



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Filogenia y biogeografía del género
Echinocactus Link & Otto 1827, (Cactaceae)

Tesis

Como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctorado en Ciencias Biológicas

Presenta:

Mario Daniel Vargas Luna

Dirigido por:

Dr. Rolando Tenoch Bárcenas Luna
Presidente

Dra. Patricia Hernández Ledesma
Secretario

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Vocal

Dr. Humberto Suzán Azpiri
Suplente

Dr. Héctor M. Hernández Macías
Suplente

Dra. Juana Elizabeth Elton Puente
Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca
Piña Directora de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2018



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Filogenia y biogeografía de género *Echinocactus* Link
& Otto 1827, (Cactaceae)

por

Mario Daniel Vargas Luna

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: CNDCC-245441

RESUMEN

Echinocactus es un género de seis especies de cactáceas distribuidas en los desiertos de Norteamérica. Estudios filogenéticos muestran que *Echinocactus* no es monofilético, no obstante, estos se limitaron a análisis con un sólo marcador molecular o carecen del muestreo de todas las especies del género. Incertidumbres taxonómicas como reconocer al subgénero *Homalocephala* o la inclusión de *E. grusonii* y *E. polycephalus* permanecen sin resolución. En este estudio se reconstruyeron las relaciones evolutivas de *Echinocactus* a través de secuencias parciales de ADN de dos marcadores moleculares del núcleo (*DODA* y *5GT*), cuatro espaciadores intergénicos del cloroplasto (*atpB-rbcL*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF* y *trnK/matK*) y 87 caracteres morfológicos. Las reconstrucciones filogenéticas con cada marcador molecular por separado fueron hechas bajo los métodos de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BA), mientras que la matriz morfológica fue analizada sólo bajo MP y BA. La topología del análisis BA con la matriz de evidencia total, la cual incluyó los 87 caracteres morfológicos, 2879 caracteres moleculares y 13 indels, fue utilizada para realizar un análisis de optimización de caracteres morfológicos y reconstruir los estados ancestrales. Los tiempos de divergencia fueron estimados bajo una aproximación bayesiana a partir de la matriz molecular, la cual incluyó los seis marcadores. Con el fin de identificar patrones biogeográficos históricos en *Echinocactus*, se desarrolló un análisis de reconstrucción de áreas de distribución ancestrales y predicciones de nicho ecológico a la última era interglaciar máxima. Los resultados demuestran que *Echinocactus* es polifilético ya que *E. grusonii* fue recuperada como especie hermana de *Ferocactus* y el resto de las especies fueron recuperadas en dos clados independientes. Se propone el reconocimiento de *Homalocephala* (*E. parryi*, *E. polycephalus* y *E. texensis*), como un género independiente a *Echinocactus* (*E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius*). Los resultados sugieren que *Homalocephala*

y *Echinocactus* divergieron hace aproximadamente 7.6 Ma, a partir de un ancestro que también comparten con *Astrophytum*, el cual se distribuía en la región este del Desierto Chihuahuense. Eventos de dispersión y vicarianza asociados a cambios climáticos durante la época Plioceno-Pleistoceno en los desiertos de Norteamérica promovieron la especiación en estos clados.

Palabras clave: Cactaceae, Cactoideae, Cambios Climáticos del Plioceno-Pleistoceno, Desiertos de Norteamérica, Morfología.

SUMMARY

Echinocactus comprises six species of cacti, distributed in all North American Deserts. Phylogenetic studies demonstrated that *Echinocactus* is not monophyletic, nevertheless, most of these studies used only one DNA marker or lack a complete sampling. Taxonomic uncertainties such as the recognition of *Homalocephala* as a subgenus or the inclusion of *E. grusonii* and *E. polycephalus*, remain unresolved. This study reconstructs the phylogenetic relationships of *Echinocactus* with partial DNA sequences of two nuclear genes (*DODA* y *5GT*), four intergenic spacers of chloroplast (*atpB-rbcL*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, and *trnK-matK*), and 87 morphological characters. The phylogenetic reconstructions with each of the markers separately were made under maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BA) analyses. The morphological matrix was analyzed only by MP and BA methods. The topology obtained in the BA analysis with the total evidence matrix, which included the 87 morphological characters, 2879 molecular characters, and 13 indels was used to perform an optimization of morphological characters and to reconstruct ancestral states. Divergence times were estimated using the molecular matrix which included the six molecular markers. In order to identify historic biogeographic patterns, we reconstruct the ancestral distribution areas and performed ecological niche modeling to the last interglacial maximum age. Our results recovered a polyphyletic *Echinocactus*, since *E. grusonii* was recovered as the sister species of *Ferocactus*, supporting the already proposal of excluding this taxon from the genus. The rest of the species of *Echinocactus* were recovered in two independent clades. We propose the recognition of *Homalocephala* (*E. parryi*, *E. polycephalus* y *E. texensis*), as an independent genus from *Echinocactus* (*E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius*). Divergence times and the reconstruction of ancestral areas suggest that *Homalocephala* and *Echinocactus* diverged from ancestor which they also shared with *Astrophytum* about 7.6 Ma that had a distribution in the eastern subregion of the Chihuahuan Desert. Later, dispersal and

vicariant events associated with climate changes during the Pliocene-Pleistocene epochs and biogeographic barriers of the North American Deserts promoted speciation of these clades.

Keywords: Cactaceae, Cactoideae, Pliocene-Pleistocene climate changes, North American Deserts, Morphology.

A mis padres Luis⁺ y Carmen y a mis hermanos Gerardo, Angélica y Adriana por el apoyo que me han brindado durante toda mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme la beca de posgrado con la cual pude sostenerme económicamente durante los cuatro años del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas (DCB) de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ). También agradezco al CONACyT por otorgarme una beca mixta para realizar una estancia de investigación en el Desert Botanical Garden (DBG) en Phoenix, Arizona, Estados Unidos.

A la UAQ por haberme facilitado sus instalaciones de docencia y el equipo de laboratorio necesario para realizar mis experimentos. Por otorgarme una beca para cubrir los costos de inscripción durante ocho semestres y por financiarme una estancia de investigación en el DBG a través de los fondos del Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI).

A mi director de tesis el Dr. Rolando Tenoch Bárcenas Luna que gracias a su gran experiencia y conocimiento en docencia y en investigación me ayudó a resolver cuestiones técnicas y a aclararme varios aspectos teóricos. A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Patricia Hernández Ledesma, Dr. Héctor Hernández, Dr. Fausto Arellano Carbajal y Dr. Humberto Suzán Azpiri por guiarme a través de mis exámenes tutoriales y reuniones individuales a mejorar cada vez mi trabajo de investigación. Un agradecimiento especial para el Dr. Héctor Hernández por haberme facilitado su base de datos de distribución de las especies de *Echinocactus* y por su asesoría durante dos estancias de investigación en el Herbario Nacional de México (MEXU) del Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México (IBUNAM). Agradezco a la Dra. Patricia Hernández Ledesma su apoyo económico y trabajo de campo realizado en Tula y Jaumave, Tamaulipas.

Agradezco a la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) por otorgarme un permiso federal de colecta. A los curadores y

personal de los herbarios ASU, DES, MEXU, QMEX y UACJ por apoyarme en la toma de datos de especímenes de *Echinocactus* y otras Cacteeae.

A Lucas C. Majure y Raúl Puente del DBG por apoyarme con salidas al campo y la generación de algunas secuencias de ADN. A mis compañeros del laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva (LGMEE) por su amistad y apoyo técnico tanto en el laboratorio como en el trabajo de campo. Agradezco en particular a mis compañeros Biól. Valeria Martínez, M. en C. Javier Álvarez, M. en C. Samuel Rico y Dra. Mónica Figueroa quienes me apoyaron fuertemente con trabajo de campo y de laboratorio, así como con datos valiosos de sus respectivas tesis. A la Dra. Figueroa y a Alfonso Barbosa por apoyarme con el análisis estadístico para codificar los estados de carácter para el número de espinas por areola y las ilustraciones del artículo científico, producto de este estudio, respectivamente.

A mis amigos Francisco Félix, Guillermo Estrada[†], Víctor Jurado, Hugo Chávez y Vianey Márquez por ayudarme económicamente y con trabajo de campo durante el muestreo en Chihuahua y Sonora. Un agradecimiento especial al Biól. Francisco Félix por asesorarme durante casi 10 años en mis tesis de licenciatura, maestría y doctorado. A la familia Hernández-Ledesma y a la señora Elpidia “pila” por su apoyo durante mis estancias en el IBUNAM y en el DBG, respectivamente. A Victor Moyers por darme hospedaje durante las primeras semanas de mi estancia en Querétaro.

CUADRO DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	9
3. OBJETIVO	9
4. MÉTODOS	10
4.1 <i>Distribución geográfica y muestreo</i>	10
4.2 <i>Extracción, amplificación y secuenciación del ADN</i>	12
4.3 <i>Caracteres morfológicos e indels</i>	13
4.4 <i>Alineamientos e inferencias filogenéticas</i>	15
4.5 <i>Optimización de caracteres morfológicos y estados ancestrales</i>	21
4.6 <i>Tiempos de divergencia</i>	22
4.7 <i>Análisis biogeográficos</i>	22
5. RESULTADOS	25
5.1 <i>Caracterización de las secuencias y matrices moleculares</i>	25
5.2 <i>Relaciones filogenéticas inferidas con marcadores de cloroplasto (cpDNA)</i>	28
5.3 <i>Relaciones filogenéticas inferidas con marcadores del núcleo (nDNA)</i>	31
5.4 <i>Relaciones filogenéticas inferidas con caracteres morfológicos</i>	33
5.5 <i>Relaciones filogenéticas inferidas con evidencia total</i>	35
5.6 <i>Distribución geográfica y áreas de ocupación</i>	37
5.7 <i>Tiempos de divergencia, reconstrucción de áreas de distribución ancestral y predicción de nicho ecológico</i>	41
6. DISCUSIÓN	46
6.1 <i>Utilidad filogenética de los genes nucleares DODA y 5GT</i>	46
6.2 <i>Echinocactus polifilético</i>	48
6.3 <i>Clado HEA</i>	48
6.4 <i>Clado Homalocephala</i>	50
6.5 <i>Clado Echinocactus</i>	51
6.6 <i>Implicaciones taxonómicas</i>	52

6.7 Evolución de caracteres morfológicos en Homalocephala y Echinocactus	54
6.7.1 Embriones	54
6.7.2 Plántulas	54
6.7.3 Adultos.....	56
6.7.4 Semillas.....	60
6.8 Biogeografía histórica de los clados Homalocephala y Echinocactus	62
7. CONCLUSIONES	67
8. BIBLIOGRAFÍA	68
9. APÉNDICES	76
9.1 Datos de los especímenes y claves de acceso de las secuencias.	76
9.2 Lista de caracteres morfológicos y estados de carácter.	81

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de <i>Echinocactus</i>	2
Figura 1. Especies de <i>Echinocactus</i>	4
Cuadro 2. Terminales utilizadas en los análisis concatenados..	21
Cuadro 3. Áreas de distribución geográfica.....	24
Cuadro 4. Resumen estadístico de las matrices analizadas.	26
Figura 2. Relaciones filogenéticas inferidas con cpDNA..	30
Figura 3. Relaciones filogenéticas inferidas con <i>5GT</i>	32
Figura 4. Relaciones filogenéticas inferidas con caracteres morfológicos	34
Figura 5. Relaciones filogenéticas inferidas con evidencia total.....	36
Cuadro 5. Áreas de ocupación (AOO).....	38
Figura 6. Distribución geográfica del clado <i>Homalocephala</i>	39
Figura 7. Distribución geográfica del clado <i>Echinocactus</i> y <i>E. grusoni</i>	40
Figura 8. Tiempos de divergencia.	42
Figura 9. Reconstrucción de áreas de distribución ancestral.....	43
Figura 10. Predicción de nicho ecológico de <i>E. texensis</i>	45
Figura 11. Predicción de nicho ecológico de <i>E. horizontalonius</i>	45
Figuras 12 a 51. Caracteres morfológicos (apéndice 1).....	81-142

1. INTRODUCCIÓN

Echinocactus fue descrito por Link & Otto (1827), quienes reconocieron a 14 especies dentro y por el aspecto espinoso de las plantas le asignaron este nombre, el cual deriva del griego *echinos* = erizo y *cactus* = cacto. No obstante, Link y Otto no designaron un holotipo, por lo cual, *Echinocactus* permaneció sin un tipo por 170 años (Arias et al. 1997). El número de especies incluidas en *Echinocactus* ha oscilado considerablemente dependiendo del autor, lo cual ha generado una historia taxonómica compleja (Cuadro 1). A finales del siglo XIX muchas cactáceas globosas con costillas fueron incluidas en *Echinocactus*, dando lugar a una clasificación artificial de 138 especies (Schumann, 1898). Actualmente, la mayoría de estas especies son reconocidas en otros géneros como, *Astrophytum* Lem., *Ferocactus* Britton & Rose, *Melocactus* Link & Otto, *Thelocactus* Britton & Rose, etc. Contrario al amplio concepto que Schumann tenía sobre *Echinocactus*, Britton & Rose (1922) sólo reconocieron a nueve especies. Además, estos autores basados en diferencias del fruto y en la forma de crecimiento del tallo segregaron a *E. texensis* Hopffer, la cual fue incluida en el nuevo género *Homalocephala* Britton & Rose.

Berger (1929) fue el primer autor en reconocer a *Homalocephala* como un subgénero de *Echinocactus*; sin embargo, Berger tenía una percepción muy amplia de *Echinocactus*, similar a la de Schumann (1898), ya que consideró grupos, series y varios subgéneros dentro del taxón. Interessantemente, Berger reconoció la serie Erianthi donde incluyó a los subgéneros *Echinocactus*, *Homalocephala* y *Astrophytum* Lem. A finales del siglo XX Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada (1991) reconocieron a seis especies de *Echinocactus* y mantuvieron la distinción de los subgéneros *Echinocactus* y *Homalocephala* (Cuadro 1). Estos autores además, incluyeron a *E. parryi* Engelm. en el subgénero *Echinocactus* y basados principalmente en similitudes entre las flores de *E. texensis* y *E. horizonthaloni* Lem. transfirieron a esta última al subgénero *Homalocephala*. Las especies *E. visnaga* Hook., *E. grandis* Rose, *E. palmeri* Rose y *E. ingens* Zucc. ex Pfeiff.,

reconocidas por Britton & Rose (1922) fueron consideradas sinónimos de *E. platyacanthus* Link & Otto por Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada (1991); quienes además sólo reconocieron a *E. xeranthemoides* como subespecie de *E. polycephalus* Engelm. & Bigelow (Cuadro 1).

Cuadro 1. Circunscripción y clasificación infragenérica de *Echinocactus* propuesta por diferentes autores. * indica especie de inclusión dudosa según el autor.

Link & Otto 1827	Britton & Rose 1922	Berger 1929	Bravo-Hollis & Sánchez- Mejorada 1991	Ferguson 1992	Anderson 2001; Hunt et al. 2006; Hunt 2016	Lodé 2015
	Género <i>Echinocactus</i>	Subgénero <i>Echinocactus</i>	Subgénero <i>Echinocactus</i>	Subgénero <i>Echinocactus</i>		
<i>E. platyacanthus</i>	<i>E. platyacanthus</i>		<i>E. platyacanthus</i>	<i>E. platyacanthus</i>	<i>E. platyacanthus</i>	<i>E. platyacanthus</i>
<i>E. tenuispinus</i>	<i>E. grusonii</i>	<i>E. grusonii</i>	<i>E. grusonii</i>	<i>E. grusonii</i>	<i>E. grusonii</i>	
<i>E. tephracanthus</i>	<i>E. horizontalonius</i>	<i>E. horizontalonius</i>			<i>E. horizontalonius</i>	<i>E. horizontalonius</i>
<i>E. poliácanthus</i>	<i>E. polycephalus</i>	<i>E. polycephalus</i>	<i>E. polycephalus</i>		<i>E. polycephalus</i>	<i>E. polycephalus</i> *
<i>E. salmianus</i>	<i>E. ingens</i>	<i>E. ingens</i>	<i>E. parryi</i>		<i>E. parryi</i>	<i>E. parryi</i>
<i>E. acuatus</i>	<i>E. visnaga</i>	<i>E. visnaga</i>			<i>E. texensis</i>	<i>E. texensis</i>
<i>E. sellowii</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. grandis</i>				
<i>E. tuberculatus</i>	<i>E. palmeri</i>	<i>E. palmeri</i>				
<i>E. recurvus</i>	<i>E. xeranthemoides</i>					
<i>E. gladiatus</i>	Género <i>Homalocephala</i>	Subgénero <i>Homalocephala</i>	Subgénero <i>Homalocephala</i>	Subgénero <i>Homalocephala</i>		
<i>E. orthacanthus</i>	<i>H. texensis</i>	<i>E. texensis</i>	<i>E. texensis</i>	<i>E. texensis</i>		
<i>E. subuliferus</i>			<i>E. horizontalonius</i>	<i>E. polycephalus</i>		
<i>E. inticatus</i>				<i>E. xeranthemoides</i>		
<i>E. meonacanthus</i>				<i>E. parryi</i>		

Ferguson (1992) basado en nueve caracteres morfológicos propuso incluir en el subgénero *Echinocactus*, sólo a *E. grusonii* Hildmann y a la especie tipo *E. platyacanthus* y en el subgénero *Homalocephala* a *E. texensis*, *E. polycephalus* y *E. parryi*. Este autor consideró que las características morfológicas peculiares de *E. horizonthalonius* pueden ser suficientes para reconocer un género nuevo. Los caracteres morfológicos que Ferguson utilizó para distinguir a *Homalocephala* de *Echinocactus* como diferentes subgéneros fueron: tallos de menor altura, costillas agudas, areolas discretas en tallos adultos, ovarios y frutos con paredes gruesas, escamas del fruto distribuidas en toda la epidermis de la pared del fruto, tricomas de flores y frutos cubriendo totalmente el pericarpelo y a la pared del fruto, semillas con quilla evidente, hilo profundamente impreso y células de la testa con paredes periclinales acanaladas.

Los tratados taxonómicos más recientes reconocen entre cinco y seis especies de *Echinocactus* y ninguno reconoce una clasificación infragenérica (Anderson, 2001; Hunt et al. 2006; Lodé, 2015; Hunt, 2016; [Cuadro 1]). Las especies de *Echinocactus* aceptadas por Hunt et al. (2016) se caracterizan por presentar tallos fuertemente acostillados de forma depresa, globosos a cortamente columnares, areolas grandes que pueden ser discretas o confluentes, ausencia de glándulas extra florales, espinas gruesas, flores de forma campanulada a cortamente infundibuliforme que emergen del ápice, areolas de flores y frutos con escamas pungentes y tricomas, semillas grandes ovadas a casi circulares con testa de color café claro a café oscuro o casi negra (Hunt et al. 2006). Las especies incluidas bajo esta circunscripción son: *E. platyacanthus*, *E. horizonthalonius*, *E. grusonii*, *E. texensis*, *E. polycephalus* y *E. parryi* (Fig. 1).



Figura 1. Especies de *Echinocactus* aceptadas por Hunt (2016). **A.** *E. platyacanthus* **B.** *E. horizontalonius*. **C.** *E. texensis*. **D.** *E. parryi*. **E.** *E. polycephalus* subsp. *polycephalus*. **F.** *E. grusonii*. Escala = 1 cm.

A nivel infraespecífico se han propuesto cuatro subespecies dentro de *Echinocactus*. Primero, Coulter (1896) basado en diferencias como la altura del tallo y el número de espinas con respecto a la subespecie típica describió a *E. polycephalus* subsp. *xeranthemoides* Coulter. Chamberland (1997) basado en el análisis biosistemático de un mayor número de caracteres morfológicos con respecto a Coulter (1896), también reconoce a *E. polycephalus* subsp.

xeranthemoides, mientras que, Salywon & Hodgson (2012), proponen que esta subespecie debe ser elevada a nivel de especie. Benson (1982), basado en diferencias como la forma de crecimiento, el tamaño del tallo, el número de espinas por areola, la curvatura de las espinas y algunas características de las semillas en individuos de *Echinocactus horizonthalonius* de poblaciones distribuidas en el Desierto Sonorense, describió a *Echinocactus horizonthalonius* subsp. *nicholii* Benson. No obstante, se carece de estudios que analicen evidencias morfológicas y moleculares que apoyen el reconocimiento taxonómico tanto de las subespecies de *E. horizonthalonius* como las de *E. polycephalus*, lo cual ha impedido que diversos autores acepten contundentemente estas propuestas (Anderson, 2001; Hunt et al. 2006; Lodé, 2015; Hunt, 2016).

