



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
SISTEMÁTICA

**SISTEMÁTICA DEL GRUPO DESMODIUM PROCUMBENS**  
**(LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE) EN MÉXICO.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA  
**ROCÍO VERÓNICA GONZÁLEZ VÁZQUEZ**

**TUTOR PRINCIPAL: Dr. Alfonso O. Delgado Salinas**  
Instituto de Biología

**COMITÉ TUTOR: Dr. Daniel Piñero Dalmau**  
Instituto de Ecología

**M. en C. Laura M. Márquez Valdelamar**  
Instituto de Biología

**MÉXICO, D.F., MARZO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de diciembre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GONZÁLEZ VÁZQUEZ ROCÍO VERÓNICA** con número de cuenta **300157880** con la tesis titulada "**Sistemática del grupo *Desmodium procumbens* (Leguminosae - Papilionoideae) en México**", realizada bajo la dirección del **DR. ALFONSO OCTAVIO DELGADO SALINAS**:

Presidente: DR. DAVID SEBASTIAN GERNANDT  
Vocal: DRA. JENY SOLANGE SOTUYO VÁZQUEZ  
Secretario: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU  
Suplente: DRA. ELIA RAMÍREZ ARRIAGA  
Suplente: M. EN C. LAURA MARGARITA MÁRQUEZ VALDELAMAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de febrero de 2014.

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por otorgar el financiamiento para la realización de mis estudios de maestría.

A los miembros de mi Comité Tutor, Dr. Alfonso O. Delgado Salinas, Dr. Daniel Piñero Dalmau y a la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar por las recomendaciones, comentarios y el apoyo recibidos durante la realización de este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Alfonso O. Delgado Salinas por darme la oportunidad de ser su alumna, por compartir sus conocimientos conmigo y darme la gran oportunidad de aprender algo por todo su apoyo y por confiar en mi.

A cada uno de los miembros del jurado, el Dr. David Gernandt, Dr. Daniel Piñero Dalmau, Dra. Jeny Sotuyo Vázquez, Dra. Elia Ramírez Arriaga y a la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar por las sugerencias y observaciones hechas para enriquecer este trabajo.

A la M. en C. María Leticia Torres Colín, por facilitarme los conocimientos básicos sobre el grupo *Desmodium procumbens* y el trabajo palinológico, por el apoyo, la confianza y la amistad.

A la Dra. Jeny Solange Sotuyo Vázquez y a la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar, por darme la orientación básica para poder trabajar en el Laboratorio de Sistemática Molecular.

A la Dra. Mariana Pérez Escobar por compartir conmigo sus conocimientos, por los consejos, apoyo y ayuda con el trabajo en el Laboratorio de Sistemática Molecular y por darme la confianza y brindarme su amistad.

Al Dr. David Gernandt por sus enseñanzas y por su ayuda para la realización de los análisis de las secuencias. Por su paciencia, apoyo y amistad.

Al Dr. Carlos Castillejos Cruz por los comentarios hechos para mejorar este escrito. Por tu amistad, por tus consejos y por tus palabras de aliento.

Al Dr. Pedro Mercado Ruaro por su ayuda y apoyo brindado para realizar los conteos cromosómicos.

A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias del Laboratorio de Microscopía Electrónica y Fotografía de la Biodiversidad del Instituto de Biología por su ayuda en la toma de fotografías con el microscopio electrónico de barrido.

A la Dra. Elia Ramírez Arriaga y al Dr. Enrique Martínez del Laboratorio de Palinología del Instituto de Geología de la UNAM, por el apoyo brindado para realizar la parte palinológica de este trabajo.

A la Dra. Lourdes Agredano Moreno y al Dr. Luis Felipe Jiménez García del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

A mi familia, por su apoyo incondicional en todo momento.

A todos y cada uno de los que directa e indirectamente contribuyeron en este trabajo, con su apoyo incondicional, palabras y consejos durante esta ardua etapa que incluyó situaciones personales difíciles: José Antonio López Millán, Fernando Guerra Correa, Biol. Miguel Castañeda Zarate, Biol. Eliseo Bravo Acevedo, Jesús Salgado Vázquez.

## CONTENIDO

	Pág.
Resumen	
Abstract	
Introducción.....	
I Antecedentes.....	4
1.1 Familia Leguminosae.....	4
1.2 Tribu Desmodieae.....	6
1.3 Género <i>Desmodium</i> .....	8
1.4 Estudios cariológicos.....	13
1.5 Estudios morfológicos de plántulas.....	16
1.6 Estudios palinológicos.....	18
1.7 Estudios filogenéticos con evidencia molecular.....	20
II Método.....	24
2.1 Revisión de literatura.....	24
2.2 Localización de poblaciones y trabajo de campo.....	24
2.3 Cariología.....	25
2.4 Morfología de plántulas.....	26
2.5 Palinología.....	26
2.6 Análisis moleculares.....	27
2.6.1 Muestreo de especies.....	27
2.6.2 Extracción de ADN.....	28
2.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	28
2.6.4 Secuenciación.....	30
2.6.5 Alineamiento de las secuencias y análisis filogenéticos.....	30
III Resultados y Discusión.....	32
3.1 Cariología.....	32
3.2 Morfología de plántulas.....	34
3.3 Palinología.....	36
3.4 Estudios filogenéticos con evidencia molecular.....	49
IV Conclusiones.....	57
V Literatura citada.....	59
Apéndice A.....	66
Apéndice B.....	70
Apéndice C.....	72

## CUADROS

Número		Pág.
1.	Características distintivas y distribución de los taxa incluidos en el grupo <i>Desmodium procumbens</i> .	11
2.	Números cromosómicos de algunas especies del género <i>Desmodium</i> .	15
3.	Marcadores empleados en la amplificación de secuencias del grupo <i>Desmodium procumbens</i> .	28
4.	Programas de termociclado para la amplificación de secuencias.	29
5.	Números cromosómicos obtenidos en el análisis cariológico del grupo <i>Desmodium procumbens</i> .	32
6.	Dimensiones, forma, estructura y escultura de la exina de los granos de polen del grupo <i>Desmodium procumbens</i> .	37
7.	Características particulares de la escultura de los granos de polen del grupo <i>Desmodium procumbens</i> .	47
8.	Estadísticos de los árboles individuales y combinado para las regiones ITS y <i>psbA-trnH</i> .	50

## FIGURAS

Número		Pág.
1.	Caracteres morfológicos distintivos y sitios de recolecta de los miembros del grupo <i>Desmodium procumbens</i> .	12
2.	Posición y dirección de los oligonucleótidos empleados en este trabajo.	29
3.	Cromosomas mitóticos de <i>Desmodium procumbens</i> var. <i>procumbens</i> , <i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i> y <i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i> .	32
4.	Cromosomas mitóticos de <i>Desmodium procumbens</i> var. <i>transversum</i> y <i>D. neomexicanum</i> .	33
5.	Plántulas de <i>Desmodium neomexicanum</i> .	35
6.	Polen de <i>Desmodium procumbens</i> var. <i>procumbens</i> .	38
7.	Polen de <i>Desmodium procumbens</i> var. <i>exiguum</i> .	39
8.	Polen de <i>Desmodium procumbens</i> var. <i>longipes</i> .	41
9.	Polen de <i>Desmodium procumbens</i> var. <i>transversum</i> .	42
10.	Polen de <i>Desmodium neomexicanum</i> .	44
11.	Ultraestructura de la exina de <i>Desmodium procumbens</i> var. <i>procumbens</i> , <i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i> y <i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i> .	46
12.	Ultraestructura de la exina de <i>Desmodium procumbens</i> var. <i>transversum</i> y <i>D. neomexicanum</i> .	48
13.	Árbol de consenso estricto y uno de los árboles más parsimoniosos obtenidos en el análisis filogenético con la región nuclear ribosomal ITS.	51
14.	Árbol de consenso estricto y uno de los árboles más parsimoniosos obtenidos en el análisis filogenético con <i>psbA-trnH</i> .	53
15.	Árbol de consenso estricto y uno de los árboles más parsimoniosos obtenidos en el análisis filogenético combinando los conjuntos de datos de ITS y <i>psbA-trnH</i> .	54

## RESUMEN

Se realizó un estudio sistemático molecular del grupo *Desmodium procumbens* (Leguminosae-Papilionoideae) con distribución en la República Mexicana. Se realizaron conteos cromosómicos a partir de células meristemáticas de raíz, análisis morfológicos de plántulas, estudios palinológicos y análisis filogenéticos con la región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADN nuclear ribosomal y con el espaciador *psbA-trnH* del ADN del cloroplasto, con los objetivos de integrar esta información y aportar evidencia taxonómica, así como establecer las relaciones filogenéticas dentro del grupo *D. procumbens*. Todos los miembros del grupo *D. procumbens* tienen un número cromosómico de  $2n=22$ ; aunque en *D. neomexicanum* se observaron células polisomáticas. Sólo se pudo observar el desarrollo de las plántulas de *D. neomexicanum*, las cuales tienen germinación epigea con cotiledones foliáceos opuestos, las dos primeras hojas son simples y opuestas, las hojas del tercer nodo son trifolioladas y el cambio en la filotaxia de las hojas, de opuesto a alterno, se observó en su tercer nodo. En general, los granos de polen del grupo de estudio son tricolporados, suboblados a subprolados, radiales, con una exina tectada, suprarugulada y con una estructura infratectal formada por gránulos y columelas. Algunos caracteres morfológicos como el grosor del margo, presencia o ausencia de fastigio y características particulares en su escultura, son compartidas por *Desmodium procumbens* var. *exiguum* y *Desmodium procumbens* var. *transversum*, sin embargo, la morfología del polen no aportó evidencia suficiente para hacer una clara delimitación entre los diferentes taxa. Los análisis moleculares resuelven parcialmente las relaciones filogenéticas entre los miembros del grupo *D. procumbens*. El análisis realizado con ITS aportó mayor resolución para el grupo, donde *Desmodium neomexicanum* se resolvió como grupo hermano del resto de los miembros del grupo; *D. procumbens* var. *longipes* debe de ser considerado como una especie diferente y *D. procumbens* var. *exiguum* y *D. procumbens* var. *transversum* deben de ser considerados como una sola entidad taxonómica, *D. procumbens* var. *exiguum*. El análisis llevado a cabo combinando ambas regiones confirmó los resultados anteriores; sin embargo, se requiere continuar con los estudios moleculares y morfológicos del grupo *D. procumbens* para complementar y confirmar los resultados obtenidos en este estudio.

## ABSTRACT

A molecular systematics study of the *Desmodium procumbens* group (Leguminosae-Papilionoideae) with distribution in Mexico was achieved. Chromosome counts from root meristem cells, seedling morphology and palynological studies were carried out; as well as phylogenetic analyses of ribosomal ITS and *psbA-trnH* spacer chloroplast DNA sequences to provide taxonomic evidence and phylogenetic relationships within the taxa of *D. procumbens* group. It was found that all members of *D. procumbens* group have a chromosome number of  $2n= 22$ ; although polisomatic cells were observed on species *D. neomexicanum*. Seedling morphology, however, only was examined on *D. neomexicanum*, which show epigeous with opposite foliar cotyledons, first two leaves or eophylls simple and opposite, on the third node the leaves are trifoliolate and a change in phyllotaxy, from opposite to alternate was observed. Overall, pollen grains of the study group are tricolporate, suboblate to subprolate, radial, exine with a suprarugulate tectum, and with infratectal structure composed by granules and columellae. While some morphological characters such as margo thickness, presence or absence of fastigium and unique features in sculpture, are only shared by *Desmodium procumbens* var. *exiguum* y *Desmodium procumbens* var. *transversum*, pollen morphology did not provide adequate evidence to draw a clear distinction between the different taxa. Molecular analysis partially resolved the phylogenetic relationships amongst members of *D. procumbens* group. The ITS analysis established a higher resolution hypothesis, where *D. neomexicanum* was resolved as sister group to all remaining members in the group; *D. procumbens* var. *longipes* should be treated as a species and *D. procumbens* var. *exiguum* and *D. procumbens* var. *transversum* should be considered as a single taxon. The analysis carried out by combining both regions confirmed the above results. However, a more detailed study of the *Desmodium procumbens* group with several more samples throughout its distribution would be required to validate the results obtained in this study.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de la subfamilia Papilionoideae, la tribu Desmodieae comprende aproximadamente 530 especies distribuidas en 30 géneros, dentro de las que se incluyen arbustos o frecuentemente hierbas y en ocasiones árboles, los cuales se distinguen principalmente por su tipo de fruto, que es un lomento. El género *Desmodium* se distribuye en regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo; es el más diverso de la tribu Desmodieae (Papilionoideae-Leguminosae) con cerca de 275 especies, de las cuales, aproximadamente 100 se encuentran en México, considerado uno de los centros de diversidad del género junto con el sureste de Asia y Brasil (Ohashi et al., 1981; 2005).

La característica distintiva del grupo *Desmodium procumbens* es la presencia de torsión en el lomento. Dentro de este grupo, Schubert (1940) incluyó a *D. procumbens* (Mill.) Hitchc. y a sus cuatro variedades, *D. procumbens* var. *procumbens* B.G. Schub., *D. procumbens* var. *exiguum* (A. Gray) B.G. Schub., *D. procumbens* var. *longipes* (Schindl.) B.G. Schub. y *D. procumbens* var. *transversum* (B.L.Rob. & Greenm.) B.G. Schub., así como a *D. neomexicanum* A.Gray, especie morfológicamente cercana al mismo. Este grupo morfológico presenta controversia en cuanto a su delimitación, debido a la variación en la forma de sus foliolos y proliferación de entidades infraespecíficas.

Debido a que las especies que integran el género *Desmodium* son altamente polimórficas y la clasificación e identificación de sus especies dependen principalmente de los caracteres del fruto (Ohashi, 1973; McVaugh, 1987), se han dejado de lado otras fuentes de información, como caracteres morfológicos de plántulas y de granos de polen, estructuras que solo se han estudiado en especies asiáticas del género (Ohashi, 1973); además, hasta el momento, no se han realizado análisis moleculares para establecer las relaciones filogenéticas de las especies incluidas en *Desmodium*. Por lo anterior, el presente estudio pretende aportar caracteres morfológicos de plántulas y de polen, así como evidencia molecular de las especies mexicanas del grupo *D. procumbens* para esclarecer la situación del mismo.

## I ANTECEDENTES

### 1.1 FAMILIA LEGUMINOSAE

La familia Leguminosae o Fabaceae es una de las 3 más diversas dentro de las angiospermas después de las orquídeas (Orchidaceae) y las compuestas (Asteraceae), con 750 géneros y aproximadamente 19,500 especies. Son plantas de amplia distribución y se encuentran desde bosques húmedos a desiertos, de tierras bajas a regiones alpinas y pocas de ellas son acuáticas, presentan su mayor diversidad en las regiones cálidas y templadas. Las leguminosas incluyen una gran variación en casi cualquiera de sus atributos y van desde pequeñas hierbas anuales a arbustos, bejucos, enredaderas y árboles. Además, son uno de los componentes principales de cualquier tipo de vegetación y gran parte de ellas tienen la habilidad de colonizar zonas perturbadas y marginales debido a que la mayoría de las especies tienen la capacidad de fijar nitrógeno a través de nódulos de sus raíces (Doyle y Luckow, 2003; Lewis et al., 2005; LPWG, 2013).

La característica común de las leguminosas es el fruto o la legumbre, que generalmente se desarrolla a partir de un solo carpelo y presenta un lóculo con 2 a numerosos óvulos dispuestos en dos filas alternantes, en una sola placenta a lo largo de la sutura adaxial. El tipo más común de legumbre dentro de la familia es la que posee una dehiscencia elástica en la que las valvas son higroscópicas y conforme el fruto se seca, la presión aumenta, provocando que se enrosquen y separen lanzando sus semillas. Sin embargo, este tipo de fruto básico en las leguminosas ha sido modificado para mostrar una gran diversidad de mecanismos de dispersión, que pueden ir de formas pequeñas con una semilla localizada dentro de una cámara endurecida, a legumbres leñosas de más de un metro de largo, que son dehiscentes o indehiscentes al madurar. En otros taxa, los frutos son más o menos duros e indehiscentes y sus semillas están rodeadas por una pulpa dulce o amarga que usualmente atraen aves o caen al suelo, como los frutos carnosos de *Tamarindus* e *Inga*. Muchas otras especies tienen frutos que al abrir, sus semillas arilladas o de colores brillantes quedan expuestas y contrastan con el color de sus valvas, atrayendo principalmente aves. Miembros de muchos géneros tienen frutos adaptados a la dispersión por viento, los cuales suelen ser indehiscentes, alados y con una o pocas semillas. Dentro de esta gran variedad, también se presentan frutos articulados denominados lomentos, los cuales se dividen en segmentos que contienen una semilla; por ejemplo, *Aeschynomene* y *Desmodium* presentan lomentos

que se rompen transversalmente y frecuentemente están cubiertos con cerdas o pelos uncinados que sirven para adherirse al pelaje o piel de diferentes animales y con ello, ser transportados. Las semillas de algunas especies de *Acacia* suelen ser dispersadas por hormigas (Doyle y Luckow, 2003; Lewis et al., 2005; Judd et al., 2008).

Las flores de Fabaceae son extremadamente variables en tamaño, forma y coloración. Dentro de la familia, existen grupos con flores relativamente grandes, atractivas y generalmente con 10 estambres; en otros taxa, estas estructuras presentan una corola reducida y numerosos estambres, que son la parte más vistosa de las mismas. En otros grupos, se desarrollan flores con la corola en forma de “mariposa”, comúnmente denominadas papilionadas o papilionoides, las cuales presentan una simetría bilateral especializada, al contar con un pétalo conspicuo o estandarte, cuya función principal es atraer al polinizador, dos pétalos laterales o alas y la quilla, formada por dos pétalos fusionados que encierra las estructuras reproductoras de la flor. Por otro lado, algunas especies de leguminosas ofrecen néctar a los polinizadores como recompensa por transportar el polen de una flor a otra y asegurar la polinización, la cual puede realizarse por una multitud de organismos, como abejas, avispas, hormigas, mariposas, moscas, escarabajos, aves y murciélagos, sin mencionar que existen plantas que se autopolinizan. En las flores papilionadas la polinización por abejas es la más común; al llegar la abeja a la flor para tomar el néctar, ejerce presión sobre las alas y los pétalos de la quilla, provocando que su androceo y gineceo se pongan en contacto con la parte inferior del insecto, lo que ocasiona que las anteras depositen su polen en el insecto y que además, el estigma tenga contacto con el polen de otras plantas que es transportado por el insecto (Lewis et al., 2005; Judd et al., 2008).

Los miembros de la familia Leguminosae contribuyen enormemente a la economía del mundo debido a su amplia diversidad, abundancia y al ser utilizadas en una multitud de formas por los humanos, principalmente como plantas alimenticias, forrajeras y ornamentales; además, a partir de ellas se generan productos que destacan por su uso en la industria, como la obtención de maderas para la construcción, de celulosa para la elaboración de papel y de compuestos con interés farmacéutico y medicinal, combustibles y en procesos de fabricación de químicos y fertilizantes. Además, a partir de ellas se obtienen compuestos denominados gomas, utilizadas como emulsificantes y otras, se emplean como plantas tintóreas (Doyle y Luckow, 2003; Lewis et al., 2005).

El sistema de clasificación actual ubica a la familia Leguminosae dentro de las Eudicotiledóneas, en el clado denominado Rosides, dentro del linaje de las Fabides y en el orden Fabales, junto con Polygalaceae, Quillajaceae y Surianaceae, familias cercanamente relacionadas a ella (APG III, 2009).

La familia Leguminosae está formada por tres subfamilias, Caesalpinioideae con 4 tribus y 2250 especies, dentro de la que se encuentran árboles, arbustos y bejucos, con hojas pinnadas y los nódulos en sus raíces son poco frecuentes. Dentro de la subfamilia Mimosoideae, se incluyen 4 tribus y 3270 especies de árboles, arbustos y bejucos, la mayoría de ellas con hojas bipinnadas, frecuentemente con glándulas especializadas y con nódulos generalmente presentes. La subfamilia más diversa, Papilionoideae, con 28 tribus y 13,800 especies, está integrada por hierbas, arbustos, bejucos y enredaderas, con hojas unifolioladas a una vez divididas, algunas de ellas presentan tendrillos.

Los análisis moleculares realizados en los últimos años con diferentes regiones del genoma del cloroplasto, como *rbcL*, *atpB*, *matK*, el intrón *trnL* y el gen nuclear 18S ADNr (APG, 1998; Doyle et al., 2000; Bruneau et al., 2001; Kajita et al., 2001; Wojciechowski et. al., 2004), indican que la familia Leguminosae es monofilética, lo que concuerda con las sinapomorfias morfológicas que la han caracterizado, como la presencia de solo carpelo que da origen a su fruto característico y óvulos parietales (Chappill, 1995). Por otro lado, en estos mismos análisis, se ha señalado que las subfamilias Mimosoideae y Papilinoideae son monofiléticas y se anidan dentro de Caesalpinioideae, que aparece como grupo parafilético.

## **1.2 TRIBU DESMODIEAE**

Dentro de la subfamilia Papilionoideae, la tribu Desmodieae comprende 30 géneros y aproximadamente 530 especies, dentro de las que se incluyen hierbas trifolioladas o arbustos y algunas veces árboles, los cuales se distinguen principalmente por su tipo de fruto, que es un lomento. En general, es considerada una tribu del viejo mundo; sin embargo, sus miembros se distribuyen en regiones tropicales, subtropicales y templado cálidas del mundo y pueden

extenderse hasta Australia y a regiones templado frías y subboreales del este de Asia y norte de América (Ohashi et al., 1981; Ohashi, 2005).

Ohashi et al. (1981) clasificaron a los taxa incluidos en Desmodieae en 3 subtribus, Lespedezinae, definida por presentar ovarios con un óvulo y flores con aurículas inflexas en su estandarte, la cual se distribuye principalmente en las regiones templadas del este de Asia y el norte de América; la subtribu Desmodiinae es más diversa en regiones tropicales del sur y sureste de Asia, pero puede extenderse hasta Australia y está poco representada en África, se caracteriza por presentar pelos uncinados y en ocasiones con pelos glandulares, estipelas presentes y en su ovario se desarrolla uno a muchos óvulos, y la tercer subtribu Bryinae, endémica del nuevo mundo, se caracteriza principalmente por tener pelos gloquidados y granos de polen periporados. Los mismos autores mencionan que el género *Brya*, había sido colocado en Aeschynomeneae, cerca de *Pictetia* por estar ambos armados; sin embargo, ubicaron a Bryinae dentro de Desmodieae debido a que sus flores presentan una liberación explosiva de sus granos de polen, característica distintiva de esta tribu.

Por otro lado, los resultados del estudio molecular realizado a aproximadamente 400 géneros de Leguminosae por Doyle et al. (1995) para determinar la presencia de regiones génicas en su ADN del cloroplasto, cuya ausencia se demostró previamente en algunas angiospermas (Downie et al., 1991; Downie y Palmer, 1992), demostraron que el marco de lectura abierto ORF184 y el intrón del gen *rpl2*, están ausentes en once de las 12 especies estudiadas pertenecientes a Desmodieae, con excepción del género *Brya*, de la subtribu Bryinae. Con base en este análisis, Bailey et al. (1997) llevaron a cabo el estudio para determinar la presencia de estas mismas regiones en los 26 géneros de la tribu Desmodieae. Sus resultados confirmaron la ausencia de la región ORF184 y del intrón *rpl2* en Desmodiinae y en los géneros *Campylotropis*, *Kummerowia* y *Lespedeza* de la subtribu Lespedeziinae; por otro lado, reafirman la presencia de ambas regiones para Bryinae, así como en dos géneros de Lespedeziinae, *Neocolletia* y *Phylacium*. Además, consideraron que con base en la distribución del intrón *rpl2*, Bryinae tiene mayor afinidad con Aeschynomeneae y mencionaron que, a pesar de que éstos grupos comparten algunas características morfológicas evidentes, Ohashi et al. (1981) colocaron a Bryinae dentro de Desmodieae por características de su indumento y por caracteres morfológicos de sus granos de polen. Así mismo, Kajita et al. (2001) destacaron que la tribu Desmodieae es polifilética al incluir

dentro de ella a Bryinae y los resultados de su análisis realizado con el gen *rbcL*, son consistentes con los realizados por Bailey et al. (1997); por lo que la pérdida de esta región del genoma del cloroplasto puede representar una sinapomorfia para un grupo central o “core Desmodieae”, que agrupa a Desmodiinae y Lespedeziinae.

