



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**SISTEMÁTICA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO
ASTRAGALUS (FABACEAE) DISTRIBUIDAS EN EL CENTRO
DE MÉXICO**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:**

ESMERALDA SALGADO HERNÁNDEZ

DIRECTOR: DR. DAVID S. GERNANDT

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

2006

A MI FAMILIA.

**Sin su amor y apoyo no hubiera
podido concluir satisfactoriamente
esta etapa de mi vida**

A MI PAPÁ MARIO

**Gracias por apoyarme, cuidarme,
por estar conmigo siempre
que lo necesito y sobre todo
por tu infinito Amor .**

A MI MAMA FLAVIANA

**La persona que más admiro en este
mundo, que me ha brindado su apoyo
en esos momentos de flaqueza e
incertidumbre por los consejos dados
y por enseñarme a luchar para
alcanzar mis metas.**

A MI HERMANA YASMIN

**Gracias por ser mi mejor amiga
por escucharme siempre que lo
necesito y por compartir conmigo
estas aventura que se llama vida.**

CON TODO MI AMOR

¡ INFINITAS GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al director de esta tesis el Dr. David S. Gernandt. Por todas sus enseñanzas, consejos e infinita paciencia durante tanto tiempo, por su gran inteligencia y por brindarme su amistad.

Al M. en C. Manuel González Ledesma por su ayuda en la identificación del material biológico, en la revisión de la tesis y por sus importantes comentarios que ayudaron al enriquecimiento de la misma.

Agradezco al Dr. Aaron Liston por la literatura proporcionada y por sus valiosas sugerencias.

Al Biólogo Omar Zerón Flores por la asistencia técnica en el laboratorio y su ayuda en campo.

A Denisse Téllez Mazzocco por su apoyo en campo y laboratorio. Por compartir esta aventura conmigo y sobre todo por su amistad.

Agradezco a los sinodales Dra. Irene Goyenechea, M. en C. Manuel González, Dra. Ana Laura López, Dra. María del Carmen Sánchez, Dr. Juan Márquez y al Dr. José Arturo Silva por revisar y aportar comentarios importantes para la corrección de distintas partes de esta tesis.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Sistemática Molecular: Denisse, Omar, Jaime, Verónica y Federico por todo su apoyo y valiosos consejos, por compartir conmigo infinitos momentos divertidos de compañerismo y amistad.

A mis compañeros y amigos cercanos durante la licenciatura con los que pase tantos momentos divertidos y otros en ocasiones estresantes Sofía Mendoza, Dianeis Téllez, Edith Mauricio, Eulogia San Juan, Gilberto Mendoza, Oscar Molina, Jorge I. Angeles, Gabriel Juárez, Héctor Uribe, Mariano Becerril, Luis Najera y Doroteo Reyes.

A Sandra García y Lizzeth Mayorga por su incomparable amistad y apoyo durante todo este trayecto.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera han compartido mi vida, mi más sincero agradecimiento a su comprensión, estímulo y ayuda.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	
De la morfología a las moléculas en sistemática.....	2
ANTECEDENTES	
La familia Fabaceae (Leguminosae).....	4
El género <i>Astragalus</i>	9
Importancia económica y ecológica de algunas especies de <i>Astragalus</i>	15
Problemas taxonómicos del género <i>Astragalus</i>	16
División del género <i>Astragalus</i> con base en datos citológicos	17
Estudios recientes de las relaciones filogenéticas de <i>Astragalus</i>	19
El género <i>Astragalus</i> en México	23
Concepto filogenético de especie	25
La región del espaciador interno transcrito (ITS) perteneciente al DNA ribosomal del núcleo.....	27
Utilidad filogenética de la región del ITS	28
JUSTIFICACIÓN.....	30
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	30
Objetivos específicos.....	30
MATERIAL Y MÉTODO	
Colecta del material biológico.....	31

Identificación y depósito del material biológico.....	33
Extracción de DNA.....	36
Amplificación de la región del ITS.....	37
Reacción de secuenciación.....	38
Obtención de secuencias del GenBank.....	38
Matrices de las secuencias de la región del ITS.....	39
Análisis filogenéticos.....	40

RESULTADOS

Caracteres morfológicos diagnósticos de las especies de <i>Astragalus</i> con distribución en el centro de México.....	41
Resultados del análisis filogenético de 135 secuencias del género <i>Astragalus</i>	46
Resultados del análisis filogenético de 83 secuencias del género <i>Astragalus</i>	53

DISCUSIÓN

La monofilia de “Neo-Astragalus”.....	58
Relaciones filogenéticas de las especies de la sección <i>Strigulosi</i>	59
Relaciones filogenéticas de <i>A. hypoleucus</i> y <i>A. aff. quinqueflorus</i> del centro de México.....	61
Relaciones filogenéticas de <i>A. wootonii</i> y <i>A. mollissimus</i> del centro de México.....	62
Delimitación filogenética de algunas especies de <i>Astragalus</i> del centro de México.....	64

CONCLUSIONES	67
---------------------------	----

LITERATURA CITADA	69
--------------------------------	----

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Representación numérica de la historia taxonómica de <i>Astragalus</i>	14
Cuadro 2. Clasificación subgenérica de las especies del Viejo Mundo y la clasificación de falanges reconocidos para Norteamérica.....	14
Cuadro 3. Especies reportadas para el Valle de México.....	25
Cuadro 4. Nombre de las especies recolectadas, falange al que pertenecen y la sección.....	33
Cuadro 5. Localidad y datos de colecta de las especies recolectadas en algunos estados del centro de México.....	34
Cuadro 6. Caracteres morfológicos diagnósticos de las hojas y flores de las especies recolectadas en el centro de México.....	42
Cuadro 7. Caracteres morfológicos diagnósticos del fruto de las especies recolectadas en el centro de México.....	44
Cuadro 8. Datos estadísticos de la región del ITS del DNA ribosomal del núcleo para el género <i>Astragalus</i>	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones filogenéticas de la familia Fabaceae con base en secuencias del intrón <i>trnL</i>	6
Figura 2. Arreglo de los tres diferentes tipos de flor de la familia Fabaceae correspondientes a las subfamilias Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae.....	7
Figura 3. Fotografías de algunas especies del género <i>Astragalus</i>	10
Figura 4 Linajes principales y posición filogenética de <i>Astragalus</i> con respecto a otros géneros.....	22
Figura 5. Diagrama que muestra los principales linajes dentro de “Neo-Astragalus”	23
Figura 6. Región del ITS del DNA ribosomal del núcleo.....	28
Figura 7. Mapas de la ubicación geográfica de las poblaciones de las especies recolectadas en el centro de México.....	32
Figura 8. Consenso estricto de 135 secuencias de la región ITS del género <i>Astragalus</i>	51
Figura 9. Consenso estricto de 83 secuencias de la región ITS del género <i>Astragalus</i>	55
Figura 10. Uno de los 5735 árboles más parsimoniosos de 83 secuencias de la región ITS del género <i>Astragalus</i>	57

ANEXOS

Anexo I. Lista de las secuencias utilizadas en el estudio filogenético de <i>Astragalus</i>	79
---	----

RESUMEN

Se investigó la posición filogenética de diez de las 12 especies del género *Astragalus* (Fabaceae) reportadas para el centro de México, mediante un análisis cladístico de secuencias de la región del espaciador interno transcrito (ITS) del DNA ribosomal del núcleo. Seis de las especies recolectadas pertenecen a la sección *Strigulosi* y las cuatro especies restantes pertenecen a otras secciones del género. Las secuencias de las especies del centro de México fueron analizadas junto con otras disponibles en el GenBank. Los resultados obtenidos indican que las especies del centro de México ($n = 11$ y 15) son miembros del clado de "Neo-Astragalus", en donde se encuentran todas las especies aneuploides con distribución en Norteamérica y Sudamérica. El clado de "Neo-Astragalus" presentó tres clados resueltos en el consenso estricto y el resto de las especies fueron politómicas. Las seis especies de la sección *Strigulosi* con distribución en el centro de México se encontraron en uno de los tres clados resueltos en "Neo-Astragalus" junto con ocho especies de Sudamérica, una especie de la sección *Quinqueflori* (*A. aff. quinqueflorus*), una especie de la sección *Hypoleuci* (*A. hypoleucus*) y dos especies de la sección *Leptocarpi* (*A. arizonicus*, *A. nothoxys*). Dos especies (*A. cobrensis* y *A. rusbyi*) de la sección *Strigulosi*, cuya secuencia se obtuvo del GenBank, se encontraron fuera del clado en el que están todas las especies de la sección con distribución en el centro de México. Las especies *A. wootonii* y *A. mollissimus* recolectadas en el centro de México se incluyeron en el segundo clado resuelto en "Neo-Astragalus". La posición filogenética de estas especies fue apoyada por un carácter morfológico del fruto. También se delimitó a las especies *A. strigosus*, *A. guatemalensis*, *A. lyonnetii*, *A. micranthus*, *A. hypoleucus* y *A. mollissimus*, para esto se consideró el concepto filogenético de especie y la formación de grupos monofiléticos, parafiléticos y polifiléticos.

INTRODUCCIÓN

De la morfología a las moléculas en sistemática

La sistemática es la rama de la biología encargada de detectar, describir y explicar la diversidad biológica (Martínez, 1997) y se ha convertido en un área de gran importancia en la biología moderna. El estudio de la biodiversidad comenzó de un modo descriptivo y posteriormente clasificatorio. A partir de la aparición de El Origen de las Especies de Darwin, en el que argumentaba que las especies estrechamente emparentadas mostraban una similitud fundamental porque comparten un ancestro común (Bowler, 1998), las clasificaciones dejaron de hacerse por similitud de caracteres y se trató que realmente representaran la historia evolutiva de los organismos, es decir que se infiriera también la filogenia (González, 1997). Los primeros estudios de plantas que tenían ya como meta clasificar y representar la filogenia, contaban sólo con caracteres morfológicos derivados de estudios taxonómicos, los cuales fueron complementados con otros de tipo anatómico, embriológico, citológico y palinológico (Lammers, 1999).

Gracias a los avances tecnológicos en los años 70's se comienzan a usar marcadores moleculares con la finalidad de resolver problemas taxonómicos en plantas. Para los años 80's su manipulación y análisis avanzaron hasta permitir el estudio de la variación del DNA (González, 1997; Martínez, 1997). Todo lo anterior aunado a la invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki *et al.*, 1985) que revolucionó a la sistemática de plantas porque permitió hacer uso de datos moleculares, especialmente secuencias de DNA como nueva fuente de información. Estos datos pueden ser utilizados como una herramienta alternativa en la resolución de varios problemas que se presentan al utilizar caracteres morfológicos.

Los caracteres moleculares junto con el avance de sus métodos de análisis han ayudado a apoyar, aclarar e inferir relaciones filogenéticas, procesos evolutivos y estado de la variabilidad genética en varios grupos de plantas a nivel de especie, género, familia y categorías superiores (Soltis y Soltis, 1998). También permiten hacer uso de un número mayor de caracteres en organismos que son morfológicamente sencillos. Son de gran ayuda para delimitar especies crípticas o gemelas, que son morfológicamente muy parecidas o idénticas pero se mantienen aisladas reproductivamente (Mayr, 1968) y no se pueden distinguir solamente con caracteres morfológicos.

Indiscutiblemente los datos morfológicos son los primeros en ser utilizados al realizar reconocimiento y descripción de taxa, pero actualmente se debe de hacer uso de los diferentes tipos de datos y herramientas disponibles para continuar con el estudio de la diversidad biológica; es por esto que cada vez más personas dedicadas a la taxonomía y sistemática toman en cuenta tanto los caracteres morfológicos, como los moleculares, ecológicos y biogeográficos, entre otros, para enriquecer sus investigaciones.

En el grupo de las leguminosas se han hecho varios estudios en el área de la sistemática a nivel de género. Las especies mexicanas del género *Astragalus* representan una opción para ampliar el conocimiento de las relaciones filogenéticas interespecíficas en el género, porque la mayoría no han sido reportadas en ninguna filogenia basada en caracteres morfológicos o moleculares. Este trabajo se enfocó a estudiar algunas especies de *Astragalus* con distribución en el centro de México, para lo cual se incluyeron en una filogenia molecular, con el fin de determinar su posición filogenética con relación a otras especies de distintas partes del mundo, delimitar a las especies y generar más información acerca de las relaciones filogenéticas del género. Con este trabajo se abren nuevas expectativas para estudios futuros en *Astragalus*, así como la necesidad de llevar acabo una revisión más detallada de las especies de México.

ANTECEDENTES

La familia Fabaceae (Leguminosae)

La familia Fabaceae (Leguminosae) es la tercera más numerosa de las plantas con flor después de las Compositae y Orchidaceae (Polhill *et al.*, 1981; Lavin *et al.*, 1990). Tiene aproximadamente 18,000 especies en 685 géneros y se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo (Polhill *et al.*, 1981; Tucker, 2003). México es considerado uno de los principales centros secundarios de diversificación de las leguminosas. Este grupo es el segundo más diverso en México representado por aproximadamente 147 géneros y 1953 especies (Sousa y Delgado, 1993; Villaseñor, 2003).

El registro fósil de la familia es abundante y diverso. Se han encontrado fósiles de flores, hojas y frutos en el Terciario, pero todos los linajes mayores de Fabaceae (exceptuando Cercideae) están presentes en el Eoceno medio en el “Mississippi Embayment” al sureste de Norteamérica. Por lo que se sugiere que la extensa diversificación de la familia se dio en este período (Herendeen *et al.*, 1992).

Las leguminosas son árboles, arbustos, hierbas y lianas provistas de espinas o inermes, con hojas pinnadas, bipinnadas, unifoliadas, trifoliadas o simples, en ocasiones reducidas a zarcillos; los folíolos son variables en número, forma y tamaño. Las flores son solitarias o dispuestas en espigas, cabezuelas o racimos axilares o terminales; generalmente con una bráctea y pueden ser actinomorfas o zigomorfas, bisexuales o unisexuales de tamaño y de color variable (Mabberley, 1997; Rzedowski y Rzedowski, 2001; Judd *et al.*, 2002). Presentan comúnmente cinco sépalos y cinco pétalos que en ocasiones son connados, imbricados o valvados, el número puede variar de tres a seis; los estambres usualmente son el doble del número de pétalos o más; el ovario es súpero, por lo general con un solo carpelo, pero puede

variar el número de 1 a 12, por lo general con muchos óvulos implantados a lo largo de la sutura ventral (Mabberley, 1997). El fruto usualmente es seco y dehiscente abriéndose por dos líneas de sutura (legumbre), ocasionalmente se rompe en secciones de una semilla (lomento), también puede ser indehiscente y samaróide o una drupa (Mabberley, 1997; Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Las leguminosas juegan un papel muy importante en el ciclo del nitrógeno. Tienen un alto metabolismo de este elemento por lo que frecuentemente se encuentran nódulos en las raíces, que contienen bacterias fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium* o *Bradyrhizobium*; Judd *et al.*, 2002). Respecto a su importancia económica y agrícola, son la segunda familia más importante después de Poaceae (Gramineae); las especies tienen diversos usos como: ornamento, alimento, medicamento, forraje para ganado, en la agricultura y en la extracción de aceites, fibras y resinas (Lavin *et al.*, 1990; Graham y Vance, 2003; Wojciechowski *et al.*, 2004).

La familia Fabaceae conforma un grupo monofilético, que es soportado por datos morfológicos y moleculares. Algunos de los caracteres morfológicos que comparten las leguminosas son: la imbricación de los pétalos en la yema floral, en donde el par de pétalos abaxiales son internos con respecto a los laterales y el carpelo simple que presenta la flor (Doyle *et al.*, 2000). Secuencias de DNA provenientes de *rbcL*, *atpB* y *trnL* junto con otros más recientes de *matK* apoyan moderadamente esta monofilia (Chase *et al.*, 1993; Doyle *et al.*, 1997; Savolainen *et al.*, 2000; Bruneau *et al.*, 2001; Hilu *et al.*, 2003; Wojciechowski *et al.*, 2004).

De las tres subfamilias que conforman a la familia Fabaceae, las subfamilias Mimosoideae y Papilionoideae son monofiléticas; cada una derivada de diferentes linajes de la subfamilia Caesalpinioideae, la cual es parafilética (Figura 1; Doyle, 1995; Doyle *et al.*, 1997, Bruneau *et al.*, 2001; Wojciechowski *et al.*, 2004).

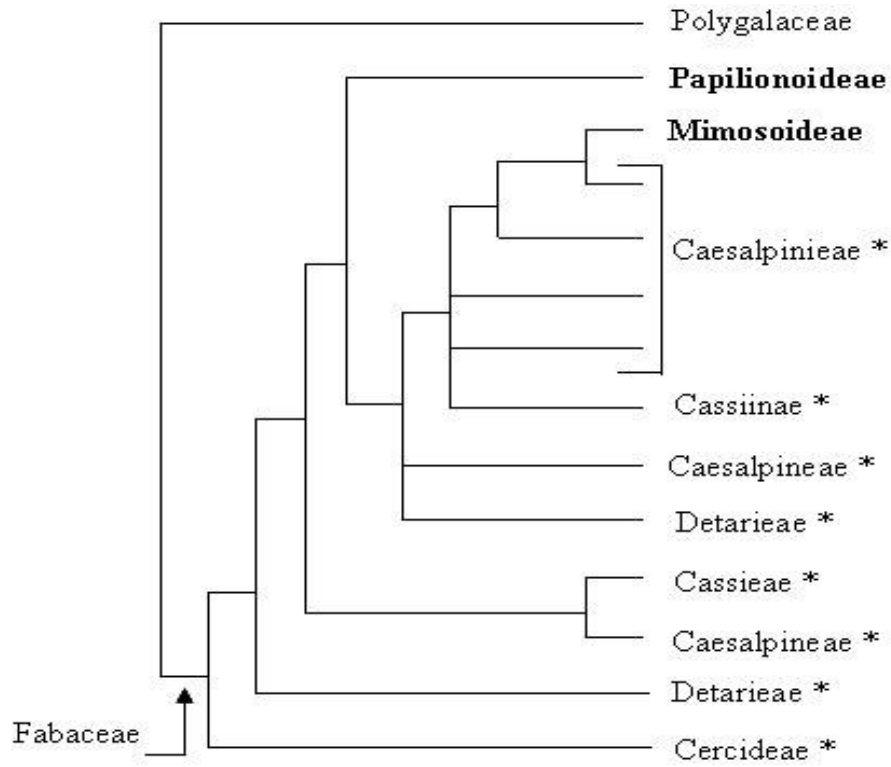


Figura 1. Relaciones filogenéticas de la familia Fabaceae con base en secuencias del intrón *trnL*. Los grupos con el * pertenecen a la subfamilia Caesalpinioideae (modificado de Bruneau *et al.*, 2001).

