



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

**SISTEMÁTICA Y CITOGENÉTICA DEL
COMPLEJO *Phaseolus pedicellatus* BENTH.
(PHASEOLINAE:FABACEAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

PEDRO MERCADO RUARO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFONSO O. DELGADO SALINAS

MÉXICO D.F.

OCTUBRE, 2006



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.

Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, que a través del Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM, otorgó una beca complementaria para la realización del doctorado.

También se agradece a la Dirección General de Estudios de Posgrado, Subdirección de Programas Institucionales de Apoyo al Posgrado, PAEP, el apoyo económico brindado para realizar el trabajo de laboratorio en secuenciación molecular. Clave del proyecto 201319.

Comité Tutorial:

Dr. Alfonso Octavio Delgado Salinas
Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Dr. Fernando Chiang Cabrera

DEDICATORIA

A **SARA** y **ALEX** por su amor siempre presente. Lo mejor de mi vida.

A mi madre.....Gracias, donde quiera que te encuentres.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial agradezco al **Dr. Alfonso O. Delgado Salinas** por la dirección y constante asesoría en el desarrollo de la presente tesis. Por su comprensión y apoyo en situaciones personales difíciles.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo y Dr. Fernando Chiang Cabrera, integrantes del Comité Tutoral, por las enriquecedoras observaciones y sugerencias durante el desarrollo y etapa final de la presente investigación.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz, Dra. Mercedes Isolda Luna Vega y Dra. Helga Ochoterena Booth, por aceptar ser parte del jurado revisor; sus observaciones y acertadas sugerencias enriquecieron notablemente el manuscrito final.

Al Instituto de Biología de la UNAM por todas las facilidades brindadas para la realización de los estudios de doctorado.

Al Dr. Héctor Hernández y Dra. Tila María Pérez Ortiz por su apoyo como directores del IBUNAM.

Al Dr. Miguel Ulloa y Claudio Delgadillo por las facilidades otorgadas como jefes del Departamento de Botánica del IBUNAM.

A la Biól. María del Rosario García Peña por la ayuda brindada en la obtención de ejemplares herborizados en préstamo de herbarios extranjeros.

A la M. en C. Laura Márquez, responsable del Laboratorio de biología molecular del IBUNAM por la ayuda y orientación brindada en la secuenciación de los ITS.

Al Dr. Fernando Chiang C. por sus observaciones críticas, pero sobre todo, por la amistad brindada.

Al Biól. Alfredo Wong León y al Lic. en Diseño Gráfico Julio Cesar Montero por todo el apoyo brindado en la parte de cómputo.

Al Biól. Alberto Reyes, M. en C. Fernando Tapia, Biól. Gabriel Flores, M. en C. Norma Oropeza y Biól. Pedro Tenorio por su compañía y apoyo en la colecta de material durante las salidas al campo.

Al M. en C. Rafael Torres por compartir material biológico importante para el presente trabajo.

Finalmente, gracias a todas aquellas personas que no son mencionadas por olvido involuntario, pero que intervinieron en la culminación de la presente tesis.

CONTENIDO

RESUMEN	VIII
ABSTRACT.....	X
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	2
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS PARTICULARES	11
HIPÓTESIS	12
CAPÍTULO II. ANÁLISIS MORFOLÓGICO.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
ANÁLISIS FENÉTICO.....	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	39
ANEXO II.1.....	44
ANEXO II.2.....	52
CAPÍTULO III. ESTUDIOS CITOGÉNÉTICOS.....	54
ESTUDIOS CROMOSÓMICOS EN <i>Phaseolus</i>	54
ESTUDIOS DE CONTENIDO DE ADN NUCLEAR EN <i>Phaseolus</i>	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
CROMOSOMAS.....	60
CONTENIDO DE ADN.....	63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
CROMOSOMAS.....	64

CONTENIDO DE ADN.....	74
CONCLUSIONES	79
ANEXO III.1.....	85
CAPÍTULO IV. FILOGENIA MOLECULAR.....	88
ESPACIADORES INTERNOS TRANSCRITOS (ITS)	88
MATERIALES Y MÉTODOS.....	93
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	101
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	110
CONCLUSIONES	118
ANEXO IV.1	119
CAPÍTULO V. REUBICACIÓN DE <i>Phaseolus dasycarpus</i>	126
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES GENERALES	143
REFERENCIAS.....	146

RESUMEN

El género *Phaseolus* L. (Fabaceae) tiene una distribución actual en el neotrópico y consiste de aproximadamente 75 especies distribuidas en 15 secciones; no obstante que contiene cinco especies con importancia económica, son pocos los estudios de las especies silvestres, la mayoría están concentrados en las cultivadas, principalmente en *P. vulgaris*, olvidando el valor que tiene el material silvestre como portador de variabilidad genética y de características deseables que pueden ser introducidas a las especies cultivadas, como ya se ha realizado en algunos casos.

Aun cuando en 2002 se realizó una revisión del género, el número de especies y las relaciones entre ellas aún no se resuelve. Al complejo *Phaseolus pedicellatus* a partir de la última revisión se le otorgó la categoría taxonómica de sección – sect. *Pedicellati*- constituida por 11 especies: *P. pedicellatus* Benth., *P. laxiflorus* Piper, *P. purpusii* Brandegees, *P. esperanzae* Seaton, *P. oaxacanus* Rose, *P. grayanus* Wooton & Standl., *P. palmeri* Piper, *P. polymorphus* S. Watson, *P. scabrellus* Benth. ex S. Watson, *P. teulensis* Freytag y *P. pyramidalis* Freytag. Excluyendo a las últimas dos especies, las nueve restantes habían sido consideradas como coespecíficas con *P. pedicellatus* o variedades de ella.

En este trabajo se realizaron estudios morfológicos, cromosómicos y de secuenciación de ADN nuclear de los espaciadores internos transcritos (ITS) en el complejo *Phaseolus pedicellatus*, con el objetivo principal de determinar el número de especies que la integran y sus relaciones. Se encontró que todas las especies analizadas cariotípicamente tienen números cromosómicos de $2n= 22$, con predominancia de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos y una segregación meiótica normal. El análisis filogenético mostró que *P. oaxacanus* no es parte de la sección y que *P. glabellus* junto con *P. neglectus*, utilizadas como especies del grupo externo, se anidan en el clado correspondiente a la sección *Pedicellati*.

Con la información generada en el presente estudio no se resuelve la sistemática de la sección *Pedicellati*, pero se establece que la sección no es monofilética.

ABSTRACT

Phaseolus L. (Fabaceae) is a Neotropical genus of approximately 75 species distributed in 15 sections, five of these species being of great economic importance. Most studies in the genus deal with the economically important cultivated species, particularly with *P. vulgaris*, overlooking the potential value of wild species as bearers of genetic variability and valuable characteristics that could be incorporated into the cultivated species, as it has been done in some cases.

A revision of the genus was undertaken in 2002; however, the number of species and the interspecific relationships are still unresolved. In that revision, the *Phaseolus pedicellatus* complex was accorded sectional status, i.e., section *Pedicellati*, with 11 species, namely *P. pedicellatus* Benth., *P. laxiflorus* Piper, *P. purpusii* Brandegees, *P. esperanzae* Seaton, *P. oaxacanus* Rose, *P. grayanus* Wootton & Standl., *P. palmeri* Piper, *P. polymorphus* S. Watson, *P. scabrellus* Benth. ex S. Watson, *P. teulensis* Freytag and *P. pyramidalis* Freytag. With the exception of the last two, the other nine species had been considered as conspecific with or varieties of *P. pedicellatus*.

In the present work several studies were undertaken, including morphologic, chromosomal, and of nuclear DNA sequencing of the internal transcribed spacers (ITS) in the *P. pedicellatus* complex, with the aim of determining the number of species that make up the complex, as well as their relationships. It was found that all the species analyzed for karyotype have $2n = 22$ chromosomes, with a prevalence of metacentric and submetacentric chromosomes, and normal meiotic segregation. The phylogenetic analysis showed that *P. oaxacanus* does not form part of the section *Pedicellati*; it also showed that *P. glabellus* and *P. neglectus*, both

employed as outgroup species, are nested in the clade corresponding to section *Pedicellati*.

The information generated in this study does not solve the systematics of section *Pedicellati*; however, it proves that the section is not monophyletic.

INTRODUCCIÓN

El género *Phaseolus* L. tiene una distribución actual en el neotrópico y pertenece a la subtribu Phaseolinae, una de las más notables por el número de géneros con importancia económica dentro de la familia Fabaceae o Leguminosae. *Phaseolus* tiene cinco especies cultivadas: *P. vulgaris* L. (frijol común), *P. coccineus* L. (frijol ayocote o escarlata), *P. dumosus* Macfad. (= *P. polyanthus* Greenm.) (frijol gordo o anual), *P. acutifolius* A. Gray (frijol escumite o tépari) y *P. lunatus* L. (frijol comba o lima), y desde tiempos previos al descubrimiento de América, se distinguió por ser un alimento básico de las civilizaciones americanas, situación que actualmente se extiende en prácticamente todo el mundo. Es tan grande la importancia del frijol en la dieta mundial, que un grupo de científicos, en el que participan varios mexicanos, formaron un consorcio internacional denominado **Phaseomics** (Broughton et al., 2003), cuyo objetivo principal es generar nuevas variedades, que no sólo sean adecuadas, sino también aceptadas por los agricultores y las comunidades consumidoras, a través de la formación de una red de conocimiento y materiales cuyos resultados serán la generación de frijoles de alto rendimiento, resistentes a enfermedades, tolerantes al estrés abiótico (edáfico e hídrico) y de alta calidad en proteínas.

No obstante la importancia de *Phaseolus*, el número de especies y las relaciones entre ellas están lejos de ser entendidas (Debouck, 1991, 2000; Freytag y Debouck, 2002); es un grupo que ha sufrido una serie de

cambios, tanto en la cantidad de secciones, como en el número de especies que deben ser consideradas; una relación condensada sobre tales cambios es presentada por Delgado-Salinas (1985) y Freytag y Debouck (2002). Contrariamente a lo que se podría pensar, y a pesar de su importancia, *Phaseolus*, en comparación con otros géneros cultivados, es menos conocido en lo referente al número de especies y las relaciones entre ellas.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

Conocida más comúnmente como Leguminosae, la familia Fabaceae es un grupo importante y diverso dentro de las angiospermas. Es la tercera familia más numerosa dentro de las plantas superiores, con 650 géneros y aproximadamente 18 000 especies (Lavin et al., 2005; Polhill, 1994; Polhill et al., 1981), en cuanto a su importancia en la agricultura, son superadas únicamente por las poáceas, siendo fijadoras de enormes cantidades de nitrógeno atmosférico por su asociación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium*, además de ser una fuente importante de proteína vegetal en la dieta humana y en alimento de ganado. Se calcula que las fabáceas proporcionan del 25 al 35% de las proteínas consumidas a nivel mundial (Broughton et al., 2003).

A nivel mundial, la familia ocupa el tercer lugar en el número de especies (National Academy of Sciences (NAS), 1979; Polhill et al., 1981), en la República Mexicana se ubica en segundo lugar, con 139 géneros y 1850 especies (Sousa et al., 2004), superada únicamente por la familia Asteraceae. Aunque las fabáceas están distribuidas en todo el país, hay más especies en las regiones tropicales (Sousa y Delgado, 1993), siendo los estados de Oaxaca y Chiapas los más ricos, resultado del traslapo de

varias provincias florísticas en los límites entre ambos estados (Sousa, 1986). Las Fabaceae se distribuyen en todos los hábitats terrestres, desde el ecuador hasta las orillas de los desiertos fríos y secos; sin embargo, existe una mayor diversidad en áreas de topografía variada y con climas estacionales (Polhill et al., 1981).

La familia Fabaceae está integrada por las subfamilias Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae aunque, para algunos autores, entre ellos Cronquist (1981), cada una de ellas debería ser considerada como familia independiente. De acuerdo con Lavin et al. (2005), la aparición de las primeras fabáceas ocurrió hace aproximadamente 60 millones de años, y que el registro fósil más antiguo corresponde a restos de frutos similares a los de *Diploptropis* y *Bowdichia*, ambos de las papilionoidéas. Estudios moleculares indican que las mimosoideas y papilionoideas son monofiléticas, mientras que las caesalpinioideas aparecen como parafiléticas (Doyle et al., 1997; Kajita et al., 2001).

Integrante de la subfamilia Papilionoideae se encuentra la tribu Phaseoleae, una de las económicamente más importantes con aproximadamente 84 géneros y 1500 especies, que incluye a los géneros *Phaseolus*, *Vigna* y *Glycine*, conocidos popularmente como frijoles; también se encuentran otros 14 géneros que pueden tener importancia como

alimento, forraje o de tipo ornamental (Lackey, 1981). *Phaseolus* y *Vigna*, géneros estrechamente relacionados, pertenecen a la subtribu Phaseolinae.

En el caso particular del género *Phaseolus*, aproximadamente 75 especies lo conforman (Freytag y Debouck, 2002), de las cinco cultivadas, *P. vulgaris* es la que más se consume y por lo tanto la especie más ampliamente cultivada. Después de las revisiones taxonómicas de Verdcourt (1970) y Maréchal et al. (1978), quedaron claros los límites del género y su restricción al continente americano, principalmente en las regiones montañosas de México (Sousa y Delgado, 1993; Debouck, 2000) y Centroamérica, en regiones tropicales y subtropicales entre los 37^o de latitud norte y 28^o de latitud sur (Debouck, 2000).

Las principales áreas de diversificación del género son las partes altas del centro (Estado de México a Jalisco) y sur de México (Chiapas), (Freytag y Debouck, 2002).

A nivel mundial, la importancia económica del cultivo de frijol radica en su consumo humano directo, con una producción que excede los 23 millones de toneladas métricas, de las cuales, siete son producidas en América Latina y África. En México, se estima que el consumo promedio per capita es mayor a 16 kg al año (Broughton et al., 2003).

Del frijol se puede consumir la semilla madura (lo más común) o inmadura, hojas, vainas y flores.

La posición taxonómica de *Phaseolus* es la siguiente:

Familia: Fabaceae
Subfamilia: Papilionoideae
Tribu: Phaseoleae DC.
Subtribu: Phaseolinae Benth.
Género: *Phaseolus* L.

La falta de claridad en la delimitación de las especies señalada por Debouck (1991) y Freytag y Debouck (2002) ha propiciado el origen de complejos o grupos taxonómicos aún sin una definición clara, sobre todo en la sección anteriormente denominada *Phaseolus* y que recientemente Freytag y Debouck (2002), en un estudio taxonómico del género, han fragmentado en varias secciones, una de ellas es la sección *Pedicellati* Freytag, en donde la mayoría de las especies que la integran habían sido consideradas por Delgado-Salinas (1985) como variedades o sinonimias de la macroespecie *P. pedicellatus*, con excepción de *P. pyramidalis* Freytag y *P. teulensis* Freytag, que son nuevas descripciones realizadas por Freytag y Debouck (2002).

Delgado-Salinas (1985) consideró 36 taxones en América del Norte y Central distribuidas en las secciones *Chiapasana* A. Delgado, *Phaseolus* DC., *Minkelersia* (Mart. & Gal.) Maréchal et al. y *Xanthotricha* A. Delgado, mientras que Debouck (1991), estimó 52 especies las integrantes del

género, mencionando que la cantidad de especies podría incrementarse cuando se realizara un mayor número de exploraciones. Debouck (2000) reconoce 56 especies y organiza a la sección *Phaseolus*, integrada por 40 especies arregladas en phyla (series de formas): phylum del frijol común; phylum del frijol escarlata; phylum del frijol tepari; phylum del frijol Lima; phylum de frijoles silvestres con testa rugosa; phylum de *P. pedicellatus*; phylum de *P. microcarpus*; phylum de *P. neglectus*, phylum con $2n=2x=20$ y 7 phyla aislados monotípicos. Recientemente Freytag y Debouck (2002), realizarón una revisión del género para América del Norte, México y América Central, estableciendo que el número de especies es de 75, distribuidas en 15 secciones:

Acutifolii Freytag, *Phaseolus acutifolius* A. Gray y *P. parvifolius* Freytag.

Phaseoli Freytag, *Phaseolus vulgaris* L., *P. costaricensis* Freytag & Debouck, *P. dumosus* Macfad. y *P. albescens* McVaugh ex R. Ramírez & A. Delgado.

Coccinei Freytag, *Phaseolus coccineus* L. (*P. glabellus* Piper, un caso especial, no tiene una posición definida en sección alguna, pero los autores la colocan cercana a *P. coccineus*).

Paniculati Freytag,

Subsección *Volubili* Freytag, *Phaseolus lunatus* L., *P. polystachyus* (L.) Britt., Sterns & Pogg, *P. salicifolius* Piper, *P. maculatifolius* Freytag & Debouck, *P. dasycarpus* Freytag & Debouck y *P. longiplacentifer* Freytag.

Subsección *Lignosi* Freytag, *Phaseolus jaliscanus* Piper, *P. scrobiculatifolius* Freytag, *P. nodosus* Freytag & Debouck, *P. albinervus* Freytag & Debouck, *P. marechalii* A. Delgado, *P. rotundatus* Freytag & Debouck, *P. acinaciformis* Freytag & Debouck, *P. xolocotzii* A. Delgado, *P. sonorensis* Standl. y *P. juquilensis* A. Delgado.

Bracteati Freytag, *Phaseolus macrolepis* Piper y *P. talamancensis* Debouck & Torres.

Minkeliersia (Mart. & Gal.) Maréchal, Mascherpa & Stainier, *Phaseolus pluriflorus* Maréchal, Mascherpa & Stainier, *P. nelsonii* Maréchal, Mascherpa & Stainier, *P. perplexus* A. Delgado, *P. plagiocylix* Harms, *P. amblyosepalus* (Piper) Morton, *P. tenellus* Piper, *P. parvulus* Greene, *P. anisophyllus* (Piper) Freytag & Debouck, *P. amabilis* Standl. y *P. pauciflorus* Sessé & Mociño ex G. Don.

Xanthotricha A. Delgado, *Phaseolus xanthotrichus* Piper, *P. hintonii* A. Delgado, *P. zimapanensis* A. Delgado, *P. gladiolatus* Freytag & Debouck, *P. magnilobatus* Freytag & Debouck y *P. esquincensis* Freytag.

Revoluti Freytag, *Phaseolus leptophyllus* G. Don.

Digitati Freytag, *Phaseolus neglectus* Hermann, *P. albiflorus* Freytag & Debouck, *P. albiviolaceus* Freytag & Debouck, *P. trifidus* Freytag y *P. altimontanus* Freytag & Debouck.

Rugosi Freytag, *Phaseolus filiformis* Benth., *P. angustissimus* A. Gray, *P. carterae* Freytag & Debouck y ***P. microcarpus*** Mart. (*P. microcarpus* es otro caso particular, Freytag y Debouck (2002) la colocan cercana a la sección *Rugosi*, no obstante que molecularmente se encuentra alejada de ella, además de que la testa no es rugosa como en el resto de los integrantes de la sección, señalan que presenta otras características morfológicas que la acercan a la sección).

Falcati Freytag, *Phaseolus micranthus* Hook. & Arn., *P. leptostachyus* Benth., *P. opacus* Piper, *P. persistentus* Freytag & Debouck y *P. macvaughii* A. Delgado.

Brevilegumeni Freytag, *Phaseolus oligospermus* Piper, *P. campanulatus* Freytag & Debouck y *P. tuerckheimii* Donnell-Smith.

Pedicellati Freytag, *Phaseolus pedicellatus* Benth., *P. oaxacanus* Rose, *P. esperanzae* Seaton, *P. polymorphus* S. Wats., *P. palmeri* Piper, *P. purpusii* Brandegees, *P. grayanus* Woot. & Standl., *P. scabrellus* Benth. ex S. Wats., *P. teulensis* Freytag, *P. pyramidalis* Freytag y *P. laxiflorus* Piper.

Chiapasana A. Delgado. *Phaseolus chiapasanus* Piper.

Coriacei Freytag, *Phaseolus maculatus* Scheele, *P. venosus* Piper y *P. reticulatus* Freytag & Debouck, y ahora *P. novoleonensis* Debouck (Salcedo et al. 2006).

La integración de las secciones corresponde, en lo general, a la forma en que habían sido ordenadas las especies en phyla (series) por Debouck (2000). Si se compara el trabajo de Delgado-Salinas (1985) con el de Freytag y Debouck (2002), es evidente que los cambios realizados por los últimos dos autores se encuentran básicamente en la sección anteriormente llamada *Phaseolus*, grupo en donde se observa el mayor incremento de nuevas descripciones y de nuevas secciones, probablemente por lo grande que era en comparación con el resto de ellas. La sección *Chiapasana* permanece sin cambios, mientras que *Minkellersia* y *Xanthotricha* incrementan el número de especies.

En el cuadro I.1 se presentan los distintos taxones que han sido reconocidos por diversos autores en lo que se conoció como complejo o macroespecie *Pedicellatus* y que, actualmente, de acuerdo con Freytag y Debouck (2002) corresponde a la sección *Pedicellati*.

Phaseolus pedicellatus var. *grayanus* es reconocida por Isely (1998) como un taxón válido en su tratamiento de las leguminosas nativas y naturalizadas de los Estados Unidos: *P. pedicellatus* Benth. var. *grayanus* (Wooton & Standley) Delgado ex Isely. El reconocimiento de Isely de la

existencia de variedades en *P. pedicellatus* implica un apoyo implícito a lo planteado por Delgado-Salinas (1985) para la especie *P. pedicellatus*, en el sentido de que se trata de un complejo taxonómico.

Lo intrincado del complejo *Pedicellatus* se refleja en los cambios que ha sufrido a lo largo del tiempo, pero además también en el punto de vista de algunos autores que puede cambiar, tal es el caso de Debouck (1991) quien considera especies válidas a *Phaseolus foliaceus*, *P. floribundus* y *P. schaffneri*, y posteriormente en Freytag y Debouck (2002) las consideran sinónimos de *P. pedicellatus*.

Aun con la importancia mencionada de *Phaseolus*, son pocos los estudios de cualquier disciplina que han incluido a las especies silvestres, la mayoría se enfocan principalmente a las cultivadas, olvidando así la investigación de las especies progenitoras de las cultivadas, así como de taxones relacionados, que pueden ampliar las fuentes de mejoramiento genético en los cultivos (Hucl y Scoles, 1985). Bayuelo-Jiménez et al. (2002a; 2002b) encuentran, por ejemplo, que *Phaseolus micranthus*, *P. macvaughii* y *P. lunatus* (silvestre) son tolerantes a la salinidad, característica que puede ser transferida y aprovechada en cultivos que se desarrollan en regiones con alta salinidad.

En virtud de la problemática planteada para el género *Phaseolus*, en particular en *P. pedicellatus*, se plantean los siguientes objetivos en el complejo *Phaseolus pedicellatus*, actualmente sección *Pedicellati*.

OBJETIVO GENERAL

-Realizar estudios citogenéticos, morfológicos y moleculares en la sección *Pedicellati* que ayuden a determinar el número de especies que la integran y sus relaciones.

OBJETIVOS PARTICULARES:

-Realizar estudios mitóticos que incluyan la determinación del número cromosómico y elaboración del cariotipo en varias poblaciones de la sección *Pedicellati*, con la finalidad de detectar posibles diferencias en el número cromosómico, longitud total de los cromosomas, fórmula cariotípica e índice de simetría TF%.

-Realizar estudios meióticos, que contemplen el análisis del comportamiento cromosómico para determinar si existen anomalías cromosómicas: presencia de univalentes, multivalentes, puentes cromosómicos, cromosomas retardados o micronúcleos.

-Análisis morfológico utilizando técnicas fenéticas que permita determinar como se relacionan morfológicamente los taxones integrantes de la sección *Pedicellati*.

-Realizar el análisis filogenético empleando la secuenciación de ITS y establecer las relaciones entre los distintos taxa de la sección *Pedicellati*.

HIPÓTESIS

Si el complejo *Pedicellatus* está integrado por las especies que Freytag y Debouck (2002) incluyen en la sección *Pedicellati*, entonces los estudios morfológicos, moleculares y cromosómicos, como técnicas individuales o en su conjunto, permitirán la identificación de cada uno de los taxa.

Cuadro I.1. Cuadro comparativo que muestra la forma que diversos autores han considerado a las especies del complejo o sección *Pedicellati*.

Piper (1926) ¹	Delgado-Salinas (1985)	Debouck (1991)	Freytag y Debouck (2002)
<i>P. foliaceus</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	Sinónimo de <i>P. pedicellatus</i> var. <i>grayanus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. foliaceus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	Sinónimo de <i>P. grayanus</i> Sección <i>Pedicellati</i>
<i>P. floribundus</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	Sinónimo de <i>P. pedicellatus</i> var. <i>pedicellatus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. floribundus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	Sinónimo de <i>P. pedicellatus</i> Sección <i>Pedicellati</i>
<i>P. schaffneri</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	Sinónimo de <i>P. pedicellatus</i> var. <i>polymorphus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. schaffneri</i> Sección <i>Phaseolus</i>	Sinónimo de <i>P. polymorphus</i> Sección <i>Pedicellati</i>
<i>P. oaxacanus</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	<i>P. pedicellatus</i> var. <i>oaxacanus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. oaxacanus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. oaxacanus</i> Sección <i>Pedicellati</i>
<i>P. pedicellatus</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	<i>P. pedicellatus</i> var. <i>pedicellatus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. pedicellatus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. pedicellatus</i> Sección <i>Pedicellati</i>
<i>P. polymorphus</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	<i>P. pedicellatus</i> var. <i>polymorphus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. polymorphus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. polymorphus</i> Sección <i>Pedicellati</i>
<i>P. palmeri</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	Sinónimo de <i>P. pedicellatus</i> var. <i>grayanus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. palmeri</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. palmeri</i> Sección <i>Pedicellati</i>
<i>P. scabrellus</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	Sinónimo de <i>P. pedicellatus</i> var. <i>pedicellatus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. scabrellus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. scabrellus</i> Sección <i>Pedicellati</i>
<i>P. grayanus</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	<i>P. pedicellatus</i> var. <i>grayanus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. grayanus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. grayanus</i> Sección <i>Pedicellati</i>
<i>P. esperanzae</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	Sinónimo de <i>P. pedicellatus</i> var. <i>pedicellatus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. esperanzae</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. esperanzae</i> Sección <i>Pedicellati</i>
<i>P. salicifolius</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	<i>P. salicifolius</i> Sección <i>Phaseolus</i> (fuera del complejo <i>Pedicellatus</i>)	<i>P. salicifolius</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. salicifolius</i> Sección <i>Paniculati</i> subsec. <i>Volubili</i>
<i>P. laxiflorus</i> (<i>P. pedicellatus</i> y sus aliados)	Sinónimo de <i>P. pedicellatus</i> var. <i>pedicellatus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. laxiflorus</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. laxiflorus</i> Sección <i>Pedicellati</i>
<i>P. purpusii</i> , sinónimo de <i>P. polymorphus</i>	<i>P. pedicellatus</i> var. <i>purpusii</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. purpusii</i> Sección <i>Phaseolus</i>	<i>P. purpusii</i> Sección <i>Pedicellati</i>
			<i>P. pyramidalis</i> Sección <i>Pedicellati</i>
			<i>P. teulensis</i> Sección <i>Pedicellati</i>

¹Piper incluye dentro del grupo *Pedicellatus* a especies que actualmente se consideran notoriamente fuera del grupo: *Phaseolus acutifolius*, *P. bolivianus*, *P. falciformis*, *P. lunatus*, *P. mollis*, *P. rosei*, *P. salicifolius* y *P. viridis* (Freytag y Debouck, 2002), y que por lo mismo no fueron tomadas en cuenta.

CAPÍTULO II

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

La taxonomía numérica es definida como el agrupamiento por métodos numéricos de unidades taxonómicas sobre las bases de sus estados de caracteres (Sneath y Sokal, 1973). El análisis fenético permite conocer la semejanza morfológica entre los taxones o ejemplares examinados y de ninguna manera refleja filogenia alguna.

La semejanza entre dos unidades taxonómicas operativas (OTU's por sus siglas en inglés) es estimada generalmente por medio de un coeficiente de similitud, el cual es una cuantificación del parecido entre los elementos en las dos columnas de la matriz de datos, representando los estados de carácter de los dos OTUS's en cuestión.

Existen varios coeficientes de similitud para evaluar la semejanza morfológica entre taxones: coeficientes de distancia, de asociación, de correlación y de similitud probabilística. El coeficiente de correlación es el utilizado con mayor frecuencia en taxonomía numérica. Dicho coeficiente ha sido usado en datos donde la mayoría de los caracteres, si no es que todos, están presentes en más de dos estados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el análisis morfológico, se examinaron ejemplares depositados en el Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM (**MEXU**) y también se solicitaron en préstamo ejemplares a los siguientes herbarios del extranjero: (**GH**) Harvard University, Cambridge, Massachusetts. USA, (**ARIZ**) University of Arizona, Tucson, Arizona. USA, (**F**) Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois. USA, (**MICH**) University of Michigan, Ann Arbor, Michigan. USA, (**MO**) Missouri Botanical Garden, Saint Louis, Missouri. USA, (**NMC**) New Mexico State University, Las Cruces. USA, (**NY**) New York Botanical Garden, Bronx, New York. USA, (**TX**) University of Texas at Austin, Austin, Texas. USA y (**US**) Smithsonian Institution, Washington, District of Columbia, USA.

Con relación a los folíolos la literatura revisada indicó que han sido utilizados para la delimitación de las especies; sin embargo, se encontró que es un carácter muy variable: aun dentro de una misma planta se pueden encontrar distintos grados de lobulación, dependiendo de si la observación es realizada en la parte basal, intermedia o apical de la planta, se pueden encontrar folíolos no lobulados, ligeramente lobulados o claramente lobulados. Con base en lo anterior se seleccionaron caracteres que incluyeran estructuras florales y de fruto, sin dejar de considerar a los folíolos.

Después de la revisión del material de herbario del MEXU y del solicitado en préstamo, se eligieron los ejemplares más completos en cuanto a características vegetativas, florales y de fruto y con ellos se realizó un análisis fenético. Los taxones que no fueron incluidos no presentaban todas las características mencionadas, y que tampoco fue posible obtener durante las salidas de campo que se realizaron para la recolección de material.

La revisión de material de herbario se hizo, además, con la intención de conocer la distribución y fenología del grupo y de esta forma planear salidas al campo para coleccionar material vivo que apoyara las observaciones del material herborizado, así como para coleccionar semillas y/o botones florales para ser utilizados en los estudios cariológicos. La colecta de nuevo material incluyó a los estados de Puebla, Oaxaca, Hidalgo, Morelos, San Luis Potosí, Querétaro, Estado de México, Veracruz, Michoacán, Durango y Aguascalientes.

ANÁLISIS FENÉTICO

Se realizó con la finalidad de determinar si un análisis morfológico es suficiente para delimitar con claridad a *Phaseolus esperanzae*, *P. grayanus*, *P. laxiflorus*, *P. oaxacanus*, *P. pedicellatus*, *P. polymorphus* y *P. purpusii*, especies que Freytag y Debouck (2002) señalan como integrantes de la

sección *Pedicellati*, taxones que Delgado-Salinas (1985) considera variedades de *P. pedicellatus*.

Phaseolus dasycarpus, especie que, de acuerdo con Freytag y Debouck (2002), no pertenece a la sección *Pedicellati*, fue incluido porque, en el transcurso del trabajo de campo, se colectó como una población con características típicas de la sección *Pedicellati*, pero con estandarte en forma de capucha, carácter que no se ha visto en los demás integrantes de la sección *Pedicellati*

Los 86 ejemplares seleccionados que resultaron de la revisión de herbario y de las colectas realizadas en el transcurso de la presente investigación, reflejan la variación morfológica del grupo en estudio. Además se incluyeron tres ejemplares de *Phaseolus glabellus* y cinco de *P. neglectus*, especies que en estudios moleculares realizados por Delgado-Salinas et al. (1999), mostraron una cercanía con la sección *Pedicellati*. En total, la matriz incluyó 94 ejemplares.

Para el análisis fenético, cada ejemplar se constituyó en una unidad taxonómica operativa. Se analizaron 39 caracteres obtenidos de hoja, inflorescencia, flor y fruto, de los cuales, 30 fueron cuantitativos y 9 cualitativos.

Phaseolus palmeri, *P. scabrellus* y *P. teulensis*, especies consideradas en la sección *Pedicellati*, no fueron incluidos en el estudio

morfológico, por la carencia de ejemplares que presentaran todas las características consideradas en el análisis.

Los caracteres muestreados son los siguientes:

- 1 Lobulación de los folíolos laterales: 0) sin lobulación; 1) ligeramente lobulados o lobulados; 2) lobulados y angulosos; 3) bilobulados o trilobulados. Fig. II.1.A-D.
- 2 Longitud de pecíolo de la hoja que sustenta a una inflorescencia. Fig.II.1. J.
- 3 Longitud del raquis del folíolo.
- 4 Largo de las estípulas.
- 5 Ancho de las estípulas.
- 6 Largo de las estipelas.
- 7 Ancho de las estipelas.
- 8 Número de nervaduras de estípulas: 0) 5-7; 1) 3-4.
- 9 Número de nervaduras de estipelas: 0) 1; 1) 2; 2) 3.
- 10 Acúmenes en el lóbulo derecho del folíolo lateral: 0) ausencia; 1) presencia.
- 11 Lobulación del folíolo central: 0) sin lobulación; 1) ligeramente lobulados o lóbulos bien definidos.

- 12 Número de nudos en raquis de la inflorescencia en el intervalo de 2 cm, del primer nudo floral al ápice de la inflorescencia: 0) 0-1; 1) 2-3; 2) 4 o más. Fig. II.1. J.
- 13 Longitud de la inflorescencia.
- 14 Longitud del pedúnculo.
- 15 Longitud del raquis de la inflorescencia.
- 16 Longitud de la bráctea.
- 17 Ancho de la bráctea.
- 18 Longitud del pedicelo.
- 19 Longitud de la bractéola.
- 20 Ancho de la bractéola.
- 21 Número de nervaduras en bráctea: 0) 0-1; 1) 2-3; 2) 4-5 al ápice.
- 22 Número de nervaduras en bractéola: 0) 0; 1) 1.
- 23 Presencia de brácteas trifidas: 0) ausencia; 1) presencia.
- 24 Grosor del pedicelo en flor.
- 25 Largo del cáliz.
- 26 Ancho del cáliz.
- 27 Largo del diente ventral medio del cáliz.
- 28 Largo del estandarte.
- 29 Ancho del estandarte.
- 30 Largo del ala derecha.

- 31 Ancho del ala derecha.
- 32 Longitud del ovario.
- 33 Número de vueltas en la quilla: 0) 1.25; 1) 1.5; 2) 1.75.
- 34 Número de óvulos: 0) 2-3; 1) 4-5; 2) 6 ó más.
- 35 Color de la flor: 0) azul o violeta; 1) blanco; 2) rojo.
- 36 Estandarte en su parte distal en anthesis: 0) forma extendida; 1) forma de capucha. Fig. II.1. E, F.
- 37 Pubescencia fruto inmaduro: 0) notablemente pubescente; 1) glabro o ligeramente pubescente.
- 38 Rostro del fruto inmaduro: 0) sin rostro o pequeño; 1) rostro pronunciado.
- 39 Textura de las valvas del fruto maduro: 0) no coriáceo; 1) coriáceo.

De los 39 caracteres enlistados anteriormente, el fruto inmaduro fue considerado por presentar con mayor claridad diferencias en cuanto a pubescencia y longitud del rostro, además de que son caracteres que se conservan en los ejemplares de herbario. El número de nudos en raquis floral en 2 cm, a partir del primer nudo basal, fue considerado para establecer qué tan separados se encuentran los nudos florales en una longitud determinada y de esta forma establecer si existen diferencias que indiquen qué tan laxa es la presentación de las flores en la inflorescencia; el

color de la flor se agregó porque se introdujo en el análisis, como ya se mencionó, a *Phaseolus glabellus* que tiene la flor de color rojo, mientras que las pertenecientes a la sección *Pedicellati* o *Paniculati* presentan una coloración violeta o blanca; las vueltas de la quilla se incluyeron al observarse que no todas presentaban el mismo grado de enrollamiento. La matriz de datos que se generó es mostrada en el anexo II.1.

