



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**DELIMITACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO
Thalictrum (RANUNCULACEAE) DEL CENTRO DE
MÉXICO CON BASE EN CARACTERES
MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**P R E S E N T A:
DENISSE TÉLLEZ MAZZOCCO.**

DIRECTOR DE TESIS: DR. DAVID S. GERNANDT

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

AÑO 2006

DEDICATORIA

Con el más grande amor a la memoria de
mi padre que desde el cielo me alienta
ha seguir adelante.

A mi madre, por su cariño, apoyo
ayuda y consejo en todo momento.
Sin ti, no se que seria de mi.
Te admiro mucho Ma.

A Jessy y a Nelly por estar siempre ahí,
por su compañía, ayuda, tolerancia y
apoyo, gracias por ser mis hermanas.

A mi familia, por miles de momentos maravillosos
y enseñarme el hermoso valor de la unidad.

AGRADECIMIENTOS.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. David Gernandt por permitirme realizar mi tesis con él, por escuchar mis dudas y ayudar a responderlas, por su paciencia y tiempo. Al M en C. Manuel González Ledesma por su ayuda en la identificación de mis plantas, que no fue nada fácil y con bibliografía.

Al Dr. Miguel Ángel Villavicencio, a la Dra. Irene Goyenenechea, al M. en C. Manuel González, al Dr. Atilano Contreras, al Dr. David Gernandt, a la Dra. Maria del Carmen Sánchez y a la Dra. Maritza López por leer y revisar esta tesis, así como por sus conocimientos, sugerencias y comentarios.

A mi hermana Nelly, por su creatividad, ideas y ayuda una que otra vez, a mis amigos: Luzma, Sofy, Esme, Ari, Jona, Alfred, Gil, Luís, Gabriel, Mariano, Omar e Isra gracias por todos esos momentos tan agradables y hacer que los lapsos tristes y de preocupación se olvidaran, pero sobre todo por aceptarme tal y como soy.

A mis compañeros de laboratorio: Vero, Federico, Jaime, Sergio, Delia, Carmen, Chuy, Paco, Luís y Paty por su ayuda en campo y hacer que el trabajo en el laboratorio fuera divertido. A la M. en C. Lety Romero Bautista, por sus correcciones y sugerencias, al Dr. Juan Márquez por proporcionarme el programa donde se realizaron los mapas y a mi amiga Luzma por sus tantas visitas a la UNAM por mi bibliografía.

A todos mis primos por tantas vivencias, locuras y diversión; finalmente quiero agradecer a toda la gente que aunque no este involucrada en este proyecto siempre tuvieron palabras de aliento.

RESUMEN.

La delimitación de especies de algunos taxones de *Thalictrum* del centro de México es controversial. El propósito de esta investigación es: 1) confirmar la posición filogenética de las especies mexicanas dentro del clado de las andromonoicas y 2) aportar por medio del concepto filogenético de especie una solución a la validez de estos taxones. Se extrajo DNA de individuos recolectados del centro de México. Se secuenció la región del espaciador interno transcrito (ITS) del DNA ribosomal del núcleo y se analizaron las secuencias mediante parsimonia para determinar la posición de las especies mexicanas con respecto a otras especies de *Thalictrum* de alrededor del mundo. En cuanto a los sistemas sexuales las andromonoicas son parafiléticas e incluyen a las especies mexicanas, las especies hermafroditas forman un grupo polifilético, y las dioicas se colocan en dos clados separados. El árbol de consenso estricto no mostró resolución de los taxones mexicanos. El análisis de agregación de poblaciones indica que *T. gibbosum* difiere de *T. hernandezii* por la morfología del aquenio, mientras que *T. pubigerum* y *T. strigillosum* difieren en la densidad del indumento en el envés del foliolo. La comparación entre *T. pubigerum* y *T. strigillosum* revela que las dos especies comparten las mismas regiones de ITS en algunas poblaciones.

Abstract.

The delimitation of several species of *Thalictrum* from central Mexico is controversial. The purpose of this investigation is 1) to confirm the phylogenetic position of the Mexican species of *Thalictrum* within the andromonoic clade and 2) to apply the phylogenetic species concept to investigate the validity of these species. DNA was extracted from individuals collected from central Mexico. The internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA was sequenced, and parsimony analysis was used to determine the position of the Mexican species relative to other species of *Thalictrum* from around the world. With respect to sexual systems, the Mexican taxa belong to a paraphyletic group of andromonoic species, the hermaphroditic species are polyphyletic, and the dioecious species form two separate clades. The Mexican species form an unresolved polytomy in the strict consensus tree. Population aggregation analysis shows that *T. gibbosum* differs from *T. hernandezii* in the morphology of the achene and *T. pubigerum* and *T. strigillosum* differ in the density of the indumentum on the lower surface of the leaflet. Comparisons between *T. pubigerum* and *T. strigillosum* revealed that the two species share the same ITS region in some populations.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 El orden Ranunculales.....	3
2.2 La familia Ranunculaceae	4
2.3 El género <i>Thalictrum</i>	6
2.4 El género <i>Thalictrum</i> en México.....	10
2.5 El problema de la especie en <i>Thalictrum</i>	11
2.6 El concepto filogenético de especie.....	19
2.7 La región del espaciador interno del DNA ribosomal del núcleo.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
5. MATERIAL Y MÉTODO.....	24
5.1 Recolección del material biológico.....	24
5.2 Identificación de las especies.....	26
5.3 Extracción, amplificación y secuenciación.....	28
5.4 Edición y alineación de secuencias.....	29
5.5 Análisis filogenético.....	30
6. RESULTADOS.....	31
6.1 Alineación	31
6.2 Análisis filogenético.....	32
6.3 Delimitación de especies del centro de México.....	39

7. DISCUSIÓN.....	41
7.1 Análisis filogenético.....	41
7.2 Delimitación de especies del centro de México.....	43
7.3 Identificación de las especies de <i>Thalictrum</i> del centro de México.....	46
7.4 Clave para la identificación de las especies de <i>Thalictrum</i> del centro de México.....	47
8. CONCLUSIONES.....	47
9. REFERENCIAS.....	50
10. GLOSARIO.....	61
11. ANEXO.....	65
11.1 Protocolo de la extracción de DNA del tejido vegetal con el DNeasy Plant mini Kit.....	65
11.2 Purificación de DNA mediante el Kit GeneClean III.....	66

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1. Distribución del género <i>Thalictrum</i> en México.....	10
Cuadro 2. Localidades de recolecta de las especies de <i>Thalictrum</i>	25
Cuadro 3. Caracteres morfológicos diagnósticos para los taxones del centro de México.....	26
Cuadro 4. Estadísticas de las secuencias de la región del ITS para los taxones del centro de México y para las especies <i>T. clavatum</i> , <i>T. thalictroides</i> , <i>T. dioicum</i> y <i>T. coriaceum</i>	32
Cuadro 5. Parámetros de los datos de máxima verosimilitud.....	37
Cuadro 6. Caracteres diagnósticos en los taxones de <i>Thalictrum</i> del centro de México.....	39
Cuadro 7. Análisis de secuencias del ITS en los taxones de <i>Thalictrum</i> del centro de México.....	40

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. <i>Thalictrum hernandezii</i> . A) hojas, B) aquenio.....	11
Figura 2. <i>Thalictrum gibbosum</i> . A) hojas, B) aquenio.....	12
Figura 3. Distribución de <i>Thalictrum hernandezii</i>	14
Figura 4. Distribución de <i>Thalictrum gibbosum</i>	14
Figura 5. <i>Thalictrum pachucense</i> . A) inflorescencia, B) aquenio.....	15
Figura 6. Distribución de <i>Thalictrum pachucense</i>	15
Figura 7. <i>Thalictrum pubigerum</i> . A) inflorescencia, B) aquenio.....	17
Figura 8. Distribución de <i>Thalictrum pubigerum</i>	17
Figura 9. <i>Thalictrum strigillosum</i> A) inflorescencia, B) aquenio y C) hojas.....	18
Figura 10. Distribución de <i>Thalictrum strigillosum</i>	18
Figura 11. Diagrama de la región del ITS del DNA ribosomal del núcleo.....	23
Figura 12. Localidades donde fueron recolectas las especies del género <i>Thalictrum</i>	27
Figura 13. Filograma de los taxones de <i>Thalictrum</i> a partir de la región del ITS.....	35
Figura 14. Árbol de consenso estricto de los taxones de <i>Thalictrum</i> a partir de la región del ITS.....	36
Figura 15. Árbol de máxima verosimilitud de los taxones de <i>Thalictrum</i> a partir de la región del ITS.....	38

1. INTRODUCCIÓN.

La sistemática es la rama de la biología que trata de detectar, describir y explicar la diversidad biológica (Moritz y Hillis, 1996), convirtiéndose en un área de gran importancia para la biología moderna. Las tres grandes áreas de aplicación de la sistemática molecular son la estructura genética de poblaciones (como variación geográfica y heterocigocidad), delimitación de especies (incluyendo híbridos) e inferencia filogenética (Baverstock y Moritz, 1996).

Los caracteres morfológicos, tradicionalmente han servido como la única base para la mayoría de los estudios taxonómicos (Stevens, 1984; 1986). Estos caracteres generaron el sistema básico de clasificación para la mayoría de los taxones (Ferguson, 1980). En la medida que estos sistemas se pretendían refinar, se utilizaron datos adicionales como: número de cromosomas, fitoquímica, micromorfología y anatomía, entre otros (Ferguson, 1980; Grant, 1984).

La incorporación de nuevos tipos de datos, particularmente los caracteres moleculares, ha sido necesaria en taxones donde los caracteres morfológicos, por sí solos, no han resuelto los problemas taxonómicos (González, 1997). La utilización de caracteres moleculares ha generado hipótesis que han servido como base para la construcción de nuevas clasificaciones en angiospermas (Chase y Albert, 1998), inferir relaciones filogenéticas, aclarar procesos evolutivos y explicar la variabilidad genética a distintos niveles (Soltis y Soltis, 1998).

Los caracteres moleculares pueden provenir de biomoléculas como proteínas, isoenzimas, enzimas de restricción, hibridación de DNA y secuencias génicas, siendo estas últimas las mas recomendables en la mayoría de los casos en estudios

sistemáticos, debido a que representan una fuente abundante de caracteres, tienen diferentes propiedades estructurales y funcionales y presentan diferentes tasas evolutivas (Ritland y Clegg, 1987; Soltis, *et al.*, 1990; Giannasi *et al.*, 1992; González, 1992).

No obstante, las secuencias génicas no son la única fuente de datos por lo que no deben remplazar a otros, especialmente a los caracteres morfológicos. Por el contrario un estudio debe basarse en toda la información disponible, molecular y no molecular; para los organismos de interés (González, 1997). La incorporación de caracteres morfológicos, fitoquímicos y anatómicos ha permitido un mayor soporte en las topologías obtenidas cuando son combinados con caracteres moleculares (Nandi *et al.*, 1998; Hoot, *et al.*, 1999; Savolainen *et al.*, 2000). En el género *Thalictrum* se han hecho varios estudios con base en caracteres tradicionales y los estudios filogenéticos solo han incluido a especies de Estados Unidos y Eurasia, por lo tanto la posición de las especies mexicanas dentro de la filogenia del género se desconoce. Así mismo la delimitación de las especies del género *Thalictrum* del centro de México es controversial debido a la falta de buenas colecciones y trabajo de campo. Una manera de solucionar este problema es a través de análisis filogenéticos, comparación de secuencias de DNA y el análisis de caracteres diagnósticos para cada taxón, permitiendo la delimitación de las especies e inferir la posición filogenética de éstas. Este trabajo se enfocó en estudiar a las especies del género *Thalictrum* del centro de México para lo cual se secuenció la región del espaciador interno transcrito (ITS) del DNA ribosomal del núcleo para inferir la filogenia del género. Se empleó el concepto filogenético de especie para la delimitación de los taxones problemáticos. Con este trabajo se abren expectativas para generar más estudios a futuro del género *Thalictrum* y desarrollar marcadores más variables para solucionar problemas de especies estrechamente relacionadas.

2. ANTECEDENTES.

2.1 El orden Ranunculales.

El orden Ranunculales está formado por las familias Menispermaceae, Berberidaceae y Papaveraceae. El grupo es considerado monofilético con base en el polen tricolpado y por diversos genes como *atpB*, *rbcL* y *matK* (Hoot *et al.*, 1999; Savolainen *et al.*, 2000; Hilu *et al.*, 2003). En los diversos razonamientos filogenéticos realizados en conjunto con otras familias de angiospermas, el orden ocupa uno de los linajes más tempranos de las herbáceas.