Estudios filogenéticos en *Echinocactus* sensu Hunt (2016), sugieren que el grupo no es monofilético. La reconstrucción filogenética de Wallace (1995) hecha a partir de enzimas de restricción (RFLP), recuperó a *E. grusonii* como hermano de un clado integrado por *Astrophytum* y el resto de las especies de *Echinocactus*. Las especies de *Echinocactus* (excepto *E. grusonii*), fueron recuperadas como un grupo monofilético, con dos principales subclados. Uno de los subclados incluyó a *E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius*; el segundo subclado fue integrado por *E. texensis*, la cual resultó especie hermana a un clado donde *E. parryi* es la especie hermana a las dos subespecies de *Echinocactus polycephalus*. Estos resultados apoyan fuertemente el concepto de dos subgéneros, *Echinocactus* y *Homalocephala* propuesto por Ferguson (1992). El estudio de Wallace (1995) ha sido el único realizado con datos genéticos que ha incluido a las seis especies de *Echinocactus*. Butterworth et al. (2002) reconstruyeron las relaciones evolutivas de la tribu Cacteeae a partir del intrón *rpl16*, incluyendo cuatro especies de *Echinocactus*. Sus resultados dan soporte al estudio de Wallace (1995), debido a que *E. grusonii* también fue recuperada en un clado con especies de *Ferocactus* y el núcleo *Echinocactus* en una tricotomía con *Astrophytum*. El único clado dentro

del núcleo *Echinocactus* que Butterworth et al. (2002) también recuperaron con respecto a Wallace (1995) fue la relación de especies hermanas entre *E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius*.

Los estudios sobre las relaciones evolutivas de las Cactaceae publicados por Bárcenas et al. (2011) y por Hernández-Hernández et al. (2011), son consistentes con los resultados previos, ya que estos, recuperan a *Echinocactus* como no monofilético debido a la posición de *E. grusonii*. No obstante, ambos estudios carecieron de la inclusión de todas las especies del género, ya que sólo incluyeron a cinco y tres especies, respectivamente. Ambos estudios recuperaron con alto soporte un clado compuesto por las especies de *Astrophytum* y el núcleo de *Echinocactus* y nuevamente, la relación de especies hermanas entre *E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius*. Un resultado sorprendente en el estudio de Bárcenas et al. (2011), fue el anidamiento de *E. polycephalus* fuera del núcleo *Echinocactus* contraponiendo los resultados del estudio de Wallace (1995). Hasta este momento el estudio filogenético de la tribu Cacteeae más robusto es el de Vázquez-Sánchez et al. (2013), quienes utilizaron cinco marcadores moleculares del cpDNA (*rbcL*, *matK*, *rpl16*, *trnL-trnF* y *psbA-trnH*) e incluyeron 135 especies. En este estudio, nuevamente se recuperó a *Echinocactus* como no monofilético debido una vez más a que *E. grusonii* resultó la especie hermana a un clado que incluyó especies de *Ferocactus*, *Stenocactus*, (K. Schum.) A. Berger ex A.W. Hill, *Thelocactus* Britton & Rose y *Leuchtenbergia principis* Hook. Las especies de *Echinocactus* analizadas por los autores (excepto *E. grusonii*) fueron recuperadas nuevamente con alto soporte en un clado que incluyó a las especies de *Astrophytum*; sin embargo, no hubo soporte para el género *Echinocactus*, ni para los dos subclados recuperados dentro de este. Basados en estos resultados y en los de Bárcenas et al. (2011), quienes habían recuperado a *E. polycephalus* fuera del núcleo *Echinocactus*, los autores proponen que el género *Echinocactus* debe ser circunscrito por sólo cuatro especies, *E. platyacanthus*, *E. horizonthalonius*, *E.*

parryi y *E. texensis*. Basado en los estudios moleculares que recurrentemente demuestran que *E. grusonii* no forma parte de *Echinocactus* y que aparentemente es la especie hermana de *Ferocactus s.l.*, Lodé (2013) describió el género monotípico *Kroenleinia* Lodé, para reubicar a *E. grusonii*. Aún cuando evidencias moleculares demuestran que *Echinocactus* no es monofilético, esto no ha sido aceptado ampliamente por los cactólogos, ya que recientemente se publicó el listado CITES de la familia Cactaceae y en este, el género sigue delimitado por seis especies (Hunt, 2016).

Las especies de *Echinocactus* se distribuyen en zonas áridas y semiáridas de los desiertos de Norteamérica, incluyendo el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, los desiertos Chihuahuense y Sonorense y el sur del desierto de la Gran Cuenca (Hernández & Gómez-Hinostrosa, 2011). Existen especies de amplia distribución como *E. platyacanthus*, *E. horizonthalonius*, *E. texensis* y *E. polycephalus*, así como especies de distribución restringida como *E. grusonii* de la cual sólo se conocen poblaciones en los estados de Zacatecas, Querétaro e Hidalgo (Hernández & Gómez-Hinostrosa, 2011) y *E. parryi* endémica de la región norte del estado de Chihuahua (Vargas-Luna, 2008). Vázquez-Sánchez et al. (2013), realizaron una reconstrucción de áreas ancestrales para la tribu Cactaeae. Los resultados sugieren que el ancestro común de la tribu presentaba una distribución en la parte sureste del Desierto Chihuahuense, en lugares colindantes con la Sierra Madre Oriental. Posteriormente, diferentes linajes de Cactaeae, entre ellos *Echinocactus* se dispersaron a la parte norte del Desierto Chihuahuense y a los otros desiertos de Norteamérica.

Recientemente, fueron estimados los tiempos de divergencia de la familia Cactaceae y sus principales linajes, entre ellos, el clado *Astrophytum-Echinocactus* (Hernández-Hernández et al. 2014). Los tiempos de divergencia de dicho clado también fueron estimados por Vázquez-Lobo et al. (2015). Ambos estudios, indican que *Echinocactus* es un linaje relativamente reciente de aproximadamente 9.22 a

7.3 Ma. Se sabe que la biogeografía histórica de la biota de los desiertos de Norteamérica ha sido fuertemente impactada por cambios geomorfológicos del Neógeno y por cambios climáticos asociados a eras glaciales e interglaciales del Plioceno-Pleistoceno (Hafner & Riddle, 2011). Todo esto hace que *Echinocactus* sea un modelo idóneo para estudiar patrones biogeográficos históricos y procesos de especiación, asociados a dichos cambios climáticos.

Con el objetivo de esclarecer las incertidumbres filogenético-taxonómicas de *Echinocactus*, en este estudio se reconstruyeron las relaciones evolutivas de todas las especies y subespecies de *Echinocactus* reconocidas actualmente mediante un análisis combinado con caracteres morfológicos y moleculares. Con la finalidad de identificar tendencias evolutivas en los caracteres morfológicos, se realizaron optimizaciones de caracteres y reconstrucciones de estados ancestrales. Finalmente, con el objetivo de identificar patrones biogeográficos históricos y posibles procesos de especiación, fueron estimados los tiempos de divergencia, se reconstruyeron las áreas de distribución ancestral y se generaron modelos de nicho ecológico a la última era interglaciar.

2. HIPÓTESIS

Echinocactus es un grupo monofilético, por lo cual, los caracteres comparativos seleccionados aprobarán las pruebas de homología (conjunción, similitud y congruencia).

Estimar los tiempos de divergencia de grupos monofiléticos en *Echinocactus*, aunado a análisis geográficos, nos permitirá postular hipótesis sobre la biogeografía histórica del taxón.

3. OBJETIVO

Reconstruir las relaciones evolutivas de *Echinocactus* y generar una hipótesis sobre la biogeografía histórica del grupo.

Objetivos Específicos

Reconstruir las relaciones evolutivas de *Echinocactus* mediante el análisis filogenético de caracteres moleculares y morfológicos.

Inferir la evolución de los caracteres morfológicos en *Echinocactus* en un contexto filogenético a través de la reconstrucción ancestral de caracteres morfológicos.

Calcular los tiempos de divergencia en *Echinocactus*.

Generar una hipótesis sobre la biogeografía histórica de *Echinocactus*, para explicar la distribución actual de las especies del género.

4. MÉTODOS

4.1 Distribución geográfica y muestreo

A través del sistema de información geográfica (ArcMap 10.3), se creó un shape con 809 registros geográficos de especímenes de *Echinocactus* provenientes de diferentes herbarios. La base de datos de los registros geográficos utilizada, fue desarrollada en el Laboratorio de Cactáceas del Instituto de Biología, UNAM (Hernández & Gómez-Hinostrosa, 2011). Con el objetivo de identificar las áreas ecológicas donde se distribuyen las especies de *Echinocactus*, el shape que contenía los puntos geográficos fue proyectado sobre una capa o shape de las ecoregiones de Norteamérica nivel III descargada de internet (<https://www.epa.gov/eco-research/ecoregions-north-america>). De esta manera, se generaron los mapas de distribución para cada una de las especies de *Echinocactus*. Sobre los mapas de distribución resultantes se aplicó el método cartográfico por conglomerados (MCC) (Hernández & Navarro, 2007). Esto se realizó con el fin de encontrar disyunciones en la el área de distribución , a través de la identificación de conglomerados y satélites, así como para calcular el Área de Ocupación (AOO) de cada especie. Este método combina elementos de los análisis aerográfico y cartográfico previamente utilizados para calcular el AOO y en general con el MCC, las estimaciones resultan más pequeñas y precisas (Hernández & Navarro, 2007).

Algunas especies de *Echinocactus* presentan amplia distribución geográfica, habitando varias regiones ecológicas, por esta razón, los sitios de muestreo fueron seleccionados siguiendo las regionalizaciones de los desiertos de Norteamérica basadas en la distribución geográfica de las Cactaceae (Hernández & Bárcenas, 1994; 1996; Hernández et al. 2004; Hernández & Gómez-Hinostrosa, 2011) y en los patrones filogeográficos de roedores, reptiles, aves y plantas (Hafner & Riddle, 2011). El Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva (LGMEE) de la

Facultad de Ciencias Naturales (FCN), Campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) cuenta con un banco de ADN de varias de las especies de estudio, provenientes de colectas en diferentes áreas geográficas, por esta razón, los sitios de muestreo fueron seleccionados priorizando áreas menos representadas en dicho banco. El muestreo dirigido se realizó con el objetivo de evaluar la posible información filogeográfica contenida en los diferentes marcadores moleculares, así como para observar y documentar la variabilidad morfológica entre las poblaciones.

En cada sitio de muestreo, en lo posible, se tomaron muestras de epidermis y del clorénquima del tallo de cinco individuos por población, las cuales fueron deshidratadas en gel de sílice, para posteriormente extraer el ADN. En algunos casos, por ejemplo en una población de *E. texensis* en Jiménez, Chih., la población esta compuesta por sólo tres individuos, por lo cual, sólo colectamos tejido de los tres individuos. Además, se colectaron semillas, plántulas, espinas, flores, frutos y algunos individuos completos, los cuales fueron transplantados a macetas y llevados al Campus Aeropuerto de la UAQ para observar y documentar cambios morfológicos y fenológicos. Las colectas se realizaron bajo el permiso (SEMARNAT 00140/15) otorgado por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Se generaron 171 especímenes de herbario, de los cuales, (149) fueron depositados en el herbario de la UAQ (QMEX) y (22) en el herbario del Jardín Botánico de Phoenix (DES) (Apéndice 1). Se intentó tomar medidas morfológicas de por lo menos 20 individuos por población, sin embargo, esto no siempre fue posible ya que como se mencionó antes en algunas poblaciones fueron encontrados menos de cinco individuos. Las poblaciones en las cuales se midieron los 20 individuos fueron: cinco poblaciones de *Echinocactus parryi* (Chih.), tres poblaciones de *E. horizonthalonius* (Gto., Chih., Az); una de *E. polycephalus* subsp. *polycephalus* (Son) y otra de *E. polycephalus* var. *xeranthemoides* (Az), mientras que las poblaciones que presentaron menos individuos fueron las de *E. texensis* (Chih. y

Tamps.) con sólo tres individuos cada una. Las mediciones morfológicas incluyeron: diámetro, altura, número de costillas, número de areolas por costilla, número de espinas de la tercera areola del ápice hacia la base en posición norte y longitud de la espina más grande de dicha areola. Estas mediciones se realizaron como parte de la construcción de una matriz de caracteres morfológicos por especie y para documentar posibles variaciones poblacionales.

4.2 Extracción, amplificación y secuenciación del ADN

El ADN fue extraído principalmente a partir del clorénquima del tallo colectado en poblaciones silvestres y deshidratado en gel de sílice. Otras extracciones de ADN fueron hechas a partir de diferentes tejidos de especímenes depositados en los herbarios ASU, DES, MEXU y QMEX (Apéndice 1). Debido a que no se pudo aislar ADN de calidad en individuos adultos de *E. texensis*, la extracción de ADN en este caso fue obtenida a partir de plántulas. Aproximadamente 25 mg de clorénquima por muestra fueron macerados en un mortero para posteriormente aislar el ADN con el protocolo de extracción de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, (CTAB 2%), descrito por Doyle & Doyle (1987) y modificado por Bárcenas (2015).

A través de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), fueron amplificados tres espaciadores intergénicos del cloroplasto (IGS por sus siglas en inglés) *atpB-rbcL*, *psbA-trnH* *trnL-trnF* y dos genes nucleares *DODA* y *5GT*, los cuales codifican para enzimas que participan en la síntesis de betalaínas. Para amplificar la región *atpB-rbcL* se utilizaron el par de cebadores diseñados por Demesure et al. (1995). Los parámetros de amplificación para esta región fueron: desnaturalización inicial a 96°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 50 s, 47°C por 1 min, 72°C por 1.5 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Para amplificar el espaciador *trnL-trnF*, se utilizaron los cebadores derecho “E” y reverso “F” diseñados por Taberlet et al. (1991). Las condiciones de amplificación para esta región fueron: 96°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C

por 1.5 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Para amplificar el espaciador *psbA-trnH* se utilizaron los iniciadores diseñados por Hamilton (1997). Los parámetros de amplificación para esta región fueron: 96°C por 4 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 48°C por 1 min, 72°C por 1.5 min y extensión final a 72°C por 5 min.

La amplificación de los genes nucleares *DODA* y *5GT* se realizó con los cebadores diseñados por Felker et al. (2007). Para amplificar el gen *5GT* se utilizó el cebador derecho 5GT-F y el cebador reverso 5GT-R. Para la amplificación del gen *DODA*, se utilizó el cebador derecho L6univsense y el cebador reverso L6univAS2. Las reacciones de PCR para los genes nucleares fueron en muchas ocasiones fallidas, incluso, siguiendo protocolos que previamente habían resultado positivos. Las condiciones de PCR más exitosas para amplificar *5GT* fueron: 96°C por 5 min; 35 ciclos of 94°C por 45 s, 52°C por 1.5 min, 72°C por 1.5 min y una extensión final de 72°C por 4 min. Para *DODA* el protocolo de PCR más eficiente fue el siguiente: 96°C por 5 min; 35 ciclos of 94°C por 45 s, 54°C por 1 min, 72°C por 1.5 min y una extensión final de 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron comercialmente purificados y secuenciados en Macrogen, Seúl, Corea del Sur o en el DNA Laboratory de la Universidad Estatal de Arizona (ASU), Tempe, Arizona, Estados Unidos. Con el fin de analizar un mayor número de caracteres moleculares, fueron descargadas secuencias parciales de la región *trnK/matK* del grupo de estudio, depositadas en GenBank (Apéndice 1).

4.3 Caracteres morfológicos e indels

Un total de 87 caracteres morfológicos fueron codificados a partir de las observaciones en campo, la revisión de especímenes generados en este estudio y especímenes depositados en los herbarios MEXU, DES, ASU, QMEX. Para codificar los estados de carácter de las figuras planas y formas tridimensionales, se siguió la terminología descrita por Radford et al. (1974) y Eggl (1993). Se generó una matriz con caracteres morfológicos binarios y caracteres multiestado en

Mesquite 3.02 (Maddison & Maddison, 2015). De los 87 caracteres morfológicos, 22 fueron codificados a partir de semillas, 3 de embriones, 15 de plántulas, 49 de adultos, en este último caso se incluyeron los caracteres de flores y frutos. (Apéndice 2). Los caracteres codificados a partir de plántulas se obtuvieron de individuos silvestres o individuos cultivados a partir de semillas colectadas en campo u obtenidas en viveros comerciales. Las comparaciones y mediciones morfológicas de las plántulas fueron hechas durante la primera semana de edad (entre los meses de julio y agosto), al primer mes de edad (durante septiembre), a los cuatro meses (durante diciembre), todo esto en el 2016 y finalmente al año de edad en julio de 2017. Las plántulas fueron cultivadas bajo las mismas condiciones ambientales en el campus aeropuerto de la UAQ, sin monitorear las condiciones de luz, temperatura y humedad. Los datos climatológicos proporcionados por el Sistema Meteorológico Nacional obtenidos en la estación climatológica “Querétaro (00022063)” durante 1951 a 2010, indican que la región donde fueron cultivadas las plántulas se caracteriza por una temperatura máxima de 26.7°C, temperatura media de 19.1°C, temperatura mínima 11.5°C y precipitación de 525.7 mm, en sus promedios anuales (<http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=qro>).

Algunos datos morfológicos fueron obtenidos a partir de la revisión de literatura especializada en descripciones de las especies de estudio (Benson, 1982; Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1991; Ferguson, 1992; Chamberland, 1997; Barthlott & Hunt, 2000; Doweld, 2000; Anderson, 2001; Hunt et al. 2006). Las hipótesis de homología primaria (Hawkins et al. 1997) fueron postuladas siguiendo los criterios de conjunción y similitud de Patterson (1982) y De Pinna (1991). Las secuencias de ADN del espaciador intergénico *atpB-rbcL* presentaron 13 indels informativos. Estos indels fueron considerados como sinapomorfías putativas y codificados como caracteres binarios de ausencia/presencia bajo el método de codificación simple descrito por Simmons & Ochoterena (2000).

4.4 Alineamientos e inferencias filogenéticas

Con base en evidencias filogenéticas (Wallace, 1995; Butterworth et al. 2002; Bárcenas et al., 2011; Hernández-Hernández et al., 2011; Vázquez-Sánchez et al., 2013; Vázquez-Lobo et al., 2015) fue diseñado un esquema de muestreo genético que incluyó 28 taxa, el cual incluyó a todas las especies y variedades de *Echinocactus*, las especies de *Astrophytum*, ocho especies de *Ferocactus*, entre ellas *F. glaucescens* (DC.) Britton & Rose y *F. hystrix* (DC.) G.E. Linds, la cual ha sido recuperada cercana a *E. grusonii* (Butterworth et al. 2002). Otras especies de Cactaceae incluidas en el estudio fueron las especies del clado *Aztekium-Geohintonia*, clado que ha sido recuperado cercano a *Echinocactus* (Bárcenas et al. 2011). Finalmente, con fines de polarización se incluyó a *Carnegiea gigantea* (Engelm.) Britton & Rose (Phyllocactaceae) y *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Opuntioideae), esta última fue utilizada como grupo externo funcional. Debido a la poca información genética disponible en las bases de datos públicas para los marcadores del ADN del núcleo, para su análisis fueron utilizados otros grupos externos como *Amaranthus tricolor* L. (Amaranthaceae), *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), *Pereskia aculeata* Mill. y *Lophophora williamsii* (Lem. ex Salm-Dyck) J.M. Coult. Todas las terminales representan especies bien definidas, excepto la terminal *E. platyacanthus* x *horizonthalonius*, la cual representa un posible híbrido.

Las secuencias consenso fueron obtenidas a través del ensamblaje de las secuencias derecha y reversa de cada terminal en el software PhyDe versión 0.9971 (Müller et al., 2007). Los caracteres ambiguos fueron corregidos a través de la visualización de los cromatogramas de ambas secuencias. Con el fin de obtener resultados objetivos, las secuencias que en su secuenciación resultaron ilegibles fueron excluidas de los análisis filogenéticos. Las nuevas secuencias fueron analizadas bajo el método BLAST implementado en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) para corroborar su identidad y evitar el uso de secuencias contaminadas. En el caso particular del marcador *DODA*, todos los

cromatogramas presentaron una parte intermedia ilegible, e incluso a veces ni siquiera se logró secuenciar esta región del gen. Lo anterior se debe posiblemente a la presencia de un intrón localizado entre las posiciones 199 a 960, según las anotaciones en las secuencias de este gen de *Opuntia ficus-indica* depositadas en GenBank (claves de acceso EU089741 y EU089742). Por esta razón, la región correspondiente al intrón fue eliminada de nuestras secuencias y los exones putativos uno y dos de *DODA* fueron concatenados en una sola matriz. Las secuencias de *trnL-trnF* generadas en este estudio abarcan más allá del IGS e incluye algunos nucleótidos de los genes *trnL* y *trnF*. No obstante, debido a la falta de caracteres de estos genes en varias terminales, decidimos sólo utilizar nucleótidos correspondientes al espaciador intergénico *trnL-trnF*. En el caso de las secuencias de la región *trnK/matK*, 1022 nucleótidos corresponden al gen *matK* y 70 nucleótidos pertenecen al intrón tRNA-Lys, sin embargo, estos fueron analizados como parte del gen *matK*, sin establecer particiones. Basados en la caracterización de la región intergénica (IGR) *psbA-trnH* de Hernández-Ledesma & Bárcenas (2017), excluimos el espaciador intergénico (IGS) debido a que su alineamiento presentó mucha diversidad nucleotídica haciéndolo altamente subjetivo.