Con base en los análisis moleculares antes mencionados, Ohashi (2005) removió a la subtribu Bryinae de la tribu Desmodieae y reubicó a los géneros *Neocollettia* y *Phylacium*, antes considerados dentro Lespedezineae, en la tribu Phaseoleae. Por otro lado, el mismo autor basado en resultados de los análisis moleculares realizados por Kajita et al. (2001), reconoce a las subtribus restantes de Desmodieae como 3 grupos filogenéticos, los grupos *Phylodium* y *Desmodium*, que corresponden a la subtribu Desmodiinae y el grupo Lespedeza, que incluye a la subtribu Lespedeziinae.

En cuanto al lomento de Desmodieae, está formado por un conjunto de artículos indehiscentes; sin embargo, en la tribu también se encuentran géneros con frutos que abren al madurar, se doblan o presentan artículos que se sobreponen, así como frutos formados por un solo artículo. Además, características como su textura, estructura de las suturas, particiones y presencia o ausencia de estípites varían considerablemente en los mismos (Ohashi et al., 1981); por lo que no es sorprendente que la morfología de su fruto domine la clasificación de la tribu Desmodieae y el énfasis en estos caracteres generalmente continúa a nivel genérico, provocando que este órgano sea esencial para la correcta identificación de la mayoría de las especies de *Desmodium*.

### 1.3 GÉNERO *Desmodium*

Dentro de la subtribu Desmodiinae, el género *Desmodium* se distribuye ampliamente en los trópicos y subtropicos del mundo, siendo más diverso en el sureste de Asia y México. Está formado por aproximadamente 275 especies, de las cuales cerca de 100 se encuentran en México. La subtribu incluye hierbas anuales o perennes, arbustos erectos o prostrados, con pelos uncinados, hojas usualmente trifolioladas o unifolioladas y su fruto es un lomento, usualmente indehiscente, comprimido o aplanado y con sus artículos coriáceos a pubescentes. Los miembros de este género

son mejor conocidos porque sus frutos y en ocasiones sus hojas y tallos, se adhieren firmemente a la ropa (Ohashi, 1973; 2005; McVaugh, 1987).

*Desmodium* muestra amplia diversidad en sus caracteres morfológicos y las especies que lo integran son altamente polimórficas, características por la que el género ha sido considerado como difícil y problemático; además, ha sido delimitado con base en combinaciones de diferentes caracteres y su concepto taxonómico ha cambiado en diferentes ocasiones, haciendo que su clasificación sea confusa y no refleje adecuadamente sus relaciones filogenéticas (Ohashi, 1973). La clasificación de este género y la identificación de sus especies dependen principalmente de los caracteres del fruto (McVaugh, 1987), dando menor importancia a caracteres morfológicos vegetativos y florales, los cuales deben de ser estudiados adecuadamente para aportar nuevas fuentes de información taxonómica que ayuden a delimitar los taxa.

De los grupos morfológicos del género *Desmodium*, uno de los que presenta mayor controversia en cuanto a su delimitación por su acentuado polimorfismo y proliferación de entidades infraespecíficas, es el denominado grupo D. procumbens. Schubert (1940) intentó aclarar algunas de las complejidades que rodean a las especies de *Desmodium procumbens* y propuso distintas combinaciones.

*Desmodium procumbens* es una especie morfológicamente variable con respecto a la forma de sus folíolos e indumento, así como por el hábito de la planta. Su característica distintiva es la presencia o ausencia de torsión en el lomento (Schubert, 1940; McVaugh, 1987). Dentro de esta especie, Schubert (1940) reconoció cuatro variedades (Cuadro 1), *D. procumbens* var. *procumbens* caracterizada por mantener consistencia en la forma de sus folíolos en un mismo individuo y presentar lomentos corto estipitados con 4-5 artículos. La segunda variedad, *D. procumbens* var. *longipes*, presenta lomentos integrados por numerosos artículos pequeños contorsionados, y ésta difiere de la primera por presentar pedicelos largos (de hasta 1.85 cm), flexuosos y filiformes, brácteas persistentes y raquis glabro a piloso (Fig. 1). Sin embargo, McVaugh (1987) indicó que para la región de Nueva Galicia la var. *procumbens* se reconoce más fácilmente por presentar una gran cantidad de pelos uncinados en la parte superior de sus tallos y eje de la inflorescencia. Del mismo modo, indicó que el carácter de brácteas persistentes o no persistentes y la longitud del pedicelo, parecen no ser útiles para separar estas variedades en Nueva Galicia.

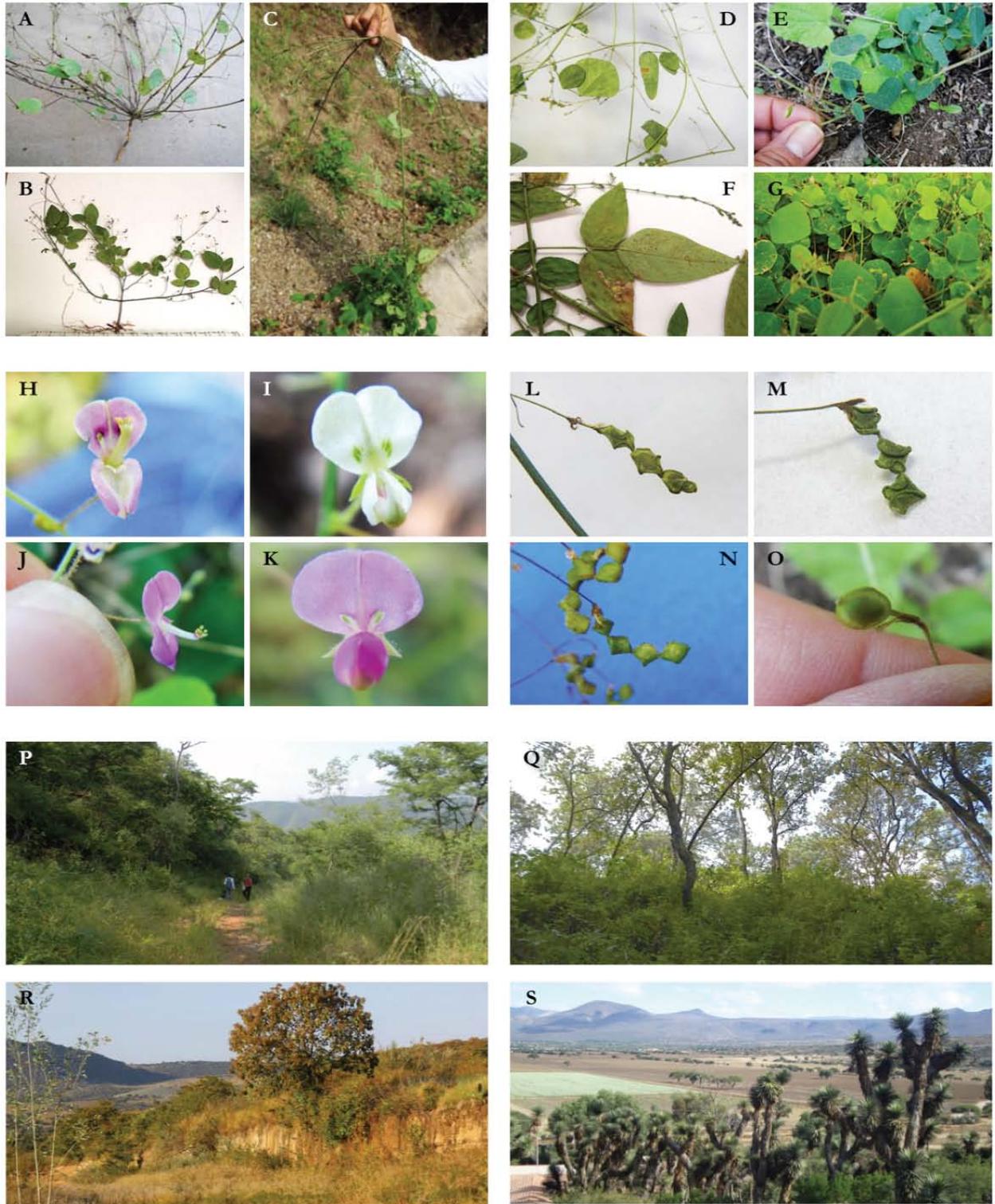
Las otras dos variedades reconocidas en el estudio de Schubert (1940), *Desmodium procumbens* var. *exiguum* y *D. procumbens* var. *transversum* difieren de las mencionadas arriba en la forma de sus folíolos, ya que en var. *transversum*, los folíolos basales son transversalmente elípticos, los cuales se mantienen con la misma forma en la parte superior de la planta, a diferencia de var. *exiguum*, cuyos folíolos de las hojas superiores generalmente son lineares o linear-lanceolados. Un segundo carácter de diferenciación, es que poseen lomentos estipitados, cuyos estípites van de 2.6-3.6 mm en var. *transversum* y de 1.4-3.4 mm en var. *exiguum* (Fig. 1, Cuadro 1). McVaugh (1987) mencionó que var. *transversum* es fácilmente reconocida del resto de las variedades propuestas por Schubert (1940), debido a sus lomentos largo-estipitados y porque sus hojas inferiores desarrollan folíolos transversalmente elípticos; sin embargo, también mencionó que su pubescencia es similar a la de var. *longipes*. Por otro lado, var. *exiguum* también presenta lomentos largo estipitados, pero difiere de var. *transversum* por tener folíolos superiores lineares a linear-lanceolados.

Dentro del grupo *Desmodium procumbens* también se encuentra *D. neomexicanum*, especie morfológicamente cercana al mismo, que se diferencia principalmente de *D. procumbens* por que los artículos de su lomento son planos y los dos terminales generalmente son glabros (Schubert, 1940) (Fig. 1L-O). Sin embargo, McVaugh (1987) mencionó que sus lomentos son cercanamente sésiles y que sus márgenes se enroscan exactamente de la misma forma que en *D. procumbens*, pero en menor grado. Por otro lado, plantas de *D. neomexicanum* se han encontrado asociadas con *D. procumbens* var. *transversum* y *D. procumbens* var. *longipes*, con las cuales se puede confundir fácilmente.

Así mismo, *Desmodium rosei*, *D. wigginsii* y *D. subrosum* suelen incluirse dentro del grupo *D. procumbens* al considerarse también como especies morfológicamente cercanas al mismo. *Desmodium rosei* presenta folíolos lineares y delgados, su lomento es corto estipitado y está formado por 3 a 4 artículos orbiculares. Por otro lado, *D. wigginsii* se distingue de sus parientes más cercanos, var. *procumbens* y *D. neomexicanum*, por la forma de sus folíolos, que son lineares a ovado lanceolados y mucronados; además, el artículo terminal de su lomento es triangular (Schubert, 1940). Recientemente, Nesom (1994) añade *D. subrosum* al grupo, la cual se caracteriza por desarrollar folíolos lineares a linear-lanceolado, su fruto está formado por 1-4 artículos biconvexos o aplanados.

**Cuadro 1.** Características distintivas y distribución de los taxa incluidos en el grupo *Desmodium procumbens* (Schubert, 1940).

	<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	<i>D. neomexicanum</i>	
Hábito	Postrada o erecta; generalmente ramificándose desde la base	Erecta	Postrada; ramificándose desde la base	Postrada; ramificándose desde la base	Erecta o postrada; usualmente ramificándose desde la base	
Hoja	Número de foliolos y posición	Superiores y basales con 3	Superiores y basales con 3	Superiores con 3 Basales con 1	Superiores con 3 Basales con 1	3; basales frecuentemente con 1
	Forma de foliolos y posición	Superiores y basales elípticos a ovados	Superiores y basales elípticos a anchamente ovados	Superiores y basales rómnicos o transversalmente elípticos	Superiores lineares a linear lanceolados; basales rómnicos o transversalmente elípticos	Superiores y basales lanceolados a lineares
Brácteas	Deciduas	Persistentes	Persistentes	Deciduas	Persistentes	
Pedicelo	Grueso	Largo flexuoso, filiforme	Grueso	Grueso	Grueso	
Lomento	Subestipitado, 4-6 artículos contorsionados	Sésil o subestipitado, 3-5 (-6) artículos contorsionados	Largo estipitado (2.2- 3.6mm), 2-4 artículos contorsionados	Largo estipitado (1.4- 3.4mm), 2-3 artículos contorsionados	Sésil a subestipitado, artículos (2-) 4-5, aplanados; los dos últimos glabros	
Distribución	Sin, Nay, Jal, Col, Gro, Méx, Oax, Yuc Chis hasta Sudamérica	Jal, Col, Mich, Méx, Ver hasta N de Sudamérica	Sin, Nay, Jal, Mich, Méx, Oax hasta N de Sudamérica	SW de EU, BC, Son, Jal, Gro, Oax hasta N de Sudamérica	Son, Chih, Coah, Dgo, Zac, Ags, Gto, Jal, SLP, Hgo, Pue, DF, Méx hasta Sudamérica	



**Fig. 1.** Caracteres morfológicos distintivos y sitios de recolecta de los miembros del grupo *Desmodium procumbens*. (A-C) Hábito. (D-G) Morfología de hojas. (H-K) Flores. (L-O) Frutos. (A,D,L) *D. procumbens* var. *exiguum*, (B,H,M) *D. procumbens* var. *longipes*, (C,F,I,N) *D. procumbens* var. *procumbens*, (E,O) *D. neomexicanum*, (G,J,K) *D. procumbens* var. *transversum*. (P) Sierra de Huautla, Mor. (Q) Autlán, Jal. (R) Estipac, Jal. (S) Cadereyta, Qro.

## 1.4 ESTUDIOS CARIOLÓGICOS

Los estudios citogenéticos son una herramienta importante que contribuye en la resolución de problemas taxonómicos y dentro de la sistemática, ayudan a comprender las variaciones genéticas involucradas en las relaciones evolutivas y filogenéticas entre diferentes grupos de plantas (Biondo et al., 2005; Silva et al., 2012). Por otro lado, el estudio de los números cromosómicos ha demostrado tener gran valor para la familia Leguminosae, ya que se han empleado para mejorar su clasificación, entender su evolución y junto con otras disciplinas, incrementar el conocimiento de su diversidad. Un ejemplo de esto, es la reestructuración de algunas tribus de la subfamilia Papilionoideae, como Desmodieae ( $x=11$ ) y Aeschynomenae ( $n=10$ ), las cuales fueron colocadas cerca de Phaseoleae, cuyo número cromosómico es  $n=11$  (Goldblatt, 1981).

Goldblatt (1981) consideró que el número cromosómico básico para la subfamilia Papilionoideae es  $x=14$ ; además, propuso que los miembros de esta subfamilia tuvieron su origen a partir de una especie poliploide de la subfamilia Caesalpinioideae, cuyo número básico ancestral fue  $x=7$ . Por otro lado, el número base  $x=11$  parece ser fundamental para la tribu Desmodieae, lo que hace que conteos en especies de *Ougeinia* ( $n=12$ ) y *Pseudarthria*, con registros de  $n=17$ , 13 y 11, se ajusten difícilmente con el número básico y sean considerados como erróneos. Dentro de esta tribu, también se encuentran géneros considerados como descendientes aneuploides, como *Alysicarpus* con  $x=8$  y *Lespedeza*, que cuenta con  $n=11$ , 10 y 9.

Uno de los primeros informes de conteos cromosómicos realizados para el género *Desmodium* fue el estudio de Kawakami (1930), quien reportó el número haploide de  $n=11$  para *D. perpesium*. Por otro lado, en el análisis citológico realizado por Cooper (1936) para determinar el número cromosómico de 13 especies pertenecientes a 7 géneros de leguminosas, se incluyó el número haploide ( $n=11$ ) de *D. grandiflorum*. Senn (1938) recopiló de trabajos previos, información sobre los números cromosómicos de 436 especies de 74 géneros de leguminosas, dentro de las que se incluyen *D. canadense* y *D. tortuosum* con  $n=11$ . En el estudio realizado por Young (1940) con 24 especies del género *Desmodium*, se menciona que el número  $n=11$  es común a todas las especies estudiadas y se indica que es diploide. Frahm-Leliveld (1953) realizó conteos cromosómicos en 36 especies de leguminosas tropicales, reportando el número  $2n=22$  para *D. leiocarpum*. Turner (1956) realizó conteos cromosómicos de 44 taxa de leguminosas, incluidas dos

especies de *Desmodium*, *D. rotundifolium* y *D. sessilifolium*, ambas con  $n= 11$ . Turner y Fearing (1960) realizaron conteos cromosómicos para 43 especies de Leguminosas de la región suroeste de Estados Unidos y México, de los cuales 42 son primeros reportes y 16 pertenecen a la subfamilia Mimosoideae; en estos conteos se incluye a *D. wightii*, con número  $2n= 22$ .

Los estudios antes citados, reportan que el género *Desmodium* se caracteriza por presentar un número cromosómico básico de  $x= 11$ ; sin embargo, Turner y Fearing (1959) en su estudio realizado a 30 especies de leguminosas africanas, incluyeron el primer reporte de un número cromosómico diferente para el género *Desmodium*,  $2n= 20$  para *D. salicifolium*, indicando que el género no es monobásico como se había considerado previamente. Posteriormente, en el estudio cariomorfológico realizado por Sanjappo y Bhatt (1985) a 13 especies de *Desmodium* recolectadas en India, se reporta el mismo resultado para esta especie, señalando que el número haploide  $n= 10$  puede haber resultado de la pérdida de un solo cromosoma a partir del conjunto básico del género *Desmodium*; sin embargo, Goldblatt (1981) mencionó que *D. salicifolium* tiene ambos números,  $n= 10$  y  $n= 11$ . Por otro lado, Rotar y Urata (1967) realizaron conteos cromosómicos para 21 especies de este mismo género e indicaron que *D. painteri* tiene un número cromosómico  $n= 10$ , señalando nuevamente que el género presenta dos números cromosómicos,  $n= 10$  y  $n= 11$ . Vanni (1987) realizó el conteo cromosómico de ocho especies ubicadas en tres géneros de la tribu Hedysareae (Desmodieae), de las cuales cuatro pertenecen a *Desmodium*: *D. pachyrhizum*, *D. glabrum*, *D. riedelii* y *D. leiocarpum*, todas con un número cromosómico  $2n= 22$ . En un trabajo posterior, Vanni (2001) presentó una revisión de las 21 especies argentinas de *Desmodium*, en la que incluyó el estudio cromosómico de *D. hassleri*, con  $n= 11$ .

Dentro de los estudios cariológicos realizados en los que se ha incluido algún miembro del grupo *Desmodium procumbens* o a las especies morfológicamente cercanas a éste, se encuentra el realizado por Ward (1983), quien efectuó conteos cromosómicos de plantas recolectadas en New Mexico y sureste de Colorado, incluidas *D. neomexicanum* y *D. rosei*, ambos reportados con el número cromosómico haploide de  $n= 11$ . Spellenberg y Ward (1988) reportaron el número cromosómico para 124 taxa de angiospermas de New Mexico, sureste de Arizona y regiones adyacentes y dentro de las cuatro especies del género *Desmodium* reportadas, incluyeron el número haploide de *D. procumbens* ( $n= 11$ ).

Hasta el momento, los estudios citogenéticos realizados en *Desmodium* solo reportan números cromosómicos de aproximadamente 20 especies (Cuadro 2) y cabe señalar que, en ninguno de los estudios antes mencionados se ha reportado la presencia de especies poliploides dentro del género *Desmodium*.

**Cuadro 2.** Números cromosómicos de algunas especies del género *Desmodium*.

Especie	Número cromosómico		Procedencia	Fuente
	<i>n</i>	<i>2n</i>		
<i>D. perpesium</i>	11		Japón	Kawakami (1930)
<i>D. grandiflorum</i>	11		Wisconsin	Cooper (1936)
<i>D. canadense</i>	11		Hungría	Senn (1938)
<i>D. tortuosum</i>	11		Puerto Rico	Senn (1938)
<i>D. canum</i>		22	Hawai	Young (1940)
<i>D. discolor</i>		22	Brasil	Young (1940)
<i>D. motorium</i>		22	Costa Rica	Young (1940)
<i>D. paniculatum</i>		22	Canadá	Young (1940)
<i>D. leiocarpum</i>		22	Indonesia	Fraham-Leliveld (1953)
<i>D. rotundifolium</i>	11		Texas	Turner (1956)
<i>D. sessilifolium</i>	11		Texas	Turner (1956)
<i>D. salicifolium</i>		20	África	Truner y Fearing (1959)
<i>D. wightii</i>		22	Texas	Truner y Fearing (1960)
<i>D. paintieri</i>	10		Venezuela	Rotar y Urata (1967)
<i>D. neomexicanum</i>	11		Colorado	Ward (1983)
<i>D. rosei</i>	11		Colorado	Ward (1983)
<i>D. pachyrrizum</i>		22	Argentina	Vanni (1987)
<i>D. glabrum</i>		22	Bolivia	Vanni (1987)
<i>D. riedelli</i>	11		Argentina	Vanni (1987)
<i>D. leiocarpum</i>	11		Brasil	Vanni (1987)
<i>D. procumbens</i>	11		New Mexico	Spellenberg y Ward (1988)
<i>D. hassleri</i>	11		Argentina	Vanni (2001)

## 1.5 ESTUDIOS MORFOLÓGICOS DE PLÁNTULAS

La morfología de las plántulas aporta información sobre la historia evolutiva y ecológica de cualquier grupo de angiospermas (Duke y Polhill, 1981; Rodrigues y Tozzi, 2008). Con respecto a las plántulas de las leguminosas, en los primeros reportes, además de analizar su morfología, se reconocieron dos tipos básicos de plántulas con base en el tipo de cotiledones que presentan; después, se hizo énfasis en su tipo de desarrollo o germinación al distinguir entre plántulas epigeas e hipogeas. Posteriormente, se tomaron en cuenta otros caracteres, como la permanencia o no de los cotiledones en la testa y la exposición de los cotiledones sobre el suelo o a nivel del suelo, los cuales se combinaron con el tipo de cotiledón y de desarrollo para elaborar clasificaciones más complejas (Duke y Polhill, 1981).

Por otro lado, Smith (1981) realizó un estudio sobre la variación de los cotiledones en las leguminosas y señaló que, estas estructuras suelen ser variables con respecto a su forma, simetría y anatomía; sin embargo, pueden clasificarse en dos grandes grupos, cotiledones foliáceos, los cuales están expuestos, son extendidos, delgados y en gran medida toman el papel de órganos fotosintéticos durante los primeros días de desarrollo, por lo que son persistentes hasta que las hojas se hacen cargo de la fotosíntesis y, los cotiledones carnosos, cuya función principal es ser un órgano de almacenamiento y por lo general, no presentan características de hojas.

Duke y Polhill (1981), indicaron que las plántulas de los integrantes de la subfamilia Papilionoideae son extremadamente variables y aunque algunos grupos o géneros presentan características en común, pueden mostrar cambios ocasionales, debido principalmente, a las adaptaciones que han surgido como respuesta a las diversas condiciones ecológicas. Sin embargo, en diversos estudios se ha evaluado la morfología de las plántulas de esta subfamilia y han aportado características morfológicas útiles para la delimitación de grupos en diferente nivel taxonómico, por ejemplo, Baudet (1974) determinó que la textura de los cotiledones, la base de las primordios foliáceos y la presencia o ausencia de pelos en el hipocótilo de las plántulas de Phaseoleae, son caracteres con valor taxonómico para esta tribu. Nozzolillo (1985), determinó que algunos caracteres morfológicos y anatómicos se presentan de forma constante en las plántulas del género *Cicer* y la presencia de estos caracteres, ayudó a soportar la decisión de colocar este género en una tribu independiente de Vicieae.

Posteriormente, Nemoto y Ohashi (1993) estudiaron la morfología de las plántulas en 22 especies del género *Lespedeza* y encontraron dos tipos de disposición de las primeras hojas verdaderas, el primero incluye plántulas que presentan hojas opuestas unifolioladas en el primer nodo (tipo opuesto) y el segundo tipo, formado por aquellas que tienen hojas alternas, la del primer nodo generalmente unifoliolada y con hojas trifolioladas en los nodos subsecuentes (tipo alterno). La mayoría de las especies que estudiaron presentan uno de los dos tipos de desarrollo; sin embargo, en algunas especies observaron la presencia de ambos tipos. Además, distinguieron a cada tipo de desarrollo por el número de primordios foliares en la plúmula de sus semillas, el tipo opuesto con dos primordios, a diferencia del tipo alterno, que presenta sólo un primordio.