El análisis de los datos se realizó empleando el programa NTSYSpc2.1. Los caracteres se estandarizaron para dar igual peso a todos ellos. Por incluirse caracteres con más de dos estados, se utilizó el coeficiente de correlación y el método de agrupamiento UPGMA en la obtención del fenograma que representa la asociación morfológica del grupo en estudio.

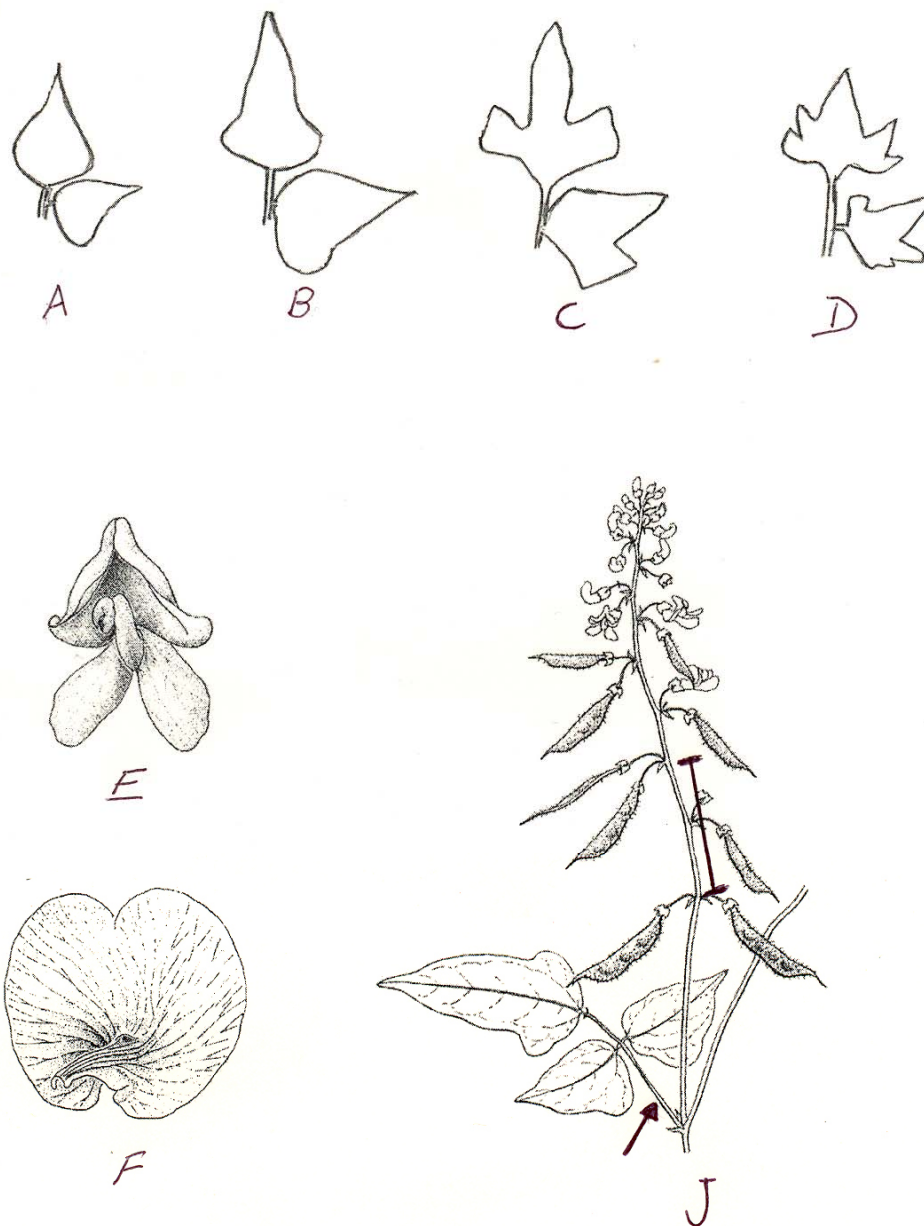


Figura II.1.- Distintos grados de lobulación de los folíolos, forma del estandarte e inflorescencia, A=0; B=1; C=2; D=3. E= estandarte en forma de capucha; F= estandarte en forma extendida; J= inflorescencia en donde se muestra la posición de hoja e inflorescencia que se consideró para la obtención de datos, así como la determinación del número de nudos en 2 cm de la inflorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aun cuando fueron analizados numerosos ejemplares de herbario, la matriz que se generó está constituida por 94 ejemplares (OTU's), que fueron los que presentaban todos los caracteres incluidos en la misma matriz, el resto carecía de estructuras florales o fruto y en muchos casos, la forma como estaba prensado el ejemplar no permitía realizar las mediciones correspondientes. Del análisis de la matriz con NTSYSpc, se generó el fenograma que se muestra en la figura II. 2.

También utilizando el programa NTSYSpc, se corrió un análisis de componentes principales, encontrándose que los caracteres que definen el fenograma son el largo y ancho del estandarte en el primer componente, mientras que, en el segundo, es el tipo de lobulación de los folíolos junto con el ancho del cáliz y, en el tercer componente, es el ancho de la bráctea y el número de nervaduras de la bractéola (Anexo II.2).

Es interesante observar que, en el fenograma, los OTUS se distribuyen en dos grandes grupos; el agrupamiento superior incluye a *Phaseolus dasycarpus*, *P. esperanzae*, *P. glabellus*, *P. laxiflorus*, *P. pedicellatus*, *P. oaxacanus* y dos colectas de *P. grayanus* provenientes del estado de Durango y de San Luis Potosí.

La mayoría de los ejemplares que se congregan en el grupo superior, presentan folíolos lobulados o ligeramente lobulados, similares a los de *Phaseolus pedicellatus*.

En el grupo inferior se encuentra el material identificado como *P. grayanus*, *P. polymorphus*, *P. purpusii*, *P. neglectus* y dos colectas de *P. pedicellatus* de Sinaloa y Nuevo León, respectivamente. La cercanía de *Phaseolus glabellus* y de *P. neglectus* con especies del grupo *Pedicellati* ya había sido detectada en reportes previos de secuenciación de ITS (Delgado-Salinas et al. 1999; Gaitán et al. 2000), razón por la que se incluyeron en el estudio. Los resultados observados en el presente análisis muestran que morfológicamente también presentan semejanza.

Al analizar el fenograma de la figura II.2 se desprenden las siguientes observaciones:

Phaseolus pedicellatus muestra una menor cohesión ya que se relaciona con varios taxones, tanto del grupo superior como en el inferior, indicando que puede ser la especie más polimórfica, portadora de características morfológicas que comparte con el resto de los taxones, razón por la que queda incluida en varios agrupamientos del fenograma.

Phaseolus esperanzae, no obstante que se encuentra relacionado con ejemplares de *P. pedicellatus*, se muestra como un subgrupo definido ya que todos los ejemplares permanecen juntos. El color negro y la forma

casi esférica de la semilla, así como la textura, forma y pubescencia del fruto son los caracteres que permiten en el campo una rápida identificación de la especie (Fig. II.3); con excepción de la textura del fruto maduro, el resto de las características no fueron consideradas en la elaboración de la matriz debido a que muy pocos ejemplares las presentaban. De haberse considerado, el número de OTU's sería muy bajo; sin embargo, en el fenograma *P. esperanzae* se agrupa aun sin la inclusión de los caracteres mencionados. La distribución de *P. esperanzae* incluye los estados de México, Puebla, Hidalgo y Distrito Federal; en la revisión de herbario no se encontraron ejemplares en el estado de Michoacán, como reportan Freytag y Debouck (2002); en cambio, sí los hubo en el Distrito Federal, entidad que no fue incluida por dichos autores.

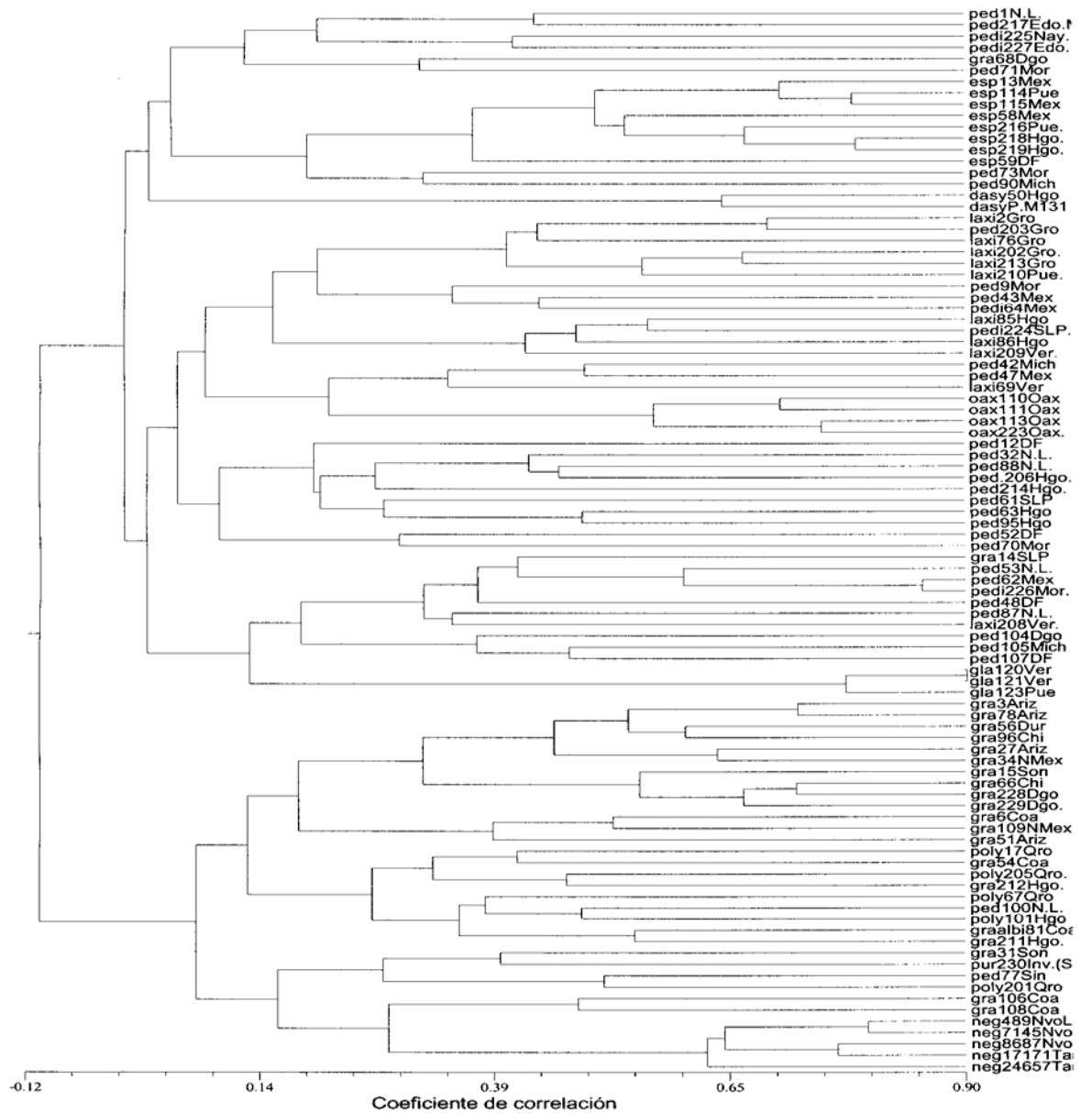


Figura II.2.- Fenograma generado con 94 OTU's y 39 caracteres. dasy= *Phaseolus dasycarpus*; esp= *P. esperanzae*; gla= *P. glabellus*; gra= *P. grayanus*; laxi= *P. laxiflorus*; neg= *P. neglectus*; oax= *P. oaxacanus*; ped= *P. pedicellatus*; poly= *P. polymorphus*; pur= *P. purpusii*.



Figura II.3. Semillas y fruto de *Phaseolus esperanzae* mostrando forma y color característicos de la semilla, así como la textura y apariencia del fruto seco (*P. Mercado et al. 23*).

Phaseolus oaxacanus, aun cuando no presenta caracteres tan evidentes como pueden ser los de *P. esperanzae*, también es un taxón en el que todos los ejemplares forman un grupo compacto. Una de las características morfológicas que lo distinguen y que permiten una fácil identificación de *P. oaxacanus* en el campo o en el herbario, es la presencia de brácteas trifidas y su distribución geográfica restringida a los alrededores montañosos de la Ciudad de Oaxaca, que corresponde a la Sierra de Juárez, Oaxaca. Otra característica que se apreció con las colectas realizadas es la poca o nula lobulación de los folíolos, como se muestra en la figura II.4. Es oportuno mencionar que la presencia de brácteas trifidas no es exclusivo de esta especie; dicha característica también ha sido encontrada en ejemplares de *P. pedicellatus* provenientes del estado de Durango, que tampoco fueron incluidos en la matriz por las razones ya

mencionadas al inicio del presente capítulo. Freytag y Debouck (2002) señalan que las brácteas trífidas se encuentran en algunos ejemplares de *P. grayanus*; sin embargo, durante la revisión de material de herbario o las colectas realizadas, no se observó la presencia de brácteas trífidas en esta especie.



Fig. II.4 *Phaseolus oaxacanus* (*P. Mercado y F. Tapia 88*). Foliolos con poca lobulación o carentes de ella; la imagen muestra también la inflorescencia.

Phaseolus laxiflorus al igual que *P. pedicellatus* no forma un grupo compacto y las colectas de estas dos especies se mezclan en el fenograma. Una de las características que presenta este taxón es la presencia de raíces adventicias y que no se introdujo en la matriz de datos porque los ejemplares de herbario carecen de dicha información; sin embargo debe mencionarse que, de las colectas que se realizaron y en donde se pudo observar raíces, *P. laxiflorus* fue la única que las presentó (figura II.5). Otras

características que permiten identificar a *P. laxiflorus* es la delgadez de sus folíolos, así como la separación que se aprecia entre los nudos florales, que es mayor en comparación con la mayoría de los integrantes de la sección *Pedicellati*; esta última característica también se presenta en algunos ejemplares de *P. pedicellatus*, razón que impide su separación.



Figura II.5. *Phaseolus laxiflorus* (*P. Mercado et al. 133*), se aprecia la producción de raíces adventicias, características de la especie; en las primeras etapas se presentan filiformes, pero las más antiguas son más gruesas, sin alterar en mucho la longitud que aquí se muestra.

Phaseolus dasycarpus, como se mencionó anteriormente, es una especie recientemente descrita por Freytag y Debouck (2002) y colocada por ellos dentro de la sección *Paniculati*. Durante el desarrollo de la presente investigación se colectó material que se consideró pertenecía a la sección *Pedicellati* pero que, por la presencia de un estandarte en forma de capucha (Fig. II.6) y los folíolos más gruesos que en el resto de las especies, la hacían candidata a nueva especie. Sin embargo, en estudio taxonómico de Freytag y Debouck (2002), se le encontró ya descrita, pero fuera de la sección *Pedicellati*. Revisiones de herbario permitieron establecer que *P. dasycarpus* fue inicialmente identificada como *P.*

pedicellatus y que el material consultado por los autores mencionados y, de acuerdo con la ilustración mostrada en la monografía, consistía de una sola colecta carente de flores que permitieran observar las características del estandarte; no obstante, Freytag y Deboluck (2002) ofrecen una descripción de la flor, probablemente basada en las estructuras de un botón floral. El fruto inmaduro pubescente con rostro pronunciado y el número de óvulos fueron las características que Freytag y Debouck (2002) consideraron para ubicarla dentro de la sección *Paniculati*. Es conveniente mencionar que, antes de conocer que la especie ya había sido descrita en otra sección, el material colectado en el presente trabajo fue considerado como nueva especie, ubicada en la sección *Pedicellati*. La apreciación de pertenencia a la sección *Pedicellati* fue apoyada por su ubicación dentro del fenograma que se generó durante el desarrollo de este estudio. Con la revisión de ejemplares de herbario se ampliaron también los datos de distribución, encontrándose la especie en los estados de Veracruz e Hidalgo.

Por lo antes mencionado, *Phaseolus dasycarpus* es analizada en un capítulo aparte de esta tesis.



Figura II.6. *Phaseolus dasycarpus* (*P. Mercado et al. 131*) Flor en donde se observa la característica que más distingue a la especie, estandarte en forma de capucha, formándose un engrosamiento en la parte superior de dicha estructura. Nótese también la coloración lila que presenta el cáliz.

En el grupo inferior del fenograma se ubican *Phaseolus grayanus*, *P. polymorphus*, *P. purpusii* y dos colectas de *P. pedicellatus*; en este grupo también se integró *P. neglectus*, de la sección *Digitati*. La característica más notable de los taxones que integran el grupo inferior, con excepción de *P. pedicellatus* y de *P. neglectus*, es la forma de los folíolos, en donde los lóbulos dejan de ser redondeados y se encuentran angulosos con la presencia de acúmenes y, en otros casos, bilobulados o tetralobulados con o sin acumen. La forma en que se agrupan *P. polymorphus* y *P. purpusii* entre los ejemplares de *P. grayanus* sugiere que se trata de la misma entidad taxonómica con variaciones intraespecíficas.

Phaseolus neglectus, aun cuando se relaciona con el grupo que incluye a *P. grayanus*, *P. polymorphus* y *P. purpusii*, todas las colectas que se consideraron de esta especie integran un subgrupo.

La dificultad para separar con claridad morfológicamente a los distintos taxones de la sección *Pedicellati* también fue enfrentada en la revisión taxonómica de Freytag y Debouck (2002), pues se presentan las siguientes inconsistencias en su monografía: las colectas *Chiang et al. 9250*, *March 1935* y *Standford et al. 563* son ubicadas tanto en *P. polymorphus* como en *P. grayanus* (pag. 239 y 244). La colecta de *McVaugh 16760* en la página 239 es considerada *P. polymorphus* del estado de Jalisco, mientras que en la página 244 la ubican como *P. grayanus* pero del estado de Aguascalientes. Lo anterior pone de manifiesto la dificultad para separar ambos taxones desde el punto de vista morfológico y las confusiones taxonómicas que ello puede generar. La identificación de *P. polymorphus* se basó en la presencia de folíolos grandes bilobulados y sin acúmenes.

En lo que respecta a *Phaseolus grayanus*, también se observan inconsistencias en la monografía de Freytag y Debouck (2002); la colecta de *Le Sueur 713* en la página 242 se identifica como *P. grayanus*, pero páginas más adelante se considera como el ejemplar tipo de *P. pyramidalis*. Esta es una nueva especie de Freytag (Freytag y Debouck, 2002), en la que la

forma piramidal que presenta la inflorescencia joven es el carácter distintivo del nuevo taxón. Sin embargo, durante la revisión de herbario se apreció que la forma piramidal en las inflorescencias jóvenes también se presenta en poblaciones de *P. pedicellatus* y de *P. grayanus* (Fig. II.7), en localidades bastante distantes de donde se encuentra *P. pyramidalis*, y ello hace suponer que no se trata de una verdadera especie y que dicho ejemplar debe permanecer como *P. grayanus*.



Figura II.7. Inflorescencia joven de *Phaseolus pedicellatus* (*P. Mercado et al. 114*, Michoacán). Se aprecia la forma piramidal de la inflorescencia.

En el caso de *Phaseolus purpusii*, los ejemplares de herbario que fueron consultados son muy distintos morfológicamente en los folíolos al resto de las especies de la sección *Pedicellati*, y son la característica morfológica para su identificación; sin embargo, como ya se mencionó con anterioridad, no fueron incluidos en la matriz de datos, ya que no presentaban todos los caracteres seleccionados.

La colecta de *R. Torres 15438* de la Mina la Fabucita de San Luis Potosí, identificada como *Phaseolus purpusii*, aun cuando no mostró todos los caracteres, el ejemplar estaba acompañado de un par de semillas. Una de las semillas fue inducida a germinar y se obtuvo una plántula que fue llevada hasta la etapa de fructificación en condiciones de invernadero; se elaboró un ejemplar de herbario, el cual se consideró en la elaboración de la matriz de datos.

Al colocar la plántula de *Phaseolus purpusii* en condiciones de invernadero junto con plántulas de *P. grayanus* o de *P. polymorphus*, *P. purpusii* perdió la forma distintiva de sus folíolos y presentó un desarrollo muy semejante a lo que se consideraría un *P. grayanus* (Fig. II.8 y II.9). También el ejemplar de *P. purpusii* portó una flor más grande, y con un diente ventral medio del cáliz en forma de espolón que la distinguió de *P. grayanus* o de *P. polymorphus* (Fig. II.10). La modificación de los folíolos de *P. purpusii* en condiciones de invernadero explica por qué se agrupa con *P. grayanus* y *P. polymorphus* en el fenograma y no forma un grupo separado.

Con base en las observaciones de la germinación y conservación de los ejemplares en invernadero en el caso específico de *P. purpusii*, la forma de sus folíolos es el resultado de su carga genética en combinación con las condiciones edáficas en que se localiza, ya que las colectas realizadas corresponden a suelos yesosos.

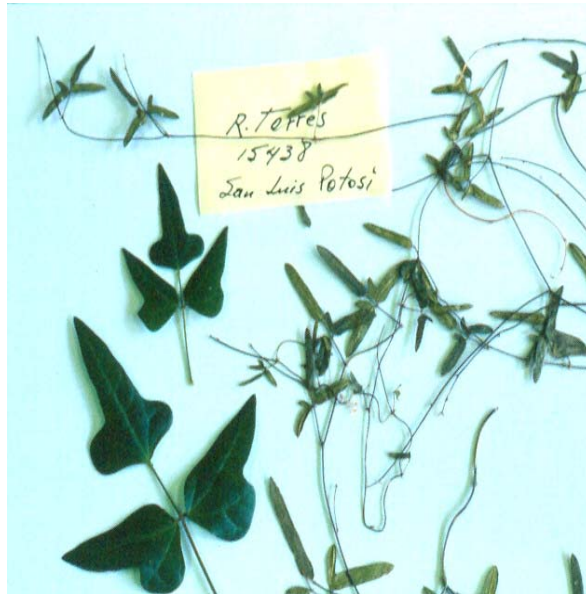


Figura II.8. *Phaseolus purpusii* (R. Torres 5438), los folíolos de la izquierda son los obtenidos de la germinación de semillas en invernadero, los de la derecha corresponden al ejemplar colectado en el campo y del que provienen las semillas germinadas.



Figura II.9. Folíolos de *Phaseolus grayanus* (P. Mercado et al. 60) desarrollándose en invernadero a partir de raíz proveniente de Presa El Peaje en San Luis Potosí; nótese la similitud de los folíolos con los de *P. purpusii* creciendo también en invernadero.



Figura II.10. Flor de *P. purpusii* mostrando el lóbulo ventral medio del cáliz en forma de espolón que, junto con la diferencia en el tamaño de la flor, la distingue de *P. grayanus*.

Una primera imagen que muestra el fenograma es la presencia de dos grupos principales, que en forma general podría estar mostrando la separación de *Phaseolus pedicellatus* en el agrupamiento superior, mientras que en el inferior se encuentra *P. grayanus*; no obstante en cada uno de los grupos se introducen OTU's que corresponden al otro. Una observación más detallada nos permite apreciar que en ambos agrupamientos se presenta lo que Sneath y Sokal (1973) llaman fenones y que se refiere a grupos que se aproximan a taxones naturales. Si se traza una línea vertical en el valor de 0.39 del fenograma, en el grupo superior los fenones que

surgen son *P. esperanzae*, *P. dasycarpus*, *P. oaxacanus*, *P. glabellus* y de manera menos clara a *P. laxiflorus*, mientras que *P. pedicellatus* se encuentra disgregado entre los taxones mencionados. En el grupo inferior se encuentra *P. neglectus* y, de manera muy difusa, *P. grayanus*, *P. polymorphus* y *P. purpusii*; de acuerdo con lo anterior, parece ser que los últimos tres taxones mencionados integran un solo taxón.

En el caso particular de *Phaseolus purpusii*, las características que ayudan a su identificación en condiciones de invernadero son el tamaño de la flor -que es más grande que en *P. grayanus* o *P. polymorphus*- y el diente medio ventral del cáliz en forma de espolón; sin embargo, dichas características no permitieron su separación en el fenograma.

Los fenones indican que los ejemplares incluidos en el análisis fenético representan 8 especies: *Phaseolus dasycarpus*, *P. esperanzae*, *P. glabellus*, *P. grayanus*, *P. laxiflorus*, *P. neglectus*, *P. oaxacanus*, y *P. pedicellatus*.

Es interesante también la agrupación de *Phaseolus glabellus* con las especies que se caracterizan por sus folíolos ligeros o marcadamente lobulados, mientras que *P. neglectus* se agrupó con *P. grayanus*, *P. polymorphus* y *P. purpusii*, especies con lóbulos de los folíolos muy marcados, angulosos y con acúmenes.

Phaseolus glabellus y *P. neglectus*, por estar ubicados cercanamente a la sección *Coccinei* y sección *Paniculati* respectivamente, se esperaba que se mostraran separados de las especies pertenecientes a la sección *Pedicellati*. Los resultados morfológicos que se obtuvieron en el presente estudio con ambas especies apoyan lo encontrado por Delgado-Salinas et al. (1999) y Gaitán et al. (2000), pero con análisis moleculares.

Es importante resaltar que los ejemplares o especies con folíolos ligera o marcadamente lobulados y sin acúmenes se distribuyen básicamente en lo que corresponde a la parte sur del país, región que resulta al considerar al Eje Neovolcánico como línea divisoria, mientras que los que tienen los lóbulos de los folíolos multilobulados y con acúmenes, se distribuyen básicamente en la porción norte que, en comparación con la parte sur, es más seca y fría. La presencia de algún taxón en una región que no le corresponde podría significar el cruce de dicha barrera (Eje Neovolcánico) o que, bajo ciertas condiciones ecogeográficas en que se encuentran las poblaciones, su fenotipo se modifica, ejemplo claro es el de *P. purpusii*, que ya fue mencionado previamente en este texto (pág. 34).

CONCLUSIONES

Con base en el fenograma que se generó con el análisis fenético, los fenones que se distinguen son *Phaseolus dasycarpus*, *P. esperanzae*, *P. grayanus*, *P. laxiflorus*, *P. oaxacanus* y *P. pedicellatus*.

La forma de los folíolos en *Phaseolus purpusii* es resultado de las condiciones ambientales en que se localiza la especie, en combinación con su carga genética.

Phaseolus pyramidalis no fue reconocido como especie en el presente estudio, porque la forma piramidal de la inflorescencia también se observa en poblaciones de *P. grayanus* y *P. pedicellatus*.

Phaseolus glabellus y *P. neglectus* se agrupan dentro de la sección *Pedicellati*, apoyando lo encontrado por Delgado-Salinas et al. (1999) y Gaitán et al. (2000) con estudios moleculares de secuenciación.

EJEMPLARES CONSULTADOS PARA EL ANÁLISIS MORFOLÓGICO:

Phaseolus dasycarpus

HIDALGO: Zacualtipan, Camino de terracería a Tlahuelompa, 24 Sep 1995, *Alcántara 2405* (MEXU); Acaxochitlán, 8 km del occidente de Acaxochitlán, 2300 m, 7 Sep 1980, *Hernández 4940* (MEXU); Pasando Zacualtipán, km 91.5 de la carretera Mex. 105 Huejutla de Reyes a Pachuca, 2200 m, 28 Ene 2001, *Mercado et al. 131* (MEXU).

Phaseolus esperanzae,

DISTRITO FEDERAL: Xochimilco, Rancho El Conejo, 2350 m, 17 Oct 1976, *Ventura 2319* (MEXU); **ESTADO DE MÉXICO:** Temascaltepec, Cajones, 2480 m, 8 nov 1932, *Hinton 2375* (MEXU); 5 km al NE de Amecameca, 2650 m, 22 Sep 1968, *Pineda 570*; **PUEBLA:** Autopista México – Puebla km 74.5, 1440 m, 3 Dic 1998, *Mercado et al. 23* (MEXU); Esperanza, 1 Aug 1907, *Purpus 3639* (MEXU).

Phaseolus glabellus

PUEBLA: Mpio. de Orizaba, Cerro San Cristóbal al SE de Orizaba (al SE de la autopista), 1400 m 29 Aug 1985, *Lorente 4857* (MEXU); Opio. Zacapoactla, San Carlos a orilla de la carretera Zacapoactla – Apulco, 12 Sep 1996, *Delgado-Salinas et al. 1582*, (MEXU, F, NY); km 9 camino Huahuaxtla Tetela de Ocampo, 1575 m, 17 Sep 1988, *Basurto 573* (TX, MEXU). **VERACRUZ:** Paxtepec, Municipio de Coacoatzintla, 400m, 27 Sep 1974, *Ventura 10601* (MEXU); Cerro de Macuiltépetl, Municipio Xalapa, Veracruz, 1480 m, 7 sep 1976, *Zola 702* (MEXU).

Phaseolus grayanus

MÉXICO,

CHIHUAHUA: northwest of Cd. Chihuahua, on road to cumbres de Macalca, 14.1 miles west of Hwy 16, 20 Sep 1984, *Lavin & Sundberg 4904* (MEXU); Santa Clara Canyon, 17 Aug 1936, *LeSueur 731* (CA, GH, F, US). **Coahuila:** High western ridges of Sierra del Jardín E of Rancho El Caballo, 29° 03' N 102° 37' W, 2250-2450 16 Sep 1972, *Chiang et al. 9350* (MEXU, TEX); High western ridges of Sierra del Jardín E of Rancho El Caballo, 29° 03' N 102° 37' W, 2250-2450 16 Sep 1972, *Chiang et al. 9342* (AC); Western side of Potrero de La Mula, about 20 km NW of Ocampo on the escarpment near the mines, 18 Sep 1941, *Johnston 9235* (GH); Cañón de San Enrique, eastern side of Sierra de La Encantada, 5 km west of Rancho Buena Vista, 4 Sept 1941, *Stewart 1389* (GH, TX); Cañon Desiderio (N-draining): in E Fork, 1.0 mi below (n of) upper woodcutters Camp, 0.9 mi above jct. with W fork, along lumber road; 9.8 mi by road W from Rancho Cerro de la Madera. 27° 07' 25"

N 102° 31' 45" W, 2280 m, 29 Sep 1976, *Wendt et al. 1836* (ARIZ, TX). **Durango:** Canyon Cantero, Sierra Gamon, ± 2000 m, 21 Sept 1948, *Gentry 8376* (MICH, GH, MEXU, UC, US); Along Mexico Highway 40, about 98 miles east of Mazatlán and 104 miles west of Durango, at El Espinazo del Diablo, 3.3 miles west of Los Bancos and 20.8 miles east of El Palmito, 14.3 miles west of La Ciudad, Sierra Madre Occidental, 27 Sep 1973, *Reveal 3565* (NY). **SONORA:** Cananea, Sonora, Mex, 20 Aug – 1 Sep 1914, *Murdoch s/n* (F); Las Tierritas de El Temblor, Sierra de el Tigre, 18 – 24 Aug 1940, *White 3438* (MEXU, MICH). **San Luis Potosí:** Charcas, S. L. P. Jul – Aug 1934, *Lundell 5317* (MICH, US).

E.U.A.

ARIZONA: Chiricahua Montains, Barfoot Park, 8000 – 8200 ft, 1 Sep 1906, *Blumer 1347* (GH, NMC, NY) Cochise, Onion Saddle in Chiricahua mtns, 7600 ft, 29 Aug 1966, *Cazier 679* (ARIZ); Chiricahua Mountains, Coronado Nacional fores, south Fork Campground of Cave Creek, 1/8 mi S of CG reside Cave Cr. Trail (USFT-243), 4 air mi SW of Portal, Az., 5600 ft, 7 Sept 1986, *Darrel 86 – 007* (NY, NMC); Cochise Country, Chiricahua Wilderness Area, Chiricahua Mountains, 8310 ft, 29 Jul 1975, *Leithliter 175* (ARIZ). **NUEVO MEXICO:** Hidalgo Co., NESW sec.8, T32S, R19W, Animas Mountains on Gray Ranch, 6200 ft, 21 Aug 1993, *McIntosh 2877* (NMC); Nuevo Mexico, 1851 m, *Wright 932* (NY, GH).

Phaseolus laxiflorus

Guerrero: 32-40 km by road west of Chilpancingo, 2100-2325 m, 4 Dec 1966, *Anderson & Laskowski 4377* (MEXU). **Hidalgo:** Acaxochitlán, cerro 4 km E de la Presa El Tejocotal, 98°08' W 20° 09' N, 2180 m, 7 Nov 1987, *Debouck & Muruaga 2380* (MICH); Molango, a 5 km al N de Molango, 1700 m, 13 Nov 1975, *Delgado-Salinas 71* (MEXU).

Phaseolus neglectus

NUEVO LEÓN: 15 miles up Cola de Caballo, south of Monterrey. 27 Aug 1984, *Lavin et al. 4889* (MEXU, TX); Montemorelos. Canyon Los Positos on the road to La Trinidad, 25° 14' 30" N 100° 09' 20" W, 9 Sep 1992, *Patterson et al. 7145* (TX); El Chipinque, aprox. 6 km al sur de Monterrey, camino a la meseta 25° 35' N y 100° 19' W, 400 m, 7 Oct 1998, *Villarreal & Carranza 8687* (TX). **TAMAULIPAS:** Puerto Purificación, Mpio. Hidalgo, 1545 m, 24 Aug 1994, *Hinton 24657* (MEXU, TEX); Mun. Hidalgo 3 km al SE de Puerto Purificación, en el camino a Conrado Castillo, 1300 m, 10 Oct 1989, *Medrano et al 17171* (MEXU).

Phaseolus oaxacanus

Oaxaca: Tlacolula, Villa Díaz Ordaz, 14 km N de V. Díaz Ordaz hacia Cuajilomoyas, 96° 24' W 17° 04' N, 2250 m, 24 Oct 1987, *Debouck & Muruaga* 2335 (MICH); Sierra de San Felipe, 3048 m, 1 Jun 1894, *Pringle* 5661 (MEXU); Camino Díaz Ordaz a Cuajilomoya ± 12 km, 2620 m, 9 Sep 2000, *Mercado y Tapia* 90 (MEXU); Sierra de Clavellinas, 2740 m, Oct 1894, *Smith* 566 (F, MEXU).

Phaseolus pedicellatus

Nuevo León: Galeana, loma cerca de Las Placetetas, 7.0 km N de 18 de Marzo, camino a San Rafael, 2140 m, 14 Sep 1985, *Debouck et al.* 1516 (MICH); General Ignacio Zaragoza, 6.0 km N de La Siberia, 2 km desviación a La Joya de San Diego, 99° 49' W 23° 50' N, 2550 m, 6 jul 1986, *Debouck et al.* 1512 (MICH); Galeana, Cerro el Potosí, 3050 m, 21 Aug 1969, *Hinton* 17245 (MEXU, TEX, US); Cerro del Viejo, 20 Aug 1948, *Meyer & Royers* 3029 (MEXU, MO); About 1.5 miles below the microwave station on Cerro Potosí, 1 Sep 1970, *Norris* 17688 (MEXU, US). **Guerrero:** Tlacotepec, Cerro Tlacotepec, 2650m, 4 Dec 1963, *Dieterle* 3236 (AS, MEXU, MICH, NY). **Distrito Federal:** Dinamo de Contreras, 3000 m, 29 Oct 1950, , *Matuda* 18641, (MEXU); Base de Sierra de Ajusco, 2438 m, 23 Oct 1896, *Pringle* 8616 (MEXU); Cerca de Contreras, 17 Sep 1930, *Russell & Souviron* 182 (MEXU). **Michoacán:** Paracho, Cerro al N de Ahuirán, 2300 m, 13 Dec 1990, *García & Pérez* 3579 (MEXU); Zitácuaro, Zona 7, 19° 23' 50" N 100° 19' 7" W 2340 m, 4 Mar 1979, *Ibarra* 388 (MEXU); Zinapécuaro, Cerro Monterrey, cerca de los ojos de agua 22 Feb 1986, *Santos* 1198 (MEXU). **Morelos:** Valle del Tepeite, norte, Mlos., *Lyonnet* 876 (MEXU, US); Valle del Tepeite (Mor), 1990 m, Nov 1933, *Lyonnet* 2988 (US); Dic 1932, Mountain wood above Cuernavaca, 2438 m, 19 Nov 1902, *Pringle* 9769 (MEXU); Carretera México-Cuernavaca, 2300 m, 13 Oct 1975, *Sousa & Delgado* 5121 (MEXU). **Estado de México:** Chiltepec, 4 km N de Chiltepec, 99° 52' W 18° 55' N, 2470 m, 1 Nov 1987, *Debouck & Muruaga* 2368 (MICH); Al NE de Temazcaltepec, 2800 m, 15 Jan 1989, *Campos* 2793 (MEXU); 1 km al E de Santo Tomás Atzingo, municipio de Tlalmanalco, 2450 m, 28 Oct 1981, *Ramos* 260 (GH, MEXU); Amecameca, 1 km al E de San Antonio, 2500 m, 31 Oct 1968, *Rzedowski* 26451 (MEXU, MICH, MO). **San Luis Potosí:** Zaragoza, 0.2 km al N. de Alvarez, 2400 m, 3 Nov 1986, *Debouck* 2051 (MEXU). **Durango:** Along Mexico Highway 40, 27 Sep 1973, *Reveal* 3565 (MEXU).