Las nuevas secuencias consenso fueron alineadas automáticamente con el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), implementado en el programa MEGA7 (Kumar et al. 2015). Posteriormente para reducir el número de gaps e incrementar la coincidencia entre las secuencias, los alineamientos fueron corregidos manualmente en el programa PhyDe. Cuatro matrices concatenadas fueron construidas en Winclada 1.00.08 (Nixon 2002): 1) la “matriz cpDNA” compuesta por los cuatro marcadores del genoma del cloroplasto *atpB-rbcL*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF* y *trnK/matK*; 2) la “matriz cpDNA + morfología”, la cual incluyó la matriz cpDNA, los 87 caracteres morfológicos y 13 indels codificados a partir de las secuencias de *atpB-rbcL*; 3) la “matriz nDNA” compuesta por las secuencias de los dos genes

nucleares, *DODA* y *5GT*; y 4) la “matriz de evidencia total” que incluyó las matrices cpDNA y nDNA, más los 87 caracteres morfológicos y los 13 indels.

Las reconstrucciones filogenéticas con cada marcador molecular por separado fueron hechas bajo los dos tipos de modelos comúnmente utilizados para medir topologías y seleccionar árboles filogenéticos óptimos: el modelo de máxima parsimonia (MP) y el modelo probabilístico, el cual incluye pruebas de máxima verosimilitud (ML) y análisis bayesianos (BA). El modelo de parsimonia tiene como hipótesis central la homología filogenética, la cual explica el patrón de similitudes como la causa común de ancestría entre organismos (De Pinna, 1991). El modelo de parsimonia valora los cambios entre estados de caracteres en unidades de “pasos” o eventos evolutivos. La dispersión en el modelo de parsimonia se mide en términos del número de pasos. Bajo este enfoque, la hipótesis más sencilla o árbol filogenético más corto “con el menor número de pasos” es el que mejor ajusta a los datos (De Luna et al. 2005). Los modelos probabilísticos (ML y BA) se basan en el concepto estadístico de verosimilitud como la probabilidad de que los datos sean correctos, si un árbol específico fuera el verdadero. La dispersión se mide en función del ajuste entre los datos observados y las predicciones calculadas por un árbol en particular y un modelo evolutivo de las secuencias. Bajo estas circunstancias, el árbol óptimo es el que posee la máxima verosimilitud o la mayor probabilidad posterior (De Luna et al. 2005). Las filogenias obtenidas bajo inferencias bayesianas calculan la probabilidad posterior de un árbol filogenético, un modelo evolutivo y los parámetros de este último. La obtención de la probabilidad posterior esta basada en la probabilidad anterior de los parámetros y en la función de verosimilitud de los datos. En la inferencia bayesiana se calcula la probabilidad de que un árbol sea correcto condicionado por los datos, a diferencia del método de ML, el cual calcula la probabilidad de que los datos sean correctos condicionados por el árbol (Holder & Lewis, 2003).

Los métodos para elegir el modelo de cambio más eficiente difieren entre los enfoques de MP y los probabilísticos. En el primero no hay necesidad *a priori* de evaluar un modelo para interpretar el orden de los estados de carácter. Los caracteres multiestado se hipotetizan sin orden y los métodos para derivar las hipótesis de cambio de estados son *a posteriori*. En contraste, en los enfoques probabilísticos los modelos de cambio entre estados son un prerrequisito para iniciar la reconstrucción filogenética (De Luna et al. 2005). En los enfoques probabilísticos también es necesario un árbol de referencia que generalmente se calcula a través de una medida de similitud total y un algoritmo de agrupamiento de vecino más cercano (neighbour joining). Finalmente, el modelo con el mejor ajuste se aplica entonces para realizar la búsqueda del árbol óptimo, es decir, el de mayor verosimilitud o mayor probabilidad posterior (De Luna et al. 2005).

Los análisis de MP y ML fueron conducidos en el programa MEGA7 y los BA en el programa MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). La matriz cpDNA + morfología y la matriz de evidencia total fueron analizadas sólo con los métodos de MP y BA, debido a que con ML no se pudieron generar las particiones correspondientes a cada marcador molecular y a los caracteres morfológicos. Los análisis de MP para las matrices cpDNA + morfología y evidencia total fueron conducidos en el programa PAUP4.0 (Swofford 2002). El Criterio de Información Bayesiano (BIC), implementado en el programa MEGA7 fue utilizado para determinar el modelo evolutivo que mejor se ajustó a cada uno de los marcadores moleculares. En algunas ocasiones nuestros datos se ajustaron a modelos evolutivos que no están disponibles en el programa MrBayes, por lo cual, en algunos análisis bayesianos (BA) se desarrollaron los análisis con el segundo mejor modelo. Todas las pruebas de máxima verosimilitud (ML) fueron desarrolladas aplicando un sólo modelo evolutivo debido a que no pudimos encontrar un software que analizara los datos ejecutando particiones.

El análisis BA de la matriz cpDNA fue conducido bajo la siguiente partición: *atpB-rbcL* ejecutado con el modelo Generalised Time Reversible y una distribución de frecuencias gamma (GTR+G); *psbA-trnH* y *trnK/matK* conducidos bajo el modelo Hasegawa, Kishino y Yano y una distribución de frecuencias gamma (HKY+G) y *trnL-trnF* con el modelo (HKY). Los análisis bayesianos de las matrices cpDNA + morfología y evidencia total fueron conducidos bajo la misma partición para los marcadores del cloroplasto. Para los marcadores nucleares *DODA* y *5GT*, se aplicó el modelo Kimura de dos parámetros (K2) y (K2+G), respectivamente. Los caracteres morfológicos y los indels en los análisis BA fueron analizados bajo el modelo evolutivo Mkv, con distribución variable. El modelo GTR, es el modelo neutral, independiente y de sitios finitos más general. El modelo es neutral ya que asume que la selección natural no opera sobre las sustituciones nucleotídicas, independiente ya que asume que los cambios en un sitio no afectan a otros sitios y de sitios finitos porque asume que cada sitio puede cambiar varias veces (Tavaré, 1986). Por su parte, el modelo de dos parametros de Kimura (K2) distingue dos tipos de homología entre los sitios. Un tipo cuando el sitio esta ocupado por dos nucleótidos diferentes pero de la misma naturaleza química ya sean purinas o pirimidinas (transiciones), y otro tipo cuando un sitio está ocupado por nucleótidos de diferente naturaleza química, una purina y una pirimidina (transversión). Este modelo asigna diferentes parámetros a transiciones y transversiones (Kimura, 1980). El modelo (HKY) es un modelo de sustitución complejo ya que fusiona el modelo (K2) y el de Feldestein (1981) en un modelo de cinco parámetros (Hasegawa et al. 1985).

Los análisis de MP se realizaron bajo una búsqueda heurística, el método TBR (Tree Bisection and Reconnection), adición de secuencias al azar y 1000 réplicas. Un árbol de mayoría (50%) fue calculado a partir de los árboles más parsimoniosos resultantes. Los análisis de ML fueron desarrollados a partir de un árbol inicial obtenido por el método del vecino más cercano y el algoritmo bionNJ

para la búsqueda heurística, para posteriormente seleccionar el árbol con la mayor verosimilitud. Los soportes en los nodos de los árboles de consenso fueron estimados a partir de 1000 réplicas no-paramétricas de bootstrap (bs) con búsquedas heurísticas y los mismos parámetros utilizados previamente (ver arriba). Los análisis BA fueron conducidos con dos corridas de cuatro cadenas de 10,000,000 de generaciones y muestreos cada 5000 generaciones. El valor promedio de la desviación estándar de las frecuencias de divergencia (Lakner et al. 2008), fue utilizado como indicador de convergencia cuando alcanzó 0.002 en el análisis BA de la matriz cpDNA, 0.001 en el análisis BA de la matriz cpDNA + morfología y 0.002 en el análisis BA de la matriz de evidencia total. Descartamos una fracción del 25% de los árboles y los restantes fueron resumidos en un árbol de consenso de mayoría, sobre el cual se calcularon las probabilidades posteriores (pp), las cuales fueron utilizadas como soporte para los clados.

Para los análisis de la matriz cpDNA se trató en lo posible de incluir para cada especie del grupo interno, tres terminales correspondientes a tres individuos de diferentes poblaciones. Sin embargo, en algunas especies para las cuales se agotaron las diluciones de ADN y el tejido para extraer más, se ensamblaron terminales combinando secuencias de diferentes individuos, formando secuencias quiméricas. El cuadro 2 muestra las terminales utilizadas en los análisis concatenados e indica cuáles están constituidas por secuencias quiméricas.

Cuadro 2. Terminales utilizadas en los análisis concatenados. Las terminales cuya identificación inicia con las letras JF, FJ, EU, KJ, FN, AY y KC, representan secuencias descargadas de GenBank. Las terminales marcadas con NA indican secuencias faltantes, S/C y S/n indican terminales obtenidas en viveros sin datos de colecta. Todas las demás terminales corresponden a secuencias generadas en este estudio. Las terminales que inician con el código mvar indican terminales colectadas por el autor. Los datos de colecta de los especímenes correspondientes a cada terminal se muestrabr en el apéndice 1.

Especie	atpB	psbA	5GT	trnL-trnF	matK	DODA
<i>O. ficus-indica</i>	JF787222	FJ026612	EU089744	KJ735936	FN997314.1	EU089741.1
<i>C. gigantea</i>	mvar86	NA	mvar86	HM041236	KT164775.1	mvar86
<i>G. mexicana</i>	JE3226	JE3226	NA	NA	JE3226	NA
<i>A. hintonii</i>	ZU991236	ZU991236	NA	NA	ZU991236	ZU991236
<i>A. valdezii</i>	S/c, S/n	S/c, S/n	NA	NA	AY015290.1	NA
<i>A. asterias</i>	S/c, S/n	S/c, S/n	NA	KC776941.1	FN997357.1	NA
<i>A. caput-medusae</i>	S/c, S/n	S/c, S/n	NA	KC776998.1	FN997077.1	NA
<i>A. myriostigma</i>	mvar116	mvar116	NA	KC776951.1	FN997366.1	mvar116
<i>A. ornatum</i>	mvar95	mvar95	H3703	KC776947.1	H3703	mvar95
<i>A. capricorne</i>	H2320	H2320	NA	KC776959.1	H2320	NA
<i>E. platycanthus_1</i>	C26M6 (Tamps)	C16M1 (SLP)	C26M6 (Tamps)	C16M1 (SLP)	FN997112.1 (SLP)	C26M6 (Tamps)
<i>E. platycanthus_2</i>	C9M1 (Coah)	C9M3 (Coah)	NA	C9M1 (Coah)	NA	NA
<i>E. platycanthus_3</i>	C18M15 (Pue)	C13M1 (Hgo)	NA	C18M1 (Pue)	NA	NA
<i>E. horizontalonius_1</i>	mvar74 (Chih)	mvar74 (Chih)	mvar74 (Chih)	HM041258 (SLP)	Na	NA
<i>E. horizontalonius_2</i>	mvar75 (Gto)	mvar75 (Gto)	mvar75 (Gto)	T1698 (Coah)	FN997104.1 (Coah)	mvar75 (Gto)
<i>E. nicholii</i>	Ecker111 (AZ)	Ecker111 (AZ)	Ecker111 (AZ)	Ecker111 (AZ)	Na	NA
<i>E. texensis_1</i>	mvar127 (Tamps)	mvar127 (Tamps)	Carter S/n (TX)	Carter S/n (TX)	FN997302.1 (Tamps)	mvar127 (Tamps)
<i>E. texensis_2</i>	MAB14286 (NM)	MAB14286 (NM)	MAB14286 (NM)	NA	NA	NA
<i>E. texensis_3</i>	MAB16609 (Coah)	MAB16609 (Coah)	MAB16609 (coah)	MAB16609 (Coah)	NA	NA
<i>E. parryi_1</i>	mvar28 (Guz)	mvar28 (Guz)	mvar28 (Guz)	NA	KC776965.1 (Sam)	mvar28 (Guz)
<i>E. parryi_2</i>	mvar41 (Mes)	mvar38 (Mes)	mvar41 (Mes)	KC776939 (Sam)	NA	mvar38 (Mes)
<i>E. parryi_3</i>	mvar61 (Fel)	mvar133 (Fel)	mvar61 (Fel)	NA	NA	NA
<i>E. polycephalus</i>	Ch51 (AZ)	Ch51 (AZ)	Ch51 (AZ)	Ch51 (AZ)	Ch45 (AZ)	mvar83 (Son)
<i>E. xeranthemoides_1</i>	mvar180 (AZ)	mvar180 (AZ)	mvar180 (AZ)	mvar180 (AZ)	NA	NA
<i>E. xeranthemoides_2</i>	WH9727 (AZ)	WH9727 (AZ)	WH25463 (AZ)	WH25463 (AZ)	NA	NA
<i>E. grusonii_1</i>	mvar92 (Qro)	mvar92 (Qro)	CHB50 (Qro)	HM041257.1 (Qro)	CHB50 (Qro)	CHB50 (Qro)
<i>E. grusonii_2</i>	T1584 (Zac)	T1588 (Zac)	NA	T1584 (Zac)	NA	NA
<i>F. glaucescens</i>	H3701	H2425	H3701	NA	FN997274.1	NA
<i>F. echidne</i>	T49	T49	T49	HM041276.1	FN997544.1	NA
<i>F. hamatacanthus</i>	H2096	H1467	H2096	NA	FN997248.1	NA
<i>F. histrix</i>	SLP1	SLP6	SLP1	NA	FN997287.1	SLP1
<i>F. latispinus</i>	mvar90	RTBL5	T1620	HM041278.1	FN997246.1	NA
<i>F. lindsayi</i>	CHB10	NA	CHB10	NA	FN997152.1	NA
<i>F. pilosus</i>	C739	C739	C739	NA	FN997133.1	NA
<i>F. wislizeni</i>	T1569	T1565	T1565	NA	FN997459.1	NA

4.5 Optimización de caracteres morfológicos y estados ancestrales

Con el fin de identificar posibles sinapomorfías para los clados recuperados en la filogenia, se realizó una optimización de caracteres no ambigua sobre el árbol de consenso estricto generado con la matriz de evidencia total en el programa

Winclada 1.00.08. Para identificar caracteres sinapomórficos adicionales las optimizaciones acctran y deltran fueron exploradas en el mismo software. Los estados ancestrales para cada carácter morfológico fueron estimados con el método de máxima parsimonia sobre la topología obtenida en el análisis BA con la matriz de evidencia total en MESQUITE 3.02.

4.6 Tiempos de divergencia

Los alineamientos de cada marcador molecular fueron sometidos a pruebas de reloj molecular en MEGA7, para determinar si estos presentaban o no variación en la tasa de mutación entre las terminales, es decir si presentaban o no un comportamiento de reloj molecular. La hipótesis de reloj molecular asume que todas las terminales de un árbol filogenético son genéticamente equidistantes a la raíz (Kimura, 1987). Ninguna de las matrices moleculares generadas en este estudio paso la prueba de reloj molecular, por lo cual, los tiempos de divergencia fueron estimados a través de una prueba de reloj molecular con logaritmo natural no correlacionado. El análisis se realizó bajo una aproximación bayesiana en el software BEAST 1.8.4 (Drummond et al. 2012), ejecutando 50,000,000 de generaciones con muestreos cada 5000 generaciones. Como punto de calibración se utilizó la edad promedio de la corona de las Cacteeae (11.94 Ma) estimado por Hernández-Hernández et al. (2014). Debido a que los análisis puramente moleculares recuperan a *Echinocactus texensis* como especie hermana a *E. polycephalus*, contrario a los análisis de evidencia total, los cuales recuperan a *E. parryi* como la especie hermana a *E. polycephalus*, para el análisis de reloj molecular se forzó el clado conformado por estas dos últimas especies como se recupera en el análisis de evidencia total.

4.7 Análisis biogeográficos

Las áreas de distribución que habita cada especie fueron asignadas siguiendo los límites geográficos de las ecoregiones de Norteamérica utilizados para generar los

mapas de distribución (Figs. 6 y 7) y las regionalizaciones de los desiertos de Norteamérica (Hafner & Riddle, 2011; Hernández et al. 2004; Hernández & Gómez-Hinostrosa, 2011). Las especies estudiadas se distribuyen en 13 áreas geográficas (Cuadro 3). Se llevó a cabo una reconstrucción de áreas ancestrales en el software RASP (Yu et al., 2015), utilizando el método bayesiano binario MCMC (BBM) y 5,000,000 de generaciones.

Con el fin de identificar posibles rutas de dispersión, se generaron modelos de nicho ecológico a la última era interglaciar (140,000 a 120,000 años) para cada especie de *Echinocactus*. Para esto se utilizaron las 19 variables bioclimáticas descargadas de la página de WorldClim (<http://www.worldclim.org>) y el programa Maxent (Phillips et al. 2018). Un total de 1,151 registros geográficos de las especies de *Echinocactus* provenientes de registros de herbario fueron utilizados, de estos 16 fueron de *E. grusonii*, 299 de *E. horizonthalonius*, 52 de *E. parryi*, 568 de *E. platyacanthus*, 137 de *E. polycephalus* y 79 de *E. texensis*. Los modelos de nicho ecológico fueron creados con los parámetros estadísticos preestablecidos y sólo con los datos de presencias en el programa Maxent.

Cuadro 3. Áreas geográficas donde se distribuyen las especies estudiadas. Valle de Tehuacán-Cuicatlán (A), Región meridional del Desierto Chihuahuense (B), Región central del Desierto Chihuahuense (C), Región norte del Desierto Chihuahuense (D), Región este del Desierto Chihuahuense (E), Desierto Sonorense (F), Grandes planicies de Tamaulipas-Texas (G), Desierto de Mojave (H), Desierto de la Gran Cuenca (I), Sur de la Sierra Madre Occidental (J), Altiplanicie semiárida del sur (K), Eje Neovolcánico (L), Depresión del Río Balsas (M).

Especie	Áreas geográficas de distribución
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	(A), (B), (C) y (E)
<i>E. horizonthalonius</i>	(C), (D), (E) y (F)
<i>E. texensis</i>	(D), (E) y (G)
<i>E. parryi</i>	(D)
<i>E. polycephalus</i>	(F), (H) y (I)
<i>E. grusonii</i>	(B) y (J)
<i>Ferocactus histrix</i>	(C), (J) y (K)
<i>F. glaucescens</i>	(B)
<i>F. hamatacanthus</i>	(C), (D), (E) y (G)
<i>F. echidne</i>	(B) y (E)
<i>F. latispinus</i>	(A), (B), (C), (D), (E), (J) y (L)
<i>F. lindsayi</i>	(M)
<i>F. pilosus</i>	(C) y (E)
<i>F. wislizeni</i>	(D) y (F)
<i>Astrophytum asterias</i>	(G)
<i>A. capricorne</i>	(D)
<i>A. caput-medusae</i>	(D)
<i>A. myriostigma</i>	(D) y (E)
<i>A. ornatum</i>	(B)
<i>Aztekium hintonii</i>	(E)
<i>Aztekium ritteri</i>	(E)
<i>Geohintonia mexicana</i>	(E)
<i>Carnegiea gigantea</i>	(F)
<i>Opuntia ficus-indica</i>	¿?

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización de las secuencias y matrices moleculares

En este estudio fueron generadas 45 secuencias del espaciador intergénico *atpB-rbcL*. Las secuencias variaron en longitud de 385 nucleótidos en *Astrophytum caput-medusae* a 782 nucleótidos en *Carnegieia gigantea*. Las secuencias de individuos de *E. platyacanthus* colectados en las poblaciones del norte (ej. Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León y Coahuila), presentan una delección de aproximadamente 60 nucleótidos, la cual está ausente en individuos de poblaciones del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y de la Zona Árida Queretano-Hidalguense. Los análisis BLAST de las secuencias de *atpB-rbcL* indican que las nuevas secuencias abarcan prácticamente todo el espaciador intergénico. Las reconstrucciones filogenéticas con *atpB-rbcL* fueron hechas a partir de una matriz que contenía 48 terminales y 915 caracteres, de los cuales, 76 resultaron informativos. De las 45 secuencias de *atpB-rbcL* generadas, 34 ya fueron depositadas en el GenBank, a las cuales les fueron asignadas las siguientes claves de acceso MH129808-MH129841. El cuadro 4 muestra el resumen estadístico de cada matriz por marcador independiente y de las matrices concatenadas analizadas.

De la región intergénica *psbA-trnH* fueron generadas 36 secuencias, las cuales, variaron en longitud de 330 a 340 nucleótidos. Los análisis BLAST para conocer la identidad de nuestras secuencias indican que todas las secuencias se encuentran en el rango de la IGR. Los análisis de MP, ML y BA con este marcador molecular fueron desarrollados utilizando una matriz molecular de 47 terminales y 319 caracteres, de los cuales 48 resultaron informativos. La región intergénica (IGS) de *psbA-trnH* considerada un “hot spot” por su alta tasa de mutaciones (Hernández-Ledesma & Bárcenas, 2017) fue ubicada en las posiciones 206-229 de nuestro alineamiento y posteriormente eliminada. 32 secuencias de *psbA-trnH* fueron

depositadas en GenBank, a las cuales se les asignaron las siguientes claves de acceso MH129842-MH129873.

Cuadro 4. Resumen estadístico de las nueve matrices analizadas en la reconstrucción de las relaciones evolutivas de *Echinocactus*.