López et al. (1998) analizaron la morfología de las plántulas de 30 taxa incluidos en la tribu Genisteae y reportaron que el número de folíolos, presencia o ausencia de estípulas foliares y el tipo de cotiledones permiten distinguir y separar a los taxa estudiados en seis grupos; además, señalaron que los géneros *Retama*, *Lupinus* y *Adenocarpus* pueden distinguirse del resto por caracteres morfológicos de sus plántulas.

Por otro lado, Rodrigues y Tozzi (2008) realizaron un estudio para describir la morfología y evaluar el valor sistemático de los caracteres que aportan las plántulas de las especies de *Acosmium* s.s., cinco especies de *Leptolobium* y *Guianodendron praeclarum*. Las plántulas de *G. praeclarum* son cripto-hipogeas con cotiledones de almacenamiento, a diferencia de las especies incluidas en *Acosmium* y *Leptolobium*, que tienen plántulas fanero-epigeas con cotiledones foliáceos; sin embargo, los miembros de estos dos géneros se distinguen entre ellos por la forma de su hipocótilo, forma y venación de los cotiledones, nictinastia de cotiledones y folíolos, presencia de estípula, morfología de los folíolos y la presencia o ausencia de una glándula intercotiledonar.

Con respecto al género *Desmodium*, únicamente se ha realizado una descripción general de las plántulas de especies asiáticas y sus géneros relacionados (Ohashi, 1973), por lo que es importante estudiar la morfología de las plántulas de las especies americanas y mexicanas del género para determinar si esta etapa del desarrollo aporta caracteres taxonómicos que ayuden a la situación taxonómica del género y del grupo *D. procumbens*.

## 1.6 ESTUDIOS PALINOLÓGICOS

Los estudios palinológicos han contribuido con caracteres informativos que ayudan a reflejar afinidades naturales en los sistemas de clasificación en diferentes grupos de angiospermas. Los análisis de la morfología del polen en Leguminosae han permitido llevar a cabo una reubicación taxonómica de un gran número taxa y al mismo tiempo, han revelado una diversidad notable en caracteres estructurales y de las aperturas de los granos de polen (Guinet, 1981; Guinet y Ferguson, 1989).

Uno de los primeros estudios sobre la morfología de los granos de polen de leguminosas fue el realizado por Erdtman (1952), quien indicó que existe una gran variación morfológica dentro del mismo, sin encontrarse diferencias significativas entre los granos de las 3 subfamilias, destacando sólo la presencia de poliadas en Mimosoideae. Sin embargo, este análisis enfatizó las características morfológicas del polen de las subfamilias Caesalpinioideae y Mimosoideae, a diferencia Papilionoideae, de la cual se estudiaron 13 géneros, de los cuales, ocho se ubican en la tribu Phaseoleae. En estudios palinológicos posteriores, Guinet y Ferguson (1989) dieron mayor énfasis a características morfológicas generales del polen de Leguminosae y menor peso a su unidad de dispersión (monadas contra poliadas); indicaron que la morfología del polen dentro de la familia es muy diversa a nivel genérico para las tres subfamilias y reconocen cuatro tendencias principales relacionadas con la estructura de la exina y las aperturas: 1) cambio en la estructura infratectal y tipo de apertura; 2) aumento en el grosor de la endexina y adelgazamiento o ausencia de la capa basal; 3) disminución del grosor de la endexina y reducción de las aperturas y 4) aumento en el número de aperturas.

En general, los granos de polen de la subfamilia Papilionoideae se caracterizan por ser tricolporados, con una exina formada por un tectum bien desarrollado y reticulado, además de presentar una estructura infratectal formada por columelas y una capa basal con aproximadamente el mismo grosor que la endexina subyacente (Guinet, 1981). Dentro de los trabajos que se han enfocado al estudio del polen de esta subfamilia, caracterizando su morfología y la estructura de su exina está el realizado por Ohashi (1973), quien realizó la contribución más importante al conocimiento de la morfología del polen de la subfamilia Papilionoideae. Estudió la morfología del polen del género *Desmodium* y de sus grupos cercanos, señalando que sus granos de polen son

muy variables con respecto a su morfología y escultura; además, indicó que la escultura de la exina de los granos de polen de *Desmodium* es rugulada. Por otro lado, Ferguson y Skvarla (1979) describieron la morfología del polen de *Cranocarpus martii* junto con la de ocho taxa cercanamente relacionados, pertenecientes al género *Desmodium*. En su estudio, reportaron que el polen de *C. martii* es pantoporado operculado, a diferencia del resto de los taxa estudiados, cuyos granos son tricolporados; además, señalaron que dentro de estos existe una ligera variación en la longitud y prominencia de colpos, siendo mas notable en las especies estudiadas del género *Desmodium*.

Posteriormente, Ferguson y Skvarla (1981) realizaron un estudio palinológico más amplio para Papilionoideae, en el que incluyeron especies pertenecientes a 32 tribus de esta subfamilia para discutir las relaciones reflejadas por la morfología de sus granos de polen. Señalaron que no es posible caracterizar a cada tribu estudiada por la morfología de sus granos de polen debido a que gran parte de sus caracteres son muy variables y por la similitud de los mismos entre las diferentes tribus, por lo que no fue posible establecer grupos de tipos de polen basados en caracteres palinológicos y compararlos con los grupos de plantas establecidos con base en caracteres macromorfológicos; sin embargo, detectaron tendencias para ciertos grupos de géneros, e incluso para tribus enteras al tener diferentes combinaciones de caracteres del polen, de no especializados, especializados, o altamente especializados.

Dentro de los estudios palinológicos que se han enfocado en el estudio de la estructura infratectal de diversos miembros de la subfamilia Papilionoideae, está el realizado por Horvat y Stainier (1980) con 12 especies pertenecientes al complejo *Phaseolus-Vigna*, quienes mostraron la presencia de dos patrones estructurales en los granos de polen estudiados, el primero con una estructura homogénea, formada por un infratectum “granular no orientado” y un engrosamiento del tectum en los muros de su retículo y el segundo, con un infratectum heterogéneo o “granular orientado”, enfatizando también la tendencia que presentan hacia la orientación de gránulos infratectales, principalmente en el opérculo y los poros. Por otro lado, Ferguson y Skvarla (1983) describieron los diferentes arreglos de la capa infratectal granular del polen de Papilionoideae utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (TEM); encontraron un amplio rango de tipos granulares en esta subfamilia, los que de manera general dividieron en 3 tipos, granos grandes e irregulares ampliamente espaciados; grupos de columelas y gránulos densamente empaquetados y, presencia de gránulos ligeramente desorganizados.

Hasta el momento solo se ha descrito la morfología del polen de especies asiáticas de *Desmodium* (Ohashi, 1973), por lo que deben realizarse estudios palinológicos con las especies americanas para determinar si existe evidencia palinológica que aporte información taxonómica y contribuya en la delimitación los taxa de este género.

## 1.7 ESTUDIOS FILOGENÉTICOS CON EVIDENCIA MOLECULAR

A finales de los años 1980s y principios de 1990s, los estudios filogenéticos moleculares empezaron a influir en las ideas sobre las relaciones entre los miembros de Leguminosae (LPWG, 2013). Las primeras investigaciones de este tipo demostraron que el ADN del cloroplasto (ADNcp) de algunas leguminosas poseen mutaciones estructurales, dentro de las que destacan una inversión de 78 kb (Palmer et al., 1987; Bruneau et al., 1990) y una deleción importante, la pérdida de una copia de la repetición invertida (IR; que contiene un conjunto duplicado de genes ARN ribosomal), cuya presencia se considera como una característica representativa del genoma del cloroplasto de las angiospermas (Palmer et al., 1988). Lavin et al. (1990) evaluaron la distribución de esta deleción en la subfamilia Papilionoideae. Indicaron que 70 de las 95 especies estudiadas conservan esta región y 24 taxa, incluidos en 6 tribus (Carmichaelieae, Hedysareae, Viciae, Cicereae y Trifolium) junto con *Wisteria* (Millettieae), carecen de una repetición invertida. Análisis filogenéticos posteriores, confirmaron la monofilia de este conjunto de 6 tribus, y reconocieron a este grupo como clado que carece de la IR o clado IRLC (Wojciechowski et al., 2000).

Debido a que el ADN del cloroplasto (ADNcp) aporta una fuente importante de caracteres para inferir filogenias de plantas, se han utilizado diferentes regiones como *rbcL*, *matK* y el espaciador intergénico *trnL-F* (Baldwin et al., 1992; Kress et al., 2005; Shaw et al., 2005) para tratar de resolver las relaciones filogenéticas de las leguminosas. Käss y Wink (1996) llevaron a cabo un análisis filogenético con secuencias de *rbcL* de 47 especies de Leguminosae. Posteriormente, Bruneau et al. (2001) realizaron un análisis filogenético basado en secuencias del intrón *trnL* para representantes de 112 géneros de la subfamilia Caesapinoideae junto con 12 de Mimosoideae y 4 incluidos en Papilionoideae. Kajita et al. (2001) realizaron un análisis de parsimonia más amplio, en el que emplearon 319 secuencias del gen *rbcL* de las cuales, 242

representan 194 géneros de leguminosas y 77 pertenecen a familias de clados cercanos a Leguminosae. En el análisis filogenético realizado por Wojciechowski et al. (2004) utilizaron 330 secuencias del gen *matK*, que representan 235 géneros pertenecientes a 37 tribus de la familia Leguminosae. Entre las conclusiones que surgieron de los estudios anteriores, destaca la posición de Leguminosae dentro del orden Fabales y su resolución como grupo monofilético; además, al hacer referencia a las relaciones dentro de la familia, señalan que las subfamilias Mimosoideae y Papilionoideae son monofiléticas y se derivan de Caesalpinioideae, la cual forma un grupo parafilético.

Del mismo modo, las regiones no codificantes del ADNcp han brindado información adecuada para resolver relaciones entre especies en algunos taxa y entre los primers universales para regiones no codificantes que han dominado el campo se encuentra la región intergénica localizada entre el gen *psbA*, el cual codifica para la proteína denominada Mr32000, la cual es un componente del centro de reacción del fotosistema II (Spielman y Stuts, 1983; Sugita y Sugiura, 1984; Zurawski et al., 1983) y el gen *trnH*, que codifica para el ARN que transfiere el aminoácido histidina (ARNt<sup>HIS</sup>) (Spielman y Stuts, 1983). En las angiospermas, la longitud promedio del espaciador *psbA-trnH* es de 465 pb y va de 198 a menos de 1077 pb; sin embargo, a pesar de su relativa corta longitud es una de las regiones del cloroplasto más variable en porcentaje de bases (Kress et al. 2005; Shaw et al., 2005).

A pesar de las dimensiones del ADN nuclear, identificar regiones de este genoma que aporten información para llevar a cabo comparaciones filogenéticas ha sido problemático (Baldwin, 1992). Sin embargo, una de las regiones nucleares más empleadas en la sistemática molecular, por ser una fuente útil de caracteres para los estudios filogenéticos, es la región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADN nuclear ribosomal 18S-26S (ADNnr), de la que se encuentran miles de copias en el genoma nuclear de las plantas, dispuestas en un arreglo tándem en una región cromosómica o en múltiples loci (Baldwin et al., 1995). Esta región incluye tres componentes, dos espaciadores designados como ITS-1 e ITS-2 y una secuencia altamente conservada que los separa, la subunidad 5.8S. La región ITS es parte de la unidad transcripcional del ADNnr y está flanqueada por los genes nucleares ribosomales 18S y 26S, que codifican para el ARN ribosomal; sin embargo, los segmentos espaciadores no son incorporados en los ribosomas maduros, pero están involucrados en la maduración del ARN ribosomal (Baldwin et al., 1995).

Dado que en las angiospermas la longitud de cada espaciador ITS es menor de 300 pb, siendo el ITS-1 de 187-298 pb, el ITS-2 de 187-252 pb y la longitud de la subunidad 5.8S es de 163 o 164 pb, la región ITS completa está conformada aproximadamente de 700 pb (Baldwin et al., 1995). Además de su tamaño pequeño y de ser un región altamente repetida en el genoma nuclear de las plantas, la presencia de secuencias altamente conservadas que flanquean cada espaciador de la región ITS, promueven su fácil detección y amplificación, características que favorecen su uso en los análisis filogenéticos en angiospermas (Baldwin et al., 1995). Por otro lado, esta familia de genes sufre de una rápida evolución concertada, lo que promueve la uniformidad del ADNnr dentro de las poblaciones de entrecruzamiento, minimizando la importancia del muestreo interpoblacional en estudios filogenéticos. Por ser una región evolutivamente conservada, secuenciar la región ITS ha demostrado tener potencial como fuente de caracteres de ADN nuclear para la reconstrucción filogenética en plantas (Baldwin, 1992; Baldwin et al., 1995).

Entre los múltiples análisis filogenéticos que se han llevado a cabo con Leguminosae, se han utilizado las secuencias de la región 5.8S del ADN nuclear ribosomal y los espaciadores internos transcritos (ITS) que la flanquean (Wojciechowski, et al., 1993; Sanderson y Liston, 1995; Sanderson y Wojciechowski; 1996; Käss y Wink, 1997; Delgado-Salinas et al., 1999; Allan y Porter. 2000; Thompson et al., 2001; Delgado-Salinas et al., 2006). Por otro lado, los estudios moleculares realizados con diferentes regiones del cloroplasto, con miembros de la tribu Desmodieae, separan a la subtribu Bryinae de la tribu Desmodieae (Bailey et al. 1997; Doyle et al., 2000; Kajita et al., 2001; Ohashi, 2005). Por otro lado, Kajita et al. (2001) reconoció a los tres grupos filogenéticos que integran actualmente a Desmodieae: *Phylodium*, *Desmodium* y *Lespedeza*.

En cuanto a los estudios moleculares con *Desmodium*, aún no se han realizado análisis filogenéticos para establecer las relaciones filogenéticas de las especies incluidas en este género. Actualmente, se está realizando un estudio filogenético con las especies americanas de este género (Delgado-Salinas et al. en prep.), por lo que es importante realizar estudios moleculares que ayuden a establecer y comprender las relaciones filogenéticas dentro del género *Desmodium*.

## **Objetivo General**

Realizar un estudio sistemático del grupo *Desmodium procumbens* (Leguminosae-Papilionoideae) en México.

## **Objetivos Particulares**

- Determinar nuevos caracteres morfológicos, como morfología de plántulas y de granos de polen, que aporten evidencia taxonómica para la delimitación de *Desmodium procumbens*, sus variedades y *D. neomexicanum*, especie morfológicamente cercana al grupo.
- Realizar un análisis molecular para establecer las relaciones filogenéticas dentro del grupo *D. procumbens* y su especie morfológicamente cercana a él.

## II MÉTODO

### 2.1 REVISIÓN DE LITERATURA

Se realizó una búsqueda de información bibliográfica en libros especializados en la familia Leguminosae y en revistas especializadas en sistemática para conocer y analizar aspectos de la taxonomía, morfología, citología, polen y polinización del grupo *Desmodium procumbens* y las especies morfológicamente emparentadas, así como su hábitat y distribución. Esta revisión se llevó a cabo durante toda la investigación. En el Apéndice B, se enlistan los nombres científicos de los taxa estudiados y de aquellos referidos a lo largo del texto de esta tesis.

### 2.2 LOCALIZACIÓN DE POBLACIONES Y TRABAJO DE CAMPO

Se examinaron 516 ejemplares de la especie *Desmodium procumbens* con sus cuatro variedades incluido *D. neomexicanum* recolectados en la República Mexicana, taxa que conforman el acervo del grupo *D. procumbens* en el Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). A partir de las etiquetas de cada ejemplar, se recopilaron datos como nombre de la especie, nombre del recolector y número de colecta, tipo de vegetación, hábitat e información sobre su sitio recolecta como localidad, latitud, longitud, altitud, así como épocas de floración y fructificación, con los que se conformó una base de datos.

Utilizando la información de colecta recopilada de los ejemplares de herbario, se ubicaron y visitaron durante los años 2011 y 2012, diversas localidades donde algunos de los taxa ocurren simpátricamente: Autlán, Chamela, Cocula y Estipac, en el estado de Jalisco; Huautla en Morelos y Cadereyta en el estado de Querétaro. Durante estas salidas, se herborizaron ejemplares del grupo *Desmodium procumbens*.

Es importante señalar que la mayor parte de los ejemplares del grupo de estudio depositados en el Herbario Nacional están incompletos y en general, solo incluyen las partes aéreas de la planta, lo que representa poca información acerca del hábito de la planta. Cada ejemplar recolectado durante esta investigación consta de raíces, hojas, inflorescencias, flores, frutos y semillas. Además, algunos organismos se trasladaron como plantas vivas al invernadero

del Jardín Botánico con el objetivo de observar su desarrollo y otros, se preservaron en FAA para su observación y posterior análisis morfológico de estructuras vegetativas y reproductivas. También se recolectaron frutos frescos maduros, los cuales se almacenaron en sobres de papel y de cada espécimen recolectado, se tomaron muestras de hojas que se conservaron en sílica gel. Cada localidad fue georreferenciada con ayuda de un geoposicionador global Garmin.

### **2.3 CARIOLOGÍA**

Se estudiaron los cromosomas mitóticos en células meristemáticas de raíz, a partir de semillas obtenidas de organismos recolectados en salidas al campo y de ejemplares depositados en el Herbario Nacional de México (Apéndice A, Cuadro I).

Semillas de cada miembro del grupo *Desmodium procumbens* se hidrataron con agua destilada durante 24 horas. Posteriormente, se colocaron en cajas petri, previamente preparadas con algodón y papel filtro humedecido con agua destilada y se colocaron en total oscuridad a temperatura ambiente. Las puntas de raíces primarias emergentes, con una longitud de 1-2 cm, se pretrataron colocándolas en una solución de 8-hidroxiquinoleína al 0.002 M, durante 5 horas a temperatura ambiente en total oscuridad. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se fijaron en solución Farmer (3:1 etanol-ácido acético) durante 24 horas; las raíces fueron enjuagadas con agua destilada e hidrolizadas en HCl 1N a 60°C durante 12 minutos, se tiñeron con solución Feulgen durante una hora conservándolas en oscuridad. La raíz se colocó sobre un portaobjetos, se conservó únicamente la parte meristemática teñida y se agregó una gota de acetoorceína al 1%, se colocó un cubreobjetos sobre el meristemo y se aplastó suavemente con la punta protegida de una pinza con el objetivo de extender y separar el tejido (Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas, 2009). Las preparaciones permanentes se elaboraron sumergiéndolas en nitrógeno líquido por aproximadamente 2 minutos, transcurrido este tiempo, se removió el cubreobjetos con ayuda de un bisturí y se lavaron con alcohol etílico absoluto. Se dejaron secar a temperatura ambiente, para posteriormente agregar una gota de resina Entellan y colocar el cubreobjetos para realizar las observaciones en microscopio óptico con el objetivo de 100×. Las fotografías se tomaron con un fotomicroscopio Zeiss Axioscope con una cámara adaptada.

## 2.4 MORFOLOGÍA DE PLÁNTULAS

Para observar la morfología de las plántulas del grupo *Desmodium procumbens*, se obtuvieron semillas de cada miembro del grupo. Los datos de procedencia de las semillas se muestran en el Apéndice A (Cuadro II). Al menos cinco semillas de cada taxón se hidrataron con agua destilada durante 24 horas; posteriormente se colocaron en cajas petri, preparadas previamente con algodón y papel filtro humedecidos con agua destilada y se mantuvieron en total oscuridad. Después de la emergencia de la radícula, las plántulas se transfirieron a recipientes plásticos, que contenían un sustrato formado con suelo de la localidad de recolecta y agrolita en proporción 1:1, humedecido con agua corriente y se cubrieron con plástico. Las plántulas se regaron cada 4 días con agua corriente. Se observó su desarrollo y se registraron los cambios en la posición de sus hojas y el número y forma de los foliolos.

## 2.5 PALINOLOGÍA

Se analizaron cinco muestras obtenidas de ejemplares del Herbario MEXU y de organismos recolectados en el campo durante esta investigación, correspondientes a cada miembro del grupo *Desmodium procumbens* (Apéndice A, Cuadro III), las cuales fueron hidratadas con agua destilada durante 10 min en baño maría y acetolizadas siguiendo el método de Erdtman (1960) modificado por Torres-Colín et al. (2010) (Apéndice B).

Parte de la muestra acetolizada se montó en gelatina glicerinada y se elaboraron dos preparaciones permanentes de cada especie y variedad, para realizar las observaciones en microscopio óptico (MO) (Zeiss, AXIOLab A1) en el Laboratorio de Palinología del Instituto de Geología de la UNAM. Las medidas se basaron en 25 granos de polen en vista ecuatorial y 25 en vista polar de cada ejemplar examinado y en lo posible, para cada carácter analizado, de las cuales se obtuvo una media de la muestra. Las fotografías se tomaron en el mismo microscopio (Zeiss, AXIOLab A1) equipado con una cámara adaptada bajo campo claro y contraste de fases en el objetivo de 100×, empleando el programa Axio Vision. Las preparaciones se depositaron en la palinoteca del Instituto de Biología y en el Instituto de Geología de la UNAM. Otra parte de la muestra se deshidrató en alcoholes graduales de 50 a 100% por 10 minutos y posteriormente se secaron con la técnica de secado a punto crítico. Se cubrieron con una capa de oro-paladio para

ser observadas y fotografiadas en el microscopio electrónico de barrido (MEB) (Hitachi, S2460-N) del Laboratorio de Microscopía Electrónica y Fotografía de la Biodiversidad, del Instituto de Biología de la UNAM.

Para caracterizar la estructura de la exina de los granos de polen del grupo de estudio, se elaboraron preparaciones para ser observadas con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para esto, las muestras se fijaron en una mezcla de glutaraldehído al 6% y paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos salino (PBS) durante 16 horas a temperatura ambiente. Las muestras se post-fijaron en tetraóxido de osmio al 1% por 16 horas y se deshidrataron en alcoholes graduales y óxido de propileno. La inclusión se llevo a cabo con resina epóxica a 60°C durante 16 horas. Se obtuvieron cortes ultrafinos y se colocaron en rejillas de cobre cubiertas con membranas de Formvar. Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.5% (Jiménez-García y Segura-Valdez, 2004). Las rejillas se observaron con el microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1010, JEOL, Peabody, MA) del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Las imágenes se tomaron con una cámara adaptada al mismo microscopio.

## 2.6 ANÁLISIS MOLECULARES

### 2.6.1 Muestreo de especies

En este estudio se incluyeron un total de 72 accesiones, de las cuales 71 representan a los taxa incluidos en el grupo *Desmodium procumbens* (Apéndice A, Cuadro IV). Se realizó un muestreo amplio para representar en lo posible, a cada miembro del grupo estudiado con dos o más accesiones; sin embargo, el muestreo es particularmente extensivo para *D. procumbens* var. *exiguum* y *D. procumbens* var. *transversum*. A pesar del esfuerzo particular por incluir más de dos accesiones para otras variedades (*D. procumbens* var. *longipes*), su muestreo resultó ser más limitado, lo cual dependió principalmente de la disponibilidad del material encontrado en el campo, de las condiciones de los ejemplares depositados en el herbario y de la obtención de secuencias. Además, representantes del viejo mundo (*D. heterocarpon*, *D. triflorum* e *Hylodesmum podocarpum*) fueron incluidos como grupo externo cuyas secuencias se obtuvieron a partir del GenBank.

Sesenta de las muestras fueron obtenidas de material recolectado y conservado en sílica gel durante las salidas al campo y doce, se obtuvieron a partir de ejemplares de herbario depositados en el Herbario Nacional (MEXU).

### 2.6.2 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN total siguiendo la metodología descrita por Doyle y Doyle (1987) por el método de CTAB (Apéndice B).

En algunos casos, con el fin de eliminar compuestos que pudieran interferir en la reacción de PCR, las muestras se limpiaron con columnas de Sephadex G-50 (Sigma S-5897-ABI Protocol). Para comprobar que la extracción se realizó de manera adecuada y valorar visualmente la calidad del ADN, se corrieron en geles de agarosa al 1% teñido con el reactivo GelRed (Biotium). Las muestras que se colocan en las pozas del gel contienen 2  $\mu$ L de agua inyectable, 2  $\mu$ L de buffer de carga y 2  $\mu$ L de la muestra obtenida de ADN. Además, como parte comparativa se colocaron 2  $\mu$ L de la escalera de 1 Kb.

### 2.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó la amplificación de secuencias tanto de ADN nuclear ribosomal (ITS) como del espaciador *psbA-trnH* (ADNcp) utilizando el conjunto de primers indicados en el Cuadro 3 (Fig. 2).