Phaseolus polymorphus

Hidalgo: Ixmiquilpan, 1 Aug 1905, *Purpus* 1365 (MEXU). **Querétaro:** Near Cadereyta, 21 Aug 1905, *Rose* 9723 (MEXU).

Phaseolus purpusii

San Luis Potosí: La Fabucita, 3 km entronque carretera Matehuala por entrada a microondas Nuñez, junto a la mina "Yeso único", Mpio. Guadalupe, 22° 41' 21" N, 100° 30' 20" W, 1600 m, 6 Nov 1999, *R. Torres* 15438 (MEXU).

Anexo 11.1. Matriz básica de datos. Se consideraron 94 Otus y 39 caracteres, 30 de ellos fueron cuantitativos y 9 cualitativos.

La matriz fue analizada con el programa NTSYSpc2.1

	1	39	94	0.999				
Caracteres	ped1N.L.	laxi2Gro	gra3Ariz	gra6Coa	ped9Mor	ped12DF	esp13Mex	gra14SL
Acúmenes lóbulo derecho	0	0	0	1	0	0	0	0
Ancho ala derecha	5.52	4.35	5.87	4.89	4.94	6.1	5.66	8.04
Ancho bráctea	1.2	1.3	1.2	1.4	1.7	1	1.3	1.1
Ancho bractéola	0.8	0.6	0.15	0.7	0.6	0.6	0.5	0.6
Ancho de estípulas	1.1	1.6	1.3	1	1.8	1.8	1.6	1.3
Ancho del cáliz	5.81	5.06	3.9	4.32	5.64	4.39	5.21	5.07
Ancho estandarte	8.34	8.33	8.6	7.78	9.37	8.72	8.23	9.24
Ancho estipelas	0.3	0.5	0.5	0.7	0.5	0.5	0.9	0.6
Bráctea trifida	0	0	0	0	0	0	0	0
Color de flor	0	0	0	0	0	0	0	0
Estandarte con capucha	0	0	0	0	0	0	0	0
Fruto coriáceo	0	0	0	0	0	0	1	0
Fruto inmaduro pubescente	1	1	1	1	1	0	1	0
Grueso del pedicelo	0.35	0.23	0.4	0.3	0.25	0.25	0.3	0.35
Largo del cáliz	4.18	4.85	3.68	3.67	4.45	4.11	3.66	4.12
Largo estandarte	8.33	9.22	6.62	6.34	7.69	8.18	6.25	8.29
Largo estipelas	1.2	2.1	1.3	1.4	1.3	1.4	1.5	1.5
Largo estípulas	2.2	2.7	3.5	2.85	4.5	4.5	3.5	3
Largo diente med. ventral de cáliz	1.54	1.33	1.16	1.08	1.31	1.49	1.29	1.45
Largo ala derecha	9.62	7.9	12.27	9.04	10.48	10.47	8.77	12.46
Lobulación del folíolo central	1	0	1	1	0	0	0	1
Lobulación folíolos	1	1	3	2	1	1	1	2
Long. bráctea	2.5	2.5	2.2	3	4.3	3.8	2.8	2.2
Long. bractéola	2	1.5	0.7	1.2	1.2	1	0.8	1.3
Long. inflorescencia	68	155	155	175	80	110	103	75
Long. pedicelo	10	8.5	5	6	7	6.5	4.5	9.5
Long. pedúnculo	52	95	80	100	42	57	48	20
Long. raquis inflorescencia	16	60	75	75	38	63	55	55
Long.ovario	3.87	5.12	4.52	5.61	4.19	3.88	4.83	5.43
Núm. de nervaduras estípulas	0	0	0	0	0	0	0	0
Núm. de nervaduras bráctea	1	1	1	2	2	1	1	1
Núm. de nervaduras bractéola	1	1	0	1	0	1	0	1
Núm. de nervaduras estipelas	0	0	0	0	0	0	0	0
Núm. de nudos en raquis 2 cm	1	0	0	0	0	0	0	1
Núm. de óvulos	0	0	1	1	1	1	1	1
Núm. de vueltas en quilla	1	1	1	2	1	1	2	2
Pecíolo en hoja de nudo floral	33	32	25	33	80	18.5	22	16.5
Raquis folíolo	10.9	9	8	13	17.5	6.47	7.3	7
Rostro en fruto inmaduro	0	1	0	1	0	0	0	1

gra15Son	poly17Qro	gra27Ariz	gra31Son	ped32N.L.	gra34NMex	ped42Mich	ped43Mex	ped47Mex	ped48DF	dasy50Hgo
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.57	4.06	4.59	6.47	6.29	5.54	3.93	5.58	5.64	4.27	4.17
1.1	0.75	1	1.5	1.3	1.1	1.5	1	1.4	0.9	0.5
0.2	0.3	0.2	0.2	0.9	0.3	0.75	0.5	0.4	0.5	0.3
1.6	1.4	1	1.5	1.2	1.2	1.3	2.2	1.5	0.9	1
3.2	4.32	3.5	3.7	5	3.7	5.15	5.07	5.13	4.06	4.17
7.37	8.52	7.51	9.43	8.88	8.25	6.57	8.56	7.7	8.31	8.85
0.5	0.45	0.4	0.5	0.7	0.4	0.6	0.6	0.7	0.4	0.45
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
0.35	0.35	0.4	0.4	0.2	0.3	0.3	0.4	0.35	0.3	0.2
3.73	4.55	3.86	5.27	5.26	4.66	4.15	3.69	4.34	3.46	4.66
6.1	6.59	7.6	8.11	8.45	9.03	7.82	9.21	8.97	7.34	8.09
1.8	1.8	1.2	1.5	2	1.6	1.6	2.2	1.8	1.4	1.5
5.2	3.5	2.5	3.2	4	3.2	3	3.7	3.8	2.5	2.5
1.49	1.53	0.64	2.26	1.46	1	1.34	0.98	1.4	1.32	1.05
7.93	7.37	12.51	13.07	12.72	13.2	7.73	9.81	10.73	6.53	7.15
1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
2	2	3	2	1	3	1	1	1	1	1
2.8	4	3	3.3	5	2.8	2.7	2.3	3.3	2.5	2
0.9	1.8	0.8	1.1	2	0.6	1.3	1.1	1	1	0.7
150	55	125	570	140	195	100	170	145	60	250
4	4.5	5	10	6.5	7	7	6.7	4	8.5	6.5
100	30	80	280	75	115	65	90	60	35	75
50	25	45	290	65	80	35	80	85	25	175
4.38	4.11	8.18	6.32	7.91	5.83	6.04	4.95	4.58	4.3	4.45
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	0
0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2	2	1	1	2	2	1	1	1	0	1
27.5	9.26	17.37	42.32	25.23	37.89	14.59	63.4	22.62	12.6	34.99
9.2	3.77	7.94	12.64	8.24	11.81	5.03	13.62	8.97	5.16	12
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1

gra51Ariz	ped52DF	ped53N.L.	gra54Coa	gra56Dur	esp58Mex	esp59DF	ped61SLP	ped62Mex	ped63Hgo	pedi64Mex
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6.03	4.14	5.92	5.34	5.37	5.27	6.05	5.75	5.51	6.07	9.32
0.5	1.2	0.95	0.5	0.75	0.9	0.75	1	0.9	1.5	0.9
0.25	0.6	0.55	0.3	0.25	0.5	0.4	0.5	0.5	0.35	0.4
0.9	1.5	1.3	1	1	1.8	0.8	1	1.4	1.5	2
4.75	5.96	4.4	3.64	3.63	5.01	4.87	5.36	4.19	5.52	5.92
9.55	7.64	8.71	7.93	8.16	8.01	8.31	8.21	8.22	8.99	8.19
0.5	0.7	0.7	0.5	0.5	0.4	0.35	0.35	0.7	0.3	0.5
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1
0.2	0.4	0.2	0.25	0.4	0.4	0.3	0.25	0.2	0.3	0.35
3.99	3.97	3.78	2.28	3.12	4.17	5.56	4.27	3.86	3.79	4.43
9.44	8.52	9.14	8.12	6.88	6.67	8.57	7.63	6.96	7.08	9.6
1.1	1.7	1.4	1.4	1.1	1.5	1.4	1.9	1.5	1.7	1.5
2.8	4.5	2.7	2.2	2	5	2.5	3.3	3.7	2.5	3.5
1.13	1.26	1.2	0.56	1.51	1.77	1.77	0.95	1.41	1.47	1.42
11.54	7.77	9.57	8.28	7.15	10.28	12.49	11.34	9.9	10.11	13.92
1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
3	1	1	2	3	1	1	0	1	1	1
2	3.2	2.5	2.3	1.9	4	3.5	3.5	3	3.5	2.5
1	1	1.3	0.75	0.8	1.2	1.2	1.15	0.9	1.2	0.9
275	230	80	55	120	140	55	140	70	120	100
8.3	5.5	5.5	3	6	6	7.5	7	5.5	7	9
190	140	50	18	50	55	40	30	40	70	45
85	90	30	37	70	85	15	110	30	50	55
4.59	5.23	4.25	4	4.11	5.03	5.65	6.19	4.75	4.41	5.23
1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	0	1	1	1	2	1
0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
36.03	19.06	21.55	12.48	21.92	26.09	47.52	16.18	20.89	18.51	50.96
12.39	6.73	8.89	5.19	11.91	9.02	11.52	7.77	7.69	4.97	15.89
0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1

gra66Chi	poly67Qro	gra68Dgo	laxi69Ver	ped70Mor	ped71Mor	ped73Mor	laxi76Gro	ped77Sin	gra78Ariz
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.96	4.68	4.97	5.93	5.97	4.62	4.84	4.67	6.73	7.72
1.6	0.8	0.9	1	1	1	0.9	1.2	0.6	1
0.25	0.45	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.6	0.5	0.25
1.5	1	0.8	1.6	1.7	0.9	1.3	1.6	1.2	1.6
3.68	4.82	4.4	5.6	5.02	4.07	4.33	4.8	3.9	4.45
7.58	8.21	8.11	9.66	9.32	7.64	9.13	7.75	8.47	8.85
0.5	0.5	0.4	0.8	0.6	0.5	0.4	0.8	0.5	0.5
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	0	1	0		1
0.3	0.28	0.3	0.2	0.3	0.25	0.22	0.25	0.25	0.25
2.63	3.56	3.76	5.45	3.55	2.92	4.1	4.82	3.51	4.35
6.35	8	4.4	9.35	7.78	7.15	6.15	7.95	6.55	7.88
2	1.8	0.9	2.3	1.1	1.2	1.5	2.5	1.5	1.4
4	3	2.8	4.2	3.3	2.5	3.5	3.8	2.5	2.8
1.17	1.46	1.32	1.6	1.02	1.05	1.15	1.46	1	1.78
8.44	8.84	8.18	10.37	9.43	8.03	11.77	8.1	9.1	11.7
1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
3	2	1	0	1	0	1	1		3
3	2.5	3.5	3.3	3.2	3	2.5	3	2	2.2
0.7	1	0.9	1	1	1	1	1.2	1.3	0.7
235	150	95	130	115	100	60	100	230	120
3	4.2	8	7	6.5	8	5	8	5.5	4
105	85	45	50	65	55	30	43	150	70
130	65	50	80	50	45	30	57	80	50
3.8	5.66	4.36	5.37	4.05	5.22	4.6	4.79	4.04	4.74
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
1	2	2	1	2	2	2	2	1	1
25.24	26.3	31.84	11.1	26.23	41.02	23.07	44.12	30.53	22.03
14.04	10.46	11.5	9.91	7.02	12.4	8.06	14.04	7.78	8.96
0	0	0	1	1	1	0	1		0

gra	laxi85Hgo	laxi86Hgo	ped87N.L.	ped88N.L.	ped90Mich	ped95Hgo	gra96Chi	ped100N.L.	poly101Hgo	ped104Dgo
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.99	6.45	7.4	5.04	5.51	6.01	4.24	6.41	4.24	5.9	7.97
0.9	0.9	1	0.8	1.4	1.2	0.75	0.8	0.7	1	0.85
0.6	0.4	0.35	0.4	0.55	0.5	0.35	0.25	0.4	0.5	0.2
0.8	0.85	1.8	1.3	1	1.5	0.9	1.2	1.1	1	1.8
4.99	5.47	5.83	4.92	5.2	4.03	4.94	3.8	4.38	4.34	4.19
9.77	9.84	9.82	9.11	9.92	9.65	7.97	8.31	8.64	9.77	11.11
0.6	0.5	0.55	0.65	0.45	0.7	0.3	0.4	0.4	0.75	0.5
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
0.4	0.2	0.2	0.25	0.35	0.4	0.4	0.25	0.25	0.3	0.5
4.05	4.28	5.19	3.29	3.45	4	3.94	2.91	3.7	3.98	2.99
8.86	8.93	8.45	8.02	8.21	7.56	7.64	7.63	7.16	7.38	8.8
1.3	1.7	2	1.5	1.3	2	1.6	1.2	1.1	1.3	1.4
2.5	3	3.3	3.3	2.7	4	2.8	2	2.3	2.5	3
1.48	1.09	1.5	1.19	1.03	1.39	1.1	0.93	1.59	1.38	0.77
10.89	11.17	11.6	9.33	9.44	10.47	7.75	9.38	8.43	9.54	11.69
1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
2	0	0	1	1	1	1	3	1	2	0
4	4	3.5	2	3.3	3	3.5	2.3	2	2.5	2.3
1.2	1	0.75	0.6	1.5	1.2	1.3	0.7	1.5	0.9	0.9
135	185	200	97	180	46.2	115	155	145	190	55
8.5	4.5	10.5	7	5.5	7	5	6.5	4.7	4.5	8
85	70	110	52	90	17.02	105	90	95	130	35
50	115	90	45	90	28.98	10	65	55	60	20
7.06	4.56	4.78	4.31	5.25	4.75	4.65	4.06	5.18	5.37	5.09
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
2	2	2	0	2	2	2	2	1	2	1
30.01	34.28	30.35	36.92	25.97	19.55	22.84	27.42	24.47	25.94	19.68
13.73	13.09	12.47	12.91	5.9	7.15	6.72	11.21	10.01	9.51	5.2
1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0

ped105Mich	gra106Coa	ped107DF	gra108Coa	gra109NMex	oax110Oax	oax111Oax	oax113Oax	esp114Pue	esp115Mex	gla120Ver
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
6.36	7.05	6.05	8.84	4.5	4.98	3.47	5.43	4.9	6.65	3.53
0.9	0.65	0.8	0.8	1.7	1.5	2.8	2.2	1.4	1	0.9
0.4	0.35	0.4	0.35	0.4	0.45	0.35	0.35	0.5	0.4	0.6
1.1	1	1.5	0.8	1.5	1.2	2.5	1.5	1.7	2.2	1.3
4.86	3.91	4.91	5.72	4.98	5.16	4.57	5.7	5.12	4.79	5.35
7.92	9.14	7.27	11.01	6.84	7.29	8.17	8.47	8.52	8.72	12.29
0.7	0.5	0.5	0.45	0.65	0.45	0.6	0.6	0.7	0.9	0.9
0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
0.6	0.45	0.4	0.45		0.45	0.6	0.23	0.25	0.23	0.53
4.16	2.67	3.14	4.97	4.89	4.19	3.96	5.59	4.51	3.88	3.12
8.63	9.07	6.78	10.93	8.22	7.43	8.02	9.88	8.81	8.64	11.49
1.5	1.2	1.3	1.5	1.8	1	1.3	1.7	2	2	1.8
3.5	2.5	3.7	2.3	3	2.3	3.5	4	3.5	3.5	2.5
1.46	0.93	0.94	1.19	2.72	0.92	0.73	1.61	1.08	1.09	0.94
10.29	12.61	10.12	12.86	8.05	8.2	7.7	9.09	7.8	9.31	8.92
0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1	3	1	2	3	0	0	0	1	1	0
3.5	2.2	2.3	2.5	4	2	3.5	3.8	3.7	2.8	2.8
1	0.9	0.7	0.8	1	0.85	0.7	0.9	1.3	0.8	1.2
140	275	65	175	130	45	120	140	75	100	270
4	4.5	7	6.5	7.5	4.5	6	6	6	4	10.5
110	100	37	110	80	35	70	90	50	55	190
30	175	28	65	50	10	50	50	25	45	80
5.44	4.69	4.88	5.47	5.66	5.38	4.44	5.46	5.81	4.56	5.75
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	2	2	3	3	1	1	1
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	2
2	2	1	2	2	1	1	2	2	2	1
27.8	38.9	16.82	22.81	27.15	17.5	35.39	32.51	36.9	31.1	66.97
10.29	15.43	6.85	8.58	12.93	8.87	13.42	12.78	8.85	8.32	16.84
1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1

gra 212	laxi 213	ped 214	esp 216	ped 217	esp 218	esp 219	oax 223	pedi224	pedi 225	pedi 226
Hgo.	Gro	Hgo.	Pue.	Edo.Mex.	Hgo.	Hgo.	Oax.	SLP.	Nay.	Mor.
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.61	4.92	3.74	6.89	6.81	4.83	4.39	7.91	4.99	6.88	4.99
0.85	1.18	0.75	1	0.95	1.32	1.23	1.89	0.93	0.7	1.21
0.4	0.5	0.45	0.42	0.52	0.46	0.3	0.32	0.5	0.4	0.54
1	1.51	1.18	1.5	1.22	2.28	2	0.85	1.2	0.83	1.24
4.69	4.69	5.32	4.96	4.71	4.97	4.64	6.32	6.08	4.93	4.26
8.93	8.11	7.95	9.14	9.79	9	8.38	10.68	10.34	10.68	8.78
0.4	0.85	0.59	0.65	0.36	0.6	0.5	0.48	0.43	0.53	0.7
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
0.3	0.21	0.29	0.31	0.22	0.23	0.28	0.27	0.21	0.27	0.22
4.59	4.14	3.56	5.18	3.21	5.05	5.57	5.24	4.85	4.68	4.02
7.71	8.58	7.07	9.5	8.78	8.16	8.04	10.14	9.67	10.24	7.55
1	2.1	1.17	1.75	1.4	1.65	1.24	1.41	1.6	1.27	1.6
3.1	3.56	3.67	4.71	2.63	5.4	4.46	2.82	3.4	2.89	3.36
1.91	1.4	1.36	1.38	1.1	1.83	1.76	2.07	1.41	1.5	1.21
7.59	8.98	7.24	10.37	11.43	9.47	9.36	11.94	12.33	11.53	8.78
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
2.65	2.7	3.3	3.01	2.7	4.38	2.9	3.91	3.04	2.19	2.61
1	1.27	0.96	1.2	1.34	1.76	0.95	0.76	1.26	1.05	1.08
190	100	60	105	75	80	100	190	135	90	95
4.67	12.5	6.68	7.55	7.02	6.52	7.9	8.6	7.07	6.2	6.58
110	45	30	60	43	55	42	110	49	60	45
80	55	30	45	32	25	58	80	86	30	50
4.6	5.23	5.85	6.37	5.24	5.51	6.31	5.35	4.33	5.26	4.47
1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
1	1	2	1	1	1	1	3	2	1	1
1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1
26.64	40.35	16.66	27.61	21.03	22.5	24.9	52.3	38.55	17	30.74
11.48	12.5	6.5	8.54	7.41	7	9.6	19.76	12.95	5	9.95
0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1

pedi 227 Edo. Mex.	gra 228 Dgo	gra 229 Dgo.	pur 230 Inv.(SLP)	dasyP.M131	neg 489NvoLeón	neg 8687NvoLeón	neg 7145NvoLeón	neg 24657Tamp	neg 17171Tamp
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.46	5.61	3.56	7.75	4.56	9.05	5.65	7.84	9.91	6.46
1.02	1.34	1.17	0.77	1.2	0.8	0.45	1.2	1	0.5
0.44	0.35	0.2	0.45	0.29	0.3	0.3	0.4	0.6	0.35
1.35	2.11	1.36	1	1.23	1.5	0.8	1	1.5	1
4.24	4.22	4.2	4.61	4.65	5.14	4.4	4.84	5.24	4.24
9.41	8.44	7.22	11.01	9.1	13.78	11.6	12.45	13.62	12.68
0.5	0.77	0.79	0.42	0.47	0.5	0.6	0.6	0.7	0.5
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
0.22	0.33	0.25	0.29	0.25	0.3	0.35	0.4	0.3	0.4
3.84	4.16	3.42	6.37	5.5	3.89	4.07	3.56	4.55	4.74
8.72	7.85	7.83	9.2	9.2	15.78	16.67	13.82	19.6	16.58
1.45	1.64	1.8	1.36	2.48	1.7	1.4	2	2	1.5
2.58	4.1	3.06	3.06	4.05	4	3	3.5	3.5	2.5
1.23	1.44	0.77	2.69	1.54	1.27	0.9	1.02	0.78	1.19
9.67	8.14	6.57	12.87	9.04	15.57	13.38	14.37	18.83	16.53
0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
1	3	3	2	1	1	1	1	0	0
2.65	2.43	2.43	2.2	4.3	3.2	2.5	4.5	2.5	2.2
0.96	0.84	0.76	1.34	0.91	0.6	0.6	0.7	1.1	0.7
105	190	230	223.33	63	270	200	260	250	325
6.61	4	7.66	12.04	7.29	5.5	6.3	5	11	7.5
50	85	70	183.33	31	190	65	155	140	140
55	105	160	40	32	80	135	105	90	185
4.1	4.07	4.4	5.69	5.7	5.18	5.2	5.31	7.89	8.56
1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
1	2	1	1	1	1	1	2	1	1
0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
0	1	1	1	1	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	1	1	1	2	1
35	17.91	26.54	36.5	22.2	40.8	46	43.58	38.62	52.16
12.44	9.33	9.76	13.45	10.5	10.1	13.3	12.44	11.98	27.04
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1

Anexo II.2. Análisis de componentes principales. Los caracteres resaltados en negritas son los que definen el fenograma.

Output: NTSYSpc 2.11V, (C) 2000-2004, Applied
Biostatistics Inc. Date & time: 23/01/2006 01:34:50 p.m.

Input parameters:

Read input from file: E:\MBD(enero23-06)

940TUSconCapucha(45)Sinmed.folioEVE. NTS Format: width=9 decimals=4

Page width: 80

Field width: 9

Decimal places: 4

Page width: 80

Comments:

STAND: input=E: \MBD (nov4-05) 940TUSconCapucha(45)Sinmed.folioN
tsys.NTS, divide=STD, subts=YBAR, direction=Row

SIMINT: input=E: \MBD (nov4-05) 940TUSconCapucha(45)Sinmed.folioS
td.NTS, coeff=CORR, direction=Rows

EIGEN: input=E:\MBD(Dic9-05) 940TUSconCapucha(45)Sinmed.folioC
orr.NTS, k=4 vectors, length=SQRT(LAMBDA)

Matrix type = 1, size = 39 by 4, missing value code = "none" (rectangular)

	C1	C2	C3	C4
Lobulación de folíolos lat	0.2363	0.7003	0.3014	0.1075
Fruto inmaduro pubesc.	-0.0027	-0.0562	0.4596	0.2120
Rostro en fruto inmad.	-0.3356	-0.2633	-0.3084	-0.3654
Fruto coriáceo	0.1983	-0.2623	0.1881	0.3852
Pecíolo de hoja de inflo.	-0.5660	-0.2795	0.0921	-0.1840
Longitud raquis foliolo	-0.6244	-0.1584	0.1274	-0.2513
largoestípulas	0.1329	-0.4255	0.4019	0.2115
Ancho de estípulas	0.1765	-0.4084	0.3032	-0.1086
Largo estípelas	-0.1939	-0.4636	0.1013	0.1527
Ancho estípelas	-0.1661	-0.3401	-0.0524	-0.1359
Longitud de inflo.	-0.6420	0.3562	0.3705	-0.0507
Longitud de pedúnculo	-0.6342	0.2567	0.3078	-0.0558
Longitud deraquis inflo.	-0.4707	0.3738	0.3421	-0.0365
Longitud de la bráctea	-0.0114	-0.5790	0.3336	0.1223
Ancho de la bráctea	0.2228	-0.4905	0.5611	-0.4603
Longitud del pedicelo	-0.4421	-0.4058	-0.1834	0.1020
Longitud de la bractéola	0.0888	-0.4351	-0.1619	0.4525
Ancho de la bractéola	-0.0163	-0.5220	-0.2936	0.1870
Largo del cáliz	-0.1774	-0.4042	0.4783	0.4691
Ancho del cáliz	-0.2263	-0.6422	-0.0096	0.0742
Largo diente ventral cáli	0.0819	-0.1708	0.4831	0.4132
Largo del estandarte	-0.8726	-0.0902	-0.0323	0.0208
Ancho del estandarte	-0.8313	-0.0432	-0.1684	0.1047
Largo del ala derecha	-0.6931	0.1082	0.1608	0.2424
Ancho del ala derecha	-0.4515	0.1009	0.0648	0.2473

Longitud del ovario	-0.5114	-0.1607	0.1115	0.2064
# de nerv. estípulas	-0.1380	0.3526	-0.0101	0.2391
# de nerv. estipelas	-0.3893	-0.2797	-0.3740	-0.2294
Acúmenes en folíolo lat.	0.0162	0.1311	0.2852	-0.0382
# de nudos en raq. inflo.	-0.0274	-0.3777	-0.3564	0.0572
# de nerv. bráctea	0.0752	-0.3468	0.3855	-0.5458
# de nerv. bractéola	-0.1433	-0.0903	-0.5416	0.1446
# de vueltas en quilla	0.1923	0.0945	0.2536	0.2094
# de óvulos	-0.5854	0.1359	0.1100	0.0498
Bráctea trifida	0.0885	-0.2711	0.4522	-0.5513
Color de flor	-0.8068	0.0440	-0.0511	-0.0816
Grueso del pedicelo	-0.1922	0.1304	-0.0050	-0.4196
Lobulación folíolo central	-0.2000	0.7472	0.1801	0.0301
Forma del estandarte	0.0113	0.0396	0.0352	0.1375

Ending date & time: 23/01/2006 01:34:50 p.m.

CAPÍTULO III

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS

ESTUDIOS CROMOSÓMICOS EN *PHASEOLUS*

No obstante que los estudios cromosómicos pueden ser utilizados como una herramienta importante en la resolución de problemas taxonómicos (Almeda y Chuang, 1992; Green et al., 1980; Thomas, 1973), la mayoría de ellos se han realizado en especies cultivadas y pocos han involucrado a las silvestres.

Goldblatt (1981) propuso que el número cromosómico básico para las Fabaceae es $x=7$, ese número solo se presenta en *Cercis* (Caesalpinioideae). A partir de $x=7$ se dio una poliploidía temprana acompañada de aneuploidías con pérdida o ganancia de uno o varios cromosomas, originando con ello desviaciones del poliploide $n=14$ y dando como resultado toda una serie de números cromosómicos básicos en los diferentes géneros de las fabáceas. Poliploidías posteriores se han presentado en grupos como *Leucaena*, en el que en algunas especies se ha registrado un número diploide ($2n$) por arriba de los 100 cromosomas (Kumari y Bir, 1985; Palomino et al., 2000).

Federov (1974) presenta como primer reporte de número cromosómico en el género *Phaseolus* el de Kleinmann en 1923 para *P.*

multiflorus con $2n= 24$, registro que parece erróneo, sobre todo por la técnica utilizada en esa época para las determinaciones cromosómicas, que consistía en la inclusión del tejido en parafina y la realización de los cortes correspondientes. Senn (1938) por su parte, en su trabajo sobre los números cromosómicos en las fabáceas, señala que Karpenchenko determinó un $2n= 22$ en *P. lunatus*, *P. vulgaris*, *P. multiflorus* (= *P. coccineus*) y *P. acutifolius*. El género se caracteriza por la constancia intraespecífica en el número cromosómico. Las especies que han sido reportadas como poliploides, se han inducido.

Goldblatt (1981), Lackey (1979) y Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (1996) propusieron, con base en los reportes disponibles que, al igual que en la tribu *Phaseoleae*, el número cromosómico básico en el género es $x= 11$, existiendo un número haploide de $n=10$ en tres especies: *P. leptostachyus*, *P. micranthus* y *P. macvaughii* (Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas, 1998), surgiendo así un número básico secundario de $x= 10$. El número cromosómico de estas tres especies, junto con información morfológica, hicieron que Debouck (2000) las considerara parte de un grupo distinto y Freytag y Debouck (2002) las integraron en la sección *Falcati*, junto con otras dos nuevas especies, de las que se desconoce su número cromosómico. El porcentaje de especies a las que se les ha determinado el número cromosómico es de 43%, y disminuye notablemente a 14% al

considerar las analizadas cariotípicamente. No obstante, con la información disponible es posible sugerir que el cariotipo de las especies de *Phaseolus* es simétrico por la predominancia de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos. *P. chiapasanus* es la única especie registrada con cromosomas subteloecéntricos (Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas, 1998, 2000).

Algunos autores (Sarbhoy, 1977, 1980; Sinha y Roy, 1979a, 1979b) señalan que, en la evolución cariotípica del grupo, han estado involucradas principalmente las inversiones pericéntricas y paracéntricas, translocaciones y pérdida o ganancia de cromatina. También proponen que el cariotipo de *Phaseolus* ha evolucionado hacia una asimetría, con una disminución en el contenido total de la cromatina.

Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (1998) señalan, de las 10 especies que analizaron cariotípicamente, a *P. filiformis* como la más primitiva cariotípicamente, por presentar todos sus cromosomas metacéntricos y una baja longitud cromosómica, ambas características señaladas como primitivas por Stebbins (1971); también Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (1998, 2000) encuentran que la aneuploidía, contrariamente a lo que se consideraba, sí ha participado en la evolución del cariotipo, al encontrar tres especies aneuploides con $2n= 20$.

El trabajo de Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (1998) proporciona un análisis cromosómico en 10 especies silvestres donde se observan diferencias en los cariotipos. La falta de estudios cariológicos se atribuye a la pequeña talla que presentan los cromosomas en este grupo y a la dificultad que esto conlleva (Hucl y Scoles, 1985; Zheng et al., 1991).

ESTUDIOS DE CONTENIDO DE ADN NUCLEAR EN EL GÉNERO *Phaseolus* L.

Una vez que se reconoció al ADN como el principal material genético en la mayoría de los organismos, y al tenerse mayor conocimiento de los mecanismos por los cuales la información genética se codifica, rápidamente se convirtió en uno de los principales focos de investigación biológica. Uno de los objetivos de investigación, fue conocer el tamaño del genoma nuclear en diferentes organismos (Bennett y Leitch, 1995), es así que Ohri (1998) considera que el estudio del ADN nuclear es crucial para un entendimiento global del genoma de un organismo. Bennett y Leitch (1997) señalan que el conocimiento del contenido de ADN nuclear puede tener aplicaciones en diferentes campos de la biología como es el caso de sistemática y evolución, ecología, biología celular y molecular, fisiología y paleontología. De acuerdo con Greilhuber (1998), el tamaño del genoma es un carácter más, y como tal, tiene significado taxonómico como cualquier otro, o tal vez más, ya que su diversificación depende de cientos e inclusive miles de pasos mutacionales.

El contenido de ADN en las angiospermas varía aproximadamente en valores 1C de 0.1 a 127.4 picogramos, en donde 1C es la cantidad nuclear de ADN no replicado en los gametos de un organismo (Fay et al., 2005). El contenido de ADN se modifica por mecanismos que pueden tener poco impacto, como son las inserciones o deleciones (INDEL), o por otras vías, como la poliploidía y los transposones en donde el efecto es mayor (Bennetzen et al., 2005, San Miguel et al., 1996). Se ha establecido que variaciones en el contenido del ADN tienen incidencia en el fenotipo celular (Bennett, 1972). Algunas de las consecuencias mencionadas por Knight et al. (2005) en especies que tienen un alto contenido de ADN, es un bajo promedio de diversificación y un alto riesgo de extinción y, que dichos organismos no se encuentran en ambientes extremos, nunca tienen semillas pequeñas y se caracterizan por bajos niveles fotosintéticos. Se menciona con frecuencia, la existencia de una correlación negativa entre latitud y altitud con el contenido de ADN, aunque, resultados de Bennett (1987), Bennett et al. (1982), Levin y Funderburg (1979) y Rayburn (1990), sugieren que la verdadera relación entre el tamaño del genoma con la altitud y latitud, se encuentra representada más adecuadamente por una distribución unimodal, en donde las especies con bajo contenido de ADN pueden existir en cualquier elevación o latitud, como ocurre con *Phaseolus*

microcarpus; especies con elevados contenidos de ADN pueden encontrarse excluidos de los extremos.

Greilhuber (1998) señala que mucha de la variación intraespecífica que se reporta en las especies vegetales puede ser relacionarse con un error metodológico ocasionado por la especie que se utiliza de referencia, recomendando emplear una que muestre valores cercanos a la o las especies que se pretendan analizar. Gregory (2005) y Greilhuber (2005) mencionan varios factores que afectan una adecuada determinación del ADN nuclear y que pueden dar la impresión de variaciones intraespecíficas que en realidad son artefactos causados por una inadecuada aplicación de la técnica o al contenido celular que interfiere con la tinción del ADN.

En el caso particular de *Phaseolus*, al igual que en los estudios cromosómicos, en los realizados sobre contenido de ADN nuclear hay especies que son referidas como pertenecientes a *Phaseolus*, cuando actualmente están ubicados en géneros cercanos (Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas, 1998); por ejemplo, *P. angularis* (Willd.) Wight reportada por Ayonoadu (1974) con un valor 2C de 2.8 picogramos, actualmente es *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi, mientras que *P. geophyllus* Burk. (2C= 2.6 pg) y *P. lathyroides* L. (2C= 2.3 pg), ambas especies también reportadas por Ayonoadu (1974), pertenecen al género *Macroptilium* (Benth.) Urban.

Una revisión condensada sobre los estudios citogenéticos que se han realizado en *Phaseolus* se presenta en el trabajo de Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (2000). La revisión fue resultado de una actividad complementaria desarrollada por el primer autor durante la presente investigación (Anexo III.1).

MATERIALES Y MÉTODOS

CROMOSOMAS

El material utilizado fue el que se obtuvo de las salidas al campo; las especies estudiadas y su procedencia se enlistan en la Cuadro III.1. Todos los ejemplares de respaldo están depositados en el Herbario Nacional de México (MEXU).

Cuadro III.1. Especies del género *Phaseolus* que fueron analizadas cromosómicamente.