	<i>atpB-rbcL</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>matK</i>	<i>DODA</i>	<i>5GT</i>	cpDNA	nDNA	Evidencia total
Número de caracteres	915	319	1082	1292	333	614	1855	953	2986
Número de caracteres informativos	76 (8.5%)	48 (15%)	62 (5.6%)	43 (3.3%)	73 (22%)	233 (38%)	103 (5.5%)	298 (31%)	295 (9.87%)
Terminales	48	47	48	30	23	37	35	14	35
Taxa	28	25	21	24	16	19	27	12	27

En este estudio generamos 10 secuencias correspondientes a una región que abarca una pequeña porción del gen *trnL*, todo el espaciador intergénico *trnL-trnF* y otra pequeña porción del gen *trnF*. Las secuencias variaron en longitud de 751 a 826 nucleótidos. El alineamiento de las secuencias produjo una matriz compuesta de 48 terminales y 1082 caracteres de los cuales 62 resultaron informativos. Las 10 nuevas secuencias fueron depositadas en GenBank, a las cuales les asignaron las siguientes claves de acceso MH138282-138291.

En este estudio fueron generadas 17 secuencias parciales del gen nuclear *DODA*, todas correspondientes a especies de Cactaceae. Las 17 nuevas secuencias oscilaron en tamaño entre 290 a 330 nucleótidos. Los análisis BLAST realizados en el servidor del GenBank, determinaron que nuestras secuencias

presentan la mayor similitud (98%) con las secuencias de este gen de otra cactácea, *Lophophora williamsii* (GenBank KR376285). Otras secuencias con alta similitud detectadas por el análisis BLAST fueron las secuencias de *Opuntia ficus-indica* (GenBank EU089745 y EU089742) y de otras Caryophyllales como: *Talinum* sp., (KR376286) y *Portulaca grandiflora* Hook. (KR376294). Debido a que el análisis BLAST sólo arrojó una secuencia completa y anotada correspondiente a *Phytolacca americana* L. (AB451869) con una similitud del 79%, esta secuencia fue la base para describir nuestras secuencias. Las nuevas secuencias de *DODA* se alinearon entre la posición 103 a 435 de *P. americana*. Las secuencias traducidas de *DODA* resultaron en secuencias de amino ácidos de 110 residuos, las cuales se alinearon entre el triptófano conservado en la posición 35 y la leucina conservada en la posición 145 de la proteína anotada de *P. americana* (BAH66635). Los análisis filogenéticos para *DODA* fueron elaborados a partir de una matriz que contenía 23 terminales pertenecientes a 16 taxa y 333 caracteres, de los cuales, 73 fueron informativos (cuadro 4).

Para el gen *5GT* fueron generadas un total de 33 secuencias parciales, las cuales presentaron una variación en longitud de 469 a 597 nucleótidos. Según los análisis BLAST, nuestras secuencias presentan la mayor similitud (73%) con las secuencias de este gen de *Opuntia ficus-indica* (EU089744 y EU089743), *Phytolacca americana* (AB458517) y *Dorotheanthus bellidiformis* N.E. Br. (Y18871) depositadas en GenBank. Debido a que sólo las secuencias de *P. americana* y *D. bellidiformis* están anotadas, estas fueron utilizadas para describir nuestras secuencias. Las nuevas secuencias de *5GT* se alinearon entre las posiciones 436 a 1048 y entre las posiciones 561 a 1067 de las secuencias de *P. americana* y *D. bellidiformis*, respectivamente. La traducción de las secuencias de *5GT* produjo secuencias de aminoácidos con una variación de longitud de 156 a 198 residuos, los cuales se alinearon entre la posición 150 correspondiente a una lisina conservada y la posición 356 de una isoleucina altamente conservada de las

proteínas anotadas de *Amaranthus tricolor* (AJY59053 y KP17810), *Beta vulgaris* (AY526080) y *P. americana* (BAG71127). Las secuencias de *DODA* y *5GT* generadas fueron depositadas en GenBank con las claves de acceso (MG149503–MG149535) y (MG149536–MG149552), respectivamente.

De las cuatro matrices concatenadas, la matriz de evidencia total presentó el mayor porcentaje de caracteres informativos (7.3%), seguida por la matriz cpDNA + morfología (9.87%) y la matriz cpDNA (5.5%) (Cuadro 4). En el caso particular de las matrices generadas con los genes nucleares el porcentaje de caracteres informativos fue relativamente elevado 22% y 38% para *DODA* y *5GT*, respectivamente. Sin embargo, los análisis con los genes nucleares fueron conducidos con un grupo externo funcional de la familia Amaranthaceae a diferencia de las matrices generadas con los marcadores de cpDNA y la matriz de evidencia total, las cuales fueron analizadas con *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae) como grupo externo funcional. Lo anterior impactó de manera positiva en el aumento de caracteres informativos en las matrices construidas con los genes nucleares. La matriz de evidencia total presentó también un aumento en el porcentaje de caracteres informativos con respecto a la matriz cpDNA, ambas con las mismas terminales y grupos externos.

5.2 Relaciones filogenéticas inferidas con marcadores de cloroplasto (cpDNA)

Los árboles filogenéticos de MP, ML y BA obtenidos con la matriz concatenada cpDNA fueron congruentes entre ellos y en general presentaron alto soporte en los nodos. Las topologías resultantes muestran que *Echinocactus* es polifilético (Fig. 2). Por una parte, *E. grusonii* fue recuperada con alto soporte (99% mpb 95% mlb y 1.0 pp.) como la especie hermana a un clado integrado por todas las especies de *Ferocactus* incluidas en este estudio (clado *E. grusonii-Ferocactus*) (Fig. 2). Por otra parte, el resto de las especies de *Echinocactus*, fueron recuperadas en dos clados independientes dentro de un clado que también incluyó a las especies de

Astrophytum (clado *HEA*), este último, recuperado con alto soporte (96% mpb, 99% mlb y 1.0 pp.). *Echinocactus texensis*, *E. parryi* y *E. polycephalus*, fueron recuperadas como grupo monofilético (clado *Homalocephala*) con valores de soporte que van de medios a altos (90% mpb, 73% mlb y 1.0 pp.). *Echinocactus platyacanthus* y *E. horizonthalonius* fueron recuperadas como especies hermanas (clado *Echinocactus*) sólo en el análisis de MP, pero con bajo soporte (59%) de bootstrap (Fig. 2). Contrario al análisis de MP, los análisis de ML y BA recuperaron a *E. platyacanthus* como especie hermana a las cinco especies de *Astrophytum*, pero con bajo soporte en el análisis BA (0.51 pp.) y sin soporte en el análisis de ML (Fig. 2).

Sólo el análisis de MP resolvió las relaciones evolutivas dentro del clado *Homalocephala*, donde *E. parryi* fue recuperada como especie hermana a un clado integrado por *E. texensis* y *E. polycephalus*, pero este con bajo soporte (58%) de bootstrap (Fig. 2). Contrario al análisis de MP, los análisis de ML y BA, recuperaron una tricotomía entre *E. parryi*, *E. texensis* y *E. polycephalus*. Estas tres especies fueron representadas por tres terminales, las cuales fueron recuperadas en clados con alto soporte (Fig. 2). A nivel infraespecífico sólo el análisis de MP presentó estructura poblacional para cada especie pero con bajo soporte (Fig. 2).

Dentro del clado *Echinocactus*, las tres terminales correspondientes a secuencias de individuos de diferentes poblaciones de cada especie fueron recuperadas en dos clados con alto soporte (Fig. 2). La estructura infraespecífica dentro del clado *Echinocactus* presentó valores que van de medios a altos (Fig. 2). En el caso de *E. platyacanthus*, la terminal 3 (compuesta de secuencias de dos individuos, uno del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y otro de la Zona Árida Queretano-Hidalguense) resultó hermana a un clado recuperado con alto soporte (97% mpb, 85% mlb y 1.0 pp.), integrado por las terminales 1 y 2 (compuestas por secuencias de individuos provenientes de Tamaulipas y San Luis Potosí). La terminal número 2 de *E. horizonthalonius* var. *horizonthalonius* (compuesta de secuencias de

individuos de Guanajuato) fue recuperada como hermana a un clado integrado por la terminal *E. horizonthalonius* var. *horizonthalonius* 1 (individuos de Chihuahua) y *E. horizonthalonius* var. *nicholii* (individuos de Arizona), este clado también fue recuperado con alto soporte (95% mpb, 85% mlb y 0.89 pp.) (Fig. 2).

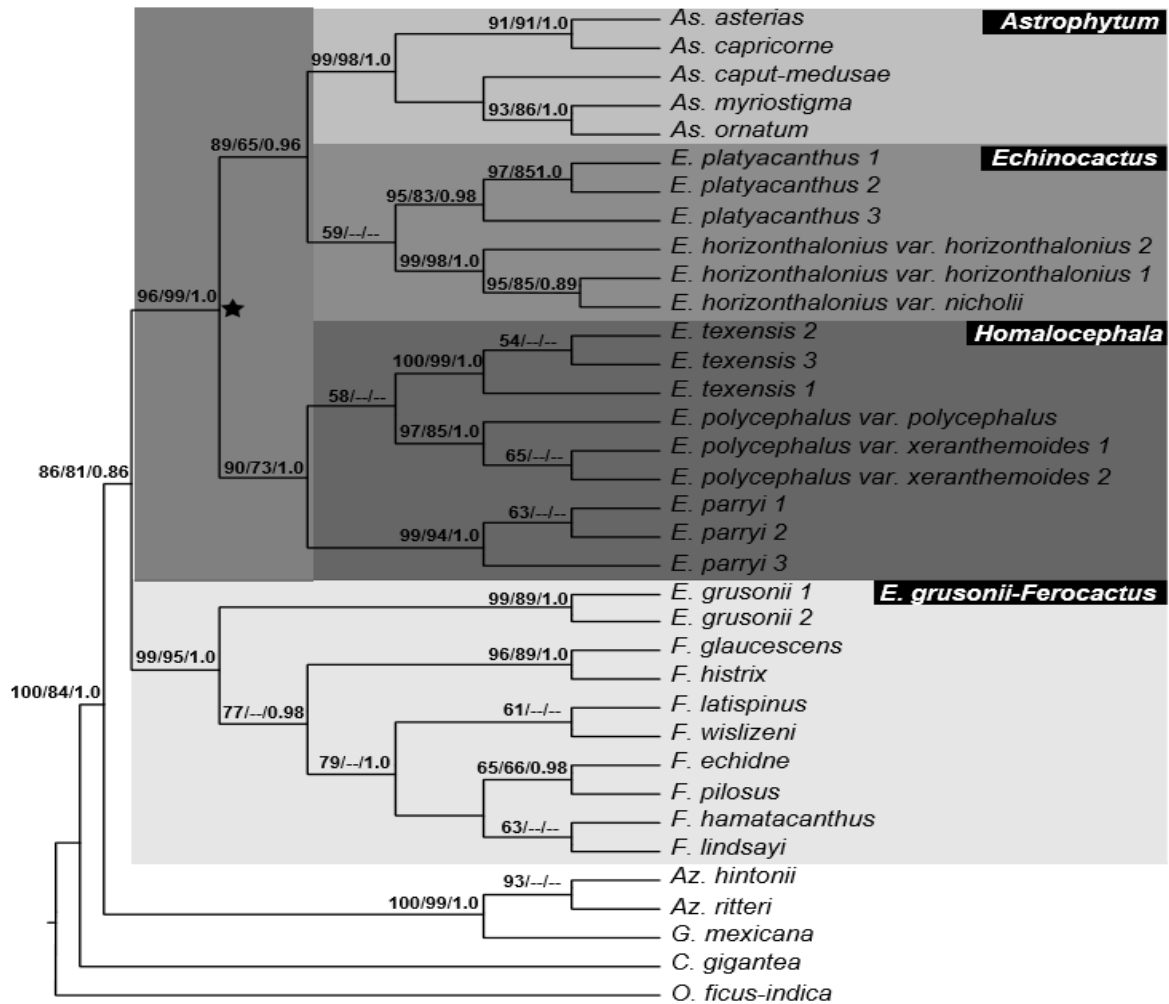


Figura 2. Relaciones filogenéticas de *Echinocactus* inferidas con la matriz cpDNA. El árbol de consenso de mayoría (50%) fue obtenido a partir de cuatro árboles igualmente parsimoniosos de 347 pasos, índice de consistencia de 0.681 e índice de retención de 0.848. Los valores en los nodos corresponden (izquierda a derecha) a los valores de bootstrap de máxima parsimonia (mpb), bootstrap de máxima verosimilitud (mlb) y de probabilidad posterior (pp). La estrella indica el clado HEA, resaltando los tres subclados *Astrophytum*, *Echinocactus* y *Homalocephala*.

5.3 Relaciones filogenéticas inferidas con marcadores del núcleo (nDNA)

Debido a la falta de secuencias de varias terminales para *DODA*, el análisis concatenado con los dos marcadores de núcleo *DODA* y *5GT* (nDNA) fue realizado sólo con 12 taxones. Por esta razón, decidimos mostrar sólo la topología obtenida con el marcador *5GT*, la cual presenta más terminales y además recupera los mismos clados que el análisis concatenado con los dos marcadores de núcleo.

Las tres topologías obtenidas con el marcador *5GT* (MP, ML y BA) recuperaron 24 clados con soporte y fueron altamente congruentes entre ellas. Al igual que en los análisis filogenéticos conducidos con la matriz cpDNA, los resultados con *5GT* recuperaron a *Echinocactus* como polifilético (Fig. 3). Nuevamente, el clado *E. grusonii-Ferocactus* fue recuperado con alto soporte (97% mpb, 94% mlb and 1.0 pp) (Fig. 3). El clado *HEA* también fue recuperado en los análisis con *5GT* (72% mpb, 89% mlb and 1.0 pp), pero en este caso debido a la falta de secuencias sólo incluyó una especie de *Astrophytum*, *A. ornatum* (Fig. 3).

Contrario a los análisis desarrollados con la matriz cpDNA, con *5GT* se recuperó a un núcleo *Echinocactus* como monofilético con valores de soporte que van de bajos a medios (68% mpb, 75% mlb, 0.62 pp). En el núcleo *Echinocactus* los análisis de ML y BA con *5GT* recuperaron dos subclados. El primer subclado, corresponde al clado *Echinocactus*, el cual fue recuperado con valores de soporte altos (99% mpb, 97% mlb y 1.0 pp). Este clado incluyó a *E. platyacanthus*, *E. horizonthalonius* var. *horizonthalonius*, *E. horizonthalonius* var. *nicholii* y la terminal del supuesto híbrido *E. horizonthalonius* x *platyacanthus* (Fig. 3). *Echinocactus platyacanthus* fue recuperada con alto soporte como especie hermana a la terminal *E. horizonthalonius* x *platyacanthus* (94% mpb, 99% mlb y 0.99 pp). *Echinocactus horizonthalonius* var. *horizonthalonius* (terminal 2, Guanajuato) se recuperó como hermana a un clado integrado por las terminales *E. horizonthalonius* var. *horizonthalonius* (terminal 1, Chihuahua) y *E. horizonthalonius* var. *nicholii* (Arizona)

(96% mpb, 96% mlb y 1.0 pp). La relación entre éstas dos últimas fue recuperada con valores medios a altos (76% mpb, 73% mlb y 0.97 pp).

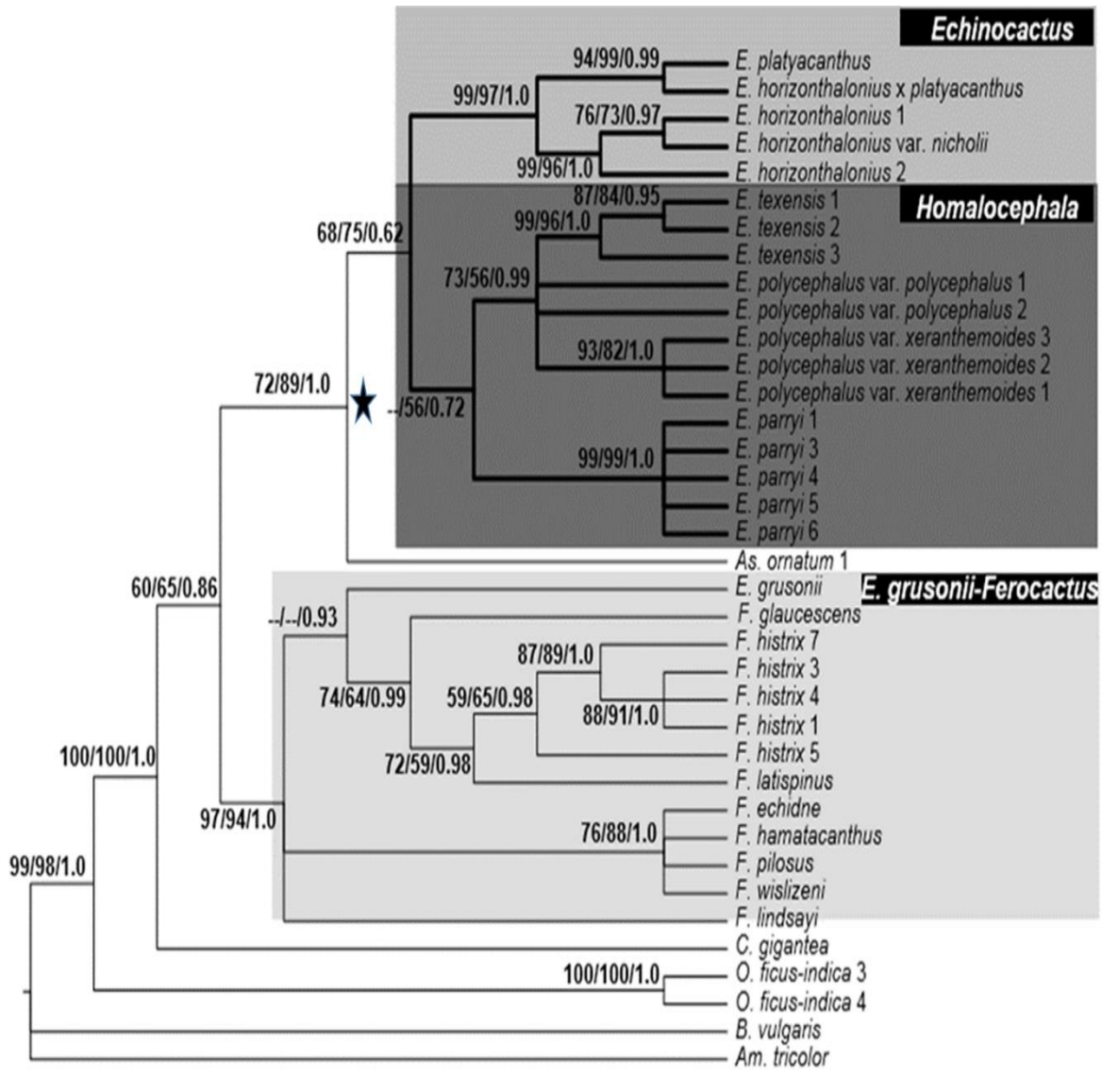


Figura 3. Relaciones evolutivas de *Echinocactus* inferidas con 5GT. Árbol consenso de mayoría obtenido en el análisis bayesiano. Los valores en los nodos (izquierda a derecha) corresponden a los valores de bootstrap del análisis de máxima parsimonia (mpb%), los valores de bootstrap del análisis de máxima verosimilitud (mlb%) y las probabilidades posteriores (pp). Los clados enmarcados corresponden a los clados *Echinocactus*, *Homalocephala* y *E. grusonii-Ferocactus*. La estrella negra indica el clado *Homalocephala-Echinocactus-Astrophytum* (HEA).

El segundo subclado dentro del núcleo *Echinocactus* corresponde al clado *Homalocephala* recuperado también en los análisis concatenados con la matriz cpDNA. Este clado fue recuperado con valores de soporte que van de bajos a medios (56% mlb y 0.72pp), pero no se recuperó en el análisis de MP. Dentro del clado *Homalocephala*, *E. parryi* fue recuperada como especie hermana a un clado internamente sin resolución con soporte que va de bajo a alto (73% mpb, 56% mlb y 0.99 pp), el cual incluyó a *E. texensis*, *E. polycephalus* var. *polycephalus* y *E. polycephalus* var. *xeranthemoides* (Fig. 3). Sólo el análisis de MP recuperó en un clado con valor de soporte bajo a las dos variedades de *E. polycephalus* (60% mpb). A nivel infraespecífico, sólo para *E. texensis* se recuperó una estructura infraespecífica donde la terminal 3 (Texas), resultó hermana a un clado con soporte de medio a alto (87% mpb, 84% y 0.95 pp) integrado por las terminales 1 (Nuevo México) y 2 (Coahuila) (Fig. 3).

5.4 Relaciones filogenéticas inferidas con caracteres morfológicos

Se construyó una matriz con 26 taxones y un total de 87 caracteres morfológicos, de los cuales, 82 fueron informativos. Debido a que no se contó con un software que realice análisis de ML para caracteres morfológicos, la matriz morfológica sólo se analizó bajo los métodos de MP y BA. Los resultados muestran que existen diferencias entre los análisis de MP y BA desarrollados con los caracteres morfológicos, ya que algunos de los clados recuperados por el análisis de MP no fueron recuperados en el BA (ej. *Homalocephala*). La posible causa de esta discrepancia puede ser que en el análisis de MP los taxones con multiestados fueron considerados como polimórficos, a diferencia del análisis BA, donde debido a limitaciones del programa los taxones con multiestados fueron considerados como inaplicables (Huelsenbeck & Ronquist 2001).