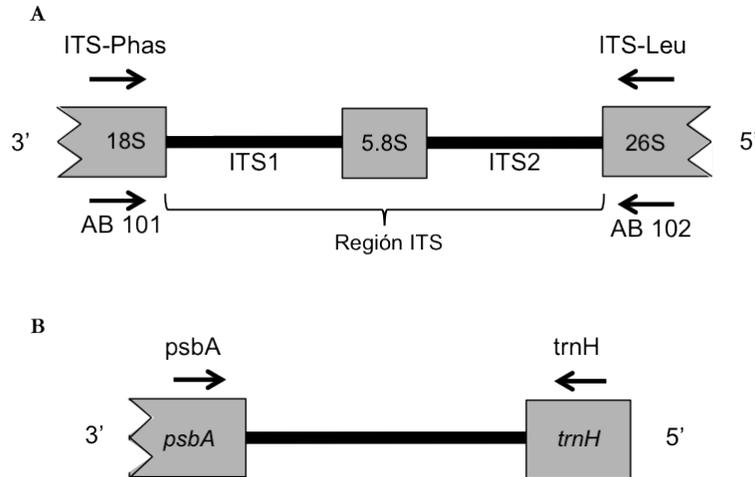
**Cuadro 3.** Marcadores empleados en la amplificación de secuencias del grupo *Desmodium procumbens*. F corresponde al primer de secuencia forward (sentido) y R al primer de secuencia reverse (anti sentido).

Nombre del marcador	Orientación	5' Secuencia del primer 3'
ITS-Leu	F	CCT TAT CAT TTA GAG GAA GGA G <sup>a</sup>
ITS-Phas	R	GCC GTT ACT AAG GGA ATC CTT GTT AG <sup>a</sup>
ITS AB-101	F	ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G <sup>b</sup>
ITS AB-102	R	TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C <sup>b</sup>
<i>psbA</i>	F	GTT ATG CAT GAA CGT ATT GCT C <sup>c</sup>
<i>trnH</i>	R	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Delgado et al. (1999)

<sup>b</sup> Sun et al. (1994)

<sup>c</sup> Sang et al. (1997)



**Figura 2.** Posición y dirección de los oligonucleótidos empleados en este trabajo. (A) Región del ADN nuclear ribosomal ITS. (B) Espaciador *psbA-trnH* del ADN del cloroplasto.

Las concentraciones finales para la reacción de amplificación fueron las siguientes:  $1 \times$  *Taq* buffer, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM de cada dNTP, 0.15  $\mu$ M de cada primer, 0.625 U de *Taq* polimerasa, 0.016% de BSA y 0.04% de DMSO para la región nuclear. Los reactivos para la reacción procedieron de Thermo Scientific. Todas las reacciones de PCR se realizaron en 10  $\mu$ L y se llevaron a cabo en un termociclador 2720 de Applied Biosystems, empleando los programas de termociclado indicados en el Cuadro 4. En todas se usaron 35 ciclos de amplificación.

**Cuadro 4.** Programas de termociclado para amplificación de secuencias.

Oligonucleótido	AB-101/AB-102 Leu/Phas	<i>psbA-trnH</i>
Desnaturalización	94°C / 2 min	94°C / 2 min
Ciclaje	94°C / 30 segs	94°C / 45 segs
	50°C / 1 min	49°C / 45 segs
	72°C / 1 min	72°C / 1 min
Extensión final	72°C / 5 min	72°C / 5 min

Para verificar que la reacción se llevó a cabo de manera adecuada, se realizó una electroforesis en gel de agarosa de la manera mencionada anteriormente, usando una alícuota de 2  $\mu$ L de la reacción de PCR.

Las reacciones exitosas de PCR se limpiaron de primers y nucleótidos no incorporados empleando el reactivo ExoSAP (Affymetrix Inc.). Este reactivo es una mezcla de las enzimas Exonucleasa I y Fosfatasa alcalina de camarón, las cuales degradan moléculas de ADN menores a 100 pb y remueven el fosfato presente en nucleótidos no incorporados así como de primers presentes en la reacción. Para la limpieza, se tomaron 8  $\mu\text{L}$  del producto de PCR y se mezcló con 2  $\mu\text{L}$  de ExoSAP diluido en agua inyectable 1:5. Se incubó en termociclador 15 minutos a 37°C, seguido de 15 minutos a 80°C para la inactivación de las enzimas. Este tratamiento permitió que el producto de PCR pudiera usarse directamente para su secuenciación.

#### 2.6.4 *Secuenciación*

La reacción de secuenciación se llevó a cabo usando el reactivo BigDye (PE Biosystem). Para un volumen total de 5  $\mu\text{L}$  de reacción, se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  de BigDye, 0.2  $\mu\text{L}$  del primer forward o del reverse, según fue el caso y 3  $\mu\text{L}$  del producto de PCR limpio. La amplificación se llevó a cabo con 25 ciclos de desnaturalización a 96°C por 10 segundos, alineamiento a 50°C por 5 minutos y extensión a 60°C por 4 minutos; una vez concluidos los ciclos, la temperatura se mantuvo a 4°C. Los productos de las reacciones de secuenciación se limpiaron con columnas de Sephadex G-50 (Sigma S-5897-ABI Protocol) y se corrieron en un secuenciador 3500 de Applied Biosystems.

#### 2.6.5 *Alineamiento de las secuencias y análisis filogenéticos*

Los cromatogramas de cada región fueron empalmados y editados con ayuda del programa CLCWorkbench v.6. Las secuencias de ADN se alinearon utilizando el programa MAFFT (Katoh et al., 2002) con los parámetros predeterminados. El alineamiento obtenido se revisó y editó manualmente con ayuda del programa Mesquite v.2.75 (Maddison y Maddison, 2011), eliminando las porciones de ambos extremos de las secuencias, correspondientes a la secuencia de los primers utilizados en la amplificación de cada región. Los gaps se trataron como datos faltantes.

Con estas secuencias, se elaboró una matriz de datos con la que se realizó el análisis filogenético con parsimonia utilizando PAUP\* v.4.0b (Swofford, 2003). Los análisis se llevaron a cabo por separado (ITS o *psbA-trnH*) y combinando ambos conjuntos de datos (ITS + *psbA-trnH*) realizando una búsqueda heurística con 10 replicas de adición secuencial al azar y utilizando el algoritmo de intercambio de ramas tree-bisection-reconnection (TBR), se retuvieron un máximo de

10,000 árboles y por cada replica de adición de secuencias, se guardaron hasta 10 árboles óptimos. El apoyo de las ramas para el árbol de consenso estricto se estimó con 1000 replicas bootstrap, realizando diez adiciones secuenciales al azar por cada replica y utilizando TBR.

La incongruencia potencial entre los conjuntos de datos nuclear (ITS) y de cloroplasto (*psbA-trnH*) se evaluó utilizando la prueba de incongruencia de diferencia de longitud (prueba ILD; Farris et al., 1994; 1995). Esta prueba se basa en que los análisis realizados combinando conjuntos de datos incongruentes darán como resultado árboles que son significativamente más largos que la suma de las longitudes de los árboles obtenidos a partir de cada una de las particiones (Farris et al., 1994; 1995; Hipp et al., 2004). La prueba ILD utiliza la longitud de los árboles para calcular el estadístico de prueba  $D$ , y lo compara con una distribución nula obtenida por el remuestreo aleatorio de los datos de las matrices iniciales, un cierto número de veces, en particiones de tamaños iguales a las particiones originales, con el propósito de determinar la significancia estadística de  $D$ . Al comparar  $D$  con la distribución obtenida, la prueba ILD proporciona un valor  $p$ , que estima la probabilidad de rechazar la hipótesis nula de que las particiones son congruentes (Hipp et al. 2004; Yoder et al., 2001). La prueba ILD se implementó en PAUP\* como la prueba de homogeneidad de particiones (PHT). Los caracteres no informativos fueron removidos antes de realizar 1000 replicas al azar con una búsqueda heurística y adición de secuencias simple, TBR y la opción de multiárboles en efecto, salvando 10 árboles por cada réplica.

### III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 CARIOLOGÍA

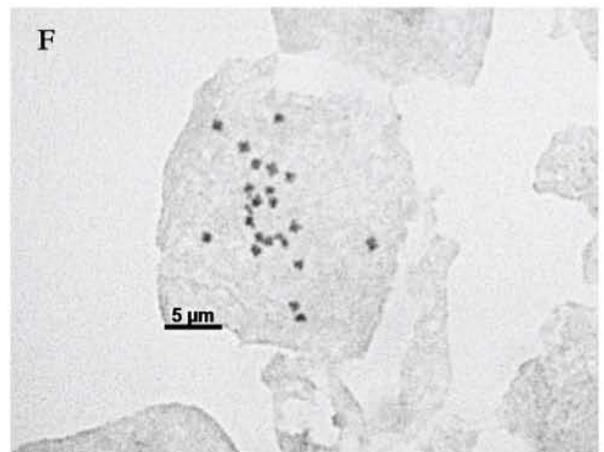
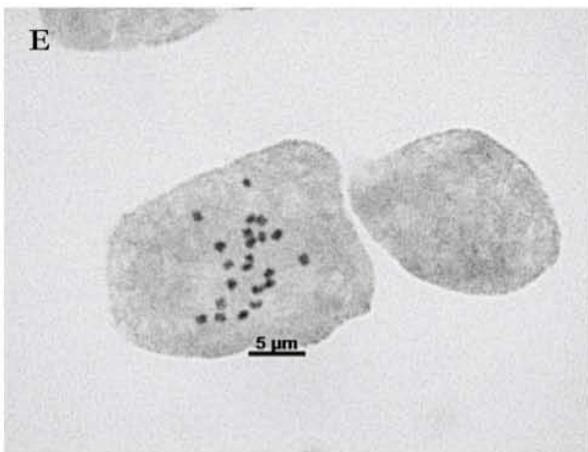
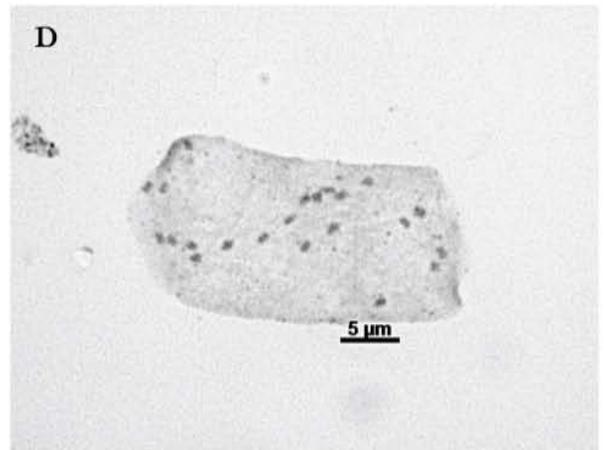
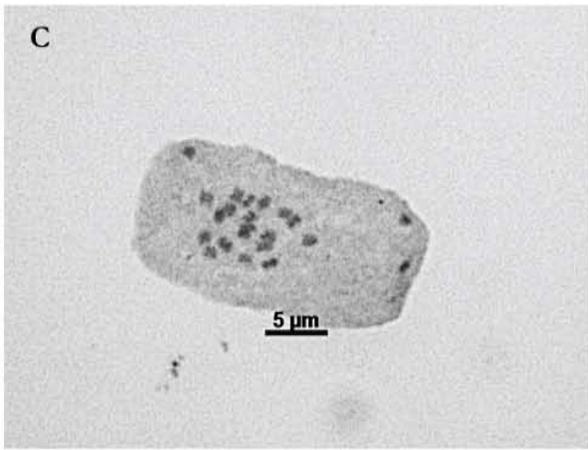
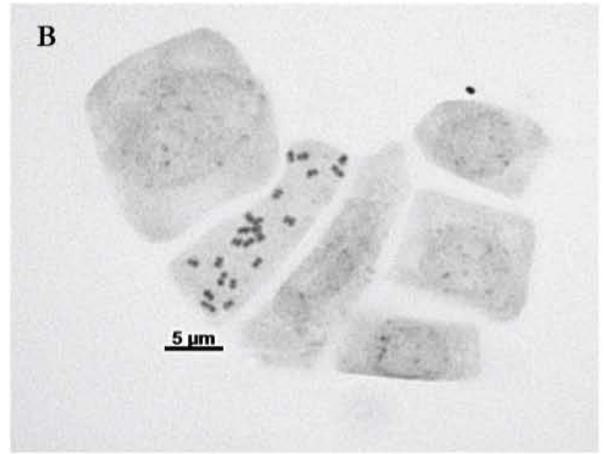
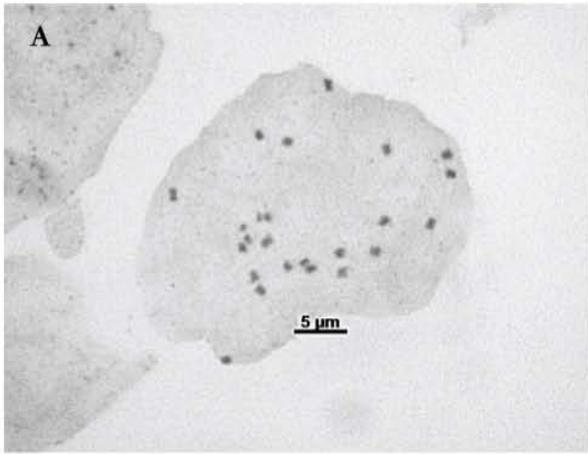
Se obtuvieron los cromosomas mitóticos de *Desmodium procumbens* var. *procumbens*, *D. procumbens* var. *longipes*, *D. procumbens* var. *transversum*, *D. procumbens* var. *exiguum* y *D. neomexicanum*. En el Cuadro 5 se muestran los números cromosómicos de las especies estudiadas. En general, se pudo apreciar que en los cinco taxa, la longitud de sus cromosomas varían de 1-2  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Las Figs. 3 y 4 muestran algunas células obtenidas en este estudio.

**Cuadro 5.** Números cromosómicos obtenidos en el análisis cariológico del grupo *Desmodium procumbens*.

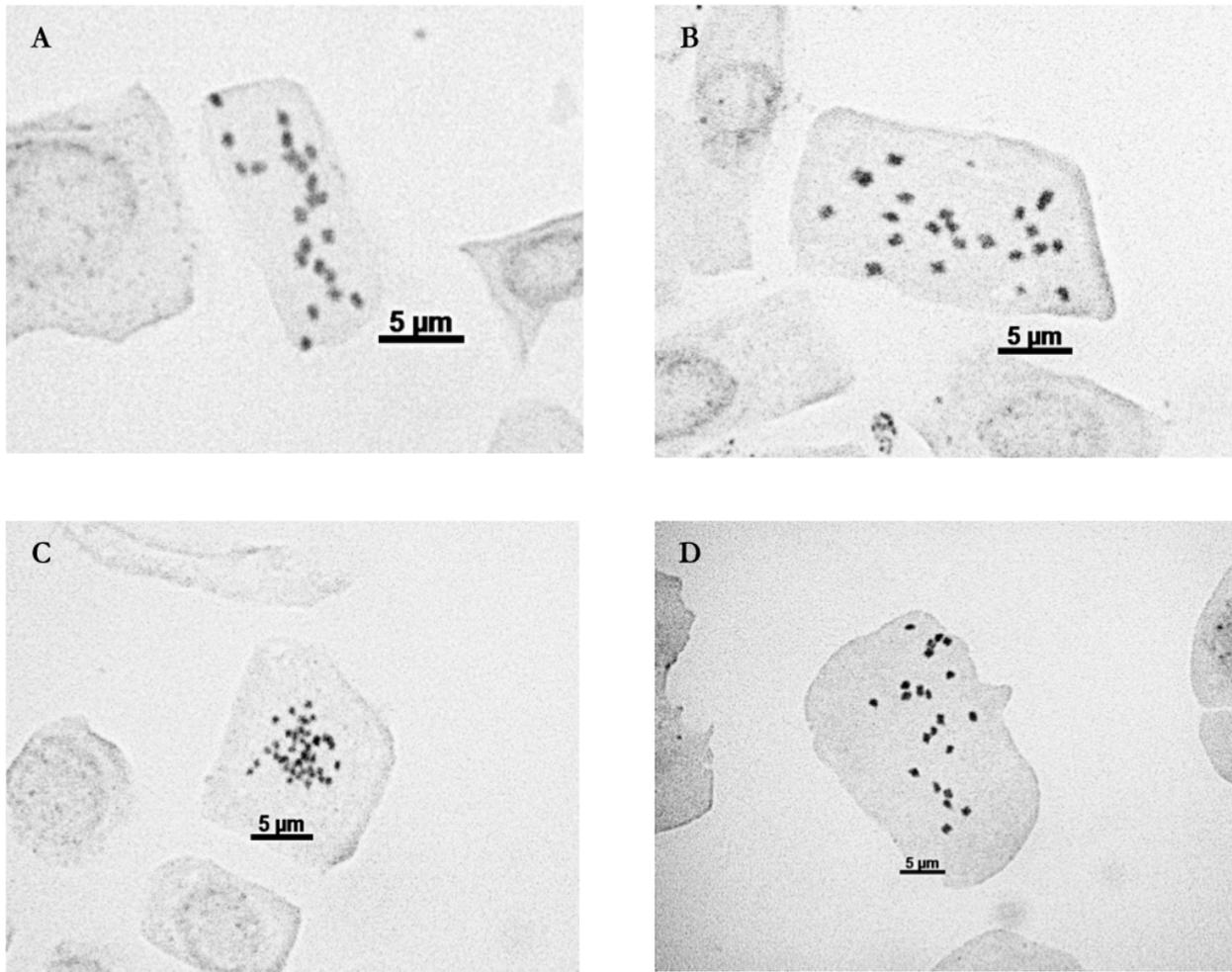
Especie	Número cromosómico (2n)	Procedencia
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	22	Morelos
<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	22	Michoacán
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	22	Morelos
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	22	Morelos
<i>D. neomexicanum</i>	22	Sonora

Los conteos cromosómicos obtenidos en este estudio confirman el número cromosómico básico propuesto por Goldblatt (1981) para la tribu Desmodieae; así como los conteos obtenidos para *Desmodium neomexicanum* y *D. procumbens* ( $2n= 22$ ), concuerdan con informes previos en los que se han estudiado los números cromosómicos de algunos miembros del grupo *D. procumbens* (Ward, 1983; Ward y Spellenberg, 1988). Con los números cromosómicos obtenidos en este estudio para *D. procumbens* var. *longipes*, *D. procumbens* var. *transversum*, *D. procumbens* var. *exiguum*, se complementa los conteos para los miembros del grupo *D. procumbens*.

Por otro lado, en *Desmodium neomexicanum* se registró polisomatía, al observarse células con 44 cromosomas, lo cual puede deberse únicamente a que al momento de someter las raíces al pretratamiento, las células examinadas sólo habían duplicado su material genético y no completaron su división celular (Fig. 4C). Al respecto, Ohashi (1973) mencionó que en Leguminosae la poliploidía es frecuente, pero no menciona datos sobre la presencia de células



**Fig. 3.** Cromosomas mitóticos  $2n=22$ . (A,B) *Desmodium procumbens* var. *procumbens*. (C,D) *D. procumbens* var. *exiguum*. (E,F) *D. procumbens* var. *longipes*.



**Fig. 4.** Cromosomas mitóticos  $2n=22$ . (A,B) *Desmodium procumbens* var. *transversum*. (C,D) *D. neomexicanum*. (C) Célula polisomática.

polisomáticas; además, también se analizaron células con  $2n=22$ , los que concuerda con el resto de los taxa estudiados y con los estudios previos.

Con información previa y la obtenida en este estudio, se conoce el número cromosómico para 15 especies incluidas en el género *Desmodium*, conteos en los que los autores coinciden en el número cromosómico de  $n=11$ ; para la especie *D. salicifolium* y *D. paintieri* han registrado el número  $n=10$  (Cuadro 2). Sin embargo, como también señala Ohashi (1973), existen dudas sobre la correcta identidad taxonómica de las especies estudiadas en algunos reportes previos como en el estudio de Rotar y Urata (1967), quienes indican que la especie *D. paintieri* procede de Venezuela; sin embargo, esta especie sólo se distribuye en México, por lo que el conteo reportado de  $n=10$  podría corresponder a otra especie del género.

### 3.2 MORFOLOGÍA DE PLÁNTULAS

La germinación de las semillas de los integrantes de grupo *Desmodium procumbens* comenzó dos días después de colocarlas en total oscuridad, con excepción de *D. procumbens* var. *procumbens*, cuyas semillas no germinaron, probablemente esto sucedió porque sólo se pudo conseguir semillas a partir de frutos inmaduros que pueden no haber completado su desarrollo.

Los taxa estudiados tienen plántulas epigeas, con dos cotiledones foliáceos opuestos. El crecimiento de las plántulas del resto de los taxa continuó con el alargamiento de sus hipocótilos, los cuales son blanco verdosos y sus epicótilos son verdes, pubescentes (Fig. 5). Sin embargo, ocho a diez días después de plantarlas, la mayor parte de las plántulas no sobrevivió, por lo que sólo se continuó observando el desarrollo de algunas plántulas de *Desmodium neomexicanum*.

Una semana después de haberse colocado en el sustrato, las primeras dos hojas que se desarrollan en las plántulas de *Desmodium neomexicanum* después de los cotiledones son unifolioladas, opuestas y sin estípulas. En su segundo nodo, la tercer y cuarta hoja, conservan la disposición opuesta; sin embargo, estas hojas y las subsecuentes son más semejantes a las hojas adultas, ya que son trifolioladas. A partir del tercer nodo, la disposición de las hojas cambia, de opuesto a alterno. Lo anterior concuerda con Ohashi (1973), quien mencionó que a pesar de la variación en el número de folíolos de las primeras hojas con respecto a las hojas adultas de *Desmodium*, las hojas juveniles son similares en forma a las adultas, las cuales son ovadas, con la base semicordada y ápice obtuso. Por otro lado, el mismo autor indicó que a partir de la tercera hoja la filotaxia cambia de opuesto a alterno, el cual se mantiene en etapas posteriores del desarrollo; aunque en *D. neomexicanum* se registró una variación, ya que el cambio en la filotaxia, de opuesto a alterno se observó a partir del tercer nodo, con la hoja cinco (Fig. 5).



**Fig. 5.** Plántulas de *Desmodium neomexicanum*. (A) Cotiledones foliáceos. (B) Primer nudo con hojas simples, opuestas y segundo nudo con hojas trifolioladas opuestas. (C,D) Detalle del tercer nudo. Se observa el cambio en la filotaxia. (E) Plántula de 3 meses de edad. (F) Detalle de las yemas.

### 3.3 PALINOLOGÍA

Las características palinológicas distintivas del grupo estudiado se muestran en el Cuadro 6. En general, los granos de polen del grupo *Desmodium procumbens* son tricolporados, endoapertura lalongada, suboblados a subprolados con simetría radial, isopolares, colpos con ápices agudos, área polar mediana y exina tectada, suprarugulada con una estructura infratectal formada por gránulos y columelas, endexina continua y compacta.

*Descripción específica de los granos de polen del grupo Desmodium procumbens*

*Desmodium procumbens* var. *procumbens* (Fig. 6)

Granos tricolporados, oblado-esferoidales. Ectoabertura con ápices agudos, margo liso de 0.8–2.5  $\mu\text{m}$ . Endoabertura de 15 (10–20)  $\mu\text{m}$   $\times$  5.4 (4–7)  $\mu\text{m}$ , costae transversal convergente cerrada. Presenta fastigio. Exina tectada foveolada, suprarugulada 1–3  $\mu\text{m}$  de grosor, rugulas de aproximadamente 4.2  $\mu\text{m}$  de largo  $\times$  3.28  $\mu\text{m}$  de ancho, apocolpio ligeramente rugulado, sexina más gruesa que la nexina. Área polar mediana, 0.31  $\mu\text{m}$ .

La exina está cuenta con un tectum continuo y rugulado, con una estructura infratectal formada principalmente por columelas, las cuales se originan a partir de la agrupación de gránulos, además se observa la presencia de pocos gránulos libres entre ellas; capa basal ausente; la endexina es ligeramente más gruesa que su tectum, y es continua delgada (Fig. 11 A,B).