La subfamilia Caesalpinioideae comprende 170 géneros y 3000 especies. Tiene una flor zigomorfa, con cinco pétalos distintos entre sí, los dos inferiores recubren a los dos laterales y estos a su vez al superior (Figura 2a; Rzedowski y Rzedowski, 2001; Judd *et al.*, 2002; Tucker, 2003). La subfamilia Mimosoideae incluye 3000 especies en aproximadamente

65 géneros. Las flores son actinomorfas, tiene cinco pétalos que son pequeños e iguales, los pétalos no se sobrepone ni se cubren entre sí (Figura 2b; Rzedowski y Rzedowski, 2001; Judd *et al.*, 2002; Tucker, 2003). La subfamilia Papilionoideae (Faboideae) está conformada por 12,000 especies, 450 géneros y 30 tribus. Tiene flores zigomorfas, que presentan cinco pétalos desiguales. Uno de ellos se diferencia perfectamente del resto por su tamaño, forma y coloración. Este recibe el nombre de estandarte y se encuentra por encima de los pétalos laterales. Los pétalos laterales son similares entre sí y son llamados alas. Los últimos dos pétalos son inferiores y se encuentran fusionados formando una estructura llamada quilla que envuelve a los estambres y al pistilo. La quilla se encuentra recubierta por las alas. Este tipo de flor es llamada papilionada (Figura 2c; Rzedowski y Rzedowski, 2001; Judd *et al.*, 2002; Tucker, 2003).



Figura 2. Arreglo de los tres diferentes tipos de flor de la familia Fabaceae correspondientes a las subfamilias Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae.

La subfamilia Papilionoideae es considerada como la más importante económicamente por lo que se ha puesto mayor atención en su estudio. En análisis previos de *rbcL* (Doyle *et al.*, 1997) se identificaron varios clados mayores dentro de la subfamilia los cuales han sido sujetos a estudios de forma individual. Uno de ellos corresponde a la clasificación de Polhill (1981), en él se encuentran las herbáceas que se distribuyen en regiones templadas y acumulan

canavanina. Las tribus que lo integran son las siguientes: Carmichaelieae, Cicereae, Hedysareae, Trifolieae, Vicieae y Galageae (Lavin *et al.*, 1990).

Todas las tribus que corresponden a la clasificación de Polhill (1981) presentan la pérdida de una repetición invertida (IR por sus siglas en inglés) del DNA del cloroplasto (Lavin *et al.*, 1990; Wojciechowski *et al.*, 2004). De manera característica el genoma del cloroplasto tiene dos copias de los genes para la producción de RNA de transferencia. Los dos juegos de genes son secuencias repetitivas idénticas pero con orientación invertida y se conoce a cada uno como repetición invertida. El clado al que pertenece este grupo de leguminosas se conoce como clado que carece de la repetición invertida (IRLC por sus siglas en inglés) y es considerado como el primero en las leguminosas en distinguirse por una sinapomorfía molecular (Lavin *et al.*, 1990; Wojciechowski *et al.*, 2000).

De las tribus mencionadas anteriormente, la tribu Galageae tiene aproximadamente 20 géneros, la mayoría se encuentran restringidos al Viejo Mundo exceptuando *Astragalus* y *Oxytropis* y actualmente otros géneros que han sido recientemente introducidos a regiones geográficas de América (Sanderson, 1991). El género *Astragalus* es el más numeroso de la tribu Galageae y ha sido objeto de varios estudios de carácter taxonómico y sistemático (Gray, 1864; Jones, 1923; Rydberg, 1929; Barneby, 1964; Podlech, 1984). Estos trabajos utilizaban sólo caracteres morfológicos, pero actualmente son utilizados en conjunto con caracteres moleculares, citológicos, bioquímicos y biogeográficos (Williams y James, 1975; Sanderson, 1991; Wojciechowski *et al.*, 1999).

El género *Astragalus*

El género *Astragalus* es considerado el más rico dentro de las leguminosas (Gómez-Sosa, 1979) y el más numeroso de las plantas con flor. Se estima que lo conforman entre 2500 y 3000 especies (Podlech, 1986; Lock y Simpson, 1991) que se distribuyen en regiones frías y áridas de casi todo el mundo, exceptuando Australia y Nueva Zelanda (Gómez-Sosa, 1979). En Norteamérica se estiman 400 a 450 especies y en los Andes de Sudamérica hay aproximadamente 100, pero es especialmente diverso en Asia con 1000 a 1500 especies (Wojciechowski *et al.*, 1999).

Su alta diversidad en Asia sugiere que el género tuvo como centro de diversificación geográfico las regiones templadas del Viejo Mundo (Lavin *et al.*, 1990), en especial el sureste y centro de Asia (Sanderson y Doyle, 1993). Lo anterior no se ha podido comprobar por la carencia de un registro fósil del género.

Morfológicamente las plantas de *Astragalus* pueden ser anuales y herbáceas o perennes y subarborescentes. Las estípulas tienen una forma triangular o lanceolada, con una textura foliácea o papirácea; pueden estar libres o fusionadas generalmente con el borde ciliado. En el género predomina la hoja imparipinnada que puede ser peciolada o sésil; los folíolos son lineares o linear-elípticos con el margen entero; son variables en número y están dispuestos en pares a lo largo del raquis. La inflorescencia de todos los *Astragalus* se encuentra en racimos axilares. El largo del pedúnculo es variable como el número, densidad y orientación de las flores. Las flores son pequeñas y acompañadas de una bráctea estipuliforme. El cáliz es campanulado o cilíndrico, la corola es papilionada y de color violeta, púrpura, blanquecina, amarillenta o rosa. Las alas son de forma variable y la quilla tiene de largo lo mismo que las alas. Los estambres son diadelfos; el ovario puede ser linear o elíptico con uno o dos pares de

óvulos. El fruto es una legumbre variable en forma, tamaño y textura. Puede ser sésil o estipitada, dehiscente y rara vez indehiscente. En las especies del Viejo Mundo la legumbre es bilocular, mientras que en América principalmente la legumbre es bilocular pero también hay semibilocular o unilocular. Las semillas son reniformes y comprimidas lateralmente de color púrpura, verde oliváceo o café (Barneby, 1964; Rzedowski y Rzedowski, 2001; Figura 3).



a) Flores de *A. strigosus*



b) Frutos de *A. strigosus*



c) Flores de *A. hypoleucus*



Figura 3. Fotografías de algunas especies del género *Astragalus*



d) Frutos de *A. hypoleucus*



e) Flores y fruto de *A. guatemalensis* var. *lozani*

Figura 3 (cont.). Fotografías de algunas especies del género *Astragalus*



f) Planta de *A. mollissimus* con flores



g) Frutos de *A. mollissimus*

Figura 3 (cont.). Fotografías de algunas especies del género *Astragalus*

Astragalus ha sido sujeto a estudios taxonómicos en varias partes del mundo, concluyendo en monografías y revisiones como las realizadas por Gray (1864), Bunge (1868; 1869), Jones (1923), Rydberg (1929), Barneby (1964) y Podlech (1982; 1983; 1984; 1986; Cuadro 1). La clasificación subgenérica se llevó acabo de forma independiente en el Viejo Mundo y en el Nuevo Mundo. Se reconocen 150 secciones y 9 subgéneros para el Viejo Mundo (Goncharov *et al.*, 1965; Poldlech, 1986) mientras que para el Nuevo Mundo, Barneby (1964) hizo una monografía para las especies de Norteamérica que lleva como nombre *Atlas of North American Astragalus*, ésta incluye una meticulosa descripción de las especies y una clasificación formal.

Barneby (1964) dividió al género en 93 secciones y 7 informales falanges (falange es un equivalente a subgénero). Los falanges son los siguientes: Phacoid, Homaloboid, Cercidothrix, Hypoglottis, Piptoloboid, Trimeniaeus y Orophaca. Cuatro de éstos son equivalentes a subgéneros reconocidos para las especies del Viejo Mundo porque incluyen representantes de especies Euroasiáticas con distribución en Norteamérica. Los falanges Homaloboid, Piptoloboid y Orophaca son considerados por Barneby (1964) como endémicos al Nuevo Mundo porque incluyen a todas las especies confinadas a Norteamérica (Cuadro 2). Las especies de Sudamérica no tienen una clasificación formal a nivel subgénero y sección; el trabajo a nivel de especie se hizo en las revisiones de Johnston (1938; 1947) y en años recientes de Gómez-Sosa (1979; 1981; 1982; 1997; Cuadro 1).

Cuadro 1. Representación numérica de la historia taxonómica de *Astragalus* con base en las monografías y revisiones aceptadas para el género (modificado de Barneby, 1964).

Autor y Fecha	Lugar	Género	Subgénero	Sección	Especies
Gray (1864)	Norteamérica	1	2	27	115
Bunge (1868; 1869)	Viejo Mundo	1	8	105	971
Jones (1923)	Norteamérica	1	0	30	417
Rydberg (1929)	Norteamérica	28	3	82	564
Barneby (1964)	Norteamérica	1	7 falanges	93	552
Gómez-Sosa (1979)	Sudamérica	1	No hay clasificación	No hay clasificación	100

Cuadro 2. Clasificación subgenérica de las especies del Viejo Mundo (Goncharov *et al.*, 1965) y la clasificación de los falanges reconocidos para Norteamérica (Barneby, 1964). Los falanges con el * son endémicos a Norteamérica.

Subgéneros reconocidos para el Viejo Mundo	Falanges reconocidos para Norteamérica
<i>Phaca</i>	Phacoid
<i>Caprinus</i>	Homaloboid *
<i>Hypoglottis</i>	Cercidothrix
<i>Trimeniaeus</i>	Hypoglottis
<i>Tragacantha</i>	Piptoloboid *
<i>Calycophysa</i>	Trimeniaeus
<i>Cercidothrix</i>	Orophaca *
<i>Epiglotis</i>	
<i>Calycocystis</i>	

En el género *Astragalus* algunas especies tienen una dispersión de semillas limitada o las poblaciones se encuentran distribuidas de forma aislada, lo que ha contribuido a que tengan una tasa alta de especiación alopátrica (Barneby, 1964; Sanderson, 1989). Lo anterior ha ayudado de manera directa a incrementar la diversidad específica y la variabilidad morfológica del género, especialmente en los caracteres vegetativos y la estructura del fruto (Sanderson, 1991). Entre los caracteres vegetativos más variables encontramos el tamaño de la planta, el tamaño y número de las flores, el color de la corola, el tipo de pubescencia, el tamaño, la textura y la forma del fruto (Barneby, 1964).

Importancia económica y ecológica de algunas especies de *Astragalus*

Las especies de *Astragalus* son comúnmente conocidas como “hierba loca”, “chinchines” o “sonadoras” (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Varias especies del género se han utilizado desde la antigüedad en la medicina tradicional china, en la cual se receta la raíz y se ha probado que ésta tiene compuestos que funcionan como inmunoestimulantes, hepatoprotectores, diuréticos, antidiabéticos, analgésicos, expectorantes y sedantes. El estudio de las propiedades farmacológicas y su aplicación clínica no había sido abordado hasta recientemente (Dong *et al.*, 2003).

Las especies patagónicas son utilizadas como forraje antes de la producción de frutos, porque una vez que maduran las semillas se vuelven peligrosas por el alto grado de compuestos tóxicos que presenta su testa (Gómez-Sosa, 1979). Se ha estudiado la toxicidad de los nitrocompuestos que tienen los *Astragalus* y se detectó que los rumiantes son particularmente sensibles a éstos, pero el grado de toxicidad depende de la cantidad consumida

y la composición de los nitrocatalizadores absorbidos a nivel de sistema digestivo (Williams y James, 1975).

En México, especies como *Astragalus guatemalensis* var. *brevidentatus* se utilizan como forraje. El ganado de pastoreo cerril consume la planta completa. *Astragalus mollissimus* es considerada una de las plantas tóxicas más importantes del desierto de Chihuahua. Se ha estudiado para reducir los daños a la ganadería (Melgoza *et al.*, 2003). Se sabe que generalmente las poblaciones de *A. mollissimus* se presentaban en densidades bajas, pero en 1992 un incremento de las poblaciones causó problemas económicos a la ganadería, primero por la pérdida de ganado, ya que éste moría a causa de la intoxicación y segundo porque el ganado se tenía que cambiar de lugar para evitar que consumiera la planta (Melgoza *et al.*, 2003).

Problemas taxonómicos del género *Astragalus*

Astragalus ha sido denominado por varios autores como un grupo taxonómicamente difícil (Jones, 1923; Barneby, 1964; Sanderson, 1991). Esto por el gran número de especies que presenta y por la dificultad para delimitarlas y clasificarlas. Los caracteres morfológicos más utilizados para diferenciar a las especies son los caracteres vegetativos, como la forma de la raíz, el tipo de pubescencia, la forma del tallo y de las estípulas, el tamaño y número de los folíolos en las hojas, el tamaño y forma de la inflorescencia, las bractéolas, el cáliz y la corola (Barneby, 1964). *Astragalus* es uno de los pocos géneros que presentan una gran variabilidad morfológica en el fruto por lo que se ha puesto un mayor interés en su forma, tamaño, curvatura, compresión y el número de lóculos para clasificar a las especies. Pero al ser tantas

especies, los caracteres morfológicos pueden resultar confusos al momento de determinar de que especie se trata.

Como resultado de lo anterior uno de los problemas taxonómicos más frecuentes en el género son las sinonimias a nivel de especie, debido a que resulta difícil diferenciar a las especies entre sí y de otras especies de géneros relacionados, como son *Phaca* y *Oxytropis* (Sanderson, 1991; Wojciechowski *et al.*, 1999). Además, las características morfológicas aisladas de algunas especies han llevado a la segregación de secciones monotípicas y en ocasiones hasta de nuevos géneros, por lo que en el género se han redescrito varias especies obscureciéndose así las relaciones intergenéricas e intragenéricas (Wojciechowski *et al.*, 1999).

División del género *Astragalus* con base en datos citológicos

Algunos estudios citológicos de *Astragalus* se han realizado tanto en especies de Asia y Europa como de Norteamérica y Sudamérica (Ledingham, 1957; 1960; Ledingham y Rever, 1963; Ledingham y Fahselt, 1964; Ledingham y Pepper, 1973; Spellenberg, 1974; 1976). Con base en evidencia citológica el género se ha dividido en dos grupos, el primer grupo formado por las especies que se distribuyen en el Viejo Mundo, las cuales tienen como número cromosómico básico $n = 8$ y los euploides son comunes (múltiplos del número básico; Ledingham, 1960; Spellenberg, 1976). En el segundo grupo se encuentran las especies de *Astragalus* con distribución en el Nuevo Mundo. Éstas tienen una línea cromosómica multibásica $n = 11, 12, 13, 14$ y 15 y son aneuploides (no hay número básico ni múltiplos de éste; Ledingham, 1960; Spellenberg, 1976). Se han encontrado especies con $n = 8, 16$ y 24 en Norteamérica. Éstas especies tienen una distribución circumboreal y han sido consideradas

como de reciente migración. Pertenecen a los falanges considerados en Norteamérica equivalentes a los subgéneros del Viejo Mundo (Barneby, 1964; Wojciechowski *et al.*, 1993).

Existen varias hipótesis que tratan de explicar el origen de las especies aneuploides del Nuevo Mundo. Una especula que el número cromosómico $n = 11, 12$ de las especies del Nuevo Mundo, pueden ser triploides derivados por hibridación entre diploides y tetraploides de especies con $n = 8$ (Vilkomerson, 1943). Ledingham (1957) propuso que el número cromosómico $n = 11$ y 13 pudo ser una modificación de $n = 12$ y comentó la posibilidad de que el número cromosómico básico fue $n = 4$. Sin embargo esto no es tan aceptado porque casi todas las especies euploides del Viejo Mundo tienen como número cromosómico base $n = 8$. La hipótesis que mejor explica el origen de las especies aneuploides, es la que propone que éstas se originaron de una serie diploide que descendió de un tetraploide o hipotetraploide derivado de $n = 8$ que es el número común de la tribu Galageae (Barneby, 1964; Ledingham y Pepper, 1973; Spellenberg, 1976).

La sección *Strigulosi* pertenece al falange Homaloboid que es el más numeroso en Norteamérica. Es una sección predominantemente mexicana; se encuentra integrada por aproximadamente 25 especies, tres cuartas partes del total son endémicas a áreas templadas de México y el resto se distribuyen en Arizona y Nuevo México (Barneby, 1964). Las especies de esta sección son morfológicamente parecidas y asociadas a otras secciones más afines a el Viejo Mundo (Barneby, 1964). Presentan un $n = 11$ y 15 ; esto es importante, porque el $n = 15$ es el número cromosómico más alto encontrado en especies del Nuevo Mundo, con lo cual se apoya la hipótesis del origen aneuploide a partir de diploides derivados de tetraploides o hipotetraploides de $n = 8$ (Spellenberg, 1974; Spellenberg, 1976).

Sanderson (1991) sugirió que las especies de Sudamérica pudieron derivar de las especies de Norteamérica, pertenecientes a las siguientes secciones: *Strigulosi*, *Miselli*,

Leptocarpi, *Hypoleuci* y *Micranthus*; porque varias especies sudamericanas presentan una combinación única de algunos caracteres encontrados en las especies de Norteamérica pertenecientes a las secciones antes mencionadas. Como son un número cromosómico $n = 13$ ó 14 y estípulas connadas, que son mucho más comunes en Sudamérica. Estos datos, en conjunto con recientes estudios filogenéticos de caracteres morfológicos y de secuencias de DNA, representan el avance en el conocimiento y entendimiento de la evolución de las especies del Nuevo Mundo.