El análisis de MP recuperó varios clados también recuperados en los análisis moleculares (Fig. 4). La única diferencia importante entre los análisis moleculares y

el análisis de MP de la matriz morfológica, es que en este último se recuperó con soporte medio a *E. grusonii* como especie hermana al clado *HEA* (76%) (Fig. 4).

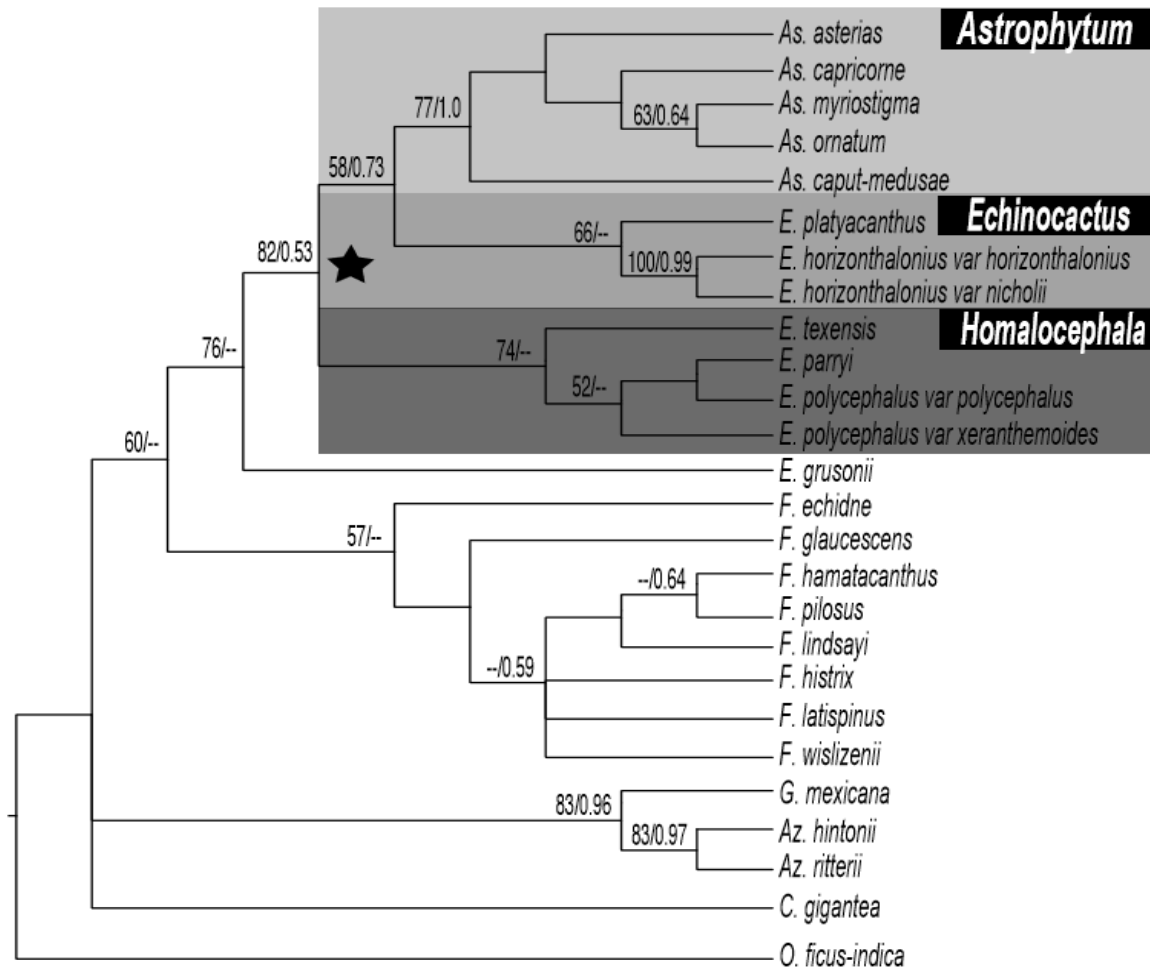


Figura 4. Relaciones evolutivas de *Echinocactus* inferidas con caracteres morfológicos. Árbol consenso de mayoría (50%) obtenido a partir de 16 árboles igualmente parsimoniosos de 419 pasos, índice de consistencia = 0.606 e índice de retención = 0.690. Los valores en los nodos corresponden (izquierda a derecha) a los valores de bootstrap obtenidos en el análisis de MP y a los valores de probabilidad posterior.

Al igual que en los análisis conducidos con la matriz cpDNA y con *5GT* se recuperó el clado *HEA* (82% mpb y 0.53 pp). Dentro de este clado, el clado *Homalocephala* (mpb 74%) fue recuperado como grupo hermano al clado

compuesto por los clados *Astrophytum* y *Echinocactus* (mpb 58% y pp 0.73). Contrario a las topologías obtenidas con las matrices cpDNA y 5GT, la topología resultante del análisis de MP con caracteres morfológicos recuperó a *E. texensis* como especie hermana a un clado con bajo soporte (52%) y sin resolución interna integrado por *E. parryi* y *E. polycephalus* (Fig. 4). El clado *Echinocactus* fue recuperado como hermano al clado *Astrophytum* con valor de soporte que va de bajo a medio (mpb 58% y 0.73 pp). Dentro del clado *Echinocactus*, el análisis de MP recuperó con bajo soporte (66%) a *E. platyacanthus* como especie hermana al clado compuesto por las dos variedades de *E. horizontalonius* (Fig. 4).

5.5 Relaciones filogenéticas inferidas con evidencia total

La matriz concatenada con los seis marcadores moleculares (*DODA* y *5GT*) del genoma nuclear, (*atpB-rbcL*, *psbA-trnH*, *matK* y *trnL-trnF*) del genoma del cloroplasto, 13 indels provenientes del marcador *atpB-rbcL* y los 87 caracteres morfológicos, estuvo compuesta de 35 terminales y 2986 caracteres. Esta matriz sólo fue analizada con MP y BA. Los resultados de los análisis con la matriz de evidencia total son, en general, congruentes con los resultados obtenidos en estudios previos y con los resultados de este estudio obtenidos con evidencias moleculares y morfológicas por separado (Fig. 5).

Este análisis reafirma las relaciones evolutivas obtenidas con las matrices cpDNA, 5GT y morfológica. Nuevamente se recuperó a *Echinocactus* polifilético. Por una parte, *E. grusonii* se mantuvo con muy alto soporte (98% mpb y 1.0 pp) como especie hermana a *Ferocactus* y por otra parte, el resto de las especies de *Echinocactus* fueron recuperadas dentro del clado *HEA*, pero en dos clados independientes con alto soporte cada uno (Fig. 5).

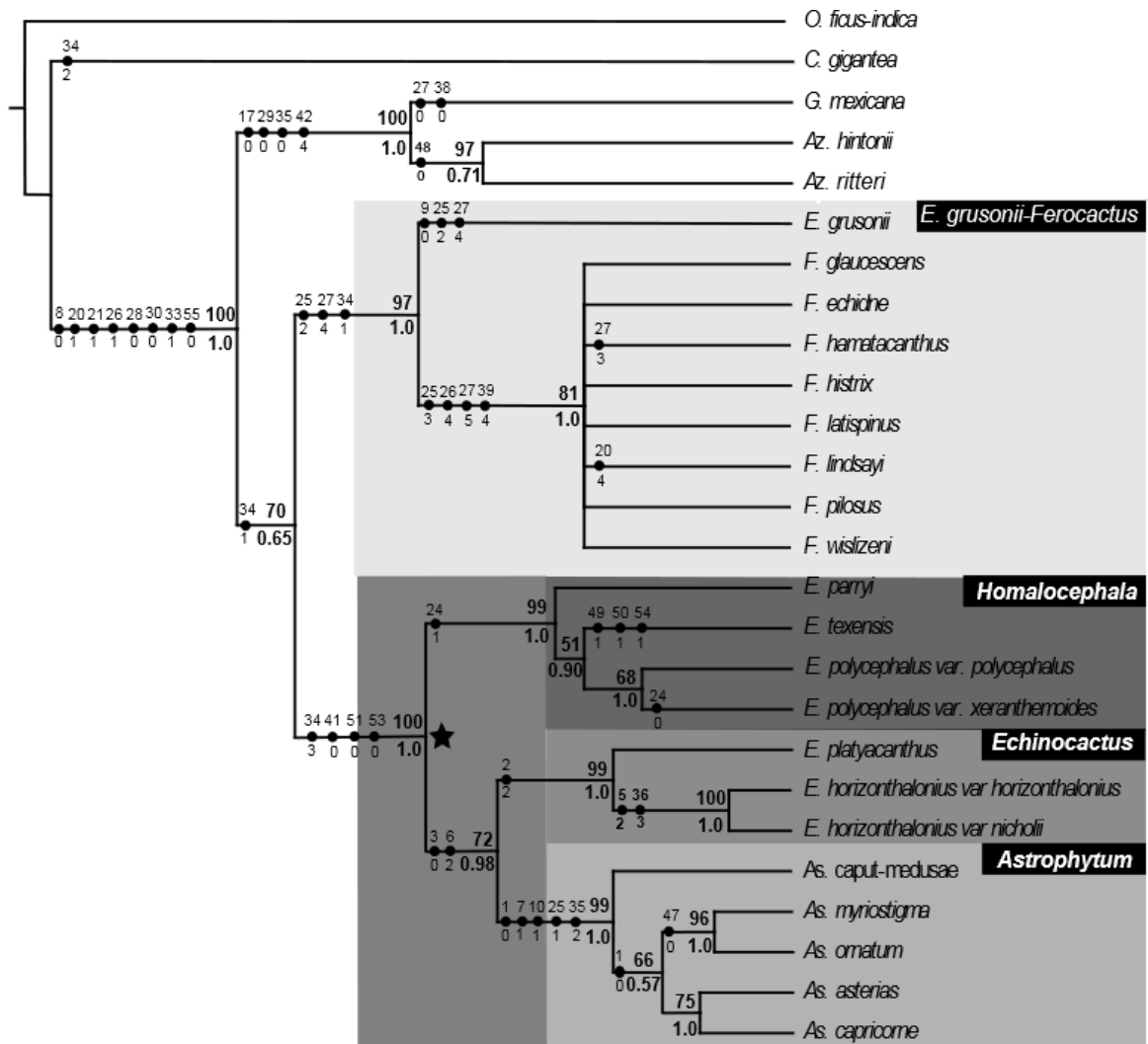


Figura 5. Relaciones evolutivas de *Echinocactus* inferidas con la matriz de evidencia total. Árbol de consenso estricto generado a partir de dos árboles igualmente parsimoniosos. Los valores arriba y debajo de los nodos corresponden a los valores de bootstrap de máxima parsimonia (mpb %) y a los valores de probabilidad posterior (pp), respectivamente. Los círculos negros indican sinapomorfías para los clados. El número arriba de los círculos indica los caracteres y el número de bajo de los círculos los estados de carácter (apéndice 2). La estrella negra indica el clado HEA. Los clados resaltados corresponden a *E. grusonii-Ferocactus*, *Astrophytum*, *Echinocactus* y *Homalocephala*.

El clado HEA se recuperó con los valores de soporte más altos (100% mpb y 1.0 pp). El clado *Homalocephala* en los análisis de evidencia total presentó valores de soporte muy altos (99% mpb y 1.0 pp) (Fig. 5). Dentro de *Homalocephala* *E.*

parryi fue recuperada como especie hermana a un clado con soporte que oscila entre bajo a medio (51% mpb y 0.90 pp), integrado por *E. texensis* y *E. polycephalus*. El análisis de evidencia total recuperó a las dos variedades de *E. polycephalus* en un clado con soporte que oscila entre bajo a alto (68% mpb y 1.0 pp), (Fig. 5).

Así como en los análisis filogenéticos con la matriz cpDNA, los análisis de evidencia total recuperaron con soporte de medio a alto (72% mpb y 0.98 pp) al clado *Echinocactus* como hermano del clado *Astrophytum* y no como hermano a *Homalocephala* (Fig. 5). El clado *Echinocactus* fue recuperado con alto soporte (99% y 1.0), (Fig. 5).

5.6 Distribución geográfica y áreas de ocupación

Tomando en cuenta los resultados filogenéticos obtenidos en este estudio, la figura 6 muestra la distribución geográfica de las especies del clado *Homalocephala* (*E. texensis*, *E. parryi* y *E. polycephalus*) y la figura 7 muestra la distribución de las especies del clado *Echinocactus* (*E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius*). En la figura 7 también se muestra el área de distribución de *E. grusonii*.

Los resultados de los análisis realizados bajo el método cartográfico por conglomerados (Hernández & Navarro, 2007), muestran que las especies con la mayor área de ocupación (AOO) son *E. texensis* y *E. horizonthalonius*, con 134,711.457 km² y 60,555.534 km², respectivamente. Por otra parte, las especies con menor AOO son *E. parryi* y *E. grusonii*, con 216.267 km² y 8 km², respectivamente. El cuadro 5 muestra las estimaciones del AOO y el índice de propinquidad mínima, así como los conglomerados y satélites detectados para cada especie.

Cuadro 5. AOO calculada con el Método Cartográfico por Conglomerados (CMC) para cada especie y variedades del género *Echinocactus*.

Especie	Índice de Propinquidad Media (km)	Conglomerados	Satélites	AOO total (km²)
<i>E. platyacanthus</i>	9.12	17	19	16,733
<i>E. horizontalonius</i> var. <i>hor.</i>	26.19	13	13	60,555
<i>E. horizontalonius</i> var. <i>nicholii</i>	11.21	1	1	12
<i>E. parryi</i>	10.16	3	0	216
<i>E. texensis</i>	66.04	3	5	134,711
<i>E. polycephalus</i> var. <i>pol.</i>	51.55	3	2	21,284
<i>E. polycephalus</i> var. <i>xer.</i>	17.22	4	4	2,413
<i>E. grusonii</i>	130.81	1	1	8

La figura 6 muestra el área de distribución de las especies del clado *Homalocephala*, así como las regiones geográficas donde se localizan. La distribución geográfica del clado *Homalocephala* abarca seis áreas geográficas, las regiones norte y este del Desierto Chihuahuense (D y E), las planicies de Tamaulipas y Texas (G), hasta los Desiertos Sonorense (F), Mojave (H) y Gran Cuenca (I), (Fig. 6).

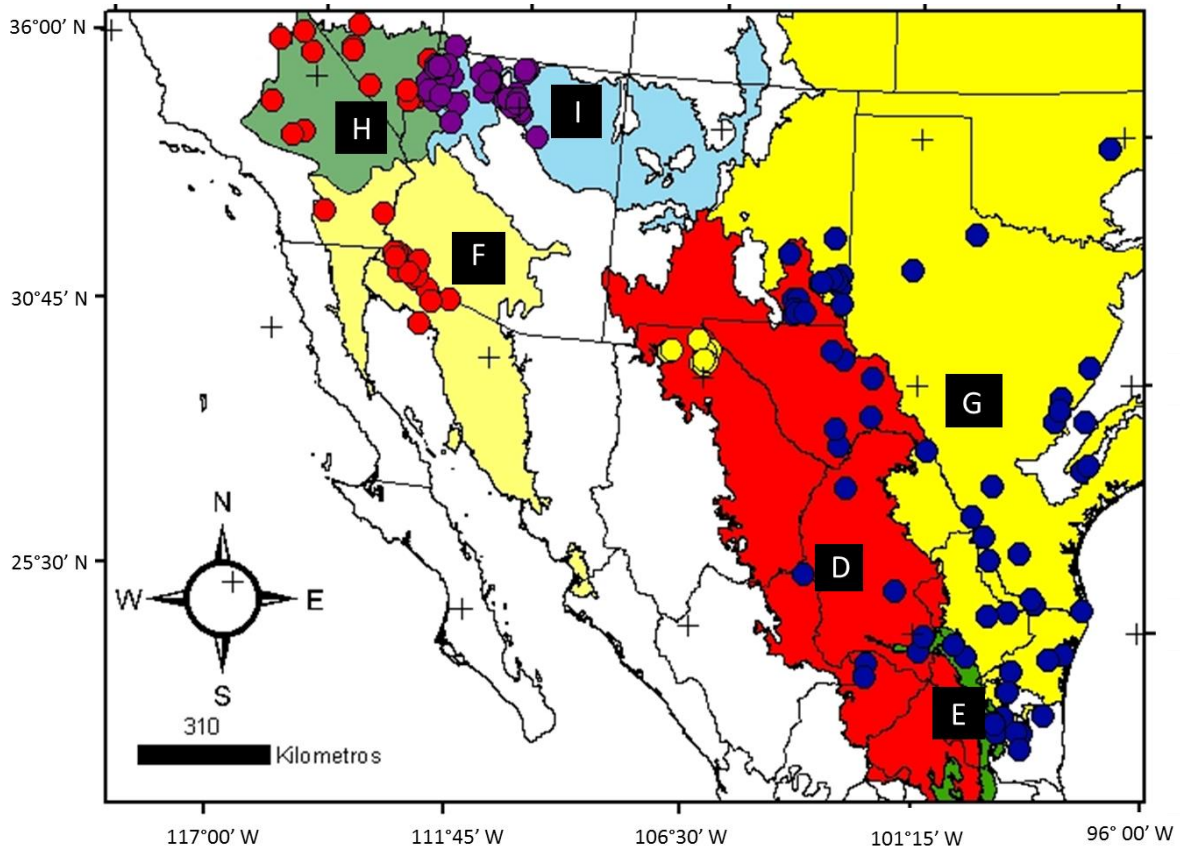


Figura 6. Distribución geográfica del clado *Homalocephala*. Los puntos azules representan las localidades georreferenciadas de los especímenes de herbario de *E. texensis*, los puntos amarillos las localidades de *E. parryi*, los puntos rojos y morados representan las localidades de *E. polycephalus* var. *polycephalus* y *E. polycephalus* var. *xeranthemoides*, respectivamente. Los polígonos de colores corresponden a las siguientes ecorregiones: D= región norte del Desierto Chihuahuense (rojo), E= región este del Desierto Chihuahuense (verde), F= Desierto Sonorense (amarillo claro), G= Grandes planicies de Tamaulipas-Texas (amarillo), H= Desierto de Mojave (verde olivo) I= Desierto de la Gran Cuenca (azul).

La figura 7 muestra el mapa de distribución del clado *Echinocactus* y de *E. grusonii*, así como sus respectivas áreas de distribución geográfica. La distribución del clado *Echinocactus* abarca porciones del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (A), las regiones meridional, central, norte y este del Desierto Chihuahuense (B, C, D y E) y el Desierto Sonorense (E), (Fig. 7). En el caso de *E. grusonii* su distribución se

restringe a dos regiones geográficas, la región meridional del Desierto Chihuahuense y el sur de la Sierra Madre Occidental (J).

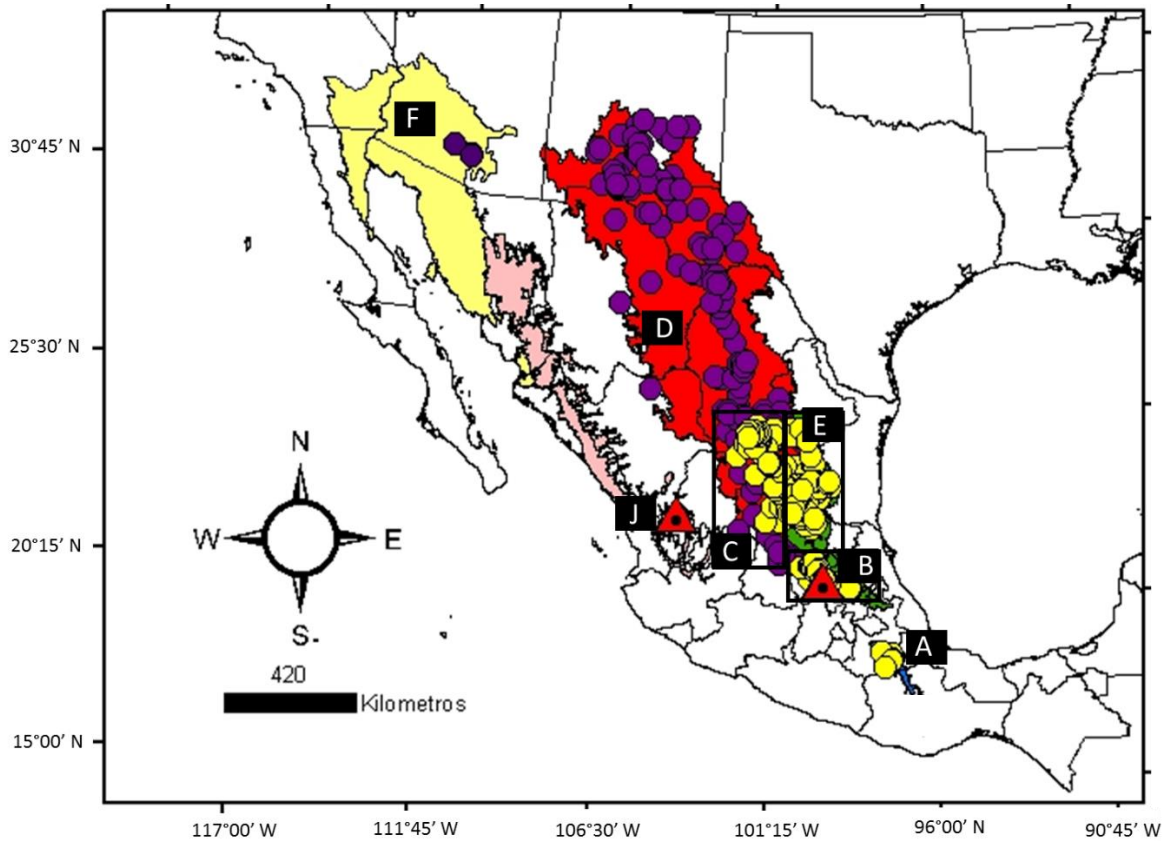


Figura 7. Distribución geográfica del clado *Echinocactus* y *E. grusonii*. Los puntos amarillos representan las localidades de *E. platyacanthus*, los morados de *E. horizontalonius* y los triángulos rojos con punto negro las localidades de *E. grusonii*. Los polígonos de colores y los de líneas negras corresponden a las siguientes regiones geográficas, A= Valle de Tehuacán-Cuicatlán (azul), B= región meridional del Desierto Chihuahuense (verde), C= región central del Desierto Chihuahuense (rojo), D= región norte del Desierto Chihuahuense (rojo), E= región este del Desierto Chihuahuense (verde), F= Desierto Sonorense (amarillo claro) y J sur de las colinas y cañones de Sonora y Sinaloa (rosa). Nota: los polígonos no reflejan los límites geográficos exactos de las regiones geográficas.