Especie	Colector	Procedencia
<i>P. dasycarpus</i>	<i>P. Mercado et al. 131</i>	Hidalgo
<i>P. esperanzae</i>	<i>P. Mercado et al. 23</i>	Puebla
<i>P. esperanzae</i>	<i>P. Mercado y A. Reyes 98</i>	Puebla
<i>P. glabellus</i>	<i>P. Mercado s/n</i>	Puebla
<i>P. grayanus</i>	<i>P. Mercado et al. 60</i>	San Luis Potosí
<i>P. grayanus</i>	<i>P. Mercado et al. 145</i>	Aguascalientes
<i>P. laxiflorus</i>	<i>P. Mercado y A. Reyes 102</i>	Veracruz
<i>P. neglectus</i>	<i>P. Mercado et al. 49</i>	San Luis Potosí
<i>P. oaxacanus</i>	<i>P. Mercado y F. Tapia 91</i>	Oaxaca
<i>P. pedicellatus</i>	<i>G. Ibarra 403</i>	Michoacán
<i>P. pedicellatus</i>	<i>P. Mercado 70</i>	Morelos
<i>P. pedicellatus</i>	<i>P. Mercado et al. 127</i>	San Luis Potosí
<i>P. pedicellatus</i>	<i>P. Mercado 181</i>	Morelos
<i>P. pedicellatus</i>	<i>P. Mercado y G. Flores 40</i>	Puebla
<i>P. pedicellatus</i>	<i>P. Mercado et al. 114</i>	Edo. de México
<i>P. purpusii</i>	<i>R. Torres 15438</i>	San Luis Potosí

El resto de las especies no fueron consideradas por carecer de material biológico ya que no fue posible obtener ejemplares durante las salidas al campo. Así, que de las 11 especies reconocidas por Freytag y Debouck (2002) en la sección *Pedicellati*, sólo fue posible analizar a seis de ellas, aunque hay que agregar a *P. dasycarpus*, especie que de acuerdo, con el capítulo anterior, pertenece a dicha sección. Como se mencionó en el capítulo anterior, por ser especies cercanas a las de la sección *Pedicellati*, y a manera de comparación, *P. glabellus* y *P. neglectus* también fueron incluidas en el análisis citogenético.

Los cromosomas mitóticos fueron observados y analizados en células meristemáticas de punta de raíz, obtenidas de la germinación de semillas en cajas de petri con algodón y papel filtro humedecidos a temperatura de 30⁰C en oscuridad. Se cortaron las raíces con una longitud de 1 – 2 cm y se pretrataron con 8 hidroxiquinoleína 0.002 M por 5 horas a temperatura ambiente, posteriormente se fijaron en solución farmer (alcohol etílico absoluto-ácido acético 3:1) durante 24 horas como mínimo; las raíces fueron lavadas con agua destilada e hidrolizadas en HCl 1N a 60⁰C durante 12 minutos, posteriormente se tiñeron con solución Feulgen por espacio de una hora en oscuridad. El aplastamiento de la punta de raíz teñida se realizó con una gota de acetorceína al 1%; las preparaciones permanentes se obtuvieron siguiendo el método de hielo seco de Conger y Fairchild

(1953) y se encuentran en la colección de preparaciones cromosómicas del Laboratorio de Fanerogamia del Instituto de Biología de la UNAM. Para las fotografías se utilizó un fotomicroscopio Carl Zeiss Axioskop. Las mediciones se realizaron en fotografías de células metafásicas; se utilizaron por lo menos 5 células por especie. En la clasificación de los cromosomas se siguió a Levan et al. (1964). El número fundamental y simetría del cariotipo se calcularon de acuerdo a Matthey (1945) y Huziwara (1962), respectivamente.

Los cromosomas meióticos fueron observados en células madres del polen obtenidas de botones florales colectados entre las 8:00 A.M. y 15:00 P.M. y fijados en solución farmer. Las anteras fueron separadas y abiertas en un portaobjetos, se les agregó una gota de acetocarmín al 2% y otra de solución de Hoyer, se mezcló de manera homogénea con la ayuda de una varilla de vidrio y posteriormente se colocó un cubreobjetos y se aplastó de manera suave, la preparación fue revisada en el microscopio para observar si contenía células madres del polen en división meiótica. Si la preparación contenía células en división, se presionaba con mayor fuerza con el dedo pulgar para lograr una mayor separación de los cromosomas. Los mejores campos fueron fotografiados y analizados para determinar el comportamiento cromosómico en la primera división meiótica.

CONTENIDO DE ADN

La cuantificación de ADN se llevó a cabo en los Royal Botanic Gardens de Kew, Inglaterra, en una estancia realizada con la Dra. Ann Kenton (†).

Las mediciones fueron realizadas en células meristemáticas de ápice radicular, la técnica utilizada fue la descrita por Bennett y Smith (1976):

Vigna radiata (L.) Wilczek con cantidad de ADN conocida de 4C de 2.1 picogramos (pg) se utilizó como referencia (estándar). Raíces en división celular activa de cada especie a analizar se colectaron y colocaron en fijador alcohol etílico-ácido acético (3:1). Al mismo tiempo también se fijaron raíces de la planta estándar en un recipiente aparte; se introdujeron en fijador fresco ambos grupos de raíces después de 30 min. Las raíces pudieron ser utilizadas después de 24 horas de fijación, pero no en un lapso mayor de 15 días, ya que un tiempo prolongado en el fijador puede afectar la tinción.

Las raíces se hidrolizaron en HCl 1N durante 12 minutos a 60°C, se extrajeron y se tiñeron en solución de feulgen hecho a base de pararosanilina por 2 h a 23°C; se realizaron tres lavados con agua sulfatada de 10 minutos cada uno, las raíces fueron colocadas en agua destilada antes de hacer las preparaciones. Se aplastaron los meristemas radiculares en una gota de ácido acético al 45% y se sellaron las preparaciones para su posterior observación, la cual no debió exceder las 7 horas.

En total se analizaron tres preparaciones con buenos campos en interfase o metafase de la especie problema y del estándar; se midieron 10 núcleos interfásicos por preparación con 3 valores integrados por núcleo. Las mediciones se realizaron en un microdensitómetro Vickers M85a con longitud de onda de 560 nm.

La cantidad de ADN se calculó del valor medio de cada núcleo de los tres valores integrados, el valor medio para cada preparación de los 10 núcleos medidos y el valor medio y error estándar entre las tres preparaciones. Las cantidades obtenidas son unidades arbitrarias y se transforman a picogramos utilizando la siguiente fórmula:

$$pg = \frac{\text{Unidades arbitrarias de la sp. problema} \times \text{cantidad de ADN de la especie referencia}}{\text{Unidades arbitrarias de la especie referencia}}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CROMOSOMAS

Se obtuvieron los cromosomas mitóticos de *P. dasycarpus*, *P. glabellus*, *P. grayanus*, *P. esperanzae*, *P. laxiflorus*, *P. pedicellatus*, *P. neglectus* y *P. purpusii*; algunas especies fueron analizadas de varias poblaciones. Se observaron cromosomas meióticos en *P. dasycarpus*, *P. glabellus*, *P. grayanus*, *P. laxiflorus*, *P. oaxacanus* y *P. pedicellatus*.

Con la información disponible y la obtenida en el presente estudio, siguiendo la clasificación de Freytag y Debouck (2002), se conoce del

género *Phaseolus* el número cromosómico de 32 especies (43%) y 1 variedad (*Phaseolus maculatus* var. *ritensis*); 29 especies, junto con la variedad presentan un número cromosómico de $2n= 22$, las tres especies restantes tienen $2n= 20$. Las figuras III.1 y III.2 muestran algunas de las células mitóticas obtenidas en el presente estudio, todas ellas con $2n= 22$.

De las especies a las que se les determinó el número cromosómico diploide, únicamente en *Phaseolus purpusii* no fue posible la obtención de cromosomas con una buena contracción que permitieran determinar su fórmula cariotípica y solo fue posible la cuantificación del número cromosómico.

La fórmula cariotípica de las otras especies se caracteriza por la predominancia de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, como ya anteriormente habían establecido Mercado-Ruaro y Delgado Salinas (1998). Se observaron cromosomas del tipo subtlocéntrico en *Phaseolus grayanus* procedente de Aguascalientes y en *P. glabellus* de Puebla, con ello se incrementó la cantidad de especies que presentan dichos cromosomas, dejando de ser exclusivos de *P. chiapasanus* como habían reportado Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (1998) (Cuadro III.2). Se confirma el número cromosómico básico $x=11$ propuesto por Goldblatt (1981) y Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (1998), y un número secundario de $x= 10$ en tres especies (sección *Falcati*). *P. glabellus* y *P. neglectus* que también

fueron analizadas mostraron número cromosómico diploide de $2n= 22$ (Fig. III.2. A-B y III.4.C).

De los 10 taxa analizados, nueve presentaron un par de cromosomas con constricción secundaria, mientras que, en *Phaseolus pedicellatus* proveniente de Veracruz no se observó dicha característica. Esto puede deberse a que las células analizadas presentan los cromosomas muy condensados o a que la separación entre el satélite y el resto del cromosoma sea muy pequeña, impidiendo que pueda observarse al microscopio la constricción secundaria. La longitud de la cromatina por complemento diploide varió de 21.51 μm en *P. esperanzae* a 39.16 μm en *P. pedicellatus* del estado de Morelos. El tamaño de los cromosomas varió ampliamente: el más pequeño lo presentó *P. pedicellatus* de Veracruz (0.72 μm), mientras que el más grande correspondió a *P. pedicellatus* de Morelos (2.31 μm). El menor índice de simetría y que indica un cariotipo más asimétrico correspondió a *P. pedicellatus* de Michoacán, con un valor TF% de 37.91, mientras que el índice mayor corresponde a *P. pedicellatus* de Morelos con un TF% de 42.28.

En lo referente al número fundamental (número de brazos cromosómicos en complementos cromosómicos haploides, 2 para cromosomas metacéntricos y submetacéntricos y 1 para los subtlocéntricos, telocéntricos y acrocéntricos), en la mayoría fue de 22 y

únicamente en las dos poblaciones que presentaron cromosomas subtelocéntricos se redujo a 21. Los cromosomas fueron pequeños como era de esperarse por reportes previos (Hucl y Scoles, 1985; Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas, 1998). *Phaseolus esperanzae* presentó una longitud total de los cromosomas menor al resto de las especies con 21.51 μm , mientras que *P. pedicellatus* de Veracruz mostró mayor longitud total con 39.14 μm . En los datos del Cuadro III.2., puede apreciarse que existe variación intraespecífica en la longitud total de la cromatina: *P. pedicellatus* presenta una variación intraespecífica de 26.14 μm a 39.14 μm , mientras que en *P. grayanus* es de 29.8 μm a 33.58 μm . La variación intraespecífica observada en las poblaciones analizadas puede ser real, como se ha encontrado en *Milium effusum* L. (Bennett y Bennett, 1992) y *Dactylis glomerata* L. (Reeves et al., 1998) por citar algunos ejemplos, y en donde dichas variaciones se han correlacionado con distintas condiciones ecogeográficas en que se localizan las poblaciones; sin embargo, no se descarta que las variaciones observadas en la longitud total de los cromosomas sean resultado de diferencias en la condensación de los cromosomas durante el ciclo mitótico, tal y como se ha observado en poblaciones de *Crotalaria incana* L. (Tapia-Pastrana et al., 2005). Otra explicación para las variaciones en el tamaño del genoma puede ser resultado de la presencia de ADN repetitivo, compuesto en su mayoría por

transposones (Knight et al., 2005), principalmente del tipo Retrotransposones-LTR (Long Terminal Repeat- Retrotransposons) que pueden encontrarse en distintas cantidades y que se asocian a grandes regiones heterocromáticas que se localizan a los lados de los centrómeros (Bennetzen et al., 2005).

Respecto al análisis meiótico, con excepción de *Phaseolus laxiflorus* de Maltrata, Ver. y *P. pedicellatus* proveniente del estado de Morelos, la segregación cromosómica en las poblaciones analizadas fue normal, con formación de 11 bivalentes. En el caso de *P. pedicellatus* del estado de Morelos, se observó la presencia de puentes cromosómicos durante la primera división meiótica (Fig. III.3.A), probablemente como resultado de una separación tardía de los cromosomas después de la sinapsis correspondiente, mientras que en *P. laxiflorus*, se observó la formación de cromosomas multivalentes, pero no en la primera división meiótica, que sería lo normal si se tratara de una especie autoploiploide; dichas formaciones fueron observadas en la segunda metafase meiótica (Fig. III.4. A). Esta agrupación de varios cromosomas puede considerarse como aglutinación cromosómica la cual, de acuerdo con Beadle (1932), es una clase de “pegajosidad” cromosómica de naturaleza desconocida, que produce una apariencia picnótica o aglutinada de los cromosomas; las aglutinaciones se producen por ciertas mutaciones génicas, y se pueden

inducir mediante la aplicación de una gran variedad de agentes físicos y químicos, durante el estado condensado de los cromosomas, en mitosis y meiosis; sin embargo, al final del proceso meiótico, todas las células observadas tenían 11 cromosomas, indicando una segregación normal (Fig. III.4. B).

En el caso particular de *Phaseolus dasycarpus*, especie ubicada por Freytag y Debouck (2002) en la sección *Paniculati*, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, que la colocan en la sección *Pedicellati*, tuvo una formación de 11 bivalentes y segregación normal, como se aprecia en la Fig. III.2. C.

Cuadro III.2. Análisis cariotípico de 10 poblaciones de especies de la sección *Pedicellati*, junto con *Phaseolus glabellus* y *P. neglectus*.

Especie	Localidad y colector	<i>n</i>	<i>2n</i>	Fórmula cariotípica (haploide)	Constricciones secundarias	Longitud total de la cromatina (µm)	Intervalo de longitud de los cromosomas (µm)	Índice de simetría (TF%)	Número fundamental
<i>P. dasycarpus</i>	Hidalgo, <i>P. Mercado et al. 131</i>	11	22	9m + 2sm	1sm	30.37	1.12 – 1.69	41.16	22
<i>P. esperanzae</i>	Puebla, <i>P. Mercado et al. 23</i>		22	7m + 4sm	1sm	21.51	0.77 – 1.21	39.05	22
<i>P. grayanus</i>	La Congoja, Ags., <i>P. Mercado et al. 145</i>	ND	22	6m + 4sm + 1st	1m	29.8	0.95 – 1.69	38.15	21
<i>P. grayanus</i>	El Peaje, S. L. P., <i>P. Mercado et al. 60</i>	11	22	10m + 1sm	1m	33.58	1.18 – 1.81	41.05	22
<i>P. laxiflorus</i>	Maltrata, Veracruz, <i>P. Mercado y A. Reyes. 102</i>	11	ND	ND					
<i>P. oaxacanus</i>	Oaxaca, <i>P. Mercado y F. Tapia 91</i>	11	ND	ND					
<i>P. pedicellatus</i>	Michoacán, <i>G. Ibarra 403</i>	11	22	6m + 5sm	1sm	26.14	0.86 – 1.6	37.91	22
<i>P. pedicellatus</i>	Morelos, <i>P. Mercado 181</i>	11	22	8m + 3sm	1m	39.16	1.35 – 2.31	42.28	22
<i>P. pedicellatus</i>	Río Verde, S. L. P., <i>P. Mercado et al. 127</i>	ND	22	8m + 3sm	1sm	31.23	1.02 – 1.79	39.19	22
<i>P. pedicellatus</i>	Veracruz <i>P. Mercado y A. Reyes 106</i>	ND	22	6m + 5sm	No se observaron	39.14	0.72 – 1.31	39.14	22
<i>P. purpusii</i>	San Luis Potosí, <i>R. Torres 5438</i>	ND	22	ND					
<i>P. glabellus</i>	Puebla, <i>P. Mercado s/n</i>	11	22	7m + 3sm + 1st	1st	25.31	0.91 – 1.54	38.95	21
<i>P. neglectus</i>	Nuevo León, <i>A. Delgado 1015</i>		22	10m + 1sm	1sm	28.04	1.09 – 1.45	45.15	22

m= metacéntrico, sm= submetacéntrico, st= subtelocéntrico; TF% = Long. total de brazos cortos/ Long. total de los cromosomas X 100; ND= no

determinado

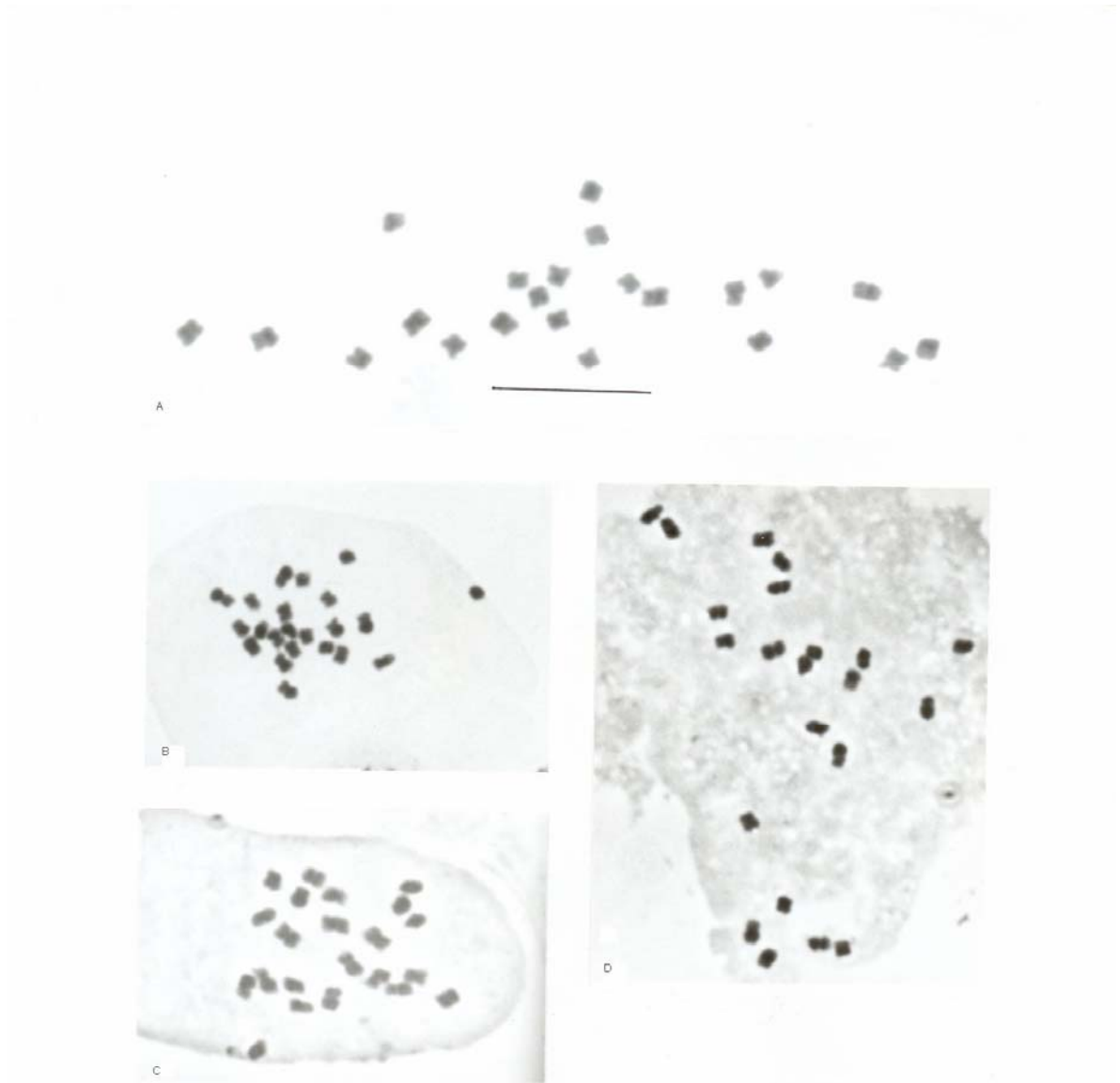


Figura III.1. Células en metafase durante la división mitótica, A) *Phaseolus dasycarpus*, Hidalgo; B) *P. esperanzae*, Puebla; C) *P. grayanus*, La Congoja, Ags.; D) *P. grayanus*, El Peaje San Luis Potosí. La escala equivale a 10 μ m.

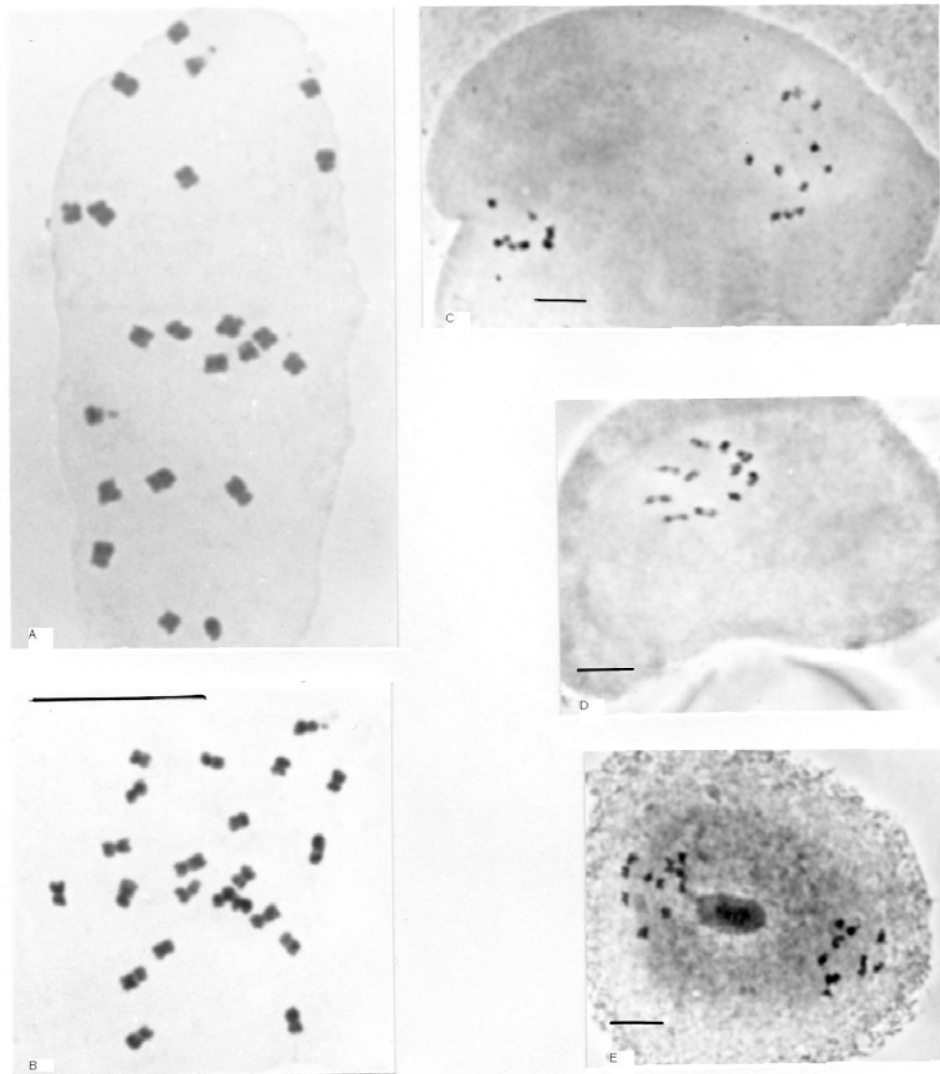


Figura III.2. A) *Phaseolus glabellus*, Zacapoaxtla, Pue. Cromosomas mitóticos $2n=22$; B) *P. neglectus*, San Luis Potosí. Cromosomas mitóticos $2n=22$; C) *P. dasycarpus*, Hidalgo, Meiosis, metafase II D) *P. grayanus*, El Peaje, S. L. P. Meiosis, metafase I; E) *P. pedicellatus*, Morelos. Meiosis, metafase II. La escala corresponde a $10\ \mu\text{m}$.

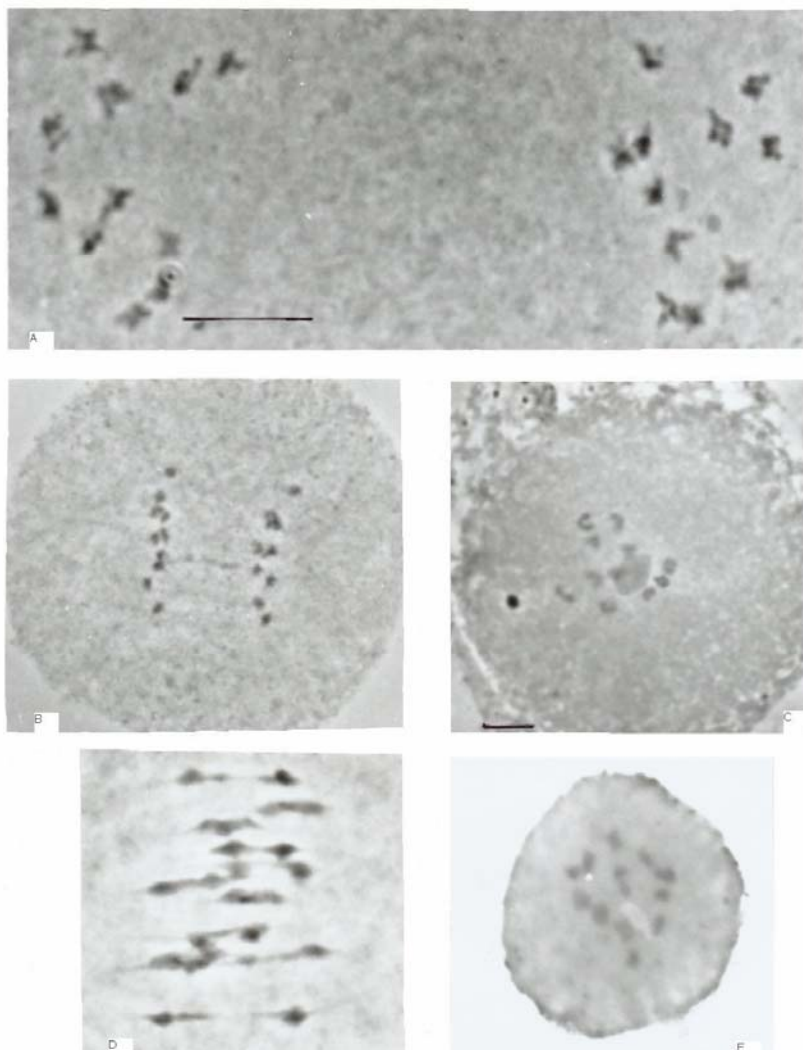


Figura III.3. A) *Phaseolus pedicellatus* Morelos. Meiosis, metafase II; B) *P. pedicellatus* Morelos. Meiosis, anafase-telofase I; C) *P. pedicellatus*, Aputzio, Michoacán. Meiosis, Profase I; D) *P. pedicellatus*, Morelos. Meiosis, anafase I; E) *P. pedicellatus*, Zinapécuaro, Michoacán. Meiosis, metafase I. La escala equivale a 10 μm .

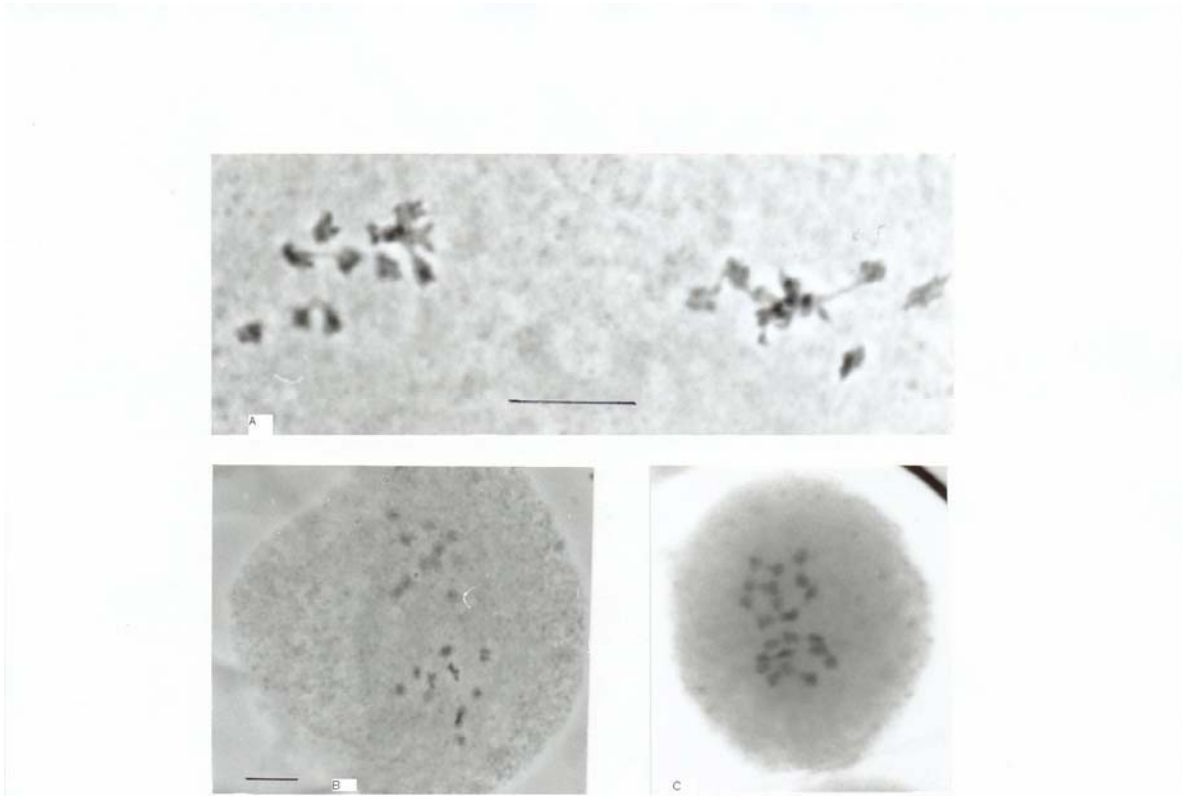


Figura III.4. A) *Phaseolus laxiflorus*, Maltrata, Veracruz. Meiosis, Anafase-telofase I.; B) *P. laxiflorus*, Maltrata. Meiosis, metafase II; C) *P. glabellus*, Nauzontla, Pue. Meiosis, metafase II La escala equivale a 10 μ m.

CONTENIDO DE ADN

Los resultados sobre contenido nuclear se obtuvieron durante una estancia que realicé en el Jodrell Laboratory de Kew Gardens, Inglaterra, en el área de citogenética con la fallecida Dra. Ann Kenton y que por comunicación personal fueron publicados en Bennett y Leitch (1995); no obstante, un análisis sobre el particular no se ha realizado.

En el Cuadro III.3., se enlistan las especies de *Phaseolus* a las que se les determinó el contenido de ADN nuclear, junto con una revisión sobre las especies que han sido reportadas con anterioridad por otros autores. De las referencias consultadas se eliminaron las especies que, de acuerdo con Verdcourt (1970) y Maréchal et al. (1978), entre otros

autores, no pertenecen al género. Así, a 30 especies se les ha cuantificado el contenido nuclear, representando el 40% del total de ellas (*sensu* Freytag y Debouck, 2002). También se aprecia que son pocos los estudios realizados en el género, de no ser por los análisis de Nagl y Treviranus (1995) y los de Mercado-Ruaro y Kenton (1995); la información al respecto estaría concentrada en *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *P. lunatus* y *P. vulgaris*, todas especies cultivadas.

Los valores 2C dentro del género oscilan de 0.9 pg en *Phaseolus macvaughii* a 3.7 pg en *P. vulgaris*; del análisis del Cuadro III.3., se aprecia que existen diferencias en los valores que se han obtenido para una misma especie, los valores reportados por Ayonoadu (1974) y Castagnaro et al. (1990) son aproximadamente el doble de los generados por los otros autores para las mismas especies; la diferencia puede ser ocasionada porque la especie *Allium cepa* L. fue utilizada como referencia con 2C= 33.55 pg, mientras que Nagl y Treviranus (1995) incluyeron a *Petunia hybrida* cv. PxPc6 (INRA, Dijon) con 2C= 2.85 pg y Mercado-Ruaro y Kenton (Bennett y Leitch, 1995) recurrieron a a *Vigna radiata* (L.) Wilczek cuyo contenido 2C es de 1.05 pg. Gregory (2005) destaca la importancia de la especie tomada como referencia, indicando que debe ser una que tenga valores cercanos a las especies que se pretendan analizar. Greilhuber (2005) por su parte, señala varios elementos metodológicos que pueden provocar errores en la cuantificación, algunos de ellos es el tipo de fijador utilizado, contenido

celular, tiempo de fijación, etc., e igualmente la especie de referencia (Greilhuber, 1998). Otra causa en la discrepancia en los resultados obtenidos es la técnica empleada, Ayonoadu (1974); Castagnaro et al. (1990) y Mercado-Ruaro y Kenton utilizaron microcitofotometría, mientras que la citometría de flujo fue aplicada por Nagl y Treviranus (1995) en sus cuantificaciones.

Si se ignoran los datos de Ayonoadu (1974), suponiendo que sean incorrectos por la especie usada de referencia, y por ello los valores son más discrepantes del resto de las determinaciones, se observa entonces que la variación dentro del género es de 0.9 a 2.18 pg (2C) en *Phaseolus macvaughii* y *P. pluriflorus*, respectivamente, una diferencia de aproximadamente 2.25 veces.

También las conclusiones vertidas por Ayonoadu (1974) deben ser vistas con cautela, ya que están basadas en especies que actualmente pertenecen a distintos géneros y por lo tanto no pueden aplicarse en lo particular al género *Phaseolus*; los agrupamientos taxonómicos sugeridos por dichos autores, tomando como referencia las diferencias en el contenido nuclear ya no son válidos por combinar varios géneros dentro de su análisis.

En el Cuadro III.3., se observa que los registros más bajos se presentan en *Phaseolus microcarpus*, *P. micranthus* y *P. leptostachyus*, mientras que los valores intermedios se encuentran de manera general

en las formas cultivadas de *P. lunatus* y *P. vulgaris* y los valores más altos en *P. grayanus*, *P. neglectus*, *P. glabellus* y *P. pluriflorus*.

Nagl y Treviranus (1995) determinan que algunas poblaciones silvestres presentan un contenido mayor de ADN nuclear en comparación con las poblaciones cultivadas. Bennett y Bennett (1992) observan especies donde las formas cultivadas son las portadoras de un mayor contenido de ADN nuclear, en el caso particular de *Phaseolus*, no se aprecia un incremento en el contenido de ADN como respuesta a la domesticación.

Los valores obtenidos por Mercado-Ruaro y Kenton (en Bennett y Leitch, 1995) son menores a los de Nagl y Treviranus (1995); no obstante, hay coincidencia en que *Phaseolus micranthus*, *P. leptostachyus* y *P. microcarpus* son especies en las que se observan bajos valores en el tamaño del genoma, aunque *P. macvaughii* presenta el valor más pequeño ($2C= 0.9$ pg). Lo anterior es interesante desde el punto de vista de evolución del cariotipo y por lo tanto del tamaño del genoma; esta especie, junto con *P. micranthus* y *P. leptostachyus* presentan un número diploide de $2n= 20$, apoyando así la propuesta de Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (1998) de que la reducción del número cromosómico estuvo acompañada de pérdida de material genético a través de translocaciones, seguido de la eliminación de un par de cromosomas carentes de información genética importante después de las translocaciones. Aun cuando existen diferencias en los valores

obtenidos por Nagl y Treviranus (1995) y Mercado-Ruaro y Kenton (en Bennett y Leitch, 1995), en general ambos presentan la misma tendencia en estas especies analizadas.