La división del género en dos grupos con base en el número cromosómico no es apoyada por los datos morfológicos, porque existen varias similitudes morfológicas consideradas como problemáticas entre las especies del Viejo Mundo con las del Nuevo Mundo. Un ejemplo de esto es el largo y estrecho fruto de la sección *Leptocarpi* de Norteamérica que es idéntico a la sección *Bucera* del Viejo Mundo (Sanderson, 1991).

Estudios recientes de las relaciones filogenéticas de *Astragalus*

Varios investigadores recientemente se han interesado en el estudio del género haciendo uso de datos morfológicos y moleculares. Sanderson (1991) realizó un análisis cladístico a 113 especies y variedades de *Astragalus* de Norteamérica, con base en 24 caracteres morfológicos vegetativos, siete correspondían a la inflorescencia y flor, 23 al fruto, dos bioquímicos y uno citológico. Como conclusión, él reconoció algunas secciones aceptadas previamente por Barneby (1964), pero no fue posible la identificación de los linajes mayores de *Astragalus* utilizando solamente este tipo de caracteres.

El uso de datos moleculares ha permitido el planteamiento de nuevas hipótesis acerca de las relaciones filogenéticas entre las especies de *Astragalus*, así como su relación con otros géneros, con los que es cercanamente relacionado. Wojciechowski *et al.* (1993) hicieron un

análisis cladístico utilizando secuencias de DNA de la región del ITS para 26 especies de *Astragalus*. De éstas, 14 eran especies aneuploides de Norteamérica, ocho especies euploides del Viejo Mundo y cuatro euploides con distribución en Norteamérica. Los resultados concluyeron con una filogenia bien resuelta. Se aceptó la división del género en dos grupos, el de las especies aneuploides de Norteamérica que es monofilético y nombrado por los autores como “Neo-Astragalus” y el de las especies euploides del Viejo Mundo que es parafilético.

Sanderson y Doyle (1993) utilizaron datos de la variación de los sitios de restricción pertenecientes al DNA del cloroplasto, para analizar 58 especies aneuploides y dos euploides de Norteamérica y una especie de *Oxytropis* como grupo externo. En sus resultados apoyan la monofilia del grupo aneuploide y reconocen otro subclado monofilético integrado por las especies de *Astragalus* correspondientes al falange Piptoloboid con flores grandes y frutos deciduos aceptado por Barneby (1964). Las especies restantes del falange Piptoloboid y del falange Homaloboid forman un grupo parafilético en el clado aneuploide de Norteamérica.

Liston y Wheeler (1994) investigaron la posición filogenética del género *Astragalus* dentro de la tribu Galageae, mapeando los sitios de restricción de los genes *rpoC1* y *rpoC2* del cloroplasto. En este trabajo se muestrearon un total de 51 especies pertenecientes a la tribu Galageae y tribus cercanamente relacionadas. De las especies muestreadas 28 pertenecían a *Astragalus*, representando nueve de los diez subgéneros del Viejo Mundo y cinco de los siete falanges de Norteamérica y dos especies de Sudamérica. Las especies de *Astragalus* formaron un grupo monofilético. El incluir varios representantes de otros géneros de la tribu Galageae ayudó a fortalecer la hipótesis de la monofilia del género. No se identificó el grupo hermano de *Astragalus*, pero dentro del género se apoyó también la monofilia de “Neo-Astragalus”, que fue soportada sólo por la pérdida de un sitio de restricción. Las especies de Sudamérica se encontraron en el grupo de aneuploides del Nuevo Mundo. Ésto fue congruente con la

morfología y citogenética porque algunas especies de Norteamérica, como es el caso de *A. wrightii*, pueden relacionarse con especies de linaje sudamericano (Liston y Wheeler, 1994).

Wojciechowski *et al.* (1999) analizaron un total de 138 secuencias de *Astragalus* pertenecientes a la región del ITS y el intrón *trnL*, un número mucho mayor en comparación a trabajos previos. Para su muestreo consideraron como variante de interés el número cromosómico e incluyeron 89 especies de Norteamérica representando los siete falanges reconocidos por Barneby (1964) y 38 especies del Viejo Mundo correspondientes a los nueve subgéneros, además de 11 especies sudamericanas. Como grupo externo se utilizaron 24 especies de 12 géneros cercanamente relacionados con *Astragalus*. En sus resultados, cinco especies de *Astragalus* (*A. complanatus*, *A. sinicus*, *A. cysticalyx*, *A. epiglottis* y *A. vogelii*) se relacionaron con especies de los géneros utilizados como grupo externo y dan una explicación con base en datos morfológicos del porque estas especies no deben ser consideradas como *Astragalus*. También se soporta la monofilia de *Astragalus* y su división en dos grupos: El grupo del Viejo Mundo que es parafilético por contener a el subgénero “*Astracantha*” y el grupo monofilético del Nuevo Mundo (“Neo-*Astragalus*”; Figura 4). Los datos moleculares indicaron que las especies de “*Astracantha*”, las cuales se consideraban como un grupo fuera de *Astragalus*, deben ser incluidas en el género, aunque esto no es apoyado por los datos morfológicos. El consenso de mayoría correspondiente a “Neo-*Astragalus*” fue poco resuelto. Sólo dos de los clados tenían más de tres taxa. El primero identificado como clado “F” fue no resuelto y estuvo conformado por ocho especies sudamericanas y dos de Norteamérica (sección *Leptocarpi*; Figura 5). El segundo clado llamado “G”, fue integrado por dos especies sudamericanas y algunas especies de Norteamérica pertenecientes al falange Piptoloboid Pacífico. Este clado presentó una similitud morfológica en la forma del fruto que es unilocular e inflado en todas las especies (Barneby, 1964). El resto de las especies fueron poco resueltas

dentro de “Neo-Astragalus” (Figura 5). Este trabajo es el que hasta el momento refleja mejor las relaciones filogenéticas dentro del género, pero aún faltan muchas especies que agregar tanto de Norteamérica como de Sudamérica.

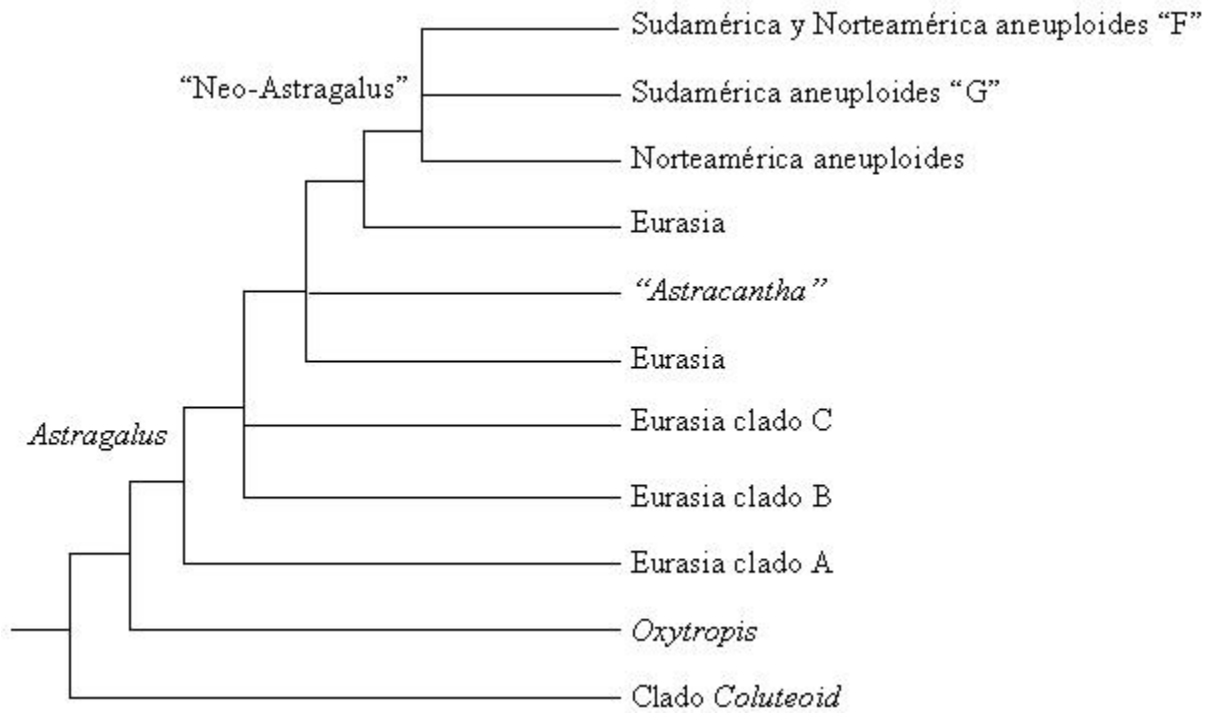


Figura 4. Linajes principales y posición filogenética de *Astragalus* con respecto a otros géneros, basado en secuencias de ITS (modificado de Wojciechowski *et al.*, 1999).

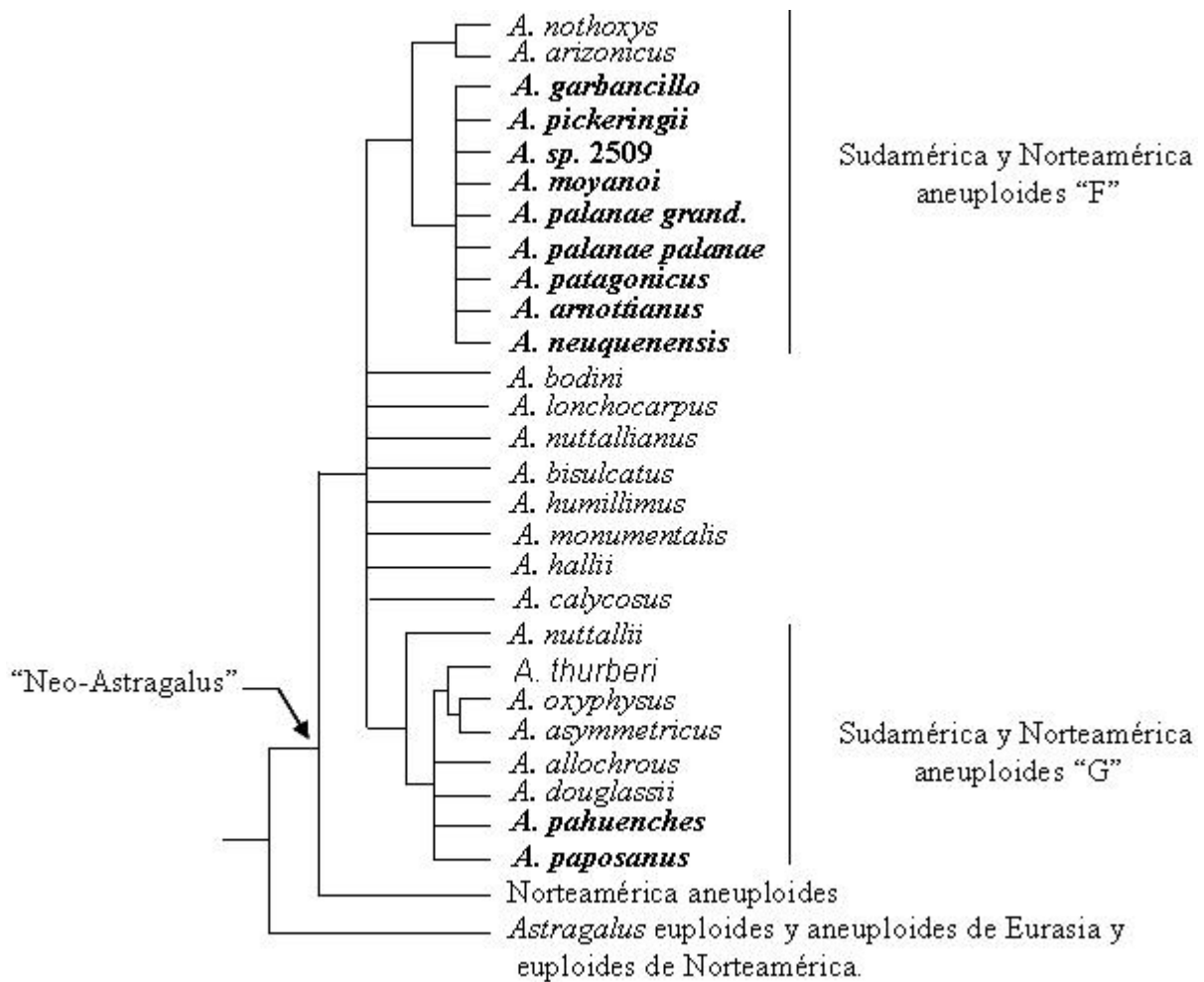


Figura. 5 Diagrama que muestra los principales linajes dentro de “Neo-Astragalus” (modificado de Wojciechowski *et al.*, 1999). Las especies en negrita son de Sudamérica.

El género *Astragalus* en México

México cuenta con aproximadamente 88 especies del género *Astragalus*, de las cuales 55 son endémicas. Las especies de México equivalen a un 4.4% del total de especies a nivel mundial (Sousa y Delgado, 1993). En todos los estados de México se encuentran distribuidas especies de *Astragalus* (Barneby, 1964). Para el Valle de México Rzedowski y Rzedowski (2001) reportaron 12 especies de *Astragalus* (Cuadro 3).

Las especies de *Astragalus* reportadas en el Valle de México son integrantes de dos de los tres falanges considerados endémicos a Norteamérica, estos son el falange Homaloboid y el falange Piptoloboid. Las especies del falange Homaloboid presentan una legumbre persistente (Barneby, 1964). Es el falange más grande de Norteamérica, comprende 46 secciones y 177 especies, las cuales se distribuyen en Norteamérica, con excepción de algunas con posible distribución en Sudamérica (*A. salicetorum* y *A. chamissonis*). El falange Piptoloboid se caracteriza por tener una legumbre decidua combinada con estípulas libres y número cromosómico $n = 11$ y 14 (Barneby, 1964). Es el segundo falange más grande de Norteamérica compuesto por 35 secciones y 170 especies.

De las 12 especies reportadas para el Valle de México una pertenece a la sección *Quinqueflori* (*A. aff. quinqueflorus*) y siete a la sección *Strigulosi*, ambas secciones del falange Homaloboid. Más del 50% de las especies de la sección *Strigulosi* son endémicas a las regiones templadas de México. Las especies presentan una legumbre semibilocular, persistente y péndula, con excepción de *A. pueblae* y *A. microcymbus*. Las cinco especies restantes pertenecen al falange Piptoloboid y a las secciones *Mollissimi*, *Inflati*, *Leptocarpi* e *Hypoleuci* (Cuadro 3). La mayoría de las especies tienen un área restringida de distribución y varias sólo son conocidas en la localidad tipo (Barneby, 1964).

Cuadro 3. Especies reportadas para el Valle de México, con el falange y la sección a la que pertenecen (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Nombre de la Especie	Falange	Sección
<i>Astragalus guatemalensis</i> Hemsl.	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>
<i>Astragalus lyonnetii</i> Barneby	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>
<i>Astragalus micranthus</i> Desv.	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>
<i>Astragalus tolucanus</i> B.L. Rob. & Seaton	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>
<i>Astragalus strigosus</i> H.B. & K.	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>
<i>Astragalus oxyrrhynchus</i> Hemsl.	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>
<i>Astragalus radicans</i> Humb. ex Hornem.	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>
<i>Astragalus quinqueflorus</i> S. Watson	Homaloboid	<i>Quinqueflori</i>
<i>Astragalus hypoleucus</i> S. Schauer	Piptoloboid	<i>Hypoleuci</i>
<i>Astragalus nuttallianus</i> DC.	Piptoloboid	<i>Leptocarpi</i>
<i>Astragalus wootonii</i> var. <i>candollianus</i> (H.B. & K) Barneby	Piptoloboid	<i>Inflati</i>
<i>Astragalus mollissimus</i> var. <i>irolanus</i> (M. E. Jones) Barneby	Piptoloboid	<i>Mollissimi</i>

Concepto filogenético de especie

De las categorías jerárquicas: género, familia, tribu, entre otras, la especie se considera como la más importante y representa la unidad básica de varias ramas de la biología, entre éstas la taxonomía, la sistemática, la ecología y biología evolutiva (Crisci, 1994). Es difícil establecer un concepto de especie que sea universalmente aceptado. La elección de un concepto de especie depende de varios aspectos. Algunos de los más importantes son: el

enfoque del autor, la pregunta que se plantea y se desea dar respuesta, el organismo con el que se trabaja y las necesidades prácticas inmediatas que se tienen (Crisci, 1994; Luna, 1994).

Se reportan varios conceptos de especie. El concepto biológico probablemente es el más aceptado, pero existen otros como es el concepto filogenético de especie, el cual Cracraft (1983) lo define de la siguiente manera: “Una especie es el grupo más pequeño de organismos individuales diagnosticables, dentro del cual existe un patrón parental de ancestría y descendencia”. Este concepto es uno de los más citados, pero existen variantes y todas coinciden en que las especies que componen un grupo sean monofiléticas y que se puedan diferenciar de otras por uno o varios caracteres (Haro, 1999).

El concepto filogenético de especie tiene varias ventajas que apoyan su uso: 1) no depende de la reproducción para probarse, 2) permite un análisis más objetivo de la especiación, 3) al tener una base evolutiva facilita la recuperación de la filogenia, 4) es apropiado para taxa con distribución alopátrica y 5) funciona para todos los organismos y en todas las situaciones. Pero del mismo modo tiene puntos en contra, algunos de éstos son: 1) con este concepto se pueden llegar a reconocer muchas especies y 2) no incluye criterios biológicos (Luna, 1994).

Al utilizar el concepto filogenético para la delimitación de especies, se requiere que una especie filogenética pueda ser diagnosticable por una combinación única de estados de carácter. Todos los individuos comparables de una especie filogenética deben tener todos los caracteres (apomorfías) de esa especie para poder decir que pertenecen a ella (Davis y Nixon, 1992; Brower, 1999).

Al investigar las relaciones filogenéticas de varios individuos de diferentes poblaciones mediante análisis cladísticos de secuencias de DNA y tomando en cuenta el concepto filogenético de especie, tenemos que si dos o más individuos comparten todas las

apomorfías de una especie y forman un grupo monofilético en una filogenia, se pueden considerar como de la misma especie. Pero si dos o más individuos forman un grupo parafilético porque no presentan una apomorfía con respecto a otra especie, es más difícil delimitar a las especies, porque aunque no sean un grupo monofilético, los individuos están como grupos contiguos y se pueden considerar como una misma especie.