5.7 Tiempos de divergencia, reconstrucción de áreas de distribución ancestral y predicción de nicho ecológico

Las reconstrucciones filogenéticas realizadas en este estudio, demuestran que el clado *HEA* está integrado por tres grupos monofiléticos, correspondientes a tres géneros, *Astrophytum* integrado por cinco especies, *Echinocactus* por dos y *Homalocephala* por tres. Dentro de este clado, *Homalocephala* divergió primero de *Astrophytum-Echinocactus* hace aproximadamente 7.6 Ma. (Fig. 8). Posteriormente, el clado *Echinocactus* y el clado *Astrophytum* divergieron hace aproximadamente 7.1 Ma (Fig. 8).

Dentro del clado *Homalocephala* *E. texensis* divergió primero (4.5 Ma) y posteriormente se presentó la divergencia entre *E. parryi* y *E. polycephalus* hace aproximadamente 3.4 Ma. (Fig. 8). Los tiempos de divergencia estimados para las diferentes poblaciones de las especies del clado *Homalocephala* van de los 960,000 años en *E. polycephalus*, 770,000 en *E. texensis* y 490,000 en *E. parryi*.

El tiempo de divergencia estimado entre *E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius* (clado *Echinocactus*) es de aproximadamente 5.1 Ma (Fig. 8). Las poblaciones de *E. horizonthalonius* y *E. platyacanthus* divergieron hace aproximadamente 2.5 Ma y 2.2 Ma, respectivamente (Fig 8). En el caso de *E. horizonthalonius*, la prueba de reloj molecular indica que la población de Guanajuato (*E. horizonthalonius* var. *horizonthalonius* 1), divergió del clado conformado por el la población de Chihuahua (*E. horizonthalonius* var. *horizonthalonius* 1) y la población de Arizona (*E. horizonthalonius* var. *nicholii*) hace 2.5 Ma. Posteriormente, las poblaciones de Chihuahua y Arizona divergieron hace 1.6 Ma (Fig. 8).

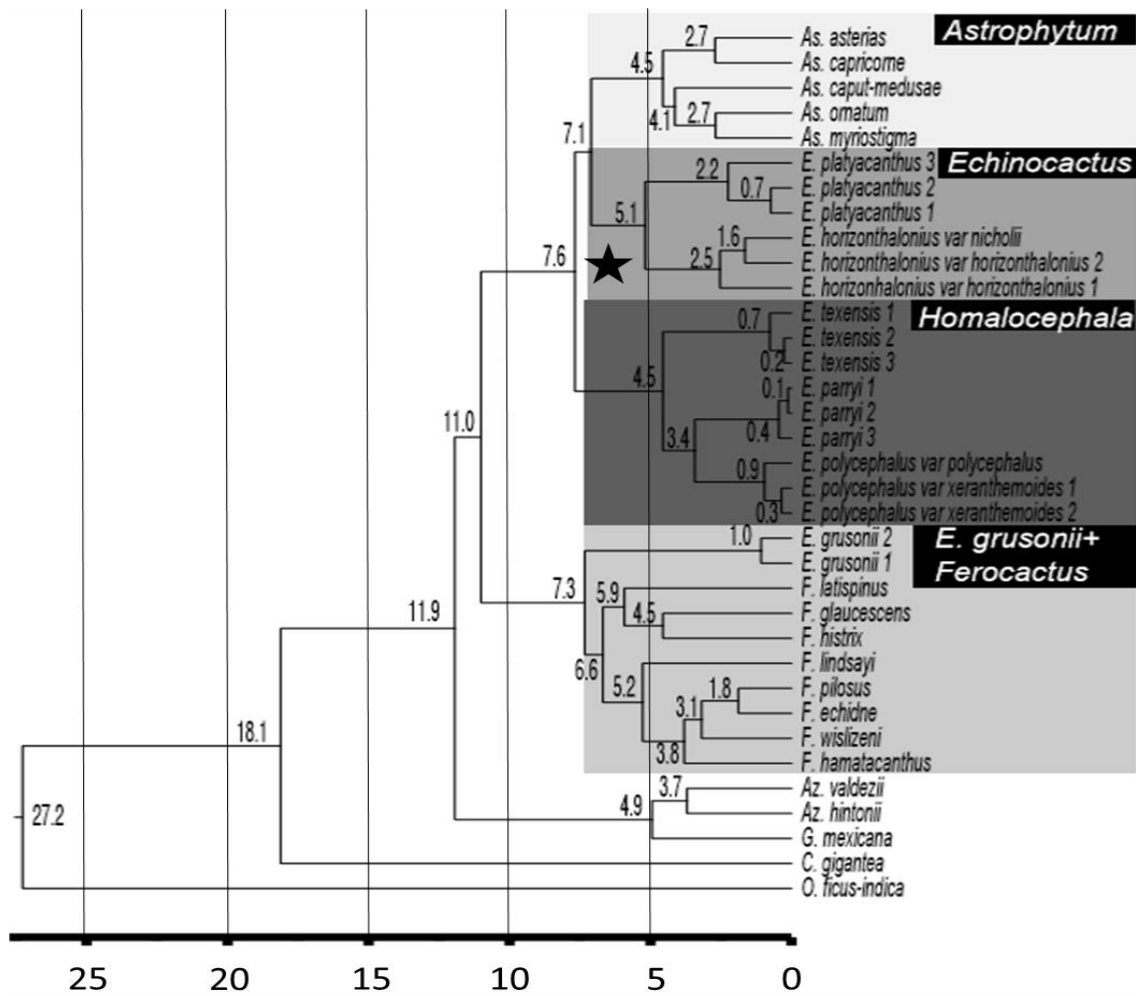


Figura 8. Tiempos de divergencia. Árbol filogenético y tiempos de divergencia obtenidos a partir de un análisis de reloj molecular relajado realizado con la matriz concatenada con los seis marcadores moleculares. La escala equivale a millones de años. Los clados resaltados corresponden a *E. grusonii-Ferocactus*, el clado *HEA* estrella negra y sus tres subclados *Astrophyllum*, *Echinocactus* y *Homalocephala*.

La reconstrucción de áreas ancestrales y los análisis de dispersión/vicarianza realizados con el programa RASP, sugieren que la distribución más probable del ancestro común del clado *HEA* era en las regiones este (E) y norte (D) del Desierto Chihuahuense, con una probabilidad de 0.61 pp y 0.91 pp, respectivamente (Fig. 9). Según estos resultados el ancestro común de este clado se distribuía en lo que hoy

es San Luis Potosí, Tamaulipas y las porciones sur de los estados de Coahuila y Nuevo León.

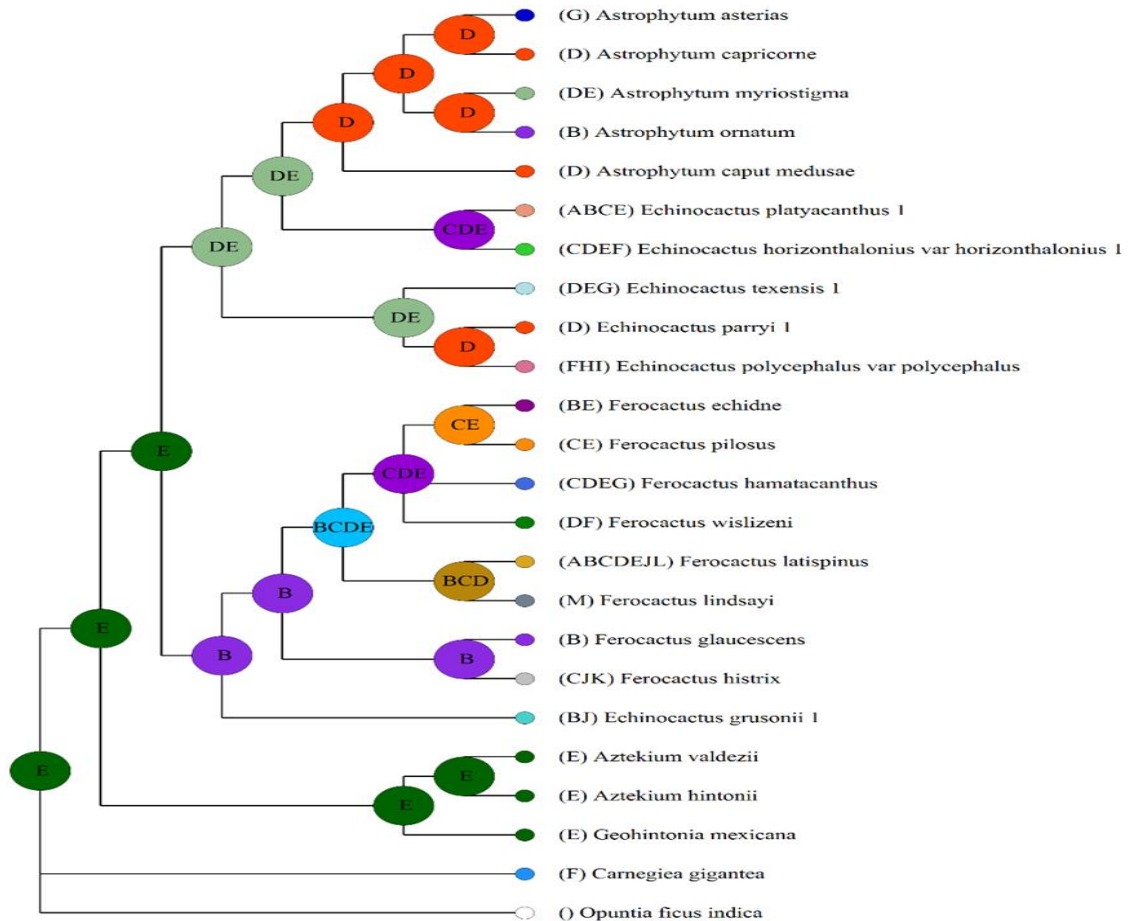


Figura 9. Reconstrucción de áreas ancestrales. Los círculos en los nodos indican cuales son las áreas de distribución más probables de cada ancestro hipotético. Las letras en los nodos y en las terminales representan las áreas de distribución asignadas y listadas en la cuadro 3.

Estas dos regiones biogeográficas también resultaron ser las áreas de distribución más probables para el ancestro común del clado *Homalocephala* con una probabilidad de 0.93 pp, para la región norte del Desierto Chihuahuense (D) y 0.57 pp, para la región este del mismo desierto (E) (Fig. 9). Posteriormente, el ancestro común de *Homalocephala* se dispersó en periodos interglaciares hasta

alcanzar los desiertos Sonorense, Mojave y Gran Cuenca. Eventos vicariantes asociados a eras glaciares promovieron la especiación en este clado, dando lugar por una parte a *E. texensis* y al ancestro común de *E. parryi* y *E. polycephalus*. La reconstrucción de áreas ancestrales determinó que la distribución más probable del ancestro común a estas dos últimas especies se distribuía en la región norte del Desierto Chihuahuense (D) (0.75 pp) y que a través de un evento de dispersión, colonizó los Desiertos Sonorense (F), Mojave (H) y Gran Cuenca (I) para posteriormente, a través de un evento de vicarianza dar origen a las dos especies actuales *E. parryi* y *E. polycephalus* (Fig. 9).

El resultado del análisis de reconstrucción de áreas ancestrales sugiere que las áreas de distribución más probables del ancestro común de los clados *Astrophytum* y *Echinocactus* (sin incluir a *Homalocephala*), también son las regiones este (E) y norte del Desierto Chihuahuense (D), con una probabilidad posterior de 0.61 y 0.92, respectivamente (Fig. 9). Mientras que el análisis sugiere que las áreas de distribución más probables del ancestro común del clado *Echinocactus* son las regiones este (0.93 pp), central (0.87 pp) y norte (0.80 pp) del Desierto Chihuahuense. Posteriormente, las especies de este clado se dispersaron hacia el norte alcanzando el Desierto Sonorense en el caso de *E. horizonthalonius* y hacia el sur alcanzando el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, en el caso de *E. platyacanthus*.

Los mapas de predicción de nicho ecológico a la última era interglaciar máxima (140,000-120,000 años atrás), muestran que tanto para *E. texensis*, como para *E. horizonthalonius* la barrera de las planicies de Deming ubicadas en los límites sureños de los estados de Arizona y Nuevo México presentaba hábitats con potencial de distribución geográfica para ambas especies. En el caso de *E. texensis* la predicción de nicho ecológico muestra que incluso la Meseta del Colorado presentaba condiciones ecológicas apropiadas para la distribución de esta especie. Las figuras 10 y 11 muestran los modelos de predicción de nicho a la última era interglaciar máxima de *E. texensis* y *E. horizonthalonius*, respectivamente.

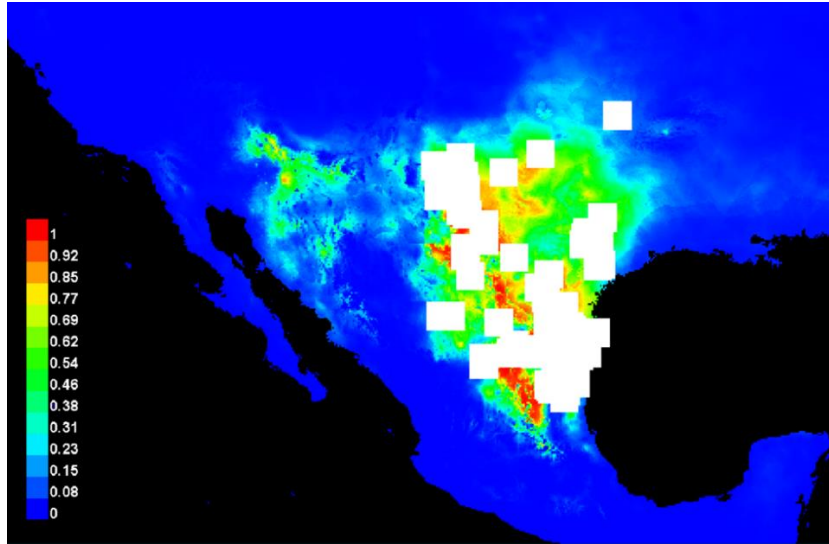


Figura 10. Predicción de nicho ecológico de *E. texensis* generado en Maxent. Los cuadros blancos indican puntos de distribución de *E. texensis* utilizados para generar el modelo de nicho ecológico. Los colores cálidos indican sitios con mayor probabilidad de distribución de *E. texensis* en la última era interglaciar.

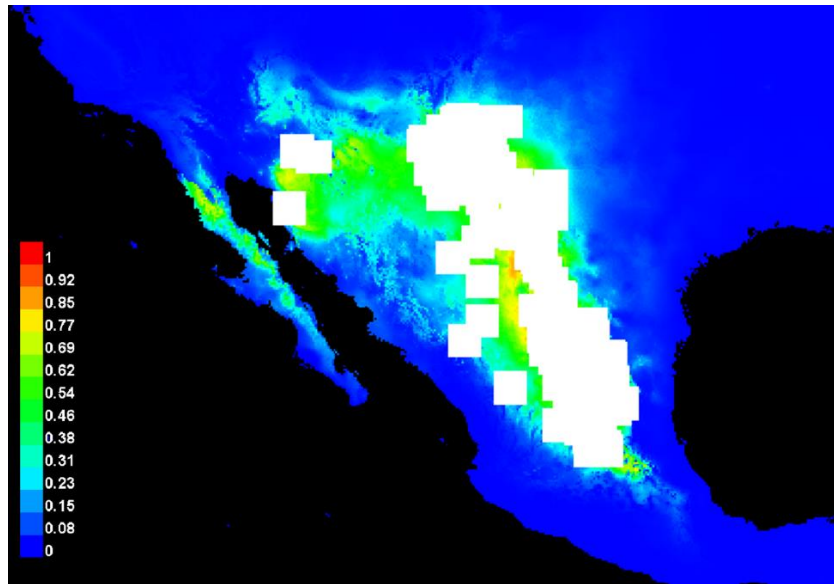


Figura 11. Predicción de nicho ecológico de *E. horizontalionius* generado en Maxent. Los cuadros blancos indican puntos de distribución de *E. horizontalionius* utilizados para generar el modelo de nicho ecológico. Los colores cálidos indican sitios con mayor probabilidad de distribución de *E. horizontalionius* en la última era interglaciar.

6. DISCUSIÓN

6.1 Utilidad filogenética de los genes nucleares *DODA* y *5GT*

La amplificación por PCR de ambos genes nucleares *DODA* y *5GT* fue inconsistente, debido a que la estandarización de las condiciones de PCR fue difícil de lograr incluso en repeticiones de experimentos que previamente habían resultado positivos. Esto puede deberse a que los primers diseñados por Felker et al. (2008) presentan poca afinidad y/o a que *DODA* y *5GT* presentan una sola o pocas copias (Small et al. 2004). Para evaluar la ortología de las secuencias de los genes nucleares, se siguió el procedimiento de Babineau et al. (2013), el cual consiste en revisar que los gels de electroforesis presenten una sola banda del mismo tamaño y asegurándose que los cromatogramas no presenten secuencias con nucleótidos con dos o más picos o señales. Además, las nuevas secuencias generadas en este estudio no presentaron problemas o ambigüedades cuando fueron alineadas con secuencias depositadas en el GenBank, lo cual sugiere que aun cuando estos genes llegasen a presentar más de una copia, se analizaron en este trabajo genes ortólogos. Otra evidencia que apoya esta suposición es la baja variabilidad genética encontrada en estos marcadores en individuos de diferentes poblaciones de especies de amplia distribución como *E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius* e incluso en diferentes especies del clado *HEA*.

Brockington et al. (2015) con base en la información genética contenida en secuencias de ADN de 100 especies de plantas pertenecientes a las Caryophyllales, determinaron la existencia de dos isoformas de *DODA*, la isoforma α y la isoforma β , como producto de un evento de duplicación. Las isoformas difieren en dos aminoácidos diagnóstico en las posiciones 183 y 227. Desafortunadamente, nuestras secuencias resultaron cortas, por lo cual la determinación de las isoformas fue imposible. No obstante, los análisis BLAST de nuestras secuencias de *DODA* confirmaron que estas son más similares a la isoforma α encontrada en el clado

integrado por dos especies de Cactaceae, *Lophophora williamsii* y *Pereskia aculeata*, así como miembros de otras familias de Caryophyllales (Brockington et al. 2015). Nuestras secuencias presentaron una similitud del 97% con la isoforma α de *DODA* de *L. williamsii* (GenBank KR376285) y sólo el 70% de similitud con la isoforma β de la misma especie.

La señal filogenética que presentan las secuencias de *DODA* y *5GT* es útil en la reconstrucción de relaciones evolutivas en el clado *HEA*. Las topologías obtenidas a partir de los análisis con los genes nucleares presentaron buena resolución filogenética y en general, son congruentes con los resultados obtenidos con las matrices cpDNA y de evidencia total. En este sentido, cabe señalar que la topología obtenida con la matriz cpDNA + morfología es idéntica a la topología obtenida con el análisis de la matriz de evidencia total, la cual incluyó a los genes nucleares. Por lo tanto, la inclusión de los datos del genoma de núcleo, no modifica la hipótesis evolutiva obtenida con la información del cloroplasto y la morfología. La única diferencia entre estos dos análisis, es que en los análisis de evidencia total algunos nodos presentaron valores de soporte más altos. La poca variabilidad genética de las secuencias de *DODA* puede ser útil para evaluar relaciones filogenéticas profundas, por ejemplo, a nivel tribu, contrario a las secuencias de *5GT*, las cuales presentan una tasa de evolución más rápida, que como se muestra en este estudio, contienen información filogenética con resolución a nivel específico e incluso a nivel infraespecífico. Todo esto muestra la importancia del estudio del genoma nuclear y en particular de estos genes relacionados a una ruta metabólica tan importante y característica de las Caryophyllales como lo es la síntesis de betalaínas. En este estudio se probó por primera vez la utilidad filogenética de dos genes inexplorados que pueden posteriormente ser estudiados con el fin de evaluar su impacto en la reconstrucción filogenética de las Caryophyllales.

