laminar, de margen irregular, ca. 0,5 mm; ovario sésil. Legumbre recta, sésil, 4-6,5 x 0,6-0,9 cm, tomentosa, coriácea, 5-11 seminada, brevemente acuminada. Semillas ovoides, de 5 x 3,5 mm, marmoladas, hilo lateral-subapical oblongo, de 1,5-2 mm, rodeado en forma completa por el estrofíolo.

Área de distribución-hábitat: Brasil central y oriental, desde Minas Gerais a Mato Grosso y Santa Catarina; Paraguay oriental; Argentina: sur de Misiones y nordeste de Corrientes. Planta campestre, propia de campos cerrados graminosos, altos, que resiste las quemazones. Después de quemada, puede florecer desprovista de tallos y hojas, apareciendo los racimos erectos de los nudos del rizoma.

Material seleccionado:

ARGENTINA. CORRIENTES: Dpto. Santo Tomé, confluencia con RP 94, 28º 09' S 55º 37' O, 07/02/2003, R. Fortunato 8072, (BAB); 7 km al SE de Virasoro por RP 37 en direcc. a Garruchos, 28º 01' S, 55º 56' O, 1 marzo 2002, R. Fortunato 7544 (BAB); **MISIONES**: Dpto. San Ignacio, 2,6 km al O de Gendarmería en direcc. al Parque Prov. Teyú-Cuaré, 27º 20' S 55º 39' O, pastizal, 4 febrero 2003, RH Fortunato 8030 (BAB); camino al Pque. Teyucuaré, campo alto pedregoso con vista al Paraná (fl, fr) 2 marzo 2002, S. Sede & F. Fernández 4 (BAB); 700 m al SO de San Ignacio e dirección a la Playa del Sol, 27º 14' S, 55º 36' O, pastizal, 4 febrero 2003, R. Fortunato 8023 (BAB); San Ignacio, alrededores de la casa

de Horacio Quiroga, en campo pedregoso (fl) 5 diciembre 1993, A Krapovickas & C. Cristóbal 44605 (CTES; BAB); 27 enero 1986, R. Fontana 122-16 (CTES; BAB);

BRASIL. GOAIAS. S. Joao da Alianca, arredores, 11 febrero 1990, Hatschbach 53822, (Museo Botanico Municipal); Nobres, Greba coqueiral, 14º 35' S 55º 57' O, 24 mayo 1997, Souza 17197, Bird/ Prodeagro/Seplan-MT. **MINAS GERAIS.** Municipio do Uberaba Rod BR-050, próximo do Rio Tejuco, 14 enero 1996, Hatschbach 64077 (MBM).

PARAGUAY. CANINDEYÚ: Reserva Natural de Mbaracayú, administrada por la Fundación Moisés Bertoni, zona de pastizal de Lagunita, 24º 08' S 55º 25' O, 11 mayo de 2003, S. Sede 60 (FCQ; BAB).

DISCUSIÓN

Camptosema

Bentham (1838; 1859) señaló que el género *Camptosema* es muy afín a *Collaea* salvo por la presencia de cáliz tubular y ovario estipitado y destaca que *Collaea rugosa* y *Collaea scarlatina* poseen caracteres similares a *Camptosema*. El estandarte reflejo, ovario estipitado y legumbre estipitada) se encuentran presentes en *C. rubicundum*, *C. coriaceum*, *C. coccineum* y *C. ellipticum*. En las restantes especies, alguno o varios de ellos se encuentran ausentes.

Camptosema coriaceum posee gran variación en el hábito, presumiblemente relacionada a los diferentes hábitats; asimismo otro carácter variable es el número de folíolos, presentando hojas 1-3-folioladas tanto en el mismo individuo como en distintos individuos de una misma población. Este mismo fenómeno se ha observado en otras especies del género (*C. rugosum* y *C. tomentosum*) y también en especies del género *Galactia* (*G. dimorpha*, *Galactia* sp. nov.).

De las 4 especies de *Camptosema* reconocidas por Burkart (1970) para la Argentina, *C. rubicundum*, es la única que posee todos los caracteres citados como diagnósticos para el género.

Camptosema paraguariense fué descripta por Chodat y Hassler (1904) bajo el nombre de *Galactia paraguariensis* y luego transferida a *Camptosema* por Hassler (1919). Comparte algunos caracteres con *Camptosema* s.s.: vexilo reflejo, ginóforo y androceo pseudomonadelfo. Sin embargo la forma campanulada del cáliz, el tamaño de las flores, la forma de sus pétalos (no tan alargados como en *Camptosema* s. s.) y el estilo incurvo, son caracteres presentes en especies de *Galactia* secc. Odonia. La especie más afín dentro de esta sección es *Galactia longifolia*, con quien comparte además un área de distribución similar en el sur de América del Sur (Chaco paraguayo y Argentina). Sin embargo difiere de esta última por la forma de los folíolos (que en *G. longifolia* son claramente oblongos) y la pubescencia foliar: glabros en *C. paraguariense* y seríceo-argenteos en *G. longifolia.* La variedad *parviflorum* presenta folíolos y legumbres más angostos y flores más pequeñas que var. *paraguariense*. Por su parte *C. paraguariense* posee una característica particular: presencia de anteras pilosas, carácter que sólo fue observado en una de las especies analizadas del complejo: *Collaea stenophylla.*

Bentham (1859) describió a *Collaea scarlatinum;* Taubert (1894) la transfirió a *Galactia*, y posteriormente Burkart (1952) a *Camptosema*. En la actual circunscripción del género *Camptosema* esta especie pertenece a la sección *Camptosema* y aunque presenta ginóforo y

androceo pseudomonadelfo, no posee cáliz netamente tubular (carácter diagnóstico de *Camptosema* s.s.) siendo los lóbulos claramente más largos que el tubo; tampoco presenta legumbre estipitada (otro carácter diagnóstico del género) observándose casi sésil como en *Galactia* secc. Odonia. En cuanto a la corola, los pétalos poseen una forma más alargada, con vexilo más largo que el doble del ancho, coincidiendo con las características de la corola de *Camptosema* s.s.(estos caracteres no se observan en *Galactia* y *Collaea*). Otras características que también comparte con *Camptosema* s.s. son el vexilo reflejo rojo y el estilo recto, no inflexo. El disco nectarífero en la base del gineceo presenta la misma forma que el de *C. rubicundum*.

En cuanto a *Camptosema praeandinum*, el color rojo de la corola, vexilo reflejo y la presencia de ginóforo son caracteres que la relacionan a *Camptosema* s.s. Burkart (1970) la encuentra afín a *C. ellipticum*, en el porte erecto, o poco voluble, en el follaje y en los larguísimos racimos. Sin embargo, no comparte con el género el cáliz campanulado, indumento en los pétalos (vexilo y alas), gineceo brevemente estipitado (siempre menor a 2 mm), morfología del disco basal del gineceo, estilo incurvo y legumbre sésil, caracteres presentes en *Galactia* secc. Galactia y Collearia.

Algunos caracteres florales también son afines a *Galactia* secc. Collaearia y a *Collaea*, como forma del cáliz, presencia de indumento en la corola y androceo pseudomonadelfo.

Bentham (1859) describe a *Camptosema ellipticum* como *Collaea rugosa*, aclarando que tanto esta especie como *Collaea scarlatina* tienen caracteres similares a *Camptosema* (cáliz tubuloso y ovario estipitado). No obstante después del estudio del material tipo de *Rudolphia ellipticum* se observó que presenta cáliz tubular con lóbulos de aproximadamente la misma longitud que el tubo, corola de pétalos alargados, siendo el estandarte pubescente en la la cara externa, más densamente en el tercio superior y gineceo con disco basal muy distinto a *Camptosema* s.s. (cilíndrico, carnoso y de margen lobulado).

Collaea

Collaea es un género que está cercanamente relacionado a *Galactia*, en especial a la secc. Collaearia, por presentar androceo pseudomonadelfo, hojas sésiles a subsésiles y pétalos pubescentes.

C. stenophylla es la única especie de *Collaea* que presenta caracteres particulares, poco relacionados con las restantes especies: flores pequeñas(1,7-1,8 cm), forma del vexilo, alas y quilla anchas, bracteolas elípticas y mucho más cortas que el tubo calicinal, diente vexilar del cáliz triangular, ovario incurvo con estilo corto y curvado, anteras pilosas.

En cuanto a *C. cipoensis*, es una especie muy relacionada con *C. paraguariensis* y *C. speciosa*. Todas presentan flores grandes, cáliz seríceo-adpreso con lóbulos carinales ovado-lanceolados, además comparte con *C. paraguariensis* la forma folíolos y el largo de los pedicelos, pero se diferencia principalmente, por presentar bractéolas iguales o más cortas que el tubo calicinal.

C. argentina se diferencia de *C. paraguariensis* y *C. cipoensis* por presentar flores de menor tamaño (2-2,8 cm) y pedicelos nunca mayores a 1,5 cm.

C. aschersoniana presenta disco cilíndrico, laminar, de margen irregular como *C. stenophylla* y el resto de las especies de *Galactia*, diferenciándose de *C. paraguariensis*, *C. cipoensis* y *C. argentina* por la forma del vexilo y el tamaño de las flores.

Galactia

La variabilidad encontrada en el género *Galactia* es muy grande, particularmente en lo referente a áreas ecológicas, hábito, forma y consistencia de folíolos, indumento, tipo de racimos y morfología del fruto.

G. jussiaeana fue largo tiempo confundida con *G. latisiliqua*, por el concepto amplio que Bentham (1859) dio a la especie, en donde sinonimiza a *G. velutina* (= *G. latisiliqua*) con *G. jussiaeana var volubilis* (Burkart, 1971). Es una especie que no se encuentra en la región austral del continente y se diferencia de *G. latisiliqua* por presentar: hábito arbustivo, erecto; indumento seríceo-estrigoso, aplicado; racimos muy breves a subsésiles, siempre menores que la hoja adyacente e inflorescencia axilar y terminal. Burkart (1971) describe 2 variedades, *G. jussiaeana* var *jussiaeana* con las hojas elípticas y *G. jussiaeana* var *angustifolia* con hojas angostamente elípticas a oblongas. Torres (1983) basando su estudio en 6 poblaciones de Venezuela, sostiene que la forma de las hojas es un carácter muy variable a nivel poblacional y no está correlacionado con otros caracteres.

Los ejemplares estudiados de G. aff latisiliqua se distinguen claramente de G. latisiliqua por el porte y la longitud de los racimos**.** Es clara también el área de distribución (Chaco Paraguayo seco), tanto por los ejemplares de herbario como por las observaciones a campo de R. Fortunato (com. pers.)

G. benthamiana es una especie que presenta poca variabilidad. Burkart (1971) bserva en un ejemplar de Misiones (M. Crovetto 8947, BAB) la presencia de hojas con 2 a 3 folíolos, siendo los laterales menores a la mitad del tamaño que el apical.

G. sp. nov. es afín a *G. weddeliana* Benth (endémica para Mato Grosso, Brasil) y *G. benthamiana* Mich.; con esta última especie comparte el tipo de hoja 1-foliolada, el vexilo

ovado a obovado, emarginado, no reflejo a la antesis, ovario sésil a subsésil, pero se diferencia por presentar 2 tipos de hojas (1- y 3-folioladas) en la misma rama/planta, los folíolos elípticos a ovados, cartáceos a finamente coriáceos, tomentoso-pubescentes en ambas caras, racimos alargados y bractéolas más largas que el tubo calicinal.

G. boavista es la única especie aquí estudiada de la sección Collaearia. El hábito y algunos caracteres florales de las especies presentes el la sección Collaearia son muy similares a los descriptos en *Camptosema praeandinum* (ej. forma del cáliz, la presencia de indumento en la corola y el androceo pseudomonadelfo).

Burkart (1971) cita por primera vez a *G. dubia* para América del Sur, siendo conocida exclusivamente en las Antillas. Según el Index Kewensis tiene distribución cosmopolita tropical.

G. fiebrigiana se distingue de *G. jussiaeana* y *G. latisiliqua* por el hábito postrado, flores de mayor tamaño, hojas brevemente pecioladas y forma de los folíolos, también difiere de *G. dubia* por presentar hábito ascendente y voluble, folíolos más angostos, elíptico-oblongos, racimos breves, subsésiles. Burkart (1971) diferencia en *G. fiebrigiana* 4 variedades, de las cuales 3 se incluyen en el presente trabajo: las vars. *fiebrigiana* y *sericophylla,* ambas comparten el área de distribución, y se diferencian por la forma de los folíolos y el indumento; y la var. *correntina*, que crece en suelos arenosos, en el NE de Argentina (Corrientes y Entre Ríos) y no corresponde al hábitat montano de las restantes variedades. Burkart (1971) justifica la descripción como variedad de *G. fiebrigiana* porque no encuentra caracteres suficientes para separarla como especie. Cabe destacar que de las tres variedades estudiadas, es la que presenta mayor afinidad con *G. latisiliqua*, incluso más que con *G. fiebrigiana* var *fiebrigiana*.

G. lindenii es la única representante de la sección Galactia en América del Sur, las restantes especies crecen en el Caribe, siendo afines a *G. rubra*, pero esta se diferencia de *G. lindenii* por presentar los folíolos más redondos, no lanceolados, los pétalos más anchos y más cortos. Según Burkart (1971), esta especie pertenece a la sección Galactia por el tamaño de la flor relativamente grande (1,8 – 2,3 cm) y los pétalos no incurvos, angostos. (El androceo es completamente diadelfo, pero este carácter está presente en las otras secciones). El tamaño de la flor y los pétalos oblongos, no incurvos, son caracteres que comparte con *G. pendula* (especie tipo de género *Galactia*) y las restantes especies de la sección.

La especie más afín a *G. longifolia* en la Argentina es *G. striata*, pero se diferencia de esta por presentar hojas subsésiles, folíolos oblongo-lineares, de bordes casi paralelos, con indumento seríceo-estrigoso plateado, bien denso en la cara abaxial, hábito menos voluble y

hábitat diferente. También presenta afinidad en la morfología con *Camptosema paraguariense*. Sin embargo, C. paraguariense se diferencia por poseer folíolos glabros y nunca oblongos y posee un área de distribución tricéntrica: Texas (EEUU), Antillas y el Gran Chaco.

G. texana se caracteriza por el porte erecto, de baja altura, flores en racimos subsésiles y especialmente por la legumbre falcada; presenta afinidad con *G. jussiaeana* pero no comparte con esta el tipo de racimo, el tamaño de las hojas y la forma del fruto. *G. texana* en Argentina es afín a *G. glaucophylla* y se diferencia por la ausencia de rizomas, forma de folíolos, los racimos y la legumbre.

G. marginalis es una especie muy afín a *G. gracillima* y *G. pretiosa* (no incluídas en este trabajo). Dichas especies comparten varios caracteres exomorfológicos: forma de los folíolos, nervadura marginal en los folíolos, ginóforo, xilopodio y forma de las alas y presenta las bractéolas distanciadas de la base del cáliz; este último carácter lo comparte con *G. pretiosa* y *G. texana s*e destaca que de las especies de *Galactia* aquí analizadas es la única que presenta ovario cortamente estipitado.

G. martii y *G. neesii* presentan gran afinidad morfológica; las bractéolas son elíptico-lanceoladas o lanceolado-subuladas, y siempre más largas que el tubo calicinal, carácter que comparten con *Galactia* sp. nov. y algunas especies de *Collaea*, así como el racimo corimbiforme y el androceo pseudomonadelfo, siendo este último carácter, raro en la secc. Odonia.

CAPÍTULO II

ESTUDIOS CROMOSÓMICOS

INTRODUCCIÓN

La citogenética brinda valiosos aportes para la resolución de problemas taxonómicos, evolutivos o aplicados. Aunque estos aportes deben ser complementados con estudios provenientes de otras áreas de investigación, trabajar en genética de eucariontes desconociendo las características y el comportamiento de sus cromosomas, lleva a errores en la interpretación de causa y efecto de muchos fenómenos(Poggio, 1996). Las características estructurales y cuantitativas del cariotipo son importantes en investigaciones taxonómicas y evolutivas. Los números cromosómicos proveen información útil respecto al número mínimo de grupos de ligamiento y cuantas veces estos se repiten. El número cromosómico puede ser muy variable entre y dentro de distintos grupos taxonómicos. En la familia Leguminosae han sido de gran valor para revisar y mejorar las clasificaciones. Estos números son constantes en muchos géneros y aún en algunas tribus por lo tanto, cuando han sido usados en conjunto con otros datos, han provisto evidencia para el establecimiento de afinidades entre distintos taxones (Goldblatt, 1981).

El número básico es otro carácter que ha sido muy utilizado en biosistemática y Raven (1975) señaló la importancia de conocer este dato para poder inferir relaciones entre especies. Aunque el conocimiento del número básico es relevante, basarse en sólo este dato para inferir relaciones puede llevar a consideraciones erróneas. El aumento o la disminución en el número básico pueden ocurrir debido a cambios estructurales, muchas veces sin estar acompañados por cambios en la exomorfología. El número cromosómico también puede variar por poliploidía y no necesariamente estos cambios estan acompañados por variación morfológica. A nivel poliploide también pueden ocurrir reestructuraciones que originen nuevos números básicos derivados que ya no tendrán relación directa con los números básicos ancestrales. Tambien la hibridación entre especies diploides o poliploides con número básico diferentes producen la aparición de números básicos secundarios o derivados. Estas consideraciones indican que el establecimiento del número básico ancestral de un grupo requiere un conocimiento muy amplio de los procesos involucrados en su evolución.

Goldblatt (1981) postuló un número básico ancestral x = 7 para la familia Leguminosae. Los datos citológicos conocidos hasta el momento sugieren que en la evolución de las leguminosas ocurrieron eventos poliploides que llevaron al establecimiento de un número básico derivado x =14. Los números cromosómicos más bajos encontrados en distintas tribus habrían ocurrido por reducción aneuploide posterior al evento de poliploidización. En leguminosas se postula que el establecimiento de la poliploidía es probablemente muy antiguo

y puede haber ocurrido en el Cretácico posterior, cuando los principales grupos de Leguminosas comenzaron a diferenciarse, siendo tetraploide el ancestro de las tres subfamilias (Goldblatt, 1981). Las reducciones aneuploides posteriores a la poliploidía ancestral están presentes en todas las líneas evolutivas pero son más evidentes en Papilionoideae, en donde la mayoría de las tribus herbáceas o géneros poseen números básicos relativamente bajos.

La tribu Sophoreae, considerada primitiva dentro de las papilionoideas, presenta números básicos que van de 14 a 8. Las tribus podalrioideas de climas templados tienen un x= 9 ó 10 y parecen haber derivado de las Sophoreae poseyendo números cromosómicos básicos derivados. La mayoría de las líneas tropicales tienen números básicos en el rango de x = 12, 11 y 10. Las tribus de climas templados, incluyendo a Galegeae y a la mayoría de las herbáceas (Vicieae, Loteae, Trifolieae) poseen números básicos bajos con x = 8, 7 y 6. Genisteae s.s.parece ser tetraploide, con números en el rango de n = 24 a 26, y son notablemente complejas a nivel citológico.

El número básico x = 11 descripto para Phaseoleae(Lackey, 1981), constituye también el número básico probable de todas las subtribus. Algunas reducciones aneuploides a n=10 son evidentes**:** en la subtribu Glycininae (*Amphicarpa*, *Ophrestia* y *Dumasia villosa*) y en la subtribu Phaseolinae (*Macrotyloma*, *Dolichos* y algunas especies de *Vigna*). Por otro lado la subtribu Erythrininae es muy variable en cuanto a sus números cromosómicos: *Mucuna* y *Apios* tienen n = 11, mientras que *Butea* posee n = 9 y *Strongylodon* n = 14. Además el 50% de las especies estudiadas de *Erythrina* posee x = 21, sugiriendo eventos de poliploidía y posterior aneuploidía.

En la subtribu Diocleinae, todos los géneros presentan n = 11 a excepción de *Galactia* y *Collaea* que poseen n = 10 (Goldblatt, 1981).

Además del número cromosómico, número básico y nivel de ploidía, otras características citológicas importantes para estudios sistemáticos y evolutivos son la descripción de otras características del cariotipo (tamaño cromosómico, numero y posición de regiones organizadoras del nucleolo, morfología de los cromosomas expresadas a través de sus índices centroméricos, localización de zonas heterocromáticas o secuencias particulares mediante técnicas de bandas o hibridación *in situ*, simetría intra e intercromosómica).

Las variaciones en el cariotipo no siempre ocurren acompañadas con cambios notorios en el exofenotipo. Un análisis más preciso de estas variaciones cromosómicas puede obtenerse a través del empleo de técnicas de citogenética molecular, como la hibridación *in situ*, que

permite conocer la organización de secuencias repetidas en el genoma, analizar variaciones estructurales y la naturaleza de las mismas (Poggio, 1996).

Los genomas de eucariotas poseen muchas familias de secuencias de ADN repetitivos, incluyendo el ADN ribosomal. Los genes de ADNr representan familias multigénicas que se cree han surgido por duplicación génica (Široký *et al*., 2001). Los genes de ADNr 18S-5.8S-25S y espaciadores intergénicos se encuentran repetidos en tandem en las regiones organizadoras nucleolares (NORs) pudiendo estar asociados o no a la formación de nucleolos (Taketa *et al*., 2001). El mapeo físico de estas familias multigénicas, por medio de la hibridación *in situ*, ha revelado relaciones interespecíficas en muchos géneros (*Aegilops*: (Bedaeva *et al*., 1996) *Arachis*: (Raina & Mukai, 1999); *Trifolium*: (Ansari *et al*., 1999) y los cambios en la distribución de estas regiones generalmente se encuentran correlacionados con tasas de especiación y han sido utilizadas para examinar caminos evolutivos en Triticeae (Heslop-Harrison, 2000).

Otro tipo de información valiosa en el análisis citogenético, consiste en el estudio de las relaciones entre el número de zonas ADNr y su nivel de expresión. Un alto número de zonas ADNr y un bajo nivel de expresión, indicaría la presencia de un alto porcentaje de genes que no son funcionales. Este hecho es particularmente interesante en el caso de las unidades 18S-5.8S-26S, ya que existen cientos o miles de copias en una o más zonas, muchas de las cuales podrían ser no funcionales o pseudogenes, comunes en los genomas de plantas (Álvarez & Wendel, 2003).

Uno de los métodos para evidenciar la actividad génica de las zonas rDNA es la tinción con plata. Únicamente las zonas que hayan sido funcionalmente activas durante la interfase se teñirán con plata (bandas Ag-NORs) en la metafase mitótica siguiente (Neves *et al*., 1997).

Existen pocos trabajos dentro de las leguminosas en donde se analicen estas otras características (Thuan, 1975); (Bairiganjan & Patnaik, 1989); (Naranjo *et al*., 1998); (Bossi & Daviña, 2000). Una de las razones está dada por el pequeño tamaño de los cromosomas dentro de las faseoloideas, con cromosomas que poseen un rango de longitud aproximado de 1 a 4 µm (Thuan, 1975).

Además de los estudios ya mencionados, el comportamiento meiótico, observado en células madres del polen, permite a veces detectar la existencia de cambios estructurales (inversiones, translocaciones, etc) o anormalidades en el cariotipo, ya que la presencia de configuraciones meióticas no usuales, señalan la existencia de heterocigosis para determinados rearreglos cromosómicos que afectan el normal desarrollo de la meiosis. Estos

cambios pueden estar relacionados con polimorfismos o eventos especiogénicos y aislamiento reproductivo (Poggio, 1996)

La revisión bibliográfica realizada de los estudios citogenéticos en el complejo genérico *Galactia- Camptosema-Collaea*, indica que, en el género *Galactia*, se evaluaron hasta la actualidad menos del 30% de las especies (16 especies/52-55 en América); en el género *Camptosema* se han efectuado recuentos en sólo 2 especies de aproximadamente 15-20 y en *Collaea* sólo se ha realizado un único recuento (1 especie/7) (Atchinson, 1949) (Coleman, 1982; Coleman & Demenezes, 1980; Coleman & Smith, 1969; Lackey, 1981; Yeh *et al*., 1983; Kumar & Hymowitz, 1989; Fernández, 1977; Krapovickas, 1965; Turner & Fearing, 1960; Lewis *et al*., 1962; Pritchard & Gould, 1964; Turner, 1956; Turner & Irwin, 1961; entre otros).

Se han encontrado varios números cromosómicos distintos que son excepciones al número propuesto para el los géneros (Lackey, 1981): por ejemplo se ha citado 2n=28 y 22 en *G. tenuiflora*; 2n=22 en *G. texana* y n=10 en *Camptosema tomentosum* (Frahm-Leliveld, 1960; Thuan, 1975; Coleman, 1982; Bairiganjan & Patnaik, 1989). Esto indica la necesidad de una revisión citológica mas completa ya que estos números pueden deberse a variaciones intraespecíficas o más probablemente a recuentos cromosómicos basados en material mal identificado, dada la conflictiva taxonomía existente entre los taxa.

OBJETIVOS

- Caracterización cromosómica de distintas especies de los géneros *Galactia*, *Camptosema* y *Collaea*.

Se determinarán los números cromosómicos y se realizará el análisis y comparación de los cariotipos con la finalidad de aportar datos que permitan resolver la problemática delimitación genérica de algunas de las especies estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Las especies utilizadas en los análisis cromosómicos se listan a continuación:

Especie	*Localidad*	*Voucher*
Camptosema		
C. paraguariense var *parviflorum*	Argentina. Formosa.	Fortunato 6805 (BAB)
C. paraguariense var paraguariense	Paraguay. Alto Paraguay	Pérez 7582 (BAB, FCQ)
C. praeandinum	Argentina. Salta	Fortunato 6805 (BAB)
C. rubicundum	Argentina. Buenos Aires	Greppi 25 (BAB)
	Argentina. Buenos Aires	Sede 17 (BAB)
	Argentina. Entre Ríos	BAB 92102
C. scarlatinum	Argentina. Misiones	Fortunato 8003 (BAB)
Collaea		
C. cipoensis	Brasil. Minas Gerais	Fortunato 8411 (BAB)
C. stenophylla	Argentina. Misiones	Sede 1 (BAB)
Galactia		
G. benthamiana	Argentina. Corrientes	Fortunato 8065 (BAB)
G. boavista	Argentina. Misiones	Sede 4 (BAB)
G. sp. nov.	Argentina. Corrientes	Fortunato 7539 (BAB)
G. dubia	Argentina. Salta	Fortunato 7170 (BAB)
	Argentina. Salta	Fortunato 7175 (BAB)
G. fiebrigiana vas fiebrigiana	Argentina. Tucumán	Sede 10 (BAB)
G. fiebrigiana var sericophylla	Argentina. Salta	Fortunato 7190 (BAB)
G. latisiliqua	Argentina. Formosa.	Fortunato 6785 (BAB)
	Argentina. Formosa.	Fortunato 6825 (BAB)
	Argentina. Formosa.	Fortunato 6840 (BAB)
	Argentina. Entre Ríos	Sede SC1 (BAB)
	Paraguay. Alto Paraguay	Mereles 8935 (BAB; FCQ)
G. lindenii	Colombia. Cundinamarca	Ruiz 2 (HCN)
G. longifolia	Argentina. Formosa	Fortunato 6237 (BAB)
G. marginalis	Argentina. Salta	Fortunato 7185 (BAB)
G. striata	Argentina. Entre Ríos	Sede SC2 (BAB)
	Argentina. Misiones	Sede 9 (BAB)
G. texana	Argentina. Salta	Fortunato 7577 (BAB)

Estudios mitóticos

Las semillas se hicieron germinar en cámaras húmedas (Cajas de Petri con algodón en la base y papel de filtro humedecido). Se incubaron en oscuridad a 25 ºC durante 1 a varios días dependiendo de la especie. Las raíces de aproximadamente 0,5-1 cm se cortaron y se pretrataron en una solución de 8-hidroxiquinoleína (0.002M) durante 3 hr a 20 ºC. Luego se fijaron en una solución de alcohol etílico absoluto-ácido acético glacial (relación 3:1) y se guardaron a–20 C hasta el momento de su procesamiento.

Las raíces ya fijadas se lavaron en agua destilada (3 lavados de 10 minutos). Se colocaron en HCl 5N a 25 ºC durante 30 minutos. Se lavaron nuevamente en agua destilada y se

colorearon con el reactivo de Feulgen (ver apéndice) durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Los preparados se realizaron mediante la técnica de aplastado en hematoxilina acética al 2% y citrato férrico 1 % (Núñez, 1968). Los preparados se fotografiaron utilizando el fotomicroscopio Leica con película Kodak Ilford Pan de 50 asas.

Los negativos se digitalizaron en imágenes en blanco y negro por medio de un scanner Umax con una definición de 4800 ppp. Las imágenes se analizaron con el programa KS 400 (Zeiss) y se determinaron los siguientes parámetros:

- Número cromosómico (**2n**)
- Area total cromosómica (**ATC**)
- Longitud total cromosómica (**LTC**)
- Indice centromérico (**IC**) = longitud del brazo corto x 100 / longitud cromosómica total

La nomenclatura utilizada para la descripción de la morfología de los cromosomas y la construcción de la fórmula cariotípica es la propuesta por (Levan *et al.*, 1964) según la cual, los cromosomas se asignan a cuatro categorías morfológicas según el índice centromérico.

Categoría	**IC**
metacéntrico (m)	50,0 - 37,5
submetacéntrico (sm)	37,5 - 25,0
telocéntricos (t)	25,0 - 12,5
subtelocéntricos (st)	12,5 – 0

Para estimar la asimetría del cariotipo se evaluaron dos parámetros numéricos de acuerdo a (Romero Zarco, 1986)

el índice de asimetría intracromosómica (**A_1**) $$A_1 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{bi}{Bi}}{n}$$

y el índice de asimetría intercromosómica (**A_2**) $$A_2 = \frac{s}{x}$$

Ambos índices son independientes del número y tamaño cromosómico.

A_1 varía entre 0 y 1 y los valores menores se obtienen cuando los cromosomas tienden a ser metacéntricos. (*n*) es el número de pares de cromosomas homólogos o grupos, b_i es la

longitud promedio de los brazos cortos de cada par de cromosomas homólogos o grupo, B_i es la longitud promedio de los brazos largos de cada par de cromosomas homólogos o grupo.

A_2 estima la asimetría del cariotipo debido a las relaciones entre el tamaño de los diferentes cromosomas: es el coeficiente de dispersión de Pearson que es la razón entre el desvío estándar (s) y la media de la longitud cromosómica (x) para cada muestra.

Para evaluar si existen diferencias entre ATC, LTC e índices de asimetría entre las distintas especies se realizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) seguido de comparaciones por medio del test de Scheffe (Sokal and Rohlf, 1981)

Estudios meióticos

El comportamiento meiótico de los cromosomas se estudió en las células madre de los granos de polen. Para el análisis se fijaron en el lugar de colección, inflorescencias jóvenes en una mezcla de alcohol absoluto: cloroformo: ácido acético glacial en proporción 6:3:1 durante el viaje de colección. Luego en el laboratorio las muestras se conservaron en una mezcla de alcohol absoluto: ácido acético en proporción 3:1 a –20 C hasta el momento de su procesamiento.

Los preparados se realizaron por medio del método de aplastado en hematoxilina acética al 2% y citrato férrico al 1% como mordiente (Núñez, 1968). Los preparados se fotografiaron y los negativos se digitalizaron de igual forma a la descripta para estudios mitóticos. Se analizó el desarrollo meiótico y las configuraciones meióticas.

Técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La técnica se realizó según Cuadrado &Jouve (1995) con algunas modificaciones:

Obtención de preparaciones de cromosomas

Las semillas se hicieron germinar y los ápices de raíces de pretrataron y fijaron de la misma forma que para los estudios mitóticos.

Los ápices radiculares se sumergieron durante 5 minutos en buffer ácido cítrico-citrato de sodio (Apéndice 2.1). Luego se renovó la solución y se incubaron durante otros 20 minutos.

Posteriormente se trataron con una solución enzimática de celulasa y pectinasa durante 1 hora o más a 37 ºC (Apéndice 2.1). Se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno en buffer ácido cítrico-citrato de sodio (Apéndice 2.1). Los preparados se realizaron por medio de la técnica de aplastado en una gota de ácido acético al 45%. Se observaron al microscopio óptico con contraste de fase. Los preparados fueron tratados con calor hasta obtener metafases mitóticas en donde los cromosomas se encuentren libres de citoplasma. Finalmente se congelan con hielo seco, se despega el cubreobjetos y se sumergen al alcohol 100 para su deshidratación. Se dejan secar y se guardan a –20 C hasta el momento de la hibridación.

Obtención y marcado de sonda

En este trabajo se estudió el número de regiones organizadoras nucleolares (NOR), usando la sonda pTa71, que es una fragmento EcoR1 de 9 Kb que contiene los genes ribosomales nucleares 18S-5.8S-25S y espaciadores intergénicos. Fue aislada de *Triticum aestivum* y clonada en el plásmido bacteriano pUC18 (Gerlach and Bedbrook, 1979). Para la amplificación de la sonda se hicieron crecer bacterias portadoras del inserto, que estaban conservadas en stabs a –80 ºC (ver apéndice), en medio LB líquido con ampicilina (ver apéndice) a 37 ºC durante 16 hs.

Se aisló el plásmido con el inserto mediante la utilización del Genie PrepTM Kit- (The RNA CompanyTM. Ambion Inc., Texas, EUA), según las instrucciones del fabricante y se cuantificó la cantidad obtenida, según se describe en "Cuantificación y control de la calidad del ADN" en el capítulo III.

La sonda se marcó con biotina, por medio del Biotin Nick Translation Kit (Boheringer Mannheim, Germany), según instrucciones del fabricante. La biotina es vitamina H y se incorpora al ADN en forma de biotin-11dUTP, biotin-14dATP ó biotin-11dCTP. Esta marca es no radiactiva y se detecta por medio de métodos inmunohistoquímicos, en particular, con anticuerpos específicos anti-biotina (avidina o estreptavidina) conjugados con un fluorescente, que puede ser rodamina (rhodamine-4-dUTP) o fluoresceína (fluorescein-11-dUTP) .

Reacción de hibridación entre la sonda y el ADN blanco

Pretratamiento

1) Tratamiento con RNAsa A

Con el objeto de evitar la hibridación de la sonda con ARN, los preparados se pretrataron con una dilución 1:100 de RNAsa (sc stock:10mg/ml) en 2x SSC (citrato sodico-ClNa). A

cada portaobjeto se le añadió 200 µl de la solución, se cubrió con un cubreobjetos de plástico y se incubó a 37 C durante una hora en cámara húmeda (caja de Petri de 9 cm de diam, con papel de filtro embebido en 2x SSC). Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno en 2x SSC a temperatura ambiente y con agitación.

2) Tratamiento con paraformaldehído

Los preparados se incubaron en una solución de p-formaldehído al 4% (p/v) durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno en 2x SSC.

3) Deshidratación

Los preparados se deshidrataron mediante una serie alcohólica: 70, 90 y 100 %, durante 3 minutos en cada uno en agitación y se dejaron secar al aire durante por lo menos 2 horas.

Hibridación

La mezcla de hibridación se preparó inmediatamente antes de su uso. En un microtubo se añadieron todos los componentes de la mezcla, excepto la sonda: 15 µl de formamida, 6 µl de sulfato de dextrano, 3 µl de buffer 20x SSC, 1 µl de SDS 10%, 1 µl de ADN de salmón. Se mezcló con vórtex y se centrífugo brevemente. Se agregaron no más de 3 µl de sonda marcada (entre 25 y 100 ng por preparación) y se llevó a volumen (30 µl) con agua bidestilada. Se mezcló nuevamente y se centrífugo brevemente.

La mezcla se desnaturalizó a 70ºC durante 15 min y se colocó en hielo durante 5 minutos. Como paso final, se añadieron 30 µl de la mezcla de hibridación a cada preparación y se colocó cuidadosamente un cubreobjetos plástico.

Los preparados se colocaron en la placa del termociclador Eppendorf Mastercycler con el siguiente perfil de desnaturalización e hibridación:

75°C	7 min
55°C	30 seg
45°C	1 min
42°C	2 min
40°C	5 min
38°C	5 min

Posteriormente se colocaron los preparados en cámara húmeda y se incubaron en estufa a 37ºC durante 12-16 hs.