En cambio, si los individuos se encuentran en diferentes partes de la filogenia, es decir, en un grupo polifilético se pueden considerar como especies diferentes independientemente de si comparten algunas apomorfías o no. Si se consideran los individuos como una misma especie, tomando como referencia los criterios anteriores, la hipótesis puede ser apoyada con otro tipo de datos como son: los morfológicos, biogeográficos, bioquímicos, citológicos y ecológicos.

La región del espaciador interno transcrito (ITS) perteneciente al DNA ribosomal del núcleo

En sistemática molecular muchos trabajos han utilizado como marcadores moleculares las regiones de DNA del núcleo que codifican para RNA ribosomal. El DNA ribosomal en el núcleo de los eucariontes está presente en cientos o miles de copias, separadas por el espaciador intergenérico (IGS) que no se transcribe (Figura 6; Soltis y Soltis, 1998). Dos regiones integran el DNA ribosomal, una región codificadora y una región que no codifica pero se transcribe. Las región codificadora la integran la subunidad pequeña (18S), el gen 5.8S y la subunidad grande (26S). La región no codificadora incluye tres espaciadores, el espaciador externo transcrito (ETS), el espaciador interno transcrito 1 (ITS-1) y el espaciador interno transcrito 2 (ITS-2). Estos espaciadores se degradan durante el procesamiento del RNA (González, 1997) y al parecer juegan un papel en la maduración de los rRNAs del núcleo (Soltis y Soltis, 1998). Las regiones codificadoras y los espaciadores en conjunto

forman el precursor del RNA ribosomal (González, 1997). Los espaciadores designados como ITS-1 e ITS-2 se encuentran entre la subunidad pequeña (18S) y la subunidad grande (26S) y están separados por el gen 5.8S (Figura 6).

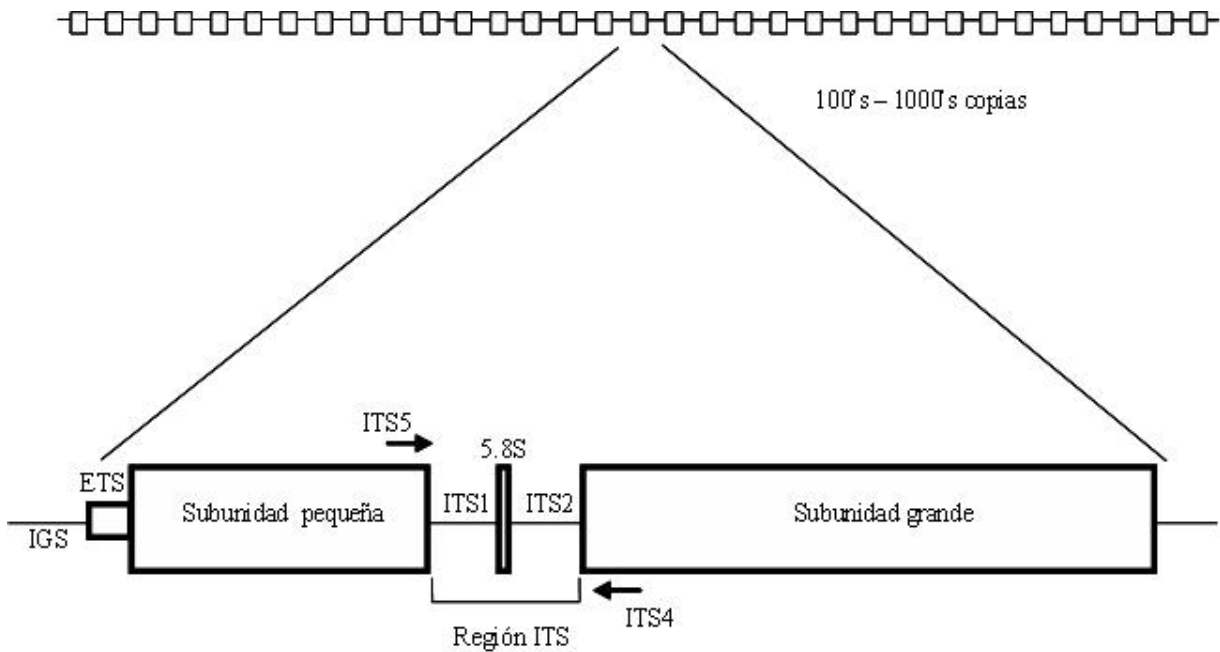


Figura 6. Región del ITS del DNA ribosomal del núcleo

Utilidad filogenética de la región del ITS

La región del ITS comprende el ITS-1, el gen 5.8S y el ITS-2. Los ITS-1 e ITS-2 tienen varias características que permiten utilizarlos para análisis filogenéticos en el grupo de las Angiospermas a nivel de especie y género (Baldwin *et al.*, 1995; Soltis y Soltis, 1998). En el genoma nuclear de las plantas la región del ITS es altamente repetida y existen “primers” universales que permiten utilizar esta región como marcador molecular en varios grupos de organismos (White *et al.*, 1990). Estas características hacen que la región del ITS sea relativamente fácil de amplificar y secuenciar. Otra característica importante es su tamaño. Es

considerada como una región pequeña y uniforme dentro de las plantas con flor, su longitud total se encuentra entre las 600-700 pb. Se calculan aproximadamente 300 pb para cada espaciador ITS, pero dependiendo de la familia de plantas el ITS-1 puede ser mayor o menor y potencialmente más informativo que el ITS-2 (Baldwin *et al.*, 1995). Los espaciadores ITS son más variables en comparación con las regiones codificadoras que están conservadas (Bult y Zimmer, 1993).

En *Astragalus* ha ayudado a mejorar la resolución de las relaciones filogenéticas entre las especies, siendo los resultados congruentes con su biogeografía y brindando un fuerte soporte a la monofilia del género y a la monofilia de las especies aneuploides pertenecientes al Nuevo Mundo (“Neo-Astragalus”). El ITS es considerada una región prometedora para continuar los estudios en *Astragalus* como en otros grupos de plantas. Sin embargo, no pudo resolver las relaciones filogenéticas dentro del grupo aneuploide del Nuevo Mundo (Wojciechowski *et al.*, 1999).

JUSTIFICACION

Este trabajo se realizó debido a que los estudios filogenéticos utilizando datos moleculares del género *Astragalus* sólo pueden incluir un número reducido de representantes respecto al total por la gran cantidad de especies que integran el género y los lugares restringidos en los que se distribuyen algunas especies. Las especies mexicanas del género *Astragalus* no han sido incluidas en una filogenia molecular. Es importante incluirlas con el fin de ampliar el muestreo del género y comprender la relación de las especies mexicanas con las de otras partes del mundo y las relaciones intraespecíficas para poder delimitar a las especies del género.

OBJETIVOS

Objetivo general

Incluir en una filogenia molecular algunas especies de *Astragalus* distribuidas en el centro de México y determinar su posición filogenética con relación a otras especies de distintas partes del mundo.

Objetivos específicos

Determinar si las especies mexicanas pertenecen al grupo monofilético del Nuevo Mundo (clado “Neo-Astragalus”) o al grupo del Viejo Mundo.

Determinar si las especies de la sección *Strigulosi* forman un grupo monofilético.

Identificar qué caracteres tradicionales (morfología, distribución, cariotipos) pueden ser utilizados para apoyar las relaciones inferidas con secuencias de DNA.

Delimitar a algunas de las especies que se distribuyen en el centro de México utilizando los resultados de las secuencias del ITS.

MATERIALES Y MÉTODO

Colecta del material biológico

De las 12 especies reportadas para el Valle de México (Cuadro 3), se recolectaron nueve en algunos estados del centro de México, éstos fueron Hidalgo, Tlaxcala, San Luis Potosí, Querétaro y el Estado de México (Cuadro 4). Las especies *A. radicans* y *A. oxyrrhynchus* no fueron recolectadas debido a que existen pocas colectas en los herbarios y los datos de colecta son escasos lo que no permitió localizar ninguna población. La especie *A. esperanzae* no es reportada para el Valle de México por Rzedowski y Rzedowski (2001), pero se encontró una población en San Luis Potosí (centro de México) y se agregó esta especie al análisis porque pertenece a la sección *Strigulosi*.

De las especie *A. guatemalensis*, *A. lyonnetii*, *A. strigulosus*, *A. micranthus* y *A. hypoleucus* se llevó a cabo la recolecta en más de una población. La localidad y los datos de colecta de las especies recolectadas se reportan en el Cuadro 5 y se muestran también los mapas de la ubicación geográfica de las poblaciones (Figura 7).

Identificación y depósito del material biológico

Se recolectaron tres ejemplares por especie y se identificaron morfológicamente, mediante las claves de Rzedowski y Rzedowski (2001) y Barneby (1964). Posteriormente se depositaron muestras de cada especie recolectada en el herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU). También se colectó tejido foliar que fue depositado en sobres de papel. Los sobres se almacenaron a -80 °C para conservar del tejido hasta el momento de la extracción de DNA.

Cuadro 4. Nombre de las especies recolectadas, falange al que pertenecen y la sección. Se reporta también el número cromosómico (Spellenberg, 1976).

Especie	Falange	Sección	Número cromosómico
<i>Astragalus guatemalensis</i>	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	n = 15
<i>Astragalus strigulosus</i>	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	n = 15
<i>Astragalus lyonnetii</i>	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	No disponible
<i>Astragalus micranthus</i>	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	No disponible
<i>Astragalus esperanzae</i>	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	No disponible
<i>Astragalus tolucanus</i>	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	No disponible
<i>Astragalus</i> aff. <i>quinqueflorus</i>	Homaloboid	<i>Quinqueflori</i>	n = 11
<i>Astragalus hypoleucus</i>	Piptoloboid	<i>Hypoleuci</i>	n = 14
<i>Astragalus mollissimus</i>	Piptoloboid	<i>Mollissimi</i>	n = 11
<i>Astragalus wootonii</i>	Piptoloboid	<i>Inflati</i>	n = 11

Cuadro 5. Localidad y datos de colecta de las especies recolectadas en algunos estados del centro de México. Entre paréntesis se reporta por sección el número de especies recolectadas y el número de especies reconocidas por Barneby (1964).

<i>Taxón y sección</i>	Localidad	Datos de colecta	Número de colecta
Sección <i>Strigulosi</i> Jones (6/25)			
<i>Astragalus guatemalensis</i> var. <i>lozani</i> M. E. Jones	Epazoyucan, Hidalgo	N 20°6'44'' O 98°36'20'' 2696m	ESH 1
<i>Astragalus guatemalensis</i> var. <i>brevidentatus</i> M. E. Jones	Temascaltepec, Edo. de México	N 19°4'51'' O 100°4'18'' 2191m	ESH 43
<i>Astragalus lyonnetii</i> Barneby	Pachuca, Hidalgo	N 20°5'41'' O 98°42'38'' 2432m	ESH 2
<i>Astragalus lyonnetii</i> Barneby	Epazoyucan, Hidalgo	N 20°0.0'30'' O 98°38'35'' 2460m	ESH 33
<i>Astragalus strigosus</i> H.B. & K.	Zempoala, Hidalgo	N 19°56'24'' O 98°36'58'' 2554m	ESH 11
<i>Astragalus strigosus</i> H.B. & K.	Epazoyucan, Hidalgo	N 20°3'36'' O 98°36'14'' 2700m	ESH 31
<i>Astragalus strigosus</i> H.B. & K.	Tulancingo, Hidalgo	N 19°52'24'' O 98°39'44'' 2400m	MGL 1457
<i>Astragalus tolucanus</i> B. L. Rob. & Seaton	Nevado de Toluca, Edo. de México	N 19°8'51'' O 99°48'32'' 3544m	ESH 14
<i>Astragalus esperanzae</i> M. E. Jones	Corralejo, San Luis Potosí	N 22°40'7'' O 100°25'4'' 2014m	ESH 24

<i>Astragalus micranthus</i> Desv.	Zempoala, Hidalgo	N 20°30'7'' O 98°38'15'' 2486m	ESH 10
<i>Astragalus micranthus</i> Desv.	Calpulalpan, Tlaxcala	N 19°34'30'' O 98°32'42'' 2591m	ESH 19
<i>Astragalus micranthus</i> Desv.	Autopista de cuota México-Puebla Edo. de México	N 19°19'11'' O 98°43'32'' 3154m	ESH 39
<i>Astragalus micranthus</i> Desv.	Municipio San José, Hidalgo	N 19°40'58'' O 98°34'33'' 2500m	ESH 48
<i>Astragalus micranthus</i> Desv.	Amecameca- Pahuacan Edo. de México	N 19°03'46'' O 98°47'57'' 2540m	DSG 570

Sección *Hypoleuci* Barneby (1/1)

<i>Astragalus hypoleucus</i> S.Schauer	Xolostitla, Hidalgo	N 20°3'46'' O 98°38'29'' 2477m	ESH 4
<i>Astragalus hypoleucus</i> S.Schauer	Puente del Tepozán, Querétaro	N 20°53'29'' O 99°39'14'' 2268m	ESH 45
<i>Astragalus hypoleucus</i> S.Schauer	Vizarrón, Querétaro	N 20°47'23'' O 99°43'28'' 2220m	ESH 46
<i>Astragalus hypoleucus</i> S. Schauer	Tulancingo, Hidalgo	N 19°52'24'' O 98°39'44'' 2400m	MGL 1456

Sección *Mollissimi* Gray (1/2)

<i>Astragalus mollissimus</i> var. <i>irolanus</i> (M. E. Jones) Barneby	Epazoyucan, Hidalgo	N 20°00'7'' O 98°38'15'' 2500m	ESH 5
<i>Astragalus mollissimus</i> var. <i>irolanus</i> (M. E. Jones) Barneby	Epazoyucan, Hidalgo	N 20°00'7'' O 98°38'15'' 2500m	ESH 6

Sección *Quinqueflori* Barneby (1/2)

<i>Astragalus</i> aff. <i>quinqueflorus</i> S. Watson	Corralejo, San Luis Potosí	N 22°40'19'' O 100°25'24'' 1945m	ESH 22
<i>Astragalus</i> aff. <i>quinqueflorus</i> S. Watson.	Corralejo, San Luis Potosí	N 22°40'7'' O 100°25'4'' 2014m	ESH 23

Sección *Inflatii* Gray (1/31)

<i>Astragalus wootonii</i> var. <i>candollianus</i> (H.B. & K) Barneby	Pachuca, Hidalgo	N 20°04'46'' O 98°43'49'' 2405m	ESH 49
--	------------------	---------------------------------------	--------

Extracción de DNA

En un mortero con pistilo se colocó aproximadamente 0.1 gr de tejido foliar y se le agregó nitrógeno líquido para molerlo y así romper las paredes celulares. Posteriormente la extracción de DNA se realizó con el Kit comercial DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN y se siguió el protocolo de extracción del fabricante. El DNA extraído se eluyó en 100 µl de Tris-EDTA. La calidad del DNA se visualizó cargando 1.5 µl por cada extracción en un gel de agarosa (1%). El DNA se almacenó a -20 °C.

Amplificación de la región del ITS

El método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se usó para amplificar la región del ITS perteneciente al nrDNA. El volumen final de los reactivos fue de 50 µl por muestra, cada una con las siguientes concentraciones: 1X buffer de PCR, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 1 µM de cada uno de los dos “primers”, 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y 1 µl de DNA genómico. Los “primers” utilizados para amplificar la región del ITS fueron ITS4 (5'-T-CCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-G-GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'; White *et al.*, 1990).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Inc.). Los ciclos de PCR se realizaron de la siguiente manera: antes de iniciar los ciclos de PCR se desnaturaliza el DNA, a una temperatura de 94 °C por tres minutos, posteriormente comienzan los 30 ciclos con una temperatura inicial de 94 °C por un minuto seguido de una temperatura de 50 °C por 50 s (asociación de los “primers”) y por último 72 °C por 80 s (la polimerasa comienza con la síntesis de la nueva hebra). Al término de los ciclos, los tubos permanecieron a una temperatura de 72 °C por cinco minutos adicionales y se enfriaron a 4 °C por 15 minutos.

Los productos de la amplificación se revisaron poniendo 2 µl por muestra en un gel de agarosa (1%) y se purificaron usando GeneClean III Kit de Q-Biogene siguiendo el protocolo de purificación del fabricante. Durante este proceso se eliminan los “primers”, el magnesio, la polimerasa y los dNTP's sobrantes al término de las reacciones. Los productos purificados se eluyeron en 31 µl de agua destilada.

Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación tuvo un volumen final de 10 μ l e incluía 6 μ l correspondientes al producto amplificado, 1 μ l del “primer” (ITS4 o ITS5) a una concentración de 2 μ M, 1 μ l de 5X buffer de secuenciación y 2 μ l de “BigDye Terminator Reaction Mix” (Applied Biosystems, Inc.). La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador en 69 ciclos de: 96 °C por 30 s, 50 °C por 15 s y 60 °C por 4 minutos. Después de terminar los ciclos se disminuye la temperatura a 4 °C por 15 minutos.

Los productos de la reacción de secuenciación fueron purificados mediante precipitación de etanol con acetato de sodio. Por cada 10 μ l de reacción de secuenciación se agregó 25 μ l de etanol al 95% y 1 μ l de acetato de sodio a 3M con un pH de 4.6. Se agitaron los tubos y se dejaron a temperatura ambiente por 25 min para que los productos se precipitaran. Se centrifugaron los tubos por 20 min a 12000 rpm. Posteriormente se desechó el líquido con una micropipeta y se agregó 150 μ l de etanol al 70%, luego se centrifugó por 5 min a 12000 rpm. Nuevamente se desechó el líquido y fueron secados en un “SpeedVac” por 20 min. Los productos purificados se eluyeron con 25 μ l de “Template Supression Reagent” (Applied Biosystems, Inc.).

Los productos se secuenciaron usando el secuenciador automático ABI modelo 310 (Applied Biosystems, Inc.). Las corridas se realizaron con un capilar corto (47cm) a un tiempo de inyección de 35 s y con un tiempo de corrida de 45 minutos.