Cuando se relaciona la información que existe sobre el contenido de ADN nuclear con los grupos (subclados) que resultan del análisis filogenético de especies silvestres y cultivadas de *Phaseolus* que realizaron Delgado-Salinas et al. (1999), *P. microcarpus* es el grupo que resulta basal respecto al resto de las especies del género y coincidentemente es una de las especies que muestran, tanto en los datos de Nagl y Treviranus (1995), como en los de Mercado-Ruaro y Kenton (en Bennett y Leitch, 1995) uno de los valores más bajos en su ADN nuclear (1-1.2 pg); lo anterior implicaría que la evolución del genoma en el género se inicia con un valor bajo y la tendencia entonces es hacia un incremento en el contenido nuclear. Un grupo que presenta valores bajos en el contenido de ADN nuclear (0.9-1.2 pg) es el denominado *P. leptostachyus* por Delgado-Salinas et al. (1999) o sección *Falcati* de acuerdo con Freytag y Debouck (2002) y que incluye a todas las especies con número cromosómico haploide de $2n= 20$ (Mercado-Ruaro y Delgado-Salinas (1998). El bajo contenido de ADN nuclear puede ser atribuido a la pérdida de un par cromosómico. El resto de los grupos incluyen especies que presentan bajos o altos valores en el contenido de ADN nuclear, estableciendo así que se trata de un carácter independiente de las relaciones interespecíficas dentro del género.

En el caso particular de la sección *Pedicellati*, se cuantificó el ADN nuclear a *Phaseolus esperanzae*, *P. grayanus* y *P. pedicellatus* en donde los valores oscilaron de 1.2 pg a 1.9 pg. El valor más alto corresponde a *P. grayanus* con 1.9 pg y fue determinado por Nagl y Treviranus (1995); lamentablemente, no se menciona el sitio de colecta del material y únicamente se sabe que proviene de México. Para esta misma especie, Mercado-Ruaro y Kenton encontraron 1.1 pg, valor más cercano a las otras dos especies de la sección *Pedicellati* (1.1-1.5pg). Independientemente del 1.9 pg de *P. grayanus*, los valores encontrados en especies de la sección *Pedicellati* son bajos y muy cercanos al valor mínimo de 0.9 pg registrado para *P. macvaughii*.

CONCLUSIONES

La sección *Pedicellati* (sensu Freytag y Debouck, 2002) presenta un número básico de $2n= 22$ y segregación cromosómica normal.

Los cariotipos presentan principalmente cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, considerándose simétricos.

No se observaron diferencias que permitan utilizar el cariotipo como un elemento en la delimitación de las especies.

Las tres especies de la sección *Pedicellati* a las que se les determinó el contenido de DNA nuclear se caracterizaron por presentar bajos valores (1.1 – 1.9 pg).

El contenido de ADN nuclear en el género *Phaseolus* es pequeño, oscilando de 0.9 picogramos en *Phaseolus macvaughii* a 3.7 en la forma silvestre de *P. vulgaris*.

No existe una evidencia clara de que haya un incremento en el contenido de ADN como resultado de la domesticación.

Las diferencias que se observan en el contenido de ADN nuclear en una misma especie pueden ser variaciones intraespecíficas, como ocurre con otras especies, aunque no se descarta la posibilidad de que las diferencias se deban a la técnica utilizada en su determinación.

Cuadro III.3. Contenido de ADN en especies silvestres y cultivadas en el género *Phaseolus*. Las marcadas en negritas señalan las especies analizadas por el autor. Se respetó la nomenclatura utilizada en la fuente original.

Taxón	2C ADN (pg)	Autor	2n
<i>P. acutifolius</i> var. <i>acutifolius</i> A. Gray	1.76	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. acutifolius</i> var. <i>latifolius</i> G. Freeman	1.62 1.5	Nagl y Treviranus (1995) Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. acutifolius</i> var. <i>tenuifolius</i> (Wooton & Standl.) A. Gray	1.63	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. angustissimus</i> A. Gray	1.32	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. augusti</i> Harms	1.1	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. coccineus</i> L.	1.6 1.3 1.98 3.5	Nagl y Treviranus (1995) Mercado-Ruaro y Kenton (1995)* Castagnaro et al. 1990 Ayonoadu (1974)	22
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i>	1.63	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i> cv. Hammond's Dwarf Scarlet	1.62	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i> cv. Desirée	1.63	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i> cv. Preisgewinner	1.65	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i> cv. Weißer Riese	1.65	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>purpurascens</i>	1.62	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. esperanzae</i> Seaton	1.2	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. filiformis</i> Benth.	1.41 1.1	Nagl y Treviranus (1995) Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. glabellus</i> Piper	2.09	Nagl y Treviranus (1995)	22

	1.8	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
<i>P. grayanus</i> Wooton & Standl.	1.9	Nagl y Treviranus (1995)	22
	1.1	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
<i>P. hintonii</i> A. Delgado	1.46	Nagl y Treviranus (1995)	22
	1.4	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
<i>P. jaliscanus</i> Piper	1.4	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. leptostachyus</i> Benth.	1.25	Nagl y Treviranus (1995)	20
	1.1	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
<i>P. lunatus</i> var. <i>lunatus</i> cvgr. Big Lima	1.43	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. lunatus</i> var. <i>lunatus</i> cvrg. Potato	1.4	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. lunatus</i> var. <i>lunatus</i> cvrg. Sieva	1.41	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. lunatus</i> var. <i>lunatus</i> cv. Early Thorogreen	1.41	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. lunatus</i> var. <i>lunatus</i> cv. Henderson Bush	1.43	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. lunatus</i> var. <i>lunatus</i> cv. Jackson Wonder	1.42	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. lunatus</i> var. <i>silvester</i> Baudet	1.42	Nagl y Treviranus (1995)	22
	1.4	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
	2.5	Ayonoadu (1974)	
<i>P. macrolepis</i> Piper	1.3	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. maculatus</i> Scheele	1.3	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. macvaughii</i> A. Delgado	0.9	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	20
<i>P. marechalii</i> A. Delgado	1.6	Nagl y Treviranus (1995)	22
	1.4	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
<i>P. micranthus</i> Hook. & Arn.	1.2	Nagl y Treviranus (1995)	20
		Mercado-Ruaro y Kenton	

	1.0	(1995)	
<i>P. microcarpus</i> Mart.	1.03	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. neglectus</i> Herman	1.92	Nagl y Treviranus (1995)	22
	1.4	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
<i>P. campanulatus</i> Piper	1.0	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. pachyrhizoides</i> Harms	1.3	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. parviflorus</i> G. Freytag	1.3	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. pauciflorus</i> Sessé & Mociño ex G. Don	1.4	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. pedicellatus</i> Benth.	1.5	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. pluriflorus</i> Maréchal et al.	2.18	Nagl y Treviranus (1995)	22
	1.9	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
<i>P. polyanthus</i> Greenm.	1.63	Nagl y Treviranus (1995)	22
	1.4	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
<i>P. sonorensis</i> Standl.	1.2	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22
<i>P. vulgaris</i> forma silvestre	1.43	Nagl y Treviranus (1995)	22
	1.3	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
	1.2		
	3.7	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
		Ayonoadu (1974)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Alubia Cerrillo	1.79	Castagnaro et al. (1990)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Exp. 113	1.69	Castagnaro et al. (1990)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Dor 41	1.63	Castagnaro et al. (1990)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Dor 157	1.56	Castagnaro et al. (1990)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Nuna	1.41	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Admiras	1.48	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Bertina	1.45	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Blauhilde	1.44	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Canadian Wonder (Kidney)	1.43	Nagl y Treviranus (1995)	

<i>P. vulgaris</i> cv. Contender	1.45	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Facta	1.44	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> c. Hild's Marona	1.43	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Hilda	1.45	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Kentucky Wonder	1.4	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Neckargold	1.46	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Neckarkönigin	1.44	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Sanilac	1.53	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Saxa	1.43	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> cv. Tendergreen	1.45	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> forma escapada	1.44	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. vulgaris</i> var. <i>aborigeneus</i> (Burk.) Baudet	1.47	Nagl y Treviranus (1995)	
	1.71	Castagnaro et al. (1990)	
<i>P. vulgaris</i> var. <i>mexicanus</i>	1.5	Nagl y Treviranus (1995)	
<i>P. xanthotrichus</i> Piper	1.73	Nagl y Treviranus (1995)	22
	1.2	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	
var. <i>xanthotrichus</i>	1.35	Nagl y Treviranus (1995)	22
<i>P. xolocotzii</i> A. Delgado	1.3	Mercado-Ruaro y Kenton (1995)*	22

*Datos obtenidos por Pedro Mercado-Ruaro y Ann Kenton en el Jodrell Laboratory de Kew en 1992, no publicados, pero comunicados a Bennett y Leitch (1995). Se utilizó un espectrofotómetro para la obtención de contenido del DNA nuclear.

Anexo III.1. Publicación en donde de forma condensada se muestran los distintos estudios citogenéticos que se han realizado en el género *Phaseolus*.

Genetics and Molecular Biology, 23, 4, 985-987 (2000)

Cytogenetic studies in *Phaseolus* L. (Fabaceae)

Pedro Mercado-Ruaro and Alfonso Delgado-Salinas

Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 70-233, Delegación Coyoacán, 04510 México, D.F., México. Send correspondence to P.M.-R.

Abstract

A review of the cytogenetic studies carried out on *Phaseolus* as well as the different proposals that have been suggested to explain the chromosomal changes in the group are presented. The importance of including wild species in cytogenetic studies and the collaboration between taxonomists and cytogeneticists in order to draw better conclusions are emphasized.

INTRODUCTION

The family *Fabaceae* (*Leguminosae*) contains the sub-family *Papilionoideae* of which the tribe *Phaseoleae* is one of the most important groups because it contains genera such as *Glycine* (soybean), *Phaseolus* (American beans) and *Vigna* (Asiatic beans), which are economically important due to their role in human nutrition and their use as cattle forage and ornamental (Lackey, 1981).

The genus *Phaseolus* is mainly found in the Mexican mountains (Sousa and Delgado, 1993), and contains approximately 50 species, with four (Delgado-Salinas, 1985) or five (Debouck, 1991) cultivated ones: *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. lunatus* and *P. polyanthus* (= *P. coccineus* subsp. *darwinianus*).

In his original description of *Phaseolus*, Linnaeus (1753) included eleven species, but with time the number grew to 200, distributed both in the Old and the New World. In 1970, Verdcourt redefined *Phaseolus*, considering it exclusively of New World origins, with approximately 50 species whose characteristics are similar to those of *P. vulgaris* (generitype). This redefinition was confirmed as valid and refined by a series of studies by other researchers (Maréchal *et al.*, 1978 and Lackey, 1981, 1983).

The last revision of the genus was made by Delgado-Salinas (1985), who recognized only 36 species in North and Central America. Despite the taxonomic studies carried out on the genus that have led to its clear delimitation, neither the number of taxa of which the genus is composed nor the genetic relationship between species has been well established (Debouck, 1991). Delgado-Salinas (1985) estimates that the genus contains 36 species, in North and Central America, some of them with subspecific divisions, while Debouck (1991) includes 52 species, without subspecific divisions.

Although the importance of cytogenetic studies have

been noted by several authors (Thomas, 1973; Green *et al.*, 1980; Almeda and Chuang, 1992), most studies have dealt with economically important species, ignoring the potential of wild species and relating only to cultivated species such as *Phaseolus*.

CHROMOSOMAL STUDIES

The first reports on chromosome numbers in *Phaseolus* go back to 1925, when Karpetschenko obtained $2n = 22$ for *P. acutifolius* A. Gray, *P. coccineus* L., *P. lunatus* L. and *P. vulgaris* L. From then on, a large number of cytogenetic studies have focused mainly on the determination of chromosome numbers, establishing $x = 11$ as the basic number.

Prior to 1996, of the approximately 50 species recognized in the genus *Phaseolus*, only 9 species and 4 subspecies had been chromosomally counted. Mercado-Ruaro and Delgado Salinas (1996, 1998) increased the number of taxa analyzed to 31. Based on the published literature Lackey (1979), Goldblatt (1981) and Mercado-Ruaro and Delgado Salinas (1996, 1998) propose that, as in the tribe *Phaseoleae*, the basic chromosome number in the genus is $x = 11$, with a haploid number of $n = 10$ in three species (*P. leptostachyus* Benth., *P. micranthus* Hook. & Arn., and *P. macvaughii* A. Delgado, ined. (Mercado-Ruaro and Delgado-Salinas, 1998)). The number of species that have been analyzed is very low, and the analyses have been restricted mainly to cultivated species (Sarbhoy, 1977; Joseph and Bouwkamp, 1978; Sinha and Roy, 1979a; Zheng *et al.*, 1991). Mercado-Ruaro and Delgado-Salinas (1998) reported the karyotypic analysis of 10 wild species, that represent on average 20% of those comprising the genus. The lack of karyologic studies in the genus has been attributed to the reduced size of the chromosomes, which makes the analysis difficult (Hucl and Scoles, 1985; Zheng *et al.*, 1991). Nonetheless, the available information has shown that there is a predominance of metacentric and submetacentric chromosomes, which translates into very symmetrical karyotypes.

Some authors (Sarbhoy, 1977, 1980; Sinha and Roy, 1979a,b) have pointed out that the main factors involved in the karyotypic evolution of the genus are pericentric and paracentric inversions, translocations and the loss or gain of chromatin. They have also proposed that the karyotype

of *Phaseolus* has evolved towards an asymmetry, with a decrease in the total chromatin content. Mercado-Ruaro and Delgado-Salinas (1998), after encountering three aneuploid species with $2n = 20$, have pointed out that aneuploidy has also played a role in the evolution of the karyotype.

GENOMIC HYBRIDIZATION

Studies of *Phaseolus vulgaris* by Frediani *et al.* (1993) using *in situ* hybridization have shown the position of the genes that code for polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) and established that the coding sequences are located in the heterochromatic pericentromeric region of metacentric chromosome 10, while Schumann *et al.* (1990) and Nenno *et al.* (1993) have documented the position of the phaseolin gene. In *P. coccineus* Avanzi *et al.* (1972) have located the ribosomal cistrons in the nucleolar and satellite regions of chromosomal pairs I and V using tritium-labelled rRNA. These studies, all employing polytene chromosomes, show the potential of *in situ* hybridization for chromosome mapping.

The application of genomic *in situ* hybridization to taxonomy and the elucidation of genetic relationships are exemplified by the studies of Mercado-Ruaro on the *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus* complex, which investigated the possible hybrid origin of *P. coccineus* subsp. *darwinianus* Hernández X. & Miranda C. (= *P. polyanthus* Greenm.) as well as the genetic relationships between the species and subspecies that make up the complex. The results of this study have shown the high degree of genetic homology between the members of this group, and because of this it was not possible to establish whether or not *P. coccineus* subsp. *darwinianus* is the result of a cross between *P. coccineus* and *P. vulgaris*, although it was possible to establish that *P. glabellus* is a taxon only distantly related to other members of the complex.

STUDIES OF NUCLEAR DNA CONTENT

There is much variation in the reported DNA content of the *Phaseolus* species studied by different authors. The DNA content of cultivated *P. vulgaris* has been reported as being 1.56, 1.63, 1.69, 1.79 pg by Castagnaro *et al.* (1990), 2.7 pg by Bennett (1982) and 3.7 pg by Ayonoadu (1974), while that of the wild-type *P. vulgaris* var. *aborigineus* has been reported to be 1.71 pg by Castagnaro *et al.* (1990). These differences may be attributable to the source of the material, the type of control used or to errors inherent in the technique. Other species studied for their DNA content include *P. coccineus*, containing 3.5 pg according to Ayonoadu (1974) and 1.98 pg according to Castagnaro *et al.* (1990); *P. lunatus* with 2.5 pg (Ayonoadu, 1974); *P. dumosus* with 3.8 pg, and *P. leucanthus* with 3.3 pg (Ayonoadu, 1974).

The latter two species are probably *P. coccineus* subsp. *darwinianus*, since both names have always been nomenclaturally associated with this subspecies.

As is the case in cytogenetic studies, there are reports of species referred as *Phaseolus* when they actually belong to other genera, for instance, *P. angularis* is really *Vigna angularis*, with a DNA content of 2.8 pg, while both species *P. geophilus* (2.6 pg) and *P. lathyroides* (2.3 pg) belong to genus *Macroptilium*.

Ayonoadu (1974) found a positive correlation between the nuclear DNA content and the nuclear volume, nucleolar and nuclear dry mass and total dry mass, i.e., high DNA content indicates high values for volume and dry mass parameters. Castagnaro *et al.* (1990), studying *P. coccineus* and several cultivars of *P. vulgaris*, along with *P. vulgaris* var. *aborigineus*, also found a positive correlation between seed weight and DNA content, with the exception of *P. vulgaris* var. *aborigineus*, which presented a negative correlation. Even so those authors conclude that varieties with a high DNA content are better adapted to cold or temperate regions, while those varieties with a lower DNA content are adapted to hot, dry environments.

We are now in the process of analyzing the DNA content of wild species of *Phaseolus* to determine if there is any relationship between DNA content and taxonomic relationships between the species and/or karyotype.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Fernando Chiang for reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Almeda, F. and Chuang, T.I. (1992). Chromosome numbers and their systematic significance in some Mexican Melastomataceae. *Syst. Bot.* 17: 583-593.
- Avanzi, S., Durante, M., Cionini, P.G. and D'Amato, F. (1972). Cytological localization of ribosomal cistrons in polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus*. *Chromosoma* 39: 191-203.
- Ayonoadu, U.W.U. (1974). Nuclear DNA variation in *Phaseolus*. *Chromosoma* 48: 41-49.
- Bennett, M.D., Smith, J.B. and Heslop-Harrison, J.S. (1982). Nuclear DNA amount in angiosperms. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 216: 179-199.
- Castagnaro, A.P., Poggio, L. and Naranjo, C.A. (1990). Nuclear DNA content variation in *Phaseolus* (Fabaceae). *Darwiniana* 30: 195-200.
- Debouck, D. (1991). Systematics and morphology. In: *Common Beans: Research for Crop Improvement* (van Schoonhoven, A. and Voysey O., eds.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK, pp. 55-118.
- Delgado, S.A. (1985). Systematics of the genus *Phaseolus* in Mexico and Central America. Ph.D. dissertation, University of Texas, Austin.
- Frediani, M., Cremonini, R., Salvi, G., Caprari, C., Desiderio, A., D'Oviedo, R., Cervone, F. and De Lorenzo, G. (1993). Cytological localization of the PGIP genes in the embryo suspensor cells of *Phaseolus vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* 87: 369-373.
- Goldblatt, P. (1981). Cytology and the phylogeny of Leguminosae. In: *Advances in Legume Systematics. Part 2* (Polhill, R.M. and Raven, P.H., eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 427-463.
- Green, D.M., Bogart, J.P. and Anthony, E.H. (1980). An interactive, micro-computer-based karyotype analysis system for phylogenetic cytotaxonomy. *Comput. Biol. Med.* 10: 219-227.
- Hucl, P. and Scoles, G.J. (1985). Interspecific hybridization in the common bean: a review. *HortScience* 20: 352-357.
- Joseph, L.S. and Bouwkamp, A.C. (1978). Karyomorphology of several species of *Phaseolus* and *Vigna*. *Cytologia* 43: 595-600.
- Lackey, J.A. (1979). A chromosome atlas of the Phaseoleae (Leguminosae-

- Papilionoideae). *Iselya* 1: 87-114.
- Lackey, J.A.** (1981). Tribe 10. Phaseoleae DC. (1825). In: *Advances in Legume Systematics. Part 1* (Polhill, R.M. and Raven, P.H., eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 301-327.
- Lackey, J.A.** (1983). A review of generic concept in American Phaseolinae (Fabaceae, Faboideae). *Iselya* 2: 21-64.
- Linnaeus, C.** (1753). *Species Plantarum*. 1st edn. Salvii, Stockholm.
- Maréchal, R., Mascherpa, J.M. and Stainier, F.** (1978). Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28: 1-273.
- Mercado-Ruaro, P. and Delgado-Salinas, A.** (1996). Karyological studies in several Mexican species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi (Phaseolinae, Fabaceae). In: *Advances in Legume Systematics. Part 8* (Pickersgill, B. and Lock, J.M., eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 83-87.
- Mercado-Ruaro, P. and Delgado-Salinas, A.** (1998). Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae-Phaseolinae). *Am. J. Bot.* 85: 1-9.
- Nenno, M., Schumann, K. and Nagl, W.** (1993). Mapping phaseolin genes to polytene chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Bean Improv. Coop.* 36: 3-4.
- Sarbhoy, R.K.** (1977). Cytogenetical studies in the genus *Phaseolus* Linn. III. Evolution in the genus *Phaseolus*. *Cytologia* 42: 401-413.
- Sarbhoy, R.K.** (1980). Karyological studies in the genus *Phaseolus* Linn. *Cytologia* 45: 363-373.
- Schumann, K., Baumann, A. and Nagl, W.** (1990). Localization of phaseolin genes in the polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* (Leguminosae). *Genetica* 83: 73-76.
- Sinha, S.S.N. and Roy, H.** (1979a). Cytological studies in the genus *Phaseolus*: Mitotic analysis of fourteen species. *Cytologia* 44: 191-199.
- Sinha, S.S.N. and Roy, H.** (1979b). Cytological studies in the genus *Phaseolus* II. Meiotic analysis of sixteen species. *Cytologia* 44: 201-209.
- Sousa, S.M. and Delgado, A.** (1993). Mexican leguminosae: Phytogeography, endemism, and origins. In: *Biological Diversity of Mexico* (Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A. and Fa, J., eds.). Oxford University Press, New York, pp. 459-511.
- Thomas, B.** (1973). Evolutionary implications of karyotypic variation in some insular *Peromyscus* from British Columbia, Canada. *Cytologia* 38: 485-495.
- Verdcourt, B.** (1970). Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the flora of tropical East Africa: IV. *Kew Bull.* 24: 507-569.
- Zheng, J., Nakata, J., Uchiyama, H., Morikawa, H. and Tanaka, R.** (1991). Giemsa C-banding patterns in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. *Cytologia* 56: 459-466.

CAPÍTULO IV

FILOGENIA MOLECULAR

ESPACIADORES INTERNOS TRANSCRITOS

Entre las diferentes herramientas moleculares empleadas en la sistemática filogenética están los llamados **ITS** (Internal Transcribed Spacers), que son secuencias de ADN localizadas entre los genes que codifican para el ARN ribosómico nuclear (**nrARN**) y que son de utilidad para examinar las relaciones entre especies estrechamente relacionadas (Hillis *et al.*, 1996). Los estudios de las secuencias de los nucleótidos de los ITS de las regiones 18S – 26S del ADN ribosómico nuclear (**nrADN**) han probado ser de utilidad en estudios taxonómicos (Baldwin *et al.*, 1995). Las regiones de los ITS están flanqueadas por secuencias conservadas, razón por la que pueden ser amplificadas por iniciadores (primers) universales, y posteriormente secuenciadas (Goel *et al.*, 2002). Comparados con los espaciadores intergénicos y las regiones de los espaciadores externos transcritos de ADN ribosómico nuclear, los ITS son relativamente conservados, aunque divergen más que las subunidades 26S, 5S y 18S del nrADN, lo que permite la elaboración de reconstrucciones filogenéticas (Baldwin *et al.*, 1995).

El principal reto al usar nucleótidos como caracteres en estudios filogenéticos, en niveles taxonómicos bajos, es la identificación de regiones

de ADN de fácil amplificación, con cambios relativamente rápidos, pero que se puedan alinear sin ambigüedad, y que proporcionen variación suficiente y adecuada dentro de un segmento de secuencia corta. Los ITS de la región 18S – 26S del nrADN cumplen con las características anteriormente mencionadas. Baldwin (1992) menciona cuatro características que deben poseer las regiones nucleares para su utilización en estudios filogenéticos: 1) evolutivamente conservadas, que se desarrollen principalmente por mutaciones puntuales, 2) que puedan ser interpretadas filogenéticamente, desarrollándose de un modo tal que permitan discernir los eventos de especiación, 3) que puedan ser fácilmente examinadas en el laboratorio y 4) sean lo suficientemente largas para ofrecer suficientes caracteres potencialmente útiles en la reconstrucción filogenética.

La organización de los ITS se muestra en la figura IV.1.

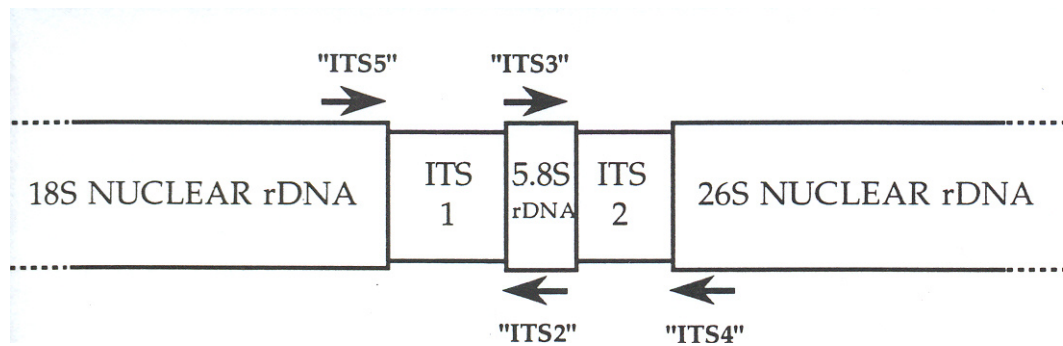


Figura IV.1. Organización de los ITS, tomada de Baldwin (1992).

Separando a los ITS se encuentra la subunidad 5.8, secuencia altamente conservada. La región de los ITS es parte de la unidad

transcripcional del nrADN, pero los espaciadores no son incorporados en los ribosomas maduros, por lo que la función de los ITS, al menos en parte, es intervenir en la maduración del ARN ribosómico nuclear (nrRNA). Las secuencias de los ITS han divergido más en el nivel de nucleótidos que las subunidades del nrADN. La longitud conservada y la alta variabilidad en la secuencia de nucleótidos en estos espaciadores permiten la alineación de taxones cercanamente relacionados, siendo lo suficientemente variables para permitir la solución de preguntas filogenéticas en niveles taxonómicos bajos (Baldwin et al., 1995).

La región de los ITS está sumamente repetida en el genoma nuclear de las plantas. Toda la región del nrADN está presente en varios miles de copias dispuestas una tras de otra, en una región cromosómica o en múltiples loci, lo anterior promueve la detección, amplificación, clonación y secuenciación del nrADN, además de que la familia de genes sufre lo que se conoce como una rápida evolución concertada, a través de entrecruzamiento desigual y conversión génica. La evolución concertada promueve la uniformidad del nrADN dentro de poblaciones con entrecruzamiento, minimizando así la importancia del muestreo intrapoblacional en estudios filogenéticos. El tamaño pequeño de la región de los ITS (menor a 700 bases en angiospermas) y la presencia de secuencias altamente conservadas a los lados de cada uno de los

espaciadores, la hacen una región fácil de amplificar a partir de material fresco o de ejemplares de herbario.

En estudios de filogenia molecular en plantas, en niveles taxonómicos altos y a nivel de familia, se ha utilizado ampliamente la secuenciación del ADN nuclear ribosómico 18-26S. El análisis con enzimas de restricción de las mismas secuencias se ha empleado en estudios de géneros o especies estrechamente relacionados. La estructura repetida una tras de otra (tandem) y el alto número de copias de estas secuencias, las hace fácilmente detectables, además de que se ha visto que este grupo de genes sufre una rápida evolución concertada dentro y entre los loci, lo que promueve su uso para reconstrucciones filogenéticas. Las variaciones en el nrADN 18-26S entre especies estrechamente relacionadas se han descubierto principalmente en las regiones de los espaciadores intergénicos (IGS) y los espaciadores internos transcritos (ITS). La principal desventaja que presentan los IGS en estudios filogenéticos en el análisis de secuencias con enzimas de restricción es que gran parte del espaciador intergénico muestra una estructura parcialmente repetida, haciéndola susceptible de mutaciones en longitud, variando extensamente entre especies, a nivel de población y a nivel de individuo. Por otro lado, los ITS son regiones que han mostrado ser evolutivamente conservadas en longitud, aunque en plantas

son demasiado pequeños, por lo que son pocos los sitios de restricción que se encuentran en ellos.

No obstante que se han realizado estudios moleculares de diversa índole en el género *Phaseolus* (Blair et al., 2003; Caicedo et al., 1999; Delgado-Salinas et al., 1993, 1999; Fofana et al., 1997, 1999; Fukuda et al., 2005; Gaitán et al. (2000); Goel et al., 2002, McClean et al., 2004; Pedrosa et al., 2003; Ramamonjisoa et al., 1998; Vallejos et al., 1992; Vekemans et al., 2002; Wojciechowski et al., 2004), la mayoría de ellos han sido enfocados a las especies cultivadas. Únicamente Delgado-Salinas et al. (1999), Gaitán et al. (2000) y Goel et al. (2002) realizaron análisis filogenéticos utilizando los ITS, además de que incluyen en sus estudios especies silvestres y cultivadas. Delgado-Salinas et al. (1999) reportan en un análisis combinado con datos morfológicos y moleculares, la formación de nueve grupos; uno de ellos es el grupo *Pedicellatus*, que resultó pobremente sostenido por los análisis bootstrap y de sensibilidad, integrado por *P. pedicellatus*, *P. neglectus*, *P. grayanus*, *P. oaxacanus* y *P. glabellus*. *Phaseolus oaxacanus* se presenta como una especie separada del conjunto que integran el mencionado grupo. *Phaseolus microcarpus* resultó ser la especie basal de todo el género. La longitud del ITS1 en el grupo *Pedicellatus*, junto con *P. microcarpus*, es de las más cortas, encontrando que la secuencia ITS1 es más conservada en longitud con una variación en

las especies estudiadas de 221 a 242 bases. Al igual que Delgado-Salinas et al. (1999), Goel et al. (2002) en su análisis filogenético muestran que las especies de *Phaseolus* se separan claramente del género *Vigna*.

Aun cuando Broughton et al. (2003) señalan que existe una limitada investigación molecular en *Phaseolus*, consideran que las familias de genes en este grupo taxonómico tienden a ser pequeñas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material biológico utilizado en la secuenciación y posterior análisis filogenético del ITS1 e ITS2, se presenta en el Cuadro IV. 1, las secuencias marcadas con asterisco fueron obtenidas del GenBank. Las especies externas a la sección *Pedicellati* fueron seleccionadas después de revisar la publicación de Delgado-Salinas et al. (1999), con el fin de incluir especies cercanas y lejanas filogenéticamente de la sección *Pedicellati* que aparecen en dicho estudio y observar su comportamiento en el presente análisis.

SECUENCIACIÓN DE LOS ITS 1 Y 2 Y DEL FRAGMENTO 5.8S

La secuenciación de ADN implica varios pasos: a) Extracción y purificación de ADN; b) Confirmación de la extracción; c) PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y d) Secuenciación.

Extracción de ADN

Se eligió la técnica descrita por Wilkie (1997), llamada Microaislamiento de ADN por el Método del CTAB, que consiste en lo siguiente:

- Machacar en un mortero aproximadamente 1-2 cm de hoja joven en 400 μ l de -CTAB frío.
- Agregar 500 μ l de amortiguador (buffer) +CTAB precalentado a 65°C (antes de calentarse, se añaden 100 μ l de mercaptoetanol por cada 5 ml de CTAB).
- Mezclar e incubar a 65°C por 90 min con inversiones ocasionales.
- Enfriar a temperatura ambiente.
- Agregar 450 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico. Mezclar invirtiendo el tubo, sin agitar.
- Centrifugar por 2 min a 13000 rpm. Remover la fase acuosa a un tubo Eppendorf limpio.
- Agregar 7 μ l de RNAsa (200 unidades).
- Incubar a temperatura ambiente por 30 min.
- Agregar 600 μ l de 2-propanol y mezclar invirtiendo el tubo.
- Centrifugar por 10 min. Eliminar el sobrenadante.
- Agregar 800 μ l de acetato de sodio frío 0.2M en alcohol al 70%. Dejar reposar por 5 min.
- Centrifugar por 2 min a 13000 rpm. Eliminar el sobrenadante.

- Agregar 100 μ l de alcohol al 70% frío y dejar reposar por 5 min.
- Centrifugar por 2 min, eliminar el sobrenadante.
- Desechar el resto del alcohol en un concentrador Eppendorf al vacío por 5 min.
- Resuspender en 50 μ l de agua bidestilada y guardar a -20°C .

Confirmación de la extracción

Para comprobar la extracción del ADN se corre un gel de electroforesis de agar al 3%, en donde las muestras que se colocan en las pozas del gel contienen:

5 μ l de agua bidestilada, 1 μ l de colorante "blue juice" y 3 μ l de la muestra del ADN obtenida de la extracción.

Como parte comparativa se colocan en la primera o última poza 2 μ l de ADN ladder de 1 kb. La corriente de la fuente de poder debe ser de 100-110 miliamperes y se deja correr por espacio de 15 ó 20 min.

PCR

Los Primers (iniciadores) que se emplearon para amplificar los ITS fueron los utilizados por Delgado-Salinas et al. (1999), siendo el Primer frontal a la subunidad 18S 5'-GTC CAC TGA ACC TTA TCA TTT AGA GG-3' y el Primer opuesto a la subunidad 26S es 5'-GCC GTT ACT AAG GGA ATC CTT GTT AG-3' y fue solicitada su elaboración a Life Technologies.

Para la reacción en cadena de la polimerasa se prepara la siguiente mezcla:

A cada tubo Eppendorf de 0.5 ml marcado previamente por muestra de ADN purificado se le agrega 1 µl del Primer 1, 1 µl del Primer 2 (en ambos casos 10 picomolas por µl), dNTP 2.5 µl, amortiguador 2.5 µl, Mg Cl₂ 0.8 µl, 0.4 µl de Taq y 1 µl del ADN purificado (pueden ser 2 µl dependiendo de cómo se vea la intensidad de la banda cuando se realiza la electrofóresis para verificar la extracción), al final se agregan 16 µl de agua bidestilada para dar un volumen final de 25 µl. Después de haber colocado las cantidades señaladas, se mezcla con vortex y se centrifuga de 15-30 seg máxima revolución y se introducen en la PCR

El programa para las temperaturas en la PCR y llevar a cabo la amplificación de los ITS fue el descrito por Kaas y Wink (1997): desnaturalización inicial de 94⁰C por 2 min, después de ello, 30 ciclos de 30 seg a 94⁰C, 30 seg a 45⁰C y 60 seg a 72⁰C, después de los 30 ciclos, la temperatura se mantiene a 72⁰C por 4 minutos, para posteriormente de manera automática mantener a 4⁰C.

Una vez que se realizó la PCR, las muestras con el ADN amplificado se mantienen a -20⁰C.

Para verificar que efectivamente hubo amplificación de los segmentos deseados, se lleva a cabo otra electroforesis, para lo cual se toman 2 μ l de la muestra del ADN amplificado que se mezclan con 1 μ l de colorante marcador y se coloca en la poza del gel.

Purificación del ADN

El ADN resultante de la electroforesis anterior y que queda atrapado en el gel, es el que se purifica para ser utilizado en la PCR, para ello se lleva a cabo lo siguiente:

Se utilizan los productos químicos y columnas incluidos en un Kit de purificación llamado "quick PCR purification kit (250)".

Se corta el pedazo de gel que contiene el ADN (se hace en la lámpara de UV y rápidamente para cada muestra), se procura que tenga la menor cantidad de gel sin ADN.

Cada trozo de gel con el ADN se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml previamente marcado, se pesa un tubo Eppendorf vacío para después pesar cada tubo que contiene gel.

El tubo con gel que pesa más se toma como referencia para multiplicarlo por 3000 y la cantidad resultante es la cantidad de μ l de amortiguador QG que se agrega a cada tubo con gel.

Los tubos se colocan en baño maría previamente calentado a 50 grados y se dejan en incubación por espacio de 10 min.

Se le agrega a cada tubo el peso del gel más elevado multiplicado por 1000 de isopropanol y se mezcla con vortex, la mezcla se vacía en una columna de separación incluida en el kit.

Centrifugar 2 min a 13000 rpm y desechar el líquido.

Añadir 500 µl de amortiguador QG a la columna y centrifugar 1 min. Desechar el líquido.

Añadir 750 µl de amortiguador PE. Esperar 5 min y centrifugar 1 min. Desechar el líquido.

Centrifugar otro minuto y desechar el líquido.

Cambiar la columna a un tubo Eppendorf limpio rotulado de 1.5 ml. (no incluido en el kit) y añadir 30 µl de agua bidestilada al centro de la columna. Dejar reposar 1 min y centrifugar.