Remoción del exceso de sonda

Se realizaron sucesivos lavados con agitación para remover el exceso de sonda que no hibridó en las soluciones:

- 2x SSC a 42ºC (5min)
- formamida deionizada al 20% (v/v) en 0.1x SSC a 42ºC (10min)
- 0.1x SSC a 42ºC (5min)
- 4x SSC/Tween (0.2%) a 42ºC (5min)
- 4x SSC/Tween (0.2%) a 20ºC (5min)

En cada preparación se colocaron 100 µl de buffer de detección: BSA (albúmina bovina) al 5% (p/v) en 4x SSC/Tween y se incubaron a 25ºC durante 5 minutos con cubreobjetos plástico. Posteriormente, se quitaron los cubres y se drenó la solución.

La detección se realizó agregando a cada preparado 50 µl de una solución 0,32% (v/v) de Streptavidina Cy3 (rojo) en BSA 5%. Los preparados se incubaron a 37ºC en cámara húmeda en oscuridad durante 1 hora y luego se lavaron 3 veces durante 10 min en una solución de 4x SSC/Twen 0.2% a 25ºC en oscuridad. Finalmente se agregó a cada preparado 100 µl de 4´,6´-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1ug/ml en buffer citrato McIlvaine pH7), se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron rápidamente en 4x SSC y se les agregó medio de montaje VectaShield antifade (Vector).

Las observaciones se realizaron al día siguiente en un fotomicroscopio de epifluorescencia Leica, con filtros para DAPI (exitación a 365 nm y emisión a 420-480 nm: azul) y Cy3 (excitación a 510-560 y emisión a 590: rojo). Los preparados se fotografiaron con películas Kodak color de 400 asas con una doble exposición (con dos filtros) para visualizar en una misma fotografía la región híbrida con la sonda marcada (en rojo) y los cromosomas contrateñidos (en azul).

Tinción con plata de las regiones organizadoras nucleares (NORs)

La tinción con plata para la detección de NORs se realizó de acuerdo a la técnica descripta por (Neves et al., 1997)con modificaciones.

La obtención de ápices radiculares y su pretratamiento se realizó de igual forma que para los estudios mitóticos. Las raíces se fijaron en FAA (v/v) formaldehído 37%: etanol 50%: ácido acético glacial en proporción 1:18:1, durante 3 días a 4 ºC. Luego se lavaron en agua destilada y se incubaron en una solución de nitrato de plata al 15% durante toda la noche a 60

ºC. Posteriormente se revelaron en una solución de hidroquinona 1%: 10 % formaldehído en proporción 1:1 y se fijaron con fijador fotográfico. Los preparados se realizaron por medio de la técnica del aplastado en ácido acético 45%. Se determinó el número de NORs en células metafásicas y el número de nucleolos en células interfásicas.

RESULTADOS

Análisis del cariotipo

Se determinaron por primera vez los números cromosómicos de *Galactia fiebrigiana* (2n=20), *Galactia latisiliqua* (2n=20), *Galactia lindenii* (2n=20), *Camptosema rubicundum* (2n=22), *Camptosema praeandinum* (2n=20), *Camptosema paraguariense* (n=10), *Camptosema scarlatinum* (n=10) y *Collaea cipoensis* (2n=20). Se confirmaron reportes previos para las siguientes especies: *Galactia benthamiana*, *G. boavista*, *G. dubia, G. longifolia*, *G. striata*, *G. texana* y *Collaea stenophylla*; todas poseen 2n=20.

Los resultados nuevos, las confirmaciones de reportes previos y los obtenidos por otros autores se muestran en la **tabla 1** y **figuras 1A**, **1B** y **1C**.

Se estudió el cariotipo de distintas especies de *Galactia*, *Camptosema* y *Collaea stenophylla*. Se construyó la fórmula cariotípica y se evaluó el tamaño cromosómico que se expresó mediante el área y la longitud. Por otro lado se estimó la asimetría cariotípica utilizando los índices A_1 y A_2. Los resultados se resumen en las **tablas 2**, **3, 4** y **figuras 1a**, **1b** y **figura 2**.

En las especies de *Galactia* estudiadas, los cariotipos son muy uniformes en cuanto a su tamaño. También son similares sus fórmulas cariotípicas y están caracterizadas por 16 cromosomas metacéntricos (m) y 4 con valores límites entre cromosomas metacéntricos y submetacéntricos (m-sm). El rango de longitud cromosómica oscila entre 1,13 µm para el cromosoma más pequeño que pertenece a *Galactia latisiliqua* y 3,37 µm para el cromosoma más grande que corresponde a *Galactia dubia*. Tanto los valores medios de área total cromosómica (ATC) como los de la longitud cromosomica total (LTC) son similares entre las distintas especies. Los índices de asimetría (A1 y A2) muestran cariotipos simétricos con valores cercanos a 0,30 y 0,25 respectivamente. No se observaron diferencias entre las especies para ninguno de los parámetros evaluados (**Tabla 4**).

Figura 1. A-D Metafases Mitóticas. **A.** *Camptosema praeandinum*. **B.** *Galactia dubia*. **C.** *G. boavista*. **D.** *G. longifolia.* **E-F** Meiosis. **E.** *C. scarlatinum*. **F.** *C. paraguariense.* Escala = 5 µm.

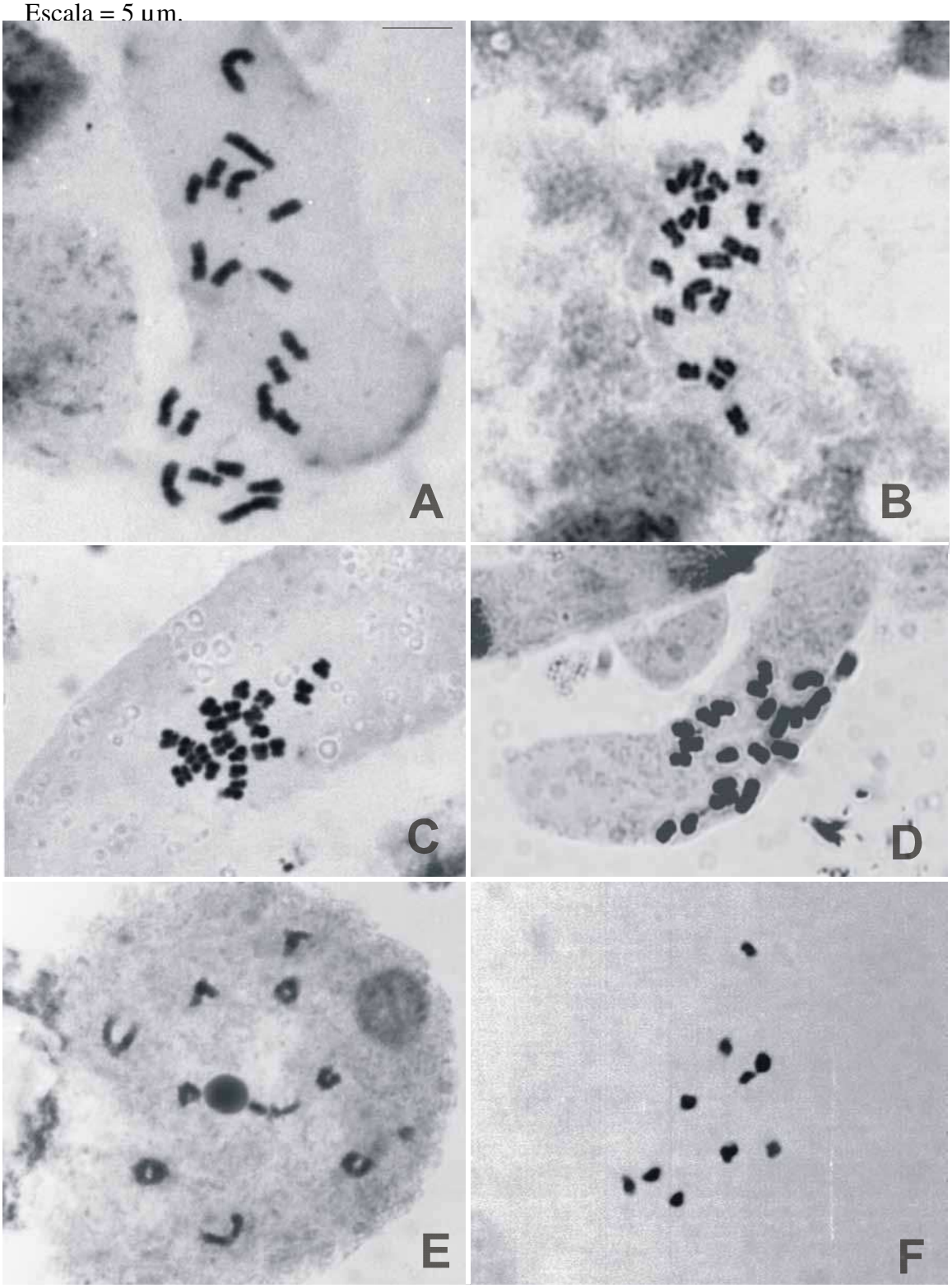
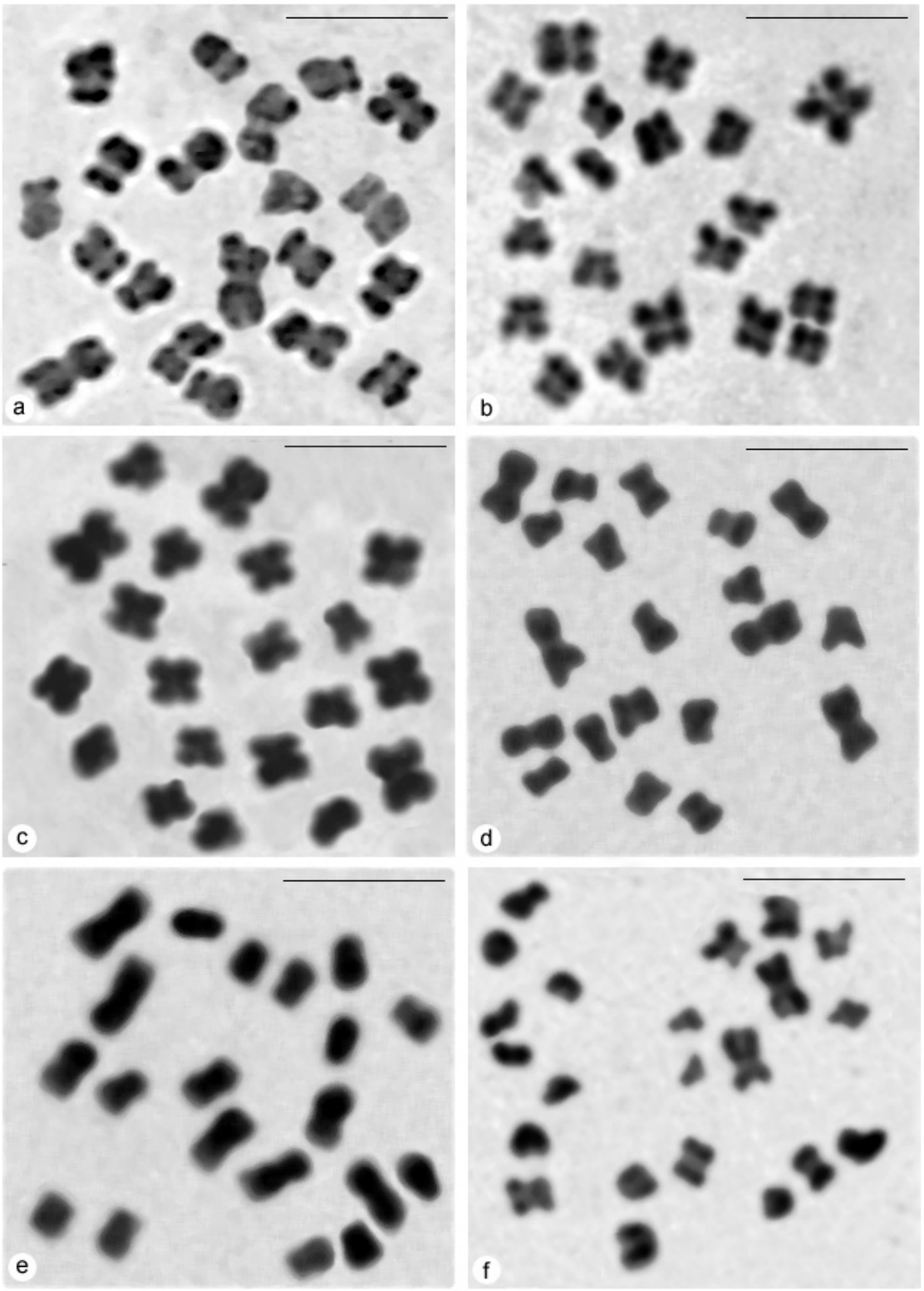


Figura 2. a-f. Metafases Mitóticas. **a.** *Collaea stenophylla*. **b.** *Galactia latisiliqua.* **c.** *G. texana*. **d.** *G. fiebrigiana.* **e.** *G. striata*. **f.** *C. rubicundum.* Escala = 5 µm.



El tamaño cromosómico y el cariotipo de *Collaea stenophylla* son muy similares a los de las especies de *Galactia* analizadas y en comparación con las especies de este género, tampoco se encontraron diferencias para ninguno de los parámetros cromosómicos analizados (**Tabla 3**).

Por otro lado, *Camptosema rubicundum* difiere de todas las especies de *Galactia* y *Collaea* estudiadas en número cromosómico y la fórmula cariotípica (2n=22; 12m + 2m-sm + 4 sm + 4st-t). Sin embargo, las restantes especies de *Camptosema* analizadas: *C. paraguariense*, *C. praeandinum* y *C. scarlatinum*, comparten el número cromosómico con las especies de *Galactia* y *Collaea*, y en el caso de *C. praeandinum*, también presenta similitud en su fórmula cariotípica. En relación a las especies de *Galactia*, el cariotipo de *C. praeandinum* muestra una mayor proporción de cromosomas submetacéntricos. El cariotipo de *C. praeandinum* se diferencia claramente del de *C. rubicundum* (**Tabla 2, Figura 1a**). Además, *C. praeandinum* muestra los mayores valores de ATC y LTC en relación a todas las especies analizadas en este trabajo. En lo que respecta al ATC C. *praeandinum* posee diferencias con *C. rubicundum* ($p<0,001$), y con algunas especies de *Galactia*, las que poseen los valores más bajos, y en comparación con también se observan diferencias ($p<0,001$) (**Tabla 3**). En cuanto a la LTC, C. *praeandinum* difiere de la mayoría de las especies de *Galactia* ($p<0,001$), ya que es la que posee los cromosomas más largos (2,12 –4,50 µm). Asimismo, difiere de *C. rubicundum* en cuanto a la LTC y rango de longitud ($p<0,001$) (**Tabla 3**). En relación a los índices de asimetría, *C. praeandinum* y *C. rubicundum* presentan los mayores valores de A1, indicando mayor asimetría intracromosómica, y ambas especies muestran diferencias con *G. latisiliqua* ($p<0,001$), la que muestra el valor más pequeño y por lo tanto un cariotipo más simétrico (**Tabla 4**).

Análisis meiótico

Se estudió la meiosis en células madres de polen de: *Galactia striata*, *Camptosema praeandinum*, *Camptosema paraguariense* y *Camptosema scarlatinum*. En todas las especies se observaron 10 bivalentes. Mediante este estudio pudo confirmarse el número cromosómico de *G. striata* y *C. praeandinum* y se determinó por primera vez el número de *C. paraguariense* y de *C. scarlatinum.*

Tabla 1. Números cromosómicos de las especies de *Galactia*, *Collaea* y *Camptosema*. En negrita: nuevos recuentos y confirmaciones de reportes previos.

Especies			Referencia
Galactia (23/52)			
G. acapulcensis Rose			(Kumar and Hymowitz, 1989)
G. benthamiana Micheli			(Bossi and Daviña, 2000)
G. boavista (Vell.) Burkart			Bossi & Daviña (2000)
G. canescens Benth.			(Turner, 1956)
G. decumbens (Benth.) Hoehne			(Coleman and Demenezes, 1980)
G. dubia DC.			(Seijo and Vanni, 1999)
G. eriosematoides Harms.			Coleman & Demenezes (1980)
G. fiebrigiana Burkart			Sede et al (2003)
G. glaucophylla Harms			(Krapovickas, 1965)
G. grayi Vail			Turner (1956)
G. jussiaenna Kunth			(Kumar and Hymowitz, 1989)
G. lindenii Burkart			
G. latisiliqua Desv.			Sede et al (2003)
G. longifolia (Jacq.) Benth.			Kumar & Hymowitz (1989)
G. macreei Curtis			(Lewis et al., 1962)
G. marginalis Benth.			Bossi & Daviña (2000)
G. martii DC.			(Turner and Irwin, 1961)
G. muelleri Benth.			(Thuan, 1975)
G. striata (Jacq.) Urban			(Coleman, 1982)
			(Yeh et al., 1983)
			Bossi & Daviña (2000)
			Sede et al (2003)

Tabla 2. Fórmula cariotípica. **m**: metacéntricos. **sm**: sumetacéntricos. **t**: telocéntricos. **st**: subtelocéntricos.

Especies	**Fórmula cariotípica**
Galactia dubia	16m + 2m-sm + 2sm
Galactia striata	16m +4m-sm
Galactia texana	16m + 4m-sm
Galactia latisiliqua	16m + 4m-sm
Galactia longifolia	16m + 4sm
Galactia boavista	16m + 4sm
Galactia fiebrigiana	16m + 4sm
Collaea stenophylla	14m + 2m-sm + 4sm
Camptosema rubicundum	12m + 2m-sm + 4sm + 4st-t
Camptosema praeandinum	12m + 2m-sm + 6sm

Tabla 3. Tamaño cromosómico: ATC: area total cromosómica (μm^2), LTC: longitud total cromosómica (µm), rango de longitud : longitud del cromosoma más pequeño / longitud del cromosoma más grande (µm). Las letras distintas indican diferencias significativas (comparaciones realizadas por medio del test de Scheffe, P<0,05).

Especies	Tamaño cromosómico			
	ATC	LTC	**Rango de longitud L (pequeño) - L (grande)**	
Galactia striata	39,03 ± 4,98ab	38,07 ± 4,42a	1,54 ± 0,13ab	2,79 ± 0,25a
Galactia dubia	43,97 ± 16,13ab	42,21 ± 7,71a	1,58 ± 0,27ab	3,37 ± 0,65ab
Galactia texana	38,73 ± 5,84ab	34,07 ± 7,36a	1,34 ± 0,27a	2,45 ± 0,65a
Galactia latisiliqua	29,36 ± 6,82b	30,25 ± 8,32a	1,13 ± 0,19a	2,22 ± 0,77a
Galactia longifolia	36,75 ± 5,57ab	39,39 ± 1,86ab	1,47 ± 0,03ab	2,89 ± 0,47ab
Galactia boavista	45,85 ± 10,24ab	36,77 ± 5,55ab	1,36 ± 0,20ab	2,62 ± 0,60ab

Galactia fiebrigiana	35,63 ± 8,22b	38,99 ± 4,92a	1,43 ± 0,13a	3,00 ± 0,44a
Collaea stenophylla	42,44 ± 4,03ab	40,91 ± 6,29ab	1,50 ± 0,06ab	3,04 ± 0,79ab
Camptosema rubicundum	29,94 ± 3,71b	33,43 ± 4,18a	1,07 ± 0,11a	2,33 ± 0,41a
Camptosema praeandinum	60,40 ± 16,63a	56,92 ± 11,87b	2,12 ± 0,56b	4,50 ± 0,98b

Tabla 4. Índices de asimetría (A1 and A2). Las letras distintas indican diferencias significativas (comparaciones realizadas por medio del test de Scheffe, P<0,05).

Especies	**Índices de Asimetría**	
	A_1	**A_2**
Galactia striata	0,27 ± 0,03abc	0,20 ± 0,01
Galactia dubia	0,26 ± 0,04ac	0,24 ± 0,04
Galactia texana	0,26 ± 0,04abc	0,19 ± 0,04
Galactia latisiliqua	0,23 ± 0,09a	0,17 ± 0,06
Galactia longifolia	0,25 ± 0,01abc	0,22 ± 0,03
Galactia boavista	0,26 ± 0,01abc	0,18 ± 0,03
Galactia fiebrigiana	0,27 ± 0,04abc	0,23 ± 0,04
Collaea stenophylla	0,29 ± 0,02abc	0,20 ± 0,05
Camptosema rubicundum	0,37 ± 0,06b	0,20 ± 0,03
Camptosema praeandinum	0,35 ± 0,02bc	0,27 ± 0,03

Determinación del número de zonas de ADN ribosomal (ADNr)

El número de regiones de ADN repetitivo detectadas resultó ser muy variable. En el género *Galactia* se encontró variación interespecífica: se detectaron 4 señales de hibridación en *Galactia dubia*, 6 en *G. latisiliqua* y *G. striata* y 8 en *G. fiebrigian.* En *Camptosema* se detectaron 10 señales en *C. praeandinum* y 6 en *C. rubicundum*. La única especie de *Collaea* analizada *C. stenophylla* presentó 8 señales (**Tabla 5, Figura 2**).

Debido al pequeño tamaño y morfología similar de los cromosomas, no fue posible confeccionar un mapa físico de estos sitios. Sin embargo pudo observarse que las señales

están siempre presentes en las zonas terminales de los cromosomas y en ninguna de las especies analizadas de *Galactia* se encontraron en los pares de cromosomas más grandes (**Figura 3**).

Análisis de las actividad de las zonas ADNr

Con el objetivo de analizar si las zonas de ADNr detectadas por FISH eran activas, se determinó el número de NORs (regiones organizadoras nucleolares) por medio de la tinción con nitrato de plata en células metafásicas de: *C. rubicundum*, *Collaea stenophylla*, *C. praeandinum* y *G. fiebrigiana.*

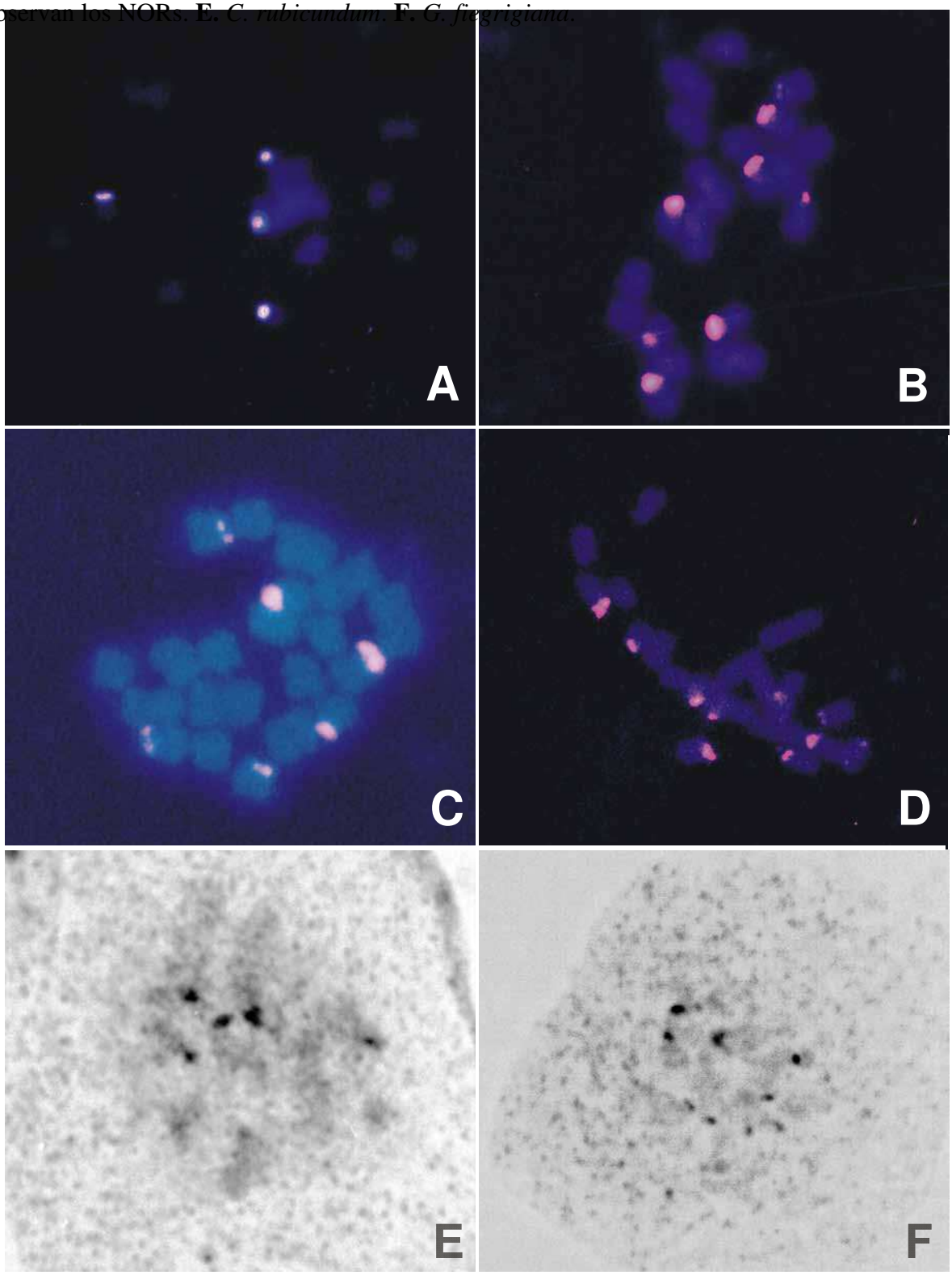
C. rubicundum y C*ollaea stenophylla* mostraron 4-6 regiones, mientras que en *C. praeandinum* y *G. fiebrigiana* se encontraron de 6 -8 regiones. Las bandas Ag-NOR obtenidas en estas especies mostró que la mayoría de las zonas ADNr detectadas por hibridación *in situ* eran activas.

Al comparar el número de Ag-NORs en metafases con el número de nucleolos en interfases, el último fue siempre más pequeño que el primero, probablemente debido a la fusión entre ellos (Tabla 5). El número máximo de nucleolos por núcleo interfásico fue en todos los casos menor que el número de Ag-NORs en células metafásicas. La frecuencia de células en interfase que contenían el número máximo de nucleolos fue siempre menor al 1,5% y el porcentaje de células en interfase con un único nucleolo fue en todos los casos superior al 82% **(Tabla 5**).

Tabla 5. Número de sitios ADNr revelados por hibridación *in situ* fluorescente usando la sonda pTa71, número de sitios Ag-NOR detectados por medio de tinción con plata y máximo número de nucleolos en la interfase en especies de *Galactia*, *Camptosema* y *Collaea*. (-: no determinado).

Especies	Número de sitios ADNr	Número de sitios Ag-NOR	Máximo número de nucleolos en interfase
Camptosema rubicundum	6	4/6	4
Camptosema praeandinum	10	6/8	5
Collaea stenophylla	8	4/6	4
Galactia fiebrigiana	8	6/8	5
Galactia latisiliqua	6	-	-
Galactia striata	6	-	-
Galactia dubia	4	-	-

Figure 3. A-D Metafases mitóticas luego de la hibridación *in situ* con la sonda pTa71 (los sitios ADNr se observan en rojo). **A.** G*alactia dubia.* **B.** *G. fiebrigiana*. **C.** *G. latisiliqua.* **D.** *Camptosema praeandinum*. **E-D** Metafases mitóticas luego de la tinción con plata en donde se observan los NORs. **E.** *C. rubicundum*. **F.** *G. fiegrigiana.*



DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudiaron por primera vez los números cromosómicos de *Galactia fiebrigiana* (2n=20), *Galactia lindenii* (2n=20), *Galactia latisiliqua* (2n=20), *Collaea cipoensis* (2n=20), *Camptosema rubicundum* (2n=22), *Camptosema praeandinum* (2n=20), *Camptosema scarlatinum* (n=10) y *Camptosema paraguariense* (n=10). Además, se confirmaron siete recuentos realizados por otros autores: *Galactia benthamiana, Galactia boavista, Galactia dubia, Galactia longifolia, Galactia striata, Galactia texana* y *Collaea stenophylla*, todas con 2n=20.

De acuerdo a Goldblatt (1981), *Galactia* y *Collaea* poseen un número básico de x=10, mientras que *Camptosema*, como muchos otros géneros de la subtribu Diocleinae, presentan un número básico de x=11. Todos los recuentos efectuados, en las especies de *Galactia* y *Collaea* estudiadas, confirman estos datos, mientras que en las especies de *Camptosema* analizadas se han encontrado controversias con los datos de la literatura.

Los números cromosómicos de *Camptosema praeandinum* (2n=20), *C. paraguariense* (n=10) y C. *scarlatinum* (n=10) no coinciden ni con el número cromosómico n=11, propuesto para el género (Goldblatt, 1981) ni con el número de la especie tipo *C. rubicundum* (2n=22) (Sede *et al.*, 2003).

En cuanto al resto de las características cromosómicas analizadas, *Galactia* y *Collaea* no mostraron características distintivas, ya que las fórmulas cariotípicas de las especies de ambos géneros son similares (16m + 4 m-sm). Ambos géneros se diferencian claramente de *Camptosema* en que las especies de *Galactia* y *Collaea* no presentan cromosomas subtelocéntricos a telocéntricos, característicos del cariotipo de la especie tipo *C.* r*ubicundum*. *Camptosema praeandinum* presenta diferencias importantes en su cariotipo con la especie tipo *C. rubicundum. Camptosema praeandinum*, al igual que las especies de *Galactia* y *Collaea* mencionadas anteriormente tampoco presentan cromosomas subtelocéntricos a telocéntricos en su formula cariotípica. Como ya se discutió en el capítulo anterior, *C. praeandinum* es una de las especies conflictivas actualmente circunscripta a *Camptosema*: no comparte con el género todos los caracteres exomorfológicos diagnósticos, y presenta gran afinidad con *Galactia* y *Collaea*. Tampoco comparte su distribución geográfica con la mayoría de las especies de *Camptosema.* Como se discutirá en los capítulos posteriores, el analisis filogenético utilizando caracteres morfológicos y moleculares, indica que no se encuentra cercanamente relacionada a las restantes especies analizadas del género *Camptosema*.

Como fue mencionado en la introducción, la técnica de hibridación *in situ* utilizando como sondas secuencias repetitivas de ADN es un método muy útil para examinar la evolución de los cromosomas en las plantas y permite a la vez obtener un panorama complementario al obtenido en el análisis cromosómico clásico (Lavaina, 1998). Tanto el número como la localización de estas regiones son marcadores útiles para la identificación de los cromosomas (Doucrick *et al*., 1995). El número y posición de la región que contiene las secuencias de ADNr (cromosomas SAT) mostró ser de utilidad en estudios evolutivos y taxonómicos en algunos taxa. Sin embargo en otros grupos se encontró que el número, la distribución y el tamaño de estos sitios presenta gran variación. Existen algunos trabajos en donde se describe una marcada variación en el número y la localización de zonas ADNr entre especies del mismo género (Schubert & Wobus,1985 en *Allium;* Guerra, Kenton & Bennett, 1996 en *Vigna* y *Phaseolus*; Adams *et al*., 2000 en *Aloe* y Siroký *et al*., 2001 en *Silene*). Esta variación puede ser explicada por varios mecanismos entre los cuales puede citarse la amplificación y fijación diferencial de secuencias en distintos sitios cromosómicos (Schubert & Wobus, 1985) (Adams *et al.*, 2000) así como la presencia de rearreglos cromosómicos. En maíz, translocaciones involucrando el cromosoma 6 (portador del NOR) y el cromosoma 9, resultaron en dos cromosomas portadores de las secuencias ADNr, siendo ambas funcionales. Esto indica que las translocaciones son un modo de aumentar el número de regiones NOR en un complemento haploide. En *Oxalis dispar* se ha propuesto que existe rotura y redistribución del organizador nucleolar. Este y muchos otros ejemplos indican que si bien el número y posición del NOR es un dato importante a tener en cuenta en la descripción de los cariotipos, la variación que se puede encontrar hace que no sea un carácter relevante para hacer inferencia s taxonómicas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan la hipótesis generalizada de labilidad evolutiva de los loci ADNr ya que se encontró, mediante técnicas de hibridación *in situ*, gran variación interespecífica en el número de zonas ADNr en G*alactia* y en las dos especies de C*amptosema* analizadas.

Cuando se encuentra variación en el numero de zonas ADNr se plantea la cuestión de si todas son funcionales o si las mismas son inactivas, ya sea por que están metiladas o por estar constituídas por pseudogenes. Si se tratara de secuencias no funcionales es necesario investigar las razones ya que como se discutirá en el capítulo 3, la incorporación de pseudogenes en el análisis filogenético puede llevar a hipótesis erróneas. Para evaluar la actividad de estas zonas se realizó tinción con plata. Esta técnica reveló, en cuatro de las especies analizadas por hibridación *in situ*, que la mayoría de las zonas ADNr eran activas.

Los datos citológicos analizados indican que los caracteres fundamentales y de mayor relevancia para la resolución de la taxonomía conflictiva del grupo, resultaron ser el número cromosómico y la fórmula cariotípica. Aunque no fue posible analizar el cariotipo en las restantes dos especies conflictivas de *Camptosema*: *C. scarlatinum* y *C. paraguariense* el número cromosómico encontrado en estas especies (n=10) no es el esperado para el género. Estas dos especies, al igual que *C. praeandinum* no presentan todos los caracteres exomorfológicos diagnósticos del género *Camptosema*. Como se verá en los capítulos posteriores, los análisis filogenéticos muestran que las tres especies conflictivas de *Camptosema* aquí analizadas, *C. scarlatinum*, *C. praeandinum* y *C. paraguariense*, no se encuentran cercanamente relacionadas a *C. rubicundum*.

CAPÍTULO III

FILOGENIA

INTRODUCCIÓN

Estudios filogenéticos en leguminosas

Los análisis filogenéticos en la familia Leguminosae comenzaron con el uso de secuencias de cloroplasto, en particular el gen *rbc*L (Doyle, 1995; Kaas & Wink, 1996; Doyle *et al*., 1997). En estos estudios, Leguminosae resulta ser grupo hermano de Polygalaceae, Surianaceae y el género de las rosáceas *Quillaja* Molina (Doyle *et al*., 2000) y los resultados de Doyle *et al*. (2000) y de Kajita *et al*. (2001) corroboran la hipótesis de monofilia de la familia. Estos resultados son consistentes con los análisis filogenéticos realizados a partir de secuencias del gen matK (Wojciechowski *et al*., 2004).

La subfamilia Papilionoideae (Polhill *et al*., 1981) es la que ha recibido mayor atención ya que es la más grande y más ampliamente distribuida de las tres subfamilias. Según los análisis llevados a cabo a partir de secuencias de cloroplasto rbcl (Kaas & Wink, 1996; Kaas & Wink, 1997; Doyle *et al*., 2000; Doyle *et al*., 1997; Kajita *et al*., 2001), el intrón *trn*L (Pennington *et al*., 2001) y el gen *mat*K (Wojciechowski *et al*., 2004), esta subfamilia resulta monofilética. La subfamilia puede ser, en líneas generales, dividida en los siguientes grupos principales de acuerdo al súper árbol basado en los análisis más recientes (Lewis *et al*., 2005): Swartzieae s.s., un grupo basal que reúne al clado genistioide, el grupo Andira, Amorpheae y el clado Dalbergioide (los últimos dos juntos conforman el clados Dalbergioide s. l. según (Wojciechowski *et al*., 2004) y finalmente un clado esencialmente del viejo mundo que incluye a los clados Baphioide, Mirbelioide s.l., Millettioide s.l. (que incluye a Indigofereae, Abreae, Phaseoleae, Desmodieae y Psoraleeae) y a Hologalegina.

Lackey (1981) planteaba que la tribu Phaseoleae era polifilética o parafilética, hipótesis que fue apoyada por las filogenias obtenidas a partir de datos de sitios de restricción de cloroplasto (Doyle & Doyle, 1993), gen *rbc*L (Doyle *et al*., 1997; Kajita *et al*., 2001) y el gen *mat*K (Hu *et al*., 2002; Wojciechowski *et al*., 2004). Gran parte de los taxones analizados de esta tribu, resultan en un mismo clado junto a especies de la tribu Milletieae, Psoraleeae, Abreae y Desmoideae en distintos análisis de acuerdo a datos de los genes *trn*K/*mat*K y *rbc*L (Hu *et al*., 2002; Kajita *et al*., 2001; Doyle *et al*., 1997; Wojciechowski *et al*., 2004).