El orden presenta varias sinapomorfias como estambres dispuestos en espiral sobre un receptáculo alargado, numerosos carpelos, condición herbácea, la simetría actinomorfa y alcaloides como berberinas e isoquilinas. Con los datos morfológicos el grupo se coloca en la subclase Magnoliidae (Magnoliales, Laurales y Canellales; Nandi *et al.*, 1998). Los estudios cladísticos de Loconte y Estes (1989) apoyan la monofilia de la familia, así como el parentesco cercano con las familias Menispermaceae y Berberidaceae, mientras que los estudios filogenéticos realizados con *atpB*, *rbcL* (Hoot *et al.*, 1999; Savolainen *et al.*, 2000) y *matK* (Hilu *et al.*, 2003) indican que el orden Ranunculales es el grupo hermano de Proteaceae, Sabiaceae, Buxaceae y Trochodendraceae, otras familias que también presentan un polen tricolpado.

Sin embargo, el registro fósil no revela cuando se origina la sinapomorfía del polen tricolpado y ni cuando se separó el grupo (Magallón, 2004). Magallón y Sanderson (2005) calcularon edades absolutas, con base en la divergencia del DNA, estimando que el orden pudo haberse originado hace 150-202 millones de años, siendo la diversificación congruente con el registro fósil (Crane *et al.*, 1993).

2.2 La familia Ranunculaceae.

Según Tamura (1993) la familia Ranunculaceae está constituida aproximadamente de 68 géneros y 2500 especies mientras que Walters *et al.* (2002) da a conocer 47 géneros divididos en 2000 especies. La familia se encuentra en regiones templadas y boreales (Mabberley, 1997). Es más diversa en el este de Asia con 44 géneros; en Europa y Norteamérica se encuentran 24 géneros siendo endémicos para esta última región (Tamura, 1993). En México existen 9 géneros, 103 especies y 28 taxones subespecíficos reconocidos para la familia (Villaseñor, 2003).

La familia se distingue por presentar hierbas anuales o perennes, a excepción de *Clematis* que presenta tallos leñosos y *Xanthorhiza* (arbustos). Pueden ser arbustos, ocasionalmente plantas trepadoras, acuáticas, con hojas basales y caulinares; por lo general alternas y en ocasiones opuestas con márgenes enteros, crenados, dentados y serrados; los tejidos vasculares están dispuestos en un anillo o dispersos. Las Ranunculáceas presentan flores solitarias o en inflorescencias como cimas, racimos y panículas; por lo general son hermafroditas pero existen géneros con flores unisexuales, mayormente actinomorfas y algunas zigomorfas, una condición derivada que solo es conocida en *Aconitum* y *Delphinium* (Bhattacharyya y Johri, 1998). Las flores tienen tépalos y algunos géneros han experimentado la pérdida de pétalos tomando su lugar sépalos coloreados (Tamura, 1965) o presentan un perianto diferenciado en cáliz con cinco sépalos usualmente libres o juntos, imbricados o valvados y una corola con cinco pétalos quizás de origen estaminal, imbricados con formación de nectarios en forma de cuernos en géneros como *Delphinium* y *Aquilegia*.

Los estambres son numerosos, dispuestos en espiral con anteras adnatas que abren longitudinalmente con granos de polen tricolpados. La base de los filamentos de los estambres de *Clematis* y *Pulsatilla* presentan una función secretora (Kratochwill, 1988). Presenta de uno a varios pistilos con estilo presente o ausente, usualmente cinco carpelos y ocasionalmente reducidos a uno; existen géneros como *Caltha* que presentan glándulas de néctar en la base de los carpelos (Smith, 1926), óvulos de uno a varios con placentación parietal y axilar, mientras que la familia presenta frutos secos en forma de aquenios, folículos, bayas y cápsulas.

A pesar de la morfología primitiva, las Ranunculaceae exhiben diversos sistemas de polinización, muchas especies son polinizadas por insectos y algunas de *Thalictrum* por el viento. En la mayoría de los géneros el perianto es accesible para insectos no especialistas, pero ciertos insectos dependen obligatoriamente de las flores de Ranunculaceae. Por ejemplo, la mosca *Chiastochaeta trollii* depende de la especie *Trollius europaeus*, y el abejorro *Bombus gersteckeri* depende de *Aconitum vulparia* (Tamura, 1993). Las flores por lo general son protandras, aunque puede ocurrir la autofecundación cuando las anteras se abren durante la maduración de los estigmas (Keener, 1975).

La familia ha desarrollado la producción de alcaloides como isoquinolinas y ranunculinas (Ruijgrok, 1968), magnoflorinas, berberinas y compuestos cianogénicos. Muchas especies son cultivadas como ornamentales por la fragancia de sus flores y otras son utilizadas como medicamentos para problemas de neuralgia, reumatismo y para calmar el dolor y la fiebre. *Clematis dioica* se utiliza para la gripe y *Thalictrum strigillosum* para lavados vaginales (Pérez *et al.*, 2003). Las semillas de *Nigella damascena* son usadas como condimento. Sin embargo un número alto de géneros son venenosos (Bhattacharyya y Johri, 1998).

Adanson (1763) dividió a la familia con base en grupos con frutos de una semilla y con frutos de varias semillas. Las subfamilias de Ranunculaceae se distinguen por el tipo de fruto, las partes de la flor, caracteres citológicos, y el número y tamaño de los cromosomas. Langlet (1932) propuso la subdivisión de la familia en el grupo *Ranunculus* que presenta cromosomas largos generalmente enrollados con un número básico de ocho (R-cromosomas) y el grupo *Thalictrum* con pequeños cromosomas poco curvados con número básico de siete (T-cromosomas). Tamura (1966) dividió a la familia en seis subfamilias: Helleboroideae, Coptoideae, Hydrastidoideae, Isopyroideae, Ranunculoideae y Thalictrioideae. Coptoideae fue incluida en Isopyroideae como una tribu por Kosuge (1989). Duncan y Keener (1991) realizaron una nueva clasificación con especial referencia en las especies del Hemisferio Occidental, presentando tres subfamilias (Hydrastidoideae, Ranunculoideae e Isopyroideae), 16 tribus y dos subtribus.

2.3 El género *Thalictrum*.

El género *Thalictrum* pertenece a la familia Ranunculaceae. Tamura (1993) reconoció 330 especies; pero dos años más tarde presentó una estimación más precisa con 190 especies (Tamura, 1995). Mabberley (1997) reconoció 300 especies, mientras que Rzedowski y Rzedowski (2001) dan a conocer de 80 a 150 especies. El género se distribuye en el Norte y Sur de América, Nueva Guinea, Eurasia, el Sur de Etiopía y África tropical (Boivin, 1944).

Son hierbas perennes, generalmente altas y erectas, con raíces comúnmente fibrosas y en algunas especies tienden a ser tuberosas. Presentan tallos huecos o simples con hojas en parte basales y en parte caulinas, alternas; márgenes enteros, lobados, crenados y algunas veces dentados.

Las flores están dispuestas usualmente en panículas, frecuentemente unisexuales, pequeñas, verdosas, amarillas y rojizas (Rzedowski y Rzedowski, 2001) con un perianto de cuatro a cinco sépalos pequeños, mientras que en algunas hermafroditas son largos y coloreados (Boivin, 1944). Las flores carecen de pétalos, presentan estambres numerosos, exsertos y anteras lineales, globosas, apiculadas y muy vistosas, con ovario de pocos a muchos carpelos insertos sobre un receptáculo y aquenios de cuatro a quince estipitados, nervados y asimétricos. El género ha experimentado hibridación combinada con alopoloidía (Kuzmanov y Dutschewska, 1982). En el curso de su evolución ha desarrollado tres sistemas sexuales: andromonoicas (flores masculinas y hermafroditas sobre el mismo individuo), dioicas (sexos separados) y hermafroditas (sexo masculino y femenino en la misma flor).

Las especies varían en su modo de polinización (Pellmyr, 1995). Solo las especies dioicas y andromonoicas son polinizadas por el viento, mientras que las hermafroditas por insectos. *Thalictrum* es el único género de Ranunculaceae polinizado por el viento y por insectos a diferencia de los demás géneros de la misma familia que son zoofílicos. Lecoyer (1885) publicó en su monografía del género *Thalictrum* doce especies de Norteamérica, siete de Centroamérica y trece de Sudamérica. Por los siguientes 25 años, el estudio del género fue dominado por E. L. Greene, quien describió 45 especies y siete variedades. Rose (1897) empezó la monografía de América central y México pero sólo fue publicada una parte de este trabajo. Para finales de 1942, se habían propuesto 165 nombres para designar las especies americanas, 40 de estas especies restringidas al sur de los Estados Unidos (Boivin, 1944).

Boivin (1944) dividió a *Thalictrum* en dos subgéneros: *Thalictrum* y *Lecoyerium*. El primero comprende 250 especies, que presentan flores hermafroditas con pistilos más cortos y cinco sépalos; se distribuyen en Nueva Guinea, Eurasia y algunas en Norteamérica. El segundo comprende 80 especies, con flores unisexuales, hermafroditas y polígamas con pistilos largos y cuatro sépalos; distribuyéndose en África y en el Norte y Sur de América (Kyung *et al.*, 1997).

Tamura (1995) colocó al género *Thalictrum* en la subfamilia Thalictrioideae. Duncan y Keener (1991) colocan al género en la subfamilia Isopyroideae. El género ha sido colocado en el grupo *Thalictrum* (T-cromosomas) presentando cromosomas pequeños y con base en el número siete (Gregory, 1941). Hoot (1995) dió a conocer que este grupo es parafilético con respecto al grupo *Ranunculus* (R-cromosomas; Kyung *et al.*, 1997).

Johanson (1995), utilizando parsimonia de Dollo y de Wagner observó las relaciones presentes en los géneros *Thalictrum* y *Aquilegia*. Estos dos se encuentran con *Isopyrum* presentándose un linaje monofilético que comprende los géneros *Anemonella*, *Thalictrum*, *Paropyrum*, *Paraquilegia*, *Isopyrum* y como grupo hermano *Aquilegia*. Con la parsimonia de Dollo, los géneros *Aquilegia* y *Thalictrum* están unidos a *Aconitum-Delphinium-Nigela*, mientras que con la parsimonia de Wagner forman un clado con *Anemone-Clematis*. Utilizando caracteres morfológicos, citológicos y embriológicos el género *Thalictrum* forma un grupo con *Aquilegia*, *Isopyrum* y *Anemone* (Nikolic, 1994). Hoot (1995) estudió la forma del fruto, metabolitos secundarios, número de cromosomas, simetría floral y nectarios dando a conocer que el género *Thalictrum* forma un grupo monofilético con el género *Anemonella. Thalictrum*, a diferencia de *Aquilegia* presenta un alto grado de poliploidia (Park, 1992).

La monofilia del género se soporta en los análisis llevados a cabo con el DNA del cloroplasto utilizando 31 géneros de la familia Ranunculaceae, tres especies del género *Thalictrum* y tres especies de dos familias relacionadas, Berberidaceae y Lardizabalaceae como grupos externos (Johanson, 1995), con la región del ITS (Ro y McPheron, 1997) utilizando nueve especies del género *Thalictrum*, 17 del género *Aquilegia* y una especie de los géneros *Enemion* y *Leptopyrum*, con el gen 26S (Ro *et al.*, 1997) y los genes *atpB* y *rbcL* (Hoot, 1995).

En el estudio de Ro *et al.* (1997) se utilizaron seis especies del género *Thalictrum*, tres especies del género *Aquilegia* y una especie de los géneros *Anemone*, *Caltha*, *Clematis*, *Cimicifuga*, *Consolida*, *Coptis*, *Delphinium*, *Hepatica*, *Nigella* y *Ranunculus*. Mientras que en el de Hoot (1995) se utilizaron 26 géneros de la familia Ranunculaceae.

Las especies norteamericanas *T. dasycarpum*, *T. cooleyi*, *T. coriaceum* forman un grupo monofilético soportado con un "bootstrap" del 98% en el estudio llevado a cabo con la región del ITS (Ro y McPheron, 1997), mientras que Ro *et al.* (1997) dan a conocer que la monofilia es soportada con un 68% utilizando el gen 26S.

2.4 El género *Thalictrum* en México.

En México existen 30 especies del género, encontrándose en gran parte de la Republica (Cuadro 1) en bosque mesófilo de montaña, de *Abies* y de encino y pino (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Cuadro.1. Distribución del género *Thalictrum* en México (Boivin, 1944).