Guardar a -20 grados el líquido resultante y que contiene el ADN amplificado.

Para conocer que efectivamente se ha realizado la purificación y al mismo tiempo determinar el peso del segmento, se corre otro gel de electrofóresis, teniendo como referencia a un segmento de peso conocido.

Una vez que se ha realizado la purificación de los segmentos amplificados de ITS, se procede a una nueva reacción de PCR para llevar a cabo la secuenciación, aún cuando es prácticamente lo mismo ya escrito, la principal diferencia es que el ADN resultante es marcado con un fluorocromo, de tal suerte que las bases nitrogenadas puedan ser reconocidas por el secuenciador. Otro cambio importante es que en esta fase que fue efectuada en el Laboratorio de Molecular del Instituto de Biología, UNAM, se utiliza un Kit llamado Remix, el cual es vendido con todo lo necesario para realizar la amplificación, con la excepción de los Primers, y por supuesto, el ADN a ser amplificado. Para la PCR para secuenciación se agregaron las siguientes cantidades por muestra: 4 μ l de Remix, 5 μ l de ADN y 1 μ l de Primer. Se prepararon dos tubos por cada tipo de ADN ya que a diferencia de la otra PCR, en este caso únicamente se obtuvo una secuencia por muestra (una por cada primer utilizado). Una vez realizado lo anterior se mezcla con vortex, se centrifugan de 15 a 30 seg máxima velocidad y se colocan en la PCR con los siguientes cambios de temperatura: 5 min a 96⁰C como inicial, para después efectuar 25 ciclos de 10 seg a 96⁰C y 4 min a 60⁰C, para posteriormente mantenerse a 4⁰C.

Después de la PCR para secuenciación se procede a la purificación de los ITS obtenidos, lo cual es completamente distinto a lo que se llevó a cabo en la primera PCR. Para ejecutar lo anterior se emplean

microcolumnas de sefadex hidratado. Previo a su colocación en la columna, a cada secuencia de ITS se le agrega 10 µl de agua desionizada y doblemente estéril para dar un volumen total por muestra de 20 µl, los cuales se agregan en las columnas previamente introducidas en tubos Eppendorf de 1.5 ml, teniendo cuidado de que la gota sea colocada en el centro de la columna. Se centrifuga por 2 min a 3000 rpm, el líquido colectado se concentra con la utilización de un concentrador por espacio de 23 min. Se resuspende la muestra en 15 µl de un reactivo llamado “template suppression reagent”, se mezcla con vortex y se centrifuga 30 seg a 0.7 rcf. Se calienta a 95⁰C por espacio de 3 minutos y se mantienen en hielo por 10 min, se mezcla con vortex, se centrifuga 10-15 seg para y se introducen los tubos en el secuenciador, aparato que se encarga de determinar el orden en que se encuentran las bases nitrogenadas que constituyen los segmentos amplificados y aislados, los resultados se obtienen de forma impresa.

La determinación del inicio y fin de cada secuencia, así como el de cada ITS y del segmento 5.8S, se basó en las secuencias proporcionadas por Goel et al. (2002). No se consideraron las de Delgado-Salinas et al. (1999), porque contenían residuos de las secuencias adjuntas.

Para llevar a cabo la alineación de las distintas secuencias, se utilizó el programa Bioedit (Hall, 1999); para realizar lo anterior fue necesario la inclusión de espacios y de esta forma hacerlas coincidir. Los indel

(inserciones-delecciones) fueron codificados y tratados como caracteres separados de codificación simple, siguiendo a Simmons y Ochotorena (2000). Se determinó el porcentaje de bases que se presentó en cada una de las secuencias, también con la ayuda del programa Bioedit. Algunas de las secuencias, principalmente las empleadas como grupo externo, fueron las reportadas por Delgado et al. (1999) y tomadas del GenBank, que se alinearon con las obtenidas en el presente estudio.

En el análisis filogenético se recurrió al programa WinClada (versión 0.0.99.unam21 (Beta), K. Nixon) para generar la matriz en Nona (Goloboff, 1993); se ejecutó un análisis heurístico con 30 replicaciones, 100 árboles iniciales y 4000 árboles máximo retenidos con una estrategia de búsqueda múltiple TBR. Se realizó un análisis Bootstrap para determinar los niveles de apoyo de las ramas. El análisis se realizó con 1000 réplicas y 10 árboles salvados por réplica. *Phaseolus microcarpus* de la sección *Rugosi* se utilizó para enraizar el cladograma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias completas que se obtuvieron en el presente estudio junto con las que se tomaron del Genbank, son mostradas en el anexo IV.1.

El anexo incluye las especies de la sección *Pedicellati* y aquellas que fueron incluidas como externas.

En el Cuadro IV.2 se incluyen las principales características de las secuencias para cada una de las especies. La longitud total de los ITS varió de 609 a 646 bases. La menor longitud se observó en *Phaseolus grayanus* de San Luis Potosí, mientras que *P. polystachyus* y *P. salicifolius* fueron los portadores de las secuencias con mayor longitud, la diferencia entre ambas es de 37 bases nitrogenadas y es ocasionada por la presencia de inserciones y deleciones.

Las longitudes obtenidas están dentro del intervalo de los valores reportados previamente en angiospermas (Baldwin et al., 1995). El espaciador ITS1 fue en la mayoría de los taxones menor que el espaciador ITS2, aunque existen valores de empalme en ambas regiones. Las secuencias en *Phaseolus* fueron mayores (208 – 252 ITS1 y 221 – 237 ITS2) a las que se reportan para varias especies de *Vigna* (196 – 207 ITS1 y 210 – 215 ITS2), género cercano (Goel et al., 2002).

Si se excluye a las especies externas al grupo y únicamente se considera a las integrantes de la sección *Pedicellati*, entonces la variación en la secuencia completa fue de 609 a 641 bases en *Phaseolus grayanus* de San Luis Potosí y en *P. laxiflorus* de Veracruz, respectivamente. Con excepción de *P. laxiflorus* y *P. oaxacanus*, la mayor parte de las especies de

la sección *Pedicellati* se caracterizó por una longitud total de la secuencia que osciló de 609 a 614 bases nitrogenadas. *P. laxiflorus* presenta una longitud de 636 a 641, mientras que *P. oaxacanus* tiene una longitud de 631 y 632 bases, valores en ambas especies más cercanos a la longitud de las especies que fueron utilizadas como grupo externo y que se caracterizan por tener los valores más altos en la longitud total de las secuencias de los ITS (Tabla IV.2.). La diferencia que se observa en las distintas colectas de una misma especie, indica que existe variación intraespecífica.

En el segmento 5.8S la longitud fue constante en todas las especies con 168 bases, mientras que en los segmentos ITS1 e ITS2 se presentaron variaciones en las distintas especies.

En el ITS1 se aprecia una diferencia de 44 bases nitrogenadas; *Phaseolus esperanzae*, junto con las tres colectas de *P. grayanus* y las colectas de *P. pedicellatus* de Durango, Michoacán y Morelos presentaron el valor más pequeño con una longitud de 208 bases, mientras que la secuencia más grande en este segmento correspondió a las dos colectas de *P. lunatus* con 252 bases. La longitud del fragmento ITS1 en las especies de la sección *Pedicellati* osciló de 208 a 236 bases nitrogenadas, el valor más pequeño se presentó en *P. esperanzae*, *P. grayanus* y en las colectas de *P. pedicellatus* de Durango, Michoacán y Morelos, mientras que la longitud mayor se encontró en las cuatro colectas de *P. laxiflorus*.

En el caso de la región de la ITS2, el intervalo de variación entre las especies de la sección *Pedicellati* y de las externas fue de 221 a 237 bases nitrogenadas, la secuencia más pequeña correspondió a *P. lunatus* de Veracruz, mientras que el fragmento de 237 bases lo mostraron las colectas de *P. glabellus* y *P. laxiflorus* de Veracruz. Al considerar únicamente a la sección *Pedicellati*, la secuencia con menor longitud pertenece a *P. laxiflorus* de Honey, Pue. (231 bases), mientras que *P. laxiflorus* de Cumbres de Maltrata, Ver., junto con tres colectas de *P. pedicellatus* de Veracruz, Puebla e Hidalgo presentaron el ITS2 con mayor longitud (237 bases). Con base en los resultados anteriores, se aprecia que existe una mayor variación en la longitud del ITS1 que en el ITS2.

En el cuadro IV.2. también se muestra el porcentaje de las bases Guanina + Citosina (G + C) en cada una de las secuencias. La variación en el porcentaje de contenido de G + C fue de 56.65 a 59.03% indicando que las secuencias son ricas en G-C. *P. oaxacanus* (R.Torres 12380) aún cuando presentó un porcentaje de 51.90% en el contenido de G +C no fue considerada en el análisis de dicho porcentaje ya que la secuencia reportada por Delgado-Salinas et al. (1999), contiene un fragmento grande de la secuencia con indefinición de las bases (Anexo IV.1.).

Del análisis anterior destaca *Phaseolus oaxacanus* (*P. Mercado y F. Tapia 90*) por presentar un total de 24 substituciones a lo largo de toda la

secuencia, junto con dos inserciones de 3 y 22 bases en lo que corresponde a la región del ITS1. *P. laxiflorus* es quien porta la inserción más grande que va de 29 a 31 bases, dependiendo de la población, el mayor fragmento de inserción se ubica en la posición 93-123. La inserción de bases tan grande que poseen estas especies, se refleja en que son las que presentan una mayor longitud en la secuencia de sus ITS (Cuadro IV.2.).

Cuadro IV.1. Especies utilizadas en el análisis filogenético molecular con ITS 1 y 2. Las secuencias de las especies señaladas con asterisco, fueron obtenidas del Genbank y son las reportadas por Delgado-Salinas et al. (1999) con claves de entrada: AF115175, AF115244, AF115171, AF115209, AF115236, AF115242, AF115232, AF115240, AF115196 y AF115182.

Especie	Localidad	Datos de procedencia
1.- <i>P. microcarpus</i> *	Durango, México	A. Delgado 1025 (MEXU)
2.- <i>P. dasycarpus</i>	Hidalgo, México	P. Mercado et al. 131 (MEXU)
3.- <i>P. esperanzae</i>	Puebla, México	P. Mercado et al. 23 (MEXU)
4.- <i>P. glabellus</i> *	Puebla, México	F. Basurto 791 (MEXU)
5.- <i>P. glabellus</i>	Puebla, México	P. Mercado s/n (MEXU)
6.- <i>P. grayanus</i>	Aguascalientes, México	P. Mercado et al. 145 (MEXU)
7.- <i>P. grayanus</i>	San Luis Potosí, México	P. Mercado et al. 60 (MEXU)
8.- <i>P. grayanus</i>	San Luis Potosí, México	P. Mercado et al. 130 (MEXU)
9.- <i>P. laxiflorus</i>	Puebla, México	P. Mercado y A. Reyes 109 (MEXU)
10.- <i>P. laxiflorus</i>	Puebla, México	P. Mercado et al. 133 (MEXU)
11.- <i>P. laxiflorus</i>	Veracruz, México	P. Mercado y A. Reyes 102 (MEXU)
12.- <i>P. laxiflorus</i>	Hidalgo, México	P. Mercado et al. 132 (MEXU)
13.- <i>P. lunatus</i> *	Magdalena, Colombia	CIAT G-26309
14.- <i>P. lunatus</i> *	Veracruz, México	A. Delgado 901 (MEXU)
15.- <i>P. neglectus</i> *	Tamaulipas, México	F. G. Medrano 16937 (MEXU)
16.- <i>P. oaxacanus</i>	Oaxaca, México	P. Mercado y F. Tapia 90 (MEXU)
17.- <i>P. oaxacanus</i> *	Oaxaca, México	R. Torres 12384 (MEXU)
18.- <i>P. campanulatus</i> *	Jalisco, México	A. S. Magallanes 1961 (MEXU)
19.- <i>P. pedicellatus</i>	Nuevo León, México	M. Lavin 4810 (MEXU)
20.- <i>P. pedicellatus</i>	Veracruz, México	R. Hernández y C. Trigos 886 (MEXU)
21.- <i>P. pedicellatus</i>	Hidalgo, México	P. Mercado et al. 123 (MEXU)
22.- <i>P. pedicellatus</i>	Durango, México	R. Hernández 7903 (MEXU)
23.- <i>P. pedicellatus</i>	Michoacán, México	P. Mercado et al. 139 (MEXU)
24.- <i>P. pedicellatus</i>	Morelos, México	P. Mercado 138 (MEXU)
25.- <i>P. polymorphus</i>	Querétaro, México	P. Mercado y G. Flores 66 (MEXU)
26.- <i>P. polymorphus</i> *	Querétaro, México	S. Zamudio 3470 (MEXU)
27.- <i>P. polystachyus</i> *	Missouri, U.S.A.	B. Summers 4680 (MO)
28.- <i>P. purpusii</i>	San Luis Potosí, México	R. Torres 15438 (MEXU)
29.- <i>P. salicifolius</i> *	Sinaloa, México	A. C. Sanders 4419 (MEXU)

Cuadro IV.2. Longitud de las regiones ITS1, ITS2 y 5.8S, junto con el contenido porcentual de Guanina + Citosina (G+C) en especies de la sección *Pedicellati*, *Coccinei*, *Paniculati*, *Digitati* y *Rugosi*. Las cantidades en negritas indican los valores mínimos y máximos. Los asteriscos indican que la información se obtuvo del Genbank: AF115175, AF115171, AF115244, AF115209, AF115236, AF115242, AF115232, AF115240, AF115196 y AF115182.

Especie	Localidad	long secuencia	%G-C	long ITS1	Long ITS2	Long 5.8S
1.- <i>P. microcarpus</i> A. D. 1025 Dgo.*		645	58.14	235	242	168
2.- <i>P. dasycarpus</i> P. M. 131 Hgo.		613	57.42	211	234	168
3.- <i>P. esperanzae</i> P. M. 23 Pue.		610	57.38	208	234	168
4.- <i>P. glabellus</i> Basurto 791 Pue*.		642	59.03	237	237	168
5.- <i>P. glabellus</i> P. M. s/n Pue.		644	58.70	239	237	168
6.- <i>P. grayanus</i> P. M. 130 S.L.P.		610	56.89	208	234	168
7.- <i>P. grayanus</i> P. M. 60 S.L.P.		609	56.65	208	233	168
8.- <i>P. grayanus</i> P. M. 145 Ags.		610	57.21	208	234	168
9.- <i>P. laxiflorus</i> P. M. 102 Ver.		641	58.81	236	237	168
10.- <i>P. laxiflorus</i> P. M. 109 Pue.		636	58.49	236	232	168
11.- <i>P. laxiflorus</i> P. M. 132 Hgo.		639	58.53	236	235	168
12.- <i>P. laxiflorus</i> P. M. 133 Pue.		638	58.31	236	234	168
13.- <i>P. lunatus</i> A. Delgado 901 Ver.*		641	58.97	252	221	168
14.- <i>P. lunatus</i> CIAT G-26308 Colombia*		645	58.76	252	225	168
15.- <i>P. neglectus</i> F. Medrano 16937 Tamps.*		614	57.82	209	237	168
16.- <i>P. oaxacanus</i> P. M. 90 Oax.		631	58.32	229	234	168
17.- <i>P. oaxacanus</i> R. Torres 12380 Oax.*		632	51.90	230	234	168
18.- <i>P. campanulatus</i> Magallanes 1961 Jal.*		631	58.32	229	234	168
19.- <i>P. pedicellatus</i> Hdez-Trigos 886 Ver.		614	57.00	209	237	168
20.- <i>P. pedicellatus</i> Lavin 4810 Nvo. León		611	57.28	209	234	168
21.- <i>P. pedicellatus</i> P. M. 138 Mor.		611	57.45	208	235	168
22.- <i>P. pedicellatus</i> P. M. 139 Mich.		611	57.28	208	235	168
23.-23.- <i>P. pedicellatus</i> P. M. 123 Hgo.		614	56.84	209	237	168
24.- <i>P. pedicellatus</i> R. Hdez. 7903 Dgo.		610	57.54	208	234	168
25.- <i>P. polymorphus</i> Zamudio 34 70 Qro.*		612	57.03	209	235	168
26.- <i>P. polymorphus</i> P. M. 66 Qro		614	56.84	209	237	168
27.- <i>P. polystachyus</i> Summers 4680 EUA*		646	57.59	246	232	168
28.- <i>P. purpusii</i> R. Torres 15438 S.L.P.		611	57.12	209	234	168
29.- <i>P. salicifolius</i> Sanders 4419 Sin.*		646	57.59	246	232	168

Cuadro IV.3. Relación de sustituciones, inserciones y deleciones en las secuencias de los ITS en distintas especies del género *Phaseolus*; la posición de la base es considerando la alineación mostrada en el anexo IV.1.

SUBSTITUCIONES				
Especie	Posición de la base	Cambio	Posición de la base	Cambio
<i>P. pedicellatus</i> Trigos y Hernández 886 Veracruz	10	C → A	86	G → T
	46	A → G	157	C → T
	55	C → G	579	C → A
	77	C → G	582	T → C
<i>P. oaxacanus</i> R. Torres 13280; <i>P. Mercado</i> 90	14	C → A	491	G → C
	36	A → C	523	G → A
	70	T → G	532	T → C
	71	G → C	536	C → A
	72	T → G	554	G → A
	86	G → T	572	A → G
	164	T → A	582	T → C
	165	G → C	606	T → C
	223	T → C	635	C → A
	234	C → A	638	G → C
	386	T → C	647	C → G
	445	T → C		
<i>P. laxiflorus</i> P. M. 102	40	T → A	536	C → T
	86	G → T	563	C → T
	228	T → C	595	C → A
	426	C → T	604	T → C
<i>P. laxiflorus</i> P. M. 109	40	T → A	595	C → A
	86	G → T	604	T → C
	228	T → C	619	C → T
	536	C → T		
<i>P. laxiflorus</i> P. M. 132	40	T → A	563	T → C
	86	G → T	579	C → A
	228	T → C	595	C → A
	536	C → T	604	T → C
<i>P. laxiflorus</i> P. M. 133	40	T → A	595	C → A
	86	G → T	604	T → C
	228	T → C	619	C → T
	536	C → T		
<i>P. pedicellatus</i> P. M. 123 Hgo.	46	A → G	495	T → A
	55	C → G	579	C → A
	62	T → C	582	T → C
	86	G → T	617	C → A
	165	G → C		
<i>P. polymorphus</i> Zamudio 34 70 Qro.; <i>P. Mercado</i> 66 Qro.	46	A → G	165	G → C
	55	C → G	448	A → G
	71	G → T	579	C → A
	86	G → T	582	T → C
<i>P. polymorphus</i> P. Mercado 66 Qro.	234	C → T	617	C → T
<i>P. purpusii</i> R. Torres 15438 S. L. P.	46	A → G	448	A → G
	55	C → G	579	C → A
	71	G → T	582	T → C
	86	G → T	591	G → T
	165	G → C		
<i>P. dasycarpus</i> P. Mercado 131	400	C → G		

Hgo.				
<i>P. grayanus</i> P. Mercado 130 S. L. P.	48 430	C → T C → T	582	T → C
<i>P. grayanus</i> P. Mercado 60 S. L. P.	48 274	C → T C → T	430 582	C → T T → C
<i>P. grayanus</i> P. Mercado 145 Ags.	164 579	T → A C → A	582	T → C
<i>P. pedicellatus</i> M. Lavin 4810 Nvo. León	55 608	C → G G → C	634	C → T
<i>P. pedicellatus</i> R. Hernández 7903 Dgo.	164 316	G → C T → G	474	A → G
<i>P. pedicellatus</i> P. Mercado 139 Mich.	223	T → A	526	G → A
<i>P. polymorphus</i> Zamudio 34 70 Qro.; <i>P. Mercado</i> 66 Qro.	123	G	245-247	TAT
INSERCIONES				
<i>P. purpusii</i> R. Torres 15438 S. L. P.	123	G	245-247	TAT
<i>P. dasycarpus</i> P. Mercado 131 Hgo.	114-116	CGA		
<i>P. pedicellatus</i> M. Lavin 4810 Nvo. León	123	G		
<i>P. pedicellatus</i> P. Mercado 138 Mor.	428	C		
<i>P. pedicellatus</i> P. Mercado 139 Mich.	428	C		
<i>P. pedicellatus</i> Trigos y Hernández 886 Veracruz.	123	C	245-247	TAT
<i>P. oaxacanus</i> R. Torres 13280; <i>P. Mercado</i> 90	67-69	CGT	92-123	31 Bases
<i>P. laxiflorus</i> P. M 102 Ver.	92-123	31 Bases	428	C
<i>P. laxiflorus</i> P. M 109 Ver.	92-123	31 Bases		
<i>P. laxiflorus</i> P. M 132 Hgo.	92-123	31 Bases	428	G
<i>P. laxiflorus</i> P. M 133 Pue.	92-123	31 Bases		
DELECCIONES				
<i>P. polymorphus</i> Zamudio 34 70 Qro	545	C	598	C
<i>P. purpusii</i> R. Torres 15438 S. L. P.	510-512	GAA		
<i>P. grayanus</i> P. Mercado 60 S. L. P.	625	C		
<i>P. oaxacanus</i> R. Torres 13280; <i>P. Mercado</i> 90	78-80	GTC		
<i>P. laxiflorus</i> P. M 102 Ver.	147	A		
<i>P. laxiflorus</i> P. M 109 Ver.	147	A	645-646	AT
<i>P. laxiflorus</i> P. M 132 Hgo.	147	A		
<i>P. laxiflorus</i> P. M 133 Pue.	147	A		

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Cuando las secuencias fueron vaciadas en una matriz de datos y analizadas con el programa WinClada, el número de caracteres originales (bases) que consistió de 609 – 646, se redujo a 105 caracteres informativos, el resto fueron no informativos.

Al codificar los espacios (“gaps”) obtenidos por la alineación de las distintas secuencias, se generó una matriz que consistió de 66 caracteres, 28 de ellos resultaron no informativos al analizarlos con WinClada, por lo que únicamente se consideraron los 38 restantes que fueron informativos para el análisis. Se fusionaron las dos matrices, generando una nueva que consta de 143 caracteres informativos.

El análisis heurístico de la nueva matriz generó 6 árboles más parsimoniosos (menor número de pasos), cada uno de los árboles consistió de 315 pasos, con un índice de consistencia (CI)= 74 y un índice de retención (RI)= 85. Los árboles generados son los que se muestran en la figura IV.2. a-f . El número que aparece en paréntesis delante del nombre de la especie, corresponde al del Cuadro IV.2. y fue colocado para conocer la procedencia de cada uno de los taxones en el cladograma.

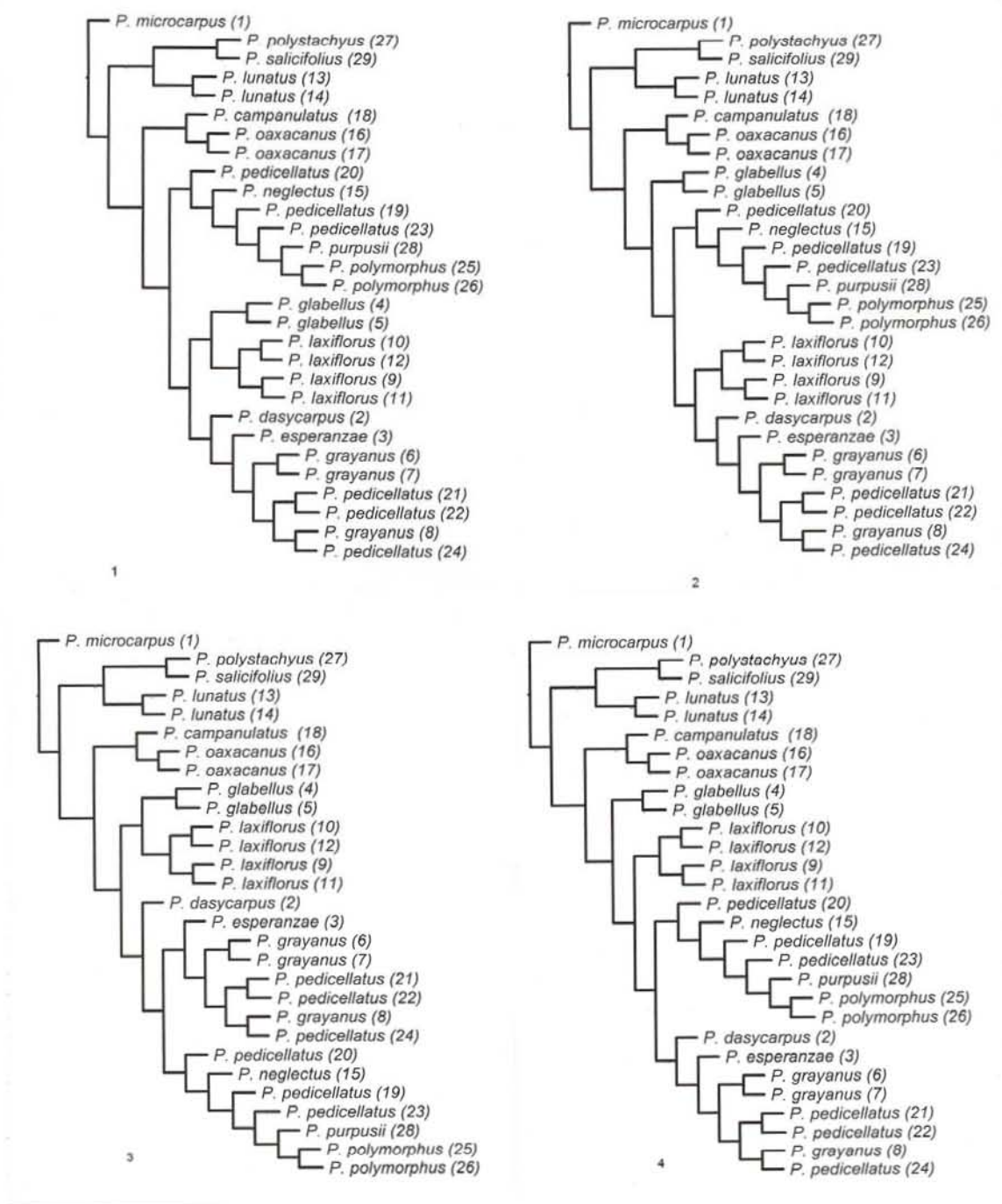


Figura IV.2. 1-6 árboles más parsimoniosos generados de un análisis heurístico, L=315, Ci=74 y Ri=85; 7 árbol de consenso estricto, L=318, Ci=73 y Ri= 84.

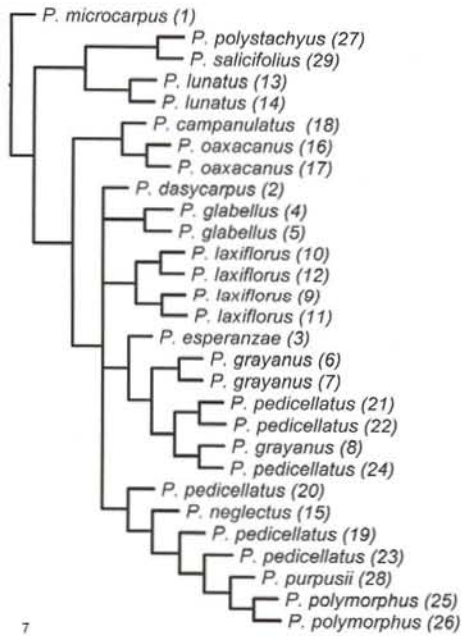
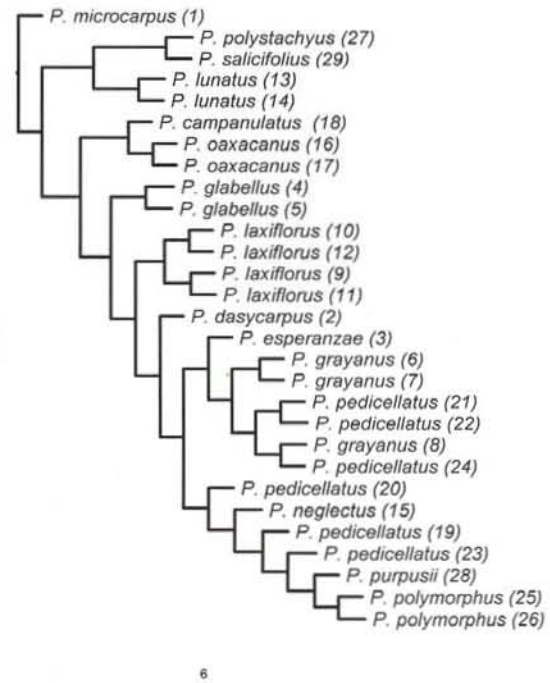
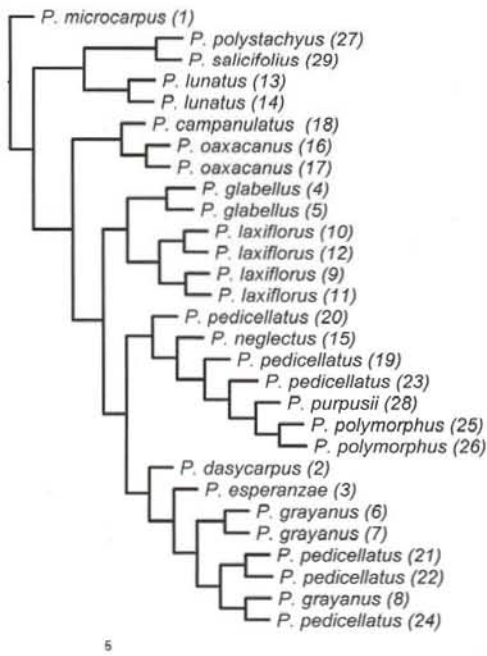


Figura IV.2. Continuación.

Del análisis de los árboles puede apreciarse que *Phaseolus oaxacanus* siempre se mantiene como un taxón fuera del clado que incluye a las especies que integran a la sección *Pedicellati*; es conveniente recordar que del análisis de las secuencias, *P. oaxacanus* presentó un mayor número de substituciones, además de ser junto con *P. laxiflorus*, la especie con las inserciones más grandes en el ITS1 (22 bases).

Phaseolus dasycarpus, *P. glabellus* y *P. neglectus*, especies que Freytag y Debouck (2002) no incluyen en la sección *Pedicellati*, claramente quedan incluidas en la misma. Resultados similares para *P. glabellus*, *P. neglectus* y *P. oaxacanus* fueron obtenidos por Delgado-Salinas et al. (1999) y Gaitán et al. (2000).

Cuando se realizó el análisis de Bootstrap para conocer el soporte de cada uno de los clados, se generó otro cladograma (Fig. IV.3), en el que nuevamente se aprecia que la topología es muy similar a la presentada por los árboles de consenso y a los más parsimoniosos.

En el árbol con valores de Bootstrap se observa que el soporte para el clado que incluye a la mayoría de las especies de la sección *Pedicellati* es de 60, valor relativamente bajo, indicando que las relaciones que se muestran en el cladograma entre los distintos taxones incluidos en el estudio son débiles.

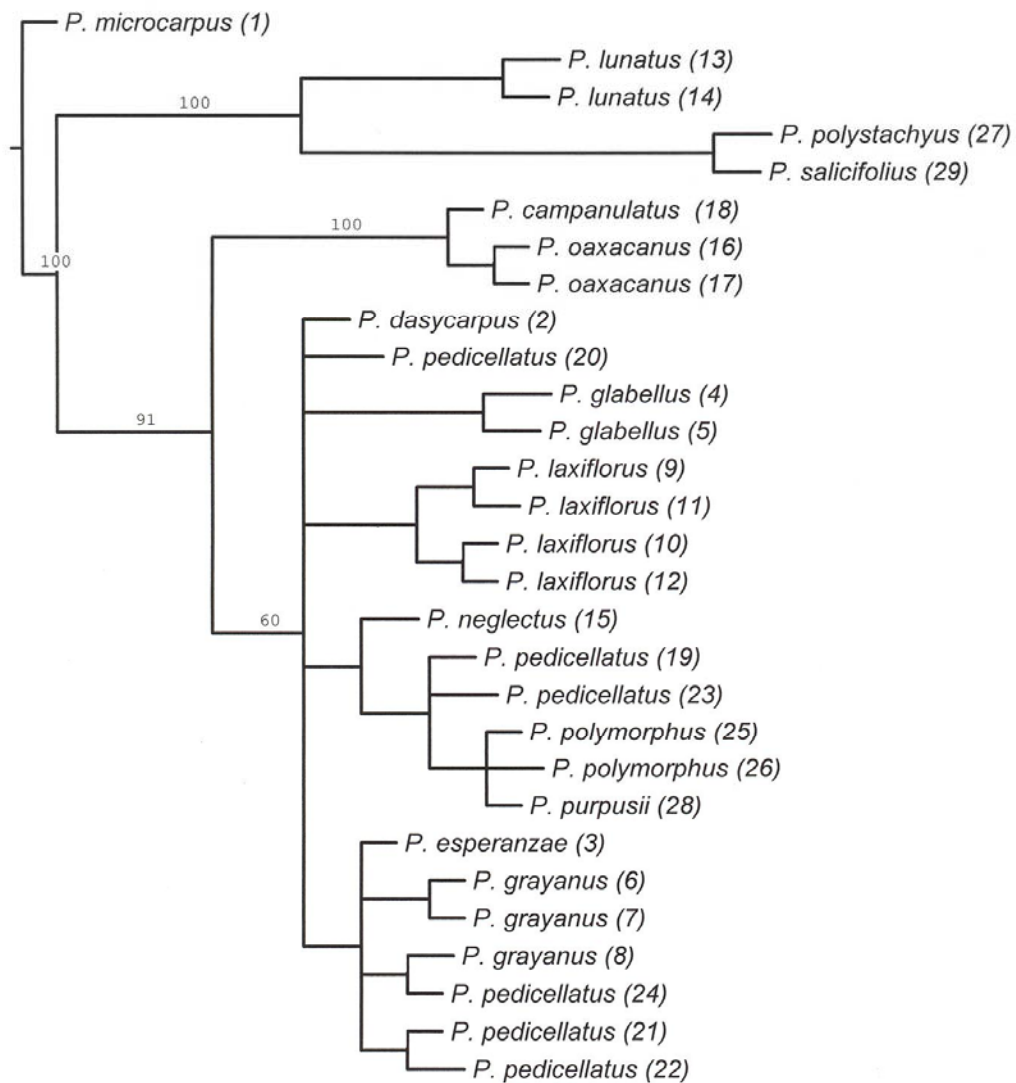


Figura IV.3. Análisis bootstrap mostrando el soporte de los distintos clados L= 321, Ci= 73 y Ri= 84. El número en paréntesis corresponde a la numeración dada en la tabla IV.1.

Las especies *Phaseolus microcarpus*, *P. campanulatus*, *P. polystachyus*, *P. lunatus* y *P. salicifolius*, se ubicaron claramente como era

de esperarse, por ser especies utilizadas como grupo externo, en un clado separado.

Con base en los resultados del presente estudio y los realizados por Delgado-Salinas et al. (1999), se confirma que *Phaseolus oaxacanus* debe ser excluida de la sección *Pedicellati*; en el análisis aquí efectuado se ubica más cercana a *P. campanulatus* de la sección *Brevilegumeni*. Sin embargo, es necesario incrementar el número de especies y de colectas de cada sección para determinar si se mantiene la cercanía que se observa en esta investigación, o se agrupa con especies de otra sección.

Phaseolus dasycarpus queda incluido con las especies de la sección *Pedicellati*, ya que los estudios morfológicos y moleculares apoyan fuertemente la reubicación de dicho taxón; más detalles y argumentos sobre su exclusión de la sección *Paniculati* y reubicación, se encuentran en el manuscrito “Taxonomic re-assessment of *Phaseolus dasycarpus* (Leguminosae): Systematic position, chromosome studies and re-description” generado con los resultados obtenidos en el presente estudio y se presenta en un capítulo aparte.

Phaseolus laxiflorus, a diferencia de lo observado en el capítulo del análisis morfológico, forma un subclado muy definido, indicando que puede ser considerado como un taxón válido.