Obtención de secuencias del GenBank

Las secuencias de *Astragalus* pertenecientes al Viejo Mundo y al Nuevo Mundo, utilizadas como complemento de la matriz de las especies del centro de México se obtuvieron del GenBank. Para conocer que secuencias se encontraban disponibles se hizo una búsqueda

de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990). Esta búsqueda permitió encontrar todas las secuencias del género *Astragalus* correspondientes a la región del ITS que estaban depositadas en el GenBank y que eran similares a las secuencias de las especies del centro de México. Las secuencias habían sido publicadas por Sanderson y Wojciechowski (1996) y Wojciechowski *et al.* (1999). Las especies del Viejo Mundo en trabajos anteriores fueron establecidas como un grupo parafilético que contiene al grupo monofilético de “Neo-Astragalus” (Sanderson y Doyle, 1993; Wojciechowski *et al.*, 1993; Wojciechowski *et al.*, 1999), es por esta razón que las especies del Viejo Mundo fueron utilizadas como grupo externo en el análisis de las especies de Norteamérica, Sudamérica y el centro de México.

Matrices de las secuencias de la región del ITS

Con base en los resultados de la búsqueda de BLAST y los trabajos previos de *Astragalus* utilizando los datos de las secuencias del ITS (Sanderson y Wojciechowski, 1996; Wojciechowski *et al.*, 1999) se eligieron un total de 112 secuencias, 77 corresponden a especies con distribución en Norteamérica, 66 son especies aneuploides y 11 especies euploides; 10 son especies de Sudamérica; 25 son especies del Viejo Mundo, de las cuales 5 son aneuploides y 20 euploides. Además se agregaron 23 secuencias correspondientes a las 10 especies recolectadas en el centro de México. Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas manualmente con el programa “BioEdit Sequence Alignment Editor” (Hall, 1999). La matriz generada tuvo un total de 135 secuencias.

Para reducir el tiempo necesario para las búsquedas, se recortó la matriz eliminando las secuencias que eran idénticas y las que tenían menos de dos diferencias al ser comparadas con otras o que fueron incompletas. Esta estrategia permitió conservar los linajes principales de

Astragalus. Esta segunda matriz tuvo un total de 83 secuencias, 10 correspondían a especies del Viejo Mundo (6 euploides y 4 aneuploides), 48 de Norteamérica (42 aneuploides y 6 euploides), 7 de Sudamérica y 18 secuencias de 10 especies recolectadas en el centro de México. De éstas se conservaron algunas secuencias que fueron iguales cuando no se trataba de la misma especie, o cuando eran de la misma especie pero de diferente población.

Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa PAUP* 4.0B8 de Windows (Swofford, 2003). Las dos matrices fueron analizadas mediante una búsqueda heurística con 10000 réplicas de incorporación de taxa al azar (“random addition sequence”) e intercambio de ramas (“tree-bisection-reconnection”). Para manejar el número elevado de árboles más parsimoniosos, fueron guardados un máximo de dos árboles para cada replicado mediante los comandos “NCHUCK” y “CHUCKSCORE”. La medida de apoyo de las ramas se determinó con 10000 réplicas de remuestreo (“bootstrap”) con “simple sequence addition” y con “mulpars = no”.

A la matriz con 83 secuencias se le calculó el índice de decaimiento (Bremer, 1994). Este evalúa el soporte de las ramas en el consenso estricto e indica cuántos pasos extra a los pasos del árbol más parsimonioso se requieren para que colapse una rama en el consenso estricto. El índice de decaimiento se calculó utilizando el comando “KEEP” en PAUP*. Las ramas del consenso estricto que tuvieron los valores más altos en el número de pasos, fueron revisados calculando nuevamente los valores usando los comandos “CONVERSE” y “CONSTRAINTS”.

RESULTADOS

Caracteres morfológicos diagnósticos de las especies de *Astragalus* con distribución en el centro de México

A partir de la información obtenida de las claves taxonómicas y las descripciones de Barneby (1964) y Rzedowski y Rzedowski (2001), para la identificación de las especies del género *Astragalus* con distribución en el centro de México, se originaron los cuadros 6 y 7 en los que encuentran los caracteres morfológicos diagnósticos de cada especie recolectada.

Cuadro 6. Caracteres morfológicos diagnósticos de las hojas y flores de las especies recolectadas en el centro de México, con base en las claves taxonómicas y descripciones de Barneby (1964) y Rzedowski y Rzedowski (2001).

Nombre de la especie	Forma de los folíolos	Número de folíolos	Estípulas	Características del cáliz	Dientes	Número de flores	Color de la corola
<i>A. guatemalensis</i> var. <i>brevidentatus</i>	Oblongo-elípticos, ovales o anchamente oblanceolados	17 a 25	Submembranas de 1.5 a 9 mm de largo	Estriguloso con pelos negros rígidos y cortos	0.6 a 2.5 mm de largo	6 a 20	Rosa o púrpura
<i>A. guatemalensis</i> var. <i>lozani</i>	Oblongo-elípticos, ovales o anchamente oblanceolados	17 a 21	Submembranas de 1.5 a 9 mm de largo	Pubescente con pelos largos delgados y de color pálido	1.4 a 3 mm de largo	6 a 13	Rosa o púrpura
<i>A. strigosus</i>	Oblongo-lanceolados u oblongo-elípticos	13 a 23	Dimórficas de 3 a 9 mm de largo	Campanulado piloso	3 a 4 mm de largo	15 a 35	Blanco amarillento
<i>A. lyonnetii</i>	Oblanceolados, linear-oblongos	15 a 25	Dimórficas	Campanulado piloso	2 a 4 mm de largo	13 a 20	Blanco amarillento
<i>A. micranthus</i>	Lineares o lanceolados	19 a 27	Dimórficas	Campanulado estriguloso	0.5 a 2.5 mm de largo	30 a 60	Purpúreo o blanco amarillento
<i>A. esperanzae</i>	Linear-oblongo oblanceolados	15 a 23	Connadas amplexicaules de 2 a 6 mm de largo	Campanulado estriguloso con pelos negros	1.8 a 3 mm de largo	10 a 25	Púrpura

Cuadro 6 (cont.). Caracteres morfológicos diagnósticos de las hojas y flores de las especies recolectadas en el centro de México, con base en las claves taxonómicas y descripciones de Barneby (1964) y Rzedowski y Rzedowski (2001).

Nombre de la especie	Forma de los folíolos	Número de folíolos	Estípulas	Características del cáliz	Dientes	Número de flores	Color de la corola
<i>A. tolucanus</i>	Ovado-oblongo angostamente oblongo	19 a 25	Dimorficas de 1.5 a 2.5 mm de largo	Negro Estriguloso	3 a 4.7 mm de largo	15 a 30	Rosa o púrpura
<i>A. hypoleucus</i>	Elípticos u oblanceolados	13 a 23	Fusionadas membranosas de 1 a 5 mm de largo	Campanulado estriguloso con pelos blancos y negros	1.2 a 2.5 mm de largo	10 a 30	Blanquecino con tintes morados
<i>A. aff. quinqueflorus</i>	Lineares, Linear oblongos, distantes entre sí y canescentes	5 a 11	Deltoides de 1 a 3 mm de largo	Campanulado, pubescente	1 a 1.5 mm de largo	1 a 7 de menos de 1 cm de largo	Blanquecino con tonos morados en el ápice
<i>A. mollissimus</i>	Ovados, rómbicos elípticos densamente vellosos	11 a 35	Semiamplexicaules	Canescente de 8 a 14 mm de largo	2 a 5.5 mm de largo	7 a 45	Rosa o púrpura, lila o amarillento
<i>A. wootonii</i>	Oblanceolados, linear-oblongos	11 a 23	Libres submembranosas de 2.5 a 7 mm de largo	Campanulado, estriguloso-velloso	2 a 3.5 mm de largo	2 a 10	Blanquecino a veces con tonos rosa o lila

Cuadro 7. Caracteres morfológicos diagnósticos del fruto de las especies recolectadas en el centro de México, con base en las claves taxonómicas y descripciones de Barneby (1964) y Rzedowski y Rzedowski (2001).

Nombre de la especie	Características de la legumbre	Tamaño de la legumbre	Tamaño del estípite	Tipo de pubescencia
<i>A. guatemalensis</i> var. <i>brevidentatus</i>	Péndula, elipsoide u oblonga-elíptica, glabra o estrigulosa	12 a 21 mm de largo y 5 a 7 mm de ancho	1.5 a 2.5 mm de largo	Basifija
<i>A. guatemalensis</i> var. <i>lozani</i>	Péndula, elipsoide u oblonga-elíptica, glabra o estrigulosa	13 a 19 mm de largo y 5 a 7 mm de ancho	3.5 a 5 mm de largo	Basifija
<i>A. strigosus</i>	Péndula- elipsoidal glabra rara vez pubescente	12 a 17 mm de largo y 5 a 7 mm de ancho	2 a 4 mm de largo	Basifija
<i>A. lyonnetii</i>	Péndula, oblongo-elipsoidal, negro estrigulosa	10 a 15 mm de largo y 3.5 mm de ancho	3 mm de largo	Basifija
<i>A. micranthus</i>	Casi sésil, oblongo-elíptico, estrigulosa	5.5 a 13 mm de largo y 2 a 3.5 mm de ancho		Basifija
<i>A. esperanzae</i>	Sésil, rencurvada y linear-lanceolada	12 a 18 mm de largo y 3 a 4 mm de ancho		Basifija
<i>A. tolucanus</i>	Péndula recta, cuneada en ambos extremos, glabra o ligeramente estrigulosa con pelos negros	10 a 15 mm de largo y 4 a 6 mm de ancho	2 a 3 mm de largo	Basifija
<i>A. hypoleucus</i>	Péndula sésil, recta o ligeramente encorvada, densamente hirsuto-estrigulosa con pelos blancos y negros	7 a 12 mm de largo y 2 a 4 mm de ancho		Dolabriforme

Cuadro 7 (cont.). Caracteres morfológicos diagnósticos del fruto de las especies recolectadas en el centro de México, con base en las claves taxonómicas y descripciones de Barneby (1964) y Rzedowski y Rzedowski (2001).

Nombre de la especie	Características de la legumbre	Tamaño de la legumbre	Tamaño del estípite	Tipo de pubescencia
<i>A. aff. quinqueflorus</i>	Cortamente péndula, oblongo-elipsoidal u ovoide, recta con la base redondeada y el ápice terminado en un pico corto comprimida lateralmente y pubescente	6 a 10 mm de largo y 3 a 5 mm de ancho		Basifija
<i>A. mollissimus</i>	Sésil extendida o ascendente lanceolada-elíptica, inflada-bilocular y glabra tomentosa	9 a 25 mm de largo y 4 a 13 mm de ancho		Basifija
<i>A. wootonii</i>	Extendida colgante, sésil oblicuamente ovoide, elipsoidal o subglobosa, inflada membranosa, estrigulosa o glabra	15 a 40 mm de largo y 10 a 20 mm de ancho		Basifija

Resultados del análisis filogenético de 135 secuencias del género *Astragalus*

La matriz de 135 secuencias de la región del ITS de *Astragalus*, tuvo una longitud de 628 pb. En el análisis filogenético de los 628 caracteres totales, 254 fueron variables; de éstos, 163 fueron informativos y 91 fueron no informativos (autapomorfías). Los porcentajes de las bases fueron calculados por separado para los espaciadores ITS1 e ITS2 y el gen 5.8S (Cuadro 8).

Cuadro 8. Datos estadísticos de la región del ITS del DNA ribosomal del núcleo para el género *Astragalus*.

Parámetros	ITS1	5.8S	ITS2	Total
Longitud de la alineación	239pb	164pb	225pb	628pb
Rango de longitud en la alineación	222 - 228	164	200 - 215	586 – 607
Caracteres Variables	117	15	122	254
Caracteres informativos	84	7	72	163
Contenido de citosina y guanina (%)	0.54	0.5	0.51	0.52

La búsqueda heurística encontró 3242 árboles más parsimoniosos, con una longitud (L) de 533 pasos, un índice de consistencia = 0.64, un índice de consistencia excluyendo caracteres no informativos = 0.55 y un índice de retención = 0.82. Por lo tanto se realizó un consenso estricto que se muestra en la Figura 8. En él las especies de *Astragalus* se dividen en dos grupos, el del Viejo Mundo y el del Nuevo Mundo. El grupo del Viejo Mundo en trabajos previos se estableció como un grupo parafilético. En este trabajo no se probó la parafilia de las

especies del Viejo Mundo; en el consenso estricto presentado aquí (Figura 8) se eligió ponerlo como parafilético para ser consistente con los trabajos anteriormente realizados. Éste grupo fue integrado por las especies euploides con distribución en Norteamérica y las especies aneuploides y euploides con distribución en Eurasia.

El clado del Nuevo Mundo llamado “Neo-Astragalus” incluyó a todas las especies que se distribuyen en Norteamérica y Sudamérica y tienen un número cromosómico aneuploide. Este grupo es monofilético y la mayoría de las relaciones filogenéticas entre las especies no están resueltas, pero se encontraron tres clados resueltos con más de tres especies cada uno (Figura 8).

El clado que hasta el momento cuenta con el mayor número de especies incluye a las especies que Wojciechowski *et al.* (1999) identificaron en su trabajo dentro de un clado llamado “F”. Éste contenía dos especies de la sección *Leptocarpi* (*A. arizonicus* y *A. nothoxys*) y nueve especies sudamericanas (*A. pickeringii*, *A. garbancillo*, *A. patagonicus*, *A. arnottianus*, *A. moyanoi*, *A. palanae* var. *grandiflora*, *A. palanae* var. *palanae*, *A. neuquenensis* y una especie no identificada). En el análisis presentado aquí el clado además incluyó ocho especies recolectadas en el centro de México (representadas por 20 secuencias). De las ocho especies, seis pertenecen a la sección *Strigulosi* (*A. micranthus*, *A. strigulosus*, *A. lyonnetii*, *A. esperanzae*, *A. tolucanus* y *A. guatemalensis*) y las dos especies restantes pertenecen a la sección *Quinqueflorii* (*A. aff. quinqueflorus*) y a la sección *Hypoleuci* (*A. hypoleucus*).

Las relaciones filogenéticas dentro del clado fueron las siguientes: las especies *A. arizonicus* y *A. nothoxys* de la sección *Leptocarpi* son un grupo monofilético y hermano de las especies *A. hypoleucus* y *A. quinqueflorus*. Los cuatro individuos de *A. hypoleucus* formaron

un grupo monofilético. El grupo hermano de este clado fueron los dos individuos de *A. aff. quinqueflorus* (Figura 8).

Los cinco individuos de *A. micranthus* y los dos de *A. lyonnetii* forman un clado en donde las especies aparecen como politómicas. Los tres individuos de la especie *A. strigosus* formaron un grupo monofilético y no se relacionaron con ninguna otra especie de la sección *Strigulosi*.

La especies del centro de México pertenecientes a la sección *Strigulosi* (*A. strigosus*, *A. guatemalensis*, *A. tolucanus*, *A. micranthus*, *A. lyonnetii* y *A. esperanzae*) se encuentran en el consenso estricto sólo en este clado (Figura 8). Sin embargo, dos especies *A. rusbyi* y *A. cobrensis*, que también fueron clasificadas por Barneby (1964) en esta sección, no forman un clado con las demás especies de la sección *Strigulosi* y se encuentran como politomías en el clado de “Neo-Astragalus”.

Los dos individuos de la especie *A. guatemalensis* correspondientes a las variedades *A. guatemalensis* var. *lozani* y *A. guatemalensis* var. *brevidentatus*, no forman un clado en el árbol de consenso estricto. Los dos individuos de *A. guatemalensis* junto con *A. tolucanus*, *A. esperanzae* y las ocho especies sudamericanas se encuentran como politomías en el clado. De las especies sudamericanas sólo *A. pickeringii* y *A. garbancillo* aparecen como taxa hermanos.

Las especies *A. oxyphysus*, *A. asymmetricus*, *A. nuttallii*, *A. thurberi*, *A. douglasii*, *A. allochour* y dos especies de Sudamérica, *A. pehuenches* y *A. paposanus*, anteriormente fueron reportadas como un grupo monofilético dentro de “Neo-Astragalus” identificado por Wojciechowski *et al.* (1999) como el clado “G”. En el consenso estricto presentado aquí el segundo clado identificado dentro de “Neo-Astragalus” se encuentra conformado por dos clados resueltos (Figura 8). El clado que incluye a las especies del clado “G” reportado por Wojciechowski *et al.* (1999) y una especie más que fue *A. wootonii* del centro de México. El segundo clado fue integrado por los tres individuos de *A. mollissimus* (dos del centro de México y uno de Arizona cuya secuencia se obtuvo en el GenBank) que forman un grupo monofilético y su taxón hermano fue *A. pachypus*.

En el consenso estricto el tercer clado es monofilético y poco resuelto (Figura 8). En él se encuentran especies con distribución en Norteamérica y se pueden distinguir dos clados uno integrado por las especies *A. curvicarpus* y *A. filipes* y el otro por *A. inyoensis* y *A. monoensis*. Las demás especies (*A. collinus*, *A. alvordensis*, *A. arthuri*, *A. tetrapterus* y *A. speirocarpus*) se encuentran como politomías. El resto de las especies aneuploides de Norteamérica, se encuentran en la parte no resuelta de “Neo-Astragalus”.

El análisis de “bootstrap” apoyó varias ramas dentro de “Neo-Astragalus” (Figura 8). Sin embargo, los tres clados resueltos en “Neo-Astragalus” no fueron soportados, aunque algunos de los linajes dentro de éstos sí recibieron un valor de apoyo. Las relaciones filogenéticas mejor sustentadas fueron: el grupo de *A. hypoleucus*, *A. quinqueflorus*, *A. arizonicus* y *A. nothoxys* con un apoyo de 98%, el grupo de *A. micranthus* y *A. lyonnetii* fue soportado por un valor de 99%, el grupo de los tres individuos de *A. strigulosus* recibió un apoyo de 96% y la relación de grupos hermanos de *A. linifolius* y *A. woodruffi* fue sustentada

por un valor de 95%. Las ramas en el consenso estricto que correspondían a las especies del Viejo Mundo fueron bien apoyadas recibiendo la mayoría valores por arriba del 90%.