En la subtribu Diocleinae se encuentran representadas la mayoría de las plantas leñosas de la tribu Phaseoleae y tanto Lackey (1981) como Polhill *et al*. (1981) consideraban a las especies de esta subtribu como el nexo entre la tribu Millettieae y las legumbres faseoloideas.

En las filogenias basadas en caracteres moleculares (Kajita *et al*., 2001; Bruneau *et al*., 1995) no se corrobora la hipótesis de monofilia de la subtribu Diocleinae. A partir del análisis

realizado por Kajita *et al*. (2001) la subtribu Diocleinae no resulta monofilética ya que *Rodhopis planisiliqua* (Erythrininae) se encuentra formando parte del clado que contiene a las especies de la subtribu (y por lo tanto dejando a la misma parafilética) y además *Calopogonium mucunoides* y *Pachyrhizus erosus* se encuentran en otro clado cercanamente relacionadas a especies de las subtribus Glycininae, Phaseolinae y Erythrininae. Estos resultados apoyan el análisis de Bruneau *et al*. (1995), en donde *Calopogonium* y *Pachyrhyzus* forman un clado monofilético junto a especies de Glycininae. Estos datos apoyan la transferencia de ambos géneros a Glycininae por (Polhill, 1994).

Desafortunadamente el muestreo no ha sido demasiado extensivo dentro de la subtribu y en especial para las especies del complejo: Bruneau *et al*. (1995) y Kajita *et al.* (2001) incluyen a una única especie de *Galactia* (*G. tashiroi* y *G. striata* respectivamente). Por otro lado, Hu *et al*. (2002) y Wojciechowski *et al*. (2004), sólo incluyen a *Galactia striata*.

Las relaciones filogenéticas dentro de la subtribu han sido parcialmente analizadas por Varela *et al*. (2004) a partir del análisis de secuencias de DNA ribosomal nuclear. En dicho análisis se incluyó una única especie de *Camptosema* (*C. pedicellatum*) y dos especies de *Galactia* (*G. latisiliqua* y *G. striata*). Sus resultados son congruentes con los de Bruneau *et al*. (1995) y Kajita *et al* (2001) en cuanto a la ubicación de *Calopogonium* y *Pachyrhyzus* junto a miembros de la subtribu Glycininae.

De Queiroz *et al.* (2003) y Maxwell & Taylor (2003), analizaron las relaciones filogenéticas dentro de la subtribu Diocleinae mediante caracteres morfológicos.

El trabajo de Maxwell & Taylor (2003), aunque hace énfasis en los subgrupos de *Dioclea*, aporta evidencias para considerar la no monofilia de *Galactia* y apoya por otro lado a los análisis basados en caracteres moleculares en cuanto a las siguientes hipótesis: los géneros *Calopogonium* y *Pachyrhyzus* no pertenecen a la subtribu; *Neurodolphia* y *Rhodopis* (Erythrininae) se encuentran cercanamente relacionados a miembros de la subtribu y algunos miembros de la tribu Millettieae forman un grupo hermano a miembros de la subtribu Diocleinae.

De Queiroz *et al*. (2003) también presentan una filogenia de la subtribu basada en caracteres morfológicos. Hasta el presente, no se habían realizado muestreos exhaustivos de las especies del complejo, ya que es la primera vez en donde se analizaron 10 especies de *Camptosema*, con representantes de las 2 secciones, 9 especies de *Galactia*, con representantes en las 3 secciones y 2 especies de *Collaea.*

Los resultados obtenidos no apoyan la hipótesis de monofilia de los géneros *Galactia* y *Camptosema*, quedando el género *Collaea*, anidado dentro de *Galactia*. Sí se corrobora la hipótesis de monofilia del género *Collaea*.

Caracteres moleculares en estudios filogenéticos

Durante los últimos años el uso de caracteres moleculares en investigaciones taxonómicas, en particular de secuencias de ADN, se ha incrementado considerablemente por varias razones; como por ejemplo, el gran número de caracteres disponibles en comparación con los morfológicos y la variabilidad en cuanto a tasas evolutivas, que permiten el análisis a distintos niveles taxonómicos. Cada región tiene un rango de aplicación taxonómica, aunque es variable de acuerdo al grupo de estudio (Soltis & Soltis, 1998). Tanto la región a utilizar como el tipo de análisis son decisiones que afectan la calidad del estudio (González, 1997). En plantas, la mayoría de los estudios filogenéticos moleculares estuvieron basados exclusivamente en secuencias de cloroplasto, en particular el gen rbcL (Soltis & Soltis, 1998). Debido a que el uso exclusivo de secuencias heredadas uniparentalmente puede llevar a inferencias filogenéticas erróneas (Soltis & Soltis, 1998)la tendencia actual es el uso combinado de secuencias provenientes de ADN de cloroplasto en combinación con secuencias de ADN nuclear.

Secuencias de ADN ribosomal nuclear

A pesar del gran tamaño del genoma nuclear y de la diversidad de genes en él (*Pgi*, *gap*A y *adh* entre otros, (Soltis & Soltis, 1998), las regiones espaciadoras transcriptas internas (ITS) del ADNr nuclear 18S-26S, son las regiones nucleares que han sido más utilizadas para el análisis de varios grupos de plantas a nivel genérico y específico. Estas secuencias no son incorporadas en el ribosoma, pero parecen tener una función en la maduración de los ARN nucleares (Baldwin *et al*., 1995). Algunas de las propiedades ventajosas para la reconstrucción filogenética son:

la herencia biparental, la amplificación por medio de primers universales, el alto número de copias y el tamaño pequeño del fragmento a amplificar y los niveles de variación adecuados para la inferencia filogenética a nivel específico, genérico y familiar.

Como otras familias multigénicas, las secuencias ITS están sujetas al fenómeno de evolución concertada, que cuando ocurre en forma completa, elimina la variación entre copias producida por la acumulación de distintas mutaciones. La homogeneización de las secuencias se produce por medio de mecanismos tales como alta frecuencia de cruzamientos desiguales y

conversión génica. Sin embargo, la homogeneización de secuencias producto de los mecanismos de evolución concertada puede no ser completa. La consecuencia de esta homogeneizacion incompleta sería la aparición de múltiples copias divergentes o parálogas que no son funcionales (pseudogenes) y que son mantenidos en el genoma. El requerimiento fundamental para la inferencia de la historia filogenética a partir de ácidos nucleicos o proteínas, es que los genes comparados sean ortólogos, es decir, que revelen eventos de divergencia entre especies y no eventos derivados de la duplicación génica (Álvarez & Wendel, 2003). Algunas propiedades de la secuencia como la estabilidad de la estructura secundaria, la tasa de sustitución de nucleótidos en regiones conservadas y el contenido de guaninas y citocinas, pueden indicar la presencia de pseudogenes, aún en ausencia de dobles picos en el cromatograma. De lo dicho anteriormente se deduce la importancia de explorar los datos previamente al análisis, ya que la reconstrucción filogenética incluyendo parálogos resultaría en una hipótesis incongruente, confundiendo la historia de divergencia entre organismos con historias de duplicación (Álvarez & Wendel, 2003; Mayol & Rosselló, 2001).

En la subfamilia Papilionoideae existen varios estudios filogenéticos moleculares en donde se ha utilizado esta región (Kaas & Wink, 1997; Allan & Porter, 2000; Hu *et al*., 2002; Ainouche *et al*., 2003; entre otros).

Secuencias de ADN de cloroplasto

Las variaciones en las secuencias de ADN de cloroplasto (ADNcp) han sido muy utilizadas para investigar relaciones interespecíficas entre angiospermas y otros grupos de plantas (Palmer, 1988; Clegg, 1991), aunque la tasa evolutiva relativamente baja de esta molécula constituye, en algunas casos, una limitación seria para resolver las relaciones entre especies cercanamente relacionadas (Soltis & Soltis, 1998). Las ventajas radican en que la mayoría de los genes son de copia única (evitando el problema de las familias multigénicas planteado anteriormente) y en que distintas regiones poseen diferentes tasas evolutivas, facilitando el análisis a distinto nivel taxonómico (Soltis & Soltis, 1998).

Los genes más utilizados son: *rbc*L, *atp*B y regiones intergénicas, *ndh*F, *mat*K y regiones no codificantes, el intrón del gen *trn*L y espaciador intergénico entre los genes *trn*L y el *trn*F. Las regiones no codificantes contienen frecuencias de mutaciones más elevadas (Palmer, 1988; Clegg, 1991), iguales o hasta 3 veces superiores a la del gen *rbc*L, y por lo tanto resultan ser las más adecuadas en estudios filogenéticos a nivel interespecífico, aunque pueden presentar el problema de regiones ricas en adenina y timina de alineamiento ambiguo y consecuentemente la formulación de una hipótesis de homología incorrecta (Gielly &

Taberlet, 1994). En particular, la región del espaciador intergénico *trn*L-F es muy pequeña, de 120-350 pares de bases, presenta mayor variabilidad que el intrón del gen trnL y es muy fácil de amplificar y secuenciar (Taberlet, 1991).

En leguminosas existen pocos estudios en donde se haya utilizado esta región (Brouat *et al*., 2001; Ainouche *et al*., 2003;Crisp & Cook, 2003; Fougere-Danezan *et al*., 2003).

Caracteres morfológicos en estudios filogenéticos

En los comienzos de la sistemática filogenética, se utilizaron exclusivamente caracteres morfológicos para el estudio de las relaciones entre organismos. Es importante distinguir entre los caracteres que se usan en las claves con el propósito expreso de distinguir un taxón de otro, de aquellos caracteres que son homólogos y sugieren relaciones. (Farris, 1970), expresó claramente que un carácter es un conjunto de estados mutuamente excluyentes, que tienen un orden fijo de evolución, en donde cada estado deriva directamente de un único otro estado.

Debido al auge de la biología molecular en la sistemática, la utilidad de la morfología ha sido cuestionada por algunos autores (Hedges & Maxson, 1996; Givnish & Sytsma, 1998). El argumento de estos autores se basaba en que la morfología está sujeta a fuertes presiones de selección que favorecerían mayor convergencia y homoplasia en los caracteres comparados con los moleculares. Sin embargo, este problema no está restringido a los datos morfológicos ya que existen otros fenómenos como cambios compensatorios y ramas largas que pueden generar el mismo patrón de convergencia en datos moleculares. Por lo tanto, la homoplasia *per se* no es una razón válida para la exclusión de datos morfológicos (Baker & Gatesy, 2002).

A pesar de que la exclusión a priori de los datos morfológicos no está ampliamente aceptada, sí es frecuente la posición de no combinar los datos moleculares con los morfológicos cuando existe conflicto entre los distintos conjuntos (Baker & Gatesy, *op cit*). El ILD (Farris, 1994) es uno de los índices más ampliamente utilizado para cuantificar la incongruencia entre conjuntos de datos. Sin embargo, este presenta algunas fallas y la interpretación de su valor puede llevar a conclusiones erróneas (Dolphin *et al.*, 2000; Lee, 2001). Según (Farris, 1983), las hipótesis filogenéticas basadas en varias líneas independientes de evidencia poseen el máximo valor explicativo. (Nixon & Carpenter, 1996) sostienen que existe una señal secundaria que sólo emerge cuando los distintos conjuntos de datos son combinados. Otros investigadores (Baker & De Salle, 1997; Sullivan, 1996) demostraron que el análisis combinado de datos heterogéneos produce hipótesis más

fuertemente apoyadas y mejor resueltas. Por lo dicho anteriormente, la mejor opción es combinar todas las fuentes de datos disponibles.

OBJETIVOS

- Poner a prueba la monofilia de los géneros *Galactia*, *Camptosema* y *Collaea* y de la Sección Galactia en su actual circunscripción.
- Conocer las relaciones entre las especies del complejo.
- Aportar información que permita validar o rechazar las propuestas taxonómicas tradicionales

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis Molecular

Material

Las especies utilizadas para la extracción de ADN se listan a continuación:

Especie	**Localidad**	**Voucher**
***Galactia* (sección Odonia)**		
G. jussiaeana	Venezuela	Fortunato (BAB)
G. latisiliqua	Argentina. Formosa: 12 km al S de Las Lomitas	Fortunato 6840 (BAB)
	Argentina. Entre Ríos: Pque. San Carlos	Sede SC1 (BAB)
G. fiebrigiana	Argentina. Tucumán: Tafí del Valle	Sede 12 (BAB)
G. striata	Argentina. Entre Ríos: Pque. San Carlos	Sede SC2 (BAB)
	Argentina. Misiones: Pque. Teyú Cuaré	Sede 9 (BAB)
G. dubia	Argentina. Salta: 1,3 km al SO de La Silleta	Fortunato 7170 (BAB)
G. texana	Argentina. Salta	Fortunato 7577 (BAB)
G. marginalis	Argentina. Salta: 14 km al S de Guachipas	Fortunato 7185 (BAB)
G. neesii	Argentina. Corrientes	Fortunato 8060 (BAB)
G. benthamiana	Argentina. E. Ríos: campo del INTA	Fortunato 7886 (BAB)
G. sp. nov.	Argentina. Corrientes	Fortunato 7552 (BAB)
G. longifolia	Argentina. E. Ríos: Ao. Quebracho y RP 2	Fortunato 7907 (BAB)
***Galactia* (sección Collaearia)**		
G. boavista	Argentina. Corrientes: 7 km al SE de Gob.Virasoro	Fortunato 7544 (BAB)
***Galactia* (sección Galactia)**		
G. lindenii	Colombia	Ruiz 2
Camptosema		
C. paraguariense	Argentina. Formosa: 20 km al O de Las Lomitas	Fortunato 6805 (BAB)
C. rubicundum	Argentina. Bueno Aires: Isla Martín García	Sede 17 (BAB)
	Argentina. Entre Ríos: Pque Unzué	Sede s/n (BAB)
C. ellipticum	Paraguay. Alto Paraguay.	Sede s/n (BAB)
C. scarlatinum	Argentina. Misiones: RP 4 e/ Sta. Ana y Bonpland	Fortunato 8003 (BAB)
C. praeandinum	Argentina. Salta: 7 km al N de Campo Quijano	Fortunato 6936 (BAB)
	Argentina. Salta: Quebrada del Toro	Fortunato 7271 (BAB)
C. coriaceum	Brasil	Fortunato (BAB)
C. coccineum	Brasil	Fortunato (BAB)
Collaea		
C. stenophylla	Argentina. Misiones: Cerro Santa Ana	Sede 3 (BAB)
C. paraguariensis	Argentina. Misiones: Cerro Santa Ana	Fortunato 8043 (BAB)
C. argentina	Argentina. Misiones: cerca de Campo Grande	Fortunato 7673 (BAB)
C. cipoensis	Brasil.	Fortunato (BAB)
C. aschersoniana	Argentina. Misiones: Cerro Santa Ana	Fortunato 8002 (BAB)

Extracción de ADN total

La extracción del ADN se realizó a partir de 20 mg de hoja según el protocolo de Doyle & Doyle (1987) con algunas modificaciones:

- El tejido se congeló con nitrógeno líquido y se lo pulverizó en un mortero.
- El pulverizado se transvasó a un tubo Eppendorff® de 1,5 ml y se añadieron 500 µl de buffer de extracción (100 mM Tris- HCl pH: 8; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 2 % p/v CTAB; 1 % p/v PVP-360 (polivinil pirrolidona); 0,2% v/v β-mercaptoetanol) a 60 ºC.
- La muestra se incubó durante 1 hora a 65ºC con agitación.
- Se realizó una extracción con 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v). Se agitó fuertemente y se centrifugó a 12.000 X g por 30 segundos a 20-25 ºC para separar las fases.
- Evitando la interfase, se pipeteó la fase acuosa en un nuevo tubo.
- Se agregó 0.5 volúmenes de NaCl 5M. Se agrego isopropanol al 40%. Se mezcló suavemente y se incubó a –20 ºC por 20 minutos o más.
- Se centrifugó a 12.000 X g durante 1 minuto a 20-25 ºC.
- Se eliminó el sobrenadante tratando de no tocar el pellet de ADN. Se realizaron 2 lavados con alcohol 75%: se agregó 0,5-1 ml de alcohol al pellet y se agitó suavemente. Luego se dejó reposar por 15-20 minutos.
- Se centrifugó a 12.000 X g por un minuto a 20-25 ºC. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 10 minutos.
- Se resuspendió la muestra en 20µl de agua bidestilada.

Cuantificación y control de la calidad del ADN

S

e sembraron 2 µl de cada muestra en geles de agarosa 0,8% con bromuro de etidio (0,1 µg/ µl), TAE 1X. La electroforesis se llevó a cabo a 4,5 V/cm (corriente constante) durante 1 hora. Se visualizaron en un transiluminador de UV y se fotografiaron. Para la cuantificación se incluyó, en el gel, el estándar de masa de "DNA High DNA Mass TM Ladder" (Life Technologies –Gibco BRL-, EUA).

Amplificación del espaciador transcripto interno (ITS) del ADNr

Los fragmentos correspondientes al espaciador interno de los genes ribosomales conteniendo el 5.8S ADNr (ITS1 e ITS2) amplificados a partir del ADN total de los distintos individuos analizados. Los *primers* (Figura 1) utilizados fueron sintetizados basándose en la

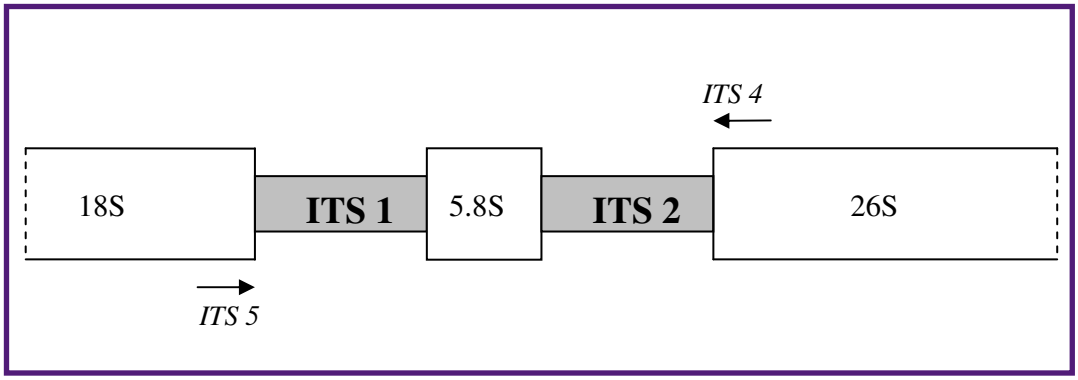
secuencia descripta por White et al. (1990) para hongos, con algunas modificaciones (resaltadas en negrita).

Secuencia de los *primers*:

ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

ITS5: 5'GGAAG**G**A**G**AAGTCGTAACAAGG 3'

Figura 1. Ubicación de los *primers* que se utilizaron en la reacción de PCR para amplificar el ITS (ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990).



Las condiciones en que se llevó a cabo la reacción fueron las siguientes:

Condiciones de la reacción	
Buffer (libre de Mg^{2+})	1x
$MgCl_2$	1,5 mM
dNTPs (c/u)	200 µM
ITS4 e ITS5 (c/u)	0,1µM
Taq ADN polimerasa	1,25 u
ADN templado	50 ng
Volumen final	50 µl

A cada mezcla se agregó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación. Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en un ciclador Perkin Elmer modelo 480 (EUA) y fueron los siguientes:

94°C (desnat. inicial)	3 min	1 ciclo
94°C (desnaturalización)	30 seg	

50°C(anillamiento, *annealing*)	1 min	40 ciclos
72°C (extensión)	2 min	
72°C (extensión final)	5 min	1 ciclo

Los productos de amplificación fueron corridos electroforéticamente en geles de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio, en TAE 1X, se visualizaron con luz UV y se fotografiaron. Para la estimación del tamaño de los fragmentos obtenidos, se utilizó el marcador en escalera de 123 pb (Gibco- BRL, EUA).

Amplificación del espaciador intergénico (IGS) entre los genes *trn*L y *trn*F de cloroplasto

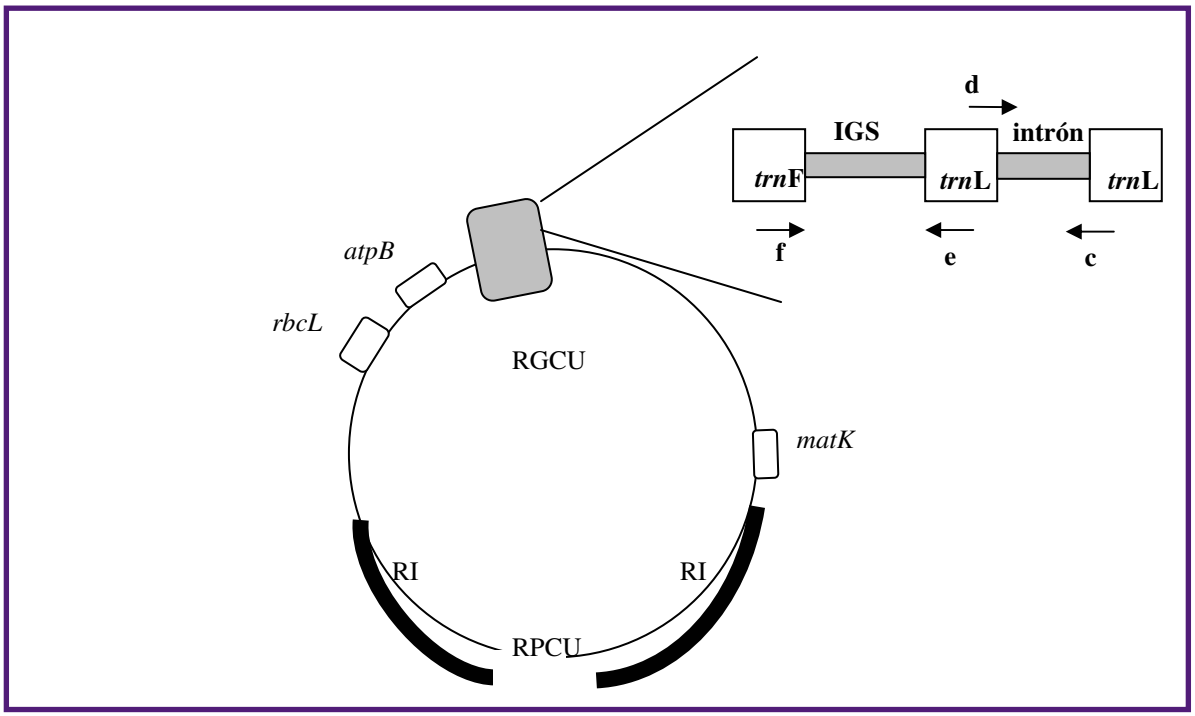
Los fragmentos correspondientes al IGS entre los genes *trn*L-F fueron amplificados a partir del ADN total de los distintos individuos analizados. Los *primers* e y f (**Figura 2**) utilizados fueron sintetizados sobre la base de la secuencia descripta por Taberlet *et al.* (1991)

Secuencia de los *primers*:

e: 5' GGTTCAAGTCCCTCTATCCC 3'

f: 5' ATTTGAACTGGTGACACGAG 3'

Figura 2. Esquema del genoma del ADN de cloroplasto, indicando las regiones analizadas. Ubicación de los *primers* que se utilizaron en la reacción de PCR para amplificar el IGS *trn*L-F (**e** y **f**) y el intrón *trn*L (**c** y **d**). Las flechas indican la posición de hibridación de los *primers* (Taberlet, 1991)
RI: repetición invertida; RGCU: región grande de copia única; RPCU: región pequeña de copia única.



Las condiciones en que se llevó a cabo la reacción fueron las siguientes:

Condiciones de la reacción	
Buffer (libre de Mg^{2+})	1x
$MgCl_2$	1,5 mM
dNTPs (c/u)	200 µM
primers **e** y **f** (c/u)	1µM
Taq ADN polimerasa	0,5 u
ADN templado	20 ng
Volumen final	25 µl

A cada mezcla se agregó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación. Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en un ciclador Perkin Elmer modelo 480 (EUA) y fueron los siguientes:

94°C (desnat. inicial)	3 min	1 ciclo
94°C (desnaturalización)	1 min	35 ciclos
50-53°C (anillamiento, 'annealing')	1 min	
72°C (extensión)	2 min	
72°C (extensión final)	5 min	1 ciclo

Los productos de amplificación se analizaron de igual forma a la descripta para las secuencias de ADN ribosomal nuclear.

Amplificación del intrón del gen *trn*L de cloroplasto

Los fragmentos correspondientes al intrón del gen trnL fueron amplificados a partir del ADN total de los distintos individuos analizados. Los *primers* **c** y **d** (**Figura 2**) utilizados fueron sintetizados basándose en la secuencia descripta por Taberlet *et al.* (1991)

Secuencia de los *primers*:

c: 5' CGAAATCGGTAGACGCTACG 3'

d: 5' GGGGATAGAGGGACTTGAAC3'

Las condiciones de reacción y los ciclos de amplificación fueron las mismas que para la región IGS *trn*L-F.

Amplificación de regiones del gen matK

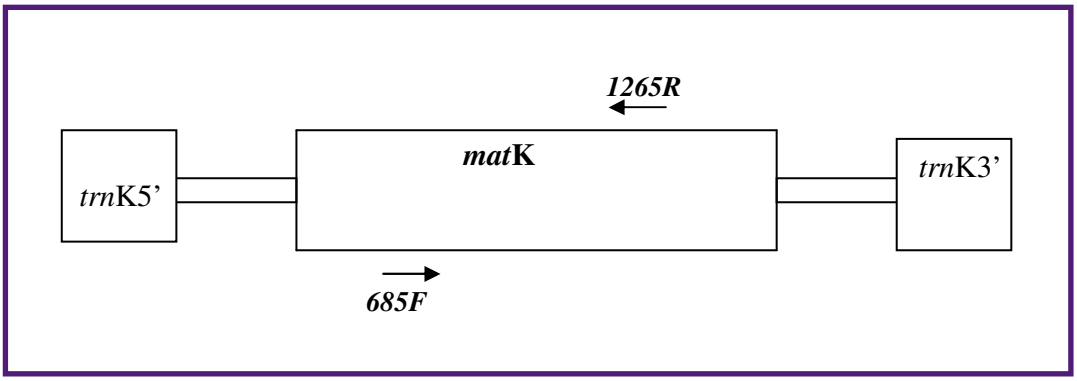
Los fragmentos correspondientes a la región del gen *mat*K(ver esquema) se amplificaron a partir de ADN total de los distintos individuos analizados. Los *primers* utilizados para amplificar la región, 685F y 1265R (**Figura 3**), fueron sintetizados sobre la base de la secuencia descripta por Johnson & Soltis (1994).

Secuencia de los *primers*:

685F: 5' GTATCGCACTATGTATCATTTG 3'

1265R: 5' GATCTTTCACCCAGTATCAAG 3'

Figura 3. Ubicación de los *primers* que se utilizaron en la reacción de PCR para amplificar la región del gen *mat*K.



Las condiciones de reacción y los ciclos de amplificación fueron las mismas que para la región IGS *trn*L-F, salvo por la temperatura de "annealing" (54°C).

Purificación y secuenciación de los productos de amplificación

El volumen total del producto amplificado se sembró en geles de agarosa al 2 % con bromuro de etidio en buffer TAE 1x. Las bandas de ADN visualizadas con luz UV se removieron del gel y se purificaron con el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, EUA) siguiendo las especificaciones de los fabricantes. Se cuantificó el DNA obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, con bromuro de etidio (1 µg/ 100ml) y fueron visualizados con luz UV. Algunos productos de amplificación del IGS *trn*L-F se clonaron molecularmente en el vector comercial pGEM-T easy (Promega Biotech, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos fueron enviados a Macrogen Inc. (Corea del Sur) para su secuenciación automática.

Se secuenció una única muestra por individuo y en la mayoría de los casos un único individuo por especie.

Para descartar la ocurrencia de amplificación inespecífica o contaminación en la muestra, las secuencias obtenidas se compararon con secuencias conocidas en distintas bases de datos mediante el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, desarrollado por el National Center for Biotechnology Information, EUA) disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Este programa utiliza un algoritmo de búsqueda de homología de secuencias que permite identificar coincidencias significativas entre una secuencia provista por el usuario (incógnita) y una secuencia de ADN almacenada en la base de datos en donde se está realizando la búsqueda.

Edición de secuencias

La edición de las secuencias se realizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, de utilización gratuita, disponible en http://services.bioesp.nl/blat/cgi-bin/blast.cgi?program=blastn. Este programa permite abrir gráficos de cromatogramas de secuencias, editar las mismas y reconstruir una secuencia completa de una molécula de ADN a partir de secuencias más cortas.

Caracterización de secuencias de ITS

Las secuencias parálogas de ITS poseen baja estabilidad de su estructura secundaria, un incremento en el contenido de AT producto de las deaminaciones y una tasa relativa de sustituciones más alta en las regiones conservadas (Bailey *et al*., 2003).

Para la identificación de posibles secuencias parálogas de ITS se caracterizaron a las secuencias por: el largo, el contenido de G + C y la presencia de la región conservada (GGCRY(n 4 a 7)GYGYCAAGGAA (Liu & Schardl, 1994), utilizando el programa BioEdit. Se ha hipotetizado que parte de esta región conservada o la misma completa actúa como señal crítica en el procesamiento enzimático del RNA ribosomal (Liu & Schardl, 1994). Se analizó también el número de estructuras de plegado, óptimas y subóptimas y los valores de energía libre asociados (ΔG) en Kcal/mol de las secuencias de ITS1 e ITS2. Las predicciones de estructuras de plegado se realizaron en el servidor de M. Zuker (http://www.ibc.wustl.edu/~zuker/rna/form1.cgi) a través del programa MFOLD ver. 3.1. a 37 ºC con un intervalo del 5% del óptimo termodinámico.

Determinación de homologías primarias: construcción de la matriz de datos

De Pinna (1991) propuso los términos homología primaria y secundaria. La formulación de una hipótesis de homología primaria involucra dos pasos: Primero, los caracteres definidos en el estudio de los organismos, ya sea morfológico o molecular, son usados para construir columnas en una matriz de datos. Luego, los caracteres son codificados en estados y asignados a los taxones terminales. En el análisis filogenético se ponen a prueba las hipótesis de homología primaria y esto resulta en el establecimiento de hipótesis secundarias de homología.

La formulación de hipótesis de homologías primarias en caracteres moleculares se realiza a través del alineamiento.Para la construcción de una matriz de datos. Las secuencias completas obtenidas se alinearon por medio del programa DIALIGN (Morgenstern *et al*.,

1996). El algoritmo utilizado por este programa se basa en la comparación de segmentos completos de secuencias que exhiban una similitud total alta y no en la comparación de residuos individuales. Las regiones de baja similitud se excluyen del alineamiento y esto permite la detección y el alineamiento correcto de regiones similares cortas en secuencias largas de baja similitud total. El algoritmo produce en primera instancia alineamientos de a pares sólo para preseleccionar aquellos segmentos que serán incluídos en el alineamiento múltiple y por lo tanto, a diferencia de otros programas, es independiente del orden en el cual se construyen los alineamientos de a pares. Este programa posee poca dependencia de parámetros definidos por el usuario. Las inserciones/deleciones no son penalizadas en este algoritmo y permanecen como aquellas partes de las secuencias que no corresponden a ninguno de los segmentos alineados. El único parámetro que debe ser definido es *T* (de *threshold*), con valores desde 0 a 10. Este parámetro limita el número de segmentos en consideración para retener sólo aquellos que tienen muy buena chance de ser relevantes a nivel biológico. Sin embargo, (Morgenstern *et al*., 1996) sostienen que *T* puede ser variado considerablemente sin cambiar esencialmente los resultados y no es importante darle un valor en secuencias de ADN cortas o de proteínas.

Se realizaron alineamientos de las distintas matrices con valores de *T*=5 y *T*=10.

Codificación de gaps

Las inserciones y deleciones generadas a partir del alineamiento se codificaron como presencias/ausencias por medio del método simple propuesto por (Simmons & Ochoterena, 2000). Este método considera a los 'gaps' con extremos 5' o 3' diferentes como caracteres separados de presencia/ausencia. Cuando gaps de diferentes secuencias constituyen un subconjunto de un determinado gap más largo (es decir que se extienden hasta los extremos 3' o 5' de ese gap o dentro de esos extremos) estos son codificados como inaplicables en los terminales que poseen dicho gap más largo. Una vez construída esta matriz, se adiciona a la matriz de secuencias antes de la búsqueda. Las matrices de los datos moleculares se detallan en el apéndice 3.1

Análisis filogenético

La construcción de las hipótesis filogenéticas se realizó mediante el método cladístico, que es en la actualidad el método más utilizado en sistemática. La formulación original de este método se atribuye al entomólogo alemán Willi Hennig y la publicación de su libro Sistemática Filogenética en (Hennig, 1968) marca el comienzo de una revolución en

Sistemática y Evolución. Hennig sostenía que las clasificaciones deben estar basadas en la filogenia, y buscaba un metodo que permitiera plantear hipótesis de filogenia a partir de las observaciones actuales de los organismos (Goloboff, 1998).

La cladística se basa en dos conceptos principales:

a) la evidencia para establecer relaciones de grupo hermano proviene de los caracteres compartidos derivados o sinapomorfías y de esta forma los organismos se agrupan en unidades monofiléticas. Las relaciones entre los organismos se muestran en un árbol jerárquico o cladograma.
b) el principio auxiliar de la cladística es el principio de parsimonia: nunca se asume que características similares entre dos organismos surgieron independientemente a menos que exista evidencia de lo contrario. El principio de parsimonia simplemente afirma que cuando existen dos o más alternativas, la mejor es aquella que requiere menor cantidad de hipótesis *ad hoc* de homoplasia (paralelismos, reversiones, convergencias) para ser explicada (Farris, 1983).

Farris (1977; 1982; 1983, entre otros), demostró que el método cladístico (agrupar por sinapomorfías) produce clasificaciones que contienen mayor cantidad de información que aquellas resultantes de la aproximación fenética (agrupamiento por similitud). Por otro lado, Hennig (1968) y Lipscomb (1998)., argumentaron que la cladística, sobre la base de sinapomorfías, provee la mejor evidencia para la evolución

El programa TNT, Tree Analysis Using New Technology ver 1.0 (Goloboff *et al*., 2003), es uno de los programas que implementa este método y tiene sobre otros algunas ventajas adicionales: provee algoritmos de búsqueda más rápidos, algunos totalmente nuevos y otros mejorados, e integra posibilidades anteriormente disponibles en programas separados (pesado implícito, asignación de costos de transformación para transiciones/transversiones, etc).

Estrategias de búsqueda

Se utilizaron distintas estrategias de búsqueda:

a) Análisis mediante el uso de algoritmos especiales
Se utilizó una combinación de algoritmos especiales implementados en TNT:

1) búsquedas sectoriales ó 'sectorial searches' que consiste en tomar una porción del árbol de Wagner, crear un conjunto de datos reducidos, y producir un pequeño análisis de ese conjunto. Si luego de la permutación de ramas con TBR, se encuentra una mejor solución para aquella porción del árbol, se reemplaza en el árbol original.

2) **fusión de árboles** ó 'tree fusing', como su nombre lo indica, mezcla árboles para producir otros mejores. Esto produce un efecto sinérgico ya que se pueden fusionar árboles provenientes de distintas búsquedas.
3) **parsimonia de matraca** ó 'ratchet' originalmente descripta por (Nixon, 1999), consiste en reasignar pesos en forma aleatoria a un porcentaje de los caracteres de la matriz, calcular nuevos árboles óptimos, redeterminar los pesos, y si se encuentra un árbol más corto se reserva y se sigue con otra ronda de asignación de pesos.

Los algoritmos se implementaron en el siguiente orden:

Primero se realizaron 100 secuencias de adición al azar combinando "sectorial searches" y "tree fusing", colapsando los árboles luego de la búsqueda. Seguidamente y a partir de los árboles obtenidos en el paso anterior guardados en la memoria, se utilizaron los algoritmos de "ratchet" y "tree fusing", hasta lograr la estabilización del consenso.