Especie	Autoridad	Subgénero	Distribución
<i>T. arsenii</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Michoacán
<i>T. conzattii</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Distrito Federal, Estado de México
<i>T. cuernavacantum</i>	Rose	<i>Lecoyerium</i>	Morelos
<i>T. deamii</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Tamaulipas, Nuevo León
<i>T. galeottii</i>	Lecoyer	<i>Lecoyerium</i>	Veracruz
<i>T. gibbosum</i>	Lecoyer	<i>Lecoyerium</i>	Puebla, Morelos, Oaxaca, Edo. de México
<i>T. grandiflorum</i>	S. Watson	<i>Lecoyerium</i>	Chihuahua, Durango, Nuevo León
<i>T. henricksonii</i>	M. C. Johnst.	<i>Lecoyerium</i>	Michoacán
<i>T. hernandezii</i>	Tausch	<i>Lecoyerium</i>	Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Distrito Federal
<i>T. jaliscanum</i>	Rose	<i>Lecoyerium</i>	Jalisco
<i>T. laeteviride</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Michoacán
<i>T. lanatum</i>	Lecoyer	<i>Lecoyerium</i>	Oaxaca, Puebla
<i>T. madrense</i>	Rose	<i>Lecoyerium</i>	Durango
<i>T. nelsonii</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Oaxaca
<i>T. pachucense</i>	Rose	<i>Lecoyerium</i>	Hidalgo
<i>T. parvifructum</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Sonora
<i>T. peltatum</i>	DC.	<i>Lecoyerium</i>	Estado de México
<i>T. peninsulare</i>	Rose	<i>Lecoyerium</i>	Baja California
<i>T. pennellii</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Durango
<i>T. pinnatum</i>	S. Watson	<i>Lecoyerium</i>	Chihuahua
<i>T. pringlei</i>	S. Watson	<i>Lecoyerium</i>	Michoacán, Jalisco
<i>T. pubigerum</i>	Benth.	<i>Lecoyerium</i>	Jalisco, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca
<i>T. pudicum</i>	Standl. y B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Michoacán
<i>T. roseanum</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Morelos
<i>T. sessilifolium</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Michoacán, Puebla
<i>T. sharpi</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Michoacán
<i>T. strigillosum</i>	Hemsl.	<i>Lecoyerium</i>	Ampliamente distribuida en la Republica
<i>T. subpubescens</i>	Rose	<i>Lecoyerium</i>	Distrito Federal
<i>T. treleasii</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Guerrero
<i>T. tripeltiferum</i>	B. Boivin	<i>Lecoyerium</i>	Michoacán

2.5 El problema de la especie en *Thalictrum*.

Muchos taxónomos, cuando propusieron nuevas especies de *Thalictrum*, tomaron en cuenta la división, tamaño, contorno y formas de las hojas y las medidas de los pecíolos. Fueron omitidos el tipo de pubescencia, la longitud del estilo, las anteras, y la forma del fruto, siendo estipitado, asimétrico o giboso (Boivin, 1944). Así mismo, la falta de colecciones cuidadosas y buenos estudios de campo han ocasionado que la literatura esté repleta de nombres que quizá no representen distintas entidades (Park y Festerling, 1997). Pero estos problemas no solo han ocurrido con especies norteamericanas y europeas. También sucede con las especies del centro de México donde su delimitación es controvertida.

Boivin (1944) reconoce a *T. hernandezii* como una especie diferente de *T. gibbosum*, pero Rzedowski y Rzedowski (2001) mencionan la posibilidad de que sean sinónimos. Las especies *T. hernandezii* (Fig. 1) y *T. gibbosum* (Fig. 2) son muy parecidas presentando la misma altura, hojas y tallos sin pelos (glabros). Solo difieren en los aquenios, siendo estipitado para *T. gibbosum*.



A)



B)

Fig. 1. *Thalictrum hernandezii*. A) hojas, B) aquenio (Boivin, 1944).



A)



B)

Fig. 2. *Thalictrum gibbosum* A) hojas, B) aquenio.

T. hernandezii Taush

Es una planta herbácea que mide de uno a tres metros de altura, con tallo glabro y más o menos glanduloso; hojas de uno a seis centímetros de largo por uno a tres centímetros de ancho; inflorescencia grande y extendida; flores pequeñas verdosas o verdoso-rojizas; polígamo-monoicas, en menor cantidad flores masculinas; estambres y estilos exsertos de un centímetro de largo; aquenio asimétrico, giboso y fuertemente nervado (Boivin, 1944). Florece de mayo a septiembre encontrándose en matorrales secundarios y bosques mesófilos en los estados de Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Distrito Federal en un rango altitudinal de 1,500-2,800 metros (Sánchez, 1969; Fig. 3).

T. gibbosum Lecoyer

Planta de uno a tres metros de altura, tallo glabro de color verde claro; hojas de uno a seis centímetros de largo por uno a tres centímetros de ancho; inflorescencia grande y extendida; flores andromonoicas, pocas masculinas; estambres exsertos de un centímetro; aquenios gibosos, asimétricos y fuertemente nervados (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Se distribuye en la región de Amecameca, en matorrales secundarios y en bosque mesófilo de montaña; también se conoce de Morelos, Puebla, Oaxaca y el Estado de México; su rango altitudinal es de 2450-2800 metros (Rzedowski y Rzedowski, 2001; Fig. 4).

Thalictrum gibbosum es una planta fina y delicada muy parecida a la especie *T. pachucense* (Fig. 5). Se sospecha que es la misma especie, aunque ambas se distinguen por la altura, siendo *T. pachucense* más pequeña. La medida del pecíolo también varía, nueve centímetros para *T. pachucense* y cinco centímetros en *T. gibbosum*. El aquenio es fuertemente nervado solo para este último.

T. pachucense Rose

Planta de veinte a cincuenta centímetros de altura; hojas basales, láminas triternadas, foliolos de menos de un centímetro de largo, enteros o con tres lóbulos apicales, base entera, cuneada o acorazonada; pecíolo de uno a dos centímetros; flores andromonoicas; púrpuras con estambres apiculados (Boivin, 1944), aquenios de cuatro a cinco milímetros, gibosos, sostenidos por un pedicelo. Se distribuye en bosques de *Abies* y en claros adyacentes en el estado de Hidalgo a una altitud de 2800-3000 metros (Rzedowski y Rzedowski, 2001; Fig. 6).

T. pubigerum Bent.

Planta de menos de un metro a 1.5 metros de alto; tallos pubescentes, pelos finos, cortos y translucidos; hojas grandes y anchas de tres centímetros de largo por tres centímetros de ancho, el envés es denso y suavemente pubescente; panículas largas y extendidas; flores hermafroditas, algunas masculinas; estambres y estilos exsertos de un centímetro de largo; produciendo de diez frutos o menos, con aquenios de cuatro a cinco milímetros de largo (Fig. 7). Se encuentra en laderas húmedas y boscosas en Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, el Estado de México, Jalisco, Veracruz y Oaxaca. Altitud 2500-3000 metros (Rzedowski y Rzedowski, 2001; Fig. 8).

La distinción entre *T. pubigerum* y *T. strigillosum* (Fig. 9) con base en la pubescencia, no siempre es clara (Rzedowski y Rzedowski, 2001). *Thalictrum pubigerum* es más pequeña con hojas grandes y anchas. El tamaño del aquenio también difiere siendo más grande en *T. strigillosum*. Esta misma especie presenta un envés con pelos toscos a diferencia de *T. pubigerum* que es suavemente pubescente con pelos finos. Las panículas son más largas en *T. pubigerum* (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

T. strigillosum Hemsley

Planta de veinte centímetros a dos metros de alto; tallos con pelos cortos o pelos largos no glandulosos coloreados; hojas de uno a dos centímetros de largo; pubescencia variada, densa en el envés de los foliolos; flores hermafroditas, pocas masculinas; estambres y estilos exsertos de un centímetro de largo; aquenios de tres a cuatro milímetros. Se encuentra en gran parte de la Republica Mexicana, en matorrales, zacatales y en bosques de encino y pino. Su rango altitudinal es de 2350-3200 metros (Rzedowski y Rzedowski, 2001; Fig. 10).

2.6 El concepto filogenético de especie.

A través de la historia de la biología se han propuesto diferentes conceptos de especie, lo cual ha dependido de los diferentes tipos de preguntas que se hace un investigador y/o de los organismos con los que trabaja (Templeton, 1989). En el último siglo y medio se ha utilizado el término con dos diferentes propósitos: como base para describir y catalogar la diversidad biológica y para representar las relaciones históricas de la diversidad de una manera jerárquica, como base de la teoría evolutiva (Cracraft, 1989).

El surgimiento de los análisis cladísticos han permitido conocer las relaciones filogenéticas entre diferentes organismos, realizar nuevas clasificaciones y han conducido a un concepto filogenético de especie (González, 1997). El primero en proponer un concepto filogenético de especie fue Cracraft (1983) describiendo que una especie “es la agrupación diagnosticable más pequeña de organismos individuales dentro de la cual hay un patrón de ancestría y descendencia”. Por varios años el concepto filogenético de especie ha sido discutido por diferentes autores (por ejemplo Rosen, 1979; Hill y Crane, 1982; Donoghue, 1985) proponiendo y defendiendo un concepto basado en un patrón de caracteres compartidos. Mishler y Theriot (2000) dan a conocer un concepto basado en la evidencia de monofilia. Nixon y Wheeler (1990) definen una especie filogenética como la “más pequeña agregación de poblaciones (sexual) o linajes (asexual) diagnosticables por una única combinación de estados de carácter en individuos comparables”. Las especies divergen por presentar una combinación de caracteres diagnosticables, constituyendo así una única entidad filogenética; estas diferencias permiten conocer que las entidades han evolucionado independientemente (Nixon y Wheeler, 1992).

Debido a que las especies presentan caracteres diagnósticos pueden llevarse a cabo diferentes métodos para la delimitación de estas especies (Sites y Marshall, 2003). Entre los métodos de delimitación de especies se encuentran los que analizan la presencia o ausencia de flujo génico (Porter, 1990), los que estudian las distancias génicas (Good y Wake, 1992; Highton, 1990), la fijación o ausencia de alelos (Doyle, 1995), y en el que las especies son delimitadas por medio de sus atributos observables como el análisis de agregación de poblaciones (AAP) presentado por Davis y Nixon (1992).

Otros métodos para la delimitación de especies se basan en las topologías de árboles filogenéticos. Estos requieren la construcción de genealogías, siendo las especies delimitadas mediante nodos resueltos (Braum y Shaw, 1995). Otros métodos utilizan tanto secuencias de DNA y morfología, separando a las poblaciones por divergencia de caracteres (Wiens y Penkrot, 2002). Brower (1999) presenta la agregación cladística de haplotipos (ACH), el cual consiste en identificar haplotipos de diferentes individuos por comparación y llevar a cabo un análisis cladístico con éstos. Este método corrobora o rechaza hipótesis a priori sobre la delimitación de especies.

Por lo tanto, en esta investigación se puede discernir si dos poblaciones pertenecen a la misma especie o a especies diferentes. Si las poblaciones de cada especie presentan apomorfias (morfológicas o moleculares) y a través de análisis de secuencias de DNA se colocan juntas, formando un grupo monofilético, pertenecen a una misma especie. Si las poblaciones de cada especie no comparten apomorfias, pero forman un grupo contiguo en la filogenia es decir, un grupo parafilético, pueden corresponder también a una misma especie (Olmstead, 1995). Pero si dos especies putativas ocurren en partes distintas de la filogenia (un grupo polifilético) se consideran especies distintas (Brower, 1999).

2.7 La región del espaciado interno transcrito (ITS) del DNA ribosomal del núcleo.

A pesar de la gran diversidad de genes que existen, los que codifican para el RNA ribosomal han sido utilizados para estudios sistemáticos, tanto en microorganismos, como en plantas y animales (Hillis y Dixon, 1991; Hamby y Zimmer, 1992). La abundancia de estos genes así como el desarrollo de “primers” universales (White *et al.*, 1990) ha facilitado su aislamiento así como las comparaciones filogenéticas para distintos niveles taxonómicos (Gonzalez, 1997). La unidad del DNA ribosomal está presente en miles de copias dentro del genoma de las plantas (Appels y Dvorak, 1982). Cada repetición de la región del DNA ribosomal del núcleo consiste de un espaciador transcrito externo (ETS), seguido por el gen 18S, un espaciador interno transcrito (ITS-1), el gen 5.8S, un segundo espaciador interno transcrito (ITS-2) y finalmente el gen 26S. Cada región del DNA ribosomal del núcleo se encuentra separada de la siguiente por un espaciador intergénico (IGS; Soltis y Soltis, 1998; Fig. 11).

La longitud de las regiones codificadoras es muy similar en las plantas. El tamaño del gen 18S es de 1800 p.b. (Nickrent y Soltis, 1995), el tamaño del gen 5.8S es de 164-165 p.b. (Hamby y Zimmer, 1992); la longitud del gen 26S es arriba de 3300 p.b. (Bult *et al.*, 1995). En las angiospermas la longitud del ITS-1 e ITS-2 presentan menos de 300 pares de bases (ITS-1: 187 a 298 p.b., ITS-2: 187 a 252 p.b.) mientras que la longitud total es de 600 a 700 p.b. (Baldwin *et al.*, 1995). La longitud del espaciador intergénico varía considerablemente, de uno a ocho Kpb (Jorgensen y Cluster, 1988).