Este trabajo es un primer acercamiento a las relaciones filogenéticas de las especies de *Astragalus* con distribución en el centro de México. Con las recolectas realizadas se dan a conocer 21 poblaciones no reportadas y datos de colecta de 10 de las 12 especies reportadas para el centro de México.

Resultados del análisis filogenético de 83 secuencias del género *Astragalus*.

La matriz de datos que originalmente tenía 135 secuencias fue reducida a 83 secuencias de *Astragalus* con la finalidad de disminuir el tiempo para las búsquedas. Esta matriz tuvo una longitud de 616 pb, 108 caracteres informativos y 84 caracteres no informativos. La búsqueda heurística encontró 5735 árboles más parsimoniosos, con una longitud (L) de 325 pasos, un IC = 0.71, ICexc = 0.60 y el IR = 0.81.

En el consenso estricto de las 83 secuencias de *Astragalus* el grupo del Viejo Mundo está integrado por seis especies euploides de Norteamérica más cuatro especies aneuploides y seis especies euploides de Eurasia. El clado de “Neo-*Astragalus*” conservo sólo uno de los tres linajes resueltos encontrados en el análisis de las 135 secuencias de *Astragalus*.

El primer clado incluye a las especies *A. hypoleucus*, *A. aff. quinqueflorus*, *A. arizonicus* y *A. nothoxys*, a las especies de la sección *Strigulosi* del centro de México (*A. guatemalensis*, *A. tolucanus*, *A. esperanzae*, *A. strigulosus*, *A. micranthus* y *A. lyonnetii*) y cinco especies sudamericanas (*A. pickeringii*, *A. garbancillo*, *A. patagonicus*, *A. neuquenensis* y *A. moyanoi*). En este clado las relaciones filogenéticas entre las especies son las mismas que las encontradas en el consenso estricto de las 135 secuencias.

En el consenso estricto de las 135 secuencias el segundo clado encontrado que incluía dos linajes no se conserva en el análisis filogenético de las 83 secuencias. Los dos linajes se separan formando dos clados. El clado que incluye a las especies *A. oxyphyxus*, *A. asymmetricus*, *A. nuttalli*, *A. wootonii*, *A. allochrous*, *A. paposanus*, *A. pehuenches* y *A. thurberi*, el clado que está conformado por los tres individuos de *A. mollisimus* (dos del centro de México y uno de Arizona) y el individuo de *A. pachypus*.

En el consenso estricto de este análisis, se forma otro grupo monofilético que no se encontraba anteriormente en el análisis de las 135 secuencias y está integrado por *A. eremiticus*, *A. cibarius*, *A. reventus*, *A. caricinus*, *A. utahensis* y *A. salmonis* (Figura 9). El resto del consenso estricto no difiere del anterior. Las especies aneuploides de Norteamérica se encuentran como politomías dentro de “Neo-Astragalus”.

Varias ramas dentro de “Neo-Astragalus” tuvieron un valor de apoyo de “bootstrap” mayor al 50%. Entre los linajes que tuvieron el soporte más alto se encuentran las relaciones de los individuos de *A. strigulosus* con un apoyo de 98%, *A. micranthus* y *A. lyonnetii* con un soporte de 98% y *A. hypoleucus*, *A. aff. quinqueflorus*, *A. arizonicus* y *A. nothoxys* con un apoyo de 87%. Las ramas del clado del Viejo Mundo fueron la mayoría sustentadas con valores de 90% y 100%.

En el clado de “Neo-Astragalus” el índice de decaimiento más alto fue de 4. Sólo dos clados en “Neo-Astragalus” tuvieron un índice de 4, estos fueron el clado de *A. hypoleucus* y *A. aff. quinqueflorus* y el clado de *A. micranthus* y *A. lyonnetii*. En el clado de las especies del Viejo Mundo el índice de decaimiento más bajo fue de 2 y el más alto de 11. Se encontró un índice de decaimiento de 11 para dos grupos; éstos fueron el conformado por *A. eucosmus* y *A. australis* y el grupo de *A. membranaceus*, *A. umbellatus* y *A. chinensis* (Figura 9).

Se muestra uno de los 5735 árboles más parsimoniosos encontrados para el análisis de las 83 secuencias. El árbol se reportó como un filograma, este tipo de diagrama muestra las relaciones filogenéticas entre los organismos y permite ver los cambios evolutivos entre éstos, porque las ramas son proporcionales al número de cambios (Figura 10).

En el filograma se pueden observar algunas posibles relaciones que no fueron soportadas en el consenso estricto (Figura 10). Las cinco especies sudamericanas se encuentran formando un grupo monofilético, grupo hermano al clado conformado por las especies *A. hypoleucus*, *A. aff. quinqueflorus*, *A. arizonicus* y *A. nothoxys*. Las especies de la sección *Strigulosi* con distribución en el centro de México se encuentran en un clado, filogenéticamente más relacionado a el clado de las especies sudamericanas y a las especies de las secciones *Leptocarpi*, *Quinqueflori* e *Hypoleuci*.

La longitud de las ramas en el filograma (Figura 10) indica que la región del ITS no es muy variable entre las especies de “Neo-Astragalus”. Algunas secuencias de las especies de Norteamérica, Sudamérica y el centro de México no presentaron cambio alguno, como es el caso de *A. micranthus* y *A. lyonnetii* o *A. guatemalensis* y *A. esperanzae*. Las especies que presentan el mayor número de cambios y difieren más entre sí son las que pertenecen al Viejo Mundo. La especies del Viejo Mundo han sido menos muestreadas que las especies del Nuevo Mundo, por lo que al tener un número menor de representantes las secuencias pueden presentar un número mayor de diferencias entre sí. En el filograma (Figura 10) se puede observar esto al comparar el largo de las ramas en las especies del Viejo Mundo las cuales presentan ramas más largas que el resto de las especies.

DISCUSIÓN

La monofilia de “Neo-Astragalus”

Varios trabajos de las relaciones filogenéticas de *Astragalus* se han hecho utilizando datos moleculares. Estos trabajos apoyan la división citológica del género en dos grandes grupos. El grupo euploide del Viejo Mundo que es parafilético y el grupo aneuploide del Nuevo Mundo llamado “Neo-Astragalus” que es monofilético (Wojciechowski *et al.*, 1993; Sanderson y Doyle, 1993; Liston y Wheeler, 1994; Wojciechowski *et al.*, 1999).

Se ha reportado el número cromosómico de seis de las diez especies de *Astragalus* recolectadas en el centro de México. Se desconoce el número cromosómico de la mayoría de las especies de la sección *Strigulosi*. De seis especies recolectadas pertenecientes a esta sección sólo se ha reportado el número cromosómico de *A. guatemalensis* y *A. strigosus* el cual es $n = 15$ (Cuadro 4; Spellenberg, 1976). Las especies restantes del centro de México, *A. mollissimus*, *A. wootonii* y *A. aff. quinqueflorus*, presentan $n = 11$ y *A. hypoleucus* $n = 14$ (Cuadro 4). Los números cromosómicos hasta ahora reportados para las especies con distribución en el centro de México indican que son especies aneuploides.

Los datos citológicos coinciden con la filogenia molecular presentada, porque las especies aneuploides con distribución en el centro de México se encuentran junto con las demás especies aneuploides de Norteamérica y Sudamérica dentro del clado de “Neo-Astragalus”. Al estar incluidas las especies del centro de México en este clado se continúa soportando la monofilia de “Neo-Astragalus”.

Relaciones filogenéticas de las especies de la sección *Strigulosi*

Este trabajo es el primero hasta el momento en agregar el mayor número de especies pertenecientes a la sección *Strigulosi*, para analizar las relaciones filogenéticas a nivel de sección. La sección *Strigulosi* tiene 25 especies, de las cuales 20 se distribuyen únicamente en México. De éstas, solamente una (*A. guatemalensis*) tiene una distribución más amplia extendiéndose a Guatemala y Honduras. De las cinco especies restantes, cuatro se distribuyen en Arizona y una en Nuevo México. Las seis especies recolectadas tienen una distribución principalmente en el centro de México y algunos estados de la parte norte, mientras que las especies *A. cobrensis* y *A. rusbyi* son dos de las cuatro especies con distribución en Arizona. Se ha reportado el número cromosómico de *A. cobrensis* y *A. rusbyi* ($n = 11$) y difiere de el número cromosómico reportado para *A. guatemalensis* y *A. strigulosus* recolectadas en el centro de México ($n = 15$; Spellenberg, 1974; 1976).

Barneby (1964) dividió a la sección en cinco grupos con base en algunas características morfológicas. En los grupos I y III es donde se encuentran las especies con distribución en el centro de México. Estos grupos presentan una flor de tamaño moderado con el estandarte recurvado aproximadamente 45° y una longitud de 9 a 14 mm de largo. El cáliz mide 5.5 a 9 mm y la legumbre es dorsoventralmente comprimida. En el grupo III la flor es como el grupo I, pero los pétalos son más encurvados y el estandarte mide 4.5 a 9.5 mm de largo. Mientras que en el Grupo IV y V se encuentran las especies con distribución en Arizona y Nuevo México. En estos grupos se encuentran *A. cobrensis* y *A. rusbyi* y presentan una flor pequeña con el estandarte más recurvado aproximadamente 90° . Los grupos IV y V difieren en el tamaño del cáliz. En el grupo IV el cáliz mide 4.5 a 9.5 mm y en el grupo V el cáliz es más pequeño de 2.2 a 3.5 mm.

La filogenia molecular obtenida de las secuencias de la región del ITS del DNA ribosomal del núcleo, sugiere que las especies de la sección *Strigulosi* con distribución en el centro de México (*A. guatemalensis*, *A. strigosus*, *A. tolucanus*, *A. esperanzae*, *A. lyonnetii*) pertenecen a un grupo monofilético (Figura 8). En éste se encuentra la especie *A. strigosus* la cual fue designada por Barneby (1964) como la especie tipo de la sección *Strigulosi*. Las especies *A. cobrensis* y *A. rusbyi* reportadas en las relaciones filogenéticas de *Astragalus* en el trabajo de Wojciechowski *et al.* (1999) y analizadas nuevamente en este trabajo aparecen separadas del resto de las especies de la sección y no se resuelven dentro de “Neo-Astragalus”. En la clasificación de la sección en grupos hecha por Barneby (1964), *A. cobrensis* y *A. rusbyi* difieren en sus características morfológicas de las especies que se distribuyen en el centro de México.

La filogenia molecular de la sección *Strigulosi*, los números cromosómicos reportados para la sección ($n = 11$ y 15), los caracteres morfológicos utilizados por Barneby (1964) y la distribución de las especies, indican que es probable que la sección se encuentra integrada por dos linajes diferentes, el linaje de las especies de México y el linaje de las especies de Arizona y Nuevo México. Por lo que posiblemente se requieran reubicar por lo menos a las especies *A. cobrensis* y *A. rusbyi* en la clasificación del género, porque al parecer pertenecen a un linaje diferente al resto de las especies de la sección *Strigulosi*. Aún es necesaria la recolecta de las 17 especies de la sección *Strigulosi* faltantes en este trabajo, analizar sus secuencias con las ya obtenidas y un estudio más detallado de los caracteres morfológicos, para ampliar el estudio y el conocimiento a nivel sección.

Sanderson (1991) sugirió que las especies de Sudamérica pudieron derivar de las especies de Norteamérica pertenecientes a las secciones *Strigulosi*, *Leptocarpi*, *Hypoleuci*, *Micranthus* y *Miselli*. Su hipótesis se basa en que algunas especies sudamericanas presentan

caracteres encontrados en especies de Norteamérica como son las estípulas connadas y un número cromosómico de $n = 13$ y $n = 14$; las especies de las secciones norteamericanas anteriormente mencionadas son las que presentan los números cromosómicos más altos ($n = 14$ y 15) y todas tienen las estípulas connadas, caracteres que comparten con las especies de Sudamérica.

Las seis especies con distribución en el centro de México pertenecientes a la sección *Strigulosi*, se encuentran filogenéticamente más relacionadas con las especies sudamericanas y con las especies de las secciones *Leptocarpi* (*A. arizonicus* y *A. nothoxys*), *Quinqueflori* (*A. quinqueflorus*) e *Hypoleuci* (*A. hypoleucus*). Estas relaciones filogenéticas se pueden reconocer como apoyo a la hipótesis de Sanderson (1991), pero es necesario ampliar el muestreo de las secciones de Norteamérica antes mencionadas y de las especies sudamericanas; es importante el estudio de estas especies, porque puede considerarse como una puerta al conocimiento del género en Sudamérica.

Relaciones filogenéticas de *A. hypoleucus* y *A. aff. quinqueflorus* del centro de México

En el análisis filogenético presentado, los dos individuos de la especie *A. aff. quinqueflorus* (*Quinqueflori*) recolectados en San Luis Potosí, integran un clado con la especie *A. hypoleucus* de la sección *Hypoleuci* y dos especies (*A. arizonicus* y *A. nothoxys*) que pertenecen a la sección *Leptocarpi*. *Astragalus hypoleucus* se distribuye en varios estados del norte y centro de México. Pertenece a la sección *Hypoleuci*, la cual es monotípica y morfológicamente se distingue de otras secciones por presentar estípulas connatas y vestidura dolabriforme (Barneby, 1964) Las relaciones filogenéticas apoyan el reconocimiento de la sección *Hypoleuci* como una sección monotípica porque los individuos recolectados e

identificados como *A. hypoleucus* se encuentran formando un grupo monofilético dentro del primer clado resuelto en "Neo-Astragalus".

La relación filogenética de *A. hypoleucus* con la especie de la sección *Quinqueflori* (*A. aff. quinqueflorus*) y con las especies de la sección *Leptocarpi* morfológicamente no se apoya. Casi todas las especies de esta sección presentan una pubescencia basifija con excepción de *A. arizonicus* la cual comparte la pubescencia dolabriforme característica de *A. hypoleucus*.

En sección *Quinqueflori* se encuentran solamente dos especies *A. quinqueflorus* y *A. brandegei*, los individuos recolectados e identificados como *A. aff. quinqueflorus* no son un grupo hermano de *A. brandegei* cuya secuencia se obtuvo del GenBank. *Astragalus aff. quinqueflorus* es grupo hermano del clado de *A. hypoleucus*, mientras que *A. brandegei* es no resuelto en "Neo-Astragalus". Se sugiere llevar a cabo más recolectas de las dos especies, análisis de nuevas secuencias y un trabajo morfológico detallado para reconocer o no a la sección.

Relaciones filogenéticas de *A. wootonii* y *A. mollissimus* del centro de México

Astragalus wootonii es una especie con distribución en Arizona, Nuevo México, Sonora, Chihuahua y el centro de México. Pertenece a la sección *Inflati* y a la subsección *Aridi* (Barneby, 1964). En el árbol de consenso estricto (Figura 8) se localiza en un clado monofilético junto con seis especies de Norteamérica. Tres de éstas (*A. allochrous*, *A. douglassii* y *A. thurberi*) se incluyen en la sección *Inflati* y las tres restantes (*A. nuttallii*, *A. oxyphysus* y *A. asymmetricus*) en la sección *Densifolli*, además el clado incluye dos especies de Sudamérica *A. pehuenches* y *A. paposanus*.

Las especies con las que se relaciona *A. wootonii* ya habían sido identificadas en un clado monofilético dentro de "Neo-Astragalus" por Wojciechowski *et al.* (1999). En este clado

se detectó una homogeneidad morfológica en un carácter del fruto que no se encontró en los otros clados de “Neo-Astragalus”. Las dos especies de Sudamérica utilizadas en el análisis filogenético presentan una legumbre larga unilocular e inflada, parecida a la legumbre de varias especies de Norteamérica pertenecientes a las secciones *Inflati*, *Densifolli* y *Trichopodi* en las que la legumbre también es inflada.

La posición filogenética de *A. wootonii* se soporta por la característica morfológica del fruto, porque al igual que el resto de las especies del clado presenta un fruto inflado. Las especies de Sudamérica no fueron clasificadas por Barneby (1964), pero si se consideran las relaciones filogenéticas y el carácter del fruto, las especies sudamericanas podrían ser clasificadas en secciones de Norteamérica, para determinar esto aún se requiere de un estudio más detallado de la morfología y analizar un número mayor de especies sudamericanas.

En el trabajo de Wojciechowski *et al.* (1999) ya se había analizado una variedad de *A. mollissimus* y se encontraba con las especies no resueltas de “Neo-Astragalus”. Las dos secuencias pertenecientes a *A. mollissimus* var. *irolanus* del centro de México se encuentran como grupo hermano de *A. mollissimus* reportado en el trabajo de Wojciechowski *et al.* (1999). Los individuos de *A. mollissimus*, junto con su taxón hermano que es *A. pachypus*, en el consenso estricto (Figura 8) presentado en este trabajo se identificaron como grupo hermano del clado conformado por *A. nuttallii*, *A. oxyphysus*, *A. asymmetricus*, *A. allochrous*, *A. douglassii* y *A. wootonii* y las dos especies de Sudamérica, *A. pehuenches* y *A. paposanus*. Esto no ocurría en el trabajo de Wojciechowski *et al.* (1999). Las relaciones filogenéticas presentadas aquí son apoyadas también por el carácter morfológico del fruto porque *A. mollissimus* presenta una legumbre inflada (Barneby, 1964) como las demás especies de su grupo hermano, sólo que la legumbre de *A. mollissimus* es bilocular y la de las otras especies en su mayoría es unilocular.

Delimitación filogenética de algunas especies de *Astragalus* del centro de México

Las especies *A. guatemalensis*, *A. lyonnetii*, *A. strigulosus*, *A. micranthus* y *A. hypoleucus* se recolectaron en más de una población y se delimitó a estas especies del centro de México con base en la relaciones filogenéticas obtenidas de las secuencias de la región del ITS del DNA ribosomal del núcleo.

Se recolectaron cuatro individuos de la especie *A. hypoleucus* en tres poblaciones diferentes del estado de Hidalgo. Los individuos fueron identificados con caracteres morfológicos, coincidiendo en que se trataba de *A. hypoleucus*. Los análisis filogenéticos de las secuencias de la región del ITS incluyen a los individuos en un grupo monofilético. Morfológicamente, esto es apoyado porque los cuatro individuos presentan la apomorfía característica de la especie que es una pubescencia dolabriforme y estípulas connadas. Molecularmente, en la alineación comparten una apomorfía en la posición 235 que los diferencia de las demás especies. Con base en lo anterior se pueden considerar que los cuatro individuos pertenecen a la especie *A. hypoleucus*.