Con esta exploración se consigue evitar el problema de las islas. Una isla es una colección de árboles cortos interconectados que están separados de otras islas por árboles más largos. Es por ello, que a veces es imposible llegar desde un árbol subóptimo hasta otro de longitud menor, a menos que se pase a través de un árbol de longitud mayor (Maddison, 1991). A diferencia de una búsqueda heurística tradicional, en donde típicamente se encuentra una sola isla (ya que los árboles de longitud mayor son descartados) el uso de 'ratchet' permite encontrar islas adicionales comenzando la búsqueda a partir de distintos puntos (árboles guardados en la memoria de la exploración con búsquedas sectoriales).

b) Análisis bajo pesos implicados

TNT implementa el método de pesado implícito de caracteres o pesos implicados de (Goloboff, 1993). La idea del método es que los caracteres que exhiben una mayor tendencia a la homoplasia son menos confiables. La relación peso / homoplasia no es lineal, sino que es una función cóncava, cuya severidad se estipula con una constante k. De esta forma al aumentar la homoplasia, el carácter recibe relativamente cada vez menos peso.

El ajuste de los caracteres al árbol es calculado como:

$$\mathbf{f = k / (e + k)}$$

donde **e=** número extra de pasos y **k =** constante de concavidad.

Se utilizaron los mismos algoritmos de búsqueda que en **a)** pero con la opción de pesos implicados y con valores de **k** = 3, 5 y 7.

c) Análisis con distintos costos de transformación para transiciones y transversiones

Los esquemas de asignación de costos de transformación no pueden ser generalizados a todos los organismos y moléculas. En cuanto a la frecuencia de ocurrencia de transiciones vs transversiones, sólo por azar uno esperaría encontrar mayor número de transversiones que de transiciones. Sin embargo, en muchos ejemplos, existen significativamente más transiciones que transversiones.

Si se acepta este modelo de cambio de caracteres, uno aplicaría un costo de transformación mayor a los eventos de menor frecuencia de ocurrencia (o menos comunes) favoreciendo un tipo de sustitución sobre la otra.

Se aplicaron costos de transformación diferenciales a las transversiones (**TV**) y transiciones (**TS**) a los distintos conjuntos de datos por separado y en forma combinada, mediante la implementación de una matriz de costos en TNT. Se exploraron 3 costos de transformación **TV/TS**: **2/1**, **4/1** y **8/1**. Se utilizó la misma combinación de algoritmos de búsqueda que en el punto **a).**

Medidas de apoyo

Existen varios métodos para medir el apoyo o soporte de grupos.

El método de '**Jackknifing**', introducido en sistemática por (Lanyon, 1985), se basa en realizar alteraciones de la matriz (mediante re-muestreos al azar sin reemplazo de algunos caracteres), calculando con qué frecuencia un grupo dado se mantiene en los árboles óptimos. Esto da una idea de que proporción de evidencia a favor y en contra hay para cada grupo y por lo tanto de en qué grado la adición de nuevos caracteres puede modificar las conclusiones.

Se realizaron 300 réplicas. Para cada réplica se realizó una búsqueda heurística tradicional con TBR sobre 10 secuencias de adición al azar, reteniendo 10 árboles en cada replicación. La probabilidad de remoción de caracteres fue de p= 0.36 y los valores se expresaron como frecuencias absolutas.

El **soporte de Bremer** (Bremer, 1994) para análisis usando parsimonia, es una medida que evalúa el número de pasos extras necesarios para perder una rama en el árbol de consenso a partir de los árboles más parsimoniosos de la búsqueda. Una rama presente en

uno de los árboles más parsimoniosos está apoyada más fuertemente por los datos si se requiere un gran incremento en la longitud de árboles adicionales antes que esta rama sea perdida en el consenso (Källersjö, 1992).

El soporte de Bremer se calculó mediante una búsqueda heurística con TBR sobre 100 secuencias de adición al azar, reteniendo secuencialmente subóptimos hasta 10 pasos de longitud hasta un total de 10000.

Medidas para evaluar la calidad de los cladogramas

Generalmente los programas de parsimonia utilizan medidas estándar para evaluar la 'calidad' de los cladogramas, como la longitud del árbol, el índice de consistencia y el índice de retención.

La longitud es el número mínimo de cambios en los estados de los caracteres (pasos) requeridos en un cladograma para dar cuenta de los datos. El largo en el árbol de consenso provee información sobre la existencia de conflicto de caracteres entre (y no dentro) de los cladogramas.

El índice de consistencia (**CI**) (Kluge & Farris, 1969) es una medida de la cantidad de homoplasia presente en una matriz de datos relativa a un cierto árbol.

El índice se calcula como:

CI= M / S

donde **M=** número mínimo de pasos que todos los caracteres pueden presentar en cualquier cladograma y **S=** número mínimo de pasos que pueden exhibir en el árbol en cuestión.

Debido a que este índice se ve incrementado por la presencia de caracteres no informativos, el cálculo se realizó previa inactivación de los mismos.

El índice de retención (**RI**) (Farris, 1989) es la fracción de posible homoplasia retenida como sinapomorfía en el árbol

Este índice se calcula como:

RI= (G - S) / (G - M)

donde **G=** mayor número de pasos que todos los caracteres pueden exhibir sobre un cladograma (es decir el peor ajuste).

Elección de grupo externo

De acuerdo a Nixon & Carpenter (1993), cuanto mayor sea el número de taxones en el grupo extreno, mejor fundada estará la inferencia filogenética. Aunque no es necesaria la presencia en el análisis de más de un taxón para determinar la raíz del árbol, si lo es para poner a prueba la monofilia del grupo de estudio.

Los análisis filogenéticos en la tribus Millettieae y Phaseoleae a partir de secuencias de ITS/5.8S (Hu et al., 2002), del gen *rbc*l (Kajita *et al*., 2001) y del gen *trn*K/*mat*K (Wojciechowski *et al*., 2004), guiaron la selección de los taxones que conforman el grupo externo de la matriz de ITS. La mayoría de las secuencias se obtuvieron del banco de datos de secuencias GenBank, disponible a través de NCBI en http://www.nlm.nih.gov/GenBank.

Los nombres de los taxones y su número de GenBank se detallan a continuación:

Especie	Número de GenBank	Secuencia
Austrosteenisia blackii	AY124765	ITS
Abrus precatorius	AF467015	ITS
Canavalia brasiliensis	AF467034	ITS
Lonchocarpus nitidus	AF467062	ITS
Dioclea virgata	AY293833	ITS
Millettia leptobotrya	AF467477	ITS
Lupinus paraguariensis	AF007476	ITS
	AF538709	IGS *trn*L-F

Se agregó además una especie de la subtribu Phaseolinae: *Macroptilium psammodes*. Las secuencias tanto de ITS como del IGS entre el trnL-F para estas dos especies fueron facilitadas por la Dra. Shirley Espert y aún no han sido depositadas en el Genebank.

Análisis morfológico

Especies analizadas del grupo interno

Para la determinación de los caracteres morfológicos se analizaron los mismos ejemplares seleccionados para la realización de las descripciones (capítulo I).

La matriz constó de las mismas 26 especies del grupo de estudio utilizadas en las matrices moleculares.

Especies analizadas del grupo externo

El grupo externo constó de 2 especies: *Lonchocarpus nitidus* (tribu Millettiae) y *Dioclea virgata* (subtribu Diocleinae). La elección estuvo guiada por los análisis filogenéticos basados en caracteres morfológicos utilizados por Maxwell & Taylor (2003) y De Queiroz *et al*. (2003).

Lonchocarpus nitidus Benth

ARGENTINA. ENTRE RÍOS. Dpto. Concordia: camino a Pte. Colorado, alrededores del Yoquey. (fl). 16 enero 1990. N. Bacigalupo et al 1347 (SI; BAB); Delta, Sta. Úrsula (fl) 31 diciembre 1990. R BAuer 202 (BAB). **MISIONES**. Posadas. 19 enero 1907. C. Spegazzini (BAB 17852); Dpto. Alem: Colonia El Chatón. Árbol de 6 m de altura (fl). 27 enero 1994. M. Dematteis et al 276 (MNES; BAB); Dpto. San Javier: San Javier, balneario, ribera del río Uruguay, 21 enero 1994. (fl) M. Dematteis et al 265 (MNES; BAB).

PARAGUAY. **CONCEPCIÓN**. En los alrededores de Yby-Jaú. Cerrado. 22º 47' S 56º 21' O. Árbol de 20 m de alt. (fr). 1 marzo 2001. E. Zardini & L. Guerrero 56435 (FACEN; MO; BAB)

Dioclea virgata (L.C.Rich) Amshoff

BOLIVIA. LA PAZ. Prov. Iturralde, Buena Vista-Tacana, al oeste de Buena Vista, a orillas del Ao. Tuihuapo. Liana (fl). 6 junio 1995. A. Serato 19 (BAB)

Se construyó una matriz morfológica de 28 taxones y 48 caracteres (Apéndice 3.2)

Del total de caracteres, 7 corresponden a la morfología externa de la hoja, 4 a la inflorescencia, 29 son caracteres florales y 7 corresponden la morfología del fruto y la semilla. De estos sólo 5 son multiestado y los restantes son binarios. Los caracteres multiestados se codificaron como no ordenados. La matriz morfológica se analizó mediante el programa TNT con dos estrategias de búsqueda: con pesos iguales y con pesos implicados.

Los caracteres seleccionados y sus estados se listan a continuación.

Lista de caracteres morfológicos

0. **Hábito**: (0) subarbusto; (1) hierba voluble; (2) hierba erecta; (3) hierba postrada.

Hoja (caracteres 1- 7):

1. Raquis: (0) presente; (1) ausente.
2. Folíolos: (0) uno; (1) tres.
3. Pecíolo: (0) peciolada: longitud mayor o igual a 1 cm; (1) subsésil-sésil: longitud menor que 1 cm. Los estados del carácter se determinaron por medio de una ANOVA seguida de comparaciones por el método de Schefée.
4. Consistencia: (0) membranácea, cartácea, papirácea; (1) coriácea.
5. Forma: (0) angostamente oblonga; (1) anchamente elíptica-obovada.
6. Color de los folíolos al secarse: (0) concolores; (1) discolores.
7. Estipelas: (0) ausencia; (1) presencia

Inflorescencia

8. Largo de la inflorescencia vs largo de la hoja adyacente: (0) de igual tamaño o mayor; (1) menor.
9. Braquiblasto: (0) vestigial; (1) globoso, claviforme, capitado; (2) alargado, ramificado
10. Consistencia del raquis: (0) leñoso; (1) no leñoso
11. Tipo: (0) racimo; (1) racimo umbeliforme/corimbiforme.

Flor

12. Brácteas florales: (0) estrobiliformes; (1) no estrobiliformes. El estado (0) del carácter se refiere al agrupamiento que adoptan las brácteas en forma similar a un estróbilo.
13. Bracteolas: (0) caducas tempranamente; (1) persistentes.
14. Largo de las bracteolas vs largo de tubo calicinal: (0) menor; (1) mayor o igual.
15. Posición de las bracteolas: (0) en la base del caliz; (1) distanciadas de la base.
16. Forma de las bracteolas: (0) ovobadas; (1) subuladas.
17. Resupinación: (0) ausente; (1) presente. Este carácter hace referencia a la torsión de la flor, ya sea por el giro completo de la inflorescencia, como es el caso en algunas especies de *Collaea* (carácter asociado a la polinización por pájaros) o por la torsión del pedicelo como es el caso en algunas especies de *Camptosema* y *Galactia*.
18. Largo de pedicelos: (0) 0 a <7 mm; (1) 7 a <15 mm; (2) 15-30 mm. Los estados del carácter se determinaron por medio de una ANOVA seguida de comparaciones por el método de Schefée.
19. Flores estaminadas por atrofia del ovario: (0) ausencia; (1) presencia. La presencia de flores estaminadas fue observada por Burkart (1970) y Fortunato (com. pers.) en distintas especies de *Galactia* y *Camptosema*.

Cáliz

20. Color: (0) rojo; (1) verde
21. Forma: (0) campanulado; (1) tubular.
22. Forma del lóbulo superior: (0) triangular; (1) elíptico/lanceolado

Corola

23. Color: (0) rojo; (1) azul-lilacino
24. Forma del estandarte: (0) orbicular; (1) ovobado-elíptico; (2) oblongo

25. Indumento del estandarte: (0) glabro; (1) pubescente en el tercio superior de la lámina; (2) pubescente en toda la lámina.
26. Ápice del estandarte: (0) emarginado/obtuso; (1) agudo
27. Áreas callosas del estandarte: (0) ausente; (1) presente
28. Indumento en áreas callosas del estandarte: (0) ausente; (1) presente
29. Reflexión del estandarte en la antesis: (0) reflejo; (1) no reflejo
30. Aurículas del estandarte: (0) vestigiales o ausentes; (1) presentes
31. Forma de las alas: (0) elípticas/oblongas (1) anchamente ovobadas
32. Indumento en el margen de las alas: (0) ausente; (1) presente
33. Ápice de la quilla: (0) recto; (1) incurvo
34. Margen superior de la quilla: (0) liso; (1) dentado

Androceo

35. Tipo de androceo: (0) pseudomonadelfo (base y/o tercio superior del estambre vexilar libre del tubo estaminal); (1) diadelfo (estambre vexilar completamente libre del tubo estaminal)
36. Indumento de las anteras: (0) glabras; (1) pubescentes

Disco y Gineceo

37. Forma del disco: (0) cilíndrico; (1) cónico/truncado
38. Margen del disco: (0) irregular; (1) lobulado
39. Ovario: (0) sésil/subsésil (largo menor a 1 mm); (1) cortamente estipitado (mayor o igual a 1mm y menor que 4 mm); (2) estipitado (mayor o igual a 4 mm). Los estados del carácter se determinaron por medio de una ANOVA seguida de comparaciones por el método de Schefée.
40. Estilo: (0) geniculado en la base o medio; (1) no geniculado

Fruto

41. Margen: (0) recto; (1) ondulado
42. Forma: (0) recto; (1) arqueado; (2) falcado
43. Indumento: (0) glabro; (1) piloso; (2) seríceo
44. Ubicación del apículo: (0) central; (1) lateral

Semilla

45. Color: (0) uniforme; (1) marmolado
46. Compresión de la semilla: (0)
47. Estrofíolo: (0) incompleto; (1) completo

Análisis combinado

El conjunto de datos moleculares y morfológicos combinados resultó en una matriz de 34 taxones y 1358 caracteres que se analizó mediante el programa TNT con pesos iguales y con pesos implicados.

Medida de la incongruencia entre conjuntos de datos (*test* ILD)

Se determinó el nivel de incongruencia entre ambos conjuntos de datos mediante el test ILD (Farris, 1994) implementado a través del subprograma Arn en el programa NONA (Goloboff, 1996). Este *test* evalúa la cantidad de pasos extra resultado de la combinación de los distintos conjuntos de datos vs los pasos extra resultantes de la incongruencia presente entre los caracteres de cada conjunto. Entonces la diferencia (D) entre dos matrices *x* e *y* es: D*xy* = L(*x*/*y*) – (L*x* + L*y*) en donde L es la longitud de los árboles más parsimoniosos. Los caracteres no informativos fueron excluidos del análisis ya que pueden sobreestimar el valor.

Se realizaron análisis de las matrices por separado y en forma combinada. Los caracteres fueron considerados como no ordenados y los no informativos fueron desactivados en todas las búsquedas.

RESULTADOS

ANÁLISIS MOLECULAR

Caracterización de secuencias de ITS

Se descartó la presencia de contaminantes o de amplificación inespecífica, ya que las secuencias analizadas poseen alta similitud con secuencias conocidas de las tribus Phaseoleae y Millettiae.

Todas las secuencias analizadas del grupo de estudio se encontraron dentro del rango de longitud estimado para las Angiospermas que es de 187-298 pb para el ITS1 y de 187-252 pb para el ITS2 (Baldwin *et al*., 1995). La secuencia de Lonchocarpus, proveniente del GenBank , se aparta de esto valores ya que presenta menor longitud en el ITS1 (**Tabla 1**).

El contenido de GC fue cercano al 50% en el ITS1 y un poco mayor en el ITS2 en la mayoría de los casos (Tablas 1 y 2). Las excepciones fueron las secuencias de ITS1 de *C. paraguariense*, *C. coriaceum* y una de las especies del grupo externo, *Dioclea virgata*. Estas 3 especies presentaron un contenido de GC menor a 45 %.

Todas las especies presentaron la región conservada analizada salvo por las tres especies citada anteriormente y *Lupinus paraguariensis*, que mostraron la misma sustitución en el cuarto nucleótido.

No se encontró gran variabilidad en la energía libre óptima y subóptima de todas las secuencias salvo en la región ITS1 de *C. paraguariense* (Tablas 1 y 2).

A pesar de que *D. virgata*, *C. paraguariense* y *C. coriaceum* presentaron un contenido de GC menor al esperado y una sustitución en la región conservada, se incluyeron igualmente en el análisis por ser las únicas disponibles de esta especie.

Tabla 1. Características de las secuencias de ITS1: longitud (pares de bases), contenido de G + C (%), presencia de región conservada, energía libre (Kcal/mol) y números de estructuras secundarias.

Especie	**largo (pb)**	**G + C (%)**	**región conservada**	**ΔG óptimo (Kcal/mol)**	**ΔG subóptimo**	**Número de estructuras**
Austrosteenisia	256	55,08	SI (21)	112	106,4	11
Abrus	238	54,2	SI (21)	81,9	78,1	15
Canavalia	230	47,22	SI (21)	73,7	70,8	10

Lupinus	228	58,33	NO (21)	86	81,7	7
Macroptilium	227	65,64	SI (21)	98,9	94,6	11
Lonchocarpus	158	71,52	SI (21)	78	74,1	5
Dioclea	237	43,46	NO (21)	77,2	74,6	5
Millettia	222	58,11	SI (21)	79,4	76,3	5
C. paraguariense	230	43,48	NO (21)	65,4	63,1	6
G. sp. nov.	228	51,75	SI (21)	79,8	76	4
C. ellipticum	232	49,14	SI (21)	74,3	71,4	8
C. praeandinum	230	49,13	SI (21)	72,9	70,1	9
C. rubicundum	228	48,68	SI (21)	80,5	76,7	5
C. scarlatinum	232	48,71	SI (21)	78,9	75,3	12
C. aschersoniana	232	47,84	SI (21)	77,6	74,1	12
C. stenophylla	229	48,03	SI (21)	77,5	74	10
G. benthamiana	230	52,61	SI (21)	81	77,8	7
G. boavista	229	49,34	SI (21)	76,9	73,3	11
G. dubia	229	51,53	SI (21)	82,2	78,9	4
G. fiebrigiana	227	51,98	SI (21)	81,4	78,8	6
C. paraguariensis	232	48,28	SI (21)	81,7	78,4	9
C. argentina	229	48,47	SI (21)	77,1	73,6	11
G. jussiaeana	230	47,83	SI (21)	71,5	68,3	4
G. latisiliqua	222	52,7	SI (21)	79,7	76,7	4
G. longifolia	231	52,38	SI (21)	88,2	84	3
G. neesii	232	48,71	SI (21)	79,2	75,7	11
G. texana	229	49,34	SI (21)	80,9	77,8	7
G. striata	229	51,53	SI (21)	79,8	76	4
G. marginalis	232	47,84	SI (21)	80,1	76,1	11
G. martii	278	49,28	SI (21)	106,3	101,1	13
C. coccineum	251	47,62	SI (21)	91,3	87,1	3
C. coriaceum	244	44,26	NO (21)	85,7	-	1
C. cipoensis	267	48,69	SI (21)	100	95,4	12

G. lindenii	229	48,47	SI (21)	77,2	74	4

Tabla 2. Características de las secuencias de ITS2: longitud (pares de bases), contenido de G + C (%), energía libre (Kcal/mol) y números de estructuras secundarias.

Especie	**largo (pb)**	**G + C (%)**	**ΔG óptimo (Kcal/mol)**	**ΔG subóptimo**	**Número de estructuras**
Austrosteenisia	249	55,42	96,1	91,3	8
Abrus	228	53,95	84,4	80,5	5
Canavalia	235	46,38	77,5	74,1	5
Lupinus	217	58,99	82,6	78,5	16
Macroptilium	205	61,35	79,4	76,8	2
Lonchocarpus	228	63,16	88	83,6	9
Dioclea	229	48,91	81,6	77,6	8
Millettia	230	55,22	81,7	77,8	6
C. paraguariense	243	53,09	84,6	80,8	7
G. sp. nov.	231	54,55	77,6	73,8	13
C. ellipticum	235	54,47	80,7	77,6	7
C. praeandinum	236	54,66	80,3	76,5	8
C. rubicundum	232	53,45	74,8	71,1	11
C. scarlatinum	236	54,24	80,6	76,8	6
C. aschersoniana	237	55,7	84	80	7
C. stenophylla	235	54,89	82,2	78,1	10
G. benthamiana	228	54,82	78,6	75,2	6
G. boavista	226	53,54	79,7	76	5
G. dubia	229	54,15	74,7	71	10
G. fiebrigiana	229	53,28	72,9	79,4	11
C. paraguariensis	233	55,36	83,2	80,1	7
C. argentina	230	54,35	79,2	75,3	15
G. jussiaeana	236	56,36	79,9	76	16
G. latisiliqua	207	54,11	68,3	65,4	7
G. longifolia	236	57,63	81,8	77,8	12

G. neesii	234	53,42	73,2	69,6	14
G. texana	244	57,79	90,4	87,3	8
G. striata	221	55,2	74,7	71	9
G. marginalis	222	53,6	72,1	68,5	7
G. martii	280	52,5	92,4	87,8	22
C. coccineum	219	49,77	66,8	64	3
C. coriaceum	260	50,77	81,4	77,4	18
C. cipoensis	256	55,47	90,9	87,2	14
G. lindenii	260	52,69	90,5	86	13

Caracterización de secuencias del IGS *trn*L-F

La caracterización de las secuencias de IGS *trn*L-F se muestra en la tabla 3. Se determinó el largo y el contenido de GC. Los valores determinados se encuentran dentro de los esperados (Taberlet et al, 1995)

Tabla 3. Características de las secuencias del IGS *trn*L-F: largo (pares de bases) y contenido de G + C (%).

Especie	**largo (pb)**	**G + C (%)**
C. praeandinum	340	30
C. stenophylla	338	30,77
C. rubicundum	360	31,67
C. paraguariense	361	31,58
G. dubia	367	31,88
G. marginalis	360	31,94
G. jussiaeana	363	31,96
G. striata	363	31,68
G. sp. nov.	363	31,4
C. scarlatinum	363	31,68
G. neesii	361	31,86
G. longifolia	361	32,13
C. aschersoniana	361	32,13

G. fiebrigiana	364	32,14
G. latisiliqua	363	31,68
G. texana	362	31,77
G. benthamiana	363	31,96
C. argentina	361	31,58
C. paraguariesis	358	31,56
C. ellipticum	361	31,58
G. boavista	360	31,67
C. cipoensis	361	31,58
G. martii	361	31,86
C. coriaceum	372	31,45
C. coccineum	372	31,45
G. lindenii	362	32,32
Macroptilium	466	27,9
Lupinus	400	25,25

***Alineamiento y* gaps**

El alineamiento de las regiones ITS1, gen 5.8S e ITS2 resultó en una matriz de 772 caracteres y 34 taxones, de los cuales 26 corresponden al grupo interno y 8 al grupo externo. Se codificaron 8 gaps en una matriz que se adicionó a la matriz principal. De los 780 caracteres, 244 resultaron ser filogenéticamente informativos.

El alineamiento de la región IGS entre los genes trnL-F resultó en una matriz de 529 caracteres y 28 taxones, de los cuales 26 corresponden al grupo interno y 2 al grupo externo. Se codificó un único gap y dicha columna se agregó a la matriz principal. De los 530 caracteres, 23 resultaron informativos.

Secuencias del intrón *trn*L y de las dos regiones del gen *mat*K

Se amplificaron y secuenciaron las tres regiones de diez especies del grupo de estudio: *Camptosema rubicundum, C. praeandinum*, *C. scarlatinum*, *Galactia boavista*, *G. dubia*, *G. latisiliqua*, *G. marginalis*, *G. jussiaeana*, *Collaea stenophylla* y *C. paraguariensis.* El largo aproximado de las secuencias fue de 600 pb para el intrón *trn*L y la región codificante del gen *mat*K. El alineamiento de las secuencias produjo cuatro sitios filogenéticamente informativos para el intrón *trn*L y 2 para la región codificante del gen *mat*K.

Debido a la poca información obtenida de estas regiones se decidió no continuar con la secuenciación de las restantes especies y no se utilizaron en el análisis filogenético.

Búsquedas bajo pesos iguales

ITS

El análisis resultó en 4 árboles igualmente parsimoniosos de 814 pasos de longitud, CI = 0,52, RI = 0,668. El árbol de consenso estricto a partir de los 4 AMP presentó 823 pasos de longitud, CI = 0,514, RI = 0,66 (**Figura 1**).

En él surge un clado basal y con altos valores de soporte, formado por *Camptosema coccineum* y *Camptosema coriaceum.* Este clado resulta grupo hermano de *Camptosema paraguariense*, el que a su vez surge como basal del gran clado con las restantes especies del complejo.

Dentro del mismo hay un clado menor con *Camptosema rubicundum* y *Galactia marginalis*, el que está fuertemente apoyado (95 JK, 5 BS) y el cual resulta hermano de un clado mayor con las restantes especies estudiadas. Las relaciones dentro de este último clado no están completamente resueltas. La mayoría de las especies de *Galactia* Sect. Odonia (*G. fiebrigiana, G. dubia, G. latisiliqua, G. dimorphophylla, G. longifolia, G. benthamiana* y *G. striata*) se encuentran formando parte de un subclado fuertemente apoyado (100 JK 10 BS). *Galactia texana*, también de la sección Odonia, se encuentra formando parte de un clado menor junto a *Galactia lindenii* (único representante de la sección Galactia). *Camptosema ellipticum*, *Camptosema praeandinum* y *Galactia boavista* se encuentran formando un clado bien apoyado (JK 91 BS 3) que resulta grupo hermano de otro con *Camptosema scarlatinum*, *Galactia neesii*, *Galactia martii* y todas las especies de *Collaea* (**Figura 1).**

trnL-F

El análisis de la matriz de datos de trnL-F resultó en 3 árboles más parsimoniosos (AMP) de 34 pasos de longitud, CI= 0,824 RI= 0,867. El árbol de consenso estricto resultó de 36 pasos de longitud , CI= 0,778, RI= 0,822. (**Figura 2).**

Los datos de *trn*L-F proveen muy poca información para revolver las relaciones entre las especies del complejo. *Camptosema paraguariense* es la especie que se encuentra más basal y surge como grupo hermano de un clado con las restantes especies. Dentro de este clado, que no posee buenos vgalores de soporte, surge un clado menor con *Camptosema coccineum* y *Camptosema coriaceum.* Este subclado, que en análisis de los datos de ITS surgía como el más basal, resulta grupo hermano de un gran clado con poca resolución y bajo soporte. Dentro

del mismo, surge un subclado con *Camptosema rubicundum* y *Galactia marginalis*, otro con la mayoría de las especies de *Galactia* y un tercero con 4 de las 5 especies de *Collaea*. (Figura 2). Aunque la mayoría de los clados resultantes del análisis de los datos de ITS no surgen de este análisis, tampoco se encuentran contradichos por los datos. Un ejemplo es el comportamiento de *Collaea cipoensis* que no surge con las restantes especies del género en un clado. Cuando se realiza una nueva búsqueda forzando la monofilia de este grupo, la longitud del árbol resultante no aumenta ya que no existen sinapomorfías que soporten dicho nodo.

Análisis combinado

El análisis resultó en 4 AMP de 851 pasos de longitud, CI= 0,53 RI= 0,673. El árbol de consenso estricto resultó de 860 pasos, CI= 0,524, RI= 0,665 (Figura 3).

La topología del árbol de consenso resultante del análisis simultáneo de ambas matrices es igual a la obtenida en el árbol de consenso del análisis de la matriz de datos de ITS. Los valores de soporte encontrados para la mayoría de los clados varían levemente, siendo en algunos casos superiores, como es el caso del clado que contiene a las especies de *Collaea* (JK=68 y BS=2) (Figura 3)

Búsquedas bajo pesos implicados

ITS

El análisis de los datos de ITS con los tres valores de constante de concavidad (K= 3,5 y 7) resultó en un único árbol más parsimonioso, de Fit= 52,91, CI= 0,518, RI= 0,666. Se obtuvo la misma topología en las tres búsquedas. Los resultados se discuten para K=7.

El árbol está completamente resuelto y se reconocen los mismos clados presentes en el análisis bajo pesos iguales (Figura 4).

trnL-F

En el análisis de la matriz de datos trnL-F se obtuvieron tres árboles igualmente parsimoniosos, con cualquiera de las constantes analizadas, de Fit=1, CI= 0,824, RI= 0,867. El árbol de consenso estricto para K=7 posee exactamente la misma topología que el de consenso estricto bajo pesos iguales (Fit=1,285, CI= 0,778, RI= 0,822) (Figura 5).

Análisis combinado

En el análisis combinado, se obtuvo un único árbol más parsimonioso con las distintas constantes evaluadas. La topología es muy similar a la obtenida en el análisis de los datos de ITS bajo pesos implicados, excepto por algunos cambios en la posición relativa de algunos taxones: *Camptosema paraguariense* se encuentra en una posición más basal con respecto al clado de *C. rubicundum* y *G. marginalis* (Figura 6).

Búsquedas con distintos costos de transformación

ITS

El análisis de los datos de ITS con costos de transformación TV/TS: 2/1 resultó en 4 árboles más parsimoniosos (L=1115, CI= 0,52, RI= 0,65). El árbol de consenso estricto (L= 1118, CI= 0,52, RI= 0,65) posee mayor resolución en la base del clado mayor comparado con el de pesos iguales. Sin embargo los subclados recuperados son idénticos, salvo por la posición relativa de algunos terminales de *Galactia* sección Odonia (Figura 7).

En el análisis con costos de transformación TV/TS: 4/1 se obtuvieron 3 árboles más parsimoniosos (L=1705) y el de consenso fue de 1712 pasos. Con los costos TV/TS: 8/1 se obtuvieron 3 árboles más parsimoniosos (L= 2881)y el consenso fue de 7 pasos más largo. Con ambos costos se recupera la misma topología que con costos 2/1, salvo por la baja resolución en la base del clado mayor y en el subclado compuesto por *G. martii*, *G. neesii* y las especies de *Collaea* (Figura 8).

trnL-F

El análisis de la matriz trnL-F con costos TV/TS: 2/1 resultó en 5 árboles igualmente parsimoniosos de L= 50, CI= 0,82, RI= 0,871. El árbol de consenso estricto L= 52, CI= 0,78, RI=0,84, muestra casi la misma topología que en los análisis bajo pesos iguales, salvo por la ausencia del clado con *C. rubicundum* y *G. marginalis*. Con los análisis utilizando costos 4/1 y 8/1 se obtuvo la misma topología del árbol de consenso que en los análisis bajo pesos iguales.

Análisis combinado

El análisis de la matriz combinada con costos TV/TS: 2/1 resultó en 2 árboles de 1172 pasos de longitud, CI= 0,538, RI= 0,664. El árbol de consenso estricto (L= 1173, CI= 0,537, RI= 0,663) recupera todos los clados principales presentes en los análisis bajo pesos iguales, y presenta mayor resolución en el clado mayor.

Con costos TV/TS 4/1 y 8/1 se obtuvieron 2 árboles más parsimoniosos de 1796 Y 2418 pasos respectivamente. El árbol de consenso fue en ambos casos de un paso más largo. En dichos árboles de recupera la misma topología que para los costos TV/TS 2/1 (Figura 9).

Al comparar la topología obtenida en los árboles de consenso de los análisis bajo costos 4/1 y 8/1 con el de la matriz de ITS para los mismos costos (Figura 8), estos presentaron mayor resolución en la base del clado más terminal con las especies de *Collaea*, *Camptosema scarlatinum*, *Galactia neesii* y *G. martii* (Figura 9).

Para los costos 8/1 los valores de soporte de Bremer y Jacknife para el consenso son similares, a veces un poco mayores, comparados con los soportes del árbol de consenso para pesos iguales. La resolución de G. jussiaeana como grupo hermano del clado con la mayoría de las especies de *Galactia* sección Odonia presenta buenos valores de soporte (BS=9, JK=72).

No se encontraron grandes variaciones en cuanto a las topologías obtenidas con los tres costos de transformación analizados en comparación con el consenso obtenido bajo pesos iguales.

Tanto en la matriz de ITS como en la combinada analizada con los distintos costos de transformación, *Galactia* y *Camptosema* no surgen como monofiléticos. *Collaea* es el único que resulta monofilético en la matriz combinada, aunque con bajos valores de soporte (BS=2, JK= 58) (Figura 9).

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Búsquedas con pesos iguales

El análisis resultó en 4 árboles más parsimoniosos (L= 155, CI= 0,37, RI= 65). El árbol de consenso estricto (L= 165) se muestra en la figura 10. El mismo árbol con las sinapomorfías comunes a los 4 árboles más parsimoniosos se muestra en la figura 11.

En el árbol de consenso surge un clado basal compuesto por *G. boavista* (Secc. Collaearia), *Camptosema praeandinum* y *G. lindenii* (Secc. Galactia). Este clado está apoyado por una única sinapomorfía: margen del fruto recto, y resulta hermano de un clado mayor con las restantes especies del grupo de estudio. En este clado mayor, *G. jussiaeana* se encuentra en una posición más basal y luego se diferencian dos subclados: uno compuesto por la mayoría de las especies de *Galactia* de la sección Galactia y que presenta muy poca resolución. Las especies en este clado comparten dos apomorfías: las aurículas del estandarte vestigiales o ausentes y margen del fruto recto. Salvo por la presencia de *G. texana* y *G.*

marginalis, las restantes especies se recuperan también en un clado en el análisis de los datos moleculares.

En el otro subclado se encuentran las restantes especies de *Camptosema*, *G. neesii* y *G. martii* (Secc. Odonia) y todas las especies de *Collaea*. *C. paraguariense* se ubica en una posición basal y resulta grupo hermano de 2 suclados: uno con las restantes especies de *Camptosema*, que presenta bajos valores de soporte (BS=2, JK= 53) y las sinapomorfías son: lóbulo del cáliz triangular, ápice de la quilla recto, estilo no geniculado y semilla de color uniforme. Dentro de este se distingue un clado con soporte moderado (BS=3, JK= 75) con *Camptosema coriaceum* y *Camptosema coccineum* quienes comparten las siguientes apomorfías: hábito subarbustivo, folíolos coriáceos, estandarte no reflejo en la antesis, disco del gineceo cónico y fruto recto. Este subclado también se recupera en el análisis de datos moleculares, aunque surge en una posición basal.

El otro subclado incluye a *G. neesii* (Secc. Odonia), que resulta grupo hermano de *G. martii* (Secc. Odonia) y esta a su vez resulta grupo hermano del clado terminal con las especies de *Collaea*. La relación de *G. martii* como grupo hermano de las especies de *Collaea* surge también en el análisis de datos moleculares. *G. martii* comparte con las especies de *Collaea* las siguientes apomorfías: folíolos oblongos, estandarte orbicular y legumbre recta.

El género *Collaea* surge como monofilético de la misma forma que en el análisis molecular, con valores de soporte mayores (BS=8; JK=94). Las sinapomorfías que apoyan al grupo son: el hábito subarbustivo, la longitud del pecíolo, la ausencia de estipelas, inflorescencia de menor tamaño que la hoja adyacente, las yemas estrobiliformes, el largo de los pedicelos, la pubescencia del estandarte y la presencia de áreas callosas en el estandarte. Aunque no presenta buena resolución en su base, el subclado con *C. argentina, C. paraguariensis* y *C. cipoensis* posee altos valores de soporte (BS=4, JK=90). La cercana relación entre estas 3 especies también surge del análisis molecular.