Phaseolus polymorphus y *P. purpusii* en todos los árboles se agrupan en un subclado, sugiriendo que ambos corresponden a la misma entidad taxonómica; la agrupación que presentan en el cladograma apoya lo que ya se mencionó en la parte morfológica, con relación a que las características de lobulación de los folíolos que se observan en *P. purpusii* y que sirvieron para su diferenciación específica, en realidad son una respuesta a las condiciones edáficas en que se encuentra dicha población y que este tipo de lobulación es el resultado de la interacción de la información genética y el medio ambiente. *Phaseolus purpusii* ya había sido reconocida como sinónimo de *P. polymorphus* por Piper (1926) y los resultados aquí obtenidos lo apoyan.

Phaseolus esperanzae, *P. grayanus* y *P. pedicellatus*, especies que morfológicamente es posible distinguir en algunos casos con cierta dificultad, en el cladograma se mezclan unas con otras no permitiendo una separación clara entre ellas, indicando que los cambios de inserción, selección o sustitución en los ITS no han sido suficientes como para generar diferencias que permitan una individualización específica dentro de este grupo de especies. Por lo anterior, se sugiere realizar otros estudios moleculares con otros marcadores para poder asegurar que molecularmente no pueden ser distinguidas.

En concordancia con Delgado-Salinas et al. (1999), se encontró que *P. glabellus* (cercana a la sección *Coccinei*) y *P. neglectus* (sección *Digitati*), se agruparon en el clado correspondiente a la sección *Pedicellati*. En lo que corresponde a *P. glabellus*, Freytag y Debouck (2002) proporcionan una serie de argumentos basados en estudios de análisis de proteínas (Pueyo y Delgado-Salinas, 1997; Schmit y Debouck, 1990; Schmit et al., 1992, 1996), ADN de cloroplastos (Gepts, 1996; Llaca et al., 1994; Schmit et al., 1993), secuenciación de ITS (Delgado-Salinas et al., 1999), que apoyan su cercanía con la sección *Pedicellati*, no obstante dichos autores consideran que por algunas similitudes, como son el color rojo de la flor, forma del estigma y otras partes florales, *P. glabellus* debe mantenerse cercana a la sección *Coccinei*. Los resultados obtenidos por Delgado et al. (1999), Gaitán et al. (2000) y los del presente estudio la colocan dentro de la sección *Pedicellati*, independientemente del color de la flor o las otras características mencionadas.

Phaseolus neglectus se encuentra relacionado con *P. polymorphus*, *P. purpusii* y *P. pedicellatus* de Hidalgo (*P. Mercado 123*) y Veracruz (*Hernández-Trigos 886*); la razón de dicha relación es que comparten al menos 5 substituciones y dos inserciones.

CONCLUSIONES

El análisis filogenético con secuencias de ITS muestra que *Phaseolus dasycarpus*, *P. pedicellatus*, *P. glabellus*, *P. laxiflorus*, *P. neglectus*, *P. polymorphus*, *P. esperanzae* y *P. grayanus* se agrupan en un clado, nominado aquí sección *Pedicellati*.

Se confirma que *Phaseolus oaxacanus* queda excluida del clado que agrupa a las especies de la sección *Pedicellati*.

Se puede considerar a *Phaseolus purpusii* como co-específico de *P. polymorphus*, como fue sugerido por Piper en 1926.

La sección *Pedicellati* (sensu Freytag y Debouck) no es monofilética. Con los resultados morfológicos, citogenéticos y filogenéticos obtenidos en el presente estudio, las especies que se reconocen en la sección *Pedicellati* son: *Phaseolus dasycarpus*, *P. esperanzae*, *P. grayanus*, *P. laxiflorus*, *P. pedicellatus* y *P. polymorphus*.

Phaseolus glabellus y *P. neglectus* requieren de estudios filogenéticos adicionales, en los que se incluyan mayor número de especies de varias secciones para confirmar si su inclusión en la sección *Pedicellati* se mantiene.

Finalmente; es necesario obtener material de *Phaseolus palmeri*, *P. scabrellus* y *P. teulensis*, para secuenciar sus ITS e incluirlas en el análisis filogenético.

Anexo IV.1. Secuencias de ITS 1, 5.8S y ITS 2, las especies resaltadas en negritas fueron de las obtenidas por Delgado-Salinas et al. (1999) y tomadas del GenBank. Se incluyen especies de la sección *Pedicellati*, así como especies consideradas externas a dicha sección.

	5	15	25	35	45	55
P. dasycar	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. esperan	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. glabell	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. glabell	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. grayanu	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	AATGCAC-AA
P. grayanu	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	AATGCAC-AA
P. grayanu	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. laxiflo	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCAACCACA-	AACGCAC-AA
P. laxiflo	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCAACCACA-	AACGCAC-AA
P. laxiflo	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCAACCACA-	AACGCAC-AA
P. lunatus	TCGATGCCTC	AACCAACCAG	TTCGACCCGC	GAATCCGT-A	TCAAACACAC	AACGCAC-AA
P. lunatus	TCGATGCCTC	AACCAACCAG	TTCGACCCGC	GAATCCGT-A	TCAAACACAC	AACGCAC-AA
P. microca	TCGATGCCTC	AACAAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAC	TCATCCACA-	AACGCACAAA
P. neglect	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACAG	A-CGCAC--A
P. oaxacan	TCGATGCCTC	AACAAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAC	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. oaxacan	TCGATGCCTC	AACAAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAC	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. campanu	TCGATGCCTC	AACAAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAC	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. pedicel	TCGATGCCTG	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	GACGCAC-AA
P. pedicel	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. pedicel	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. pedicel	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. pedicel	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	AACGCAC-AA
P. polymor	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	GACGCAC-AA
P. polymor	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	GACGCAC-AA
P. polysta	TCGATGCCTC	AACCAACCAG	TTCGACCCGC	GAATCCG---	T---AT-GA-	AATCCAC-AA
P. purpusi	TCGATGCCTC	AACCAG----	TTCGACCCGC	GAATCTGTAA	TCATCCACA-	GACGCAC-AA
P. salicif	TCGATGCCTC	AACCAACCAG	TTCGACCCGC	GAATCCG---	T---AT-GA-	AATCCAC-AA

	65	75	85	95	105	115
P. dasycar	C-----GG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GTGCGGG	C-----
P. esperan	C-----GG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GTGCGGG	C-----
P. glabell	C-----GG-	--GC--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	C--GGCCGGCC
P. glabell	C-----GG-	--GC--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	CGGGC--GGC-
P. grayanu	C-----GG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GTGCGGG	C-----
P. grayanu	C-----GG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GTGCGGG	C-----
P. grayanu	C-----GG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GTGCGGG	C-----
P. laxiflo	C-----GG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	CCGGCCGG--
P. laxiflo	C-----GG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	CCGGCCGG--
P. laxiflo	C-----GG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	CCGGCCGG--
P. lunatus	CGGCTGGGGC	TCGTCCCCTC	CCGTGT---G	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	CGGGCCGG--
P. lunatus	CGGCTGGGGC	TCGTCCCCTC	CCG---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	CGGGCCGG--
P. microca	-----GG-	--GT--CCTC	CTGCGT---G	CGTCGTCGAG	A-----GTA	CGGGCG--CTG
P. neglect	C-----GGG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	C-----
P. oaxacan	C-----GG-	--GT--CCTC	CCCC-TGCGT	CGTC---GAG	A--GGGCGGG	CGGGC--GGCC
P. oaxacan	C-----GG-	--GT--CCTC	CCCCGTGCGT	CGTC---GAG	A--GGGCGGG	CGGGC--GGCC
P. campanu	C-----GG-	--GT--CCTC	CCCC-TGCGT	CGTCG---AG	A--GGGCGGG	CGGGC--GGCC
P. pedicel	-----GGG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTGTCGAG	A--GGGCGGG	C-----
P. pedicel	-----GGG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GTGCGGG	C-----
P. pedicel	C-----GG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GTGCGGG	C-----
P. pedicel	C-----GG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GTGCGGG	C-----

P. pedicel	-----GGG-	--GT--CCCC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	C-----
P. pedicel	C-----GG-	--GT--CCTC	CCC---TGTG	CGTCGTCGAG	A--GTGCGGG	C-----
P. polymor	-----GGG-	--GT--CCTC	CCC---TTTG	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	C-----
P. polymor	-----GGG-	--GT--CCTC	CCC---TTTG	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	C-----
P. polysta	C-GC-GCGGC	CNGT--CCGA	CGTTGTGT-G	CCAAGTCGAG	AGAGGGCGGG	CAGGCG----
P. purpusi	-----GGG-	--GT--CCTC	CCC---TTTG	CGTCGTCGAG	A--GGGCGGG	C-----
P. salicif	C-GC-GCGGC	CCGT--CCGA	CGTTGTGT-G	CCAAGTCGAG	AGAGGGCGGG	CAGGCG----

.....
125	135	145	155	165	175	

P. dasycar	-----	--GCA-----	---GCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. esperan	-----	-----	---GCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. glabell	-C-GATGCCG	TGCGCATCCG	ACCGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. glabell	TCCGATGCCG	TGCGCATCCG	ACCGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. grayanu	-----	-----	---GCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. grayanu	-----	-----	---GCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. grayanu	-----	-----	---GCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. laxiflo	TC-GATGCCG	TGCGCATTGG	GCCGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. laxiflo	TC-GATGCCG	TGCGCATTGG	GCCGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. laxiflo	TC-GATGCCG	TGCGCATTGG	GCCGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. laxiflo	TC-GATGCCG	TGCGCATTGG	GCCGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. lunatus	TCCG-T----	-----	-----GCC	CC-GTGCATG	CGGTTCGCAAG	CCCGTGTCTC
P. lunatus	TCCG-T----	-----	-----GCC	CC-GTGCATG	CGGTTCGCAAG	CCCGTGTCTC
P. microca	TGCG-TCG--	-----	-----TCG	TGAGTACGGG	CGCTCGC--G	CCTGTGTCTC
P. neglect	-----	-----	---CGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. oaxacan	-C-GAT-----	---GCATTCG	GCCGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. oaxacan	-C-GAT-----	---GCATTCG	GCCGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. campanu	-C-GAT-----	---GCATTCG	GCCGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. pedicel	-----	-----	---CGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. pedicel	-----	-----	---CGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. pedicel	-----	-----	---GCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. pedicel	-----	-----	---GCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. pedicel	-----	-----	---CGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. pedicel	-----	-----	---GCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. polymor	-----	-----	---CGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. polymor	-----	-----	---CGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. polysta	TC-----CCG	-----AT---	-----GCC	CCCGTGCACC	CGGTTCGCACG	CCCGCGTCTC
P. purpusi	-----	-----	---CGCAAGCC	CGTGT-----	-----	-----CTC
P. salicif	TC-----	-----	---CCGAAGCC	CCCGTGCATC	CGGTTCGCACG	CCCGCGTCTC

.....
185	195	205	215	225	235	

P. dasycar	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. esperan	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. glabell	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. glabell	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	CTGCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. grayanu	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. grayanu	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. grayanu	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. laxiflo	CCGACAAA-C	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. laxiflo	CCGACAAA-C	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. laxiflo	CCGACAAA-C	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. laxiflo	CCGACAAA-C	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. lunatus	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTCATG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. lunatus	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTCATG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. microca	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTCACG	C-GCCAAGGA	ACACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. neglect	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. oaxacan	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTACACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. oaxacan	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTACACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. campanu	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTACACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. pedicel	CCGACAAAAC	ACTAACCCTG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG

P. pedicel	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. pedicel	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. pedicel	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. pedicel	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTCACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. pedicel	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTCGACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. polymor	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTCACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. polymor	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTCACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. polysta	CCGGCAAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTGATG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. purpusi	CCGACAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTCACG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG
P. salicif	CCGGCAAAAAC	ACTAACCCCG	GCGCTTCATG	C-GCCAAGGA	ATACGAAGCT	GTTAGGTGAG

....
245	255	265	275	285	295	

P. dasycar	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. esperan	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. glabell	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGCCG	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. glabell	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGCCG	TWACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. grayanu	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. grayanu	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. grayanu	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. laxiflo	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	CCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. laxiflo	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	CCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. laxiflo	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	CCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. laxiflo	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	CCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. lunatus	GCAGCCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGCCT	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. lunatus	GCAGCCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGCCT	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. microca	GCAACCGGGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACAAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. neglect	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTATTAT	GTA AAAATGAC
P. oaxacan	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGCGTCG	TCACGAAGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. oaxacan	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGCGTCG	TCACGAAGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. campanu	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGCGTCG	TCACGAAGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. pedicel	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTATTAT	GTA AAAATGAC
P. pedicel	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. pedicel	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. pedicel	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGAGTCG	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. pedicel	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	NCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTATTAT	GTA AAAATGAC
P. pedicel	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. polymor	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTATTAT	GTA AAAATGAC
P. polymor	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGATGAC	ATGTTATTAT	GTA AAAATGAC
P. polysta	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	ACGGGTGCCT	TCACGACAAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC
P. purpusi	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	GCGGGTGTCCG	TCACGACGAC	ATGTTATTAT	GTA AAAATGAC
P. salicif	GCAACCGAGG	GACGTGTCCC	ACGGGCGCCT	TCACGACAAC	ATGTTAT---	GTA AAAATGAC

....
305	315	325	335	345	355	

P. dasycar	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. esperan	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. glabell	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. glabell	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. grayanu	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. grayanu	TCTCGGCAAC	GGATATTTTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. grayanu	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. grayanu	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. laxiflo	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. laxiflo	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. laxiflo	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. laxiflo	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. lunatus	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. lunatus	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. microca	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. neglect	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTAGCGAAA	TGCGATACTT
P. oaxacan	TCTCGGCAAC	GGATATCTCG	GCTCTTGCAT	CGATGAAGAA	CGTARCGAAA	TGCGATACTT

P. microca	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCC-	-GCCCGCCAC
P. neglect	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. oaxacan	CATTAGGCCG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	YCACCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. oaxacan	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNCCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. campanu	CATTAGGCCG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	YCACCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. pedicel	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. pedicel	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. pedicel	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCCC	CGCCCCGCCAC
P. pedicel	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCCC	CGCCCCGCCAC
P. pedicel	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATNG	TCACCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. pedicel	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. polymor	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. polymor	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. polysta	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. purpusi	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCCC	-GCCCGCCAC
P. salicif	CATTAGGCTG	AGGGCACGCC	TGCCTGGGTG	TCACACATCG	TCACCCCCC-	TGCCCGCCAC

....
485	495	505	515	525	535	

P. dasycar	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. esperan	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. glabell	ACTTAGCT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. glabell	ACTTAGCT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. grayanu	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. grayanu	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. grayanu	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. laxiflo	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	GGTGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. laxiflo	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. laxiflo	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. lunatus	ACTTAACT-A	ATTAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGGTGGAA	GTTGACCTCC	CGCGAG--AC
P. lunatus	ACTTAACT-A	ATTAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGGTGGAA	GTTGACCTCC	CGCGAG--AC
P. microca	ACTTATC-CA	AATAAGGGTG	CGGCA--GGG	---GGTGA	GATGACCTCC	CACGAGCGAG
P. neglect	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. oaxacan	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCCAG
P. oaxacan	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCCAG
P. campanu	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCCAG
P. pedicel	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. pedicel	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. pedicel	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. pedicel	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. pedicel	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. pedicel	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. pedicel	ACTTAACT-A	AATAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	AATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. polymor	ACTTAACT-A	AGTAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. polymor	ACTTAACT-A	AGTAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. polysta	ACCTAACT-A	AATAGGTGTG	CAGCAGGGGG	--TGCA---A	GATGACCTCC	CGCGAG--AC
P. purpusi	ACTTAACT-A	AGTAAATGTG	CAGCAGGGGG	--TGA---AA	GATGACCTCC	CGCGAGCGAG
P. salicif	ACTTAACT-A	AATAGGTGTG	CAGCAGGGGG	--TGCA---A	GATGACCTCC	CGCGAG--AC

....
545	555	565	575	585	595	

P. dasycar	TTCTCTCGTG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. esperan	TTCTCTCGTG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. glabell	CTCTCTCGTG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTTCG	GGGCGGAGTC	CCTCACGATA	ACGGTGGATG
P. glabell	CTCTCTCGTG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTTCG	GGGCGGAGTC	CCTCACGATA	ACGGTGGATG
P. grayanu	TTCTCTCGTG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. grayanu	TTCTCTCGTG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. grayanu	TTCTCTCGTG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. grayanu	TTCTCTCGTG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. laxiflo	TTCTCTCGTG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTTCG	GGGCGGAGTC	CCTCACGATA	ACGGTGGATG
P. laxiflo	TTCTCTCGTG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTTCG	GGGCGGAGTC	CCTCACGATA	ACGGTGGATG
P. laxiflo	TTCTCTCGTG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTTCG	GGGCGGAGTC	CCTCACGATA	ACGGTGGATG

P. laxiflo	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGGCGGAGTC	CCTCACGATA	ACGGTGGATG
P. lunatus	CTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGACGGAGTC	TCCCGCGATA	TCGGTGGATG
P. lunatus	CTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGAAGGAGTC	TCCCGCGATA	TCGGTGGATG
P. microca	TCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. neglect	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCCGCGATA	ACGGTGGATG
P. oaxacan	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCA	GGGCGGAGCC	CCACACGATA	ACGGTGGATG
P. oaxacan	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCA	GGGCGGAGCC	CCACACGATA	ACGGTGGATG
P. campanu	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCA	GGGCGGAGCC	CCACACGATA	ACGGTGGATG
P. pedicel	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. pedicel	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. pedicel	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. pedicel	TACCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. pedicel	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. polymor	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	A-GGTGGATG
P. polymor	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AGCAAGTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. polysta	TTCTTCGTGG	TTGGTTGAAA	AACAAGTTCG	GGGCGGAGTC	TCCACGATA	ACGGTGGATG
P. purpusi	TTCCCTCGTGG	TTGGTT---A	AGCAAGTTCG	GGGCGGAGTC	CCCCACGATA	ACGGTGGATG
P. salicif	TTCCCTCGTGG	TTGGTTGAAA	AACAAGTTCG	GGGCGGAGTC	TCCACGATA	ACGGTGGATG

....
605	615	625	635	645	655

P. dasycar	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CCTGCGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. esperan	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CCTGCGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. glabell	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAGTCGTG	GCTGTGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. glabell	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAGTCGTG	CCTGTGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. grayanu	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CCTGTGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. grayanu	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CCTGTGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. grayanu	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CATGYGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. laxiflo	GGCCAACGCC	C--G----AG	ACCAATCGTG	CCTGCGCGAC	TCCG-ACAAA	ACGGACTCAT
P. laxiflo	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CCTGCGCGAC	TCCG-ACAAA	ACGGACTCAT
P. laxiflo	GGCCAACGCC	C--G----AG	ACCAATCGTG	CATGCGCGAC	TCCG-ACAAA	ACGGACTCAT
P. laxiflo	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CCTGCGCGAC	TCCG-ACAAA	ACGGACTCAT
P. lunatus	AGCCCACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	GCTGTGGGAC	TCCGGACGTA	ATGGACTTAC
P. lunatus	AGCCCACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	GCTGTGGGAC	TCCGGACGTA	ATGGACTTAC
P. microca	AGCCAACGCT	CGAGACCAAG	ACCAATCGTG	CCTGCGCGAC	TCC-GACGTA	ACGGACTTAC
P. neglect	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CCTGCGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. oaxacan	AGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAGTCGTG	CCTGTGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAC
P. oaxacan	AGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAGTCGTG	CCTGTGCGAC	TCCG-ACACA	ANGGACTTAC
P. campanu	AGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAGTCGTG	CCTGTGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAC
P. pedicel	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CATGTGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. pedicel	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CCTGCGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. pedicel	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CCTGCGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. pedicel	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CATGTGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. pedicel	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CCTGCGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. polymor	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CATGTGCGAC	TCCG-ACACA	A-GGACTTAT
P. polymor	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CATGTGCGAC	TCCG-ACACA	ACGGACTTAT
P. polysta	AGCCCACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CTTGTAAGAC	TCCG-ACGTG	ATGGACTTAT
P. purpusi	GGCCAACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CATGTGCGAC	TCCT-ACACA	ACGGACTTAT
P. salicif	AGCCCACGCT	C--G----AG	ACCAATCGTG	CTTGTAAGAC	TCCG-ACGTG	ATGGACTTAT

....
665	675	685	695	705

P. dasycar	CGACCCACACA	CGCGCCC-TC	T-GTAAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. esperan	CGACCCACACA	CGCGCCC-TC	T-GTAAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. glabell	CGACCCACACA	CGCGCCCCTC	T-GTAAAAAT	CGAGTGCGC	CCATCTAC
P. glabell	CGACCCACACA	CGCGCCCCTC	T-GTAAAAAT	CGAGTGCGC	CCATCTAC
P. grayanu	CGACCCACACA	CGCGCCC-TC	T-GTAAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. grayanu	CGACCCACACA	CGCGCCC-T-	T-GTAAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. grayanu	CGACCCACACA	CGCGCCC-TC	T-GTAAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC

P. laxiflo	CGACCCCACA	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGGGTGCGCC	--ATCTAC
P. laxiflo	CGACCCCACA	CGTGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	----CTAC
P. laxiflo	CGACCCCACA	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. laxiflo	CGACCCCACA	CGTGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. lunatus	TGACCCCACA	CGCGCCC-TC	-----	CG-CT-----	--ATCCAC
P. lunatus	TGACCCCACA	CGCGCCC-TC	T-GTG-----	-----CGC-	-TATCCAC
P. microca	CGACCCCACG	CGCGCCACTC	A-GTGAAAAC	TTAGTGCGTG	CCATCTAC
P. neglect	CGACCCCACA	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. oaxacan	CGACCCCACG	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	AGACTGCGCC	--ATGTAC
P. oaxacan	CGACCCCACG	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	AGACTGCGCC	--ATGTAC
P. campanu	CGACCCCACG	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	AGACTGCGCC	--ATGTAC
P. pedicel	CGACCCCACA	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. pedicel	CCACCCCACA	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAT	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. pedicel	CGACCCCACA	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. pedicel	CGACCCCACA	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. pedicel	CGACCCCACA	AGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. pedicel	CGACCCCACA	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. polymor	CGACCCCACA	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. polymor	CGACCCCACA	TGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. polysta	TGACCCCACG	TGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGTGC-	-TATCCAC
P. purpusi	CGACCCCACA	CGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGCGCC	--ATCTAC
P. salicif	TGACCCCACG	TGCGCCC-TC	T-GTGAAAAC	CGAGTGTGC-	-TATCCAC

CAPÍTULO V

REUBICACIÓN DE *Phaseolus dasycarpus*

En este capítulo se presenta el manuscrito en que se analiza la situación de *Phaseolus dasycarpus* y que fue enviado a la revista Brittonia para su publicación.

Taxonomic re-assessment of *Phaseolus dasycarpus* (Leguminosae): Systematic position, chromosome studies and re-description.

PEDRO MERCADO-RUARO, ALFONSO DELGADO-SALINAS AND FERNANDO CHIANG

Mercado-Ruaro, P.^{*}, A. Delgado-Salinas, and F. Chiang (Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM. Apartado Postal 70-233. C.P. 04510, México, D.F., México. ^{*}e-mail: mruaro@ibiologia.unam.mx). Taxonomic re-assessment of *Phaseolus dasycarpus* (Fabaceae): Systematic position, chromosome studies and re-description. Brittonia 00: 000–000. 200X. Based on new information of floral structures, seedling, fruit, seed, root, and leaflets, *Phaseolus dasycarpus* is re-described and illustrated. The species is transferred to sect. *Pedicellati*, based upon the results of phylogenetic analysis of ITS sequences. Its chromosome number was determined as $2n = 22$, with metacentric and submetacentric chromosomes, and karyotype formula of $9m + 2sm$. The limits of sect. *Pedicellati* are questioned.

Key words: Chromosomes, ITS, *Paniculati*, *Pedicellati*, *Phaseolus*.

Taxonomic re-assessment of *Phaseolus dasycarpus* (Fabaceae): Systematic position, chromosome studies and re-description. Con nueva información de estructuras florales, plántulas, frutos, semillas, raíz y folíolos, se redescubre e ilustra a *Phaseolus dasycarpus*. Además, se reubica a esta especie en la sección *Pedicellati*, con base en los resultados del análisis filogenético de secuencias de ITS. Se determina el número cromosómico $2n= 22$, con cromosomas metacéntricos y submetacéntricos y fórmula cariotípica = $9m + 2sm$. Se cuestionan los límites de la sección *Pedicellati*.

The genus *Phaseolus* L. (Fabaceae) comprises approximately 70 species that are distributed in tropical and temperate regions of the New World, from southeastern Canada to northern Argentina. More than 90% of the species occur in Mexico, from sea level to 3000 m. Five species were domesticated and at least one, *Phaseolus vulgaris* L., with hundreds of cultivars, is extensively grown for its edible pods and seeds. *Phaseolus* species are predominately perennials, and most are trailing or climbing herbaceous vines, with indument of small uncinata hairs, and flowers with a distally coiled keel. The taxonomic history of *Phaseolus* reflects recurring taxonomic confusion mainly with the genus *Vigna* Savi (Delgado-Salinas, 1985).

For *Phaseolus* of North and Central America, Delgado-Salinas (1985) enumerated 36 species in four sections; in contrast, Freytag and Debouck (2002) recognized 75 species arranged in 15 sections. Section *Pedicellati* Freytag & Debouck, comprises 11 species: *P. pedicellatus* Benth., *P. laxiflorus* Piper, *P. purpusii* Brandegees, *P. esperanzae* Seaton, *P. oaxacanus* Rose, *P. grayanus* Wootton & Standl., *P. palmeri* Piper, *P. polymorphus* S. Watson, *P.*

scabrellus Benth. ex Watson, *P. teulensis* Freytag, and *P. pyramidalis* Freytag. Except for the last two, which were new species described by Freytag, the rest had been considered by Delgado-Salinas (1985) as conspecific with or varieties of *P. pedicellatus*.

Phaseolus dasycarpus Freytag & Debouck (2002) was placed in section *Paniculati* Freytag subsect. *Volubili* Freytag. The material upon which the authors based their description consists of a single collection, *Hernández & Trigos 872* (holotype and one isotype); therefore, their information was necessarily limited. In the present study, live specimens were collected in the field and grown in the greenhouse until they bloomed and set fruits. Flowers and fruits were dissected for study, and seeds were germinated to obtain root-tips for chromosome studies and to observe the seedlings. Chromosome counts were also obtained from pollen mother cells. We present herein a re-description with new information such as root and seedling type, characters of the standard petal and pollen grains, variation in leaflet form and texture, and chromosome number. In addition, we reconstruct the phylogeny of this species using nrDNA sequences.

Materials and Methods

MORPHOLOGY AND CHROMOSOME STUDIES.

Description was based on herbarium specimens from the National Herbarium in Mexico City (MEXU) and the Instituto de Ecología, A.C. Herbarium in Xalapa (XAL), and on living material. *Phaseolus dasycarpus* was collected in the state of Hidalgo, México in the winter of 2001. Seeds were germinated for morphological and chromosomal studies. Seedlings were grown in greenhouse conditions until they bloomed and set fruit. Observations and measurements

were made on living and herbarium materials. For observations of external pollen features, non-acetolized pollen grains were mounted on stubs, sputter coated with gold in an EMITECH K 550, and studied under a Hitachi S-2460N at 15 KV, scanning electron microscope (SEM). Pollen terminology follows Delgado-Salinas (1985). Mitotic chromosomes were studied in meristematic cells of root tips obtained from germinated seeds on Petri dishes with moist filter paper and cotton at 30°C and following the method described in Mercado-Ruaro and Delgado-Salinas (1988), while meiotic chromosomes were studied in pollen mother cells from immature anthers according to Tapia-Pastrana and Mercado-Ruaro's (2001) method.

PHYLOGENETIC ANALYSIS.

Due to morphological similarity of *Phaseolus dasycarpus* of section *Paniculati* to members of section *Pedicellati*, a phylogenetic analysis using nrDNA ITS1 and ITS2 sequences from several populations was performed to assess if this morphological similarity was congruent or not with the sectional placement of this species. Within the ingroup taxones, in addition to *Phaseolus dasycarpus* and four species of section *Paniculati*, seven out of eleven species belonging to section *Pedicellati* were sampled. Samples were chosen to reflect as much of the morphological variation in section *Pedicellati* as possible. Efforts were made to include all species of this section, but *P. palmeri*, *P. scabrellus*, *P. teulensis*, and *P. pyramidalis* were not included in the study, since no populations of these species could be located. Four species from different related sections chosen among previously proposed sister groups of the *Pedicellatus* group (Delgado-Salinas et al., 1999) were included as outgroup members. Overall, fourteen species of *Phaseolus* were included in the analysis,

representing species of the two main clades established in a recent phylogenetic study by Delgado-Salinas et al. (in prep.). Voucher information along with GenBank accession numbers are detailed in Table 1.

DNA extraction, was carried out by DNA micro isolation by the CTAB method, followed Wilkie (1997). The primers for amplifying the ITS were those used by Delgado-Salinas et al. (1999). The parameters employed in the PCR for amplifying the ITS were those described by Kass and Wink (1997).

The matrix includes several sequences reported by Delgado-Salinas et al. (1999) and from the GenBank. WinClada (version 0.0.unam21 [Beta], K. Nixon) was used to spawn the matrix into Nona (Goloboff, 1993). Heuristic searches included TBR branch swapping on 100 initial trees, holding 20 trees on each, and retaining a maximum 4000 trees. Bootstrap analysis was conducted with 1000 replications, 100 random taxones entry sequences per replication, and 10 trees saved per replication.

Results

TAXONOMIC TREATMENT

Phaseolus dasycarpus Freytag & Debouck, emend. & ampl., Mercado-Ruaro. Sida, *Botanical Miscellany* 23: 120. 2002. TYPE: MEXICO. Veracruz: Municipio Huayacocotla, El Paraje, Huayacocotla (20°30'N, 98°30'W), 1950 m, 24 Oct 1970, Hernández & Trigos 872 (HOLOTYPE: F; ISOTYPE: MEXU). (Fig. 1)

Herbaceous, twining or trailing, perennial vines, to 2 m long. *Root* thick and fleshy, 10-15 cm long. *Stem* cylindrical, purple to green, 1-1.25 mm diam., striate, with internodes 8-8.5 cm long, sparsely strigose, with retrorse hairs of

two sizes, the long ones 0.4-0.45 mm, the short ones 0.1-0.15 mm; stipules deltoid, 2-2.5 mm X 1 mm at the base, 3-(occasionally 4-) nerved, adaxially covered by hairs 0.3-0.35 mm long. *Leaves* pinnately trifoliolate, 10-12 cm long, membranaceous to papyraceous, deep to light green, with prominent purple-red (in living material) veins in upper side, or with white veins not prominent in either upper or lower side; petiole 3-3.5 cm long, terete, sparsely covered with long and short hairs, canaliculate; rachis 1-1.5 cm long, canaliculate; lateral pulvinuli 3-3.5 mm long, the central one 2-2.5 mm, adaxially covered by straight long hairs; stipels oblong, 1-nerved, 1.5 mm long; central leaflet very variable in shape, either elongated and thin, 0.8-1.2 cm wide with two lobes at the base, or triangular sublobed, or triangular with or without two lobes at the base, 5-6.5 cm X 3-4 cm, apex acuminate, slightly apiculate, the upper and lower surfaces sparsely strigose, the margins ciliate; lateral leaflets with unequal base, ovate, or with a lateral lobe above the base, or triangular with unequal basal lobes. *Inflorescence* a pseudo-raceme or a scarcely developed panicle; peduncle 0.7 mm diam., striate, 30-40 cm long, puberulent; rachis 15-22 cm, with uncinata hairs 0.5 mm long, with 4-10 nodes, each node bearing 2-4 flowers; primary bract lanceolate, 3-3.5 mm X 0.65 mm, with 2-3 (occasionally 5) green veins, lustrous, abaxially pubescent, persistent; pedicel 0.6-0.9 cm at anthesis, 1.0-1.2 cm in fruit, adaxially green, abaxially purple, with uncinata hairs 0.05 mm long; bracteole ovate to lanceolate, 1-nerved or nerveless, 0.75 mm long, ciliate, purple or green, persistent. *Flowers* purple to lavender, fading to yellow-brown; calyx campanulate, 5.6-6.2 mm X 4.3-5.6 mm, inner surface of tube strigillose, outer surface covered with short hairs, abundantly so on lower lobe, upper lobes connate, emarginate, the three lower lobes deltoid, unequal, lower lobe

1.7-3 mm long; standard usually wider than long, recurved at anthesis, with the upper part hood-like, thickened at point of folding up, margins of blade rolled backwards, auriculate at base with quadrate flap-like appendages, 0.9-1 cm high, 0.9-1.1 cm wide; wings convex, slightly unequal, 0.9-1.0 cm X 5-6 mm, 2-3 mm at the narrowest part that adheres to the keel, claws 3.5-4.5 mm long; keel incurved and rotated laterally above the curve, ca. 1 cm long, distally coiled with 1.5 spirals; androecium diadelphous, vexillar stamen with a gibbous appendage, 1-1.5 mm broad, 0.6-0.7 mm from the base; stamens connate into a tube 0.9-1 cm, with two lobe-like appendices 1 mm from the base; anthers oblong, 0.65-0.75 mm X 0.25-0.35 mm; pollen tricolporate, exine sculpturing narrowly reticulate, operculum hemispheric, surface regulate (Fig. 2); gynoecium surrounded at base by a cylindrical nectary, less than 1 mm long; ovary densely strigose, 5.3-6 mm X 1.2-1.55, 4-5-ovuled; style distally thickened, with a pollen brush; stigma subapical, introrse. *Fruit* linear-falcate, densely strigose (immature) to hirsute, valves elastically dehiscent along both sutures and curling, 3.5-4.5 cm X 7.5-8 mm, with a straight, 5-6 mm beak. *Seeds* 2-4, brown, rounded and flattened, 4.2-5 mm long, 3.5-4.3 mm wide, 2.5-3.2 mm thick, hilum ovate 1.23-1.45 mm X 0.75-0.9 mm. *Seedling* with hypogeal germination, eophylls simple and opposite, ovate and acute at the tip, petiolate.

Distribution and ecology.- *Phaseolus dasycarpus* occurs in the states of Hidalgo and Veracruz, Mexico, between 20°31' and 20°39' long. N, and between 98°29' and 98°39' lat. W, at 1950 – 2250 m, in cloud and pine-oak forests on rocky volcanic soil.

Phenology.- Flowering and fruiting takes place from July through November.

Additional specimens examined: **MEXICO. HIDALGO:** Municipio Zacualtipán, gravel road to Tlahuelompa, 24 Sept 1995 and 15 Nov 1995, *Alcántara 2045, 2721* (MEXU); pine woods on trail to Nonoalco below Tepeoco, about 4 mi from Zacualtipán near Tianguistengo road, 18 Oct 1949, *Moore Jr. 5359* (MEXU); altered oak forest, with *Pinus*, *Clethra*, and *Rubus*, Km 91.5 of Highway 105, from Huejutla de Reyes to Pachuca, 28 Jan 2001, *Mercado et al. 131* (MEXU). **VERACRUZ:** 3 km SW of Huayacocotla along road to Palo Bendito, Jul 22 1982, *Nee & Diggs 25183* (MEXU, XAL).

MORPHOLOGICAL FEATURES

The hood-like standard (Fig. 1; D-F) and the pubescent fruit with a conspicuous thin beak (Fig. 1; A) allow for quick identification of this species in the field or in the herbarium. Freytag and Debouck (2002) stated that *P. dasycarpus* is 1 to 1.5 m tall, while field and greenhouse observations allowed us to determine its size actually up to 2 m. The number of ovules, 4 to 5, was obtained after dissecting 10 flowers, and it differs from the number of 6 that was reported in the original description.

CHROMOSOME STUDIES

The mitotic chromosome number was $2n = 22$ (Fig. 3), which agrees with most of the species in the genus (Mercado-Ruaro and Delgado-Salinas, 1996,

1998), thus confirming the base chromosome number of $x = 11$ for *Phaseolus* (Goldblatt, 1981; Mercado-Ruaro and Delgado-Salinas, 1996).