Los espaciadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2) tienen como función la maduración del RNA ribosomal (Baldwin *et al.*, 1995). Hershkovitz y Zimmer (1996) dan a conocer que el ITS-2 está más conservado que el ITS-1, así como el contenido de guaninas y citosinas es alto en ambos espaciadores.

La región del ITS se ha amplificado fácilmente en muchas angiospermas en parte por su pequeño tamaño, gran número de copias y porque los “primers” que se utilizan para PCR (método de la reacción en cadena de la polimerasa) corresponden a secuencias altamente conservadas, lo que ayuda grandemente a la amplificación, secuenciación, alineamiento y análisis filogenético (Baldwin, 1992).

Las secuencias de la región del ITS han permitido la reconstrucción filogenética en angiospermas (Baldwin *et al.*, 1995), algas (Bakker *et al.*, 1995) y helechos (Stein *et al.*, 1992), así como en hongos (Vilgalys y Sun, 1994) e insectos (Campbell *et al.*, 1993). La región del ITS es filogenéticamente útil a nivel de familia (Bayer *et al.*, 1996), género (Soltis *et al.*, 1996) y dentro de especies para investigar relaciones entre poblaciones alopátricas (Baldwin, 1992), resolver conflictos entre especies y proporcionar resolución a especies relacionadas (Baldwin *et al.*, 1995). El DNA ribosomal consiste de miles de copias por locus, y es común que presente evolución concertada (Small *et al.*, 2004). La evolución concertada homogeniza las regiones del DNA ribosomal, siendo la evolución de estas regiones muy compleja. La evolución concertada puede originarse por varios mecanismos como cruzamiento desigual de cromosomas homólogos y la conversión de genes, pero la contribución de estos dos mecanismos no es muy clara (Dover, 1982). Trabajos de Buckler *et al.* (1997) y Buckler y Holtsford (1996), sugieren precaución en las reconstrucciones filogenéticas que presentan evolución concertada, particularmente en niveles taxonómicos bajos.

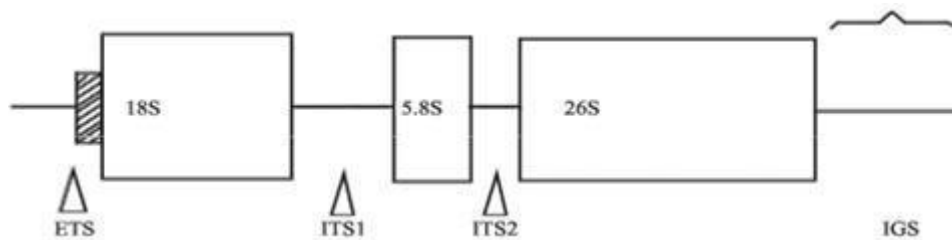


Fig. 11. Diagrama de la región del DNAr del núcleo. El DNA ribosomal está conformado por los genes 18S, 5.8S y 26S y los espaciadores ITS1 (el espaciador interno transcrito 1), ITS2 (el espaciador interno transcrito 2), IGS (espaciador intergénico) y el ETS (espaciador transcrito externo; Soltis y Soltis, 1998).

3. JUSTIFICACIÓN.

El género *Thalictrum* ha sido poco estudiado y para la identificación de las especies se conocen pocos caracteres diagnosticables. En el centro de México la delimitación de algunas especies de este género es controvertida y los pocos trabajos (Hoot, 1995; Johanson, 1995; Ro *et al.*, 1997; Ro y McPheron, 1997) realizados con este género no incluyen a los taxones del centro de México.

El propósito de esta investigación es establecer la posición de estos taxones utilizando secuencias de especies del mismo género de diversas partes del mundo proporcionadas por el Dr. Aaron Liston de Oregon State University y aportar una solución a la validez a estos taxones mediante caracteres morfológicos y secuencias de DNA.

4.0 OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar la posición filogenética de los taxones del género *Thalictrum* del centro de México utilizando el espaciador interno transcrito (ITS) del DNA ribosomal del núcleo en conjunto con otras especies del mismo género de diversas partes del mundo.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

Evaluar la validez de los taxones del centro de México con base en los criterios de monofilia y divergencia.

Delimitar estos taxones utilizando caracteres morfológicos y secuencias de ITS.

Comprobar si los taxones del centro de México pertenecen al clado de las andromonoicas.

5. MATERIAL Y MÉTODO.

5.1 Recolecta de material biológico.

Las plantas fueron recolectadas (Cuadro 2) en los estados de Hidalgo, Querétaro y en el Estado de México (Fig. 12). Estos estados forman parte de las provincias de Llanuras y Sierras de Querétaro e Hidalgo y de Lagos y Volcanes de Anahuac (Cervantes *et al.*, 1990). La recolecta se llevó a cabo en bosque de *Abies*, *Pinus* y *Quercus* así como en matorral secundario; sobre laderas y a orillas de arroyos, entre 1500 y 2900 metros de altitud. Posteriormente las plantas se prensaron y se secaron.

Una vez secas las plantas se almacenaron en el Herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo para posteriormente ser identificadas utilizando dos claves (Boivin, 1944; Rzedowski y Rzedowski, 2001). A las plantas se les cortaron algunas hojas para guardarlas en sobres que fueron etiquetados con los datos correspondientes (fecha y lugar de recolecta). Estos sobres fueron colocados en el congelador a -80° C para extraer el DNA posteriormente.

Cuadro 2. Localidades donde fueron recolectadas las especies del género *Thalictrum*.

Especie	No. de recolecta	Fecha de recolecta	Estado	Localidad	Coordenadas
<i>T. gibbosum</i>	DTM22	19/12/2004	Edo. de México	Amecameca	N 19° 07' 35" O 98° 46' 36" Altitud 2300m
<i>T. hernandezii</i>	DTM15	28/11/2004	Edo. de México	Toluca	N 19° 08' 15" O 99° 55' 27" Altitud 2496m
<i>T. hernandezii</i>	DTM16	28/11/2004	Edo. de México	Toluca	N 20° 09' 16" O 99° 57' 29" Altitud 2496m
<i>T. hernandezii</i>	DTM17	28/11/2004	Edo. de México	Toluca	N 20° 09' 16" O 99° 57' 29" Altitud 2496m.
<i>T. pachucense</i>	DTM7	10/08/2003	Hidalgo	Zimapán	N 20° 48' 17" O 99° 15' 37" Altitud 2080m
<i>T. pubigerum</i>	DTM3	25/06/2003	Hidalgo	La Estanzuela	N 20° 10' 20 " O 98° 45 ' 15" Altitud 2780m
<i>T. pubigerum</i>	DTM4	10/08/2003	Hidalgo	Zimapán	N 20° 48' 17" O 99° 15' 37" Altitud 2080m
<i>T. pubigerum</i>	DTM5	10/08/2003	Hidalgo	Zimapán	N 20° 48' 17" O 99° 15' 37" Altitud 2080m
<i>T. pubigerum</i>	DTM6	10/08/2003	Hidalgo	Zimapán	N 20° 48' 17" O 99° 15' 37" Altitud 2080m
<i>T. pubigerum</i>	DTM13	11/10/2004	Hidalgo	Real del Monte	N 20° 08' 51" O 98° 40' 59" Altitud 1,559m
<i>T. strigillosum</i>	DTM1	19/06/2003	Hidalgo	Peñas Cargadas	N 20° 06' 34" O 98° 37' 41" Altitud 2740 m

<i>T. strigillosum</i>	DTM10	18/08/2004	Hidalgo	Molango	N 20° 47' 26.2" O 98° 43' 41.2" Altitud 1559m
<i>T. strigillosum</i>	DTM12	11/10/2004	Hidalgo	Real del Monte	N 20° 08' 51" O 98° 42' 60" Altitud 1,559m
<i>T. strigillosum</i>	DTM20	08/12/2004	Querétaro	Pinal de Amoles	N 21° 10' 52" O 99° 34' 28" Altitud 2095m
<i>T. strigillosum</i>	DTM21	08/12/2004	Querétaro	Pinal de Amoles	N 21° 10' 52" O 99° 34' 28" Altitud 2095m

5.2 Identificación de las especies.

Para poder identificar las especies del género *Thalictrum* del centro de México, se distinguió la pubescencia densa y suave en el envés de los folíolos, pelos opacos y translucidos en el tallo así como hojas y tallos glabros. En el momento de la recolecta algunos ejemplares eran jóvenes y pocos tenían el aquenio, en algunos ejemplares el fruto llegaba a caerse y era difícil establecer a que especie pertenecía.

Los caracteres morfológicos que se seleccionaron para delimitar a los taxones del centro de México fueron tomados a partir de las claves que se han realizado para la identificación de estas especies. Los caracteres corresponden a tallos y envés de los folíolos pubescentes o glabros, la coloración de los pelos y tamaño de estos, así como las formas de los aquenios (Cuadro 3).

Cuadro 3. Caracteres morfológicos diagnósticos para los taxones del centro de México.

Estructura	Característica
Tallos y folíolos	Glabros o pubescentes
Pelos	Translucidos u opacos
Tallos	Pelos cortos o largos
Aquenios	Gibosos y estipitados

5.3 Extracción, amplificación y secuenciación de DNA.

La extracción del DNA genómico de las hojas se llevó a cabo por medio de morteros con pistilo para romper las paredes celulares y con nitrógeno líquido, siguiendo los pasos del protocolo DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN (anexo).

El DNA purificado fue diluido en 100 µl de Tris-EDTA. Para estimar la cantidad y calidad de DNA extraído, se colocaron 2 µl de éste en un gel de 0.9% de agarosa; mediante electroforesis los fragmentos se separaron y el DNA presente en el gel fue visualizado en una caja de luz UV (302 nm).

Para la amplificación del DNA se utilizó el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis, 1990) con las siguientes concentraciones: 1X Buffer, 1.56 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP (Invitrogen) 1 µM de los “primers” ITS4 (5'-tcctccgcttattgatatgc-3') e ITS5 (5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3'), 2 U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen) y 1 µl de DNA genómico.

Las reacciones se llevaron a cabo en un Termociclador, GeneAmp PCR System (Applied Biosystems) primero aplicando una temperatura de 94°C por tres minutos, seguido por 30 ciclos de: 3 min. a 94°C, 50 s a 55°C y 80 s a 72°C, por último a 72°C por 5 min. La reacción de PCR fue verificada en un gel de agarosa. Las amplificaciones exitosas fueron purificadas con el Kit GeneClean III Kit (Bio101; anexo). Finalmente el producto de PCR purificado se colocó en otro gel para verificar que la calidad del producto fuera la adecuada y que no quedara algún reactivo de la PCR.

Después se llevó a cabo una reacción de secuenciación utilizando 6 uL del producto purificado, 1 µl de 5X Buffer, 1 µl de 2 uM de “primer” y 2 µl de BigDye Terminator Reaction Mix (Applied Biosystems) en un termociclador por 69 ciclos de 30 s a 96°C, 15 s a 50°C, 4 min. a 60°C y 15 min. a 4°C.

Los productos fueron precipitados con acetato de sodio con pH 4.6, se colocaron 25 µl etanol al 95% y 150 µl de etanol al 70%, se centrifugo por cinco min. a 12000 rpm. Se desechó el líquido, se secó en el “SpeedVac” y se agregó 25 µl de Template Suppression Reagent (Applied Biosystems).

Después de aproximadamente 25 minutos se pasó la muestra a los tubos de secuenciación para posteriormente ser colocados en un secuenciador automático de DNA (ABI310, Applied Biosystems).

5.4 Edición y alineación de secuencias.

Las secuencias de ITS 5 e ITS 4 para *T. hernandezii*, *T. gibbosum*, *T. pachucense*, *T. pubigerum* y *T. strigillosum* fueron editadas en el programa BioEdit (Hall, 1999). Para conocer la posición de estos taxones dentro de la filogenia del género, las secuencias finales fueron alineadas en conjunto con otras 38 especies de diversas partes del mundo no publicadas (Aaron Liston, comunicación personal). Las especies *Aquilegia fragrans*, *Aquilegia skinneri*, *Enemion bipernatum*, *Enemion occidentale*, *Leptopyrum fumarioides* y *Paraquilegia grandiflora* de la familia Ranunculaceae fueron incluidas como grupos externos.