Análisis bajo pesos implicados

El análisis de los datos con el valor de concavidad K=3 produjo 2 árboles más parsimoniosos (Ci=0,365, RI= 0,643). Con los valores K=5 y K=7 se obtuvo un único árbol más parsimonioso (CI=0,37, RI=0,65). Las topologías recuperadas en los dos últimos análisis son iguales entre sí (Figura 12) y similares a las del análisis con pesos iguales aunque los subclados presentan mejor resolución y los valores de soporte son más altos

Aunque las hipótesis de relaciones entre las especies de *Camptosema* son diferentes a las inferidas en el análisis de datos moleculares, el análisis morfológico, bajo pesos iguales o

implicados, tampoco apoya la monofilia de los géneros *Galactia* y *Camptosema*. El análisis forzando la monofilia de *Galactia* produce árboles de 16 pasos más largos, mientras que al forzar la monofilia de *Camptosema* se obtienen árboles de 6 pasos más largos.

Algunos clados no se recuperan en este análisis. La estrecha relación entre *Camptosema rubicundum* y *Galactia marginalis* inferida a partir del análisis de datos moleculares, no surge en este análisis ya que *C. rubicundum* se encuentra en un subclado junto a *C. ellipticum*. Tampoco se recupera el clado formado por *C. ellipticum*, *C. praeandinum* y *G. boavista*. Sin embargo, *G. boavista* y *C. praeandinum* surgen en un mismo clado en ambos análisis, pudiéndose inferir que esta especie se encuentra más cercanamente relacionada a *G. lindenii* (en análisis morfológico) o a *G. boavista* (molecular) que a cualquier otra especie de *Camptosema*.

Tanto la posición de *Camptosema praeandinum* como la de *C. paraguariense* en el análisis morfológico dejan a *Camptosema* como no monofilético. La misma observación es válida para la sección Odonia de *Galactia* con las posiciones de *G. jussiaeana*, *G. neesii* y *G. martii*.

EVOLUCIÓN DE CARACTERES

Los caracteres morfológicos se optimizaron sobre la topología obtenida del análisis bajo pesos implicados (con K=7) de la matriz combinada de datos moleculares.

A continuación se discute la evolución de algunos de ellos:

Raquis (carácter 1). Los grupos más basales están caracterizados por la presencia de raquis en las hojas. Su ausencia se infiere como estado derivado, quedando restringido al clado con *G. martii* y las especies de *Collaea* aunque pudo haber sido adquirido independientemente en *G. boavista* y *G. neesii*.

Tipo de inflorescencia (carácter 11). El estado derivado de este carácter (racimo umbeliforme/corimbiforme) es consistente con la hipótesis de relación de *G. martii* con las especies de *Collaea* que se infiere del análisis molecular. Dada la optimización ambigua en la base del clado más terminal, no es posible inferir correctamente su evolución en *G. neesii* y *C. scarlatinum*.

Brácteas florales (carácter 12). El estado derivado de este carácter (presencia de brácteas formando estróbilos) evoluciona una única vez y es consistente con la topología molecular en donde *Collaea* surge como monofilético (Figura 14). Este es uno de los caracteres utilizado tradicionalmente para definir al género.

Largo de los pedicelos (carácter 18). Los pedicelos más cortos (menores a 7 mm) caracterizan a los grupos más basales del árbol. Todas las especies de *Galactia* y *Camptosema* también presentan este estado. El carácter evoluciona una única vez hacia el estado intermedio (pedicelos entre 7 y 15 mm) en 2 especies de *Collaea*. Los pedicelos más largos (entre 15 y 30 mm) se encuentran en las especies de *Collaea* mas terminales. La evolución de este carácter ocurre en forma ordenada a pesar de no haber sido codificado de esa forma.

Forma del cáliz (carácter 21). La forma campanulada surge como estado basal en el árbol y luego evoluciona independientemente tres veces en el clado formado por *C. coriaceum* y *C. coccineum*, en *C. rubicundum* y en *C. ellipticum*, demostrando ser un carácter altamente homoplásico.

Indumento del estandarte (carácter 25).
La pubescencia en el tercio superior de la lámina se infiere como estado ancestral para el árbol. Sin embargo dentro del grupo interno, el estado glabro surge como basal y la pubescencia se adquiere en clados terminales. Dentro del grupo de estudio, el carácter evoluciona dos veces hacia el estado pubescente en el tercio superior de la lámina: en *G. lindenii* y el clado formado por *G. boavista* y *C. praeandinum*. La pubescencia en toda la lámina surge independientemente dos veces, en *C. ellipticum* y en el clado con las especies de *Collaea*.

Aurículas del estandarte (carácter 30). El estado que surge como basal es la ausencia de aurículas. La presencia es adquirida independientemente dos veces en el complejo genérico: en *G. marginalis* y en el clado formado por la mayoría de las especies de *Galactia* de la sección Odonia.

Tipo de androceo (carácter 35).
El androceo pseudomonadelfo se infiere como estado ancestral. El androceo diadelfo surge en *G. marginalis,* en el clado con *G. texana* y *G. lindenii*, en *G. boavista* y en el clado con la

mayoría de las especies de *Galactia* sección Odonia. El clado terminal con las especies de *Collaea, C. scarlatinum, G. martii* y *G. neesii*, presenta androceo pseudomonadelfo. Debido a la optimización ambigua en los nodos centrales, no es posible inferir claramente su evolución.

ANÁLISIS COMBINADO

Los conjuntos de datos moleculares (matriz combinada de ITS e IGS *trn*L-F) y morfológicos no son incongruentes (P= 0,1667) de acuerdo al test de ILD.

Análisis con pesos iguales

Cuando se analizan bajo pesos iguales, la matrices de datos morfológicos y moleculares combinadas produjeron 8 árboles más parsimoniosos (L= 1052, CI= 0,48, RI= 0,63). El árbol de consenso (L=1058) se muestra en la **figura 13**.

Análisis con pesos implicados

El análisis con pesos implicados con los 3 valores de constante de concavidad (K=3, 5 y 7) produjo en todos los casos un único árbol más parsimonioso (CI=0,48, RI=0,43). La topología resultó idéntica con los tres valores (Figura 14). El árbol presenta mayor definición en su base comparado con el consenso de pesos iguales. Difiere también por la ubicación de *G. jussiaeana* , que no resulta grupo hermano del clado con G. texana y *G. lindenii*. La posición relativa del clado con *C. ellipticum, C. praeandinum* y *G. boavista* es más basal que en análisis con pesos iguales.

En el análisis de la matriz combinada con pesos implicados (Figura 14) se recuperan los mismos clados principales que en el análsis de la matriz de datos moleculares (Figura 6), aunque la posición relativa de algunos es distinta (*G. texana* y *G. lindenii*) y (*C.ellipticum*, *C. praeandinum* y *G. boavista*).

Así como en el análisis de la matriz de datos moleculares, los resultados obtenidos no apoyan la monofilia de *Galactia* y *Camptosema*. Para lograr la monifilia en el análisis con pesos iguales se necesitan árboles de 31 y 37 pasos más largos respectivamente. Asimismo, *Collaea* resulta monofilético. En este análisis combinado, los valores de soporte resultan bastante más altos que en el análisis de datos moleculares (JK=100, BS=9) (Figura 13).
Un resumen de los resultados se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Presencia/ausencia de los principales grupos en los análisis bajo distintas condiciones.

	C. coriaceum *C. coccineum*	*C. rubicundum* *G. marginalis*	Mayoría de *spp.* *Galactia* Secc. Odonia	*C. ellipticum* *C. praeandinum* *G. boavista*	*Collaea*
ITS P iguales	SI	SI	SI	SI	SI
ITS P implicados (K7)	SI	SI	SI	SI	SI
ITS tv/ts = 8/1	SI	SI	SI	SI	NO
IGS *trn*L P iguales	SI	SI	SI	NO	NO
IGS *trn*L P implic.	SI	SI	SI	NO	NO
Molec P iguales	SI	SI	SI	SI	SI
Molec P implic. (K7)	SI	SI	SI	SI	SI
Molec tv/ts = 8/1	SI	SI	SI	SI	SI
Morfo P iguales	SI	NO	SI	NO	SI
Morfo P implic. (K7)	SI	NO	SI	NO	SI
Combinado P iguales	SI	SI	SI	SI	SI
Combinado P implic.	SI	SI	SI	SI	SI

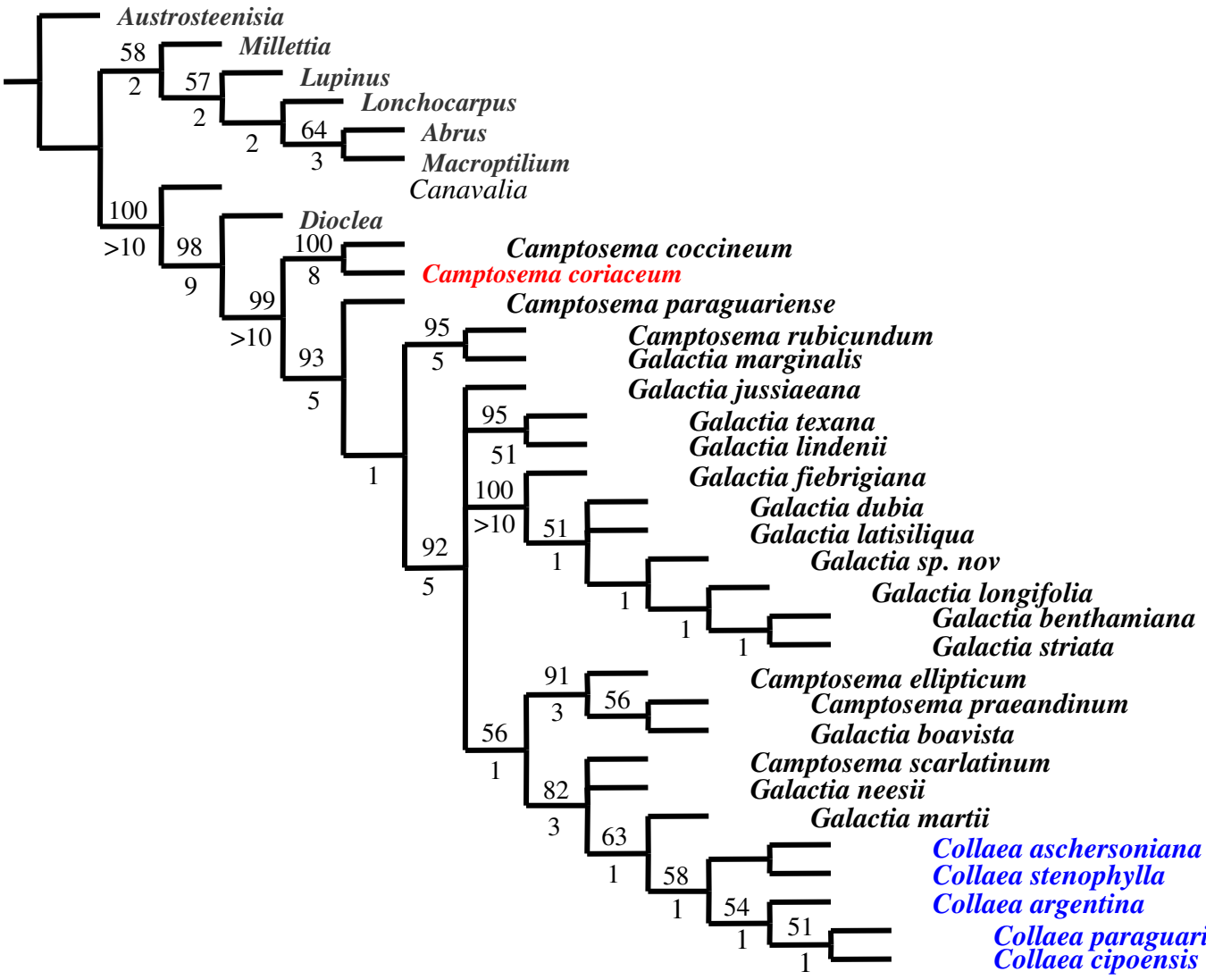


Figura 1. Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis de datos del ITS con pesos iguales. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

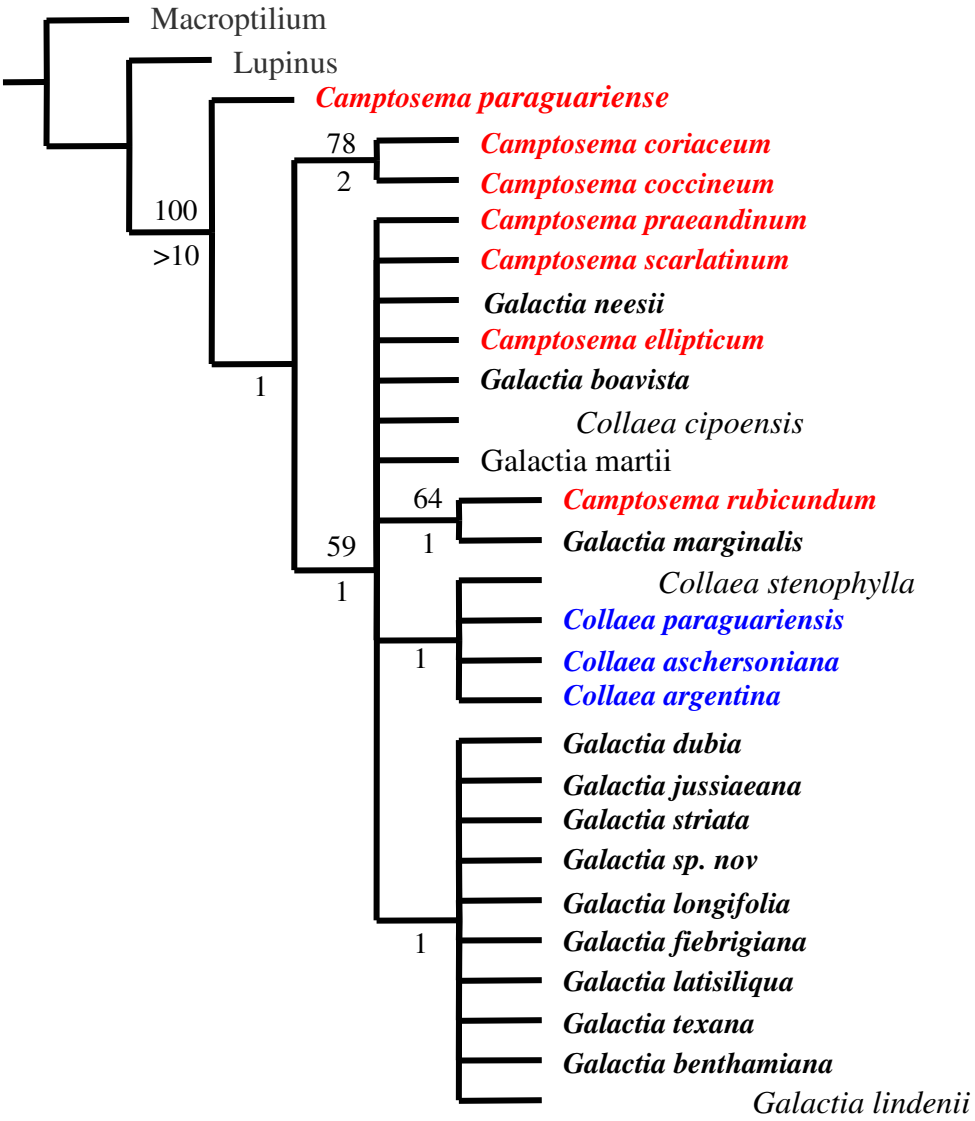


Figura 2. Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis de datos del IGS trnL-F con pesos iguales. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

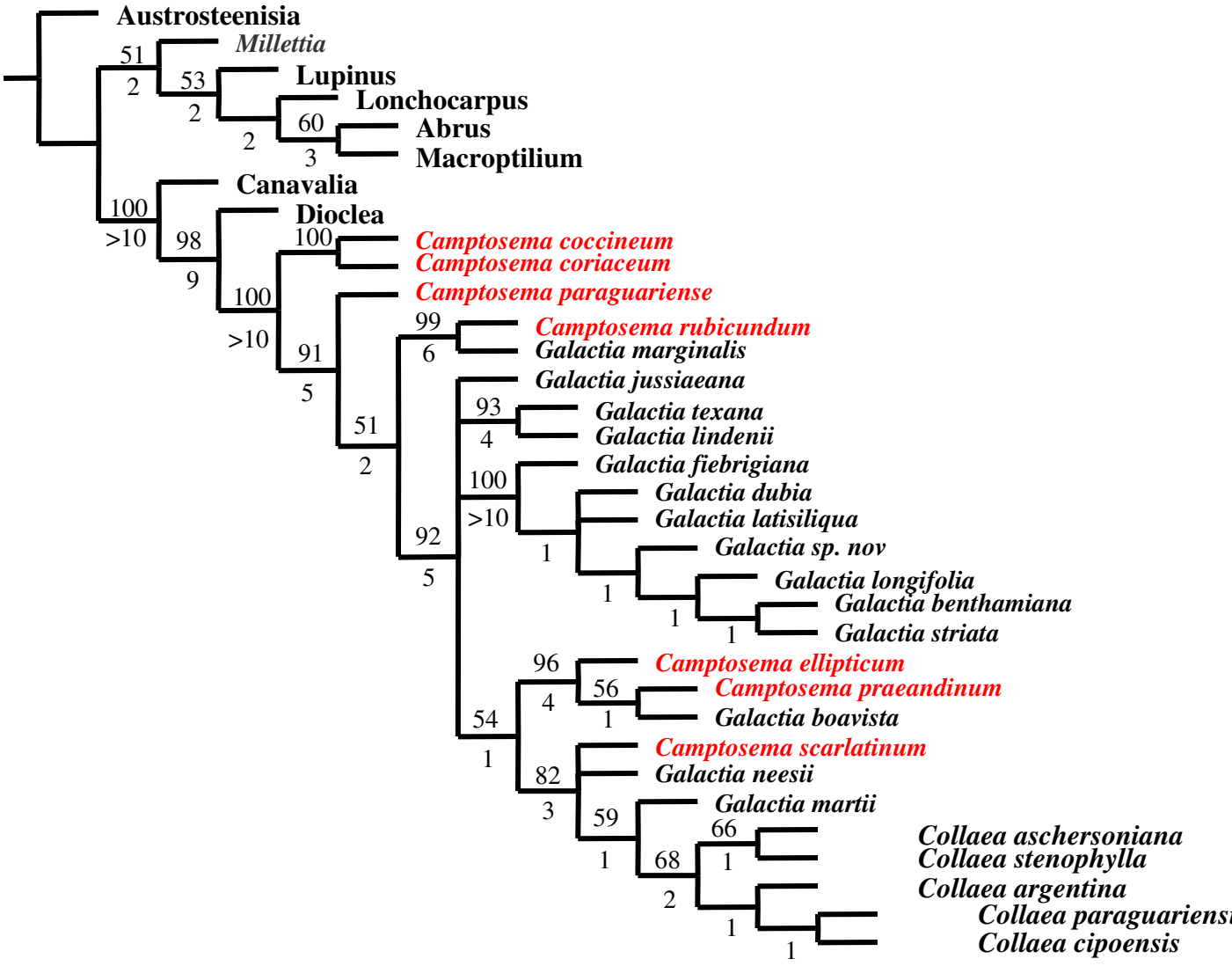


Figura 3. Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis de datos moleculares combinados (ITS + IGS trnL-F) con pesos iguales. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

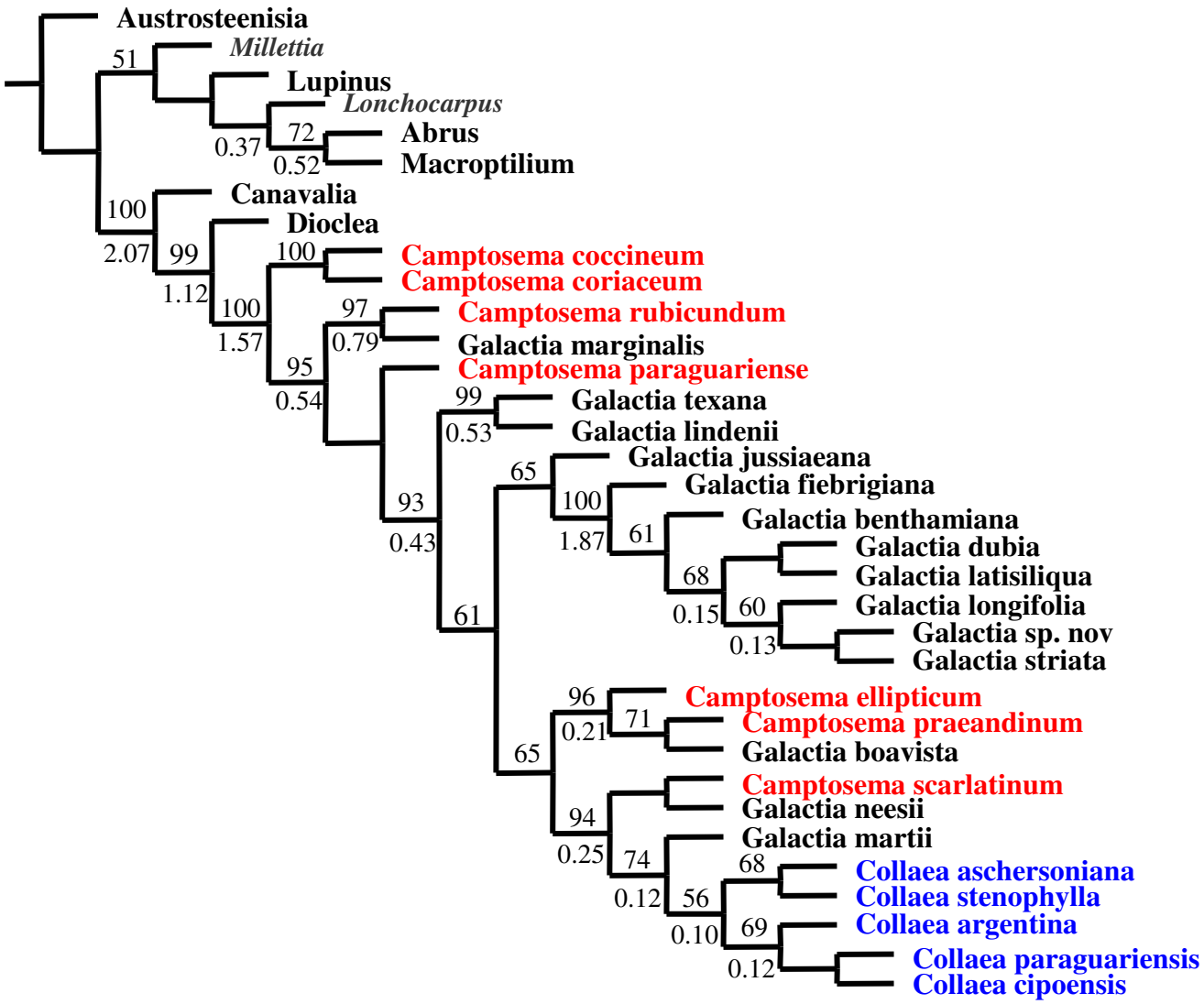


Figura 4. Único árbol más parsimonioso obtenido en el análisis de datos del ITS con pesos implicados (K = 7). Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

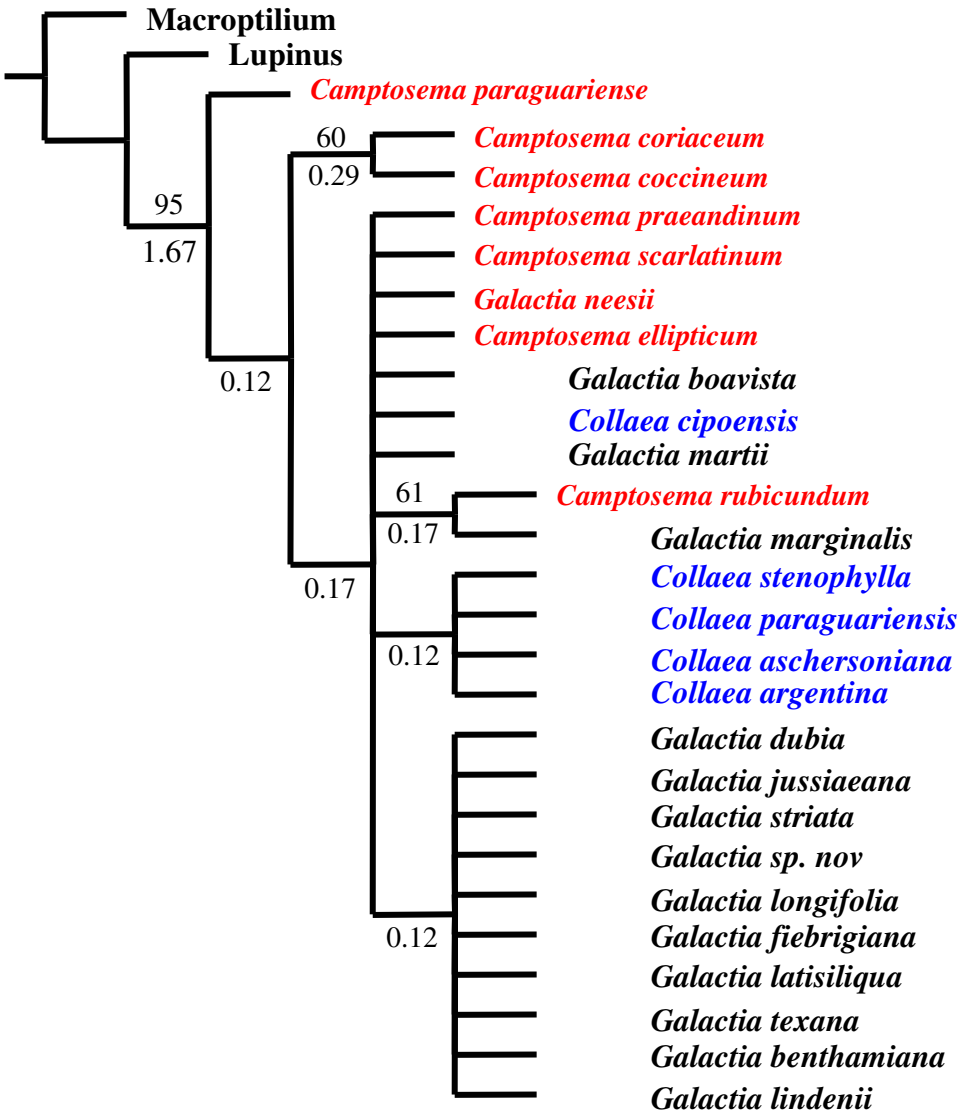


Figura 5. Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis de datos del IGS trnL-F con pesos implicados (K = 7). Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

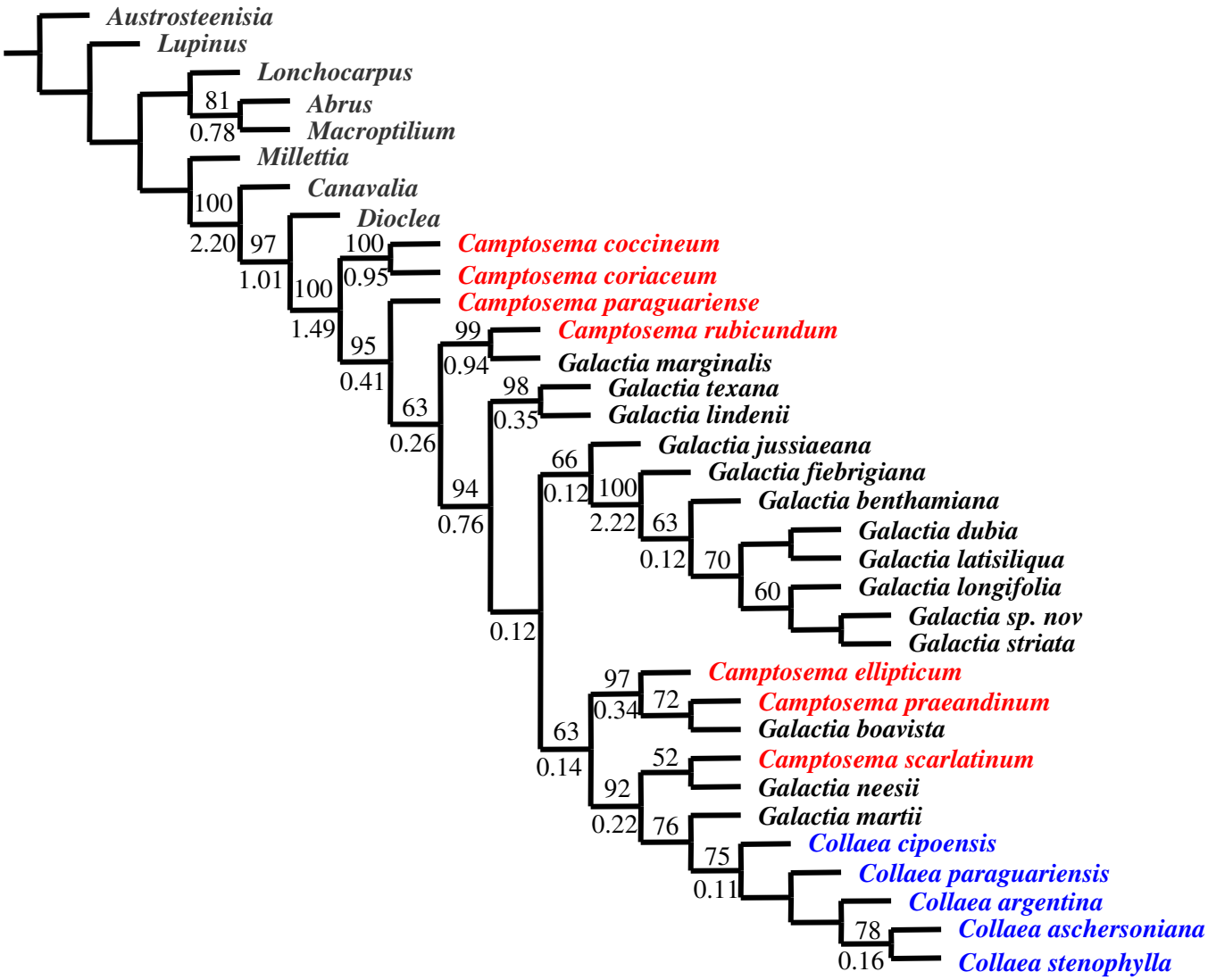


Figura 6. Único árbol más parsimonioso obtenido en el análisis de datos moleculares combinados (ITS + IGS trnL-F) con pesos implicados (K = 7). Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

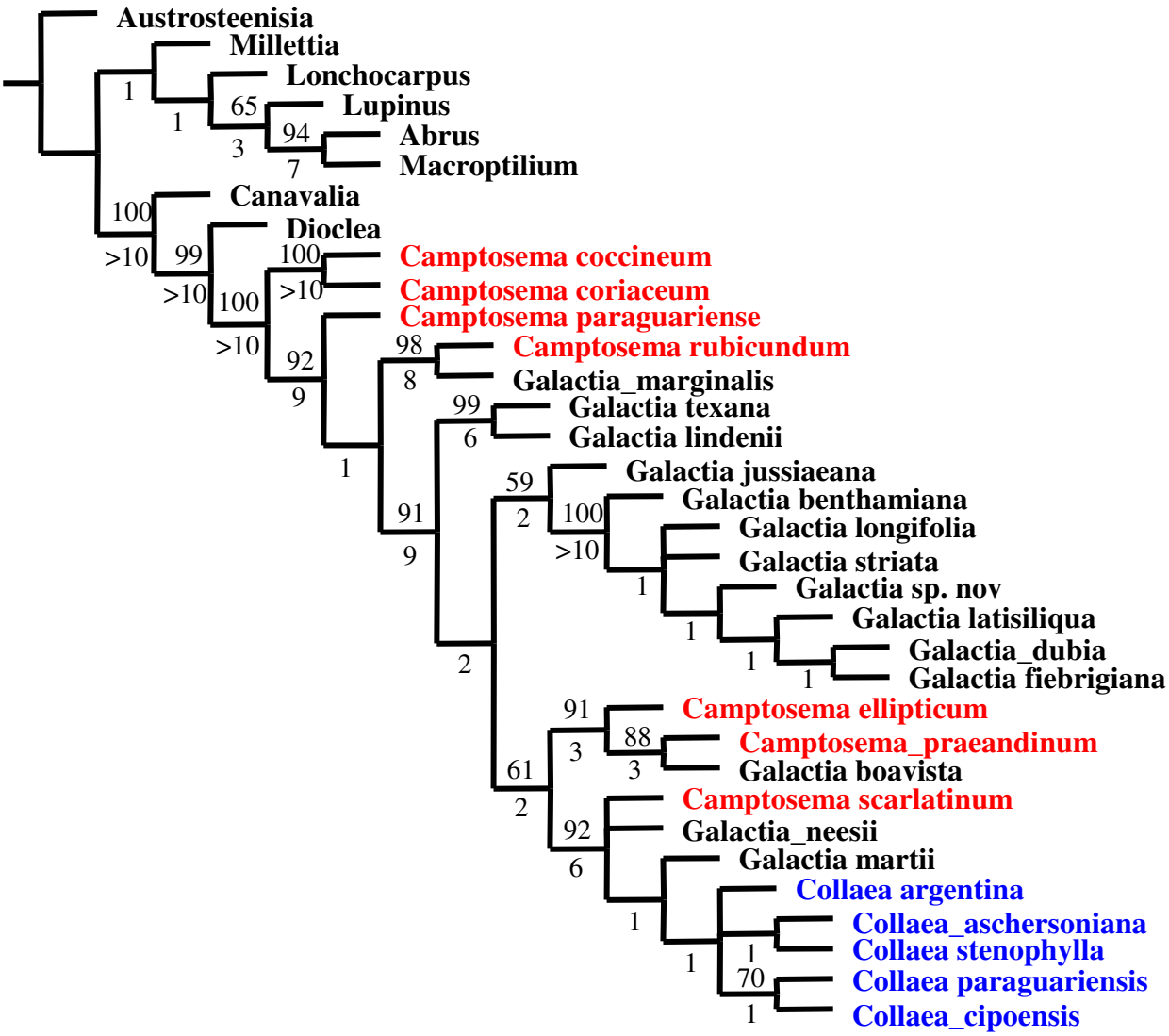


Figura 7. Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis de datos del ITS con costos de transformación TV/TS = 2/1. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

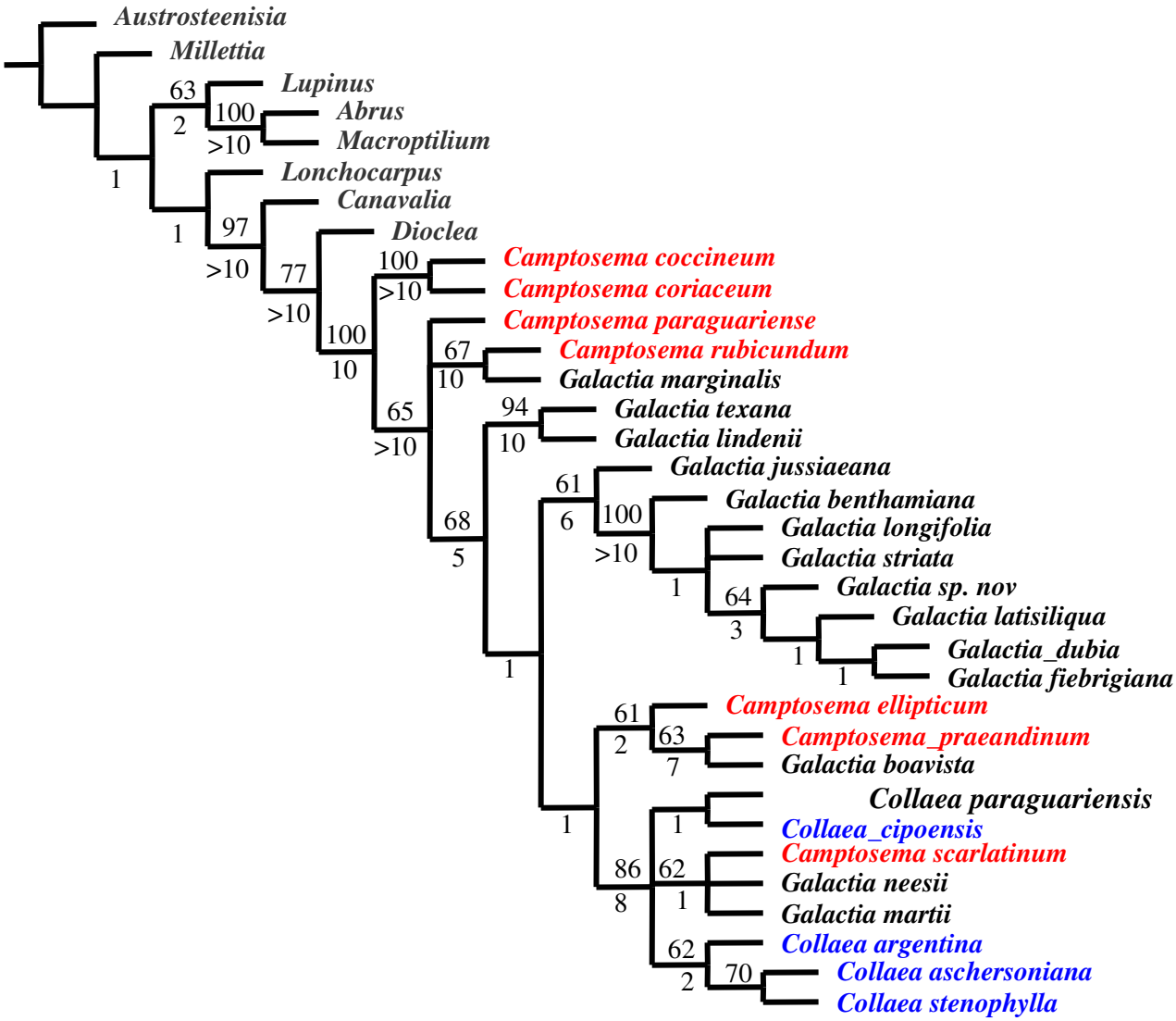


Figura 8. Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis del ITS con costos TV/TS = 8/1. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