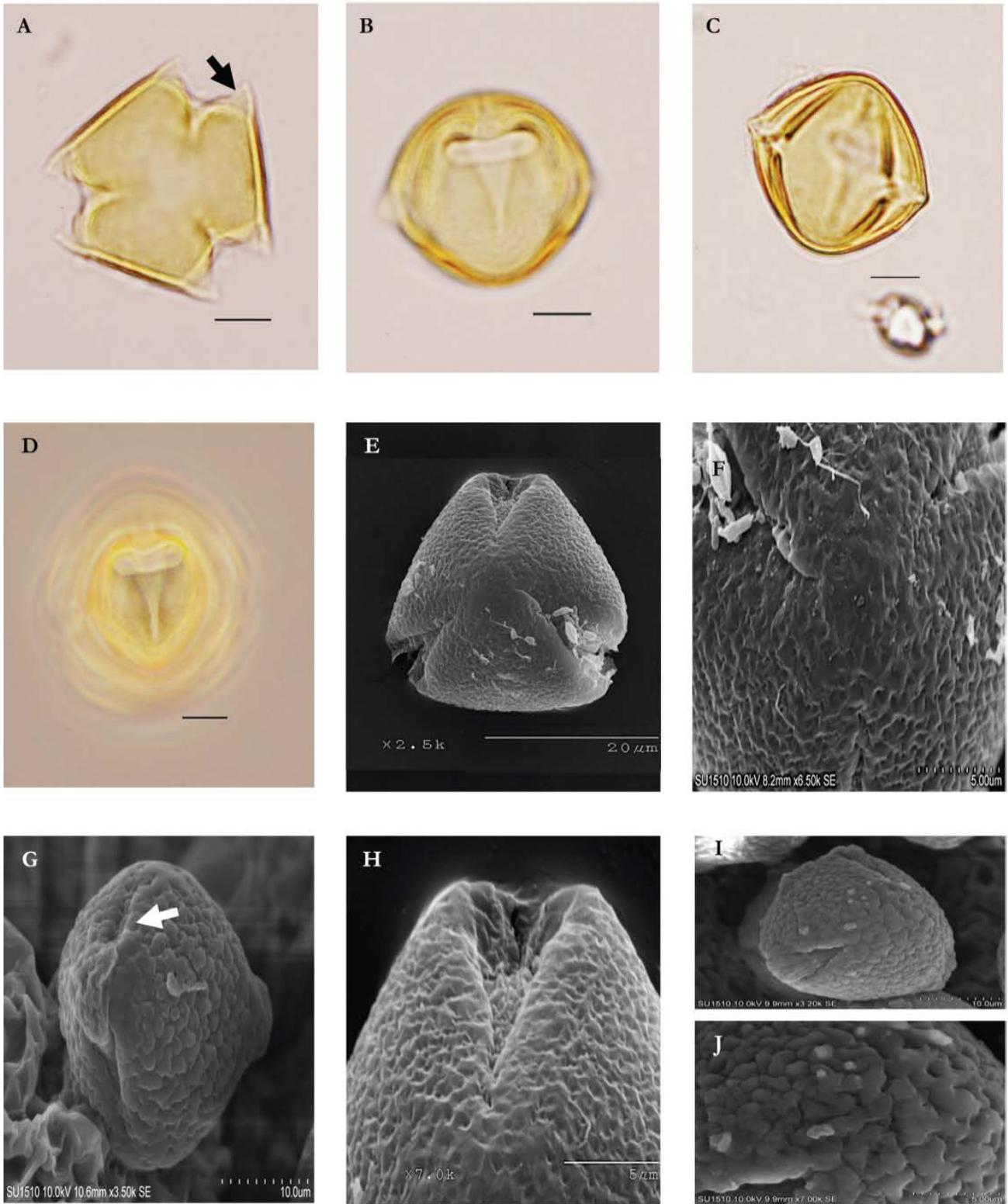
*Desmodium procumbens* var. *exiguum* (Fig. 7)

Granos tricolporados, oblado esferoidales. Ectoabertura con ápices agudos, margo de 1–2.5  $\mu\text{m}$ , ligeramente rugulado. Endoabertura de 13.4 (10–17)  $\mu\text{m}$  de largo  $\times$  4.3 (2–5)  $\mu\text{m}$  de ancho con costa transversal convergente cerrada. Exina tectada suprerugulada de 2–3  $\mu\text{m}$ , rugulas de aproximadamente 3.48  $\mu\text{m}$  de largo  $\times$  2.44  $\mu\text{m}$  de ancho, rugulas de mayor grosor en el apocolpio; la sexina es más gruesa que la nexina. Área polar mediana, 0.40  $\mu\text{m}$ .

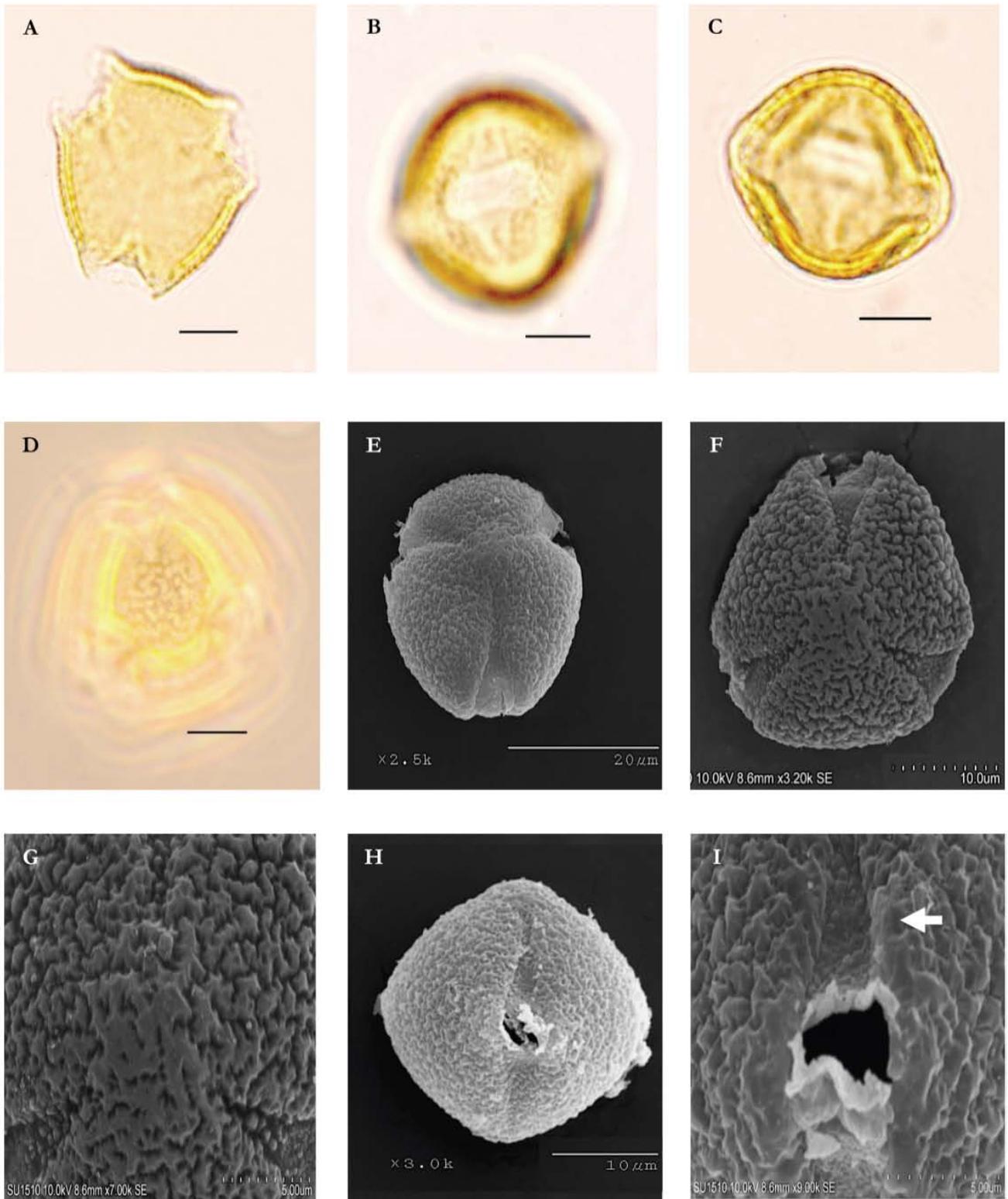
Su exina cuenta con un tectum continuo, rugulado; sus elementos infratectales son gránulos de tamaño irregular con poca tendencia a formar columelas (ver Cuadro 6); no presenta una capa basal; endexina gruesa y continua, se observa de mayor grosor a nivel de las aperturas (Fig. 11 C,D).

**Cuadro 6.** Dimensiones, forma, estructura y escultura de la exina de los granos de polen del grupo *Desmodium procumbens* observados. E.P.= Eje Polar, E.E.= Eje Ecuatorial, EP/EE= Eje Polar entre Eje Ecuatorial.

Especie	Forma	E.P. ( $\mu\text{m}$ )	E.E. ( $\mu\text{m}$ )	EP/EE ( $\mu\text{m}$ )	Apertura		Exina	
					Margo ( $\mu\text{m}$ )	Endoapertura ( $\mu\text{m}$ )		
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Oblado esferoidal	28-41	30-37	1.02	Tricolporada	0.8-2.5	10-20 $\times$ 4-7	1-3 $\mu\text{m}$ Tectada, columelar-granular suprarugulada
<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	Prolado esferoidal	26-33	24-32	1.11	Tricolporada	1-3	10-15 $\times$ 3-7	Tectada, columelar-granular suprarugulada 1-2 $\mu\text{m}$
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Oblado esferoidal	28-38	30-40	0.93	Tricolporada	1-2.5	10-17 $\times$ 2-5	Tectada, columelar-granular suprarugulada 2-3 $\mu\text{m}$
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Prolado esferoidal	28-40	30-40	1.0	Tricolporada	0.8-2.5	10-18 $\times$ 3-6	Tectada, columelar-granular suprarugulada 2-3 $\mu\text{m}$
<i>D. neomexicanum</i>	Oblado esferoidal a prolado esferoidal	33-44	34-47	1.1	Tricolporada	2.4	13-18 $\times$ 3-6	Tectada, columelar-granular suprarugulada 2-3 $\mu\text{m}$



**Fig. 6.** Polen de *Desmodium procumbens* var. *procumbens*. (A) Vista polar (MO), se observa la presencia de fastigio (flecha). (B-D) Vista ecuatorial (MO). (B) Detalle de la endoapertura. (C) Detalle de la exina y colpos. (D) Margo (contraste de fases). Escala 10  $\mu$ m. (E) Vista polar (MEB). (F) Detalle del apocolpio (MEB). (G) Vista ecuatorial, detalle del margo (flecha) y membrana del colpo (MEB). (H) Vista polar, detalle del colpo (MEB). (I, J) Detalles del polen obtenidos de un botón floral (MEB). MO= microscopio óptico, MEB= microscopio electrónico de barrido.



**Fig. 7.** Polen de *Desmodium procumbens* var. *exiguum*. (A) Vista polar (MO). (B-D) Vista ecuatorial (MO). (B) Detalle de la endoapertura. (C) Detalle de la exina y colpos. (D) Ornamentación (contraste de fases). Escala 10 μm. (E,F) Vista polar (MEB). (G) Detalle del apocolpio. (H) Vista ecuatorial (MEB). (I) Detalle de la endoapertura afectada por acetólisis y margo (flecha). MO= microscopio óptico, MEB= microscopio electrónico de barrido.

*Desmodium procumbens* var. *longipes* (Fig. 8)

Granos tricolporados, prolado-esferoidales. Ectoabertura con los ápices agudos, margo liso de 1–3  $\mu\text{m}$  de grosor. Endoabertura de 11.8 (10–15)  $\mu\text{m}$  de longitud  $\times$  4.7 (3–7)  $\mu\text{m}$  de ancho con costae transversal paralela, ocasionalmente convergente cerrada; presenta fastigio. Exina tectada suprarugulada de 1–2  $\mu\text{m}$  de grosor, rugulas de cerca de 2.13  $\mu\text{m}$  de largo  $\times$  1.19  $\mu\text{m}$  de ancho, apocolpio liso a ligeramente rugulado; sexina más gruesa que la nexina. Área polar mediana, 0.50  $\mu\text{m}$ .

Su exina presenta un tectum continuo, rugulado; sus elementos infratectales son columelas, que están formadas por la superposición de algunos gránulos, entre las columelas se presentan gránulos pequeños; su capa basal es delgada y discontinua; su endexina es continua y ligeramente más gruesa que su tectum (Fig. 11 E,F).

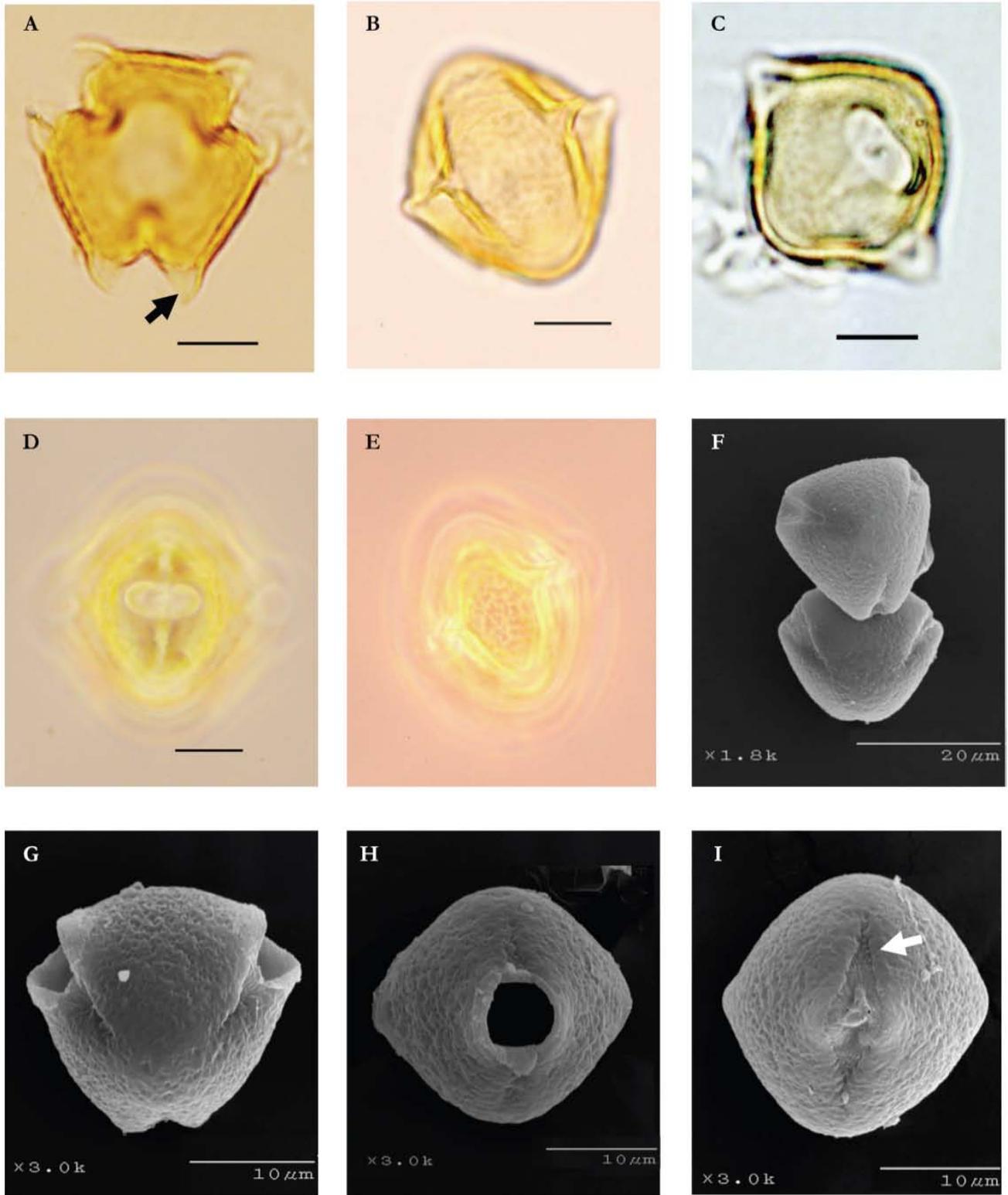
*Desmodium procumbens* var. *transversum* (Fig. 9)

Granos tricolporados, prolado-esferoidales. Ectoabertura con ápices agudos, margo de 0.8-2.5  $\mu\text{m}$ , ligeramente rugulado. Endoabertura de 14.5 (10-18)  $\mu\text{m}$  de largo  $\times$  4.8 (3-6)  $\mu\text{m}$  de ancho con costae transversal convergente cerrada. Exina tectada suprarugulada de 2.3 (2-3.2)  $\mu\text{m}$  de grosor, con rugulas de aproximadamente 5.45  $\mu\text{m}$  de largo  $\times$  2.88  $\mu\text{m}$  de ancho, apocolpio con rugulas de mayor grosor; sexina más gruesa que la nexina. Área polar mediana, 0.37  $\mu\text{m}$ .

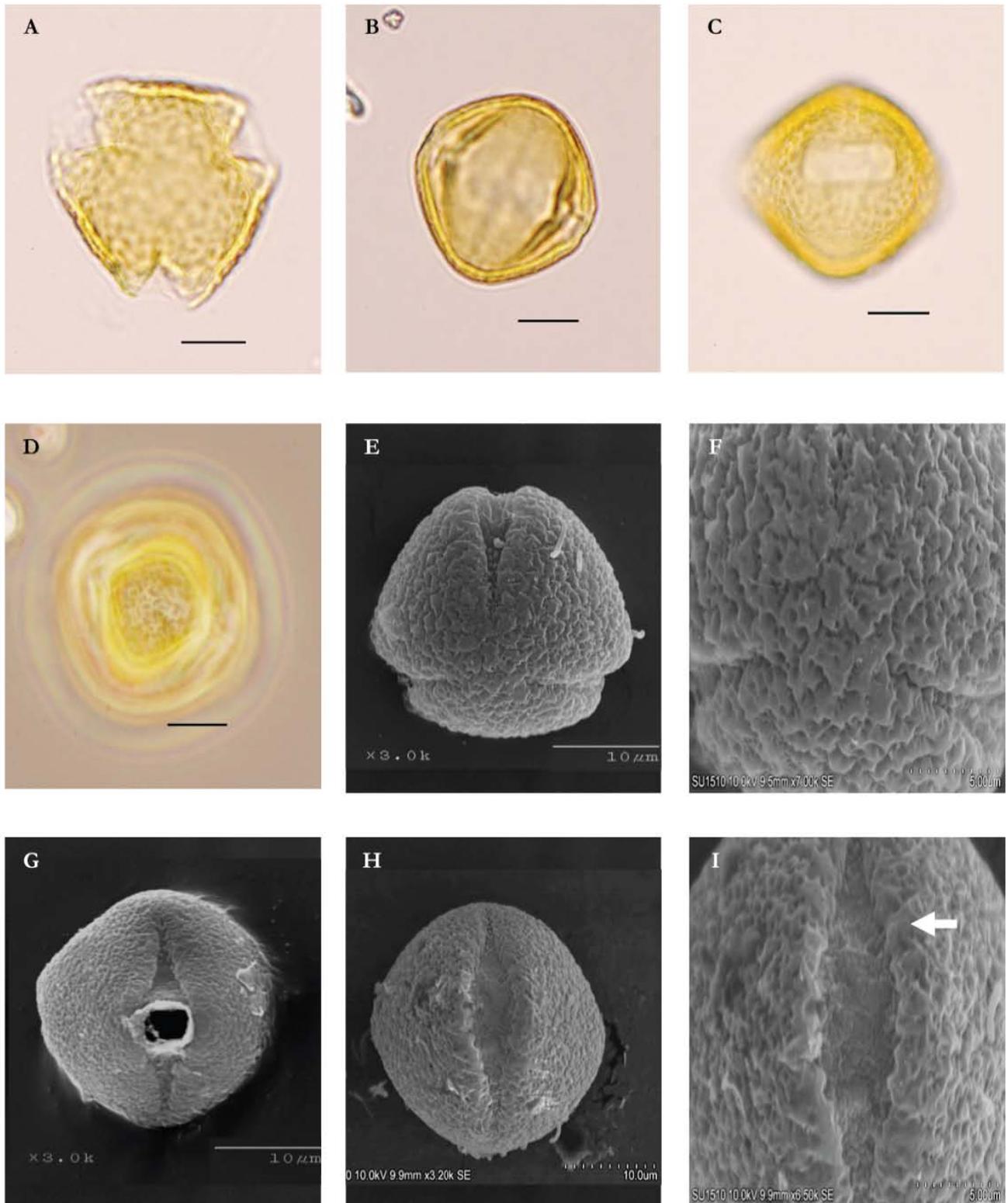
La exina está formada por un tectum continuo, rugulado; los gránulos que forman parte de su estructura infratectal son de tamaño irregular y se encuentran en mayor número que las columelas; la capa basal es delgada y discontinua o ausente; endexina gruesa y continua (Fig. 12 A,B).

*Desmodium neomexicanum* (Fig. 10)

Granos tricolporados, oblado-esferoidal a prolado-esferoidales; ocasionalmente con una constricción en los márgenes a nivel de la endoapertura. Ectoabertura con sus ápices agudos, margo liso de 2-4  $\mu\text{m}$  de grosor. Endoabertura de 15.4 (13-18)  $\mu\text{m}$  de largo  $\times$  5 (3-6)  $\mu\text{m}$  de ancho con costae transversal paralela cerrada; presenta fastigio. Exina tectada, suprarugulada de 1.3-2  $\mu\text{m}$  de grosor, rugulas de cerca de 2-3  $\mu\text{m}$  de largo  $\times$  2  $\mu\text{m}$  de ancho, apocolpio liso, ocasionalmente foveolado; sexina es más gruesa que la nexina. Área polar mediana, 0.31  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 8.** Polen de *Desmodium procumbens* var. *longipes*. (A) Vista polar (MO), se observa la presencia de fastigio (flecha) (MO). (B-D) Vista ecuatorial (MO). (C) Detalle de la exina y endoapertura. (D) Margo (contraste de fases). (E) Ornamentación (contraste de fases). Escala 10  $\mu$ m. (F,G) Vista polar (MEB). (H,I) Vista ecuatorial (MEB). (H) Endoapertura abierta por tratamiento químico. (I) Margo (flecha). MO= microscopio óptico, MEB= microscopio electrónico de barrido.



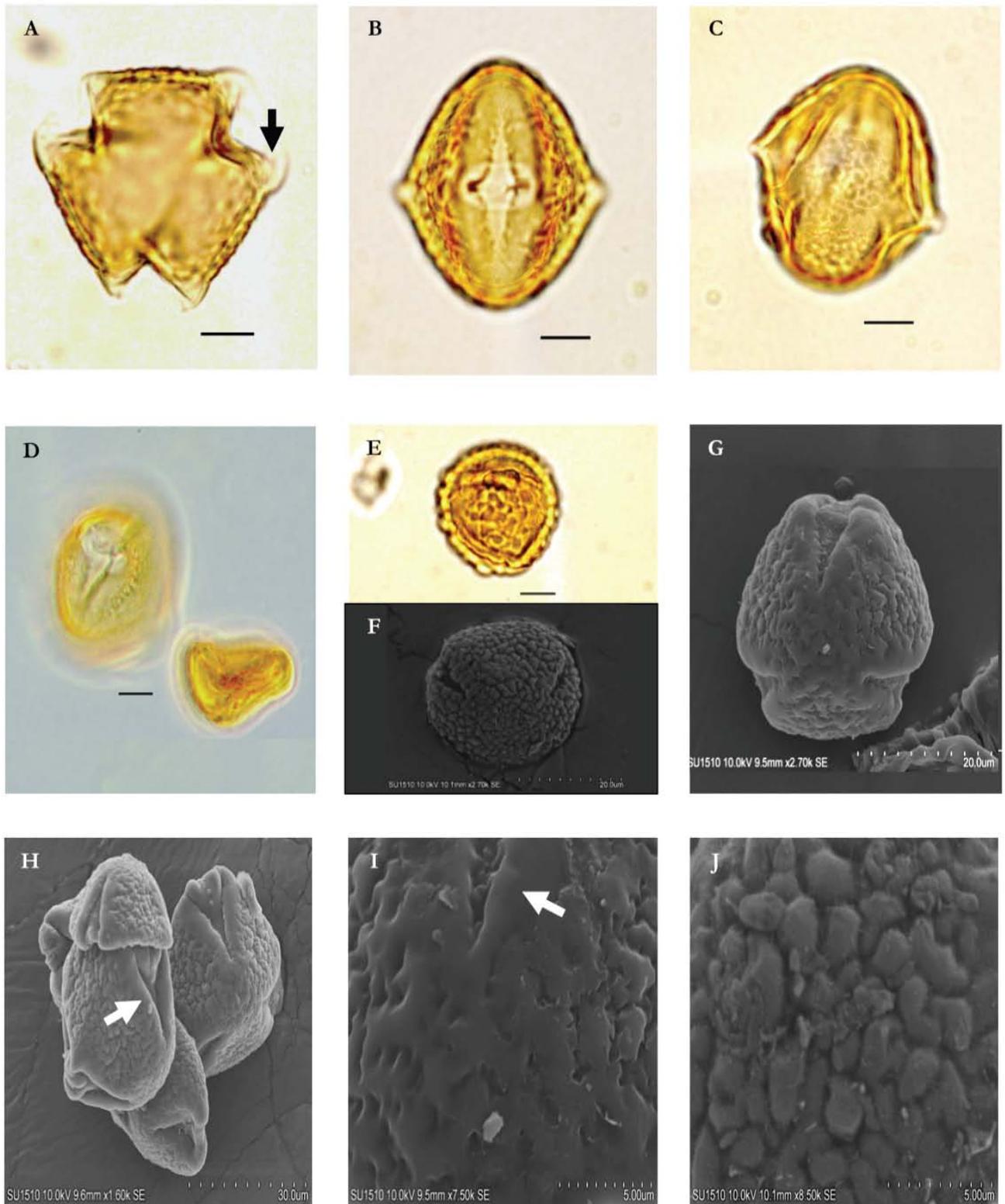
**Fig. 9.** Polen de *Desmodium procumbens* var. *transversum*. (A) Vista polar (MO), (B-D) Vista ecuatorial (MO). (C) Detalle de la exina y endoapertura. (D) Ornamentación (contraste de fases). Escala 10  $\mu$ m. (E) Vista polar (MEB). (F) Detalle del apocolpio. (G,H) Vista ecuatorial (MEB). (G) Endoapertura afectada por acetólisis. (I) Detalle del colpo y mesocolpio, se observa el margo (flecha). MO= microscopio óptico, MEB= microscopio electrónico de barrido.