5.5 Análisis filogenético.

Las secuencias se analizaron mediante parsimonia y máxima verosimilitud en el programa PAUP* 4.0B10 (Swofford, 2003). El análisis de parsimonia se llevó a cabo con 62 taxones terminales mediante una búsqueda heurística con 10,000 replicas para la incorporación secuencial de los taxones al azar “random sequence addition” e intercambio de ramas “tree-bisection-reconnection” (TBR).

Para manejar el número elevado de árboles más parsimoniosos se guardaron un máximo de dos por cada replicado utilizando los comandos “nchuck” y “chuckscore”. Los valores de “bootstrap” (remuestreo) fueron determinados con 10,000 replicas de “simple addition sequence” y con “mulpars=off”

Debido a que el análisis de máxima verosimilitud sólo puede llevarse a cabo con pocos taxones terminales, no se incluyeron las secuencias de las especies de diversas partes del mundo; además las secuencias de las especies de este género del centro de México que fueron proporcionadas por el Dr. Aaron Liston de Oregon State University tampoco se colocaron en el análisis debido a que no pudieron ser examinadas mediante electroferogramas para conocer si presentaban sitios polimorficos en el ITS. Para escoger un modelo evolutivo se llevó a cabo una prueba de cociente de “log-verosimilitud” en el programa Modeltest 3.0 (Posada y Crandall, 1998). El análisis de máxima verosimilitud usó una búsqueda heurística con incorporación secuencial de los taxones “as-is” con intercambio de ramas TBR.

6. RESULTADOS.

6.1 Alineación.

Las 62 secuencias fueron alineadas manualmente, resultando una matriz de 625 pares de bases. Las posiciones entre la 241 a la 410 no presentaron variación. Se introdujo un mayor número de “gaps” en las especies, *T. dasycarpum*, *T. dioicum*, *T. flavum*, *T. revolutum*, *T. minus*, *T. coriaceum*, *T. aquilefolium*, *T. clavatum* y *T. thalictroides* en las posiciones 10 a la 90. Las especies *T. revolutum*, *T. flavum* y *T. clavatum* presentaron caracteres faltantes entre las posiciones 287-309 mientras que *T. reniforme*, *T. coriaceum* y *T. steymarki* presentaron caracteres faltantes entre las posiciones 545-625.

Los grupos externos presentaron un mayor número de “gaps” en las posiciones de la 10-90 para el género *Paraquilegia*, en las posiciones 120-140 para el género *Leptopyrum* y para *Aquilegia* y en las posiciones 1-17 para el género *Enemion*.

En algunos casos no fue posible determinar que nucleótido aparece en una posición. Por ello se utilizaron códigos de ambigüedad (ejemplo: Y = T o C) presentando un mayor número de estas *T. gibbosum* en las posiciones 30, 43 y 617, *Thalictrum strigillosum* 12 en las posiciones 50, 75 y 617, *T. pubigerum* 3 en las posiciones 189, 201 y 617 y por último *T. pubigerum* 5 en las posiciones 202, 590 y 617. Los códigos de ambigüedad fueron tratados como caracteres faltantes en los análisis filogenéticos.

La variación de la región del ITS para el género *Thalictrum* se observa en el Cuadro 3 siendo el contenido de guaninas y citosinas para ITS1= 0.601, 5.8S= 0.541 e ITS2= 0.658. El número de sitios variables fue de 113 sitios para el ITS1, 13 sitios para 5.8S y 118

sitios para ITS 2; mientras que fueron 80 sitios informativos para ITS1, 5 sitios para 5.8S y 64 sitios para ITS2. Siendo la región del ITS2 la que presenta un mayor número de sitios variables. El mayor contenido de guaninas y citosinas corresponde a la región ITS 2. El 5.8S es el menos variable e informativo.

Cuadro 4. Estadísticas de las secuencias de la región del ITS para especies del centro de México y para las especies *T. clavatum*, *T. thalictroides*, *T. dioicum* y *T. coriaceum*.

PARAMETRO	ITS1	5.8S	ITS2	TOTAL
Longitud alineada.	235	162	216	613
Rango de longitud .	221-228	162	215-216	598-606
Promedio del contenido de G + C	0.601	0.541	0.658	0.600
Numero de sitios variables	113	13	118	245
Numero de sitios informativos	80	5	64	149

6.2 Análisis filogenético.

La reconstrucción filogenética de la región de ITS en *Thalictrum*, recuperó 11,568 árboles más parsimoniosos de 464 pasos, un índice de consistencia (IC) de 0.616, índice de retención (IR) de 0.953 e índice de consistencia excluyendo caracteres informativos (ICexc) de 0.511. Así mismo la filogenia presentó 422 caracteres constantes, 115 informativos y 88 variables no informativos. Uno de los árboles más parsimoniosos se presenta en la Fig. 13. El filograma (Fig. 13) y el árbol de consenso estricto (Fig. 14) de la región del ITS muestra que la monofilia de *Thalictrum* es soportada con un valor de “bootstrap” (remuestreo) del 72%.

Los taxones del centro de México *T. pubigerum*, *T. gibbosum*, *T. hernandezii* y *T. pachucense* no presentan resolución y se agrupan con las especies *T. arsenii*, *T. henricksoni*, *T. lanatum*, *T. grandiflorum* y *T. podocarpum*. Dos de cuatro ejemplares de las especies *T. hernandezii* forman un grupo monofilético con un valor de remuestreo del 80%.

Los taxones norteamericanos forman tres grupos monofiléticos separados. El primero está constituido por las especies *T. dasycarpum*, *T. cooleyi*, *T. coriaceum*, *T. pubescens* y *T. revolutum* con un valor de remuestreo del 97%. Las especies *T. dasycarpum*, *T. cooleyi* y *T. coriaceum* presentan una politomía en el árbol de consenso estricto (Fig. 14) y no existe resolución en el filograma; estas especies forman un grupo hermano con *T. revolutum* y *T. pubescens* con valores de remuestreo del 97%.

Las especies *T. revolutum* y *T. pubescens* forman un grupo monofilético con valor de remuestreo del 75%. El segundo grupo de taxones norteamericanos lo forman las especies *T. polycarpum*, *T. dioicum*, *T. occidentale*, *T. venulosum*, *T. fendleri*, *T. sparsiflorum*, *T. heliophilum* y *T. pinnatum* con un valor de remuestreo del 97% siendo el clado de mayor soporte dentro de las especies norteamericanas

El último grupo está formado por las especies *T. clavatum*, *T. thalictroides* y *T. faurei* con un valor de remuestreo de 89%. Las especies *T. clavatum*, *T. thalictroides* forman un grupo monofilético con un valor del 80%. Las especies de Eurasia *T. flavum* y *T. ramosum* forman un grupo monofilético con un valor de remuestreo de 63%. La especie *T. delavayi* en el árbol de consenso estricto no presenta resolución, a diferencia del filograma donde forman un grupo monofilético con *T. minus* con un valor de remuestreo del 78% (Fig. 13).

En ambos árboles la especie *T. uchiyamai* no presenta resolución, mientras que los dos ejemplares de *T. aquilegifolium* están unidas con un valor del 100%. La especie peruana *T. decipiens* y la de los Himalayas *T. reniforme* forman un grupo monofilético con un 76% para ambos árboles, estas últimas están unidas con *T. sparsiflorum* 1 con un valor de remuestreo del 53% a diferencia del árbol de consenso estricto donde esta especie no presenta resolución (Fig. 14).

Las especies *Leptopyrum fumarioides* y *Paraquilegia grandiflora* forman un grupo monofilético con un valor de 93%. *Aquilegia skinneri* y *A. fragrans* son unidas con un valor de 100%, mientras que *Enemion biternatum* y *E. occidentale* forman un grupo monofilético con un valor de 93%.

En cuanto a los sistemas sexuales las especies andromonoicas de México forman un clado junto con tres especies hermafroditas (*T. arsenii*, *T. henricksoni* y *T. steyemarkii*, *T. tripeltiferum* y *T. decipiens*) (Fig.13). La condición hermafrodita se presenta en muchos clados y linajes diferentes (polifilético), observándose esta condición en las especies de Eurasia, las dos especies mexicanas *T. arsenii* y *T. henricksoni* y las especies de América del Norte *T. clavatum*, *T. thalictroides* y *T. faurei* (Fig. 13).

Las especies dioicas se presentan en tres linajes diferentes: un clado formado por *T. dasycarpum*, *T. cooleyi*, *T. pubescens* y *T. revolutum*; un segundo clado formado por *T. polycarpum*, *T. fendleri*, *T. sparsiflorum*, *T. heliophilum*, *T. dioicum*, *T. occidentale*, *T. venulosum* y *T. sparsiflorum* 1; y un tercer linaje donde se ubica aislado *T. sparsiflorum* 2.

El sistema sexual hermafrodita es el estado pleisomórfico en el género, debido a que los primeros dos linajes de *Thalictrum* que divergen en la filogenia 1) *T. ichangensis* – *T. clavatum* y 2) *T. macrocarpum* al igual que el grupo externo presentan esta condición.

El modelo escogido para el análisis de máxima verosimilitud dependió del acomodo de las bases nitrogenadas, y permitió dos tasas diferentes de transiciones siendo elegido el modelo k8luf que da a conocer el modelo de substitución de éstas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Parámetros de los datos de máxima verosimilitud.

Número de Taxones.	Modelo	Score-InL	Frecuencia	Substitución	Sitios invariables (I)
16	K8luf	926.94	A = .2171 C = .31101 G = .2980 T = .1748	A - C = 1.000 A - G = 3.9467 A - T = .0000 C - G = .0000 C - T = 3.9467 G - T = 1.0000	0.9621

El análisis de máxima verosimilitud, solo para las especies del centro de México, da a conocer cuatro grupos. El primer grupo está formado por tres ejemplares de *T. hernandezii*. El segundo grupo está formado por *Thalictrum pubigerum* 13, *Thalictrum strigillosum* 10, 12, 20 y 21. El tercer grupo por las especies *T. pubigerum* 3 y 6 con *T. gibbosum*. El cuarto grupo está formado por los ejemplares *T. pubigerum* DTM 2, 4, y 5, *T. strigillosum* DTM 1 y *T. pachucense* DTM 7 (Fig. 15).

6.3 Delimitación de especies del centro de México.

El análisis llevado a cabo con la agregación de poblaciones (Davis y Nixon, 1992) se observa en el Cuadro 6. Se utilizaron cinco caracteres morfológicos. Estos caracteres son diagnósticos permitiendo distinguir a las poblaciones de las especies de *Thalictrum* del centro de México.

Cuadro 6. Caracteres diagnósticos en los taxones de *Thalictrum* del centro de México.

Taxón	Pubescencia	Pelos	Tallos con pelos cortos y largos	Aquenio giboso	Aquenio estipitado
DTM 2	suave	translucido	ausente	ausente	ausente
DTM 3	suave	translucido	ausente	ausente	ausente
DTM 4	suave	translucido	ausente	ausente	ausente
DTM 5	suave	translucido	ausente	ausente	ausente
DTM 6	suave	translucido	ausente	ausente	ausente
DTM 13	suave	translucido	ausente	ausente	ausente
<i>T. pubigerum</i>					
DTM 1	densa	opaco	presente	ausente	ausente
DTM 10	densa	opaco	presente	ausente	ausente
DTM 12	densa	opaco	presente	ausente	ausente
DTM 20	densa	opaco	presente	ausente	ausente
DTM 21	densa	opaco	presente	ausente	ausente
<i>T. strigillosum</i>					
DTM 15	glabra	ausente	ausente	presente	ausente
DTM 16	glabra	ausente	ausente	presente	ausente
DTM 17	glabra	ausente	ausente	presente	ausente
<i>T. hernandezii</i>					
DTM 7	glabra	ausente	ausente	presente	ausente
<i>T. pachucense</i>					
DTM 22	glabra	ausente	ausente	presente	presente
<i>T. gibbosum</i>					

Un carácter morfológico distingue a las especies *Thalictrum gibbosum* y *T. hernandezii*, mientras que *T. pubigerum* y *T. strigillosum* difieren en tres caracteres. La comparación de las secuencias de la región del ITS (Cuadro 7) muestra que se puede distinguir los ejemplares de *T. hernandezii* del ejemplar de *T. gibbosum*. Tienen una diferencia constante en la posición 439.

Los ejemplares de las poblaciones *T. strigillosum* DTM 1 y de *T. pubigerum* DTM 13 y los ejemplares de *T. pubigerum* DTM 3 y DTM 6 con *T. strigillosum* DTM 10 fueron idénticos. Además los ejemplares de *T. pubigerum* DTM 4 y DTM 5 también son iguales con respecto a *T. pachucense* DTM 7.

Cuadro 7. Análisis de secuencias del ITS en los taxones de *Thalictrum* del centro de México.

Posición de la alineación.