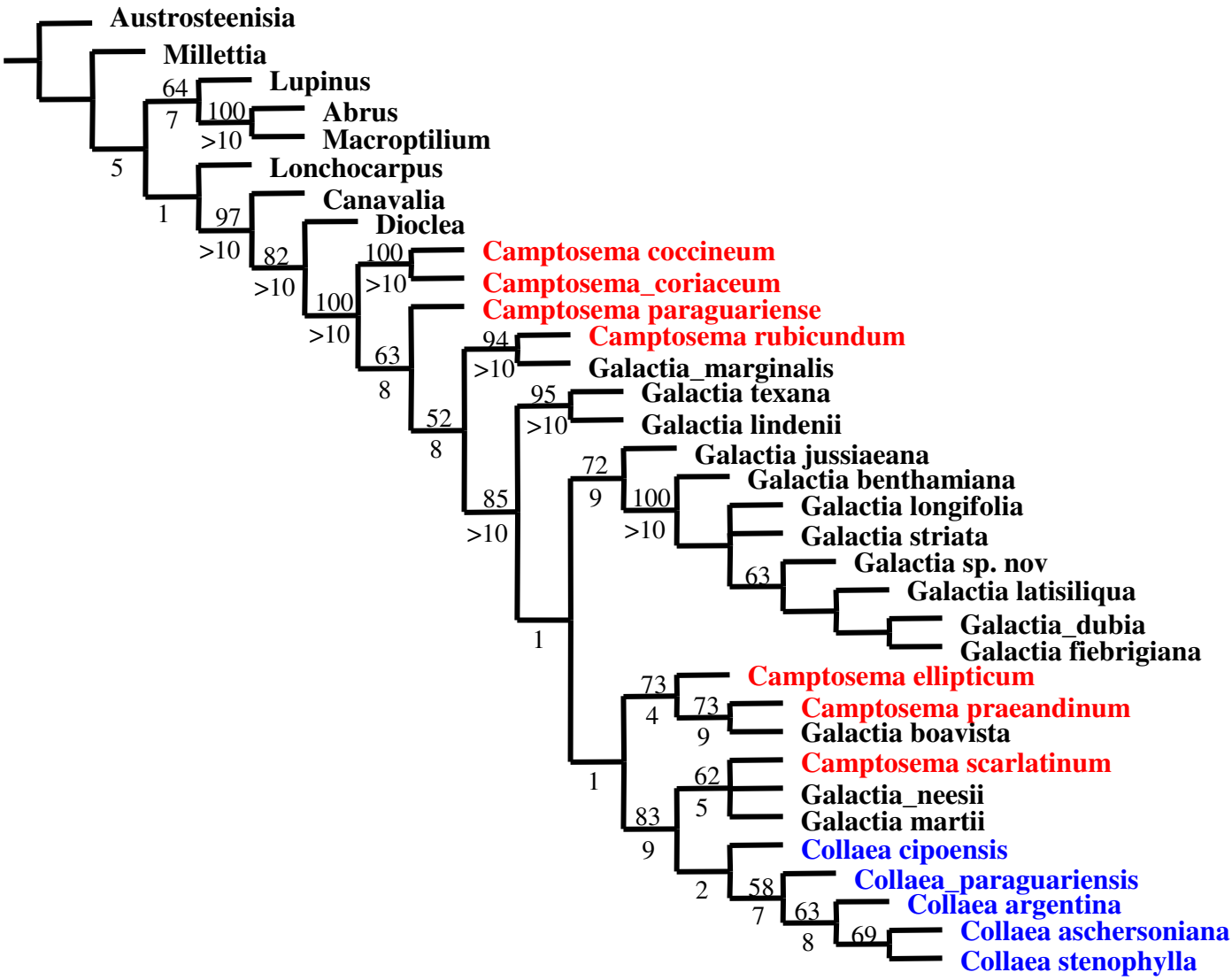


Figura 9. Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis los datos moleculares combinados con costos TV/TS = 8/1. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

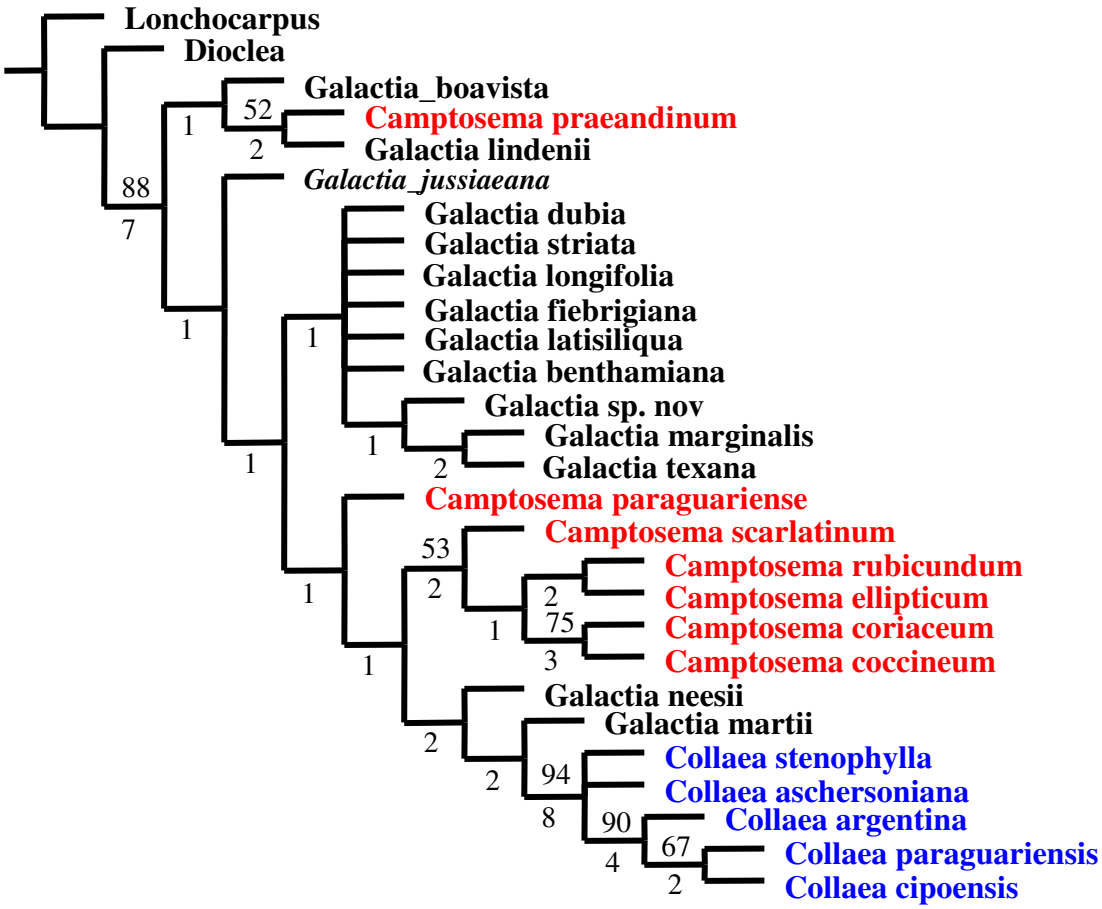


Figura 10. Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis de datos morfológicos con pesos iguales. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

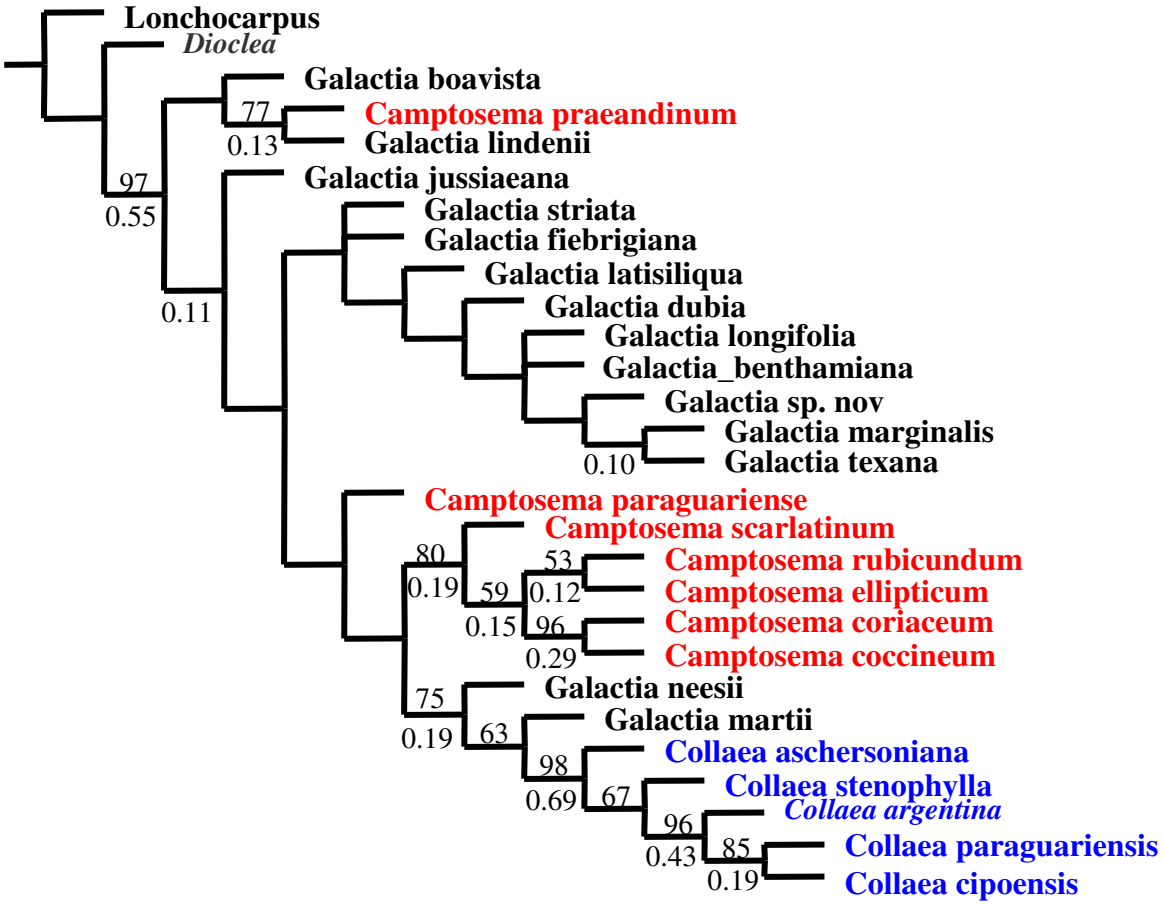


Figura 11. Único árbol más parsimonioso obtenido en el análisis de datos morfológicos con pesos implicados (K = 7). Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

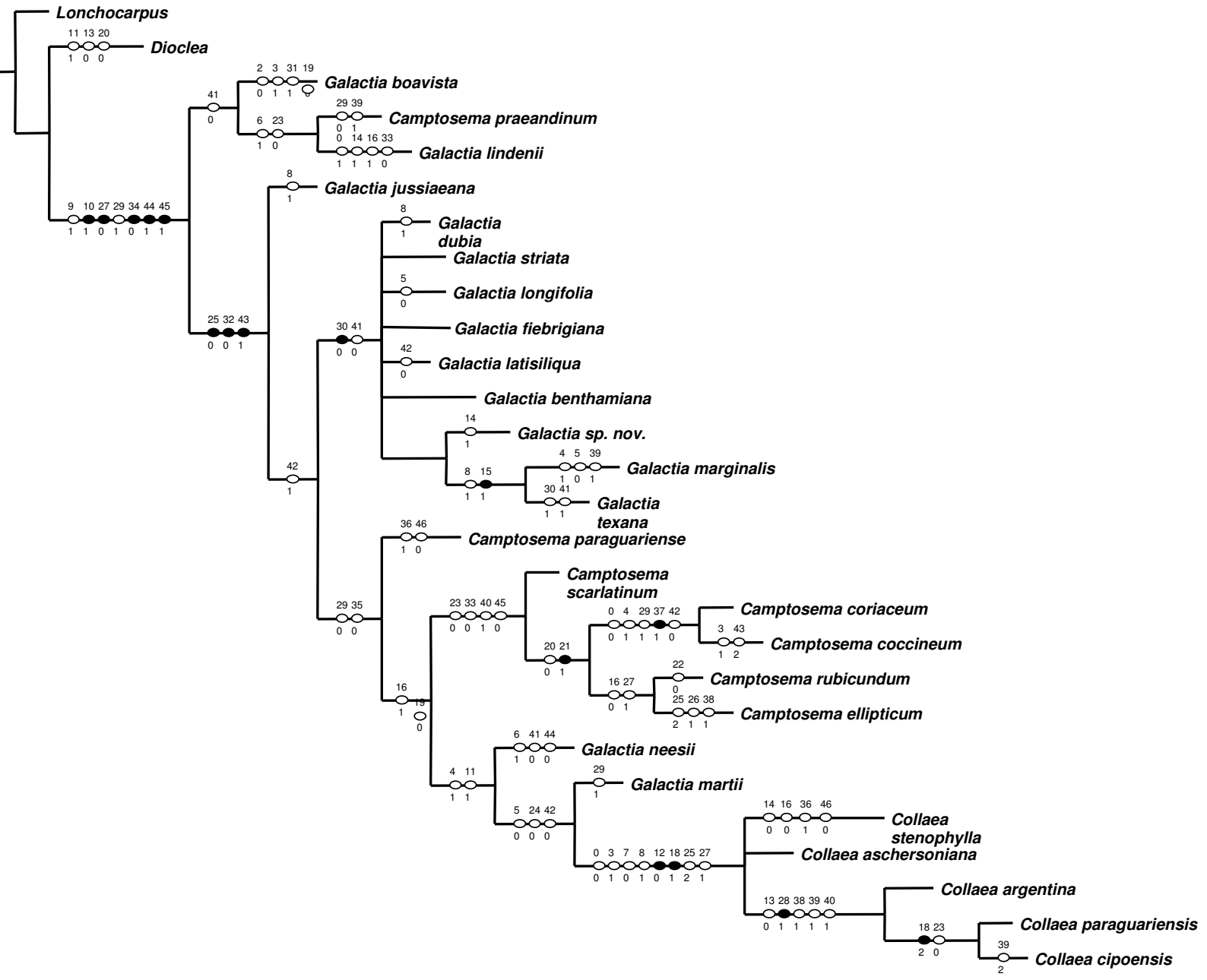


Figura 12. Sinapomorfías comunes a los 4 árboles más parsimoniosos obtenidos en el análisis de datos morfológicos con pesos iguales. Los números de los caracteres (ver lista en materiales y métodos) se encuentran sobre el nodo y los números por debajo corresponden a los estados. En negro: apomorfías. En blanco: homoplasias.

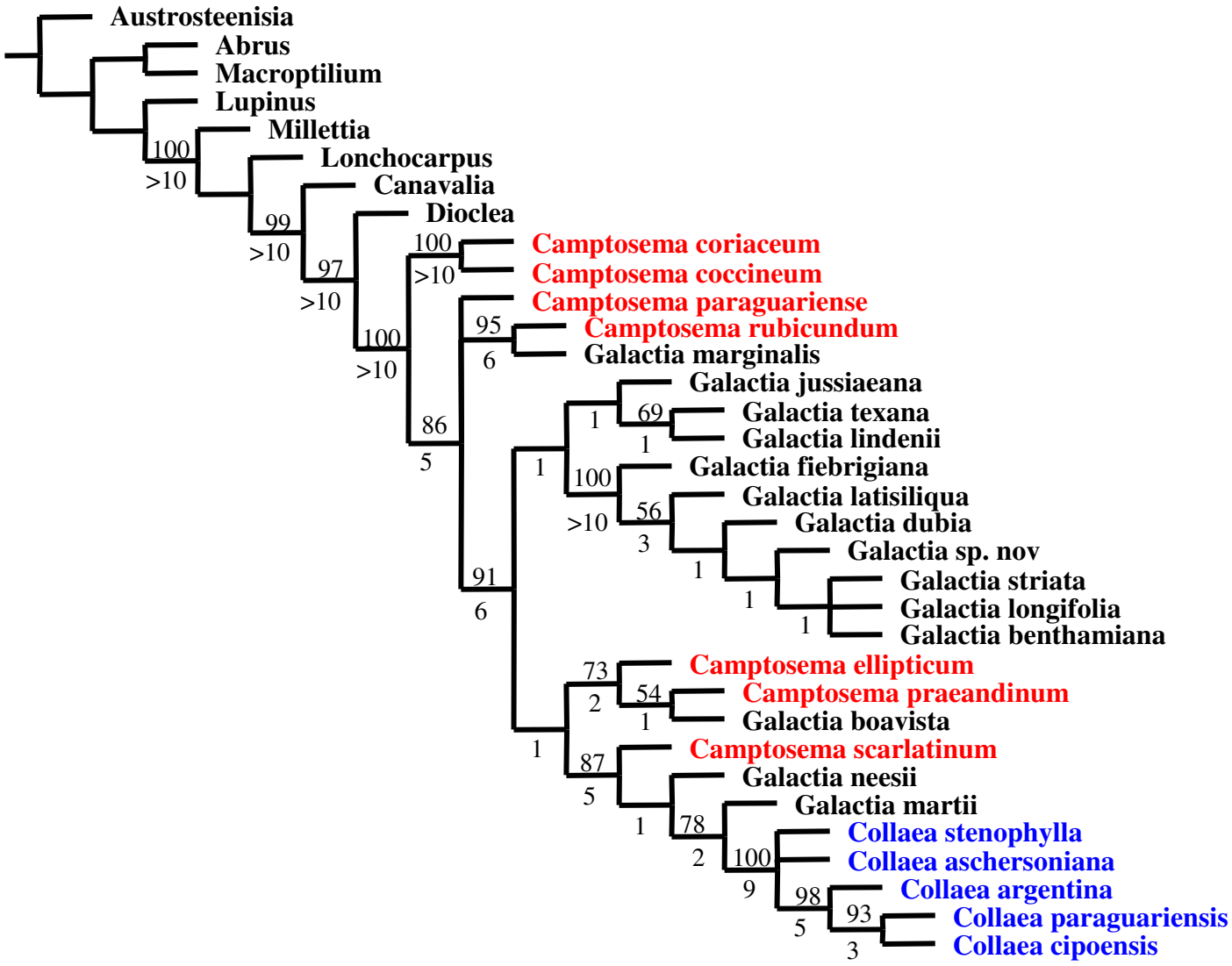


Figura 13. Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis de datos combinados (morfológicos y moleculares) con pesos iguales. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

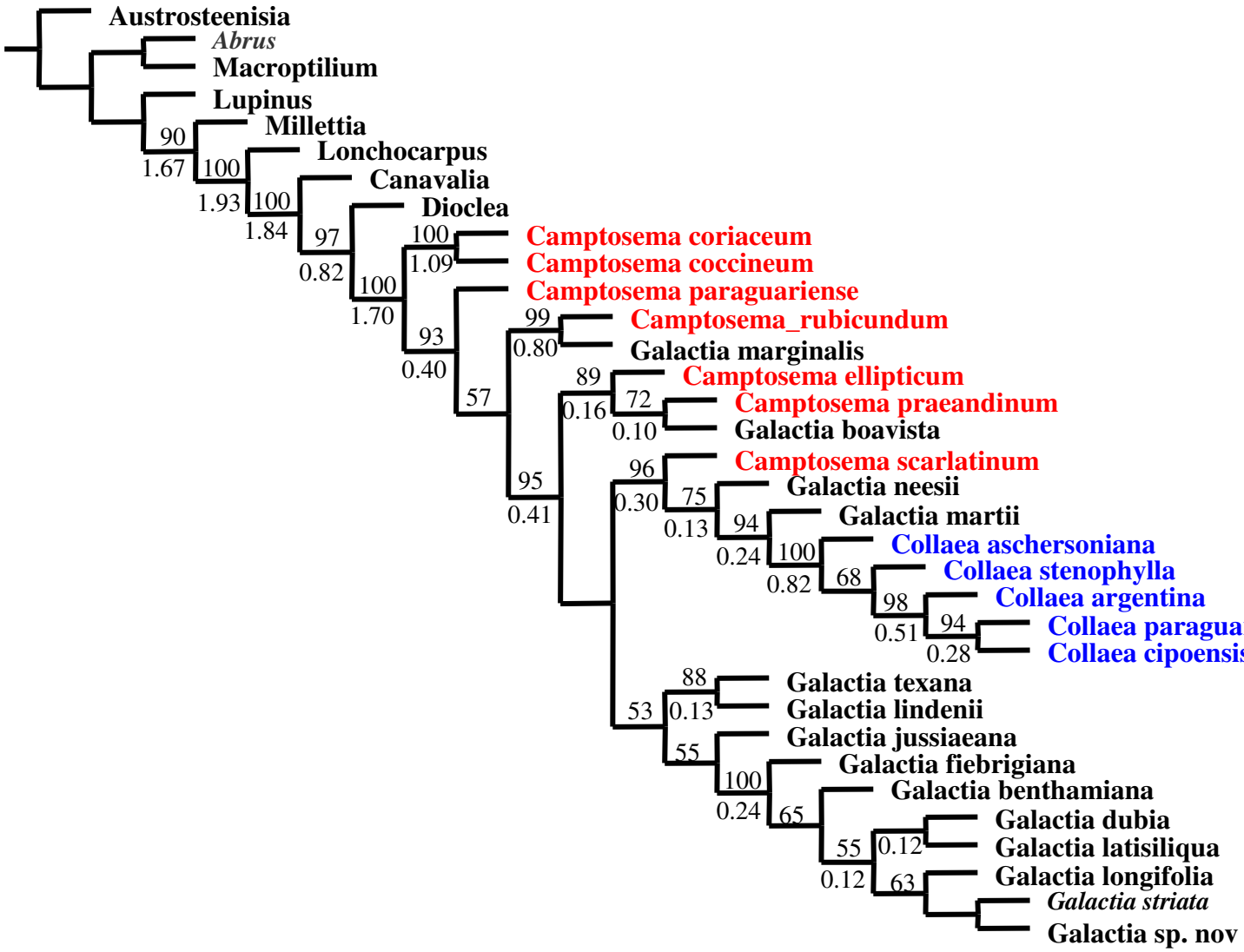


Figura 14. Único árbol más parsimonioso obtenido en el análisis de datos combinados (morfológicos y moleculares) con pesos implicados. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo de los nodos respectivamente.

DISCUSIÓN

Las hipótesis filogenéticas resultan robustas ya que se mantiene básicamente la misma topología variando las estrategias de búsqueda.

En los análisis con pesos iguales, los caracteres morfológicos produjeron mayor cantidad de homoplasia que los caracteres moleculares (CI=0,35, RI=0,62 y CI=0,53, RI= 0,67) respectivamente.

El soporte de los principales clados en el análisis morfológico mejora sensiblemente bajo pesos implicados. Esto no sucede al analizar la matriz de datos moleculares con las mismas condiciones de búsqueda.

Los principales clados que resultan del análisis molecular se recuperan en el análisis combinado. Sin embargo la topología producida en el análisis morfológico varía notablemente con respecto a las anteriores en cuanto a las relaciones inferidas entre las especies de *Camptosema*. A pesar de esta diferencia, se recuperan los restantes dos clados principales, uno con la gran mayoría de las especies de *Galactia* secc. Odonia y el de *Collaea*.

El género *Collaea*, en su actual circunscripción, está bien apoyado tanto por la evidencia morfológica como molecular. En el análisis combinado, el clado presenta un soporte de Jackknife de 100 y el valor de soporte de Bremer indica que el clado se mantiene en árboles de hasta 9 pasos más largos. Con respecto a la relación entre las especies del género, *C. argentina*, *C. paraguariensis* y *C. cipoensis* surgen siempre en un clado bien apoyado tanto en el análisis combinado como en el morfológico y en el molecular con pesos iguales. Estos resultados corroboran la hipótesis previa sobre la estrecha relación entre estas especies basada en el análisis taxonómico de su exomorfología: *C. cipoensis* comparte con *C. paraguariensis* la longitud del pedicelo y la forma y el ancho de los folíolos. *C. argentina* solo se diferencia de *C. paraguariensis* y *C. cipoensis* por el menor tamaño de la flor y de los pedicelos(García, 1989); (Fortunato, 1995). En el análisis morfológico, las tres especies de este clado poseen siete sinapomorfías (ver resultados).

Con respecto a las restantes dos especies de *Collaea*, *C. aschersoniana* y *Collaea stenophylla*, surgen en un mismo clado sólo en el análisis molecular. En el análisis morfológico con pesos implicados y en el combinado surgen como grupos hermanos. En el análisis combinado con pesos implicados, *C. stenophylla* surge como grupo hermano del clado con *C. cipoensis*, *C. argentina* y *C. paraguariensis*, aunque en los otros análisis su relación con las restantes especies de *Collaea* no es clara. *C. stenophylla*, como se discutió en el capítulo morfológico, es la única representante del género que presenta caracteres

particulares. Su pertenencia al género está bien apoyada por la evidencia morfológica y molecular. Hooker & Arnold (1832) señalaron la necesidad de fundar un nuevo género con esta especie (*Platystylus*), mientras que Bentham (1859) la consideró dentro de la sección Platystylus del género *Collaea*. Burkart (1970) sólo reconoció al género sin distinción en secciones.

Aunque la especie tipo, *C. speciosa*, no se incluye en el presente análisis, es posible que dadas las evidencias sobre las relaciones entre las distintas especies junto con el análisis exomorfológico, deba reconsiderarse la división en secciones del género.

El concepto tradicional de los géneros *Galactia* y *Camptosema* corresponde a grupos artificiales.

La monofilia del género *Galactia* no es apoyada por ninguno de los datos en el presente análisis. Este resultado es congruente con los análisis filogenéticos de De Queiroz *et al* (2004) y Maxwell & Taylor (2004), basados en caracteres morfológicos, en donde *Galactia* resulta polifilético.

A pesar de esta condición artificial, es posible encontrar en *Galactia*, algunos grupos bien apoyados por la evidencia de datos combinados: por ejemplo, existe una estrecha relación entre *G. fiebrigiana*, *G. latisiliqua*, *G. dubia*, *G. sp. nov.*, *G. striata*, *G. longifolia* y *G. benthamiana*, todas especies pertenecientes a la sección Odonia. La monofilia de esta sección tampoco está apoyada por los datos. Aunque las especies de la sección Odonia utilizadas por De Queiroz *et al* (*op. cit.*) no son las mismas que en el presente trabajo, los autores tampoco encontraron a esta sección monofilética.

En todas las topologías derivadas de las distintas búsquedas, las especies *G. martii* y *G. neesii*, no resultan nunca en el mismo clado de especies de la sección Odonia. Ambas se encuentran más cercanamente relacionadas a las especies de *Collaea*. De Queiroz *et a*l (*op. cit*.) también encuentran a *G. martii* y *G. neesii* cercanamente relacionadas y nunca en un mismo clado con las especies de la sección Odonia.

En el análisis morfológico, *G. neesii* y *G. martii* comparten con las especies de *Collaea* las apomorfías: consistencia coriácea de los folíolos y el racimo umbeliforme. En el análisis combinado bajo pesos implicados, la relación de *G. martii* como grupo hermano de las especies de *Collaea* está fuertemente apoyado.

No fue posible poner a prueba la monofilia de la sección Collaearia, dado que se incluyó una única especie de esta sección, *G. boavista*. Se observó que *G. boavista* se encuentra siempre formando parte de un mismo clado junto a *C. praeandinum*. Este clado surge en los análisis (molecular y combinado) como grupo hermano de *C. ellipticum*. En el análisis

morfológico, *G. boavista* surge como grupo hermano de un clado formado por *G. lindenii* (sección Galactia) y *C. praeandinum*. *G. boavista* y *C. praeandinum* comparten algunos caracteres exomorfológicos, como por ejemplo el hábito y la presencia de indumento en la corola, siendo este último considerado diagnóstico de la sección Collaearia. Aunque los ejemplares de la sección Collaearia analizados en el trabajo de De Queiroz *et al.* (*op. cit*.) son distintos a los del presente trabajo, los autores encuentran que *G. glauscescens* (secc. Collaearia) resulta grupo hermano de un clado con *C. praeandinum* y *C. ellipticum* en algunos de sus análisis.

La hipótesis de monofilia del género *Camptosema* no está apoyada por los resultados de los análisis aquí presentados. Aunque en el análisis morfológico resulta un grupo natural con la mayoría de las especies, la posición de *C. praeandinum* y *C. paraguariense*, dejan a *Camptosema* polifilético. Según se discute en el párrafo anterior, *C. praeandinum* se encuentra más cercanamente relacionada a *G. boavista*. En el análisis combinado, estas dos especies se encuentran formando un clado con *Camptosema ellipticum* fuertemente soportado. Esta última especie presenta indumento en la corola, de la misma forma que *C. paraeandinum* y *G. boavista*.

De Queiroz *et al* (op. cit.) encuentran a *C. ellipticum* y *C. praeandinum* cercanamente relacionadas. Esta relación es congruente con lo observado por Burkart (1970) quien señala que son especies afines.

Por su parte, *C. scarlatinum*, en los análisis combinado y molecular, surge en un mismo clado con *G. martii*, *G. neesii* y las especies de *Collaea*. Este clado tiene valores de soporte alto en todos los casos. En el análisis de De Queiroz *et al.* (op.cit.) *C. scarlatinum* tampoco surge en un mismo clado con otras especies de *Camptosema*. Esta especie, como ya se discutió en el capítulo morfológico, es conflictiva en cuanto a su ubicación taxonómica. A pesar de que está actualmente incluída en *Camptosema*, posee caracteres tales como:la forma campanulada del cáliz, el tamaño de las flores, la forma de los pétalos y el estilo incurvo, que no comparte con *Camptosema s.s.*

Camptosema coriaceum y *Camptosema coccineum* resultan en un clado bien soportado en todos los análisis. Salvo en el análisis morfológico, la posición del mismo dentro del grupo es basal. La ubicación de estas especies en *Camptosema* no constituye ningún problema taxonómico, ya que ambas presentan todos los caracteres citados como diagnósticos para el género. Sin embargo, salvo en el análisis morfológico, no se encuentran cercanamente relacionadas a *C. rubicundum*, especie tipo. Este resultado es congruente con el de De Queiroz *et al* (*op.cit*.). Este clado surge como grupo hermano de *C. paraguariense*, que

también se ubica en una posición basal, salvo en el análisis morfológico. Esta especie, como *C. scarlatinum* y *C. praeandinum*, tampoco presenta todos los caracteres diagnósticos del género. De Queiroz *et al* (*op.cit*.)., en su análisis del género, también encuentran a *C. paraguariense* como grupo hermano de la mayor parte de especies de *Galactia* y *Collaea*.

Por último, el clado que surge en la mayoría de los análisis con *C. rubicundum* y *G. marginalis*, no tiene explicación a nivel morfológico y tampoco había sido sugerida por otros autores. La única característica morfológica que comparten estas dos especies es la presencia de ovario estipitado. Esta relación merece un análisis más profundo, que incluya otras especies de *Galactia* con caracteres exomorfológicos similares a *G. marginalis*, como por ejemplo *G. gracillima* y *G. pretiosa*.

Una posible solución para la resolución del problema taxonómico de este complejo, y que sea consistente con los resultados del presente análisis cladístico, sería considerar a todo el grupo como un único género. La evidencia morfológica como los resultados de este estudio, sugieren que debería irse en esta dirección cuando se considera a *Galactia* y a *Camptosema*. Sin embargo, *Collaea*, tal cual su circunscripción actual, resulta ser un grupo monofilético fuertemente apoyado por los datos morfológicos y moleculares.

La hipótesis filogenética que surge del presente trabajo, es un avance en el reconocimiento de grupos bien apoyados por distintas fuentes de evidencia. Esta hipótesis no representa "la verdadera filogenia", ya que los cladogramas obtenidos pueden reverse a la luz de nuevos datos o de la reinterpretación de las hipótesis de homología. Sin embargo, el análisis aquí realizado constituye una base objetiva para determinar cambios en la nueva clasificación.

CAPÍTULO IV

AFLP

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, la utilización de marcadores moleculares como los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)(Vos *et al*., 1995) en estudios sistemáticos se ha incrementado rapidamente. Las prinpipales características ventajosas de este método son: a su alta reproducibilidad, el alto número de polimorfismos generados y el hecho de que no se requieren conocimientos previos sobre el genoma.

La aplicación de esta técnica fue exitosa en la evaluación de la diversidad y las relaciones genéticas en distintas variedades *Prunus armeniaca* y sus especies relacionadas (Hagen *et al*., 2002), en poblaciones *de Populus nigra* (Winfield *et al*., 1998), en especies de *Oxalis* (Tosto & Hopp, 2000), de *Ilex* (Gottlieb *et al*., 2005), en *Solanum* (Mace *et al*., 1999), *Cichorium* (Kiers *et al*., 2000), y en la resolución de problemas taxonómicos en *Solanum* Secc. Petota (Kardolus *et al*., 1998),en *Lactuca* (Koopman *et al*., 2001) y en el género *Veronica* (Martínez-Ortega *et al*., 2004), entre otros.

La técnica de AFLP (Vos *et al*., 1995), utiliza los métodos de digestión enzimática y amplificación por PCR, para detectar variabilidad combinando la presencia o ausencia de sitios de restricción y la existencia de polimorfismos de secuencia adyacente a esos sitios. Se basa en la restricción del ADN gencon dos enzimas, una de corte poco frecuente, como *Eco*RI (que reconoce una secuencia de 6 bases) y otra, con una frecuencia más alta, como la *Mse*I (que reconoce una secuencia de 4 nucleótidos). Una vez generados los fragmentos, estos son ligados a adaptadores doble cadena cuyo diseño es exclusivo de cada uno de los sitios de restricción obtenidos. De esta manera se obtienen fragmentos de ADN de secuencia desconocida pero con sus extremos conocidos, lo que posibilita su amplificación por medio de la técnica de PCR. Los fragmentos que se obtienen son de tres tipos según los extremos agregados:

- ambos extremos con sitios *Eco*RI;
- ambos extremos con sitios *Mse*I
- con extremos distintos.

En general el número de fragmentos obtenidos es muy grande, dependiendo de la complejidad del genoma, e imposible de analizar en una sola corrida electroforética. Para disminuir la complejidad del patrón de bandas se realiza una segunda amplificación mediante PCR con *primers* selectivos los cuales poseen tres o dos bases nucleotídicas adicionales en el extremo 3´. Luego, los fragmentos producidos se separan mediante electroforesis vertical en

geles de poliacrilamida que se tiñen con nitrato de plata o bien se utiliza marcación radiactiva. También pueden evidenciarse en sistemas de secuenciación nucleotídica automática marcados con fluorocromos.