6.2 *Echinocactus* polifilético

Así como en estudios previos (Wallace, 1995; Butterworth et al. 2002; Bárcenas et al. 2011), todos nuestros análisis recuperaron, con alto soporte, a *E. grusonii* como especie hermana a las especies de *Ferocactus*. Estos resultados apoyan la segregación de esta especie y apoyan parcialmente el reconocimiento del género monotípico *Kroenleinia* (Lodé, 2014). Aun cuando la optimización de caracteres morfológicos no ambigua no identificó caracteres sinapomórficos para el clado *E. grusonii-Ferocactus*, la optimización del tran muestra que las semillas pequeñas es una sinapomorfía. La optimización del tran identificó que la forma trulada de las escamas del tubo floral o receptáculo, es una sinapomorfía para el clado *E. grusonii-Ferocactus*. Posteriormente, la forma trulada cambió a una forma ovada en las especies de *Ferocactus* (Fig. 5). Esta tendencia evolutiva se presentó también en la forma de los segmentos internos del perianto donde la forma rómbica como en *E. grusonii* es plesiomórfica, cambiando después a una forma lanceolada en *Ferocactus* (Fig. 5). No obstante el epicótilo tuberculado es homoplásico, es importante señalar que tanto *E. grusonii* como la mayoría de las plántulas de *Ferocactus* presentan este tipo, excepto *F. hystrix*, la cual presenta un epicótilo acostillado, comparable al epicótilo presente en plántulas del clado HEA. Esta tendencia es igual para el número de espinas por areola en plántulas y en la forma del ápice de los cotiledones, ya que todas las especies del clado *E. grusonii-Ferocactus*, presentan de 9 a 12 espinas por areola y cotiledones con ápice agudo excepto *F. hystrix*, la cual presenta de 5 a 8 espinas por areola y cotiledones con ápice redondeado.

6.3 Clado HEA

La cercana relación evolutiva entre *Astrophytum* y el núcleo *Echinocactus* está bien documentada tanto por estudios moleculares (Wallace, 1995, Butterworth et al. 2002; Bárcenas et al. 2011; Hernández-Hernández et al. 2011; Vázquez-Lobo et al.

2015), como por estudios taxonómicos (Berger, 1929; Benson, 1982). En este estudio se recuperó un clado con alto soporte integrado por los subclados *Homalocephala*, *Echinocactus* y *Astrophytum* (clado *HEA*). Estos resultados sugieren que el clado *HEA* debe ser considerado una unidad filogenética bien conformada, que incluye biznagas norteamericanas y que ésta debe ser reconocida en la taxonomía de las Cactaceae. Los resultados sugieren que el clado *HEA* puede ser considerado una subtribu dentro de las Cactaceae. Quizá lo más parsimonioso sea incluir a *Astrophytum* a la subtribu Echinocactinae Britton & Rose., la cual en la propuesta de Buxbaum (1958) incluye a *Echinocactus* y *Homalocephala*.

Las especies del clado *HEA* se caracterizan principalmente por sus pericarpelos y paredes del fruto con presencia de escamas puntiagudas y tricomas que emergen de las axilas de dichas escamas, semillas grandes y una región hilo-micrópilo disyunta. Estos caracteres fueron identificados como sinapomorfías para este clado (Fig. 5). La optimización de caracteres del tran identificó que areolas con 1 a 4 espinas en plántulas es una sinapomorfía para el clado conformado por *Astrophytum* y *Echinocactus* pero no para el clado *Homalocephala*, en el cual, las plántulas presentan de 5 a 8 espinas, excepto en *E. polycephalus* subsp. *xeranthemoides*, la cual presenta de 9 a 12 espinas por areola (Fig. 5). A nivel molecular la optimización no ambigua determinó que los indels presentes en la IGS *atpB-rbcL* son sinapomorfías para este clado (Fig. 5).

Es notable que especies de la tribu Cactaceae que no presentan escamas puntiagudas ni tricomas en el pericarpelo y en la pared del fruto (ej. *Aztekium* spp., *Ferocactus* spp., *Geohintonia mexicana*, *Lophophora* spp., *Sclerocactus* Britton & Rose spp. y *Thelocactus* spp.), no han sido recuperadas dentro del clado *HEA* en ningún estudio filogenético a la fecha. En contraste, *E. grusonii* es la única especie de las Cactaceae que presenta estas características morfológicas y la cual, sin embargo, ha sido recuperada fuera del clado *HEA* (Wallace 1995; Butterworth et al.

2002; Bárcenas et al. 2011). Interesantemente, *E. grusonii* no presenta los indels en el IGS *atpB-rbcL*, sinapomórficos y hasta el momento diagnósticos del clado *HEA*.

6.4 Clado *Homalocephala*

Los análisis filogenéticos realizados en este estudio, apoyan fuertemente los resultados moleculares de Wallace (1995) y el estudio taxonómico de Ferguson (1992), quienes reconocen dos grupos en el núcleo *Echinocactus*, los clados *Homalocephala* y *Echinocactus*. Todos nuestros análisis recuperan a las dos subespecies de *E. polycephalus* dentro de *Homalocephala*, esto, contrapone a los resultados obtenidos por Bárcenas et al. (2011), en donde la única terminal de esta especie que se incluyó fue recuperada fuera del clado *HEA*. Por lo tanto, basados en nuestros análisis moleculares y morfológicos, consideramos que las dos subespecies de *E. polycephalus* deben ser incluidas en el género *Homalocephala*, así como Wallace (1995) y Ferguson (1992), lo propusieron en su momento.

Los análisis de MP con la matriz cpDNA, así como todos los análisis con *5GT* recuperaron dentro del clado *Homalocephala* a *E. parryi* como especie hermana a un clado con soporte moderado compuesto por *E. texensis* y *E. polycephalus*. Sin embargo, los análisis de ML y BA con la matriz cpDNA recuperan una politomía con alto soporte para estas tres especies (Fig. 2) y el análisis de evidencia total, contrariamente, recupera a *E. texensis* como especie hermana al clado compuesto por *E. polycephalus* y *E. parryi* (Fig. 5). Debido a que los análisis moleculares demuestran que *E. texensis* es hermana de *E. polycephalus*, pero el análisis de evidencia total, el cual incluye los caracteres morfológico, recuperó a *E. parryi* como la especie hermana a *E. polycephalus*, se considera necesario contar con más evidencia para esclarecer las relaciones dentro del clado *Homalocephala*. Algunos taxónomos han elevado el rango de *E. polycephalus* subsp. *xeranthemoides* a nivel de especie (Rydberg, 1917; Salywon & Hodgson, 2012). En el caso de Salywon & Hodgson (2012), con base en varios caracteres morfológicos

como el color y número de espinas, tamaño, color y orientación de las escamas del fruto, tamaño y ornamentación de la testa de la semilla, sin embargo, nuestros resultados, sutilmente apoyan esta propuesta, ya que estos dos taxa siempre fueron recuperados como hermanos, excepto en el análisis de MP con la matriz cpDNA + morfología (resultados no presentados), en donde fueron recuperadas sin resolución con las otras dos especies del clado *Homalocephala*. Además, la divergencia en las secuencias de ADN entre estas dos subespecies es casi nula, con sólo tres nucleótidos simples polimórficos (SNP) en todas las matrices analizadas. Sin embargo, dos de estos SNP's apoyan la distinción entre las dos subespecies.

La única sinapomorfía para el clado *Homalocephala* detectada por el análisis de optimización de caracteres no ambiguo fue la pubescencia de la epidermis abaxial de las escamas del pericarpelo (Figs. 5 y 30). Este estado de carácter posteriormente cambió a un estado glabro en *E. polycephalus* subsp. *xeranthemoides*, en la cual la epidermis es glabra (Fig. 5). No obstante, otros caracteres morfológicos dan soporte a la monofilia del clado *Homalocephala*, con respecto a sus parientes más cercanos, los clados *Echinocactus* y *Astrophytum*. Estos caracteres son: embriones campilótrpos, cotiledones conspicuos con ápice agudo, espinas con epidermis pubescente, 5-8 espinas por areola en plántulas, costillas agudas en estado juvenil y adulto, flores ligeramente tubulares, flores y frutos con escamas conspicuas y células de la testa con límites acanalados.

6.5 Clado *Echinocactus*

En todos los estudios filogenéticos previos, el clado *Echinocactus* ha sido recuperado con soporte que oscila de medio a alto (Wallace, 1995; Butterworth et al. 2002; Bárcenas et al. 2011; Hernández-Hernández et al. 2011; Vázquez-Lobo et al. 2015). Este clado fue recuperado con alto soporte en nuestros análisis conducidos con las matrices cpDNA + morfología (resultados no presentados) y

evidencia total (Fig. 5). Aun cuando los análisis de MP con la matriz cpDNA recuperaron a *Echinocactus* como monofilético, los valores de soporte fueron menores, e incluso los análisis de ML y BA con esta matriz recuperaron a *E. horizonthalonius* y *E. platyacanthus* en un clado sin resolución (con alto soporte) formando una politomía con *Astrophytum* (Fig. 2). Este resultado parcialmente apoya las propuestas de Ferguson (1992) y Doweld (2000), quienes propusieron excluir a *E. horizonthalonius* del género *Echinocactus* y crear uno nuevo para segregar a esta especie. Además, los análisis de optimización de caracteres identificaron que el epicótilo apicalmente tuberculado y la testa negra-grisácea son caracteres autapomórficos para *E. horizonthalonius*. Sin embargo, debido a que la mayoría de los análisis aquí desarrollados, así como los estudios previos recuperan la relación de especies hermanas entre *E. horizonthalonius* y *E. platyacanthus*, se sugiere mantener a *E. horizonthalonius* en el género *Echinocactus*, hasta que más evidencias demuestren lo contrario. La optimización de caracteres no ambigua muestra que los ápices redondos de los cotiledones es sinapomórfico para este clado (Figs. 5 y 16 C). Otros caracteres que dan soporte a la monofilia del clado son: embriones anátropos, una a cuatro espinas por areola en plántulas, costillas obtusas en estado juvenil y adulto, ápice del tallo cubiertos con tricomas, flores campanuladas, pericarpelos y paredes del fruto con escamas inconspicuas.

6.6 Implicaciones taxonómicas

Los resultados indican que el clado *Echinocactus* tiene una relación filogenética más cercana a *Astrophytum* que a *Homalocephala*. Lo anterior tiene soporte morfológico, ya que la forma cuadrangular del epicótilo y areolas con una a cuatro espinas por en plántulas son sinapomorfías para el clado *Astrophytum-Echinocactus* (Fig. 5). La optimización acctran muestra que el epicótilo de forma cuadrangular es el estado plesiomórfico y este posteriormente cambió a forma globosa en *E. horizonthalonius* y *A. asterias* (Zucc.) Lem. y en forma cilíndrica en *A. caput-medusae* (Velazco y Nevárez) D.R. Hunt (Fig. 5). La optimización deltran indica que la reducción de 1 a

4 espinas por areola en plántulas e individuos de un año es sinapomórfico para el clado. Aparentemente, el clado *Homalocephala* mantuvo caracteres plesiomórficos, tales como embriones campilótropos, cotiledones con ápice agudo y más espinas por areola en estado de plántula, comparado con *Astrophytum* y *Echinocactus*, en los cuales estos caracteres se modificaron y derivaron a embriones anátropos u ortótropos, cotiledones con ápice obtuso o redondo y plántulas con areolas que llevan menos espinas.

En este estudio se generaron nuevas combinaciones taxonómicas para reubicar a *E. polycephalus* y *E. parryi* en el género *Homalocephala*. Esta decisión se tomó con base en el reconocimiento de grupos que se consideran naturales ya que el seguir reconociendo a las especies del clado *Homalocephala* como *Echinocactus* nos arrojaría un grupo parafilético por no incluir a las especies de *Astrophytum*. Por otra parte, se pudieran reconocer a las especies de *Astrophytum* como *Echinocactus*; sin embargo, los caracteres morfológicos característicos de *Astrophytum*, como embriones ortótropos, los tricomas de la epidermis del tallo y las semillas en forma de sombrero, entre otros, delimitan claramente a este género. A continuación se presentan las nuevas combinaciones taxonómicas para las especies incluidas en el género *Homalocephala*.

Homalocephala parryi (Engelm.) Vargas & Bárcenas, **comb. nov.** *Echinocactus parryi* Engelm., Proc. Amer. Acad. Arts 3: 276. 1857. Tipo: unas cuantas espinas colectadas por el Dr. Parryi cerca del Lago Santa María, Chihuahua, aparentemente extraviadas (**lectotipo**, designado por Chamberland, Syst. Bot. 22: 310. 1997: lámina 32, figs. 6-7 de Engelm. en Rep. U.S. Mex. Bound., Bot. [Emory]).

Homalocephala polycephala (Engelm. & J.M. Bigelow) Vargas & Bárcenas **comb. nov.** *Echinocactus polycephalus* Engelm. & J.M. Bigelow, Proc. Amer. Acad. Arts 3: 276. 1857. Tipo: U.S.A., California, Mohave Valley, Bigelow s/n., 8 Mar 1854 (**lectotipo**, designado por Chamberland, Syst. Bot. 22: 311. 1997: MO 2017480).

Homalocephala polycephala* subsp. *xeranthemoides (J.M. Coult.) Vargas & Bárcenas, **comb. nov.** *Echinocactus polycephalus* Engelm. & J.M. Bigelow subsp. *xeranthemoides* (J.M. Coult.) N.P. Taylor, Contr. U.S. Natl. Herb. 3(7): 358. 1896. Tipo: U.S.A., Arizona, cerca del Río Colorado, Siler *s/n.*, Nov., 1881 (**lectotipo**, designado por Benson, Cacti U.S. Canada, 951. 1982: MO 106798 [excluding packet labeled "Siler, 1882"]).

6.7 Evolución de caracteres morfológicos en *Homalocephala* y *Echinocactus*

De los 87 caracteres morfológicos a continuación se discute la evolución de los caracteres que presentaron tendencias evolutivas claras.

6.7.1 Embriones

La forma de los embriones en el *clado HEA* parece seguir una tendencia hacia reducir la curvatura. Por ejemplo, en el grupo externo funcional *Opuntia ficus-indica*, los embriones son tipo campilótropo (curvos), similares a los embriones del *clado Homalocephala*, aparentemente el grupo más primitivo del *clado HEA*. Parece que los embriones en grupos más recientes disminuyeron su curvatura, como en los *clados Echinocactus*: anátropos (poco curvos) y *Astrophytum* ortótropos: (sin curvatura). No obstante, la reconstrucción de caracteres ancestrales muestra que lo más parsimonioso es que el embrión anátropo es plesiomórfico para el *clado HEA*. Posteriormente, en *Homalocephala* apareció el estado campilótropo y en *Astrophytum* el estado ortótropo.

6.7.2 Plántulas

Nuestro análisis de reconstrucción de caracteres ancestrales infirió que la forma aguda en los ápices de los cotiledones es el estado plesiomórfico. En el *clado E. grusonii-Ferocactus*, todas las especies presentan este estado de carácter, excepto *F. hystrix* la cual presenta ápices redondos. La reconstrucción de caracteres ancestrales también determinó que los ápices agudos son plesiomórficos para el *clado HEA*. Posteriormente, los ápices agudos evolucionaron a formas más

reducidas como ápices obtusos en la mayoría de las especies del clado *Astrophytum* y a ápices redondos en el clado *Echinocactus*. La optimización de caracteres del tran determinó que cotiledones con ápices redondos es un carácter sinapomórfico para el clado *Echinocactus*. Las observaciones realizadas durante los primeros dos años del desarrollo de plántulas-juveniles nos permitió determinar que en las plántulas que presentan cotiledones con ápices obtusos o redondos (ej. clados *Astrophytum* y *Echinocactus*), estos rápidamente se vuelven inconspicuos, contrario a las plántulas con cotiledones de ápices agudos (ej. *Homalocephala*), en las cuales los cotiledones permanecen visibles hasta el primer año de edad.

La reconstrucción de caracteres ancestrales identificó que en la tribu Cacteeae las areolas que presentan de 9 a 12 espinas en plántulas, son plesiomórficas. Este carácter está presente en la mayoría de las plántulas de las especies del clado *E. grusonii-Ferocactus*, excepto en *F. hystrix* y *F. latispinus* las cuales presentan de 5 a 8 espinas por areola. Desafortunadamente, la reconstrucción no pudo determinar el carácter ancestral para el clado *HEA*; sin embargo, sí pudo determinar que para *Homalocephala* el carácter plesiomórfico es areolas con 5 a 8 espinas y posteriormente este carácter evolucionó en *E. polycephalus* var. *xeranthemoides* que presenta 9 a 12 espinas por areola. Para el clado integrado por *Echinocactus* y *Astrophytum* el estado de carácter plesiomórfico es de 1 a 4 espinas por areola. La optimización del tran determinó que las areolas de 1 a 4 espinas es un carácter sinapomórfico para este clado.

Dentro de las especies de Cacteeae analizadas, pudimos determinar tres tipos de epicótilo. Para el clado *E. grusonii-Ferocactus* nuestros análisis indican que el carácter plesiomórfico es un epicótilo con tubérculos, contrario al epicótilo con costillas, el cual es plesiomórfico para el clado *HEA*. En este último clado todas las especies presentan epicótilos con costillas al primer año de edad, excepto *E. horizonthalonius*, la cual presenta un epicótilo con tubérculos sólo en la parte apical siendo este, un estado autapomórfico para esta especie.

6.7.3 Adultos

El tipo de crecimiento simple resultó el carácter plesiomórfico para la tribu Cacteeae, así como para los clados *E. grusonii*-*Ferocactus* y *HEA*. Dentro del clado *Homalocephala* la reconstrucción de caracteres ancestrales indica que el carácter plesiomórfico sigue siendo un crecimiento simple como en *E. texensis*, el cual después evolucionó a un estado cespitoso en *E. parryi* y *E. polycephalus*. Al analizar la distribución geográfica de las especies del clado *Homalocephala* (Figura 6) se observa un patrón sureste-noroeste, en donde la especie que se distribuye más al sureste del Desierto Chihuahuense (*E. texensis*) presenta sólo crecimiento simple, la especie que se distribuye en el norte del Desierto Chihuahuense (*E. parryi*), rara vez presenta crecimiento cespitoso, hasta la especie que se distribuye más al noroeste en los desiertos Sonorense, Mojave y Gran Cuenca (*E. polycephalus*), la cual presenta regularmente crecimiento cespitoso.

El color verde claro del tallo es autapomórfico para *E. grusonii*. El resto de las especies analizadas presentan tallos de color verde glauco. La presencia de tricomas en el ápice del tallo es una de las características que Hunt et al. (2006) utilizaron para reconocer taxonómicamente a *Echinocactus*. Nuestras observaciones en campo, la revisión de especímenes de herbario y las descripciones en la literatura muestran que en nuestro grupo de estudio existen especies con ápices glabros (ej. clado *Astrophytum*, excepto *A. asterias*), especies con ápices ligeramente cubiertos por tricomas (ej. clado *Homalocephala*) y especies con ápices densamente cubiertos por tricomas (ej. clado *Echinocactus* y *E. grusonii*). La reconstrucción de caracteres ancestrales muestra que el estado de carácter glabro es plesiomórfico y que los ápices densamente cubiertos por tricomas “pseudocefalio” surgieron independientemente en una convergencia evolutiva en *E. grusonii* y en el clado *Echinocactus*.

En nuestro grupo de estudio se presentan dos tipos de costillas, agudas y obtusas. En el clado *HEA* el estado de carácter agudo es plesiomórfico, el cual

posteriormente evolucionó a estado obtuso independientemente en el clado *Echinocactus* y en *A. asterias*. Este carácter es uno de los que apoya el reconocimiento de dos clados independientes dentro de *Echinocactus* como Ferguson (1992) lo propuso: las especies del clado *Echinocactus* caracterizadas por costillas obtusas, mientras que las especies del clado *Homalocephala* presentan costillas agudas.

La epidermis de las espinas en nuestro grupo de estudio incluyendo los grupos externos puede presentar dos estados de carácter, glabro o pubescente. Nuestros datos muestran que el estado glabro es plesiomórfico en la tribu Cacteeae, como en el clado *HEA*. La pubescencia en la superficie de las espinas es un carácter compartido en el clado *Homalocephala*, en este grupo, este carácter evolucionó nuevamente a un estado glabro en *E. polycephalus* var. *xeranthemoides*. Fuera de *Homalocephala* la única especie del clado *HEA* que presenta espinas pubescentes es *A. capricorne*, sin embargo, esta especie es polimórfica ya que la mayoría de las espinas observadas son glabras.

Las areolas floríferas de nuestro grupo de estudio presentan tricomas que pueden ser pequeños, sin cubrir todo el tubo receptácular o pueden ser grandes, los cuales cubren todo el tubo receptácular. El carácter plesiomórfico del clado *HEA* es areolas floríferas con tricomas pequeños, el cual evolucionó a tricomas grandes en el clado *Echinocactus*. Las areolas floríferas con tricomas grandes es un carácter homoplásico ya que también *E. grusonii* presenta este estado de carácter.