Taxón	30	102	202	228	439	578	600
DTM 2	A	T	G	G	C	T	C
DTM 3	A	G	A	G	C	T	C
DTM 4	A	G	G	G	C	T	G
DTM 5	A	G	G	G	C	T	G
DTM 6	A	G	A	G	C	T	C
DTM 13	T	G	G	G	C	T	G
<i>T. pubigerum</i>							
DTM 1	T	G	G	G	C	T	G
DTM 10	A	G	A	G	C	T	C
DTM 12	A	G	G	G	C	T	G
DTM 20	A	G	A	G	C	T	G
DTM 21	A	G	A	G	C	T	G
<i>T. strigillosum</i>							
DTM 15	A	T	G	G	T	T	G
DTM 16	A	T	A	A	T	C	G
DTM 17	A	T	A	A	T	C	G
<i>T. hernandezii</i>							
DTM 7	A	G	G	C	T	T	G
<i>T. pachucense</i>							
DTM 22	A	G	A	G	C	T	C
<i>T. gibbosum</i>							

7. DISCUSIÓN.

7.1 Análisis filogenético.

Los estudios de las especies de *Thalictrum* del centro de México son escasos y sólo hay antecedentes de tres autores (Rose, 1899; Boivin, 1944; Rzedowski y Rzedowski, 2001). Se observó heterogeneidad en las secuencias de las especies del género *Thalictrum* del centro de México. Esta diferencia en las secuencias da a conocer que aún la evolución concertada del marcador del ITS no ha actuado suficientemente rápido para homogenizar copias. Puede ser el caso de que una reciente hibridación está ocurriendo (Kim y Janson, 1994).

Estudios realizados por Kuzmanov y Dutschewska (1982) dan a conocer que el género está dividido en dos grupos de poliploides, en el primer grupo la hibridación y la poliploidia han promovido el éxito reproductivo y adecuación a diferentes nichos, mientras que en el segundo grupo los cambios evolutivos todavía continúan. A este segundo grupo es quizá al que pertenecen las especies del centro de México. Otra posibilidad que explica la heterogeneidad de las copias del ITS es la retención de copias del ITS ancestrales que divergieron antes de los eventos de especiación.

Las especies *T. sparsiflorum* 1 y *T. diffusiflorum* pertenecientes al subgénero *Thalictrum* se colocan con *T. decipiens* y *T. reniforme*, dos especies del subgénero *Lecoyerium*. Lo mismo sucede con las especies de Norteamérica *T. dasycarpum*, *T. cooleyi*, *T. coriaceum*, *T. pubescens* y *T. revolutum* (subgénero *Lecoyerium*) que forman un grupo monofilético con las especies de Eurasia (subgénero *Thalictrum*) *T. uchiyamai*, *T. delavayi*, *T. flavum*, *T. ramosum*, *T. minus* y *T. aquilegifolium*.

Finalmente la especie *T. sparsiflorum* 2 del (subgénero *Thalictrum*) está ubicada en un clado formado por *T. occidentale*, *T. venulosum*, *T. fendleri*, *T. heliophilum* y *T. pinnatum*, otras especies del subgénero *Lecoyerium*.

La clasificación realizada por Boivin (1944) basada en la distribución, morfología de los pistilos, número de sépalos y el sistema sexual no concuerda con el árbol de consenso estricto (Fig. 14) de la región del ITS. Los estudios realizados por Ro y McPherson (1997) con la región del ITS con ocho especies de Norteamérica y dos de Eurasia tampoco concordaron con la clasificación en subgéneros realizada por Boivin (1944).

Debido a la falta de resolución de las especies del centro de México en el filograma y el árbol de consenso estricto, se realizó un árbol de máxima verosimilitud (Fig. 15) dando como resultado cuatro grupos. El primero sí concuerda con las características que presentan las especies *T. hernandezii* al ser glabras. Un segundo grupo formado por las especies *Thalictrum strigillosum* DTM 10, 12, 20, 21 y *Thalictrum pubigerum* DTM 13, se colocan juntas por presentar pubescencia densa en el envés de los foliolos y pelos cortos y largos en el tallo, solo en las cuatro primeras. El tercer grupo está formado por dos especies pubescentes y una glabra, *T. gibbosum*. El cuarto grupo por las especies *T. pubigerum* DTM 2, 4 y 5, *T. strigillosum* DTM 1 y *T. pachucense* DTM 7. Las especies *T. pubigerum* DTM 2, 4 y 5 y la *T. strigillosum* DTM 1 se colocan juntas por presentar la característica de ser pubescentes aunque en las tres primeras la pubescencia es suave y en la última es densa. Lo interesante es que *T. pachucense* se coloque aquí cuando es glabra; quizá la identificación no fue correcta debido a que cuando la planta fue recolectada tenía foliolos muy pequeños (una característica de identificación en esta especie) y muy jóvenes.

Además en el lugar de recolecta (Zimapán) no hay registros de esta especie (Herbario MEXU). Zimapán sería una región interesante de estudio donde quizá se distribuyen especies que no han sido registradas para esta localidad.

7.2 Delimitación de especies del centro de México.

Se observan pocos caracteres distintivos en las especies *T. hernandezii* y *T. gibbosum* debido a que comparten las características de ser glabras, medir más de un metro de altura y tener aquenios asimétricos y gibosos. Por presentar caracteres morfológicos similares las dos especies anteriores es difícil conocer si son la misma o diferente especie. El análisis llevado a cabo para la delimitación de las especies del centro de México por medio del análisis de poblaciones (Cuadro 6) da a conocer que *T. hernandezii* se puede distinguir de *T. gibbosum*. Individuos de *T. gibbosum* presentan un aquenio estipitado de cuatro a ocho milímetros siendo diferente de *T. hernandezii* que carece de este tipo de aquenio y llega a medir de tres a cinco milímetros. Boivin (1944) reconoció a *T. gibbosum* como una especie diferente de *T. hernandezii* por una condición dioica, hojas ternadas y altura de menos de tres metros.

La distribución de *T. hernandezii* y *T. gibbosum* también apoya el resultado de ser especies diferentes. Aunque ambas se distribuyen en el Estado de México los ejemplares DTM 15, 16 y 17 se encuentran cerca de Toluca y DTM 22 en Amecameca. Pero es cierto que aún falta más información ya que sólo se analizó una población de *T. gibbosum*. Los resultados sugieren que la especie *T. strigillosum* es distinguible de *T. pubigerum* aunque ambas son pubescentes.

La pubescencia difiere en el envés de sus foliolos, además de que solo *T. strigillosum* presenta pelos largos y cortos en el tallo, característica que *T. pubigerum* no presenta. La distribución de *T. pubigerum* y *T. strigillosum* corrobora que son especies diferentes, las dos especies se distribuyen en el Estado de Hidalgo pero las localidades donde fueron recolectadas difieren, el ejemplar de *T. pubigerum* DTM 2 se recolectó en la localidad del Chico, DTM 3 en la Estanzuela y DTM 4, 5 y 6 en Zimapán.

El ejemplar de *T. strigillosum* DTM 1 se recolectó en la localidad de Peñas Cargadas, DTM 10 en Molango, DTM 12 en Real del Monte y DTM 20 y 21 en Querétaro. *Thalictrum pachucense* comparte con *T. gibbosum* la condición glabra y el aquenio asimétrico pero se necesitarían más estudios debido a que fueron pocos los caracteres analizados de este ejemplar.

La delimitación realizada para las especies *T. hernandezii*, *T. gibbosum*, *T. pubigerum* y *T. strigillosum* con el método de análisis de agregación de poblaciones se debe considerar una hipótesis debido a que los caracteres utilizados para delimitar a las especies y las poblaciones analizadas han sido muy pocas.

Thalictrum gibbosum y *T. hernandezii* se consideran diferentes, corroborándose este resultado con la región del ITS que muestra que las poblaciones de estas especies son distintas por presentar diferencias en las posiciones 102 y 439. Los ejemplares de *T. hernandezii* DTM 16 y 17 comparten apomorfías en todas las posiciones. Por ello se colocan como un grupo monofilético. A pesar de las diferencias morfológicas, los ejemplares de *T. strigillosum* DTM 1 y de *T. pubigerum* DTM 13 presentan secuencias idénticas, lo cual sugiere que son especies hermanas.

Los ejemplares de *T. pubigerum* DTM 3 y 6 comparten secuencias con *T. strigillosum* DTM 10 y *T. pubigerum* DTM 4 y 5 con *T. pachucense* DTM 7. Aunque la especie de *T. strigillosum* DTM 12 y la especie de *T. pubigerum* DTM 13 fueron recolectadas en la misma localidad se considerarían diferentes debido a que no comparten caracteres morfológicos y secuencias de las regiones del ITS. La especie *Thalictrum pachucense* DTM 7 podría corresponder a la especie *T. pubigerum* debido a que comparte secuencias en todas las posiciones de *T. pubigerum* DTM 4 y 5 y porque en el árbol de máxima verosimilitud (Fig. 15) se coloca con estos ejemplares. *T. pachucense* no puede decirse que sea una misma o diferente especie que *T. gibbosum*, se necesitan más estudios y un mayor número de recolectas debido a que sólo se cuenta con una población de ambas especies.

Con los resultados obtenidos en el método de análisis de agregación de poblaciones se elaboró una clave modificada de Rzedowski y Rzedowski (2001).

7.3. Clave para la identificación de las especies del género *Thalictrum* del centro de México.

1 Planta glabra con altura de uno a tres metros de alto; hojas de uno a seis centímetros de largo por uno a tres centímetros de ancho.

2 Con aquenio de tres a cinco milímetros y aquenio no estipitado distribuyéndose en Guerrero Jalisco, Distrito Federal y el Estado de México.....*T. hernandezii*

2 Con aquenio de cuatro a ocho milímetros y aquenio estipitado distribuyéndose en Amecameca.....*T. gibbosum*

1 Planta con diferente tipo de pubescencia.

3 Planta con pubescencia suave en el envés de los foliolos con pelos translucidos y aquenio de cuatro a cinco milímetros de largo distribuyéndose en Jalisco, Veracruz, Oaxaca Tlaxcala, Puebla e Hidalgo.....*T. pubigerum*

3 Planta con pubescencia densa con pelos opacos en el envés de los foliolos y pelos largos y cortos en el tallo con aquenio de tres a cuatro milímetros distribuyéndose en Oaxaca, Hidalgo, San Luís Potosí, Querétaro y el Estado de México.....*T. strigillosum*

7.4 Identificación de las especies.

La falta de resolución en las especies de *Thalictrum* del centro de México se podría solucionar utilizando marcadores del DNA del cloroplasto como *trn T-L-F* y *matk*. Varios estudios han resultado exitosos utilizando este tipo de marcadores para examinar variación y procesos evolutivos dentro de angiospermas (Soltis y Soltis, 1998).

Otra técnica que ayudaría a estudiar las relaciones entre las especies de *Thalictrum* del centro de México son los marcadores genéticos llamados ISSR (secuencias simples repetidas intermedias). Dichas secuencias funcionan como alelos, por medio de la presencia o ausencia de bandas. Llegan a ser más variables que el ITS debido a que son muy abundantes presentándose hasta 7Kpb de secuencias (Condit y Hubbell, 1991). Los ISSR ayudan a conocer la hibridación experimentada en algún género (Wolfe y Elisens, 1993) así como el flujo génico entre poblaciones (Wolfe *et al.*, no publicado) y mapeo genético (Tsumura *et al.*, 1996) pero se debe tener precaución al utilizarlos debido a sus altas tasas de mutación.

8. CONCLUSIONES.

1) La monofilia del género *Thalictrum* se soporta con un valor de remuestreo del 72%.

2) La clasificación de subgéneros realizada por Boivin (1944) no concuerda con el árbol de consenso estricto de la región del ITS, por lo tanto esta clasificación debe ser revisada.

3) La condición hermafrodita solo la presentan las especies de Eurasia, las dos especies mexicanas *T. arsenii* y *T. henricksoni* y las especies *T. clavatum*, *T. thalictroides* y *T. faurei* formando un grupo polifilético. La condición dioica aparece en dos clados diferentes y un tercer linaje aislado correspondiente a los taxones de Norteamérica por lo tanto se comprueba que las especies mexicanas pertenecen al clado de las andromonoicas.

4) La evolución concertada de la región del ITS no ha actuado suficientemente rápido para homogenizar copias ya que aún se observa heterogeneidad entre las especies del Valle de México.

5) No existe resolución entre las especies mexicanas, debido a la retención de alelos ancestrales o a la hibridación.