Su exina está integrada por un tectum continuo, rugulado; sus estructura infratectal está formada por columelas y gránulos presentes en proporción similar; capa basal delgada y discontinua; su endexina es gruesa y continua, ligeramente más engrosada a nivel de las aperturas (Fig. 12 C,D).

Las características generales observadas en los granos de polen del grupo *Desmodium procumbens* concuerda con el tipo básico descrito por Guinet (1981) y Guinet y Ferguson (1989) para la subfamilia Papilionoideae, al ser granos tricolporados con una exina compleja y un tectum bien desarrollado. Así mismo, la forma de los granos de polen del grupo de estudio se encuentra dentro del rango reportado para la subfamilia (Ferguson y Skvarla, 1981), cuyo polen puede ser prolado-esferoidal como el que se desarrolla en *D. procumbens* var. *longipes* y *D. procumbens* var. *transversum*, hasta oblado-esferoidales, como los registrados en *D. procumbens* var. *procumbens* y *D. procumbens* var. *exiguum*. Por otro lado, el tamaño de los granos de polen no es una característica que permita reconocer entre los taxa, ya que todos se encuentran dentro de la categoría de granos de clase media (Erdtman, 1952); además, el tamaño de los granos de polen concuerda con Ferguson y Skvarla (1981), quienes indicaron que los granos de polen de las papilionoides no miden más de 50  $\mu\text{m}$  (Cuadro 6).

*Desmodium neomexicanum* fue el único taxa en el que se observó polen de forma y tamaños diferentes, granos prolado-esferoidales de hasta de 47  $\mu\text{m}$  y oblado-esferoidales, de menos de 34  $\mu\text{m}$ . Esta diferencia puede deberse a que las plantas de este grupo presentan estambres con filamentos largos y cortos. Para corroborar si estas diferencias están relacionadas con esta característica morfológica de su androceo, se observaron granos no acetolizados en MEB, con lo que pudo apreciarse que los granos de menor tamaño también están colapsados, lo que podría indicar que estos granos no completaron su desarrollo o no son viables (Fig. 10). Sin embargo, debe de continuarse con los análisis para determinar si estos granos de polen no viables también se presentan en el resto de los taxa estudiados.

El grosor de la pared del polen de los miembros del grupo estudiado se encuentra en el rango de 1-3  $\mu\text{m}$  y en *Desmodium procumbens* var. *longipes* se registró una exina de menor grosor (Fig. 8, Cuadro 6). Además, la proporción en la que se presentan las capas que forman su exina, sexina

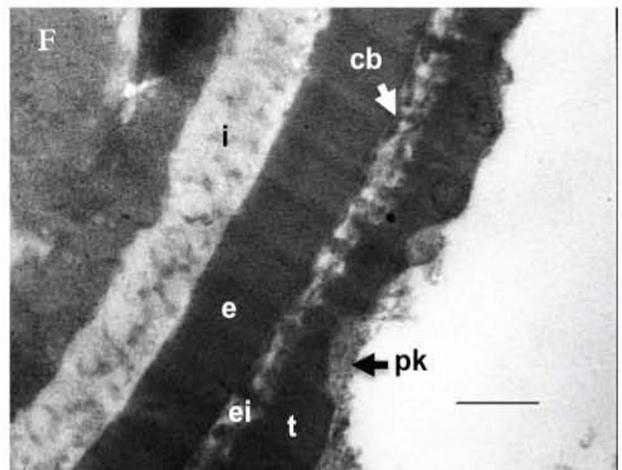
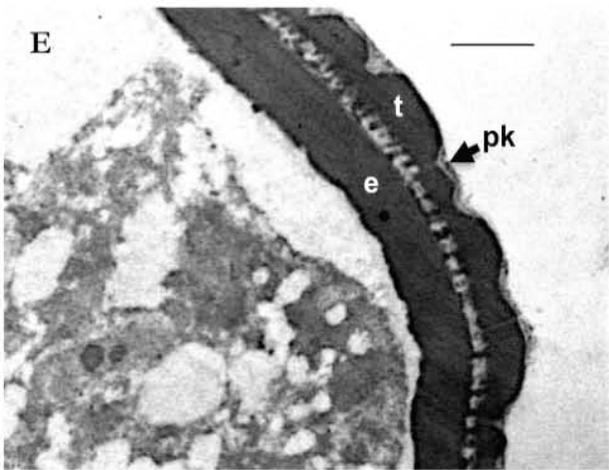
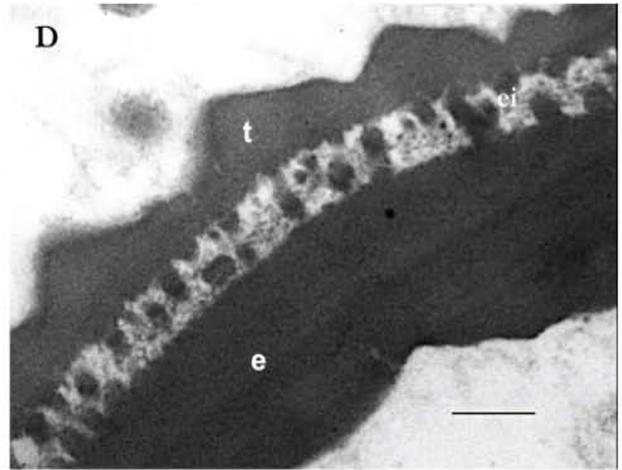
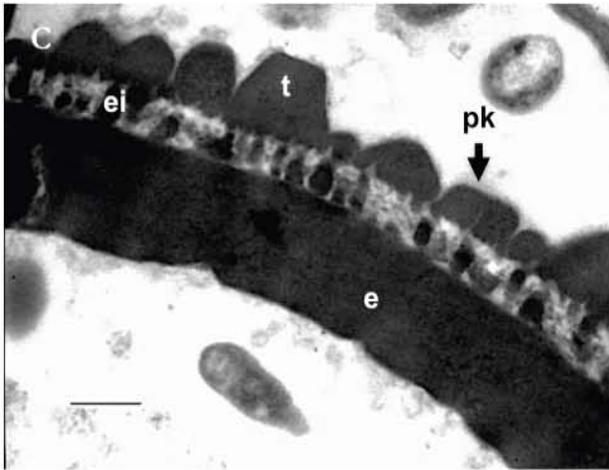
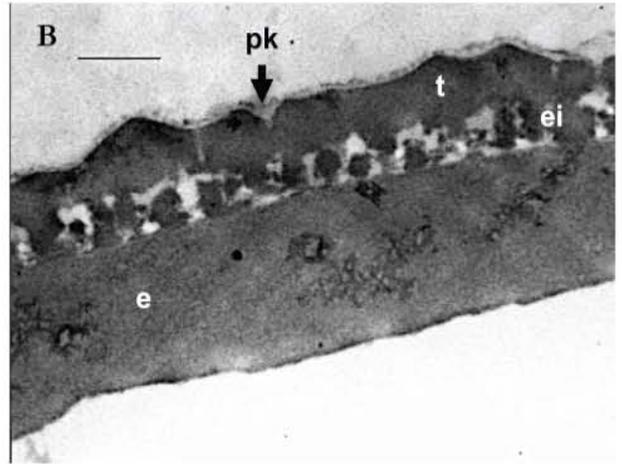
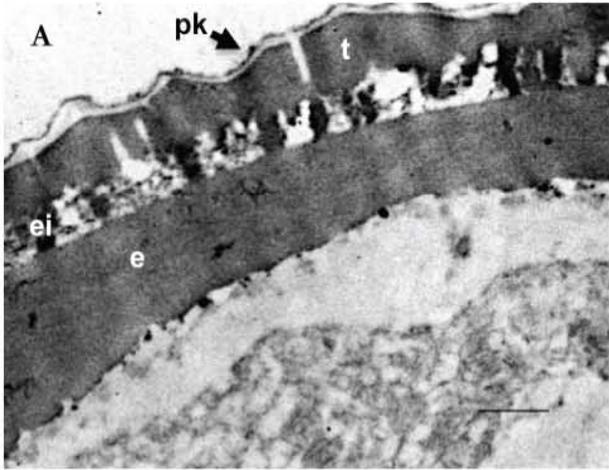


**Fig. 10.** Polen de *Desmodium neomexicanum*. (A) Vista polar (MO), se observa la presencia de fastigio (flecha). (B-D) Vista ecuatorial (MO). (B) Detalle de la endoapertura. (C) Detalle de la exina y ornamentación. (D) Granos de polen de diferente tamaño, el pequeño se observa colapsado (contraste de fases). (E) Vista ecuatorial de grano pequeño. Se observa detalle de la ornamentación (MO). Escala 10  $\mu$ m. (F) Vista polar grano de polen pequeño (MEB). (G) Vista polar (MEB). (H) Se observa el margo (flecha) y polen colapsado. (I) Detalle del apocolpio, margo (flecha) (MEB). (J) Detalle del mesocolpio (MEB). MO= microscopio óptico, MEB= microscopio electrónico de barrido.

y nexina, es aproximadamente 2:1; sin embargo, *D. neomexicanum* presenta diferencias significativas entre estas capas, ya que la sexina es 3 veces más gruesa que la nexina.

Por otro lado, el polen de los taxa estudiados presenta una ornamentación rugulada, lo que concuerda con lo descrito por Ohashi (1973) para otras especies del género; sin embargo, se observaron diferencias en su escultura, por ejemplo, para *Desmodium procumbens* var. *longipes* se registraron las rugulas de menor grosor ( $2.13 \times 1.19 \mu\text{m}$ ) a diferencia del resto de los organismos observados. Además, *D. procumbens* var. *exiguum* y *D. procumbens* var. *transversum*, presentan rugulas de mayor grosor en su apocolpio y un patrón característico en su mesocolpio, características que las distinguen del resto del grupo (Figs. 7 y 9); así mismo, en *D. procumbens* var. *procumbens* y *D. neomexicanum* también se observaron diferencias entre la escultura de su apocolpio y mesocolpio (Cuadro 7). Lo anterior concuerda con Ferguson y Skvarla (1981), quienes indicaron que en las especies americanas de *Desmodium* se presenta amplia variación en la ornamentación de sus granos de polen, con tendencia hacia la complejidad de su escultura con diferencias en su área polar; también señalaron que en los granos rugulados, se presentan diferencias en el grosor de sus rugulas y pueden desarrollar diversos patrones en las mismas.

Los granos de los cinco taxa estudiados presentan aperturas compuestas, formadas por un colpo y una endoapertura alongada, aperturas típicas de los miembros de la subfamilia Papilionoideae (Ferguson y Skvarla 1981); sin embargo, se observaron diferencias en el engrosamiento y ornamentación a nivel de sus ectoaperturas. El margo de *D. neomexicanum* es de hasta  $4 \mu\text{m}$  a diferencia de lo registrado para el resto de los miembros del grupo, cuyo margo no es de más de  $2.5 \mu\text{m}$ . *Desmodium procumbens* var. *longipes* y *D. neomexicanum* presentan un margo liso, en el resto de los miembros del grupo el margo es ligeramente rugulado (Cuadro 7). Las endoaberturas en el grupo *D. procumbens* son uniformes en tamaño; sin embargo, en *D. procumbens* var. *exiguum* son ligeramente menos anchas que en el resto de los taxa estudiados (Cuadro 6), lo que puede deberse a un efecto de los tratamientos químicos a los que fueron sometidos los granos de polen para su observación, ya que en algunos granos las endoaperturas se observaron cerradas casi en su totalidad. Por otro lado, *D. procumbens* var. *procumbens*, *D. procumbens* var. *longipes* y *D. neomexicanum* presentan una separación entre la sexina y nexina a nivel de su endoapertura, denominada fastigio (Figs. 6, 8 y 10).



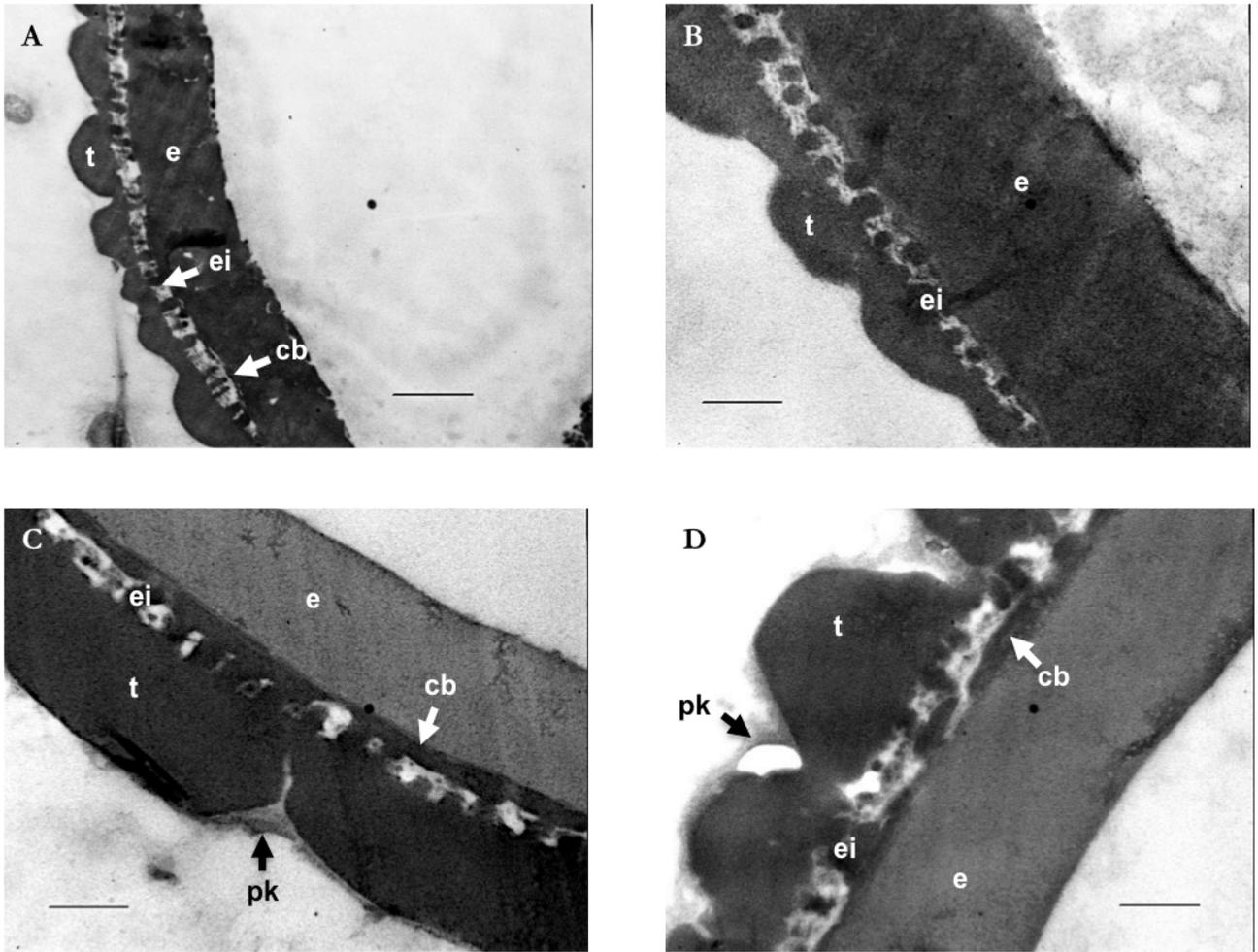
**Fig. 11.** Ultraestructura de la exina (TEM) de (A,B) *Desmodium procumbens* var. *procumbens*. (C,D) *D. procumbens* var. *exiguum*. (E,F) *D. procumbens* var. *longipes*. cb= capa basal, e= endexina, ei= elementos infratectales, i= intina, pk= pollen kitt, t= tectum. Escala = 0.5  $\mu$ m, (C) 1  $\mu$ m. TEM= microscopio electr3nico de transmisi3n.

**Cuadro 7.** Características particulares de la escultura de los granos de polen del grupo *Desmodium procumbens*.

Especie	Grosor de las rugulas ( $\mu\text{m}$ )	Apocolpio	Margo	Patrón entre las rugulas
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	$4.2 \times 3.28$	Liso a ligeramente rugulado	Liso	No detectado
<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	$2.13 \times 1.19$	Rugulado	Liso	No detectado
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	$3.48 \times 2.44$	Rugulas de mayor grosor	Ligeramente rugulado	Conexiones entre las rugulas
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	$5.45 \times 2.88$	Rugulas de mayor grosor	Ligeramente rugulado	Conexiones entre las rugulas
<i>D. neomexicanum</i>	$2-3 \times 2$	Foveolado	Liso	No detectado

Con respecto a las observaciones de la estructura de la exina analizada con TEM, los granos de polen de los miembros del grupo *Desmodium procumbens* muestra algunas diferencias entre ellos. En general, su ectexina está formada por un tectum delgado y continuo con ornamentación rugulada; sin embargo, se observaron diferencias en el tamaño de las rugulas entre los taxa, siendo de mayor grosor en *D. procumbens* var. *transversum* y *D. neomexicanum* (Cuadro 7), en contraste con el resto de las variedades. Se observó la presencia de pollenkitt cubriendo la pared de los granos de polen de todos los individuos estudiados, encontrándose en menor cantidad en *D. procumbens* var. *exiguum* y *D. procumbens* var. *transversum* (Figs. 11 C,D y 12 A,B).

La estructura infratectal del grupo de estudio está integrada por gránulos y columelas, lo que concuerda con lo observado por Ferguson y Skvarla (1983) para la estructura del polen de las papilionoides, quienes en su clasificación basada en el tipo de elementos infratectales que presentan, ubicaron a los miembros de la tribu Desmodieae dentro del tipo estructural al que denominaron “Tipo B”, que se caracteriza por la presencia de grupos de gránulos y columelas densamente empaquetados.



**Fig. 12.** Exinas de (A,B) *Desmodium procumbens* var. *transversum* y (C,D) *D. neomexicanum*. cb= capa basal, e= endexina, ei= elementos infratectales, i= intina, pk= pollenkitt, t= tectum. Escala = 0.5  $\mu$ m, (H) 1  $\mu$ m.

Los elementos infratectales de *D. procumbens* var. *exiguum* y *D. procumbens* var. *transversum* (Figs. 11 C,D y 12 A,B) de acuerdo con Horvat y Stainier (1980), se disponen de forma homogénea debajo del tectum y forman una capa “desordenada” o “granular no orientada”, ya que pocos de sus gránulos se agrupan para formar columelas; en contraste con el arreglo heterogéneo o “granular orientado”, denominada así por la tendencia de que presentan los gránulos para agruparse y formar columelas, característica observada claramente en la exina del polen de *D. procumbens* var. *procumbens* y *D. procumbens* var. *longipes*; en *D. neomexicanum* se aprecia una proporción similar de gránulos y columelas.

Una característica de la estratificación de la exina del polen en las leguminosas y que distingue a los integrantes de la tribu Desmodieae, es la tendencia de un aumento del grosor de la endexina correlacionado con un adelgazamiento o pérdida de la capa basal, (Ferguson y Skvarla, 1981; Guinet y Ferguson (1989). Tendencia que se ejemplifica claramente con el grupo *Desmodium procumbens*, cuyos miembros que tienen una endexina de mayor grosor *D. neomexicanum*, *D. procumbens* var. *exiguum* y *D. procumbens* var. *transversum*, por lo general, su capa basal no se observa claramente o esta ausente, a diferencia de los taxa en los que la capa basal es delgada y discontinua, como en *D. procumbens* var. *longipes*, *D. neomexicanum*, *D. procumbens* var. *transversum* que presentan una endexina de menor grosor (Figs. 11 y 12).

### 3.4 ESTUDIOS FILOGENÉTICOS CON EVIDENCIA MOLECULAR

De las 72 accesiones incluidas en este estudio, se obtuvieron secuencias para 63 de ellas, de las cuales, 29 corresponden a la región ITS, que junto con dos secuencias descargadas del GenBank (*Hylodesmum podocarpum* y *Desmodium heterocarpon*), conformaron una matriz con un total de 31 accesiones para esta región del ADNnr. Para la región del espaciador *psbA-trnH* del ADN del cloroplasto, la matriz final quedó integrada por 33 secuencias, 32 obtenidas en este estudio y una secuencia descargada del GenBank (*H. podocarpum*). Las características de las secuencias se presentan en el Cuadro 8. Para el resto de las accesiones incluidas en el análisis, no se logró amplificar una o ambas regiones.

En el alineamiento de ambas regiones amplificadas no se encontraron ambigüedades, excepto por la presencia de regiones en las que se presentaron inserciones o deleciones y de algunas posiciones inciertas.

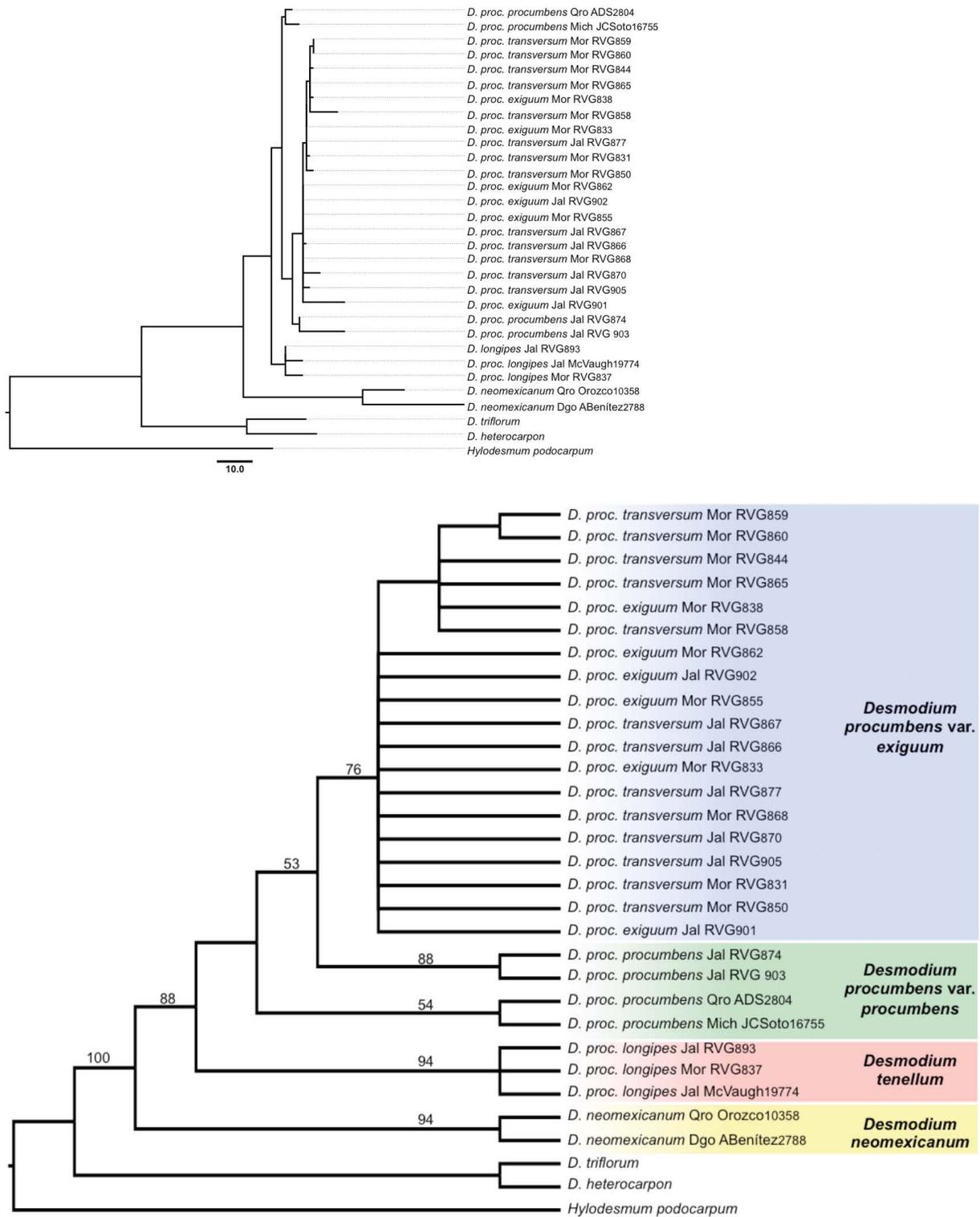
La prueba de incongruencia de caracteres reveló que no existe incongruencia significativa entre los conjuntos de datos de la región nuclear ribosomal y del cloroplasto ( $p= 0.382$ ). Lo anterior indica que estas regiones son homogéneas, por lo que los datos de ITS y del espaciador *psbA-trnH* se combinaron para ser analizados filogenéticamente.