Algunas de las principales características de este tipo de marcadores son: su capacidad para evaluar distintas regiones del genoma simultáneamente en una única reacción de PCR y su alta reproducibilidad debido a la exigente temperatura de hibridación durante la PCR.

La asignación de homologías entre bandas del mismo tamaño puede ser errónea si la divergencia taxonómica existente entre los OTU analizados es grande. Una gran proporción de fragmentos no homólogos puede resultar en altos niveles de homoplasia entre los genotipos y puede conducir a errores en la reconstrucción del árbol, ya sea por métodos de agrupamiento o de parsimonia (Koopman, 2005).

En el presente trabajo se analizarán las relaciones genéticas entre individuos del complejo genérico *Galactia- Camptosema- Collaea*. No se espera que existan problemas en la asignación de homologías, dada la cercana relación entre las especies de los distintos géneros,

OBJETIVOS

- Establecer si los grupos delimitados morfológicamente pueden ser discriminados mediante los patrones de bandas de AFLP
- Estudiar las relaciones genéticas entre los individuos de las especies del complejo genérico Galactia- Camptosema- Collaea y explorar el grado de variación intra- e interespecífica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las especies utilizadas en el análisis se listan a continuación. La primera columna indica el número de OTU en la matriz.

# de OTU	Especie	Localidad	Voucher
	Galactia		
1	*G. jussiaeana*	Venezuela	Fortunato (BAB)
2	*G. latisiliqua*	Argentina. Formosa: 28 km al E de Ing. Juárez	Fortunato 6785 (BAB)
4	*G. latisiliqua*	Argentina. Formosa: 12 km al S de Las Lomitas	Fortunato 6840 (BAB)
6	*G. latisiliqua*	Argentina. Formosa: 9,9 km al SE de Pozo del Tigre	Fortunato 6861 (BAB)
7	*G. latisiliqua*	Argentina. Entre Ríos: Pque. San Carlos	Sede SC1 (BAB)
8	*G. latisiliqua*	Argentina. Entre Ríos: Pque. San Carlos	Sede SC4 (BAB)
9	*G. latisiliqua*	Argentina. Entre Ríos: Pque. San Carlos	Sede SC5 (BAB)
10	*G. latisiliqua*	Argentina. Entre Ríos: Pque. San Carlos	Sede SC3 (BAB)
11	*G. latisiliqua*	Paraguay. Boquerón: Proyecto Tagua	Luckow 4500 (FCQ)
12	*G. latisiliqua*	Argentina. E. Ríos: cerca de Nueva Escocia	Fortunato 7527 (BAB)
13	*G. latisiliqua*	Paraguay. Alto Paraguay: Pque. Def.del Chaco	Mereles 8935 (FCQ)
15	*G. latisiliqua*	Paraguay. Alto Paraguay: Fortín Patria	Pérez 7550 (FCQ)
16	*G. latisiliqua*	Argentina. Salta: 3,6 km al O de Orán	Fortunato 7855 (BAB)
17	*G. latisiliqua*	Argentina. Entre Ríos: Pque. San Carlos	Sede SC6 (BAB)
18	*G. fiebrigiana var sericophylla*	Argentina. Corrientes	Fortunato 7665 (BAB)
20	*G. fiebrigiana var sericophylla*	Argentina. Salta	Fortunato 7190 (BAB)
21	*G. fiebrigiana var fiebrigiana*	Argentina. Salta: Las Huertas	Fortunato 8167 (BAB)
22	*G. fiebrigiana var correntina*	Argentina. E. Ríos: Santa Ana	Fortunato 7894 (BAB)
23	*G. fiebrigiana var fiebrigiana*	Argentina. Tucumán: Tafí del Valle	Sede 10 (BAB)
24	*G. fiebrigiana var fiebrigiana*	Argentina. Tucumán: Tafí del Valle	Sede 12 (BAB)
25	*G. striata*	Argentina. Entre Ríos: Pque. San Carlos	Sede SC2 (BAB)
26	*G. striata*	Paraguay. Boquerón	Zardini 40035 (AS)
27	*G. sriata*	Argentina. Misiones: Pque. Teyú Cuaré	Sede 9 (BAB)
29	*G. sriata*	Argentina. Misiones: 1,2 km al E de Cerro Corá	Fortunato 7992 (BAB)
30	*G. sriata*	Argentina. Misiones: 3,8 km al N de 25 de Mayo	Fortunato 8050 (BAB)
31	*G. dubia*	Argentina. Salta: 1,3 km al SO de La Silleta	Fortunato 7170 (BAB)
32	*G. texana*	Paraguay	Luckow 4483 (FCQ)
33	*G. texana*	Argentina. Salta	Fortunato 7577 (BAB)
34	*G. texana*	Argentina. Formosa	Fortunato 6745 (BAB)
35	*G. marginalis*	Argentina. Salta: 14 km al S de Guachipas	Fortunato 7185 (BAB)
36	*G. marginalis*	Argentina. E. Ríos: Ao. Quebracho y RP 2	Fortunato 7908 (BAB)
361	*G. marginalis*	Argentina. Misiones	Greppi 106 (BAB)
37	*G. neesii*	Argentina. Corrientes	Fortunato 8060 (BAB)

38	*G. boavista* (secc. Collaearia)	Argentina. Corrientes: 7 km al SE de Gob.Virasoro	Fortunato 7544 (BAB)
39	*G. boavista*	Argentina. Misiones: camino al Pque. Teyú Cuaré	Sede 4 (BAB)
40	*G. boavista*	Argentina. Misiones: Pque. Teyú Cuaré	Sede 7 (BAB)
41	*G. boavista*	Argentina. Misiones: San Ignacio	Fortunato 8023 (BAB)
42	*G. boavista*	Argentina. Corrientes: Sto. Tomé. RP 94.	Fortunato 8072 (BAB)
43	*G. boavista*	Paraguay. Canindeyú: Reserva Nat. Mbaracayú	Sede 60 (FCQ)
44	*G. boavista*	Paraguay. Canindeyú: Reserva Nat. Mbaracayú	Sede 65 (FCQ)
45	*G. benthamiana*	Argentina. E. Ríos: campo del INTA	Fortunato 7886 (BAB)
45	*G. benthamiana*	Paraguay. Canindeyú: Reserva Nat. Mbaracayú	Sede 68 (FCQ)
47	*G. sp. nov.*	Argentina. Corrientes: 7 km al SE de Gob. Virasoro	Fortunato 7539 (BAB)
48	*G. sp. nov*	Argentina. Corrientes	Fortunato 7552 (BAB)
49	*G. sp. nov*	Argentina. Corrientes: RP 37 a 3,2 km de RP 94	Fortunato 8071 (BAB)
50	*G. benthamiana*	Argentina. Corrientes: 2,6 km al sur de Garruchos	Fortunato 8065 (BAB)
51	*G. benthamiana*	Argentina. Corrientes: RP 37 a 3,2 km de RP 94	Fortunato 8073 (BAB)
52	*G. longifolia*	Paraguay. Alto Paraguay: Fortín Patria	Pérez 7580 (FCQ)
53	*G. longifolia*	Argentina. E. Ríos: Ao. Quebracho y RP 2	Fortunato 7907 (BAB)
54	*G. longifolia*	Argentina. Chaco : Isla del Cerrito	Fortunato (BAB)
	Camptosema		
55	*C. paraguariense var parviflorum*	Argentina. Formosa: 20 km al O de Las Lomitas	Fortunato 6805 (BAB)
56	*C. paraguariense var paraguariense*	Paraguay. Alto Paraguay. Fortín Patria	Péres 7605 (FCQ)
57	*C. rubicundum*	Argentina. Buenos Aires: Isla Martín García	Greppi 25 (BAB)
571	*C. rubicundum*	Argentina. Entre Ríos: e/Pto. Yeruá y N. Escocia	Sede 86 (BAB)
58	*C. rubicundum*	Argentina. Bueno Aires: Isla Martín García	Sede 17 (BAB)
59	*C. rubicundum*	Argentina. Entre Ríos: Pque Unzué	Sede s/n (BAB)
60	*C. paraguariense var paraguariense*	Paraguay. Alto Paraguay: Fortín Patria	Pérez 7582 (FCQ)
61	*C. paraguariense var paraguariense*	Paraguay. Alto Paraguay: Fortín Patria	Pérez 7592 (FCQ)
62	*C. ellipticum*	Paraguay. Alto Paraguay	Sede s/n (BAB)
63	*C. scarlatinum*	Argentina. Misiones: RP 4 e/ Sta. Ana y Bonpland	Fortunato 8003 (BAB)
64	*C. praeandinum*	Argentina. Salta: 7 km al N de Campo Quijano	Fortunato 6936 (BAB)
65	*C. praeandinum*	Argentina. Salta: Quebrada del Toro	Fortunato 7271 (BAB)
66	*C. praeandinum*	Argentina. Salta: Quebrada del Toro	Fortunato 7273 (BAB)
	Collaea		
67	*C. stenophylla*	Argentina. Misiones: Cerro Santa Ana	Sede 1 (BAB)
68	*C. stenophylla*	Argentina. Misiones: Cerro Santa Ana	Sede 3 (BAB)
69	*C. stenophylla*	Argentina. Misiones: Loreto	Sede 6 (BAB)
70	*C. stenophylla*	Argentina. Misiones	Fortunato 7998 (BAB)
72	*C. stenophylla*	Paraguay.Canindeyú: Reserva Nat. Mbaracayú	Sede 76 (FCQ)
73	*C. paraguariensis*	Argentina. Misiones: Cerro Santa Ana	Fortunato 8043 (BAB)

74	*C. argentina*	Argentina. Misiones: cerca de Campo Grande	Fortunato 7673 (BAB)
75	*C. aschersoniana*	Argentina. Misiones: Cerro Santa Ana	Fortunato 8002 (BAB)
76	*C. stenophylla*	Argentina. Misiones: Cerro Santa Ana	Sede 2 (BAB)
	Grupo externo		
78	*Centrosema virginianum*	Paraguay. Alto Paraguay: Fortín Patria	Pérez 7584 (FCQ)
79	*Eriosema sp.*	Argentina. Misiones	Fortunato 8052 (BAB)
80	*Lonchocarpus sp.*	Argentina. Misiones	Fortunato 7843 (BAB)
81	*Clitoria sp.*	Argentina. Corrientes	Fortunato 7545 (BAB)
82	*Desmodium sp.*	Argentina. Corrientes	Fortunato 7538 (BAB)

Métodos

Digestión con endonucleasas de restricción- Ligación

Se utilizó el protocolo propuesto por (Milbourne et al., 1997) y (Vos et al., 1995), con las modificaciones pertinentes para la utilización de tinción con plata en lugar de utilización de radiactivo(Marcucci- Poltri, 1998). La digestión y ligación se llevó a cabo al mismo tiempo, durante 4 horas a 37°C partiendo de 500 ng de ADN genómico de los distintos individuos a analizar; la reacción se realizó en un volumen final de 30 µl. En primer lugar se preparó la mezcla para la digestión. La misma se realizó con dos endonucleasas de restricción, EcoRI (de corte poco frecuente) y MseI (con alta frecuencia de corte), en un volumen final de 25 µl con los siguientes reactivos:

Componentes	Volumen
Buffer RL $_{(1)}$ 5x	5,0 µl
EcoRI 10 U/µl	0,3 µl
MseI 4 U/µl.	0,6 µl
ddH_2O	14,1 µl
ADN 0,1 µg/µl.	5,0 µl

$^{(1)}$Buffer de restricción- ligación: 10mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgAc, 50mM KAc, 5mM DTT, 50 ng/µl BSA.

En segundo lugar se preparó la mezcla para la ligación de adaptadores para cada enzima, el volumen final es de 5 µl, con los siguientes reactivos:

Componentes	Volumen
Buffer RL $_{(1)}$ 5x	1,0 µl
Adaptadores EcoRI 5 µM	0,5 µl

Adaptadores MseI 50 µM.	0,5 µl
ATP 10mM	0,6 µl
T4 ADN Ligasa 1U/µl.	0,5 µl
ddH_2O	1,9 µl

La secuencia de los adaptadores se describe en la tabla 4. Ambas mezclas se llevaron a volumen (Vol. final de 30 µl) y se procedió a la digestión- ligación según las condiciones anteriormente mencionadas. Al finalizar la reacción se verificó la digestión sembrando 5µl del producto final en un gel de agarosa al 1% en TAE 1x.

Reacciones de amplificación:

Las amplificaciones se realizaron en dos pasos:

1) Pre-amplificación (amplificación no selectiva) usando *primers* con 1 nucleótido selectivo (+1).

2) Amplificación selectiva usando *primers* con 3 nucleótidos selectivos (+3).

En ambos casos se utilizó un ciclador térmico Perkin Elmer 480 (EUA)

Pre-amplificación:

Las pre-amplificaciones se realizaron en 25µl. de volumen final, conteniendo cada una:

Componentes	Volumen
Buffer PCR LD 10x	2,500 µl
$MgCl_2$ 50 mM	1,500 µl
dNTP 10 mM	0,500 µl
Primer EcoRI (+1) 1µg/µl.	0,075 µl
Primer MseI (+1) 1 µg/µl.	0,075 µl
Taq ADN pol LD 5 U/µl.	0,200 µl
ddH_2O	16,150 µl
Producto de ligación	4,000µl

La PCR se realizó con el siguiente programa:

94°C (desnaturalización)	30 seg	30 ciclos
60°C (anillamiento, "annealing")	30 seg	
72°C (extensión)	1 min	

Los productos fueron controlados en un gel de agarosa al 1% en TAE 1x y almacenados a –20°C, para ser utilizados como templado de la amplificación selectiva.

Amplificación selectiva:

Para la amplificación selectiva se utilizaron 5 combinaciones de *primers* EcoRI/ MseI con tres nucleótidos selectivos (+3). Las reacciones se realizaron en un volumen de 22 µl, conteniendo los siguientes componentes:

Componentes	**Volumen**
Buffer PCR 10x	2,00 µl
$MgCl_2$ 50mM	0,60 µl
dNTP 10mM	0,40 µl
Primer EcoRI (+3) 1 µg/µl.	0,03 µl
Primer MseI (+3) 1 µg/µl.	0,03 µl
Taq ADN pol 5 U/µl.	0,10 µl
ddH_2O	16,84 µl
Producto de pre-amplificación	2,000 µl

Las secuencias de los *primers* +3 se describen en la tabla 1.
Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes:

94°C (desnaturalización)	30 seg	1 ciclo
65°C (anillamiento, *annealin*g)	30 seg	
72°C (extensión)	30 seg	
94°C (desnaturalización)	30 seg	1 ciclo
64°C (anillamiento, *annealing*)	30 seg	
72°C (extensión)	30 seg	

Reducción de 1°C por ciclo hasta llegar a 56°C de temperatura de anillamiento

94°C (desnaturalización)	30 seg	25 ciclos
56°C (anillamiento, *annealing*)	30 seg	
72°C (extensión)	30 seg	

Separación y detección de AFLPs

Los productos de amplificación fueron guardados a –20°C hasta ser separados electroforéticamente. Antes de la siembra se les agregaron 10 µl de buffer de carga (98%

formamida, 10 mM EDTA pH 8, 0,05% de azul de bromofenol y 0,05% xilencianol), fueron desnaturalizados a 95°C durante 5 min e inmediatamente se enfriaron en hielo. Se sembraron 10 µl de cada muestra en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%. Los geles se corrieron en TBE 1x a 60 W durante 3-4 horas en el sistema de Gibco BRL Modelo S2 (EUA).

Tabla 1: Secuencia de los iniciadores y adaptadores utilizados para el análisis mediante AFLP:

adaptadores[a] EcoRI	5'- CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
adaptadores[a] MseI	5'-GACGATGAGTCCTTGAG-3' 3'-TACTCAGGAACTCAT-5'
primers [b] AFLP	
EcoRI+1	5'-GACTGCGTACCAATTC**A**-3'
MseI+1	3'-GATGAGTCCTTGAGTAA**A**-5'
EcoRI+3	
E38	5'-GACTGCGTACCAATTC**ACT-**3'
E40	5'-GACTGCGTACCAATTC**AGC-**3'
E41	5'-GACTGCGTACCAATTC**AGG-**3'
E43	5'-GACTGCGTACCAATTC**ATA-**3'
E52	5'-GACTGCGTACCAATTC**CCC-**3'
MseI+3	
M31	3'-GATGAGTCCTTGAGTAA**AAA**-5'
M38	3'-GATGAGTCCTTGAGTAA**ACT**-5'
M39	3'-GATGAGTCCTTGAGTAA**AGA**-5'
M45	3'-GATGAGTCCTTGAGTAA**ATG**-5'
M57	3'-GATGAGTCCTTGAGTAA**CGG**-5'

[a] Los adaptadores fueron ligados a los extremos de los fragmentos de restricción.
[b] Los *primers* +1 fueron utilizados en la pre-amplificación del ADN y los patrones de AFLP evaluados fueron generados mediante la amplificación con los *primers* +3.

Luego de finalizada la corrida electroforética se utilizó el sistema de Promega Biotech (EUA) "DNA staining kit" para la tinción de geles de secuencia con nitrato de plata.

Los pasos para el revelado fueron los siguientes:

1) Fijación del gel en ácido acético al 10% durante 20min.
2) 3 lavados en agua bidestilada durante 2 min cada vez.

3) Tinción con nitrato de plata al 0,1% y formaldehído 1,5 ml/ litro de solución.
4) Lavado de 10 seg en agua bidestilada fría.
5) Revelado en solución de carbonato de sodio 30g/ litro, formaldehído 1,5 ml/ litro y tiosulfato de sodio 10 mg/ litro hasta obtener coloración en las bandas.
6) Detención de la reacción con ácido acético al 10% durante 10 min.
7) 2 lavados con agua bidestilada durante 2 min cada vez.
8) Secado a temperatura ambiente.

Los patrones de bandas se analizaron directamente en los vidrios sobre un transiluminador de luz blanca o bien los geles fueron desprendidos de los vidrios con hidróxido de sodio 0,2 N durante tiempos variables y levantados con papel Wattman 3MM (Inglaterra), secados a 80°C con vacío y conservados para su análisis.

Se relevaron las bandas monomórficas (bandas presentes en todos los individuos de todas las especies pertenecientes al grupo de estudio), las bandas polimórficas (presentes en algunos individuos del grupo de estudio)y las bandas diagnósticas de especie (presentes en todos los individuos de una única especie). Las bandas diagnósticas se relevaron únicamente en especies cuyo número de OTUS fue como mínimo 4 o mayor.

ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis de los datos se aplicaron técnicas numéricas (Sneath & Sokal, 1973) mediante el programa NTSyS-PC version 2.01 (Rolph, 1998).

Construcción de la matriz básica de datos (MBD)

En primer lugar se definieron las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) como los distintos individuos pertenecientes a las distintas especies.

En segundo lugar se definieron los caracteres. Puede definirse carácter, como cualquier propiedad que varía entre las OTUs. Los posibles valores que ese carácter pueda presentar son considerados sus estados (Sneath & Sokal, 1973) y describirán las OTUs. En este estudio los caracteres fueron los distintos loci AFLPs y los estados posibles son los alelos.

Un fragmento de amplificación que posee una movilidad electroforética determinada (sin tener en cuenta su intensidad) puede estar (o no) presente en cada uno de los individuos estudiados y esta propiedad permitió que sea codificado con 1 (presencia) y 0 (ausencia), son

datos de tipo binario o doble estado. Todos los geles se analizaron manual e independientemente. Las bandas con igual movilidad se consideraron iguales. Con estos datos se construyó la MBD que representó a todos los individuos y a sus respectivas variables. Las columnas correspodieron a las OTUs y las filas a las variables (o caracteres, cada fragmento de amplificación). En caso de datos perdidos o dudosos se les asignó un código arbitrario 5.

Con los patrones de bandas polimórficas de AFLPs observados, codificados como presentes, ausentes o dato faltante, se construyó una MBD en donde las filas muestran las variables (bandas) y las columnas las OTU (en este caso, especies) (Apéndice 4.1).

Construcción de la matriz de similitud

A partir de los datos de la MBD se estimaron las matrices de similitud entre los distintos OTUs a través de dos coeficientes de asociación: Jaccard y Dice. Los cuales según el caso van a contemplar las presencias o le van a dar mayor peso a las presencias compartidas.

Jaccard: a /(a+b+c), (Jaccard, 1908)
Dice: 2a/(2a+b+c), (Dice, 1945),(Nei & Li, 1979)

Estos coeficientes varían de 0 a 1 y toman este último valor en el caso de la identidad. Y dependiendo de cuál se use se acentúan distintos aspectos de la similitud.
donde:
a =número de caracteres en los cuales el mismo estado es compartido por ambas OTUs (1,1).
b =número de caracteres en los cuales un estado es poseído por la primera OTU, pero no por la segunda (1,0).
c =número de caracteres en los cuales está ausente en la primer OTU, pero presente en la segunda (0,1).

Estos índices resultan los más apropiados para tratar este tipo de datos, dado que le otorgan más peso a la presencia de bandas.

Mediante la utilización de estos coeficientes (módulo SimQual del programa NTSyS) se generaron la matrices de similitud.

Análisis de agrupamientos

Con el objeto de sintetizar la información de las distintas matrices de similitud a fin de permitir el reconocimiento de las relaciones de la totalidad de las OTUs se utilizó para el análisis de agrupamientos la técnica de ligamiento promedio no ponderado (Sokal & Michener, 1958), que utiliza la media aritmética no ponderada también llamada UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages), donde se considera que el valor de similitud entre la OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo.

La estructura obtenida a través del análisis de agrupamiento se representó gráficamente mediante un dendrograma, que muestra la relación de similitud entre las OTUs.

Generación del dendrograma

Con el objeto de visualizar fácilmente las similitudes entre los individuos, se construyeron los dendrogramas a partir de las distintas matrices de similitud mediante el un análisis de clusters. Para la construcción de los dendrogramas se utilizó el módulo denominado SAHN, que agrupa en forma jerárquica y secuencial a los individuos según las similitudes. Se utilizaron distintos métodos de ligamiento. El método UPGMA posee cuatro propiedades denominadas SAHN por sus siglas en inglés:

S (Secuencial): se realizan una serie de operaciones secuenciales recurrentes para llegar a la división final.

A (Aglomerativo): los OTUs son sucesivamente agrupados llegando eventualmente a un grupo que contiene a todos los OTUs.

H (Jerárquico): el número de subgrupos se va reduciendo en cada paso, creando una jerarquía taxonómica. Cada jerarquía puede ser dibujada como un árbol sin raíz o dendrograma.

N (Sin superposiciones): un OTU que pertenece a un grupo no puede pertenecer a otro.

Estos métodos no reflejan en forma exacta la información obtenida a partir de las matrices de similitud debido a la forma bidimensional que se adopta en la representación en forma de árbol. Esta distorsión de los datos originales generada por el método de agrupamiento puede ser cuantificada construyendo, a partir del árbol obtenido, otra matriz de similitud denominada cofenética (ver más abajo). Luego se estudiará la correlación entre ellas utilizando el análisis de correspondencia de Spearman. Si el valor de correlación de las matrices es lo suficientemente alto, se considera que el dendrograma observado refleja de manera adecuada las relaciones fenéticas.

RESULTADOS

Se analizó un total de 75 OTUS, 70 correspondientes al grupo de estudio y 5 al grupo externo. El análisis se realizó mediante seis combinaciones de *primers Eco*RI/*Mse*I (**Tabla 1**) selectivos que generaron un total de 378 bandas. El número de productos generados por cada combinación de primer fue variable encontrándose un mínimo de 29 y un máximo de 105 bandas por cada combinación. Del total de bandas, 377 (99,7 %) resultaron polimórficas, 1 monomórfica (0,26%) y 17 diagnósticas (4,5%) (**Tabla 2**).

Tabla 2- Cantidad de bandas totales, monomórficas y diagnósticas, registradas para las seis combinaciones de *primers*

Combinaciones de *primers*	**N° de bandas totales**	**N° de bandas monomórficas**	**N° de bandas diagnósticas**
1- E38- M31	105	1	6
2- E40- M39	76	0	6
3- E40- M45	73	0	3
4- E41- M38	53	0	1
5- E43- M39	29	0	0
6- E52- M57	42	0	1
Total	378	1	17

Se halló un número variable de bandas diagnósticas para las distintas especies (**Tabla 3**)

Tabla 3. Número de bandas diagnósticas de especie evidenciadas mediante AFLPs para las distintas combinaciones de *primers*.

Especies	**Combinaciones de *primers***				
	E38/M31	**E40/ M39**	**E40/M45**	**E41 –M38**	**E52 –M57**

G. latisiliqua	-	1	-	-	-
G. striata	-	-	-	1	-
G. boavista	3	-	-	-	1
G. benthamiana	3	-	1	-	-
C. paraguariense	-	1	1	-	-
C. stenophylla	-	4	1	-	-

De las combinaciones combinaciones de primers ensayadas, las combinaciones E38/M31 y E40/M39 fueron las que evidenciaron el mayor número de bandas diagnósticas de especie.

Con los datos obtenidos, se construyó una matriz binaria de 75 x 378, la que incluye todos los datos obtenidos.

Análisis de agrupamiento

La MBD construída, fue analizada utilizando 2 índices de asociación (Jaccard y Dice) y el método de agrupamiento (UPGMA) generando dendrogramas idénticos. En la **figura 1** se muestra el dendrograma construído utilizando el índice de Jaccard.

En el análisis de la matriz de datos construída a partir de las bandas obtenidas con todas las combinaciones de *primers*, se observa que las especies de *Collaea* forman un *cluster* bien definido, aunque no ocurre lo mismo con las especies de *Camptosema* y *Galactia* (**Figura 1**). Los clusters (I y II) corresponden a la mayor parte de las especies de *Galactia*.El grupo I corresponde a especies de la sección Odonia mientras que el II corresponde a a especies de la sección Odonia (*G. texana y G. neesii*) y sección Collaearia (*G. boavista*).

Dentro del *cluster* I se observa una delimitación específica de los OTUS, salvo por el subcluster con los individuos de *G. benthamiana* y *G. sp. nov.* (**grupo c**). Además se observa que los OTUs correspondientes a *G. latisiliqua* se agrupan según la región geográfica de procedencia (**grupo a**). Con respecto a las variedades de *G. fiebrigiana* (**grupo b**), se observa que el OTU correspondiente a *G. fiebrigiana* var *correntina* posee una similitud mayor con los OTUS de *G. latisiliqua* que con las restantes variedades, var *sericophylla* y var *fiebrigiana*. Por su parte, el agrupamiento de estas variedades es congruente con la delimitación taxonómica (**grupo b**).

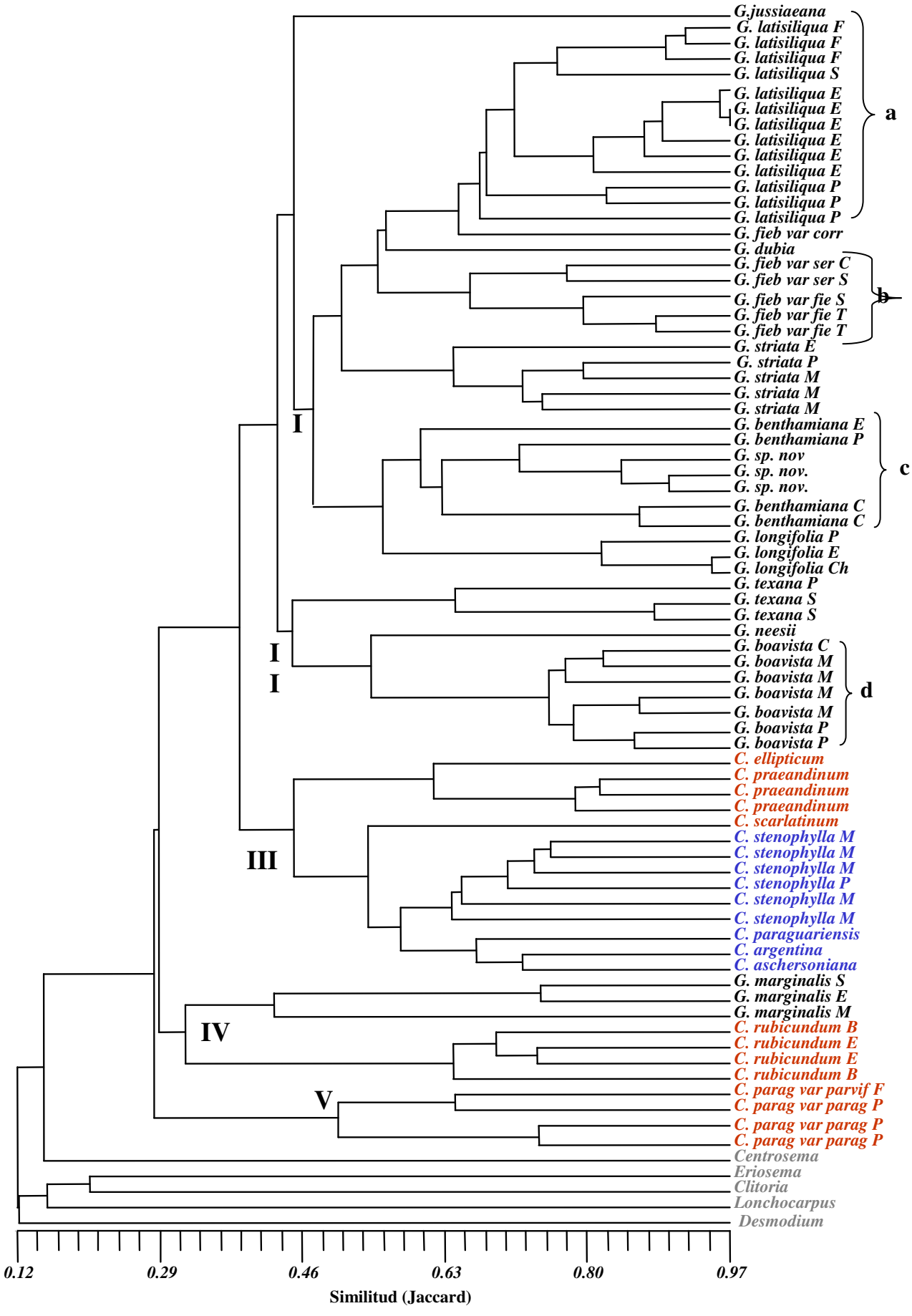
Dentro del *cluster* II, las especies de *G. boavista* provenientes de distintas regiones geográficas, se encuentran agrupadas con un nivel de similitud genética cercano a 75% (**grupo d**).

El cluster III de encuentra formado por los individuos de *Collaea*; *Camptosema scarlatinum*, *Camptosema praeandinum* y *Camptosema ellipticum*. Todas las especies de *Collaea* forman un único cluster con un nivel de similitud genética (cercano al 50%) comparable al encontrado en los agrupamientos de las distintas especies de *Galactia*. Esta observación sugiere la presencia de una menor diversidad genética entre los individuos de las especies de *Collaea* en comparación con *Galactia*.. También ocurre lo mismo con las distintas especies del género; por una lado se agrupan los OTUS correspondientes a *C. stenophylla* y por otro los restantes correspondientes a las otras especies.

El cluster IV se encuentra formado por los OTUS de *Galactia marginalis* y *Camptosema rubicundum*, aunque los subclusters correspondientes a ambas especies están asociados con un bajo porcentaje de similitud genética (cercano al 30%).

Finalmente, el cluster V, se encuentra formado por los OTUs de *Camptosema paraguariense*.

Figura 1. Dendrograma construído con el método de agrupamiento UPGMA a partir del análisis de AFLPs de todas las combinaciones de *primers*. Las letras al lado del nombre de la especie indican la región geográfica de procedencia.



DISCUSIÓN

Además de su uso para la caracterización de cultivares, variedades y accesiones en los bancos de germoplama, la aplicación de la técnica de AFLP para estudiar la diversidad genética en distintos organismos reveló que son marcadores moleculares adecuados ya sea para establecer relaciones a nivel intraespecífico, interespecífico e, incluso, intergenérico (ver citas más abajo).

En el caso de los individuos analizados del complejo *Galactia- Camptosema- Collaea*, los AFLP demostraron ser una herramienta efectiva para la determinación de los límites a nivel específico. Esto también se observó en otros trabajos: (Loh *et al*., 2000) observaron una situación semejante al comparar distintas especies de bambú pertenecientes a seis géneros distintos de la subtribu Bambusinae (Bambusoideae, Poaceae), en el género *Alstroemeria* ya sea en la identificación de las distintas especies como de los híbridos interespecíficos (Han *et al*., 2000), en berenjena (*Solanum melongena*) y las distintas especies silvestres del género relacionadas (Mace *et al*., 1999)y en especies del género Verónica (Scrophulariaceae) (Martínez-Ortega *et al*., 2004). También dentro del género *Solanum* en la sección *Petota* (papas) se observó que los AFLP son una herramienta útil para la caracterización de los distintos especies (Kardolus *et al*., 1998), (Marcucci- Poltri, 1998).

Los resultados de este estudio evidenciaron la posibilidad de diagnosticar a determinadas especies por medio de la detección de bandas exclusivas obtenidas con ciertas combinaciones de *primers*, en particular con las combinaciones E38/M31 y E40/M39. Con estas combinaciones fue posible diagnosticar a cinco especies del complejo: *Camptosema paraguariense*, *Collaea stenophylla G. boavista*, *G. benthamiana*, y *G. latisiliqua*.

Por otro lado fue posible también evidenciar diferencias geográficas dentro de algunos *clusters*, en particular el de *G. latisiliqua*, donde los individuos de Formosa forman un agrupamiento, y los de distintas localidades de Entre Ríos forman a su vez otro.

El análisis apoya la hipótesis previa de mayor similitud morfológica entre *G. fiebrigiana var correntina y G. latisiliqua*, como ya se discutió en el capítulo uno. El patrón de agrupamiento de las especies del complejo no es congruente con la circunscripción actual de las especies de *Camptosema*. *C. scarlatinum* posee mayor similitud genética con las especies de *Collaea* que con otras especies de *Camptosema*. Asimismo, *C. ellipticum* y *C. praeandinum*, se encuentran formando parte de un grupo que muestra mayor similitud con las especies de *Collaea* y *C. scarlatinum* que con *C. paraguariense* y *C. rubicundum*, siendo esta última la especie tipo.

El agrupamiento entre *G. marginalis* y *C. rubicundum* es poco explicable en términos morfológicos. Aunque el nivel de diferenciación genética que surge en el presente estudio es relativamente alto, la relación entre *G. marginalis* y *C. rubicundum* también surge en los análisis filogenéticos de la región ITS y *trn*L-F. Esta correlación en los resultados requiere de un análisis más profundo. Sin embargo es claro que existe cierta afinidad a nivel genético entre estas dos especies que no se correlaciona a nivel morfológico.

Aunque los taxones utilizados en el análisis filogenético y en el de los patrones de AFLP difieren, los resultados obtenidos son congruentes. Algunos ejemplos son los agrupamientos de *C. scarlatinum* con las especies de *Collaea* y de *Camptosema ellipticum* con *Camptosema praeandinum*. *G. neesii* se agrupa junto a los individuos de *G. boavista* (Secc. Collaearia) y en el análisis filogenético esta especie se encuentra más cercanamente relacionada al género *Collaea* y a *C. scarlatinum* que a las especies de la sección Odonia a la que pertenece.

Esta concordancia entre los resultados obtenidos a través del análisis filogenético de la región ITS y los obtenidos a través del análisis de los patrones de AFLP también se observó en *Prunus* (Hagen *et al.,* 2002), *Solanum melongena* y especies afines (Mace *et al*., 1999), en *Lactuca (*Koopman *et al.,* 2001), entre otros.