Meiotic division was normal, with formation of 11 bivalents and segregation of 11 chromosomes to each of the poles. The karyotype formula of the chromosomes of *P. dasycarpus* is composed of 9 metacentrics + 2 submetacentrics, a pair of the latter bearing a secondary constriction; the average chromosome size is 1.38 μm , ranging from 1.125 to 1.69 μm ; the chromosome total diploid length is 30.37 μm , with a symmetry index TF% of 41.16 ($[\text{sum total of short arms} / \text{sum total of chromosome length}] \times 100$). All the results of the karyotype analysis fall within the range of chromosome measurements of 10 wild *Phaseolus* species studied by Mercado-Ruaro and Delgado-Salinas (1998).

PHYLOGENETIC ANALYSIS

The ITS phylogenetic tree (Fig. 4) resolves *P. dasycarpus* nested in the clade corresponding to sect. *Pedicellati*. This contrasts with Freytag and Debouck's (2002) placement of *P. dasycarpus* in sect. *Paniculati*. Members of sections *Brevilegumeni*, *Paniculati* and *Rugosi*, such as *P. lunatus*, *P. polystachyus*, *P. salicifolius*, *P. oligospermus* and *P. microcarpus*, together with *P. oaxacanus*, form a well supported clade apart from the group of species forming sect. *Pedicellati*.

Phaseolus oaxacanus is excluded from sect. *Pedicellati* (sensu Freytag & Debouck, 2002), in agreement with Delgado-Salinas et al. (1999) and Delgado-Salinas et al. (in prep.). *Phaseolus neglectus* of sect. *Digitati* (Freytag & Debouck 2002) is resolved within the *Pedicellati* clade, also in agreement with

other phylogenetic analyses of *Phaseolus* (Delgado-Salinas et al., 1999 and Delgado-Salinas et al., in prep.). Such agreement among different phylogenetic analyses that utilize different combinations of data (although always with ITS sequences) bolsters our conclusion that *P. dasycarpus* is part of the *Pedicellati* clade.

These molecular results, in addition to the new morphological information, compel us to transfer *P. dasycarpus* to sect. *Pedicellati*. This transfer does not alter the morphological integrity of the section, since the characteristics that define it are shared with *P. dasycarpus*. However, this arrangement plus the inclusion of *P. neglectus* and exclusion of *P. oaxacanus* questions the monophyly of section *Pedicellati*, and makes it necessary to be re-defined (Mercado-Ruaro, in prep.).

Acknowledgments

We thank Maria del Rosario García Peña for her help in obtaining the loans of specimens used in writing this paper; Albino Luna for drawing the beautiful illustration; Helga Ochoterena, L. Kelly, and M. Lavin made useful suggestions to improve the manuscript; Norma Oropeza, Alberto Reyes, Gabriel Flores and Fernando Tapia for their assistance in the field; Virginia León Règagnon and Laura Márquez Valdelamar for the facilities and their support in the molecular studies; Berenit Mendoza for preparing the SEM photo of the pollen, and Alfredo Wong for providing computer support. The Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA-UNAM) awarded a graduate studies scholarship to the first author.

Literature Cited

- Delgado-Salinas, A.** 1985. Systematics of the genus *Phaseolus* (Leguminosae) in North and Central America. Ph. D. dissertation, University of Texas, Austin, U. S. A.
- , **T. Turley, A. Richman & M. Lavin.** 1999. Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic Botany* 24: 438 – 460.
- Freytag, G. F. & D. G. Debouck.** 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. *Sida, Botanical Miscellany* 23: 1-300.
- Gepts, P.** 1996. Origin and evolution of cultivated *Phaseolus* species. Pages 65 – 74. *In*: B. Pickersgill & J. M. Lock, editors. *Advances in legume systematics. Part 8. Legumes of Economic Importance.* Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Goldblatt, P.** 1981. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. Pages 427 – 463. *In*: R. M. Polhill & P. H. Raven, editors. *Advances in legume systematics. Part 2.* Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Goloboff, P.** 1993. Nona. Software and documentation by the author, Tucumán, Argentina.

Kass, E. & M. Wink. 1997. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (Family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL) and ncDNA (ITS 1 and 2). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 65-88.

Mercado-Ruaro, P. & A. Delgado-Salinas. 1996. Karyological studies in several Mexican species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi (Phaseolinae: Fabaceae). Pages 83-87. *In*: B. Pickersgill & J. M. Lock, editors. *Advances in legume systematics. Part 8. Legumes of Economic Importance.* Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

————— & —————. 1998. Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). *American Journal of Botany* 85(1): 1 - 9.

Tapia-Pastrana, F. & P. Mercado-Ruaro. 2001. A combination of the “squash” and “splash” techniques to obtain the karyotype and assess meiotic behavior of *Prosopis laevigata* L. (Fabaceae: Mimosoideae). *Cytologia* 66: 11 – 17.

Wilkie, S. 1997. Genomic DNA isolation, southern blotting and hybridization. Pages 3-14. *In*: M. S. Clark, editor. *Plant Molecular Biology. A Laboratory Manual.* Springer-Verlag, Berlin, Germany.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Phaseolus dasycarpus* Freytag & Debouck. **A.** Habit, inflorescences, flowers, and fruits. **B.** Stem node showing stipules, petiole and basal part of peduncle. **C.** Floral node with flower bud. **D.** Flower, frontal view. **E.** Flower, lateral view. **F.** Standard petal, showing the upper part hood-like. **G.** Keel, lateral view, showing distal part coiled with 1.5 spirals. **H.** Wing petal, showing auricle at base and claw. **I.** Gynoecium, showing ovary with cylindrical nectary at base, style with pollen brush, and introrse stigma. **J.** Diadelphous androecium with vexillary stamen, showing appendix at base. **K.** Seed, frontal and lateral view, showing hilum. **L.** Seedling of three-weeks old. (Drawn from *P. Mercado et al. 131* by Albino Luna).

Figure 2. Scanning electron micrograph of non-acetolyzed pollen grain, equatorial view, showing the operculum with rugulate surface (*P. Mercado et al. 131*).

Figure 3. Mitotic chromosomes of *Phaseolus dasycarpus* from root meristem, $2n=22$.

Figure 4. Strict consensus tree of a heuristic analysis, based on ITS1 + ITS2 sequences (length= 297, CI= 77, RI= 86). Numbers above branches indicate parsimony bootstrap values greater than 50 %. Note that the Pedicellati clade includes species of sections Paniculati (*P. dasycarpus*) and Digitati (*P. neglectus*). Numbers after species correspond to ones used in Table 1.

Table 1. *Phaseolus* species included in the present nrDNA ITS phylogenetic analysis. Nomenclature follows Freytag and Debouck (2002). All specimens are deposited in MEXU, except for *P. lunatus* (CIAT G-26309), and *P. polystachyus* (B. Summers 4680). Asterisks after species indicate that ITS sequence information is from GenBank and accession numbers are the following: AF115175, AF115171, AF115209, AF115236, AF115242, AF115232, AF115240, AF115196 and AF115182.

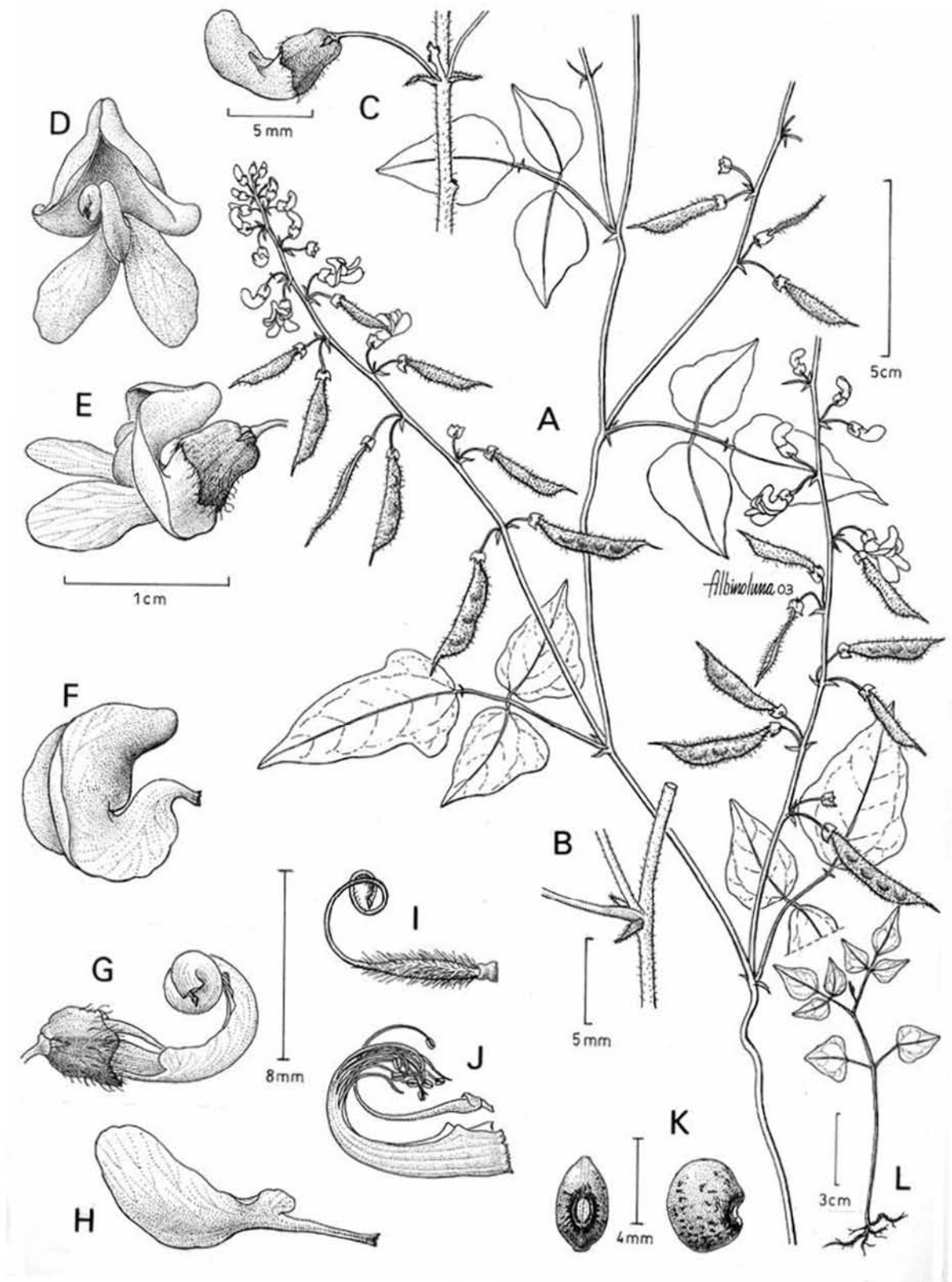


Figure 1

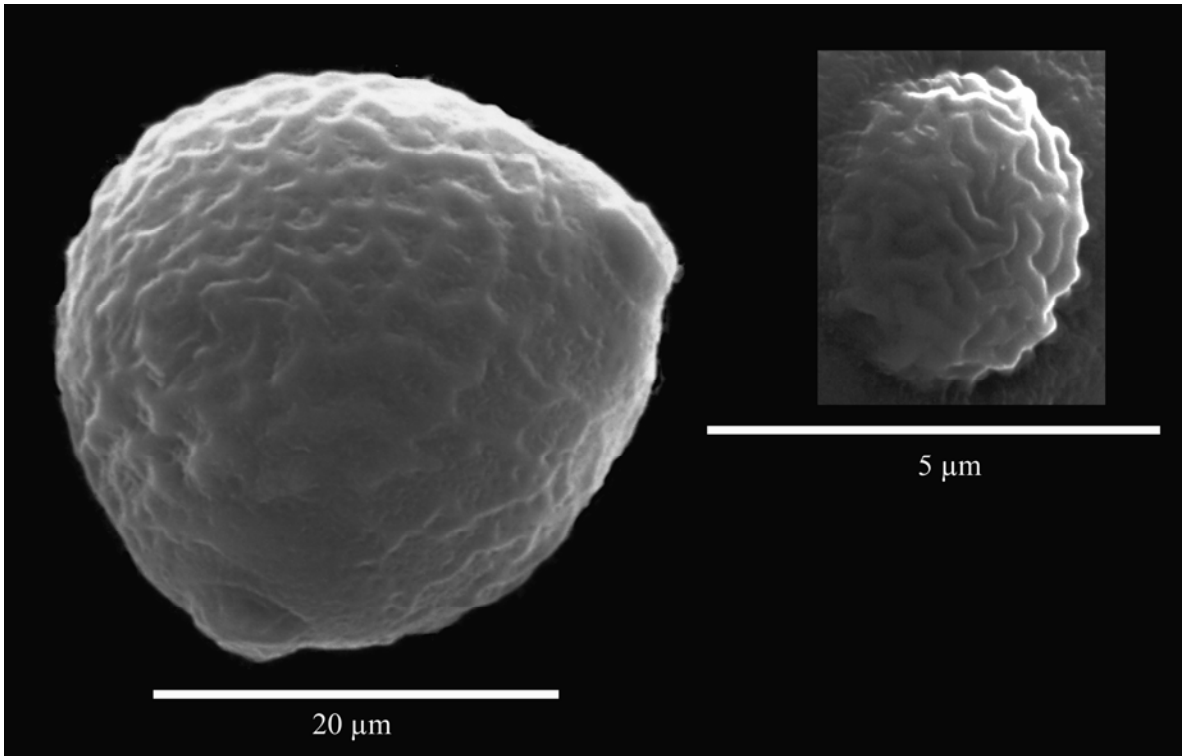


Figure 2



Figure 3

Figure 4

TABLE 1

Species	Location	Specimen voucher
1.- <i>P. dasycarpus</i>	Hidalgo, Mexico	<i>P. Mercado et al. 131</i> (MEXU)
2.- <i>P. esperanzae</i>	Puebla, Mexico	<i>P. Mercado et al. 23</i> (MEXU)
3.- <i>P. grayanus</i>	Aguascalientes, Mexico	<i>P. Mercado et al. 145</i> (MEXU)
4.- <i>P. grayanus</i>	San Luis Potosí, Mexico	<i>P. Mercado et al. 60</i> (MEXU)
5.- <i>P. grayanus</i>	San Luis Potosí, Mexico	<i>P. Mercado et al. 130</i> (MEXU)
6.- <i>P. laxiflorus</i>	Puebla, Mexico	<i>P. Mercado & A. Reyes 109</i> (MEXU)
7.- <i>P. laxiflorus</i>	Puebla, Mexico	<i>P. Mercado et al. 133</i> (MEXU)
8.- <i>P. laxiflorus</i>	Veracruz, Mexico	<i>P. Mercado & A. Reyes 102</i> (MEXU)
9.- <i>P. laxiflorus</i>	Hidalgo, Mexico	<i>P. Mercado et al. 132</i> (MEXU)
10.- <i>P. lunatus</i> *	Magdalena, Colombia	CIAT G-26309
11.- <i>P. lunatus</i> *	Veracruz, Mexico	<i>A. Delgado 901</i> (MEXU)
12.- <i>P. microcarpus</i> *	Durango, Mexico	<i>A. Delgado 1025</i> (MEXU)
13.- <i>P. neglectus</i> *	Tamaulipas, Mexico	<i>F. G. Medrano 16937</i> (MEXU)
14.- <i>P. oaxacanus</i>	Oaxaca, Mexico	<i>P. Mercado & F. Tapia 90</i> (MEXU)
15.- <i>P. oaxacanus</i> *	Oaxaca, Mexico	<i>R. Torres 12384</i> (MEXU)
16.- <i>P. campanulatus</i> *	Jalisco, Mexico	<i>A. S. Magallanes 1961</i> (MEXU)
17.- <i>P. pedicellatus</i>	Nuevo León, Mexico	<i>M. Lavin 4810</i> (MEXU)
18.- <i>P. pedicellatus</i>	Veracruz, Mexico	<i>R. Hernández & C. Trigos 886</i> (MEXU)
19.- <i>P. pedicellatus</i>	Hidalgo, Mexico	<i>P. Mercado et al. 123</i> (MEXU)
20.- <i>P. pedicellatus</i>	Durango, Mexico	<i>R. Hernández 7903</i> (MEXU)
21.- <i>P. pedicellatus</i>	Michoacán, Mexico	<i>P. Mercado et al. 139</i> (MEXU)
22.- <i>P. pedicellatus</i>	Morelos, Mexico	<i>P. Mercado 138</i> (MEXU)
23.- <i>P. polymorphus</i>	Querétaro, Mexico	<i>P. Mercado & G. Flores 66</i> (MEXU)
24.- <i>P. polymorphus</i> *	Querétaro, Mexico	<i>S. Zamudio 3470</i> (MEXU)
25.- <i>P. polystachyus</i> *	Missouri, U.S.A.	<i>B. Summers 4680</i> (MO)
26.- <i>P. purpusii</i>	San Luis Potosí, Mexico	<i>R. Torres 15438</i> (MEXU)
27.- <i>P. salicifolius</i> *	Sinaloa, Mexico	<i>A. C. Sanders 4419</i> (MEXU)

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

Todos los integrantes de la sección *Pedicellati* que se han analizado cariotípicamente tienen número cromosómico diploide y haploide de $2n= 22$ y $n= 11$, respectivamente con predominancia de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos.

No se observaron diferencias cariotípicas que permitan distinguir especies a nivel cariológico; los cariotipos en todas las poblaciones analizadas fueron simétricos.

Aún cuando se observaron cromosomas retardados y formación de multivalentes, la segregación fue normal de 11 cromosomas a cada uno de los polos.

Morfológicamente y utilizando técnicas fenéticas, fue posible distinguir dos grupos: el primero incluye a *P. esperanzae*, *P. dasycarpus*, *P. laxiflorus*, *P. pedicellatus*, *P. oaxacanus* y *P. glabellus*, especies caracterizadas por folíolos de ligera a marcadamente lobulados, mientras que el segundo se encuentra *P. grayanus*, *P. polymorphus*, *P. purpusii* y *P. neglectus* que presentan los folíolos marcada o profundamente lobulados.

Phaseolus pyramidalis no se reconoce como especie válida, ya que la inflorescencia en forma de pirámide que la define también se observa en otras especies de la sección.

Phaseolus glabellus morfológicamente se integra con el grupo que presenta folíolos ligeramente o marcadamente lobulados, mientras que *P. neglectus* lo hace con las especies caracterizadas por los folíolos lobulados y angulosos.

De los taxones originalmente incluidos en la sección *Pedicellati*, *Phaseolus oaxacanus* es el único que se separa del resto de las especies de la sección *Pedicellati* en el análisis filogenético con ITS.

Phaseolus dasycarpus no pertenece a la sección *Paniculati* subsección *Volubili*, y se propone su reubicación en la sección *Pedicellati*.

La inclusión de *Phaseolus dasycarpus* no rompe la integridad morfológica de la sección *Pedicellati*; las características que definen a la sección se encuentran en *P. dasycarpus*.

La forma de los folíolos de *Phaseolus purpusii* es resultado de las condiciones ambientales en que se localiza; morfológicamente y con análisis de ITS, se encuentra relacionado con *Phaseolus polymorphus*.

Con base en los estudios morfológicos y de secuenciación de los ITS, se establece que *Phaseolus dasycarpus*, *P. esperanzae*, *P. grayanus*, *P. laxiflorus*, *P. pedicellatus* y *P. polymorphus* son especies válidas dentro de la sección *Pedicellati*.

La inclusión de *Phaseolus glabellus* y de *P. neglectus* dentro de la sección *Pedicellati*, y la posición de *P. oaxacanus* fuera del clado *Pedicellati*, claramente indica que la sección *Pedicellati* es parafilética.

REFERENCIAS

- Almeda, F. y T. I. Chuang. 1992. Chromosome numbers and their systematic significance in some Mexican Melastomataceae. *Systematic Botany* 17: 583-593.
- Ayonoadu, U. W. U. 1974. Nuclear DNA variation in *Phaseolus*. *Chromosoma (Berl.)* 49: 41 – 49.
- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1(1): 3 – 16.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Cambell 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.
- Bayuelo-Jiménez, J. S., R. Craig y J. P. Lynch. 2002a. Salinity tolerance of *Phaseolus* species during germination and early seedling growth. *Crop Science* 42: 1584 – 1594.
- Bayuelo-Jiménez, J. S., D. G. Debouck y J. P. Lynch. 2002b. Salinity tolerance in *Phaseolus* species during early vegetative growth. *Crop Science* 42: 2184 – 2192.
- Beadle, G. W. 1932. A gene for sticky chromosomes in *Zea mays*. *Z. Induct. Abstammungs.- Vererbungsl.* 63: 195 – 217.
- Bennett, M. D. 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society of London B* 181: 109 – 135.
- Bennett, M. D. 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist* 106: 177 – 200.
- Bennett, M. D. y I. J. Leitch. 1995. Nuclear DNA amounts in Angiosperms. *Annals of Botany* 76: 113 – 176.

- Bennett, M. D. e I. J. Leitch. 1997. Nuclear DNA amounts in angiosperms-583 new estimates. *Annals of Botany* 80: 169 – 196.
- Bennett, M. D. y J. B. Smith. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 274: 227 – 274.
- Bennett, M. D., J. B. Smith y R. I. L. Smith. 1982. DNA amounts of angiosperms from the Antarctic and South Georgia. *Environmental and Experimental Botany* 22: 307 – 318.
- Bennett, S. T. y M. D. Bennett. 1992. Variation in nuclear DNA amount between wild and cultivated populations of *Milium effusum* ($2n= 28$). *Genome* 35: 1050 – 1053.
- Bennetzen, J. L., J. Ma y K. M. Devos. 2005. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Annals of Botany* 95: 127 – 132.
- Blair, M. W., F. Pedraza, H. F. Buendía, E. Gaitán-Solis, S. E. Beebe, P. Gepts y J. Tohme. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1362 – 1374.
- Broughton, W. J., G. Hernández, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts y J. Vanderleyden. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil* 252: 55 – 128.
- Caicedo, A. L., E. Gaitán, M. C. Duque, O. Toro Chica, D. G. Debouck y J. Tohme. 1999. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Science* 39: 1497 – 1507.
- Castagnaro, A. P., Poggio, L. y Naranjo, C. A. 1990. Nuclear DNA variation in *Phaseolus* (Fabaceae). *Darwiniana* 30: 195 – 200.
- Conger, A. D. y L. M. Fairchild. 1953. A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technology* 28: 281 – 283.

- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. The evolution and classification of flowering plants. Columbia University Press. New York. 587 – 591 pp.
- Debouck, D. 1991. Systematics and morphology. En: A. van Schoonhoven y O. Voysest (eds.). Common beans: research for crop improvement. Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, Reino Unido, pp. 55-118.
- Debouck, D. G. 2000, Biodiversity, ecology and genetic resources of *Phaseolus* beans-Seven answered and unanswered question. En K. Oono, ed. Wild legumes. Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, and National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Ibaraki, Japan, pp. 95 – 123.
- Delgado-Salinas, A. 1985. Systematics of the genus *Phaseolus* in Mexico and Central America. Ph.D. dissertation. Univ. of Texas, Austin.
- Delgado-Salinas, A., A. Bruneau y J. J. Doyle. 1993. Chloroplast DNA phylogenetic studies in New World Phaseolinae (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). Systematic Botany 18: 6 – 17.
- 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.
- Doyle, J. J., J. L. Doyle, J. A. Ballenger, E. E. Dickson, T. Kajita y H. Ohashi. 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: Taxonomic correlation and insights into the evolution of nodulation. American Journal of Botany 84: 541 – 554.
- Fay, M. F., R. S. Cowan e I. J. Leitch. 2005. The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. Annals of Botany 95: 237 – 246.
- Federov, A. 1974. Chromosome numbers of flowering plants. Otto Koeltz Science Publishers. Koenigstein, Germany.

- Fofana, B., X. Vekemans, P. du Jardin y J. P. Baudoin. 1997. Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. *Euphytica* 95: 157 – 165.
- Fofana, B., J. P. Baudoin, X. Vekemans, D. G. Debouck y P. du Jardin. 1999. Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus*) using chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 202 – 212.
- Freytag, G. F. y D. G. Debouck. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. *Sida, Botanical Miscellany*, No. 23.
- Fukuda, T., J. Yokoyama, T. Nakamura, I. Song, T. Ito, T. Ochiai, A. Kanno, T. Camella y M. Maki. 2005. Molecular phylogeny and evolution of alcohol dehydrogenase (Adh) genes in legumes. *BMC Plant Biology* 5: 6 – 15.
- Gaitán, E., O. Toro, J. Thome y G. D. Debouck. 2000. Molecular taxonomy of the genus *Phaseolus* through ITS sequencing. Annual report. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. pp 55 – 60.
- Gepts, P. 1996. Origin and evolution of cultivated *Phaseolus* species. In: B. Pickersgill y J. M. Lock. (eds.). *Advances in legume systematics. Part 8.* Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 65-74.
- Goel, S., S. N. Raina y Y. Ogiwara. 2002. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal Transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA in the *Phaseolus-Vigna* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 1 – 19.
- Goldblatt, P. 1981. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. En: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.). *Advances in legume systematics. Part 2.* Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 427-463.
- Goloboff, P. 1993. Nona. Software and documentation by the author, Tucumán, Argentina.

- Green, D. M., J. P. Bogart y E. H. Anthony. 1980. An interactive, microcomputer-based karyotype analysis system for phylogenetic cytotaxonomy. *Computers in Biology and Medicine* 10: 219-227.
- Gregory, T. R. 2005. The C-value enigma in plants and animals: A review of parallels and an appeal for partnership. *Annals of Botany* 95: 133 – 146.
- Greilhuber, J. 1998. Intraspecific variation in genome size: A critical reassessment. *Annals of Botany* 82 (suplement A): 27 – 35.
- Greilhuber, J. 2005. Intraspecific variation in genome size in angiosperms-identifying its existence. *Annals of Botany* 95: 91 – 98.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95 - 98.
- Hillis, D. M., B. K. Mable, A. Larson, S. K. Davis y E. A. Zimmer. 1996. Nucleic acids IV: Sequencing and cloning. In: D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable (eds.). *Molecular systematics* (second edition). Sinauer Associates, Inc. Publishers, Massachusetts, USA.
- Hucl, P. y G. J. Scoles. 1985. Interspecific hybridization in the common beans: a review. *Hortscience* 20: 352-357.
- Huziwara, Y. 1962. Karyotype analysis in some genera of Compositae VIII. Further studies on the chromosomes of *Aster*. *American Journal of Botany* 49: 116 – 119.
- Isely, D. 1998. Native and naturalized Leguminosae (Fabaceae) of the United States. Monte L. Bean Life Science Museum, Brigham Young University, Provo, Utah. 1007 pp.
- Kajita, T., OACI, Y. Tateishi, C. D. Donovan y J. J. Doyle. 2001. *rbcl* and Legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and Allies. *Systematic Botany* 26: 515 – 536.
- Käss, E. y M. Wink. 1997. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (Family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (*rbcl*)

- and ncDNA (ITS 1 AND 2). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 65-88.
- Knight, C. A., N. A. Molinari y D. A. Petrov. 2005. The large genome constraint hypothesis: Evolution, ecology and phenotype. *Annals of Botany* 95: 177 – 190.
- Kumari, S. y S. S. Bir. 1985. Karyomorphological evolution in Mimosoideae. *Journal of Cytology and Genetics* 20: 16 – 35.
- Lackey, J. A. 1979. A chromosome atlas of the Phaseoleae (Leguminosae-Papilionoideae). *Iselya* 1: 87 – 114.
- Lackey, J. A. 1981. Phaseoleae. En: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.). *Advances in legume systematics. Part 1*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 301 – 327.
- Lavin, M., P. S. Herendeen y M. F. Wojciechowski. 2005. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Systematic Biology* 54: 575 – 594.
- Levan, A., K. Fredga y A. Sanberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201 – 219.
- Levin, D. A. y S. W. Funderburg. 1979. Genome size in angiosperms: temperate versus tropical species. *American Naturalist* 114: 784 – 795.
- Llaca, V. A., A. Delgado-Salinas y P. Gepts. 1994. Chloroplast DNA as an evolutionary marker in the *Phaseolus vulgaris* complex. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 646 – 652.
- Maréchal, R. J. Mascherpa y F. Stainier. 1978. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et poliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28: 1-273.
- Matthey, R. 1945. L'évolution de la formule chromosomiale chez les vertébrés. *Experientia* 1: 50.

- McClellan, P. E., R. L. Lee y P. N. Miklas. 2004. Sequence diversity analysis of dihydroflavonol 4-reductase intron 1 in common bean. *Genome* 47: 266 – 280.
- Mercado-Ruaro, P. y A. Delgado-Salinas. 1996. Karyological studies in several Mexican species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi. (Phaseolinae, Fabaceae). In: B. Pickersgill y J. M. Lock. (eds.). *Advances in legume systematics. Part 8.* Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 83-87.
- Mercado-Ruaro, P. y A. Delgado-Salinas. 1998. Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae-Phaseolinae). *American Journal of Botany* 85: 1-9.
- Mercado-Ruaro, P. y A. Delgado-Salinas. 2000. Cytogenetic studies in *Phaseolus* L. (Fabaceae). *Genetics and Molecular Biology* 23: 985-987.
- Nagl, W. y A. Treviranus. 1995. A flow cytometric analysis of the nuclear 2C DNA content in 17 species (53 genotypes). *Botanica Acta* 108: 403-406.
- NAS (National Academy of Sciences). 1979. *Tropical legumes: Resources for the future.* Washington, D. C. 331 p.
- Ohri, D. 1998. Genome size variation and plant systematics. *Annals of Botany* 82 (suplement A): 75 – 83.
- Palomino, H. G. 2000. Genome analysis of Mexican flora. *Genetics and Molecular Biology* 23(4): 921- 924.
- Pedrosa, A., E. E. Vallejos, A. Bachmair y D. Schweizer. 2003. Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 205 – 212.
- Piper, C. V. 1926. *Studies in American Phaseolinae.* Contributions of US. National Herbarium 22: 663 – 701.
- Polhill, R. M., P. H. Raven y C. H. Stirton. 1981. Evolution and systematic of the Leguminosae. En: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.). *Advances in legume systematics. Part 1.* Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 1-26.

- Polhill, R. M. (1994). Classification of the Leguminosae. En: F.A. Bisby, J. Buckingham y J.B. Harborne (eds). *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, vol 1. Plants and their constituents. Chapman & Hall, London. pp. 35-36.
- Pueyo, J. J. y A. Delgado-Salinas. 1997. Presence of α -amylase inhibitor in some members of the subtribe Phaseolinae (Phaseoleae: Fabaceae). *American Journal of Botany* 84: 79 – 84.
- Ramamonjisoa, D., S. Kauffmann, N. Choisine, L. Maréchal-Drouard, G. Gree, H. Wintz, I. Small y A. Dietrich. 1998. Structure and expression of several bean (*Phaseolus vulgaris*) nuclear transfer RNA genes: Relevance to the process of bRNA import into plant mitochondria. *Plant Molecular Biology* 36: 613 – 625.
- Rayburn, A. L. 1990. Genome size variation in Southwestern United States Indian maize adapted to various altitudes. *Evolutionary Trends in Plants*. 4: 53 -57.
- Reeves, G., D. Frances, M. S. Davies, H. J. Roger y T. R. Hodgkinson. 1998. Genome size is negatively correlated with altitude in natural populations of *Dactylis glomerata*. *Annals of Botany* 82: 99 – 105.
- Salcedo, C. J., J. A. Arroyave, O. Toro y D. G. Debouck. 2006. *Phaseolus novoleonensis*, a new species (Leguminose, Phaseolinae) from Sierra Madre Oriental, Nuevo León, México. *Novon* 16 (1): 105 – 111.
- SanMiguel, P., A. Tikhonov, Y. Jin, N. Motchoulskaia, D. Zakharov, A. Melake-Berhan, P. S. Springer, K. J. Edwards, M. Lee, Z. Avramova, y J. L. Bennetzen. 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274: 765 - 768.
- Sarbhoy, R. K. 1977. Cytogenetical studies in the genus *Phaseolus* Linn. III. Evolution en the genus *Phaseolus*. *Cytologia* 42: 401 – 413.
- Sarbhoy, R. K. 1980. Karyological studies in the genus *Phaseolus* Linn. *Cytologia* 45: 363 - 373.

- Schmith, V. y D. G. Debouck. 1990. *Phaseolus glabellus* Piper, a noteworthy variant of the *P. coccineus* complex?. Annual Report Bean Improvement Cooperative (USA) 33: 124 – 125.
- Schmith, V., D. G. Debouck y J. P. Baudoin. 1996. Biogeographical and molecular observations on *Phaseolus glabellus* (Fabaceae, Phaseolinae) and its taxonomic status. Taxon 45: 493 – 501.
- Schmith, V., J. P. Baudoin y B. Wathelet. 1992. Contribution à l'étude des relations phylétiques au sein du complexe *Phaseolus vulgaris* L.-*Phaseolus coccineus* L.-*Phaseolus polyanthus* Greenman. Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux 27: 199 – 207.
- Schmith, V., P. du Jardin, J. P. Baudoin y D. G. Debouck. 1993. Use of chloroplast DNA polymorphisms for the phylogenetic study of seven *Phaseolus* taxa including *P. vulgaris* and *P. coccineus*. Theoretical and Applied Genetics. 87: 506 – 516.
- Senn, H. A. 1938. Chromosome number relationships in the Leguminosae. Bibliografia Genetica 12: 175 – 345.
- Sinha, S. S. N. y H. Roy. 1979a. Cytological studies in the genus *Phaseolus* I. Mitotic analysis in fourteen species. Cytologia 44: 191 – 199.
- Sinha, S. S. N. y H. Roy. 1979b. Cytological studies in the genus *Phaseolus* II. Meiotic analysis of sixteen species. Cytologia 44: 201 – 209.
- Simmons, M. P. y H. Ochoterena. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. Systematic Biology 49: 369 – 381.
- Sneath, P. H. A. y R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman and Co. San Francisco. 572 pp.
- Sousa, S. M., R. Medina, G. Andrade y M. de L. Rico. 2004. Leguminosas. En: A. García-Mendoza, M. de J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds.). Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza_ World Wildlife Fund, México, pp. 249 – 269.

- Sousa, S. M. 1986. Fabaceae. In: D. E. Breedlove, Listados florísticos de México IV. Flora de Chiapas. Mexico. UNAM. Inst. Biol. pp. 90 – 112.
- Sousa, S. M. y A. Delgado-Salinas. 1993. Mexican Leguminosae: Phytogeography, endemism, and origins. En: Ramamoorthy, T. P., R. Bye y A. Lot (Eds.). Biological diversity of Mexico: Origins and distribution. Oxford University Press, Inc Nueva York, pp. 459 – 511.
- Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London. 216 pp.
- Tapia-Pastrana, F., E. Gallegos-Pacheco, C. De Teodoro-Pardo y P. Mercado-Ruaro. 2005. New cytogenetic information of two Mexican populations of *Crotalaria incana* L. (Leguminosae-Papilionoideae). Cytologia 70: 207 – 212.
- Thomas, B. 1973. Evolutionary implications of karyotypic variation in some insular *Peromyscus* from British Columbia, Canada. Cytologia 38: 485-495.
- Vallejos, C. E., N. S. Sakiyama y C. D. Chase. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. Genetics 131: 733 – 740.
- Vekemans, X., T. Beauwens, M. Lemaire e I. Roldán-Ruíz. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. Molecular Biology 11: 139 – 151.
- Verdcourt, B. 1970. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the flora of tropical East Africa: IV. Kew Bulletin 24: 507-569.
- Wilkie, S. 1997. Genomic DNA isolation, southern blotting and hybridization. In: M. S. Clark (Ed.) Plant molecular biology. A laboratory manual. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania. pp. 3 – 15.
- 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.

Zheng, J., J. Nakata, H. Uchiyama, H. Morikawa y R. Tanaka. 1991. Giemsa C-banding patterns in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. *Cytologia* 56: 459-466.