**Cuadro 8.** Estadísticos de los árboles individuales y combinado para las regiones ITS y *psbA-trnH*.

	ITS	<i>psbA-trnH</i>	ITS + <i>psbA-trnH</i>
Número de accesiones	31	33	30
Longitud del alineamiento (pb)	727	423	1150
Número de caracteres parsimoniosamente informativos	89	19	102
Caracteres variables	157	44	202
Caracteres constantes	481	360	846
Número de árboles retenidos	980	520	730
Longitud del árbol más parsimonioso	335	68	389
Índice de Consistencia (IC)	0.88	0.95	0.91
Índice de Consistencia, sólo caracteres informativos	0.76	0.86	0.79
Índice de Retención (IR)	0.71	0.94	0.83

#### *Datos nucleares ITS*

Las características del análisis filogenéticos de la región ITS se resumen en el Cuadro 8. El árbol de consenso estricto, junto con uno de los árboles más parsimoniosos obtenidos en este análisis se presentan en la Figura 13. Este análisis filogenético resolvió a *Desmodium neomexicanum*, considerado especie morfológicamente cercana al grupo *D. procumbens*, como su especie hermana. Por otro lado, *D. procumbens* var. *longipes* forma un clado bien apoyado por el análisis bootstrap (94%) que a su vez, es hermano del resto de los miembros de este grupo morfológico; sin embargo, las relaciones filogenéticas entre el resto de los taxa no están claramente resueltas, ya que var. *procumbens* forma dos clados, que se resuelven como hermanos de la politomía formada por var. *exiguum* y var. *transversum*; sin embargo, uno de los clados de var. *procumbens* cuenta con un bajo apoyo del análisis bootstrap (54%).



**Fig. 13.** Árbol de consenso estricto y uno de los de los 980 árboles más parsimoniosos obtenido del análisis filogenético de la región nuclear ribosomal (ITS). Números sobre las ramas son los valores bootstrap mayores al 50% (L= 335, IC= 0.88, IR= 0.71).

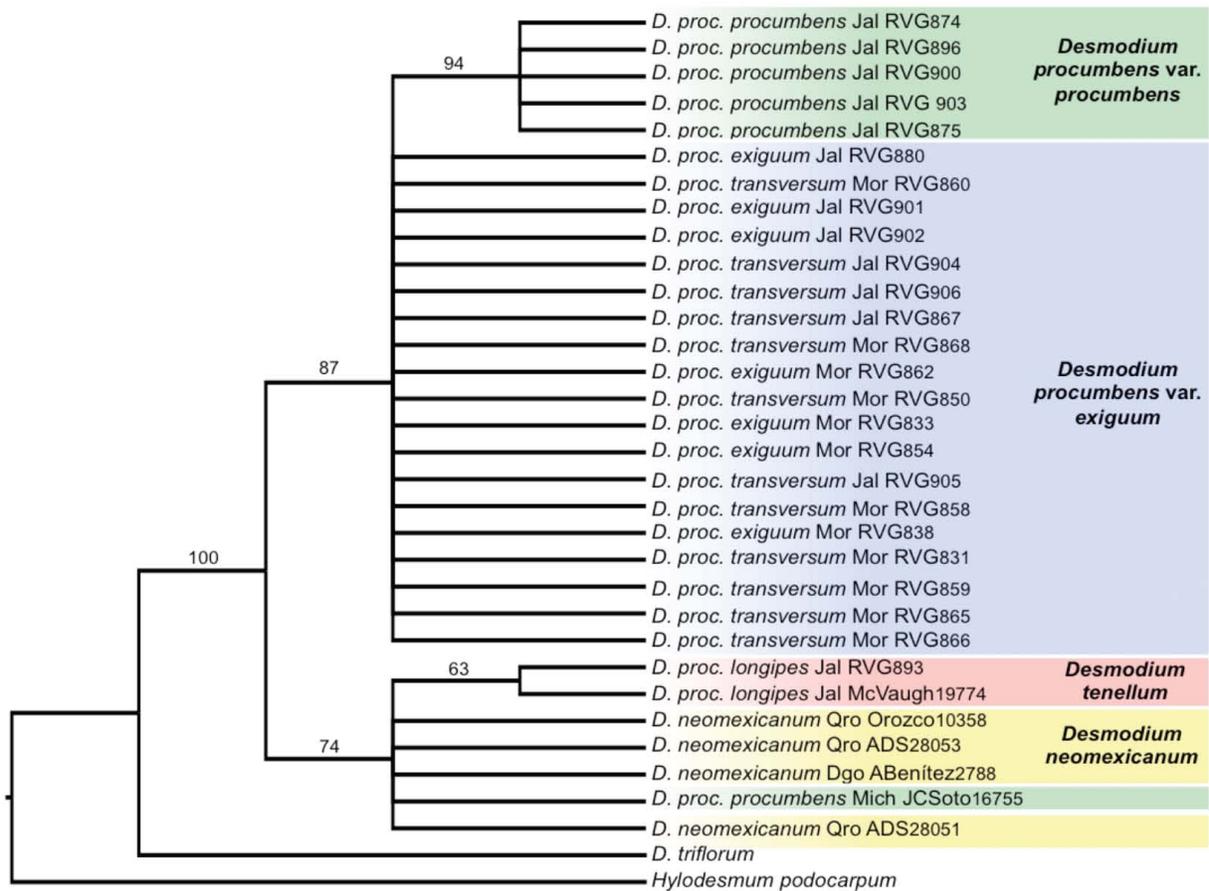
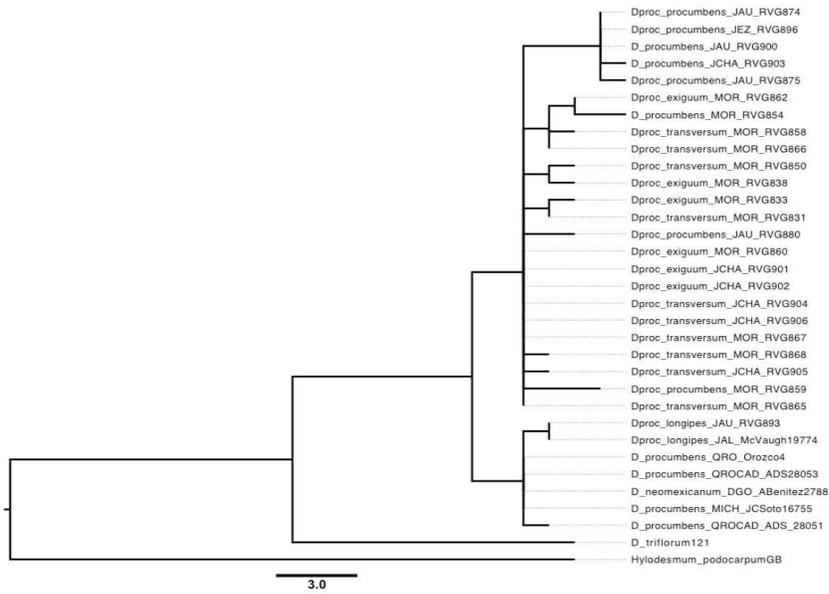
#### *Datos de cloroplasto psbA-trnH*

El análisis filogenético realizado con el conjunto de datos del espaciador del cloroplasto no aporta resolución al grupo *Desmodium procumbens* (Fig. 14), ya que separa los taxa incluidos en este grupo en dos clados principales, en el primero se encuentra *D. neomexicanum*, junto con una accesión de *D. procumbens* var. *procumbens* y el subclado que, de manera similar a los resultados obtenidos con ITS, forma var. *longipes*; sin embargo, en este análisis su apoyo es menor (63%). El segundo clado es una politomía formada por var. *exiguum* y var. *transversum* y un subgrupo integrado por el resto de las accesiones de la var. *procumbens*, el cual cuenta con un buen apoyo de bootstrap (94%).

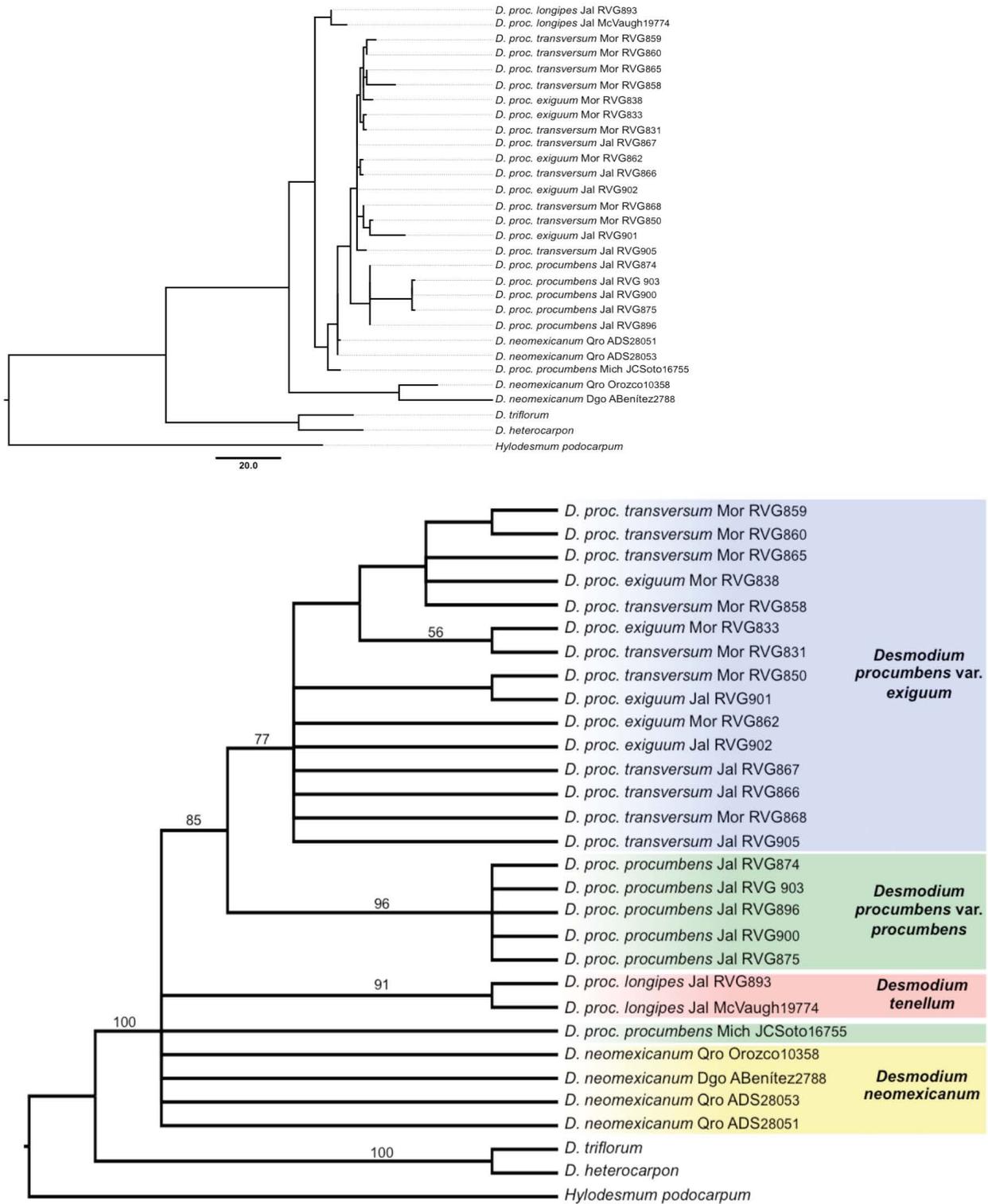
#### *Análisis combinados*

Para llevar a cabo el análisis combinando ambas regiones, se incluyeron 28 accesiones de las 63 obtenidas en este estudio, junto con dos secuencias que fueron descargadas del GenBank (Cuadro 8). El análisis filogenético, del mismo modo que los análisis individuales, resuelve claramente la relación entre *Desmodium triflorum*, *Hylodesmum podocarpum*, especies del viejo mundo y el grupo *D. procumbens* (Fig. 15). Por otro lado, el resultado obtenido en el análisis de ITS con respecto a *D. neomexicanum* como grupo hermano del grupo *D. procumbens* no se recupera y su relación con el grupo no es clara, resultado similar al obtenido con el espaciador *psbA-trnH*; sin embargo, de forma similar a los resultados obtenidos en el análisis de cada región, se mantiene el clado formado por var. *longipes*, el cual mantiene un buen apoyo bootstrap (91%). El clado principal de esta topología está conformado por dos subclados, el primero con un soporte alto (96%) está integrado por var. *procumbens*, el cual se resuelve como hermano del subclado formado por var. *exiguum* y var. *transversum*.

Los resultados obtenidos en el análisis realizado con ITS apoyan lo establecido por Schubert (1940), quien consideró a *Desmodium neomexicanum* como especie morfológicamente cercana al grupo *D. procumbens*; no obstante, las relaciones entre ambos no se han aclarado completamente, ya que este resultado no se recuperó en el análisis llevado a cabo con *psbA-trnH* y al combinar ambas regiones; sin embargo, la presencia de algunos caracteres morfológicos como, ser plantas que tienden a ser erectas, con hojas trifolioladas lineal ovado a lineal lanceoladas. Con respecto a su fruto, lo observado en los ejemplares incluidos en los análisis moleculares,



**Fig. 14.** Árbol de consenso estricto de los 470 árboles más parsimoniosos de la región *psbA-trnH* (ADNcp). Números sobre las ramas son los valores bootstrap mayores al 50% (L= 99, IC= 0.95, IR= 0.93).



**Fig. 15.** Árbol de consenso estricto y uno de los 730 árboles más parsimoniosos resultantes de los conjuntos de datos de la región nuclear ribosomal (ITS) y *psbA-trnH* combinados. Números sobre las ramas son los valores bootstrap mayores al 50% (L= 389, IC= 0.91, IR= 0.83).

concuera con lo indicado por McVaugh (1987), ya que se observó que los lomentos pueden ser aplanados y en ocasiones, pueden contorsionarse de forma similar a los de *D. procumbens* var. *procumbens*, lo que comúnmente causa confusión en la determinación taxonómica de los ejemplares, y a diferencia del grupo *D. procumbens*, su último artículo es glabro. Por otro lado, algunas de sus características palinológicas observadas en este trabajo, como la presencia de fastigio, apocolpio foveolado, margo liso de hasta 4  $\mu\text{m}$  de grosor, y presentar una estructura infratectal con una proporción similar de gránulos y columelas, también aportan información para considerar a *D. neomexicanum* como especie distinta, pero sí relacionada a este grupo.

En los análisis filogenéticos realizados con ITS y el espaciador *psbA-trnH* de manera individual, *Desmodium procumbens* var. *longipes* se mantiene como un clado, resultado que se conserva al combinar ambas regiones. Aunque su posición como hermano del resto de los taxa únicamente se presentó en el análisis con ITS, su posición es cercana a *D. neomexicanum* y no queda incluido como un subclado de los clados principales integrados por var. *procumbens*, var. *exiguum* y var. *transversum* (Fig. 14). Por otro lado, junto con la evidencia molecular obtenida en este estudio, var. *longipes* presenta evidencia morfológica que debe de ser tomada en cuenta para reconsiderar su posición taxonómica. Entre estos caracteres morfológicos, destaca el que son plantas erectas de hasta 50 cm de alto; sus dos primeros pares de ramas son opuestas, presentan entrenudos largos y en ocasiones, sus nudos pueden presentar una coloración morada; sus hojas son trifolioladas, membranáceas, largamente pecioladas, generalmente las de la inflorescencia son unifolioladas y con el folíolo terminal más grande que los laterales; sus estípulas y brácteas son deciduas; sus flores son blanquecinas con pigmentaciones moradas en estandarte y alas, además, su quilla y las alas son de mayor tamaño que el estandarte. Su fruto comienza a torcerse al iniciar su desarrollo y generalmente está más contorsionado que en otros taxa del grupo *D. procumbens*. Además, sus granos de polen presentan fastigio y sus rugulas son de menor grosor que el resto de los taxa revisados y su margo es similar al de *D. neomexicanum*, en escultura y grosor. Por lo tanto, al elevar a este taxón a la categoría taxonómica de especie y después de llevar a cabo la revisión de la literatura correspondiente, el nombre con el que debe de ser reconocido es *Desmodium tenellum* (Kunth) DC.

En los análisis filogenéticos realizados con cada marcador molecular y en su conjunto, las relaciones de *Desmodium procumbens* var. *procumbens* no se resuelven completamente, ya que una

accesión de este taxón se ubica junto a *D. neomexicanum* y el clado formado por var. *longipes*. A pesar de esto, el resto de las accesiones de var. *procumbens* conforman un clado con buen soporte (Fig. 14), cuyos miembros también comparten características morfológicas que apoyan su agrupación, por ejemplo, la mayoría son plantas postradas, sin embargo, algunas tienden a ser erectas y pueden llegar a medir más de 1 m de alto; generalmente la mayoría de sus ramas nacen del nudo cotiledonar, pero aquellas que son erectas, su primer par de ramas suele ser opuesto y presentan una coloración morada en sus nudos; sus hojas son trifolioladas, lanceoladas; las brácteas son persistentes y sus flores son blanco-amarillentas o rosadas, su quilla y alas son de tamaño similar al estandarte; su lomento se tuerce en menor grado que la var. *longipes* y todos sus artículos tienen tricomas. Además, sus granos de polen presentan fastigio, apocolpio liso a rugulado y su margo no está muy engrosado; además, su estructura infratectal es heterogénea.

Por otro lado, el clado formado por *Desmodium procumbens* var. *procumbens* se resuelve como grupo hermano del clado integrado por *D. procumbens* var. *exigum* y *D. procumbens* var. *transversum*, que morfológicamente, tanto en el campo como en ejemplares de herbario, pueden ser confundidos y en los resultados de los análisis filogenéticos, no se establece una separación clara entre ambos. Lo anterior puede indicar que los cambios en sus genomas no han sido suficientes como para generar diferencias que permitan reconocerlos a cada uno como una entidad o incluso, como variedades diferentes. Además, ambos comparten caracteres morfológicos como su hábito postrado, presentan heterofilia en un individuo (hojas trifolioladas y unifolioladas), siendo los de su base unifoliolados y en las parte superior trifolioladas, así como tener folíolos de diferente forma, que van de elípticos a transversalmente elípticos o romboidales y su fruto es estipitado. Sus granos de polen no presentan fastigio, desarrollan un patrón característico en la ornamentación de sus granos de polen, sus rugulas son más gruesas en el apocolpio y su estructura infratectal es homogénea.

## IV CONCLUSIONES

Los números cromosómicos no aportaron información taxonómica que ayude en la delimitación de los taxa incluidos en el grupo *Desmodium procumbens*. Sin embargo, se debe continuar con los estudios cariológicos y cariotípicos en este grupo para determinar si existe alguna característica morfológica en los cromosomas que pueda ser utilizada en la delimitación taxonómica de estos organismos.

A pesar de que los resultados obtenidos durante el desarrollo de plántulas de los miembros del grupo *Desmodium procumbens* fueron escasos, se pudo observar que *D. neomexicanum* mostró un cambio en su filotaxia a partir del tercer nodo. Por lo que es importante continuar con los estudios morfológicos de plántulas, para determinar si esta etapa del desarrollo puede brindar mayor información que contribuya a delimitar de las especies estudiadas.

Los granos de polen del grupo *Desmodium procumbens* presentan características homogéneas; sin embargo, las diferencias observadas en el grosor y ornamentación del margo, la ausencia de fastigio y características de la escultura de la exina, permiten y diferenciar a *Desmodium procumbens* var. *exiguum* y *Desmodium procumbens* var. *transversum* del resto de los miembros del grupo estudiado.

Las observaciones de la ultraestructura de los granos de polen del grupo estudiado muestran que la distribución de sus elementos infratectales es muy regular, por lo que no aportan información suficiente para distinguir claramente entre los taxa del grupo *Desmodium procumbens*.

Con respecto a los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos, *Desmodium neomexicanum* debe de considerarse como hermano del grupo *D. procumbens*. La ausencia de pubescencia en el último artículo de su lomento y que sea de mayor tamaño que el resto de los artículos, junto con la forma de las hojas, pueden considerarse como apomorfías de esta especie.

Con base en los resultados obtenidos por los análisis filogenéticos y con ayuda de evidencia morfológica, *Desmodium procumbens* var. *longipes* debe de ser reubicado taxonómicamente y considerado especie diferente *Desmodium tenellum* (Kunth) DC. Sin embargo, se debe continuar con los estudios moleculares e incrementar en lo posible el número de accesiones para confirmar los resultados obtenidos. Por otro lado, debido a que no se obtuvo suficiente evidencia molecular y que existe evidencia morfológica que comparten *Desmodium procumbens* var. *exiguum* y *Desmodium procumbens* var. *transversum*, ambos deben de ser considerados como una sola entidad taxonómica, bajo el nombre de *Desmodium procumbens* var. *exiguum*.

## V LITERATURA CITADA

- Aldrich, J., B. W. Cherney, E. Merlin y L. Christopherson. 1988. The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Current Genetics* **14**: 137-146.
- Allan, G. J. y J. M. Porter. 2000. Tribal delimitation and phylogenetic relationships of Loteae and Coronilleae (Faboideae: Fabaceae) with special reference to *Lotus*: evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. *American Journal of Botany* **87**: 1871-1881.
- APG. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **85**: 531-553.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105-121.
- Bailey, C. D., J. J. Doyle, T. Kajita, T. Nemoto y H. Ohashi. 1997. The chloroplast *rpl2* intron and ORF184 as phylogenetic markers in the legume tribe Desmodieae. *Systematic Botany* **22**: 133-138.
- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example for Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **1**: 3-16.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell y M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**: 247-277.
- Baudet, J. C. 1974. Signification taxonomique des caractères blastogéniques dans la tribu des Papilionaceae-Phaseoleae. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* **44**: 259-293.
- Biondo, E. S., T. S. Mohito y M. T. Schifino-Wittmann. 2005. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região sul do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **28**: 797-808.
- Bruneau, A., J. J. Doyle y J. F. Palmer. 1990. A chloroplast DNA inversion as a subtribal character in the Phaseoleae (Leguminosae). *Systematic Botany* **15**(3): 378-386.
- Bruneau, A., F. Forest, P. S. Herendeen, B. B. Klitgaard y G. P. Lewis. 2001. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Systematic Botany* **26**(3): 487-514.