6) En el árbol de máxima verosimilitud se pueden identificar cuatro grupos: el primero por *T. hernandezii* DTM 15, 16 y 17. El segundo por *Thalictrum strigillosum* DTM 10, 12, 20 y 21 y *Thalictrum pubigerum* DTM 13. El tercero por *T. gibbosum* DTM 22 y *T. pubigerum* DTM 3 y 6 y el cuarto por las especies *T. pubigerum* DTM 2, 4 y 5, *T. strigillosum* DTM 1 y *T. pachucense* DTM 7.

7) El análisis de poblaciones da a conocer que *T. gibbosum* es diferente de la especie *T. hernandezii* debido a la diferencia del aquenio y a la distribución.

8) La localidad de Zimapán debe ser mejor estudiada pues allí se distribuyen especies que no han sido registradas para esa localidad.

9) *T. pubigerum* y *T. strigillosum* son especies distintas, presentan las siguientes diferencias morfológicas: *T. pubigerum* presenta pubescencia suave en el envés de los foliolos así como pelos translucidos y panículas extendidas mientras que *T. strigillosum* su pubescencia es densa con pelos opacos cortos y largos en el tallo.

10) La comparación entre las secuencias de la región del ITS distingue a *T. gibbosum* de *T. hernandezii*. No se pueden distinguir algunos ejemplares de *T. pubigerum* y *T. strigillosum*.

11) Para poder plantear hipótesis más robustas sobre las relaciones entre las especies del centro de México hay que realizar un mayor número de recolectas que incluyan partes reproductivas, más individuos para una mejor representación, colecciones cuidadosas y marcadores moleculares más sensibles que permitan distinguir entre especies.

9. REFERENCIAS.

- Adanson, M. 1763. Families des plantes. Vincent. Paris.
- Appels, R. y Dvorak, K. 1982. The wheat ribosomal DNA spacer region: its structure and variation in populations among species. *Theoretical and Applied Genetics* 63: 337-348.
- Bakker, F., Olsen, L. y Stam, J. 1995. Evolution of nuclear rDNA ITS sequences in the *Cladophora albidal sericea* clade (Clorophyta). *Journal of Molecular Evolution* 40: 640-651.
- Baldwin, B. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3-16.
- Baldwin, B., Sanderson, M., Porter, J., Wojciechowski, M., Campbell, C. y Donoghue, M. 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.
- Baum, D.A y Swaw, K.L. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. En Hoch, P.C. y Stephenson, A.G. Eds. *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematic*. Missouri Botanical Garden. 289-303 pp.
- Baverstock, P.R. y Moritz, C. 1996. Project design. En Hillis, D., Moritz, M. y Mable, C. Eds. *Molecular Systematics*. 2da. Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts. 17-27 pp.
- Bayer, R.J., Hufford L. y Soltis, D.E. 1996. Phylogenetic relationships in Sarraceniaceae based on *rbcL* and ITS sequences. *Systematic Botany* 21: 121-134.

- Bhattacharyya, B y Johri. M. 1998. Flowering Plants: Taxonomy and Phylogeny. Springer. Berlin.
- Boivin, B. 1944. American *Thalictra* and their Old World allies. *Journal of the New England Botanical Club* 46: 336-345.
- Brower, A.V.Z. 1999. Delimitation of phylogenetic species with DNA sequences: A critique of Davis and Nixon's Population Aggregation Analysis. *Systematic Biology* 48: 199-213.
- Buckler, S.E. y Holtsford, P. 1996. *Zea* systematics: ribosomal ITS evidence. *Molecular Biology and Evolution* 13: 612-622.
- Buckler, S.E., Ippolito A. y Holtsford, P. 1997. Evolution of plant ribosomal DNA: pseudogenes, recombination and phylogenetic implication. *Genetics* 145: 821-832.
- Bult, C., Sweere, A. y Zimmer E. 1995. Cryptic sequence simplicity, nucleotide composition bias, and molecular coevolution in the large subunit of ribosomal DNA in plants: implications for phylogenetic analyses. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 235-246.
- Campbell, C.S., Baldwin B.G. y Donoghue, M.J. 1993. A phylogeny of Maloideae (Rosaceae) from sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 80 (Supplement, abstract): 135.
- Cervantes, Z.Y., Cornejo, O.S., Márquez, R.L., Espinoza, R.J. y Pineda, M.E. 1990. *Provincias Geograficas*. UNAM.
- Chase, M.W. y Albert, V.A. 1998. A perspective on the contribution of plastid *rbcL* DNA sequences to angiosperm phylogenetics. En Soltis, D.E., Soltis, P.S. y Doyle, J.J. Eds. *Molecular Systematics of Plants II DNA Sequencing*. Kluwer Academic Publishers. New York. 489-504 pp.

- Condit, R. y Hubbell, S. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Ornithology* 1: 159-187.
- Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. En Otte, D y Endler, J.A. Compiladores. *Speciation and its Consequences*. Library of Congress. Massachusetts. 28-59 pp.
- Crane, P.R., Friis, M., Pedersen, K.R. y Drinnan, A.N. 1993. Early Cretaceous (early to middle Albian) platanoid inflorescences associated with *Sapindopsis* leaves from the Potomac Group of eastern North America. *Systematic Botany* 18: 328-344.
- Davis, J.I y Nixon, K.C. 1992. Populations, genetic variation and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology* 41: 421-435.
- Donoghue, M. 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist* 88: 172-181.
- Dover, G. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299: 111-117.
- Doyle, J. 1995. The irrelevance of allele tree topologies for species delimitation, and a non-topological alternative. *Systematic Botany*. 20: 574-588.
- Duncan, T. y Keener, S.C. 1991. A classification of the Ranunculaceae with special reference to the Western Hemisphere. *Phytologia* 70: 24-27.
- Ferguson, A. 1980. *Biochemical systematics and evolution*. J. Wiley & Sons, New York.
- Giannasi, D.E., Zurawski, G., Learn, G. y Clegg, M. T. 1992. Evolutionary relationships of the Caryophyllidae based on comparative *rbcL* sequences. *Systematic Botany* 17:1-15.

- Good, D.A. y Wake, D.B. 1992. Geographic variation and speciation in the torrent salamanders of the genus *Rhyacotriton* (Caudata: Rhyacotritonidae). University of California Publication Zoology 126: 1-91.
- González, D. 1997. Classification of the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* (Basidiomycotina: Tulasnelales) using ribosomal DNA sequence data. MS Thesis. Duke University. Durham, North Carolina.
- Grant, W.F. 1984. Plant biosystematics. Academic Press. London.
- Gregory, W.C. 1941. Phylogenetic and cytological studies in the Ranunculaceae. Phylogenetic Society 5: 443-521.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Hamby, K.R. y Zimmer, E.A. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. En P. Soltis, D. Soltis y Doyle, J. Eds. Molecular Systematics of Plants. Chapman y Hall. New York. Pp.50-91
- Hershkovitz, M. A. y Zimmer, E. 1996. Conservation patterns in Angiosperm rDNA ITS 2 sequences. Nucleic Acids Research 24: 2857-2867.
- Hill, C. y Crane, P. 1982. Evolutionary cladistics and the origin of angiosperms. En Joysey, K.A. y Friday, A.E. Eds. Problems of Phylogenetic Reconstruction. Academic Press. New York. 269-361 pp.
- Hillis, D.M y Dixon, M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Quarterly Review of Biology 66: 411-453.

- Highton, R. 1990. Taxonomic treatment of genetically differentiated populations. *Herpetologica*. 46: 114-121.
- Hilu, W.K., Borsch, T., Muller, K., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Savolainen, V, Chase, M.W., Powell, M.P., Lawrence, A., Evans, R., Sauquet, H., Neinhuis, C., Slota, T.A.B., Rohwer, J.G., Campbell, C.S. y Chatrou, L.W. 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *American Journal of Botany* 90: 1758-1776.
- Hoot, S.B. 1995. Phylogeny of the Ranunculaceae based on preliminary *atpB*, *rbcL* and 18S nuclear ribosomal DNA sequences data. *Plant Systematics and Evolution* 9: 241-251.
- Hoot, S.B., Magallón S. y Crane. P.R. 1999. Phylogeny of basal eudicots based on three molecular data sets: *atpB*, *rbcL* and 18S nuclear ribosomal DNA sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 1-32.
- Johanson, J. 1995. A revised chloroplast DNA phylogeny of the Ranunculaceae. *Plant Systematics and Evolution (Suplemento)* 9: 253-261.
- Jorgensen, R.A. y Clutter P.D. 1988. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 78-81.
- Keener, C.S. 1975. Studies in the Ranunculaceae of the southeastern United States I: *Anemone* L. *Castanea* 40: 36-44.
- Kim, K y Janson, R. 1994. Comparison of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*, Asteraceae): additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant Systematics and Evolution*. 190: 157-185.

- Kosuge, K. 1989. Ontogenetic studies on petal in *Aconitum*. *Botanica (Tokyo)* 20: 223-237.
- Kratochwill, A. 1988. Zur Bestäubungsstrategie von *Pulsatilla vulgaris*. *Flora* 181: 262-324.
- Kuzmanov, B. y Dutschewska, H. 1982. Evolutionary pattern and alkaloid biosynthesis in *Thalictrum*. *Journal of Natural Products* 45: 766-771.
- Kyung, E.R., Keener, S. y McPheron, B. 1997. Molecular phylogenetic study of the Ranunculaceae: Utility of the nuclear 26S ribosomal DNA for inferring intrafamilial relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 8: 117-127.
- Langlet, O. 1932. Über Chromosomenverhältnisse und Systematik der Ranunculaceae. *Svensk Botanisk Tidskrift* 26: 381-400.
- Loconte, H. y Estes, J.R. 1989. Phylogenetic systematics of Berberidaceae and Ranunculales (Magnoliidae). *Systematic Botany* 14: 565-579.
- Mabberley, D. 1997. *The Plant Book*. 2da. Edition. Cambridge University Press. Cambridge.
- Magallón, S. 2004. Dating lineages: molecular and paleontological approaches to the temporal framework of clades. *International Journal of Plant Science* 165: 57-521.
- Magallón, S. y Sanderson, M.J. 2005. Angiosperm divergence times: the effect of genes, codon positions, and time constraints. *Evolution* 59: 1653-1670.
- Mishler, B.D. y Theriot, E.C. 2000. The phylogenetic species concept (Sensu Mishler and Theriot): Monophyly, Apomorphy and Phylogenetic Species Concepts. En Wheeler, Q.D. y Meier, R. Eds. *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A debate*. Columbia University Press. New York. 44-54 pp.

- Moritz, C. y Hillis, D.M. 1996. Molecular systematics: context and controversies. En Hillis, D.M. y Mable, B.K. Eds. *Molecular Systematics*. 2da edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts. 1-12 pp.
- Mullis, K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 4: 56-65.
- Nandi, O., Chase, M.W. y Endress, P.K. 1998. A combined cladistic analysis of angiosperms using *rbcL* and non-molecular data sets. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 137-212.
- Nickrent, D.L. y Soltis, D.E. 1995. A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear 18S rDNA and *rbcL* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82:208-234.
- Nixon, K.C. y Wheeler, Q.D. 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6: 211-223.
- Nixon, K.C. y Wheeler, Q.D. 1992. Extinction and the origin of species. En Novacek, M.J., Wheeler, Q.D. Eds. *Extinction and Phylogeny*. Columbia University Press. New York. 119-143 pp.
- Olmstead, R.G. 1995. Species concepts and pleisomorphic species. *Systematic Botany* 20: 623-630.
- Park, M.M. 1992. A biosystematic study of *Thalictrum* section *Leucocoma* (Ranunculaceae). Ph.D. dissertation. Pennsylvania State University.
- Park, M.M. y Festerling, D. 1997. *Thalictrum*. En Argus, W y Barkley, T. Eds. *Flora of North America* Editorial Committee. *Flora of North America*. Oxford University Press. New York. 112-114 pp.

- Pellmyr, O. 1995. Pollination biology. En P. Hiepko. Ed. Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Ranunculaceae, 2nd ed., vol 17 a IV, 160-184. Duncker y Humblot. Berlin.
- Pérez Escandón, B.E., Villavicencio N.A. y Ramirez, A. 2003. Lista de plantas útiles del Estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca. 153p.
- Porter, A.H. 1990. Testing nominal species boundaries using genes flow statistics: the taxonomy of two hybridizing admiral butterflies (*Limenitis*: Nymphalidae). *Systematic Zoology* 39: 131-147.
- Posada, D y Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Ritland, K. y Clegg, M. T. 1987. Evolutionary analysis of plant DNA sequences. *The American Naturalist* 130: S74-S100.
- Ro, K.E. Keener, S. y McPheron, B. 1997. Molecular phylogenetic study of the Ranunculaceae: utility of the nuclear 26S ribosomal DNA in inferring intrafamilial relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 117-127.
- Ro, K.E. y McPheron, B. 1997. Molecular phylogeny of the *Aquilegia* group (Ranunculaceae) based on internal transcriber spacer and 5.8S nuclear ribosomal DNA. *Biochemical Systematics and Ecology* 25: 445-457.
- Rose, J.N. 1897. Notes on some Mexican species of *Thalictrum*. *Contributions of the U.S. Natural Herbarium* 5: 185-189.
- Rosen, D.E. 1979. Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. *American Museum of Natural History* 162: 267-376.