Considerando los resultados obtenidos de las secuencias del ITS, la delimitación filogenética de las especies *A. micranthus* y *A. lyonnetii*, no fue posible porque las especies se encontraron conformando un clado monofilético no resuelto a pesar de ser diferentes morfológicamente. Esto tiene que ver con el marcador molecular que se utilizó, en este caso la región del ITS es idéntica en las dos especies. En esta situación la delimitación de especies utilizando los criterios anteriormente mencionados se complica. En este caso sí se pueden considerar especies diferentes con base en datos morfológicos. Los individuos identificados como *A. micranthus* tienen un racimo denso con 30 a 60 flores y una legumbre oblongo-elíptica, semibilocular; mientras que los individuos de *A. lyonnetii* se distinguen por tener

racimos menos densos de 13 a 20 flores con una corola blanco amarillenta y una legumbre péndula negro estrigulosa. Para delimitar a las especies con secuencias de DNA se requiere de un marcador molecular que sea más variable entre especies.

Los tres individuos de poblaciones diferentes identificados morfológicamente como *A. strigulosi* forman un grupo monofilético en el árbol de consenso estricto. En la alineación de las secuencias de la región del ITS los tres individuos comparten tres apomorfías en la posición 120, 209 y 450. Todos presentan un racimo de 15 a 35 flores, con corolas blanco amarillentas y una legumbre glabra, lo que indica que los tres se pueden considerar como integrantes de una misma especie.

Los dos individuos de *A. mollissimus* recolectados en el centro de México pertenecen a la misma población y en el consenso estricto forman un grupo monofilético con el individuo identificado como *A. mollissimus*, cuya secuencia se obtuvo del GenBank. En la alineación de las secuencias los tres individuos comparten una apomorfía en la posición 596, que los distingue de las demás especies. Los individuos son plantas hirsuto-tomentosas, con una legumbre extendida más o menos inflada bilocular, caracteres morfológicos distintivos de *A. mollissimus*. Con lo anterior se puede considerar que los tres pertenecen a la especie *A. mollissimus*.

Los dos individuos de la especie *A. guatemalensis* fueron identificados morfológicamente como dos variedades *A. guatemalensis* var. *lozani* y *A. guatemalensis* var. *brevidentatus*. Estas variedades de *A. guatemalensis* son muy parecidas entre sí, pero *A. guatemalensis* var. *brevidentatus* se diferencia de otras variedades por tener un cáliz de 3.2 a 6 mm, dientes estrigulosos de 3 a 4 mm, con pelos cortos y rígidos y el fruto con un estípite de 1 a 2.5 mm de largo (Barneby, 1964). La otra variedad, que es *A. guatemalensis* var. *lozani*, se distingue por ser hirsútula con pelos largos y delgados de color pálido y un fruto con el estípite

de 3.5 a 5 mm de largo (Barneby, 1964). En el consenso estricto del análisis de la región del ITS las dos variedades se encuentran en distintos linajes de “Neo-Astragalus”. En la alineación de las secuencias de la región del ITS molecularmente las dos variedades difieren sólo en las posiciones 477 y 500. Aunque no forman un grupo monofilético o parafilético y se encuentran como no resueltas en “Neo-Astragalus”, esto no es suficiente para determinar si son especies diferentes o una misma especie y como en el caso de *A. micranthus* y *A. lyonnetii* se requiere de un marcador molecular más variable a nivel de especie para poder concluir en algún sentido.

Alexander *et al.* (2004) estudiaron los niveles de la variabilidad genética y la distribución de éstos en poblaciones de *A. oniciformis*, utilizando datos moleculares de “Inter-simple sequence repeats” (ISSR). Estos marcadores moleculares presentaron diferencias entre individuos y poblaciones permitiéndoles estudiar el flujo genético que es importante para preservar la diversidad e integridad genética en la especie. Tomando como referencia este trabajo, los ISSR se pueden considerar como un marcador molecular que puede servir también en la diferenciación y delimitación de las especies del centro de México en trabajos futuros por la variabilidad que han presentado a nivel de individuo y población en el género. Al utilizar los ISSR es importante considerar sus tasas elevadas de mutación, usarlos para estudiar las relaciones entre las especies puede ser problemático debido a los altos niveles de homoplasia que presentan.

CONCLUSIONES

Las especies mexicanas del género *Astragalus* no han sido muy estudiadas en el área de la sistemática. Las claves existentes presentan varias dificultades para identificar a las especies únicamente con caracteres morfológicos. El presente estudio proporcionó un primer acercamiento a la filogenia de las especies de México dando a conocer 21 poblaciones no reportadas y datos de colecta de 10 especies con distribución en el centro de México.

Las secuencias de la región del ITS indican que las especies con distribución en el centro de México pertenecen al clado de las especies aneuploides de *Astragalus* llamado “Neo-Astragalus”. En “Neo-Astragalus” se conservaron los dos cladogramas principales reportados por Wojciechowski *et al.* (1999), en uno se incluyen a las especies de la sección *Strigulosus*, *Leptocarpi* e *Hypoleuci* del centro de México y en el otro clado se incluyeron las especies *A. wootonii* y *A. mollissimus*. Esta última relación fue soportada por un carácter morfológico del fruto.

Es posible que se requiera reubicar en el género por lo menos dos especies de la sección *Strigulosi*, *A. cobrensis* y *A. rusbyi*, clasificadas por Barneby (1964) en esta sección, ya que no aparecen en el clado en donde se encuentran la especie tipo y la mayoría de las especies de la sección *Strigulosi*. Posiblemente sean un linaje independiente al linaje de las especies que se distribuyen únicamente en México.

Las especies de México representan una nueva fuente de información para estudiar como derivaron las especies de Sudamérica, porque se ha sugerido que probablemente algunas especies sudamericanas pudieron estar estrechamente relacionadas con especies de la sección *Strigulosi*, cuya mayoría se distribuyen sólo en México. Las relaciones filogenéticas presentadas aquí apoyan esta hipótesis porque las especies de la sección *Strigulosi* con

distribución en el centro de México son cercanamente relacionadas con las especies sudamericanas.

Es necesario obtener nuevas secuencias de especies no muestreadas de *Astragalus*, tanto de la región del ITS del DNA ribosomal del núcleo, como de otros marcadores moleculares que presenten mayor variabilidad a nivel de especie, con el fin de mejorar la resolución de los árboles filogenéticos y tener una idea más clara de las relaciones entre las especies. Una buena estrategia para trabajar lo anterior es agregar el mayor número de especies pertenecientes a una sección y con base en los resultados formular nuevas hipótesis sobre las relaciones filogenéticas del grupo.

LITERATURA CITADA

- Alexander, A., A. Liston y S. Popovich. 2004. Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniformis* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 91: 2004-2012.
- Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers y D. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403 – 410.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell y M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Barneby, R. 1964. Atlas of North American *Astragalus*. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 13: 1-1188.
- Bowler, P. 1998. *Historia Fontana de las ciencias ambientales*. Fondo de la Cultura Económica. México. 463 pp.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.
- Brower, A. 1999. Delimitation of phylogenetics species with DNA sequences: a critique of Davis and Nixon's population aggregation analysis. *Systematic Botany* 48: 199-213.
- Bruneau, A., F. Forest, P. Herendeen, B. Klitgaard y G. Lewis. 2001. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Systematic Botany* 26: 487-514.
- Bult, C. y E. Zimmer. 1993. Nuclear ribosomal RNA sequences for inferring tribal relationships within Onagraceae. *Systematic Botany* 18:48-63.

Bunge, A. 1868. Generis Astragali species gerontogae. Pars prior. Claves diagnosticae.

Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de Saint Petersburg, ser. VII, 11: 1-140.

Bunge, A. 1869. Generis Astragali species gerontogae. Pars Altera: Species

enumeratio. *Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de Saint Petersburg, ser. VII, 15: 1-254.*

Chase, M., D. Soltis, R. Olmstead, D. Morgan, D. Les, B. Mishler, M. Duvall, R. Price,

H. Hills, Y.-L. Qiu, K. Kron, J. Rettig, E. Conti, J. Palmer, J. Manhart, K.

Sytsma, H. Michaels, W. Kress, K. Karol, W. Clark, M. Hedrén, B. Gaut, R.

Jansen, K. Kim, C. Wimpee, J. Smith, G. Furnier, S. Straus, Q.-Y. Xiang, G.

Plunkett, P. Soltis, S. Swensen, S. Williams, P. Gadek, C. Quinn, L. Eguiarte, E.

Golenberg, G. Learn, S. Graham, S. Barrett, S. Dayanandan y V. Albert. 1993.

Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 528-580.

Cracraft, J. C. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* 1:

159-187.

Crisci, J. 1994. La especie: realidad y concepto, pp. 207-225 En: Llorente B. J. y V. I.

Luna (compiladores). *Taxonomía biológica*. Ediciones Científicas Universitarias,

UNAM-Fondo de Cultura Económica. México. 626 pp.

Davis, J. I. y K. C. Nixon. 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of

phylogenetic species. *Systematic Biology* 41: 421-435.

- Dong, T. T., X. Q. Ma, C. Clarke, Z. H. Song, Z. N. Ji, C. K. Lo y K. W. Tsim. 2003. Phylogeny of *Astragalus* in China: Molecular evidence from the DNA sequences of 5S rRNA spacer, ITS, and 18S rRNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 6709-6714.
- Doyle, J. 1995. DNA data and legume phylogeny: a progress report, pp. 11–30 En: M.D. Crisp y J. J. Doyle (eds.). *Advances in legume systematics Part 7*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Doyle, J., J. Doyle, J. Ballenger, E. Dickson, T. Kajita y H. Ohashi. 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *American Journal of Botany* 84: 541-554.
- Doyle, J., J. Chappill, C. Bailey y T. Kajita. 2000. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data, pp. 1-20 En: Herendeen P. S y A. Bruneau (eds.). *Advances in Legume Systematics Part 9*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Gómez-Sosa, E. 1979. Las especies sudamericanas del género *Astragalus* (Leguminosae) las especies patagónicas argentinas. *Darwiniana* 22: 313-376.
- Gomez-Sosa, E. 1981. Novedades en el genero *Astragalus* (Leguminosae-Galegeae). *Darwiniana* 23: 507-516.
- Gomez-Sosa, E. 1982. Novedades en el genero *Astragalus* (Leguminosae-Galegeae). *Darwiniana* 24: 23-31.
- Gomez-Sosa, E. 1997. A new *Astragalus* (Leguminosae) from Argentina, notable for placentation of its seeds. *Brittonia* 49: 537-541.

- Goncharov, N. F., A. G. Borisova, S. G. Gorshkova, M. G. Popov y I. T. Vasilchenko. 1965. *Astragalus*, pp. 1-918 En: V. L. Komarov y B. K. Shishkin (eds.). *Flora of the U.S.S.R Vol. 12*. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, Smithsonian Institution and the National Science Foundations.
- González, D. 1997. El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 137-157.
- Graham, P., y C. Vance. 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 31: 872-877.
- Gray, A. 1864. A revision and arrangement (mainly by the fruit) of the North American species of *Astragalus* and *Oxytropis*. *Proceedings of American Academy of Arts* 6: 188-236.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Haro, J. 1999. ¿Qué es una especie?. *Boletín de la Sociedad Entomológica y Aragonesa* 26: 105-112.
- Herendeen, P., W. Crepet y D. Dilcher. 1992. The fossil history of the Leguminosae: phylogenetic and biogeographic implications, pp. 303-317 En: Herendeen, P. y D. Dilcher. (eds.). *Advances in Legume Systematics Part 4*. The Royal Botanic Gardens, Kew.
- Hilu, K., T. Borsh, K. Müller, D. Soltis, P. Soltis, V. Savolainen, M. Chase, M. Powell, A. Lawrence, R. Evans, H. Sauquet, C. Neinhuis, C. Slotta, J. Rohwer, C. Campbell y L. Chatrou. 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *American Journal of Botany* 90: 1758-1776.

- Johnston, I. M. 1938. Notes on some *Astragalus* species of Ecuador and Peru. J. *Arnold Arboretum* 19:88-96.
- Johnston, I. M. 1947. *Astragalus* in Argentina, Bolivia, and Chile. J. *Arnold Arboretum* 28:336-409.
- Jones, M. 1923. *Revision of North American Astragalus*. Published by the author, Salt Lake City, Utah.
- Judd, W., C. Campbell, E. Kellogg, P. Stevens y M. Donogue. 2002. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Segunda edición. Sinauer. Sunderland, Massachusetts. 576 pp.
- Lammers, T.G. 1999. Plant systematic today: all our eggs in one basket? *Systematic Botany* 24: 494-496.
- Lavin, M., J. Doyle y J. Palmer. 1990. Evolutionary significance of the loss of the chloroplast-DNA inverted repeat in the Leguminosae subfamily Papilionoidea. *Evolution* 44: 390-402.
- Ledingham, G. 1957. Chromosome numbers of some Saskatchewan Leguminosae with particular reference to *Astragalus* and *Oxytropis*. *Canadian Journal of Botany* 35: 657-666.
- Ledingham, G. 1960. Chromosome numbers in *Astragalus*. *Proceedings of the Genetic Society of Canada* 3: 15-18.
- Ledingham, G., y B. Rever. 1963. Chromosome numbers of some southwest Asian species of *Astragalus* and *Oxytropis* (Leguminosae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 5: 18-32.
- Ledingham, G. y M. Fahselt. 1964. Chromosome numbers of some North American species of *Astragalus* (Leguminosae). *Sida* 1: 313-327.

- Ledingham, G. y B. Pepper. 1973. Chromosome numbers of some South American species of *Astragalus*. *Kurtziana* 7: 27-37.
- Liston, A. y J. Wheeler. 1994. The phylogenetic position of the genus *Astragalus* (Fabaceae): evidence from the chloroplast genes *rpoC1* and *rpoC2*. *Biochemical Systematics and Ecology* 22: 377-388.
- Lock, J.M. y K. Simpson. 1991. Legumes of West Asia: A Check-list. *Royal Botanic Gardens, Kew*.
- Luna, V. 1994. Los conceptos de especie evolutiva y filogenética, pp. 83-94 En: Llorente B. J. y Luna V. I. (compiladores). *Taxonomía biológica*. Ediciones Científicas Universitarias, UNAM-Fondo de Cultura Económica. México.
- Mabberley, D. J. 1997. *The Plant-Book. A portable dictionary of the higher plants*. Second edición. Cambridge University Press, Cambridge.
- Martínez, M. 1997. Sistemática molecular: comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 123-136.
- Mayr, E. 1968. *Especies animales y evolución*. Universidad de Chile. De Ariel Santiago. 458 pp.
- Melgoza, C. A., M. M Royo, N. C. Morales y T. S. Sierra. 2003. Germinación de la semilla de la hierba loca (*Astragalus mollissimus* Torr) con diferentes niveles de humedad y temperatura. *Técnica Pecuaria en México* 41: 85-89.
- Podlech, D. 1982. Neue aspekte zur evolution und gliederung der gattung *Astragalus*. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 18: 359-378.
- Podlech, D. 1983. Zur taxonomie und nomenclatur der tragacanthoiden Astragali. *Mitteilungen der Botanischen Staatsammlung München* 19: 1-23.
- Podlech, D. 1984. Revision von *Astragalus* L. sect. *Herpocaulos* Bunge. *Mitteilungen der Botanischen Staatsammlung München* 20: 441-449.

- Podlech, D. 1986. Taxonomic and phytogeographical problems in *Astragalus* of the Old World and South-West Asia. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 89: 37-43.
- Polhill, R. P. 1981. Papilionoideae, pp. 191-208 En: Polhill, R. y P. Raven (eds.). *Advances in Legume Systematics Part 1*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Polhill, R., P. Raven y C. Stirton. 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae, pp. 1-26 En: Polhill, R. Y P. Raven (eds.). *Advances in Legume Systematics Part 1*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Rydberg, P. 1929. *Astragalanae*. North American Flora 24: 251-462.
- Rzedowski, G.C y J. Rzedowski. 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a. ed., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el uso y Conocimiento de la Biodiversiad. Pátzcuaro, Michoacán. México. 1406 pp.Saiki R., S. Scharf, F. Faloon, K. Mullis, G. Horn, H. Erlich y N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sanderson, M. 1989. *Patterns of homoplasy in North American Astragalus*. Ph.D. dissertation, University of Arizona, Tucson.
- Sanderson, M. 1991. Phylogenetic relationships within North American *Astragalus* L. (Fabaceae). *Systematic Botany* 16: 414-430.
- Sanderson, M. y J. Doyle. 1993. Phylogenetic relationships in North American *Astragalus* (Fabaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation. *Systematic Botany* 18: 395-408.
- Sanderson, M. y M. Wojciechowski. 1996. Diversification rates in a temperate legume clade: Are there "so many species" of *Astragalus* (Fabaceae)?. *American Journal*

- of Botany* 83: 1488-1502.
- Savolainen, V., M. Chase, S. Hoot, C. Morton, D. Soltis, C. Bayer, M. Fay, A. Bruijn, S. Sillivan y Y. Qiu. 2000. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. *Systematic Biology* 49: 306-362.
- Soltis, D. y P. Soltis. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis, pp. 1-42 En: Soltis, D., P. Soltis y J. Doyle (eds.). *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*. Kluwer Academic Publishers. Boston, Massachusetts. 574 pp.
- Sousa, S. y S. Delgado. 1993. Leguminosas mexicanas: fitogeografía, endemismo y orígenes, pp. 449-493 En: Ramamoorthy, T.R., R. Bye, A. Lot y J. Fa. (compiladores). *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología de la UNAM, México. 792 pp.
- Spellenberg, R. 1974. Chromosome number as an indication of relationships of *Astragalus*, section *Strigulosi* (Leguminosae), with descriptive notes on *A. altus*. *The Southwestern Naturalist* 18: 393-396.
- Spellenberg, R. 1976. Chromosome numbers and their cytotaxonomic significance for North American *Astragalus* (Fabaceae). *Taxon* 25: 463-476.
- Swofford, D. 2003. PAUP*. *Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tucker, S. 2003. Floral Development in Legumes. *Plant Physiology* 131: 911-926.
- Vilkomerson, H. 1943. Chromosomes of *Astragalus*. *Torrey Botanical Club Bulletin* 46:49-57.
- Villaseñor, J. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México.