Las relaciones genéticas sugeridas en el presente estudio no avalan la hipótesis taxonómica actual propuesta para el género *Camptosema*. Aunque el muestreo de las especies de este género no es extenso, los datos obtenidos no corroboran su actual circunscripción.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La mayoría de los caracteres utilizados como diagnósticos en la taxonomía tradicional del grupo no posibilitan una clara delimitación de los rangos genéricos e infragenéricos.
A partir del estudio realizado los caracteres potencialmente diferenciales a nivel genérico son:

a) Brácteas y bractéolas. La presencia de brácteas estrobiliformes definen al género *Collaea*. El tamaño de las bractéolas permite caracterizar a nivel específico dentro del género *Collaea*; estas son siempre mayores que el tubo calicinal salvo en *Collaea stenophylla* y *Collaea cipoensis*. En *Camptosema* y en *Galactia* son mas cortas que el tubo excepto en *Galactia neesii* y *Galactia martii.*

b) Cáliz. Es un carácter que posibilita diferenciar los taxones a nivel genérico en leguminosas. Se observó gran variabilidad en el género *Camptosema*. En *Camptosema* s.s., las especies presentan cáliz tubular, sin embargo las especies conflictivas de *Camptosema* presentes en la región austral de América del Sur, *C. praeandinum*, *C. scarlatinum* y C. *paraguariense*, presentan cáliz campanulado como todas las especies de *Galactia*.

c) Forma del vexilo. Pese a la gran variación encontrada en este carácter, es importante para la diferenciación genérica. En *Camptosema* s.s.; las especies *C. coccineum*, *C. coriaceum*, *C. rubicundum* y *C. ellipticum* presentan vexilo angostamente oblongo, mientras que en el resto de las especies de *Camptosema* estudiadas en este trabajo, es ovobado-elíptico. En *Galactia* es ovobado-elíptico a orbicular y sin áreas callosas. Las especies de *Collaea* presentan desde un vexilo giboso, ovobado-depreso a elíptico, siempre con dos áreas callosas prominentes.

d) Disco del gineceo. Aunque este fue un carácter descrito por varios autores, hasta el presente no había sido planteado como diferencial entre taxones. Sobre esta base se observó que es un carácter constante en *Galactia* ya que todas las especies presentan un disco tubular de margen irregular y de consistencia laminar. Sin embargo se encontró variabilidad en *Camptosema* s.s. (disco cónico o trapezoidal, laminar de borde irregular) y en *Collaea* (tubular, de margen lobulado o irregular y de consistencia carnosa o laminar)

e) Estípite. El estípite es un carácter relacionado a la forma del cáliz observándose en los grupos que presentan cáliz tubular. En *Camptosema* s.s. el estípite es alargado, mientras que en las restantes especies con cáliz campanulado, el estípite es sésil o subsésil. A pesar de esto llama la atención la existencia de este ginóforo en *G. marginalis* y *C. paraguariense*.

f) Estilo. Permite caracterizar a *Galactia* (inflexo) y *Camptosema* s.s. (no inflexo). En *Collaea* es variable; en el caso particular de *C. stenophylla*, este es corto y geniculado, mientras que en las restantes especies es inflexo a alargado.

Los datos citológicos analizados indican que los caracteres fundamentales y de mayor relevancia para la resolución de la taxonomía conflictiva del grupo, resultaron ser el número cromosómico y la fórmula cariotípica. Las especies de *Galactia* y *Collaea* analizadas presentaron un 2n=20 y fórmulas cariotípicas similares. *C. praeandinum* (2n=20) no coincide con el número cromosómico de la especie tipo *C. rubicundum* (2n=22) y sus fórmulas cariotípicas son distintas.

Aunque no fue posible analizar el cariotipo en las restantes dos especies conflictivas de *Camptosema*: *C. scarlatinum* y *C. paraguariense,* el número cromosómico encontrado en estas especies (n=10) no es el esperado para el género. Como se mencionó anteriormente, estas dos especies, al igual que *C. praeandinum,* no presentan todos los caracteres exomorfológicos diagnósticos del género. *C. praeandinum* ,*C. scarlatinum* y *C. paraguariense* no se encuentran cercanamente relacionadas a *C. rubicundum* según se infiere del análisis de agrupamiento a partir del patrón de bandas de AFLP y de la hipótesis filogenética planteada.

La técnica de AFLP demostró ser una herramienta efectiva para el análisis de los individuos del complejo *Galactia- Camptosema- Collaea*, ya que fue posible determinar los límites a nivel genérico y específico. El análisis de agrupamiento obtenido a partir de los patrones de bandas de AFLPs no es consistente con la actual circunscripción de *Galactia* y *Camptosema*, corroborando los resultados obtenidos en el estudio de caracteres morfológicos y en el análisis filogenético de datos combinados. *C. scarlatinum*, posee mayor similitud genética con las especies de *Collaea* que con otras especies de *Camptosem*a. Asimismo *C. ellipticum* y *C. praeandinum*, se encuentran formando parte de un grupo que muestra mayor similitud con las especies de *Collaea* y *C. scarlatinum* que con *C. paraguariense* y *C. rubicundum*. El agrupamiento entre *G. marginalis* y *C. rubicundum*, aunque poco explicable sobre la base de caracteres morfológicos, es congruente con la evidencia surgida del análisis filogenético a partir de secuencias de ADN nuclear y de cloroplasto.

Las diferencias genéticas entre las especies, así como su grado de variación intraespecífico, son congruentes con el análisis de los caracteres morfológicos. Por ejemplo, la variedad correntina de *G. fiebrigiana* presentó mayor similitud genética con los individuos de

G. latisiliqua que con las restantes variedades de *G. fiebrigiana* y esto se ve correlacionado con los caracteres morfológicos que comparte esta variedad con *G. latisiliqua*.

Por último, la presencia de bandas diagnósticas exclusivas de especie posibilitó diferenciar a *Camptosema paraguariense*, *Collaea stenophylla*, *Galactia boavista*, *G. benthamiana* y *G. latisiliqua.*

Los análisis filogenéticos realizados en el complejo genérico *Galactia -Camptosema – Collaea*, basados en caracteres morfológicos y moleculares, no apoyan la monofilia de los géneros *Galactia* y *Camptosema*. Estos resultados apoyan la idea de que el concepto tradicional de los géneros *Galactia* y *Camptosema* corresponde a grupos artificiales.

La monofilia del género *Galactia* no es apoyada por ninguno de los datos en el presente análisis. A pesar de esta condición artificial, es posible encontrar en *Galactia*, algunos grupos bien apoyados por la evidencia de datos combinados: por ejemplo, existe una estrecha relación entre *G. fiebrigiana*, *G. latisiliqua*, *G. dubia* entre otras especies de la sección Odonia. La monofilia de esta sección tampoco está apoyada por los datos; las especies *G. martii* y *G. neesii*, no se encuentran nunca en el mismo clado de especies de la sección Odonia. Ambas se encuentran más cercanamente relacionadas a las especies de *Collaea*.

La hipótesis de monofilia del género *Camptosema* no está apoyada por los resultados de los análisis aquí presentados. Aunque en el análisis morfológico resulta un grupo natural con la mayoría de las especies, la posición de *C. praeandinum* y *C. paraguariense*, dejan a *Camptosema* polifilético. *C. praeandinum* se encuentra más cercanamente relacionada a *G. boavista*. Por su parte, *C. scarlatinum*, en los análisis combinado y molecular, surge en un mismo clado con *G. martii*, *G. neesii* y las especies de *Collaea*. El clado que surge en la mayoría de los análisis de datos moleculares con *C. rubicundum* y *G. marginalis*, no tiene explicación a nivel morfológico y la relación entre estas dos especies tampoco ha sido sugerida por otros autores. La única característica morfológica que comparten estas dos especies es la presencia de ovario estipitado. Sin embargo, como ya se discutió anteriormente, en el análisis de agrupamiento generado a partir del patrón de bandas de AFLP, estas dos especies se encuentran también relacionadas.

La monofilia del género *Collaea* está fuertemente corroborada en el presente análisis cladístico, tanto por la evidencia morfológica como molecular. Esta hipótesis es congruente con su circunscripción actual. Con respecto a la relación entre las especies del género, *C. argentina*, *C. paraguariensis* y *C. cipoensis* surgen siempre en un clado bien apoyado en los análisis con distintas estrategias de búsqueda. *C. stenophylla*, como se discutió en el capítulo

morfológico, es la única representante del género que presenta caracteres particulares. Su pertenencia al género está bien apoyada por la evidencia morfológica y molecular.

Una posible solución para la resolución del problema taxonómico de este complejo, y que sea consistente con los resultados del presente análisis cladístico, sería considerar a todo el grupo como un único género. La evidencia morfológica como los resultados de este estudio, sugieren que debería irse en esta dirección cuando se considera a *Galactia* y a *Camptosema*. Sin embargo, *Collaea*, tal cual su circunscripción actual, resulta ser un grupo monofilético fuertemente apoyado por los datos morfológicos y moleculares.

La hipótesis filogenética que surge del presente trabajo, es un avance en el reconocimiento de grupos bien apoyados por distintas fuentes de evidencia. Esta hipótesis no representa "la verdadera filogenia", ya que los cladogramas obtenidos pueden reverse a la luz de nuevos datos o de la reinterpretación de las hipótesis de homología. Sin embargo, el análisis aquí realizado constituye una base objetiva para determinar cambios en la nueva clasificación actual.

Los estudios morfológicos, citológicos, moleculares y filogenéticos sugieren que:
-*Camptosema preandinun* y *Camptosema scarlatinum* deberían ser transferidas a *Galactia*.
-La ubicación de *Camptosema paraguariense* continúa siendo conflictiva.
-*Galactia* secc. Odonia debería ser reestructurada; en particular entre las especies estudiadas debería reverse la posición de *Galactia martii* y *Galactia neesii*.
-*Collaea* constituye un grupo monofilético. La variabilidad observada entre las especies sugiere su agrupamiento en dos niveles infragenéricos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Adams, S. P., I. J. Leitch, M. D. Bennett, M. W. Chase, and A. R. Leitch. 2000. Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). American Journal of Botany 87:1578-1583.

Ainouche, A. K., R. J. Bayer, P. Cubas, and M. T. Misset. 2003. Phylogenetic relationships within tribe Genisteae (Papilionoideae) with special reference to genus *Ulex*. Pages 239-252 *in* Advances in Legume Systematics, Part 10 (B. B. Klitgaard, and A. Bruneau, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.

Allan, G. J., and 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., and J. F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution 29:417-434.

Ansari, H. A., N. W. Ellison, S. M. Reader, E. D. Bedaeva, B. Friebe, and T. E. Miller. 1999. Molecular cytogenetic organization of 5S and 18S-25S rDNA loci in white clover (*Trifolium repens* L.) and related species. Annals of Botany 83:199-206.

Atchinson, E. 1949. Studies in the Leguminosae. IV. Chromosome numbers and geographical relationships of miscellaneous Leguminosae. Journal of the Mitchell Scientific Society 65:118-122.

Bailey, C. D., T. G. Carr, S. Harris, and C. Hughes. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. Molecular Phylogenetics and Evolution 29:435-455.

Bairiganjan, G. C., and S. N. Patnaik. 1989. Chromosomal evolution in Fabaceae. Cytologia 54:51-64.

Baker, R. H., and J. Gatesy. 2002. Is morphology still relevant? Pages 163-174 *in* Molecular Systematics and Evolution: Theory and Practice (R. De Salle, G. Giribet, and W. Wheeler, eds.). Birkhauser Verlag, Switzerland.

Baker, R. H., and R. De Salle. 1997. Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. Systematic Biology 46:654-673.

Baldwin, B. G., M. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and 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.

Bedaeva, E. D., B. Friebe, and B. S. Gill. 1996. Genome differentiation in *Aegilops. 2.* Physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species. Genome 39:1150-1158.

Bentham, G. 1859. Leguminosae. Pages 1-216 *in* Flora Brasiliensis (V. M. C. F. P., ed.).

Bossi, F. S., and J. R. Daviña. 2000. Cromosomas de cuatro especies de *Galactia* (Fabaceae). Bonplandia 10:175-179.

Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. Cladistics 10:295-304.

Brouat, C., L. Gielly, and 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.

Bruneau, A., J. J. Doyle, and J. L. Doyle. 1995. Phylogenetic relationships in Phaseoleae: evidence from chloroplast DNA restriction site characters. Pages 309-330 *in* Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny (M. D. Crisp, and J. J. Doyle, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.

Burkart, A. 1952. Las Leguminosas Argentinas silvestres y cultivadas, 2 edition. Acme Agency.

Burkart, A. 1970. Las Leguminosas-Faseóleas argentinas de los géneros *Mucuna*, *Dioclea* y *Camptosema*. Darwiniana 16:175-218.

Burkart, A. 1971. El género *Galactia* (Leguminosae-Phaseoleae) en Sudamérica con especial referencia a la Argentina y países vecinos. Darwiniana 16:663-797.

Clegg, M.T. and E.M. Golenberg. 1991. Molecular evolution of chloroplast DNA. Pages 135-149 *in* Evolution at the Molecular Level (C. A. Selander RK, Whittman TS., ed.) Sinauer Associates, Sunderland.

Coleman, J. R. 1982. Chromosome numbers of Angiosperms collected in the state of Sao Paulo. Brazil Journal of Genetics 5:533-549.

Coleman, J. R., and E. M. Demenezes. 1980. Chromosome numbers in Leguminosae from the State of Sao Paulo, Brazil. Rhodora 82:475-481.

Coleman, J. R., and L. B. Smith. 1969. Chromosome numbers of some Brazilian angiosperms. Rhodora. 71:548-551.

Crisp, M. D., and L. Cook. 2003. Phylogeny and embryo sac evolution in the endemic australasian Papilionoid tribes Mirbelieae and Bossiaeeae. Pages 253-268 *in* Advances in Legume Systematics, part 10 (B. B. Klitgaard, and A. Bruneau, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.

Cuadrado, A., and N. Jouve. 1995. Fluorescent in situ hybridization and C-banding analyses of highly repetitive DNA sequences in the heterochromatin of rye (*Secale montanum* Guss.) and wheat incorporating *S. montanum* chromosome segments. Genome 38:795-802.

De Candolle, P. 1825. Leguminosae. Prodromus 2:234-489.

De Pinna, M. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. Cladistics 7:367-394.

De Queiroz, L. P., R. H. Fortunato, and A. M. Giulietti. 2003. Phylogeny of the Diocleinae (Papilionoideae: Phaseoleae) based on morphological characters. Pages 303-324 *in* Advances in Legume Systematics, Part 10 (B. B. Klitgaard, and A. Bruneau, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.

Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. Ecology 26.

Dolphin, K., R. Belshaw, C. Orme, and D. Quicke. 2000. Noise and incongruence: Interpreting results of the incongruence length difference test. Molecular Phylogenetics and Evolution 17:401-406.

Doucrick, R. L., J. S. Heslop-Harrison, C. D. Nelson, T. Schmidt, W. L. Nance, and T. Schwarzacher. 1995. Karyotype of slash pine (*Pinus elliotti* var *elliotti*) using patterns of fluorescence in situ hibridization and fluochrome banding. Journal of Heredity 86:289-296.

Doyle, J. J. 1995. DNA data and legume phylogeny: a progress report. Pages 11-30 *in* Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny (M. D. Crisp, and J. J. Doyle, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.

Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19:11-15.

Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1993. Chloroplast DNA phylogeny of the papilionoid legume tribe Phaseoleae. Systematic Botany 18:309-327.

Doyle, J. J., J. A. Chappill, C. Donovan Bailey, and T. Kajita. 2000. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and non-molecular data. Pages 1-20 *in* Advances in Legume Systematics, part 9 (P. S. H. a. A. Bruneau, ed.) Royal Botanic Gardens, Kew.

Doyle, J. J., J. L. Doyle, J. Ballenger, E. E. Dickson, T. Kajita, and H. Ohashi. 1997. A phylogeny of the chloroplast gene rbcL in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. American Journal of Botany 84:541-554.

Farris, J. 1970. Methods for computing Wagner trees. Systematic Zoology 19:83-92.

Farris, J. 1977. Phylogenetic analysis under Dollo's Law. Systematic Zoology 26:77-88.

Farris, J. 1982. Outgroups and Parsimony. Systematic Zoology 31:328-334.

Farris, J. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. Pages 7-36 *in* Advances in Cladistics (N. Platnick, and V. Funck, eds.). Columbia Uni. Press, New York.

Farris, J. 1989. The retention index and rescaled consistency index. Cladistics 5:417-419.

Farris, J., Kallersjo, M, Kluge, AG, Bult, C. 1994. Testing significance of incongruence. Cladistics 10:315-319.

Fernández, A. 1977. Números cromosómicos en Angiospermas. Hickenia 15:83-86.

Fortunato, R. 1994. *Galactia burkartii* Fortunato; una nueva especie del género Galactia P. Browne (Phaseoleae-Fabaceae). Candollea 49:257-260.

Fortunato, R. H. 1995. A new species of Collaea (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae: Diocleinae) from Brazil. Kew Bulletin 50:795-799.

Fougere-Danezan, M., S. Maumont, and A. Bruneau. 2003. Phylogenetic relationships in resin-producing Detarieae inferred from molecular data and preliminary results for a biogeographic hypothesis. Pages 161-180 *in* Advances in Legume Systematics, part 10 (B. B. Klitgaard, and A. Bruneau, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.

Frahm-Leliveld, J. A. 1960. Chromosome numbers in leguminous plants. Acta Bot Neerland 9:327-329.

García, R. C. 1989. Una novedad en el género *Collaea* (Fabaceae, Phaseoleae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 26:136-137.

Gerlach, W. L., and J. R. Bedbrook. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucleic Acids Research 7:1869-1885.

Gielly, L., and P. Taberlet. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. Molecular Biology and Evolution 11:769-777.

Givnish, T. J., and K. J. Sytsma. 1998. Homoplasy in molecular *versus* morphological data: The likelihood of correctbphylogenetic inference. Cambridge University Press, Cambridge.

Goldblatt, P. 1981. Cytology and the Phylogeny of Leguminosae. Pages 427-463 *in* Advances in Legume Systematics, Part 1 (R. M. P. a. P. H. Raven, ed.) Royal Botanic Gardens, Kew.

Goloboff, P. A. 1993. Estimating character weights during tree search. Cladistics 9:83-91.

Goloboff, P. A. 1996. NONA ver 2.0. INSUE, Fundación e Instituto Miguel Lillo.

Goloboff, P. A. 1998. Principios básicos de la cladística. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires.

Goloboff, P. A., J. Farris, and K. C. Nixon. 2003. T. N. T.: Tree Analysis Using New Technology.

González, D. 1997. El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. Boletín de la Sociedad Botánica de México 60:137-157.

Gottlieb, A. M., G. C. Giberti, and L. Poggio. 2005. Molecular analyses of the genus Ilex (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data. American Journal of Botany 92:352-369.

Grisebach, A. 1874. Plantae Lorentzianae. Abh. Königl. Ges. Wiss. Göttingen 19:77-78.

Hagen, L. S., B. Khadari, P. Lambert, and J.-M. Audergon. 2002. Genetic diversity in apricot revealed by AFLP markers: species and cultivar comparisons. Theoretical and Applied Genetics 105:298-305.

Han, T., D. J. Marjo, H. van Eck, and E. Jacobsen. 2000. Genetic diversity of Chilean and Brazilian *Alstroemeria* especies assesed by AFLP Analysis. Heredity 84:564-569.

Hedges, S. B., and L. Maxson. 1996. Molecules and Morphology in amniote phylogeny. Molecular Phylogenetics and Evolution 6:312-314.

Hennig, W. 1968. Sistemática Filogenética. Eudeba, Buenos Aires.

Heslop-Harrison, J. S. 2000. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. The Plant Cell 12:617-635.

Hu, J., M. Lavin, M. F. Wojciechowski, and M. Sanderson. 2002. Phylogenetic analysis of nuclear ribosomal ITS/5.8 S sequences in the tribe Millettieae (Fabaceae): *Poecilanthe-Cyclolobium*, the core Millettieae, and the *Callerya* group. Systematic Botany 27:722-733.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. soc. Vaud. Sci. Nat:223-270.

Johnson, L. A., and D. E. Soltis. 1994. *mat*K DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. s. Systematic Botany 19:143-156.

Kaas, E., and 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.

Kaas, E., and M. Wink. 1997. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (Familiy Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbc-L) and ncDNA (ITS1 and 2). Molecular Phylogenetics and Evolution 8:65-88.

Kajita, T., H. Ohashi, Y. Tateishi, C. D. Bailey, and J. J. Doyle. 2001. rbcL and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and Allies. Systematic Botany 26:515-536.

Källersjö, M., Farris, JS, Kluge, AG, Bult, C. 1992. Skewness and permutation. Cladistics 8.

Kardolus, J. P., H. J. van Eck, and R. G. van den Berg. 1998. The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (Solanaceae). Plant Systematics and Evolution 210:87-103.

Kiers, A. M., T. H. Mes, R. Van der Meijden, and K. Bachmann. 2000. A search for diagnostic AFLP markers in Cichorium species with emphasis on endive and chicory cultivar groups. Genome 43:470-476.

Kluge, A. G., and J. S. Farris. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Systematic Zoology 18:1-32.

Koopman, W. J. M. 2005. Phylogenetic signal in AFLP data sets. Systematic Biology 54:197-217.

Koopman, W. J. M., M. J. Zevenbergen, and R. G. van den Berg. 2001. Species relationships in *Lactuca s.l.* (Lactuceae, Asteraceae) inferred from AFLP fingerprints. American Journal of Botany 88:1881-1887.

Krapovickas, A. 1965. Recuentos cromosómicos de Leguminosae. Kurtziana. 2:91-94.

Kumar, P. S., and T. Hymowitz. 1989. Where are the diploid (2n = 2x = 20) genome donors of *Glycine* Willd. (Leguminosae, Papilionoideae)? Euphytica 40:221-226.

Lackey, J. A. 1981. Phaseoleae. Pages 301-327 *in* Advances in Legume Systematics, part 1 (R. M. P. a. P. H. Raven, ed.) Royal Botanic Gardens, Kew.

Lanyon, S. 1985. Detecting internal inconsistencies in distance data. Systematic Zoology 34:397-403.

Lavaina, U. C. 1998. Fluorescence in situ hybridization in genome, chromosome and gene identification in plants. Current Science 74:126-133.

Lee, M. 2001. Uninformative Characters and Apparent Conflict Between Molecules and Morphology. Molecular Biology and Evolution 18:676-680.

Levan, A. K., K. Fredga, and A. SANDBERG. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52:201-220.

Lewis, G. P., B. D. Schrire, and M. Mackinder. 2005. Legumes of the world, first edition. The Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Lewis, W. H., H. L. Stripling, and R. G. Ross. 1962. Chromosome numbers for some angiosperms of the southern United States and Mexico. Rhodora 64:147-161.

Lipscomb, D. 1998. Basics of Cladistic Analysis. George Washington University, Washington D.C.

Liu, J., and C. Schardl. 1994. A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. Plant Molecular Biology 26:775-778.

Loh, J. P., R. Kiew, O. Set, L. Huat Gan, and Y. Y. Gan. 2000. A study of genetic variation and relationships within the bamboo subtribe Bambusinae using amplified fragment length polymorphism. Annals of Botany 85:607-612.

Mace, E. S., R. N. Lester, and C. G. Gebhardt. 1999. AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L., and wild relatives (Solanaceae). Theoretical and Applied Genetics 99:626-633.

Maddison, D. 1991. The discovery and importance of multiple islands of most parsimonious trees. Systematic Zoology 40:315-328.

Marcucci- Poltri, S. 1998. Caracterización molecular y cariotípica de la variabilidad genética de germoplasma argentino en *Solanum* L.*in* Facultad de Cs. Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Martínez-Ortega, M. M., L. Delgado, D. C. Albach, J. A. Elena-Roselló, and E. Rico. 2004. Species Boundaries and Phylogeographic Patterns in Cryptic Taxa inferred from AFLP markers: *Veronica* subgen. *Pentasepalae* (Scrophulariaceae) in the western Mediterranean. Systematic Botany 29:965-986.

Maxwell, R. H. 1970. The genus *Cymbosema* (Leguminosae): notes and distribution. Annals Missouri Botanical Gardens 57:252-257.

Maxwell, R. H., and D. W. Taylor. 2003. Phylogenetic relationships of the Diocleinae with particular emphasis on the subgroups of *Dioclea*. Pages 325-353 *in* Advances in Legume Systematics, Part 10 (B. Klitgaard, and A. Bruneau, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.

Mayol, M., and J. A. Rosselló. 2001. Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus*. Molecular Phylogenetics and Evolution 19:167-176.

Milbourne, D., R. Meyer, J. E. Bradshow, E. Baird, N. Bonar, J. Provan, W. Powell, and R. Waugh. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Molecular Breeding 3:127-136.

Morgenstern, B., A. Dress, and T. Werner. 1996. Multiple DNA and protein sequence alignment based on segment-to-segment comparison. Proceedings of the National Academy of science 93:12098-12103.

Naranjo, C., M. R. Ferrari, A. M. Palermo, and L. Poggio. 1998. Karyotype, DNA content and meiotic behaviour in five south american species of *Vicia* (Fabaceae). Annals of Botany 82:757-764.

Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of science 76:5269-5273.

Neves, N., M. Silva, J. S. Heslop-Harrison, and W. Viegas. 1997. Nucleolar dominance in triticales: control by unlinked genes. Chromosome Research . 5:125-131.

Nixon, K. C. 1999. The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. Cladistics 15:407-414.

Nixon, K. C., and J. M. Carpenter. 1993. On outgroups. Cladistics 9:413-426.

Nixon, K. C., and J. M. Carpenter. 1996. On simultaneous analysis. Cladistics 12:221-241.

Palmer, J.D., Michaels H.J., Chase, M.W. and J.R. Manhart. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden 75:1180-1206.

Pennington, R. T., M. Lavin, H. Ireland, B. Klitgaard, J. Preston, and J. Hu. 2001. Phylogenetic relationships of basal papilionoid legumes based upon sequences of the chloroplast *trn*L intron. Systematic Botany 26:537-556.

Poggio, L. 1996. Algunos aportes a la citogenética y a la especiación vegetal. Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas y Naturales 48:79-92.

Polhill, R. M. 1994. Classification of the Leguminosae & Complete synopsis of legume genera. Pages 35-57 *in* Phytochemical Dictionary of the Leguminosae (F. A. Bisby, J. Buckingham, and J. B. Harborne, eds.). Chapman & Hall, London.

Polhill, R. M., P. H. Raven, and C. H. Stirton. 1981. Evolution and systematics of the leguminosae. Pages 1-26 *in* Advances in Legume Systematics, Part 1 (R. M. Polhill, and P. H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.

Pritchard, D. A. J., and K. F. Gould. 1964. Chromosome numbers in some introduced and indigenous legumes and grasses. Div. Trop. Pastures Tech. Pap. (C. S. I. R. O., Australia) 2:18 pp.

Raina, S. N., and Y. Mukai. 1999. Detection of a variable number of 18S-5.8S-26S and 5S ribosomal DNA loci by fluorescent in situ hybridization in diploid and tetraploid *Arachis* species. Genome 42:52-59.

Raven, P. H. 1975. The bases of angisperm phylogeny: Cytology. Annals Missouri Botanical Gardens 62:724-764.

Rolph, F. J. 1998. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.0. Exeter Software.

Romero Zarco, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon 35:526-530.

Rundel, P. W. 1989. Ecological success in relation to plant form and function in the woody legumes. Pages 377-398 *in* Advances in Legume Biology (C. H. Stirton, and J. L. Zarucchi, eds.).

Schubert, I., and U. Wobus. 1985. In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. Chromosoma 92:143-148.

Sede, S. M., R. Dezi, E. Greizerstein, R. Fortunato, and L. Poggio. 2003. Chromosome studies in the complex Galactia-Collaea-Camptosema (Diocleinae, Phaseoleae, Papilionoideae, Fabaceae). Caryologia 56:295-301.

Seijo, G., and R. Vanni. 1999. Números cromosómicos en leguminosas de Paraguay. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 34:119-122.

Simmons, M. P., and H. Ochoterena. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. Systematic Biology 49:369-381.

Široký, J., M. A. Lysák, J. Doležel, E. Kejnovský, and B. Vyskot. 2001. Heterogeneity of rDNA distribution and genome size in *Silene* spp. Chromosome Research . 9:387-393.

Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.

Sokal, R. R., and C. D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Scientific Bulletin:1409-1438.

Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1981. Biometry, 2nd edition edition. W. H. Freeman and Company, New York.

Soltis, D. E., and P. S. Soltis. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. Pages 1-42 *in* Molecular Systematics of Plants II: DNA sequencing (D. E. Soltis, P. S. Soltis, and J. J. Doyle, eds.). Kluwer Academic Publishers.

Sullivan, J. 1996. Combining data with different distributions of among-site rate variation. Systematic Biology 35:470-488.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology 17:1105-1109.

Taketa, S., H. Ando, K. Takeda, and R. von Bothmer. 2001. Physical locations of 5S and 18S-25S rDNA in Asian and American diploid *Hordeum* species with the I genome. Heredity 86:522-530.

Taubert, P. 1894. *in* Die natürlichen Pflanzenfamilien (A. Engler, and K. Prantl, eds.). Engelmann, Leipzig.

Thuan, N. V. 1975. Contribution á l'étude caryo-taxinomique des Phaséolées. Rev. gén. Bot 82:157-214.

Tosto, D. S., and H. E. Hopp. 2000. Suitability of AFLP markers for the study of genomic relationships within the *Oxalis tuberosa* alliance. Plant Systematics and Evolution 223:201-209.

Turner, B. L. 1956. Chromosome numbers in the Leguminosae. I. American Journal of Botany 43:577-581.

Turner, B. L., and H. S. Irwin. 1961. Chromosome numbers of some brazilian Leguminosae. Rhodora 63:16-19.

Turner, B. L., and O. S. Fearing. 1960. Chromosome numbers in the Leguminosae. III. Species of the southwestern United States and Mexico. American Journal of Botany 47:603-608.

Varela, E. S., J. Lima, A. S. Galdino, L. da S. Pinto, W. M. Bezerra, E. P. Nunes, M. A. Alves, and T. B. Grangeiro. 2004. Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae, Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. Phytochemistry 65:59-69.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van der Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23:4407-4414.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 *in* PCR protocols: a guide to methods and applications (M. Innis, D. Gelfand, J. Sminsky, and T. White, eds.). Academic Press, San Diego, California.

Winfield, M. O., G. M. Arnold, F. Cooper, A. Le Ray, J. WHite, A. Karp, and K. J. Edwards. 1998. A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. Molecular Ecology 7.

Wojciechowski, M. F. 2003. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. Pages 5-35 *in* Advances in Legume Systematics, part 10 (B. B. Klitgaard, and A. Bruneau, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.

Wojciechowski, M. F., M. Lavin, and 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.

Yeh, M., F. Maekawa, and H. Yuasa. 1983. Chromosome numbers of the tribe Phaseoleae, Leguminosae. Res. Inst. Evol. Biol. Sci. Rep. 2:37-44.

APÉNDICES

APÉNDICE 1.1

Composición taxonómica de la subfamilia Papilionoideae:

Adesmieae
Aeschynomenae
Amorpheae
Genisteae
Euchresteae
Thermopsideae
Crotalarieae
Liparieae
Podalyrieae
Hypocalypteae
Bossiaeeae
Mirbelieae
Brongnartieae
Milletieae
Phaseoleae
Abreae
Desmodieae
Psoraleeae
Indigofereae
Carmichaelieae
Cicereae
Hedysaereae
Trifolieae
Vicieae
Loteae
Coronilleae
Galegeae
Robinieae
Swartzieae
Sophoreae
Dipterygeae

Composición taxonómica de la tribu Phaseoleae:

Clitoriinae
Cajaninae
Kenediinae
Phaeolinae
Diocleinae
Glycininae
Erythrininae
Ophrestiinae

APÉNDICE 2.1

Solución de 8-hidroxi-quinoleína 0,002M
Se calienta el agua bidestilada a 50-60 ºC y luego se coloca la 8-hidroxi-quinoleína en agitador en oscuridad hasta que se disuelve completamente. Se almacena en heladera en frasco color caramelo.

Solución de hematoxilina acética 2% (p/v)
Se disuelve la hematoxilina en una solución acuosa al 45% de ácido acético glacial. Se almacena de 15 a 20 días en frasco color caramelo antes de su utilización.

Solución de citrato férrico 1% (p/v)
Se coloca el citrato férrico en una solución acuosa al 45% de ácido acético glacial. Se calienta en agitación hasta disolver completamente. Se deja enfriar, se filtra y se almacena en frasco color caramelo.

Colorante de Feulgen
1 g de fucsina básica (Merck)
1,9 g de metabisulfito de sodio (Merck)
100 ml de ácido clorhídrico 0,15 N
2 g de carbón activado
Se disuelve el metabisulfito de sodio en HCl y luego se agrega la fucsina básica. Luego de 2 horas en agitación a temperatura ambiente y oscuridad se agrega el carbón activado y se filtra. Si la solución no queda transparente, se agrega nuevamente carbón activado y se vuelve a filtrar. Se almacena en heladera, en frasco color caramelo.

Buffer ácido cítrico-citrato de sodio (pH 4,8)
Solución A: solución de ácido cítrico monohidratado 0,1M
Solución B: solución de ácido trisódico bihidratado 0,1M
Solución stock (10x): 40 ml de solución A + 60 ml de solución B

Solución enzimática
Soluciones en buffer ácido cítrico-citrato de sodio
Solución A: solución de celulasa (Calbiochem) al 2% (p/v) + pectinasa (SIGMA) al 20% (v/v)
Solución B: solución de celulasa (Ozonuka RS) al 2% (p/v) + pectinasa (SIGMA) al 20% (v/v)
Solución de trabajo: 4 partes de A + 1 parte de B. Se guarda a –20 ºC

Medio LB
Bacto-triptona 10 g
Extracto de levadura 5 g
Cloruro de sodio 10 g
Agua destilada 1 l
Se ajusta el pH a 7 con Hidróxido de sodio y se esteriliza.
La ampicilina se agrega una vez frío a una concentración final de 100 µg/ml.

Conservación de la sonda en 'stabs'
En un tubo Eppendorff® de 1,5 ml estéril, se colocan 350 µl de medio líquido LB estéril y 150 µl de glicerol tindalizado. Luego se agregan 500 µl del cultivo bacteriano suavemente, se coloca en hielo y se conserva a –80 ºC.

Paraformaldehído 4%
Se agregan 4 g de paraformaldehído en 100 ml de agua. Se calienta en agitación hasta que la temperatura llegue a 60 ºC y la solución adquiera aspecto lechoso. Se deja enfriar y a temperatura ambiente se añaden 2 ml de NaOH 1M. Se agita la solución hasta que el color se aclare.

Formamida desionizada
Se mezclan 500 ml de formamida (Fluka) y 50 g de resina (AG501-X8 (D) BioRad) en agitación durante una hora. Se filtra con papel de filtro común y se almacena alicuotada a -20 ºC.

Sulfato de dextrano
Se prepara al 50% (p/v) en agua destilada y se esteriliza por filtración.

20x SSC
Se disuelven 175,3 g de cloruro de sodio y 88,2 g de citrato de sodio en 800 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 7 con una solución de hodróxido de sodio 10M. Se completa el volumen a 1 l. Se fracciona en alícuotas y se esteriliza en autoclave.

SDS 10%
Se disuelven 100 g de SDS en 900 ml de agua destilada. Se calienta a 70 ºC para ayudar a la disolución. Se ajusta el pH a 7,2 con HCl concentrado. Se completa el volumen a 1 l y se fracciona en alícuotas. No se esteriliza.

Coloración con DAPI
Solución stock: 0,2 mg/ ml de 4'6' diamino-2-fenilindol (SIGMA) en agua bidestilada.
Solución de trabajo: 0,001 mg/ml (25 µl de solución stock en 5 ml de Buffer Mc Ilvaine).
Ambas se conservan a –20 ºC.

Buffer Mc Ilvaine (pH 7)
Solución A: ácido cítrico monohidratado 0,1 M
Solución B: fosfato de sodio (PO_4HNa) 0,2 M
Solución de trabajo: 8,8 ml de Sc A + 41,2 ml de Sc B

Solución de nitrato de plata (pH 5,5)
Se disuelven 1,5 g de $AgNO_3$ en 10 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH con ácido fórmico a 5,5. Se conserva a temperatura ambiente en frasco color caramelo.

Revelador
Hidroquinona 1%: formaldehído 10% (1:1)
Se disuelven 2,5 g de hidroquinona en 430 ml de agua destilada. Se agregan 70 ml de formaldehído 37%. Se conserva a temperatura ambiente en frasco color caramelo.