- Ruijgrok, H. 1968. The distribution of ranunculid and cyanogenetic compounds in the Ranunculaceae. En Swain, T. Ed. Comparative Phytochemistry. Academic London: Press. 175-186 pp.
- Rzedowski, G.C. de y Rzedowski, J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, CONABIO. Pátzcuaro, Michoacán.
- Sánchez, S. O. 1969. La flora del Valle de México. Editorial Herrero, S.A. México D.F.
- Savolainen, V., Chase, M.W., Hoot, S.B., Morton, M., Soltis, D., Clemens, B., Fay, M.F., Brujin, A., Sullivan, S. y Qui, Y. 2000. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. Systematic Biology 49: 306-362.
- Sites, J.W. y Marshall, J.C. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. Trends in Ecology and Evolution 18: 462-470.
- Smith, G.H. 1926. Vascular anatomy of ranalian flowers (Ranunculaceae). Botanical Gazette 82: 1-29.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Clegg, M.T. y Durbin, M. 1990. *rbcL* sequence divergence and phylogenetic relationship in Saxifragaceae *sensu lato*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87: 4640-4644.
- Soltis, D.E., Johnson, L.A. y Looney, C. 1996. Discordance between ITS and chloroplast topologies in the *Boykinia* group (Saxifragaceae). Systematic Botany 21: 169-185.
- Soltis, D.E. y Soltis, P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. En Soltis, D.E., Soltis, P.S. y Doyle, J.J. Eds. Molecular Systematics of Plants II DNA Sequencing. Kluwer Academic Publishers. New York. 15-26 pp.

- Stein, D., Lonant, S. y Ahearn, E. 1992. Structural rearrangements of the chloroplast genome provide an important phylogenetic link in ferns. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 89: 1856-1860.
- Stevens, P.F. 1984. Metaphors and typology in the development of botanical systematics 1690-1960, or the art of putting new wine in old bottles. *Taxon* 33: 169-211.
- Stevens, P.F. 1986. Evolutionary classifications in botany, 1960-1985. *Journal of the Arnold Arboretum* 67: 313-339.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, M. 1965. Morphology, ecology and phylogeny of the Ranunculaceae Id. IV. *Science Republic Osaka University* 15: 13-65.
- Tamura, M. 1966. Morphology, ecology and phylogeny of the Ranunculaceae Id. VI *Science Republic Osaka University*. 15: 13-35.
- Tamura, M. 1993. Ranunculaceae En Kubitzki, K. Rowher, J.G. y Bittrich, V. Eds. *The families and genera of vascular plants*, Springer, Berlin. 563-583 pp.
- Tamura, M. 1995. Ranunculaceae En Kubitzki, K. Rowher, J.G. y Bittrich, V. Eds. *The families and genera of vascular plants*, Springer, Berlin. 420-423 pp.
- Templeton, A.R. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. En Otte, D y Endler, J.A. *Compiladores. Speciation and its consequences*. Sunderland, Massachusetts. 3- 27 pp.

- Tsumura, Y., Ohba, K., Strauss, S. H. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* 92: 40-45.
- Vilgalys, R. y Sun, L. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A.* 91: 4599-4603.
- Villaseñor, J.L. 2003. Diversidad y distribución de las magnoliophyta de México. *Interciencia* 28: 160-167.
- Walters, J., Campbell, C.S., Kellogs, E., Stevens, P. y Donoghue, M. 2002. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. 2da Edicion. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts.
- White, T.J., Bruns, S.L. y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis, M., Celfand, D., Snisky J. y White, T. Eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, California. 331-338 pp.
- Wiens, J.J y Penkrot, T.A. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology* 51: 69-91.
- Wolfe, A.D. y Elisens, W.S. 1993. Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae) revisited. *American Journal of Botany* 81: 1627-1635.

10. GLOSARIO.

Nota: Estas definiciones fueron tomadas con base en:

Rzedowski, G.C. de y Rzedowski, J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México.

Instituto de Ecología, CONABIO. Pátzcuaro Michoacán.

Schuh, T.R. 2000. Biological Systematics. Principles and Applications. Cornell University

Press. New York.

Actinomorfa: de simetría radial; que tiene por lo menos dos planos de simetría.

Adnatas: órganos o partes de órganos fusionados.

Alineamiento: es una hipótesis sobre las homologías posicionales entre bases (caracteres) de distintos individuos.

Androceo: conjunto de los órganos masculinos de la flor; los estambres.

Andromonoicas: planta provista de flores masculinas y flores hermafroditas en el mismo individuo.

Anteras: parte más o menos abultada del estambre que contiene polen.

Apículada: provisto de apículo.

Apículo: punta corta y aguda.

Apomorfia: Carácter derivado que surge como una novedad evolutiva.

Árbol filogenético: diagrama que denota explícitamente las relaciones evolutivas entre grupos de organismos.

Aquenio: fruto seco, indehiscente que contiene una sola semilla separada de las partes del mismo.

Axilar: placentación en la que los óvulos se insertan sobre el eje central de un ovario, divididos en dos o varios lóculos.

Basifijas: adherido o fijo por su base.

Baya: fruto simple, carnosos, indehiscents, con varias a muchas semillas.

Bootstrap: técnica que utiliza el remuestreo y el remplazamiento de los caracteres, permitiendo determinar qué tan soportada está la topología de un árbol.

Cáliz: conjunto de sépalos que pueden ser libres o más o menos unidos entre sí.

Cápsula: fruto seco dehiscente.

Carpelo: cada una de las hojas modificadas que forman el gineceo.

Caulinas: concierne y pertenece al tallo.

Consenso: conjunto de datos que están contenidos exactamente en todos los árboles filogenéticos que han resultado de un análisis filogenético.

Consenso estricto: árbol que combina todos los componentes que aparecen repetidos en todos los árboles originales.

Corola: conjunto de pétalos separados o bien fusionados en una sola pieza.

Crenados: con borde provisto de dientes cortos y romos.

porción más angosta hacia el punto de inserción.

Dehiscente: Apertura natural de un órgano al llega a la madurez.

Dioicas: planta en la que las flores masculinas y femeninas se encuentran en distintos individuos.

Enteros: borde desprovisto de picos, ondulaciones etc.

Envés: cara inferior de la hoja.

Estambres: elemento masculino de la flor, portador de polen, formado por filamentos y anteras.

Estaminal: relativo a los estambres.

Estigma: porción apical del pistilo que recibe el polen.

Estilo: parte cilíndrica del pistilo que sostiene a los estigmas.

Estipitado: provisto de estípites o estructura alargada de soporte.

Exsertos: estilos o estambres que sobresalen de la corola.

Filograma: diagrama que representa el tiempo evolutivo con diferentes longitudes de ramas.

Foliolos: cada uno de los segmentos individuales de una hoja compuesta.

Gaps: representan eventos de inserción o delección de bases.

Gineceo: conjunto de los órganos femeninos de la flor; ovarios, estilo y pistilo.

Glabro: desprovisto de pelo o vello.

Glaucos: de color verde claro con matiz azul-grisáceo.

Grupo externo: grupo de organismos no pertenecientes al grupo que se está analizando pero proporcionan información acerca de los estados pleisomórficos.

Grupo monofilético: grupo definido por sinapomorfias y que contiene un ancestro en común y todos sus descendientes.

Grupo parafilético: un grupo que contiene un ancestro en común y algunos pero no todos sus descendientes.

Grupo polifilético: un grupo que tiene diferente ancestro y todos sus descendientes.

Haz: cara superior de la hoja.

Hermafroditas: ambos sexos en la misma flor.

Heurística: busca el árbol más parsimonioso por aproximación, por el método de acierto y error.

Homoplasia: que tienen origen y ancestro diferentes.

Imbricado: hojas u órganos fóliales muy próximos entre sí, que se cubren por los bordes.

Indehiscente: que no se abre en la madurez.

Índice de consistencia: cuantifica la homoplasia relativa de un carácter; se calcula dividiendo el número de pasos esperados de acuerdo al número de estados de un carácter en la matriz de datos entre el número real de pasos.

Índice de retención: cuantifica la cantidad de sinapomorfía esperada en función de la sinapomorfía posible.

Inflorescencia: sistema de ejes ramificados en que se disponen las flores.

Lámina triternada: tres veces ternado, referente a hojas compuestas de veintisiete folíolos, estos distribuidos en tres grupos de nueve, cada grupo a su vez subdividido en tres conjuntos de tres.

Lóculo: cavidad o compartimiento de una antera, de un ovario o de un fruto.

Longitud del árbol filogenético: es el número total de cambios o estados de carácter.

Márgenes: orillas o bordes de las hojas.

Monoperiantadas: flores que presentan solo sépalos.

Opuestas: hojas que se originan en el mismo nodo, pero de lados opuestos del tallo.

Panícula: cualquier inflorescencia muy ramificada.

Parietal: placentación en la que los óvulos se encuentran unidos a las paredes del ovario.

Parsimonia: principio metodológico que postula la elección del cladograma que explique la filogenia de un grupo con el menor número de cambios posibles.

Pecíolo: porción basal muy estrecha de la hoja, que une la lámina con el tallo.

Pedicelo: en la inflorescencia, el último segmento del sistema de ejes ramificados; el que sostiene directamente a la flor.

11. ANEXO.

11.1 Protocolo de la extracción de DNA del tejido vegetal con el DNeasy Plant mini Kit.

- 1) Se muele la planta o el tejido foliar con nitrógeno líquido usando un mortero. Se transfiere el tejido ya molido a un tubo.
- 2) Agregar 400 µL de Buffer AP1 y mezclar con el vortex.
- 3) Incubar la mezcla por 10 minutos a 65°C y mezclar de 2 a 3 veces durante la incubación por inversión de tubo.
- 4) Agregar 130 µl de Buffer AP2 a la mezcla e incubar por 5 minutos en hielo. Centrifugar la lisis por 5 minutos a 12000 revoluciones por minuto.
- 5) El sobrenadante se coloca en la columna QIAshredder y se centrifuga por 2 minutos a 12500 revoluciones por minuto.
- 6) Se transferir el líquido del paso 5 a un tubo nuevo.
- 7) Se mide el volumen el cual será multiplicado por 1.5 para determinar la cantidad de Buffer APB/E que será agregada.
- 8) Se agregan 650 µl de la mezcla del paso 7 a la columna DNeasy y centrifugar por 1 minuto a 8000 revoluciones por minuto y descartar el líquido
- 9) Repetir el paso 8 con el líquido faltante.
- 10) Colocar la columna DNeasy en un nuevo tubo colector de 2 µl y agregar 500 µl de Buffer AW y se centrifuga por 1 minuto a 8000 revoluciones .Descartar el líquido y usar el tubo colector en el paso 11.
- 11) Volver a colocar 500 µl de Buffer AW a la columna DNeasy y centrifugar por 2 minutos a 12500 revoluciones.

12) Transferir la columna DNeasy a un tubo de 2 µl y colocar 100 µl de Buffer AE (previamente incubado a 65° C) se deja por 5 minutos a temperatura ambiente centrifugar por 1 minuto a 8000 revoluciones por minuto.

13) Repetir la elución del paso 12; el tubo anterior puede ser utilizado para una segunda elución.

11.2 Purificación de DNA mediante el Kit GeneClean III.

- 1) Centrifugar las muestras por 1 minuto a 8000 revoluciones por minuto.
- 2) Cambiar tubos de .2 µl a tubos de .5 µl
- 3) Poner 195 µl de Na I y mezclar en el vortex.
- 4) Colocar 2 µl de Glassmilk.
- 5) Mezclar cada 2 minutos por 15 minutos y posteriormente centrifugar por 1 minuto 12,500 revoluciones por minuto.
- 6) Vaciar el líquido, sin tocar el pelet.
- 7) Colocar 250 µl de New Wash y mezclar en el vortex.
- 8) Centrifugar por 1 minuto a 12,500 revoluciones por minuto.
- 9) Vaciar el líquido.
- 10) Realizar los pasos 7 y 8 (tres veces).
- 11) Poner las muestras a 20 minutos al vacío en el Speed Vac.
- 12) Colocar 31 µl de Elution Solution y mezclar.
- 13) Dejar reposar las muestras por 10 minutos y centrifugar por 1 minuto a 12,500 revoluciones por minuto.
- 14) Pasar el líquido a un tubo nuevo y etiquetado con el número de PCR y la fecha.