- Chappill, J. 1995. Cladistic analysis of the Leguminosae: The development of an explicit phylogenetic hypothesis. In: M. D. Crisp y J. J. Doyle (eds.), *Advances in Legume Systematics*. Parte 7. Royal Botanical Gardens, Kew, England, pp.1-9.
- Cooper, D. C. 1936. Chromosome numbers in the Leguminosae. *American Journal of Botany* **23**: 231-233.
- Delgado-Salinas, A., T. Turley, A. Richman y M. Lavin. 1999. Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic Botany* **24**: 438-460.
- Delgado-Salinas, A., R. Bibler y M. Lavin. 2006. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany* **31**: 779-791.
- Downie, S. R., R. G. Olmstead, G. Zurawski, D. E. Soltis, P. S. Soltis, J. C. Watson y J. D. Palmer. 1991. Six independent losses of the chloroplast DNA *rpl2* intron in dicotyledons: molecular and phylogenetic implications. *Evolution* **45**: 1245-1259.
- Downie, S. R. y J. D. Palmer. 1992. Use of chloroplast DNA reconstruction in plant phylogeny. In: P. S. Solis, D. E. Soltis y J. J. Doyle (eds.), *Molecular Systematics of Plants*. Chapman and Hall, New York, pp. 14-35.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.
- Doyle, J. J., J. L. Doyle y J. D. Palmer. 1995. Multiple independent losses of two genes and one intron from legume chloroplast genomes. *Systematic Botany* **20**: 272-294.
- Doyle, J. J., J. A. Chappill, C. D. Bailey y T. Kajita. 2000. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In P. S. Herendeen y A. Bruneau (eds.), *Advances in Legume Systematics*. Parte 9. Royal Botanical Gardens, Kew, England, pp.1-20.
- Doyle, J. J. y M. A. Luckow. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* **131**: 900-910.
- Duke, J. A. y R. M. Polhill. 1981. Seedling of Leguminosae. In: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.). *Advances in Legume Systematics* Parte 2. Royal Botanical Gardens, Kew, England, pp. 941-949.
- Erdtman, G. 1952. Pollen morphology and plant taxonomy, Angiosperms. Almqvist and Wiksell. Stockholm. 539 pp.
- Erdtman, G. 1960. The acetolysis method, a revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift Utgiffvenaf Svenska Botaniska Foreningen* **54**: 561-564.

- Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge y C. Bult. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**: 315-319.
- Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge y C. Bult. 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Systematic Biology* **44**: 570-572.
- Ferguson, I. K. y J. J. Skvarla. 1979. The pollen morphology of *Cranocarpus martii* Bentham (Leguminosae: Papilionoide). *Grana* **18**: 15-20.
- Ferguson, I. K. y J. J. Skvarla. 1981. The pollen morphology of the subfamily Papilionoideae (Leguminosae). In: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.). *Advances in Legumes Systematics*, Parte 2. Royal Botanical Gardens, Kew, England, pp. 859-896.
- Ferguson, I. K. y J. J. Skvarla. 1983. The granular interstitium in the pollen of subfamily Papilionoideae (Leguminosae). *American Journal of Botany* **70**: 1401-1408.
- Frahm-Leliveld, J. A. 1953. Some chromosome numbers in tropical leguminous plants. *Euphytica* **2**: 46-48.
- Goldblatt, P. 1981. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. In: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.). *Advances in Legume Systematics*. Parte 2. Royal Botanical Gardens, Kew, England, pp. 427-463.
- Guinet, Ph. y I. K. Ferguson. 1989. Structure, evolution and biology of pollen in Leguminosae. In: C. H. Stirton y J. L. Zarucchi (eds.). *Advances in Legumes Biology. Monograph. Systematic. Botany. Missouri Botanical. Garden* **29**: 77-103.
- Horvat, F. y F. Stainier. 1980. L'étude de l'exine dans le complexe *Phaseolus-Vigna* et dans des genres apparentes, IV. *Pollen et Spores* **22**: 139-172.
- Jiménez-García, L. F., M. L. Segura-Valdez. 2004. Visualizing nuclear structure in situ by atomic force microscopy. In: P. C. Braga y D. Ricci (eds.) *Methods in Molecular Biology*, vol. 242: Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Judd, W., C. Campbell, E. Kellogg, P. Stevens y M. Donoghue. 2008. Plant Systematics. Ed. Sinauer, Massachusetts.
- Kajita, T., H. Ohashi, Y. Tateishi, C. D. Bailey y J. J. Doyle. 2001. *rbcL* and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae y allies. *Systematic Botany* **26**: 515-536.
- Käss, E. y M. Wink. 1996. Molecular evolution of the Leguminosae: phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL*-sequences. *Biochemical Systematics and Ecology* **24**: 366-378.

- Käss, E., y M. Wink. 1997. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (Family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (*rbcL*) and nDNA (ITS1 and ITS2). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **8**: 65-88.
- Katoh, K., K. Misawa, K. Kuma y T. Miyata. 2002. MAFFT; a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**: 3059-3066.
- Kawakami, J. 1930. Chromosome numbers in Leguminosae. *Botanical Magazine Tokio* **44**: 319-328.
- Kress, W. J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt y D. H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8369-8374.
- Lavin, M., J. J. Doyle y J. D. Palmer. 1990. Evolutionary significance of the loss of the chloroplast-DNA inverted repeat in the Leguminosae subfamily Papilionoideae. *Evolution* **44**: 390-402.
- Lewis, G., B. Schrire, B. Mackinder y M. Lock. 2005. Legumes of the world. The Royal Botanical Gardens, Kew, England.
- López, J., J. A. Devesa, T. Ruiz y A. Ortega-Olivencia. 1998. Seedling morphology in Genisteae (Fabaceae) from south-west Spain. *Botanical Journal of the Linnean Society* **127**: 229-250.
- LPWG (Legume Phylogeny Working Group). 2013. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* **62**: 217-248.
- Maddison, W. P. y D. R. Maddison. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 (<http://mesquiteproject.org>).
- McVaugh, R. 1987. *Flora Novo-Galiciana*. Vol. 5. Leguminosae. The University of Michigan Press. 796 p.
- Mercado-Ruaro, P. y A. Delgado-Salinas. 2009. Karyotypic analysis in six species of *Phaseolus* L. (Fabaceae). *Caryologia* **62**: 167-170.
- Nemoto, T. y H. Ohashi. 1993. Seedling morphology in *Lespedeza* (Leguminosae). *Journal of Plant Research* **106**: 121-128.
- Nesom, G. L. 1993. A new species of *Desmodium* (Fabaceae) from northeastern Mexico, with comments on the genus in Nuevo Leon. *Phytologia* **75**: 385-390.
- Nozzolillo, C. 1985. Seedling morphology and anatomy of eight *Cicer* species and their taxonomic value. *Canadian Journal of Botany* **63**: 1-6.

- Ohashi, H. 1973. The Asiatic species of *Desmodium* and its allied genera (Leguminosae). *Ginkgoana* **1**: 1-318.
- Ohashi, H., R. M. Polhill, y B. G. Schubert. 1981. Desmodieae. In: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.), *Advances in Legume Systematics*. Parte 1. Royal Botanical Gardens, Kew, England, pp. 292-300.
- Ohashi, H. 2005. Tribe Desmodieae. In: G.P. Lewis, B. Schrire, B. Mackinder y M. Lock (eds.). *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, England, pp. 433-451.
- Palmer, J. D., B. Osorio, J. Aldrich y W. F. Thompson. 1987. Chloroplast DNA evolution among legumes: Loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements. *Current Genetics* **11**: 275-286.
- Palmer, J. D., B. Osorio y W. F. Thompson. 1988. Evolutionary significance of inversions in legume chloroplast DNAs. *Current Genetics* **14**: 65-74.
- Rodrigues, R. S. y A. M. G. A. Tozzi. 2008. Systematic relevance of seedling morphology in *Acosmium*, *Guianodendron* and *Leptolobium* (Leguminosae-Papilionoideae). *Brittonia* **60**: 287-296.
- Rotar, P. P. y U. Urata. 1967. Cytological studies in the genus *Desmodium*: some chromosome counts. *American Journal of Botany* **54**: 1-4.
- Sanderson, M. J. y A. Liston. 1995. Molecular phylogenetic systematics of Galegeae, with special reference to *Astragalus*. In: M. Crisp y J. J. Doyle (eds). *Advances in Legume Systematics*. Parte 7, Royal Botanical Gardens, Kew, England, pp. 331-350.
- Sanderson, M. J. y M. F. Wojciechowski. 1996. Diversification rates in a temperate legume clade: Are there “so many species” of *Astragalus* (Fabaceae)? *American Journal of Botany* **83**: 1488-1502.
- Sang, T., D. J. Crawford y T. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* **84**: 1120-1136.
- Sannjappa, M. y R. P. Bhatt. 1985. Karyomorphological observations in some species of *Desmodium* Desv. (Fabaceae-Papilionoideae). *Cytologia* **50**: 487-497.
- Senn, H. A. 1938. Chromosome number relationships in the Leguminosae. *Bibliography Genetics (Gravenhage)* **12**: 175-345.
- Shaw, J., E. B. Lickey, J. T. Beck, S. B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. C. Siripun, C. T. Winder, E. E. Schilling y R. L. Small 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* **92**: 142-166.

- Silva, R. P., M. Magalhães S. y R. X. Correa. 2012. Karyomorphology of *Caesalpinia* species (Caesalpinioideae: Fabaceae) from Caatinga and Mata Atlántica biomes of Brazil. *Journal of Plant Studies* **1**: 82-91.
- Smith, D. L. 1981. Cotyledons of the Leguminosae. In: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.). *Advances in Legumes Systematics*, Part 2. Royal Botanical Gardens, Kew, England, pp. 927-940.
- Spellenberg, R. y D. E. Ward. 1988. Chromosome counts of angiosperms from New Mexico and adjacent areas. *Phytologia* **64**: 390-398.
- Spielman, A. y E. Stutz. 1983. Nucleotide sequence of soybean chloroplast DNA regions which contain the *psbA* and *trnH* genes and cover the ends of the large single copy region and one of the inverted repeats. *Nucleic Acids Research* **11**: 7157-7167.
- Sugita, M. y M. Sugiura. 1984. Nucleotide sequence and transcription of the gene for the 32000 dalton thylakoid membrane protein from *Nicotiana tabacum*. *Molecular Genetics and Genomics* **195**: 308-313.
- Sun, Y., D. Z. Skinner, G. H. Liang y S. H. Hulbert. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* **89**: 26-32.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Versión 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou y J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105-1109.
- Thompson, I. R., P. Y. Ladiges y J. H. Ross. 2001. Phylogenetic studies of the tribe Brongniartieae (Fabaceae) using nuclear DNA (ITS-1) and morphological data *Systematic Botany* **26**: 557-570.
- Torres-Colín, L., S. Fuentes-Soriano y A. Delgado-Salinas. 2010. Estudio palinológico del género *Macroptilium* (Benth.) Urb. (Leguminosae) en México y Centroamérica. *Acta Botanica Mexicana* **91**: 51-69.
- Turner, B. L. 1956. Chromosome numbers in the Leguminosae I. *American Journal of Botany* **43**: 577-581.
- Turner, B. L. y O. S. Fearing. 1959. Chromosome numbers in the Leguminosae II: African species, including phyletic interpretations. *American Journal of Botany* **46**: 49-57.
- Turner, B. L. y 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.

- Vanni, R. O. 2001. El género *Desmodium* (Leguminosae, Desmodieae) en Argentina. *Darwiniana* **39**: 255-285.
- Vanni, R. O. 1987. Recuentos cromosómicos en *Zornia*, *Stylosanthes* y *Desmodium*. *Bonplandia* (Corrientes) **6**: 39-43.
- Ward, E. D. 1983. Chromosome counts from New Mexico and southern Colorado. *Phytologia* **54**: 302-309.
- Wojciechowski, M. F., M. J. Sanderson, B. G. Baldwin y M. J. Donoghue. 1993. Monophyly of aneuploid *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany* **80**: 711-722.
- Wojciechowski, M. F., M. J. Sanderson, K. P. Steele y A. Liston. 2000. Molecular phylogeny of the "Temperate Herbaceous Tribes" of papilionoid legumes: a supertree approach. In: P. S. Herendeen y A. Bruneau (eds.). *Advances in Legume Systematics*. Parte 9, Royal Botanical Gardens, Kew, England, pp. 277-298.
- Wojciechowski, M. F., M. Lavin y M. J. 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.
- Young, J. 1940. Cytological investigations in *Desmodium* and *Lespedeza*. *Botanical Gazette* **101**: 839-850.
- Zurawski, G. H. J. Bohnert, P. R. Whitfeld y W. Bottomley. 1982. Nucleotide sequence of the gene for the Mr 32000 thylakoid membrane protein from *Spinaia oleacea* and *Nicotiana debneyi* predicts a totally conserved primary translation product of Mr 38950. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 7966-7703.

## APÉNDICE A.

**Cuadro I.** Material examinado en el análisis cariológico del grupo *Desmodium procumbens*.  
Todos los ejemplares están depositados en el Herbario MEXU.

Especie	Localidad	Datos de procedencia
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 806
<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	José Sixto Verduzco, Michoacán	E. Pérez y E. García 1825
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 826
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 824
<i>D. neomexicanum</i>	Álamos, Sonora	T.R. VanDevender 98-1602

**Cuadro II.** Material utilizado en el análisis morfológico de las plántulas del grupo *Desmodium procumbens*.  
Todos los ejemplares están depositados en el Herbario MEXU.

Especie	Localidad	Datos de procedencia
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 806
<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	José Sixto Verduzco, Michoacán	E. Pérez y E. García 1825
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 826
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 824
<i>D. neomexicanum</i>	Álamos, Sonora	T.R. VanDevender 2003-1127

**Cuadro III.** Material examinado en el análisis palinológico del grupo *Desmodium procumbens*.  
Todos los ejemplares están depositados en el Herbario MEXU.

Especie	Localidad	Datos de procedencia
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 806
<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	José Sixto Verduzco, Michoacán	E. Pérez y E. García 1825
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 826
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 824
<i>D. neomexicanum</i>	Álamos, Sonora	T.R. VanDevender 2003-1127

## APÉNDICE A. Cont.

**Cuadro IV.** Listado de especies utilizadas en el análisis filogenético del grupo *Desmodium procumbens*.  
 Todos los ejemplares se encuentran depositados en el Herbario Nacional del Instituto de Biología (MEXU).

Especie	Localidad	Datos de procedencia
<i>D. neomexicanum</i>	Álamos, Sonora	A.L. Reina 2006-1182
<i>D. neomexicanum</i>	Tlacolula, Oaxaca	M. Sousa 9709
<i>D. neomexicanum</i>	Cadereyta, Querétaro	A. Delgado S. 2804
<i>D. neomexicanum</i>	Cadereyta, Querétaro	R. González V. 910
<i>D. neomexicanum</i>	Cadereyta, Querétaro	R. González V. 911
<i>D. neomexicanum</i>	Durango	A. Benítez 2788
<i>D. procumbens</i>	Apatzingan, Michoacán	R. McVaugh 17941
<i>D. procumbens</i>	Cadereyta, Querétaro	C. Orozco et al. 10358
<i>D. procumbens</i>	Barra de Navidad, Jalisco	O. Téllez 13812
<i>D. procumbens</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 820
<i>D. procumbens</i>	Cadereyta, Querétaro	A. Delgado S. 2805
<i>D. procumbens</i>	Cadereyta, Querétaro	A. Delgado S. 2805
<i>D. procumbens</i>	Cadereyta, Querétaro	A. Delgado S. 2805
<i>D. procumbens</i>	Cadereyta, Querétaro	A. Delgado S. 2805
<i>D. procumbens</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 887
<i>D. procumbens</i>	Emiliano Zapata, Jalisco	R. González V. 898
<i>D. procumbens</i>	Emiliano Zapata, Jalisco	R. González V. 899
<i>D. procumbens</i>	Emiliano Zapata, Jalisco	R. González V. 900
<i>D. procumbens</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 854
<i>D. procumbens</i>	Chamela, Jalisco	R. González V. 903
<i>D. procumbens</i>	Michoacán	J. C. Soto 16755
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 873
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 884
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Emiliano Zapata, Jalisco	R. González V. 897
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 874
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 875
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 878
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 880
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 881
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 882
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 883
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Emiliano Zapata, Jalisco	R. González V. 896

Cuadro IV. Cont.

Espece	Localidad	Datos de procedencia
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Chamela, Jalisco	R. González V. 908
<i>D. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 859
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Agua Amarilla, Sonora	T.R. VanDevender 2008-495
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 860
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Tepecoacuilco, Guerrero	G. Hall 101
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 862
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 855
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 833
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 804
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 809
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 815
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Estipac, Jalisco	R. González V. 870
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Estipac, Jalisco	R. González V. 871
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 876
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 877
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Chamela, Jalisco	R. González V. 901
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 838
<i>D. procumbens</i> var. <i>exiguum</i>	Chamela, Jalisco	R. González V. 902
<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 837
<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 893
<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	Calmecca, Puebla	M. Sousa 12452
<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	Putla, Oaxaca	O. Téllez 3894
<i>D. procumbens</i> var. <i>longipes</i>	Autlán, Jalisco	R. McVaugh 19775
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 858
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 867
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 868
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 865
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 866
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 844
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 850
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 852
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Jojutla, Morelos	R. González V. 831
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Nayar, Nayarit	A. Domínguez 2938

**Cuadro IV.** Cont.

Espece	Localidad	Datos de procedencia
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Autlán, Jalisco	R. González V. 879
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Chamela, Jalisco	R. González V. 905
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Chamela, Jalisco	R. González V. 904
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Chamela, Jalisco	R. González V. 906
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Chamela, Jalisco	R. González V. 907
<i>D. procumbens</i> var. <i>transversum</i>	Lagos de Moreno, Jalisco	O. Téllez 13812
<i>D. triflorum</i>	Puebla	J. L. Contreras 5973
<i>D. heterocarpon</i>	Taiwán	ID GB   GQ413942.1* TNM S138550
<i>Hylodesmum podocarpum</i>	Corea del Sur	ID GB   GU572166.1* B.H. Choi 9810
<i>H. podocarpum</i>	Corea del Sur	ID GB   GU572286.1*B.H. Choi 9810

\*Secuencias descargadas del GenBank.

## **APÉNDICE B.** Descripción de las metodologías utilizadas en este estudio.

Acetólisis (Erdtman, 1960) modificado por Torres-Colín et al. (2010).

- Agregar ácido acético y agitar constantemente.
- Centrifugar durante 10 minutos a 2500 rpm.
- Decantar el sobrenadante, teniendo cuidado de no tirar el precipitado.
- Agregar ácido acético y agitar constantemente.
- Centrifugar durante 10 minutos a 2500 rpm.
- Decantar el sobrenadante teniendo cuidado de no tirar el precipitado.
- Agregar la mezcla acetolítica (anhídrido acético-ácido sulfúrico 9:1).
- Incubar a 65-70°C agitando constantemente durante 12 min.
- Agregar ácido acético, agitar, centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos y decantar el sobrenadante, teniendo cuidado de no tirar el precipitado (repetir dos veces).
- Agregar agua destilada, agitar, centrifugar durante 10 minutos a 2500 rpm y decantar el sobrenadante (repetir cuatro veces).
- Tamizar con una malla de 30-40  $\mu\text{m}$  de diámetro y recuperar el filtrado.
- Centrifugar el filtrado durante 10 minutos a 2500 rpm.
- Agregar agua destilada, agitar, centrifugar durante 10 minutos a 2500 rpm y decantar.
- Agregar un poco de agua y agitar.
- Preparación de las muestras permanentes

## APÉNDICE B. Cont.

Extracción de ADN a partir de pequeñas cantidades de tejido vegetal (Doyle y Doyle, 1987).

- Añadir 4  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada 1 mL de CTAB a usar. Precalentar a 65°C por 15 min.
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla a cada muestra colocada en un tubo de 1.5 mL.
- Moler la muestra con un micropistilo.
- Incubar a 65°C durante 30 minutos.
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamilico 24:1, conservado a 4°C) a cada muestra.
- Incubar a temperatura ambiente con agitación suave y continua durante 30 minutos.
- Centrifugar a 9000 rpm durante 10 minutos.
- Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo de 1.5  $\mu\text{L}$ , teniendo cuidado de no tomar los sólidos ni la fase inferior que contiene el SEVAG.
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto frío, si se está trabajando con material fresco o isopropanol al 100% si se trata de ejemplares de herbario.
- Colocar en el refrigerador a -20°C durante 24 horas; para ejemplares de herbario 7 días.
- Centrifugar durante 15 minutos a 13000 rpm.
- Decantar el sobrenadante y escurrir en papel absorbente teniendo cuidado de no tirar el precipitado.
- Agregar 100  $\mu\text{L}$  de etanol frío al 85% para lavar el precipitado.
- Centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm.
- Decantar el sobrenadante e invertir el tubo sobre papel absorbente hasta secar.
- Resuspender el pellet de ADN en 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.
  - Si las muestras se emplearán el mismo día, dejar a temperatura ambiente durante 1 hr, de lo contrario, almacenar a -20°C.

**APÉNDICE C.** Nomenclatura de los taxa mencionados en este trabajo.

*Acacia senegal* (L.) Willd.

*Acosmium* Schott

*Adenocarpus* DC.

Aeschynomeneae (Benth.) Hutch.

*Aeschynomene* L.

*Alysicarpus* Desv.

*Arachis* L.

*A. hypogaea* L.

Bryinae B.G. Schub.

*Brya* P.Browne

*Campylotropis*

*Centrosema* (DC.) Benth.

*Cicer* L.

*Cicer arietinum* L.

*Cranocarpus martii* Benth.

Desmodieae (Benth.) Hutch.

Desmodiinae Benth.

*Desmodium* Desv.

*D. canadense* DC.

*D. distortum* (Aubl.) J.F. Macbr.

*D. glabrum* DC.

*D. grandiflorum* DC.

*D. hassleri* (Schindl.) Burkart

*D. heterocarpon* (L.) DC.

*D. leiocarpum* G. Don

*D. molliculum* (Kunth) DC.

*D. neomexicanum* A.Gray

*D. painteri* Standl.

*D. palmeri* Hemsl.

*D. pachyrhizum* Vogel

*D. perpesium*  
*D. procumbens* (Mill.) Hitchc.  
*D. procumbens* var. *exiguum* (A. Gray) B.G. Schub.  
*D. procumbens* var. *longipes* (Schindl.) B.G. Schub.  
*D. procumbens* var. *procumbens* B.G. Schub.  
*D. procumbens* var. *transversum* (B.L. Rob. & Greenm.) B.G. Schub.  
*D. retinens* Schldtl.  
*D. riedelii* (Schindl.) Burkart  
*D. rotundifolium* Wall.  
*D. rosei* B.G. Schub.  
*D. salicifolium* DC.  
*D. sessilifolium* Torr. & A. Gray  
*D. subrosam* G.L. Nesom  
*D. subsessile* Schldtl.  
*D. triflorum* (L.) DC.  
*D. wigginsii* B.G. Schub.  
*D. wightii* Graham  
 Genisteae Dumort  
*Glycine* Willd.  
*G. max* (L.) Merr.  
*Guianodendron praeclarum* (Sandwith) Sch.Rodr. & A.M.G. Azevedo  
*Haematoxylum campechianum* L.  
 Hedysareae DC.  
*Hylodesmum podocarpum* (DC.) H. Ohashi & R.R. Mill  
*Indigofera tinctoria* L.  
*I. suffruticosa* Mill.  
*I. arrecta* Hochst. ex A. Rich.  
*Kummerowia* Schindl.  
*Lens culinaris* Medik.  
*Leptolobium* Vogel  
 Lespedezinae (Hutch.) B.G. Schub.

*Lespedeza* Michx.  
*Lotus corniculatus* L.  
*Lupinus* L.  
*Macroptilium* (Benth.) Urb.  
*Medicago sativa* L.  
*Melilotus* (L.) Mill.  
*Neocolletia* Hemsl.  
*Ougeinia* Benth.  
*Pachyrhizus erosus* (L.) Urb.  
Phaseoleae (Bronn) DC.  
Phaseolinae Benth.  
*Phaseolus* L.  
*Phaseolus vulgaris* L.  
*Phylacium* Benn.  
*Pictetia* DC.  
*Pisum sativum* L.  
*Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth.  
*Pseudarthria* Wight & Arn.  
*Ramirezella* Rose  
*Retama* Raf.  
*Stylosanthes* Sw.  
*Tamarindus indica* L.  
*Trifolium* L.  
Viciae DC.  
*Vicia* L.  
*V. faba* L.  
*Vigna* Savi  
*V. radiata* (L.) R. Wilczek