- Interciencia* 28: 160-167.
- White, T., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322 En: Innes M., D. Gelfand, J. Sninsky, y T. White (eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego. 482 pp.
- Williams, M. C. y L. F. James. 1975. Toxicity of nitro-containing *Astragalus* to sheep and chicks. *Journal Range Management* 28: 260-263.
- Wojciechowski, M., M. Sanderson, B. Baldwin y M. Donoghue. 1993. Monophyly of the aneuploid species of *Astragalus*: evidence from nrDNA internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany* 80: 711-722.
- Wojciechowski, M., M. Sanderson y M. Hu. 1999. Evidence on the monophyly of *Astragalus* (Fabaceae) and its major subgroups based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA *trnL* intron data. *Systematic Botany* 24: 409 -437.
- Wojciechowski, M., M. Sanderson, K. Steele y A. Liston. 2000. Molecular phylogeny of the “Temperate Herbaceous Tribes” of Papilionoid legumes: a supertree approach, pp. 277–298 En: Herendeen P.S. y A. Bruneau (eds). *Advances in Legume Systematics* 9. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Wojciechowski, M., M. Lavin y M. Sanderson. 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matk* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* 91: 1846-1862.

Anexo I. Lista de las secuencias utilizadas en el estudio filogenético de las especies del género *Astragalus*.

Especie	Falange Subgénero	Sección	Distribución	Longitud de la secuencia	Número GenBank (ITS)
<i>A. alopecias</i> Pallas	Calycophysa	<i>Alopecias</i>	Viejo Mundo	437	U50508, U50509
<i>A. falcatus</i> Lam.	Cercidothrix	<i>Euodmus</i>	Viejo Mundo	438	U50488, U50489
<i>A. adsurgens</i> Pallas	Cercidothrix	<i>Onobrychium</i>	Viejo Mundo	553	AF121674
<i>A. chaborasicus</i> Boiss & Hausskn.	Cercidothrix	<i>Onobrychium</i>	Viejo Mundo	429	L10808, L10809
<i>A. canadensis</i> L.	Cercidothrix	<i>Uliginosi</i>	Norteamérica	435	L10770, L10771
<i>A. oreganus</i> Nutt. ex T. & G.	Cercidothrix	<i>Uliginosi</i>	Viejo Mundo	600	AF121687
<i>A. cysticalyx</i> Ledeb.	Calycocystis	<i>Cysticalyx</i>	Viejo Mundo	604	AF121682
<i>A. hamosus</i> L.	Epiglottis	<i>Buceras</i>	Viejo Mundo	436	L10778, L10779
<i>A. cymbicarpos</i> Brot.	Epiglottis	<i>Edodimus</i>	Viejo Mundo	603	AF121678
<i>A. edulis</i> L.	Epiglottis	<i>Epiglottis</i>	Viejo Mundo	602	AF121677
<i>A. epiglottis</i> L.	Epiglottis	<i>Epoglottis</i>	Viejo Mundo	436	U50506, U50507
<i>A. vogelii</i> (Webb.) Bornm.	Epoglottis	<i>Herpocaulos</i>	Viejo Mundo	436	U50498, U50499
<i>A. salmonis</i> Jones	Homaloboid	<i>Atrati</i>	Norteamérica	596	AF121735
<i>A. bisulcatus</i> var. <i>haydenianus</i> Barneby	Homaloboid	<i>Bisulcati</i>	Norteamérica	423	L10766, L10767
<i>A. collinus</i> (Hook) Don	Homaloboid	<i>Collini</i>	Norteamérica	597	AF121703
<i>A. curvicarpus</i> (A. Hell) Macbr.	Homaloboid	<i>Collini</i>	Norteamérica	597	AF121698
<i>A. ceramicus</i> Sheld.	Homaloboid	<i>Cusickiani</i>	Norteamérica	597	AF121730
<i>A. filipes</i> Torr. Ex Gray	Homaloboid	<i>Cusickiani</i>	Norteamérica	597	AF121699
<i>A. spatulatus</i> Sheld.	Homaloboid	<i>Drabellae</i>	Norteamérica	597	AF121732

Especie	Falange Subgénero	Sección	Distribución	Longitud de la secuencia	Número GenBank (ITS)
<i>A. kentrophyta</i> Gray var. <i>implexus</i> Barneby	Homaloboid	<i>Ervoidei</i>	Norteamérica	597	AF121723
<i>A. tenellus</i> Pursh	Homaloboid	<i>Ervoidei</i>	Norteamérica	559	AF121718
<i>A. miser</i> Dougl. Ex Hooker	Homaloboid	<i>Genistoidei</i>	Norteamérica	597	AF121717
<i>A. sesquiflorus</i> S. Wats.	Homaloboid	<i>Humistrati</i>	Norteamérica	597	AF121731
<i>A. inyoensis</i> Sheldon	Homaloboid	<i>Inyoenses</i>	Norteamérica	597	AF121737
<i>A. lonchocarpus</i> Torr.	Homaloboid	<i>Lonchocarp</i>	Norteamérica	597	AF121689
<i>A. chamaemeniscus</i> Barneby	Homaloboid	<i>Malaci</i>	Norteamérica	597	AF121727
<i>A. cibarius</i> Sheld.	Homaloboid	<i>Malaci</i>	Norteamérica	597	AF121729
<i>A. arthuri</i> Jones	Homaloboid	<i>Miselli</i>	Norteamérica	597	AF121739
<i>A. neglectus</i> (T. & G.) Sheld.	Homaloboid	<i>Neglecti</i>	Norteamérica	597	AF121713
<i>A. oocalycis</i> Jones	Homaloboid	<i>Oocalyces</i>	Norteamérica	419	L10784,L10785
<i>A. asclepiadoides</i> Jones	Homaloboid	<i>Pachyphyllus</i>	Norteamérica	597	AF121725
<i>A. pachypus</i> Greene	Homaloboid	<i>Pachypodes</i>	Norteamérica	597	AF121722
<i>A. linifolius</i> Osterhout	Homaloboid	<i>Pectinati</i>	Norteamérica	597	AF121693
<i>A. speirocarpus</i> Gray	Homaloboid	<i>Podosclerocarp</i>	Norteamérica	597	AF121733
<i>A. molybdenus</i> Barneby	Homaloboid	<i>Polares</i>	Norteamérica	596	AF121694
<i>A. polaris</i> Benth. ex Hook	Homaloboid	<i>Polares</i>	Norteamérica	597	AF121714
<i>A. shultziorum</i> Barneby	Homaloboid	<i>Polares</i>	Norteamérica	595	AF121693
<i>A. praelongus</i> Sheld.	Homaloboid	<i>Preussiani</i>	Norteamérica	597	AF121716
<i>A. preussii</i> Gray	Homaloboid	<i>Preussiani</i>	Norteamérica	595	AF121726
<i>A. brandegei</i> T.C. Porter	Homaloboid	<i>Quinqueflori</i>	Norteamérica	400	L10768, L10769
<i>A. eremiticus</i> Sheld.	Homaloboid	<i>Reventi-Arrecti</i>	Norteamérica	597	AF121736

Espece	Falange Subgénero	Sección	Distribución	Longitud de la secuencia	Número GenBank (ITS)
<i>A. obscurus</i> Wats.	Homaloboid	<i>Reventi-Arrecti</i>	Norteamérica	596	AF121701
<i>A.reventus</i> Gray	Homaloboid	<i>Reventi-Arrecti</i>	Norteamérica	596	AF121702
<i>A.sheldoni</i> (Rydb.) Barneby	Homaloboid	<i>Reventi-Arrecti</i>	Norteamérica	595	AF121704
<i>A. hallii</i> Gray var. <i>fallas</i> Barneby	Homaloboid	<i>Scytocarp</i>	Norteamérica	430	L10776, L10777
<i>A. alvordensis</i> Jones	Homaloboid	<i>Solitarii</i>	Norteamérica	597	AF121700
<i>A. cobrensis</i> Gray	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	Norteamérica	597	AF121720
<i>A. rusbyi</i> Greene	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	Norteamérica	597	AF121715
<i>A. guatemalensis</i> var. <i>brevidentatus</i> Hemsl.	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	Norteamérica	597	
<i>A. guatemalensis</i> var. <i>lozani</i> Jones	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	Norteamérica	597	
<i>A. strigulosus</i> H.B. K.	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	Norteamérica	597	
<i>A. micranthus</i> Desv.	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	Norteamérica	599	
<i>A. lyonnetii</i> Barneby	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	Norteamérica	599	
<i>A. tolucanus</i> Rob. & Seat.	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	Norteamérica	597	
<i>A.esperanzae</i> Jones	Homaloboid	<i>Strigulosi</i>	Norteamérica	597	
<i>A. quinqueflorus</i> Wats.	Homaloboid	<i>Quinqueflori</i>	Norteamérica	597	
<i>A. scopulorum</i> T.C. Porter	Homaloboid	<i>Tiopsidei</i>	Norteamérica	429	L10790, L10791
<i>A. woodruffi</i> Jones	Homaloboid	<i>Woodruffiani</i>	Norteamérica	597	AF121724
<i>A. agrestis</i> Dougl. Ex. G. Don	Hypoglottis	<i>Hypoglottoidei</i>	Norteamérica	428	L10758, L10759
<i>A. cicer</i> L.	Hypoglottis	<i>Hypoglottoidei</i>	Viejo Mundo	431	L10772, L10773
<i>A. pulchellus</i> Boiss.	Hypoglottis	<i>Malacothix</i>	Viejo Mundo	429	L10786, L10787
<i>A. gilviflorus</i> Sheldon	Orophaca	<i>Orophaca</i>	Norteamérica	597	AF121692

Espece	Falange Subgénero	Sección	Distribución	Longitud de la secuencia	Número GenBank (ITS)
<i>A. aretioides</i> (Jones) Barneby	Orophaca	<i>Sericoleuci</i>	Norteamérica	428	L10762, L10763
<i>A. alpinus</i> L.	Phaca	<i>Astragalus</i>	Viejo Mundo	435	L10760, L10761
<i>A. leptaleus</i> A. Gray	Phaca	<i>Astragalus</i>	Norteamérica	597	AF121695
<i>A. membranaceus</i> Bunge	Phaca	<i>Cenantrum</i>	Viejo Mundo	603	AF121675
<i>A. chinensis</i> L.	Phaca	<i>Chlorostachys</i>	Viejo Mundo	603	AF121681
<i>A. williamsii</i> Rydb.	Phaca	<i>Hemiphaca</i>	Norteamérica	600	AF121685
<i>A. australis</i> (L.) var. <i>glabriusculus</i> (Hook.) Isely	Phaca	<i>Hemiphragmium</i>	Viejo Mundo	597	AF121686
<i>A. eucosmus</i> Robinson	Phaca	<i>Oroboidei</i>	Viejo Mundo	597	AF121684
<i>A. robbinsii</i> A. Gray var. <i>minor</i> (Hook.) Barneby	Phaca	<i>Oroboidei</i>	Viejo Mundo	433	U50490, U50491
<i>A. americanus</i> (Hook.) Jones	Phaca	<i>Phaca</i>	Norteamérica	438	U50492, U50493
<i>A. umbellatus</i> Bunge	Phaca	<i>Phaca</i>	Viejo Mundo	602	AF121683
<i>A. polycladus</i> Bureau & Franchet	Phaca	<i>Polycladi</i>	Viejo Mundo	602	AF121676
<i>A. purshii</i> Dougl. Ex.Hook.	Piptoloboid	<i>Argophylli</i>	Norteamérica	430	L10788, L10789
<i>A. utahensis</i> Torr. & Gray	Piptoloboid	<i>Argophylli</i>	Norteamérica	396	L10797, L10796
<i>A. caricinus</i> (Jones) Barneby	Piptoloboid	<i>Chaetodontes</i>	Norteamérica	596	AF121734
<i>A. nuttallii</i> (T. & G.) T. How.	Piptoloboid	<i>Densifolli</i>	Norteamérica	598	AF121705
<i>A. oxyphysus</i> Gray	Piptoloboid	<i>Densifolli</i>	Norteamérica	598	AF121708
<i>A. monumentalis</i> Barneby	Piptoloboid	<i>Desperati</i>	Norteamérica	431	L10814, L10815
<i>A. cremnophylax</i> Barneby	Piptoloboid	<i>Humillimi</i>	Norteamérica	428	L10810, L10811
<i>A. humillimus</i> Gray ex. Brandege	Piptoloboid	<i>Humillimi</i>	Norteamérica	428	L10780, L10781

Espece	Falange Subgénero	Sección	Distribución	Longitud de la secuencia	Número GenBank (ITS)
<i>A. hypoleucus</i> Schauer	Piptoloboid	<i>Hypoleuci</i>	Norteamérica	602	
<i>A. allochrous</i> Gray	Piptoloboid	<i>Inflati</i>	Norteamérica	598	AF121707
<i>A. douglasii</i> (T. & G.) Gray	Piptoloboid	<i>Inflati</i>	Norteamérica	598	AF121709
<i>A. sabulonum</i> Gray	Piptoloboid	<i>Inflati</i>	Norteamérica	597	AF121706
<i>A. thurberi</i> Gray	Piptoloboid	<i>Inflati</i>	Norteamérica	427	L10792, L10793
<i>A. wootonii</i> (H.B.K) Barneby	Piptoloboid	<i>Inflati</i>	Norteamérica	597	
<i>A. arizonicus</i> Gray	Piptoloboid	<i>Leptocarpi</i>	Norteamérica	598	AF121690
<i>A. lindheimeri</i> Engelm. ex. Gray	Piptoloboid	<i>Leptocarpi</i>	Norteamérica	597	AF121711
<i>A. nothoxys</i> Gray	Piptoloboid	<i>Leptocarpi</i>	Norteamérica	598	AF121688
<i>A. nuttallianus</i> DC. var. <i>nuttallianus</i> A. DC.	Piptoloboid	<i>Leptocarpi</i>	Norteamérica	430	L10816, L10817
<i>A. rattanii</i> Gray var. <i>rattani</i>	Piptoloboid	<i>Leptocarpi</i>	Norteamérica	597	AF121712
<i>A. tener</i> Gray var. <i>tener</i>	Piptoloboid	<i>Leptocarpi</i>	Norteamérica	597	AF121697
<i>A. didymocarpus</i> H. & A. var. <i>dispermus</i> Gray	Piptoloboid	<i>Microlobium</i>	Norteamérica	597	AF121721
<i>A. mollissimus</i> (Jones) Barneby	Piptoloboid	<i>Mollissimi</i>	Norteamérica	599	
<i>A. mollissimus</i> Torr.	Piptoloboid	<i>Mollissimi</i>	Norteamérica	597	AF121719
<i>A. monoensis</i> Barneby	Piptoloboid	<i>Monoenses</i>	Norteamérica	597	AF121738
<i>A. tetrapterum</i> Gray	Piptoloboid	<i>Pterocarpi</i>	Norteamérica	597	AF121728
<i>A. calycosus</i> Torr. ex. Wats.	Piptoloboid	<i>Scaposi</i>	Norteamérica	597	AF121691

Espece	Falange Subgénero	Sección	Distribución	Longitud de la secuencia	Número GenBank (ITS)
<i>A. atropilosulus</i> (Hochst.) Bunge	Pogonophace	<i>Chlorostachy</i>	Viejo Mundo	438	U50504, U50505
<i>A. sinicus</i> L.	Pogonophace	<i>Lotidium</i>	Viejo Mundo	439	U50502, O50503
<i>A. complanatus</i> R. Br.	Pogonophace	<i>Phyllobium</i>	Viejo Mundo	654	U50500, U50501
<i>A. nankotaizanensis</i> Sasaki	-----	-----	Viejo Mundo	604	AF121680
<i>A. amottianus</i> (Gillies) Reiche	*****	*****	Sudamérica	597	AF121748
<i>A. echidnaeformis</i> Sirj.	Tragacantha	<i>Tragacantha</i>	Viejo Mundo	439	U50512, U50513
<i>A. boeticus</i> L.	Trimeniaeus	<i>Cyamodes</i>	Viejo Mundo	602	AF121679
<i>A. corrugatus</i> Bertol.	Trimeniaeus	<i>Harpilobus</i>	Viejo Mundo	419	L10774, L10775
<i>A. asterias</i> Stev. ex. Ledeb.	Trimeniaeus	<i>Oxyglottis</i>	Viejo Mundo	430	L10764, L10765
<i>A. tribuloides</i> Del.	Trimeniaeus	<i>Oxyglottis</i>	Viejo Mundo	430	L10794, L10795
<i>A. echinatus</i> Murray	Trimeniaeus	<i>Pentaglottis</i>	Viejo Mundo	432	U50510, U50511
<i>A. garbancillo</i> Cavanilles	*****	*****	Sudamérica	596	AF121740
<i>A. moyanoi</i> Spegazzini	*****	*****	Sudamérica	597	AF121743
<i>A. neuquenensis</i> Gómez-Sosa	*****	*****	Sudamérica	597	AF121749
<i>A. palanae</i> var. <i>grandiflora</i> Spegazzini	*****	*****	Sudamérica	597	AF121745
<i>A. palanae</i> var. <i>palanae</i> (Phil.) Reiche	*****	*****	Sudamérica	597	AF121744

Especie	Falange Subgénero	Sección	Distribución	Longitud de la secuencia	Número GenBank (ITS)
<i>A. paposanus</i> Johnston	*****	*****	Sudamérica	598	AF121750
<i>A. patagonicus</i> (Phil.) Spegazzini	*****	*****	Sudamérica	597	AF121746
<i>A. pehuenches</i> Niederlein	*****	*****	Sudamérica	598	AF121747
<i>A. pickeringii</i> Gray	*****	*****	Sudamérica	597	AF121741
<i>A. cerasocrenus</i> Bunge	Tragacantha	<i>Polyanthos</i>	Viejo Mundo	439	U50514, U50515
<i>A. peristerus</i> Boiss.	Tragacantha	<i>Rhacophorus</i>	Viejo Mundo	439	U50494, U50495