Según Hunt et al. (2006) la forma de la flor en *Echinocactus* presenta dos estados de carácter, campanulada o cortamente infundibuliforme. Siguiendo las descripciones de formas tridimensionales de Eggli (1993), nosotros determinamos también dos estados, campanulado y ligeramente tubular. Este carácter en nuestra filogenia resultó altamente homoplásico. La reconstrucción de caracteres ancestrales no pudo determinar el estado plesiomórfico para el clado *HEA*, no obstante, el análisis sí pudo determinar que para el clado *Homalocephala* el estado

plesiomórfico son flores de forma tubular, contrario al clado *Echinocactus*, donde el estado plesiomórfico son flores de forma campanulada.

Los resultados moleculares de Bárcenas et al. (2011), muestran que el clado *Aztekium-Geohintonia* es hermano al clado *HEA*, contrario a esto, nuestros resultados muestran que el clado *Aztekium-Geohintonia* es el grupo hermano al resto de las especies de la tribu Cacteeae y que los clados *E. grusonii-Ferocactus* y *HEA* son hermanos (ver figuras 4 y 7). A nivel morfológico la presencia de escamas en el pericarpelo da soporte a la última hipótesis. La reconstrucción de caracteres ancestrales muestra que en la tribu Cacteeae el pericarpelo con presencia de estructuras accesorias (espinas y/o escamas) es plesiomórfico y que en el clado *Aztekium-Geohintonia* se perdieron dichas estructuras, lo que derivó en un pericarpelo desnudo.

La presencia de tricomas en las areolas del pericarpelo y en la pared del fruto son caracteres diagnósticos para las especies de *Echinocactus* (Hunt et al. 2006). El resultado del análisis de reconstrucción de caracteres ancestrales indica que la presencia de tricomas en las areolas del pericarpelo y pared del fruto son los estados plesiomórficos en la tribu Cacteeae. Estos estados de carácter se mantuvieron en todas las especies del clado *HEA*. En el clado *E. grusonii-Ferocactus*, *E. grusonii* mantuvo el estado plesiomórfico, el cual derivó en la pérdida de los tricomas en las especies de *Ferocactus*.

En este estudio determinamos dos formas de escamas en el pericarpelo y en la pared del fruto, la forma semicircular presente en todas las especies de *Ferocactus* y en *Carnegiea gigantea* y la forma filiforme a linear triangular presente en todo el clado *HEA* y en *E. grusonii*. Desafortunadamente, el análisis de reconstrucción de caracteres no pudo determinar el estado plesiomórfico de la tribu Cacteeae, ni para el clado *E. grusonii-Ferocactus*. Este resultado limita formular una hipótesis acerca de la tendencia evolutiva en la forma de la escamas del pericarpelo

y de la pared del fruto. La optimización deltran identificó que el estado de carácter escama filiforme a linear triangular es homoplásico entre el clado *HEA* y *E. grusonii*.

Los segmentos externos del perianto presentan una gran variedad de formas, desde obovada como en *Carnegiea gigantea*, oblanceolada en el clado *HEA*, excepto *E. platyacanthus*, hasta ligeramente elíptica y lanceolada en el clado *E. grusonii-Ferocactus*. El estado de carácter oblanceolado es plesiomórfico para las Cacteeae. Este estado se mantuvo en todas las especies del clado *HEA*, excepto en *E. platyacanthus*, donde la forma oblonga es un estado autapomórfico. Para el clado *E. grusonii-Ferocactus* la forma ligeramente elíptica es el estado plesiomórfico (ej. *E. grusonii*), el cual derivó en una forma lanceolada en especies como *F. latispinus* y *F. pilosus*. Al igual que los segmentos externos del perianto, los internos también presentan gran diversidad de formas. La forma oblanceolada es un estado plesiomórfico en el clado *HEA*, el cual se ha mantenido en todas las especies que integran este clado. Según la optimización de caracteres deltran, la forma ligeramente elíptica de los segmentos externos del perianto y la forma ligeramente romboide de los segmentos internos del perianto son autapomórficos para *E. grusonii*. Es interesante que la forma de los segmentos internos del perianto en *E. grusonii* es única entre las especies analizadas. Esto es un carácter morfológico que apoya la propuesta de Lodé (2013) de reconocer al género monotípico *Kroenleinia* para incluir a *E. grusonii*, ya que este carácter es diferente a todas las especies de *Ferocactus* aquí estudiadas.

La reconstrucción de caracteres ancestrales determinó que el fruto seco es el estado plesiomórfico de la tribu Cacteeae. Posteriormente en algunas especies del clado *E. grusonii-Ferocactus* como *F. hystrix*, *F. hamatacanthus* y *F. wislizeni* el fruto evolucionó al tipo suculento. También en el clado *HEA* el estado plesiomórfico es el fruto seco, el cual evolucionó al tipo suculento en *E. texensis*. Igual que la forma de crecimiento, este carácter presenta el mismo patrón sureste-noroeste, en donde la especie que se distribuye más al sureste (*E. texensis*) presenta frutos carnosos y

suculentos, a diferencia de las especies que se distribuyen al noroeste (*E. parryi* y *E. polycephalus*), las cuales presentan frutos secos. La optimización no ambigua de caracteres determinó que el fruto seco es un carácter sinapomórfico para la tribu Cacteeae.

6.7.4 Semillas

La optimización del tran determinó que las semillas de tamaño pequeño (0.9-1.1 mm) es sinapomórfico para el clado *E. grusonii-Ferocactus* y las semillas de tamaño grande (2.0-2.9) lo es para el clado *HEA*. Lamentablemente, la reconstrucción de caracteres ancestrales no pudo determinar el carácter plesiomórfico para la tribu Cacteeae, lo cual limita generar una hipótesis sobre la tendencia evolutiva de este carácter en este clado. Todas las especies del clado *HEA* presentan semillas de tamaño grande y sólo en ciertas ocasiones *Echinocactus texensis* presenta semillas de categoría muy grande. Las categorías de tamaño fueron codificadas siguiendo las descripciones de semillas de la tribu Cacteeae de Barthlott y Hunt (2000), (ver apéndice 2).

El color de la testa es un carácter difícil de evaluar ya que se sabe que este depende del estado de madurez de la semilla (Barthlott y Hunt, 2000). Sin embargo, nuestras observaciones del color de la testa no presentaron variaciones considerables en semillas de la misma especie colectadas recientemente y semillas de ejemplares de herbario colectados varias décadas atrás. Es interesante resaltar que las especies del clado *HEA* están caracterizadas por semillas con testa de color negro a negro-pardo, excepto *E. horizonthalonius* la cual presenta como carácter autapomórfico una testa de color negro-grisáceo. En Contraste con el clado *HEA*, *E. grusonii* presenta una testa de color pardo-rojizo presente en especies de otros clados, como por ejemplo, *Aztekium* spp.

La ausencia de quilla en las semillas de las Cacteeae es el carácter plesiomórfico, el cual derivó a semillas con quilla en el clado *HEA*. Dentro de este clado, *E. platyacanthus* perdió la quilla siendo la única especie dentro de este clado

con semillas sin quilla. En nuestro estudio pudimos determinar tres tipos de relieve en los límites de las células de la testa (relieve de las paredes anticlinales), el relieve inconspicuo presente en semillas de algunas especies de *Ferocactus* como *F. lindsayi*, *F. pilosus* y *F. hamatacanthus*, el relieve acanalado como en la mayoría de las especies del clado *HEA*, excepto en el clado *Echinocactus* y en *A. asterias*, en las cuales el relieve es elevado. La reconstrucción de caracteres ancestrales muestra que un relieve acanalado es el carácter plesiomórfico del clado *HEA*, el cual derivó a relieve elevado en el clado *Echinocactus* y en *A. asterias*. Con respecto al relieve de las paredes periclinales cuatro estados están presentes en nuestro grupo de estudio. Existen especies con semillas que presentan un relieve convexo (testa verrugosa) como *E. parryi*, *E. polycephalus* y *E. horizonthalonius*, otras con semillas con relieve parcialmente convexo (testa ligeramente verrugosa) como el resto de las especies del clado *HEA*, otras con semillas con relieve cóncavo (testa porosa) como *Opuntia ficus-indica* y otras con relieve parcialmente cóncavo (testa ligeramente porosa) como *Ferocactus hamatacanthus*. El microrelieve de las células de la testa puede presentar tres estados de carácter, glabro como en la mayoría de las especies del clado *HEA*, excepto *E. horizonthalonius* y *A. asterias* las cuales presentan un microrrelieve verrugoso. El tercer estado de carácter del microrelieve de las células de la testa es el estriado presente sólo en el clado *Aztekium-Geohintonia*. Llama la atención las convergencias morfológicas en los caracteres relieve anticlinal y microrelieve de las células de la testa de las semillas entre *A. asterias* y *E. horizonthalonius*. Estas dos especies comparten otras similitudes morfológicas aparte de la ultraestructura de las células de la testa como el tallo depresso y la presencia generalmente de ocho costillas.

Según Barthlott & Hunt (2000), la configuración de la región hilo-micrópilo en las Cactoideae puede presentar tres estados disyunto, conjunto y conjunto pero separado por una región esclerificada. Las especies analizadas presentaron dos estados, el estado disyunto, característico de todas las especies del clado *HEA* y el

estado conjunto separado por una región esclerificada, presente en el resto de las especies de Cactoideae analizadas. Las optimizaciones de caracteres acctran y deltran determinaron que una configuración disyunta de la región hilo-micrópilo es un carácter sinapomórfico del clado *HEA* (Fig. 5). Aun cuando la distinción entre los estados conjunto y conjunto separado por tejido esclerificado es ambigua, es evidente que en nuestro grupo de estudio hay especies que presentan semillas con una distancia mayor entre el hilo y el micrópilo (ej. clado *HEA*), que otras (ej. clado *E. grusonii-Ferocactus*). Por lo tanto, es recomendable para estudios morfológicos posteriores medir la distancia entre el hilo y el micrópilo en semillas de individuos de diferentes poblaciones de cada especie y bajo una aproximación estadística determinar si existen grupos discretos y si estos coinciden con las categorías propuestas aquí.

6.8 Biogeografía histórica de los clados *Homalocephala* y *Echinocactus*

Se estima que el origen de la tribu Cacteeae fue hace aproximadamente 15.27 Ma (Hernández-Hernández et al. 2014). Los resultados de Vázquez-Sánchez et al. (2013) sugieren que el ancestro común de la tribu presentaba un área de distribución en la región de la Sierra Madre Oriental y que posteriormente diferentes linajes se dispersaron a otras áreas geográficas como El Desierto Chihuahuense, donde alcanzaron su máxima diversificación durante la época Mioceno-Pleistoceno. Los resultados de Vázquez-Sánchez et al. (2013) sugieren que en el núcleo de las Cacteeae han existido por lo menos cinco eventos de dispersión del Desierto Chihuahuense hacia otras áreas geográficas como los desiertos Sonorense, Mojave, Gran Cuenca, El Valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre otras. La región a la que Vázquez-Sánchez et al. (2013) sugieren como centro de origen de las Cacteeae (Sierra Madre Oriental), nosotros la consideramos como la subregión este del Desierto Chihuahuense (Hernández et al. 2004). Esto con base a que los mismos autores (ej. Vázquez-Sánchez et al. 2013), mencionan esta área corresponde

básicamente a valles del Desierto Chihuahuense enclavados en La Sierra Madre Oriental.

La subregión este del Desierto Chihuahuense, está conformada por valles semiáridos como, Aramberri y Rayones en Nuevo León y Jaumave y Tula en Tamaulipas, México. Esta subregión está caracterizada por la presencia de varias especies de Cactaceae endémicas e incluso géneros endémicos como *Obregonia* (Hernández et al. 2004). Con respecto a especies del clado *HEA*, en esta subregión convergen las distribuciones geográficas de una especie del clado *Homalocephala* (*E. texensis*), las dos especies del clado *Echinocactus* (*E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius*) y dos especies de *Astrophytum* (*A. asterias* y *A. myriostigma*).

Los resultados de Vázquez-Sánchez et al (2013) son congruentes con los obtenidos en este estudio, ya que nuestra reconstrucción de áreas de distribución ancestral estimó que las regiones más probables para los ancestros comunes de los clados *HEA*, *Homalocephala* y *Echinocactus* son las subregiones central, este y norte del Desierto chihuahuense. Nuestras estimaciones sobre el origen del clado *HEA* “stem group age” (11 Ma) coinciden con los 11.5 Ma calculados por Hernández-Hernández et al. (2014) y difieren de los 9.3 Ma calculados por Vázquez-Lobo et al. (2015). Con respecto al tiempo de divergencia dentro del clado *HEA* “crown group age”, nuestros resultados (7.6 Ma) coinciden con los 7.3 Ma estimados por Vázquez-Lobo et al. (2015) y con los rangos estimados por Hernández-Hernández et al. (2014). Vázquez-Lobo et al. (2015), recuperaron a *Echinocactus* como monofilético y estimaron que el tiempo de divergencia entre *Homalocephala* y *Echinocactus* fue hace aproximadamente 2.9 Ma. Dentro de *Echinocactus* la divergencia estimada entre *E. horizonthalonius* y *E. platyacanthus* fue de 0.9 Ma. Sin embargo, la filogenia de estos autores sólo incluyó tres especies de *Echinocactus*, por lo que no tiene sentido comparar nuestras estimaciones de los tiempos de divergencia para los clados *Homalocephala* y *Echinocactus* con los de estos autores. Nuestros resultados sugieren que dentro del clado *Homalocephala*,

E. texensis divergió hace 4.5 Ma y que posteriormente *E. parryi* y *E. polycephalus* divergieron hace aproximadamente 3.4 Ma. Dentro del clado *Echinocactus* nuestra inferencia para la divergencia entre *E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius* fue de 5.1 Ma.

Los eventos climáticos asociados a procesos de dispersión y vicarianza del clado *Homalocephala* son cambios en los periodos pluviales y con ello, cambios en las composiciones bióticas de los desiertos de Norteamérica y la aparición o desaparición de ríos y paleolagos. Al observar la distribución geográfica de las especies del clado *Homalocephala*, podemos observar que los límites de distribución de las especies coinciden claramente con barreras geográficas que subdividen al Desierto Chihuahuense y con la barrera biogeográfica denominada planicies de Deming, la cual divide al desierto Chihuahuense del Sonorense. Dependiendo del periodo climático, estas barreras estuvieron “abiertas” (periodos interpluviales), permitiendo el contacto entre las biotas de diferentes subregiones del Desierto Chihuahuense e incluso de este con el Sonorense, o cerradas (periodos pluviales) evitando la dispersión de las especies entre estas áreas geográficas (Hafner & Riddle, 2011).

Bajo este escenario, *Homalocephala* divergió durante la era del Mioceno, hace aproximadamente (7.6 Ma) de un ancestro común al clado *HEA*, el cual se distribuía en la subregión este del Desierto Chihuahuense. Posteriormente, el ancestro común de *Homalocephala* a través de eventos de dispersión alcanzó una muy amplia distribución, a través de las planicies de Texas-Tamaulipas, la subregión norte del Desierto Chihuahuense, los desiertos Sonorense, Mojave y hasta El Desierto de la Gran Cuenca. Posiblemente esta amplia distribución haya sido fomentada por la presencia de frutos suculentos, como los de *E. texensis*, los cuales son atractivos para animales dispersores de semillas. El modelo de nicho ecológico a la última era interglaciar de *E. texensis* sugiere que el ancestro de *Homalocephala* se dispersó del Desierto Chihuahuense al Sonorense a través de las planicies de

Deming y de ahí se dispersó a los desiertos de Mojave y la Gran Cuenca. Posteriormente la aparición de ríos y paleolagos en la subregión Chihuahuense del Desierto Chihuahuense (Hafner & Riddle, 2011), aislaron una población periférica, la cual a través de una especiación peripátrida dio origen al ancestro común de *E. parryi* y *E. polycephalus*. Este último ancestro logró dispersarse primero al Desierto Sonorense cruzando las planicies de Deming durante un periodo interpluvial. Finalmente, durante un periodo pluvial las planicies de Deming separaron en un evento vicariante a las poblaciones del Desierto Chihuahuense y Sonorense de este ancestro, generando la especiación en *E. parryi* y *E. polycephalus*.

Existen evidencias paleoclimáticas que apoyan el posible impacto que tuvieron paleolagos como El Lago King localizado en la cuenca cerrada de Trans-Pecos, al este de El Paso Texas (Wilkins & Currey, 1997) sobre el posible aislamiento de una población periférica del ancestro del clado *Homalocephala*, lo cual promovió la especiación peripátrida del ancestro de *E. parryi* y *E. polycephalus*. Actualmente, las poblaciones de *E. texensis* de Texas y Nuevo México están separadas de las poblaciones de *E. parryi* justo por la cuenca de Trans-Pecos, lugar donde se encontraba el Lago King (Wilkins & Currey, 1997). Otro patrón geográfico influenciado por la presencia de paleolagos es la distribución actual de las poblaciones de *E. parryi*, las cuales muy posiblemente hayan sido moldeadas por la presencia del Lago Cabeza de Vaca durante el Pleistoceno, este lago, cuando presentó su máxima extensión, llegó a ocupar hasta 26, 000 km² en porciones de Chihuahua, Texas y Nuevo México (Rosenthal & Forstner, 2014).

Después de la divergencia de *Homalocephala* del clado *HEA*, se presentó la divergencia entre los clados *Echinocactus* y *Astrophytum* hace aproximadamente 7.1 Ma. Nuestras estimaciones son congruentes con los (7.3 Ma) publicados por Vázquez-Lobo et al. (2015) y están dentro del rango (13.6-5.5 Ma) estimado por Hernández-Hernández et al. (2014). Nuestros resultados sugieren que el ancestro común del clado *Echinocactus* se distribuía en las subregiones este y central del

Desierto Chihuahuense. Lo anterior difiere sutilmente de los resultados publicados por Vázquez-Lobo et al. (2015), quienes estimaron que el ancestro común de este clado probablemente se distribuía en la subregión meridional, central y norte del Desierto Chihuahuense, sin embargo, los autores no incluyeron a todas las especies del clado *HEA*. Los resultados sugieren que posteriormente a la divergencia entre *E. horizonthalonius* y *E. platyacanthus*, la primera se dispersó hace aproximadamente 2.5 Ma hacia la subregión norte del Desierto Chihuahuense, hasta alcanzar a través de las Planicies de Deming la porción este del Desierto Sonorense; y la segunda se dispersó hace aproximadamente 2.2 Ma hacia el sur hasta alcanzar el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Figueroa (2015), realizó un estudio fitogeográfico utilizando microsatelites como marcadores moleculares de las poblaciones de *E. platyacanthus*. La autora encontró un patrón biogeográfico similar a nuestros resultados, reportando dos grandes “megapoblaciones”, una población sureña, compuesta por poblaciones de Puebla y Oaxaca en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y poblaciones de la Región Árida Queretano-Hidalguense, compuesta por poblaciones de Querétaro e Hidalgo, y la población del norte en la Región Principal del Desierto Chihuahuense, compuesta por poblaciones de San Luis Potosí, Zacatecas, Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila.

7. CONCLUSIONES

- 1) El género *Echinocactus*, como actualmente se reconoce es polifilético.

- 2) Nuestros resultados apoyan fuertemente la propuesta de Lodé (2015) quien describió el nuevo género *Kroenleinia* para incluir a *Echinocactus grusonii*.

- 3) Esta tesis apoya las propuestas taxonómicas que reconocen dos linajes diferentes dentro del núcleo *Echinocactus*, los clados *Homalocephala* y *Echinocactus*, cada uno con sus propias características morfológicas y moleculares y cada uno representando un género dentro de las Cacteeae.

- 4) El clado *HEA* es un grupo monofilético y debe ser reconocido como una subtribu dentro de las Cacteeae.

- 5) El ancestro común del clado *HEA* se distribuía entre las subregiones centro y este del Desierto Chihuahuense y a partir de estas áreas geográficas ha habido eventos de dispersión en diferentes tiempos durante el Plioceno-Pleistoceno a otras áreas geográficas como los Desiertos Sonorense, Mojave, y Gran Cuenca hacia el noroeste y al Valle de Tehuacán-Cuicatlán hacia el sur.

- 6) Los procesos de dispersión y vicarianza dentro de los clados *Homalocephala* y *Echinocactus* han sido influenciados por cambios climáticos (eras pluviales e interpluviales) durante el Plioceno-Pleistoceno en Norteamérica.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abramoff M.D., Magalhaes P.J. and Ram S.J. **2004**. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11 (7): 36-42.

Anderson E. **2001**. The Cactus Family. Timber Press. U.S.A.

Arias S., Gama S. y Guzmán U. **1997**. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Fascículo 14. Universidad Autónoma de México. México D.F.

Babineau M., Gagnon E. and Bruneau A. **2013**. Phylogenetic utility of 19 low copy nuclear genes in closely related genera and species of Caesalpinoid legumes. *South African Journal of Botany* 89: 94-105.

Bárcenas R.T. **2015**. A molecular phylogenetic approach to the systematics of *Cylindropuntieae* (Opuntioideae, Cactaceae). *Cladistics* 32 (4): 351-359.

Bárcenas R.T., Yesson C. and Hawkins J. **2011**. Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics* 27: 470-489.

Barthlott W. and Hunt D. **2000**. Seed diversity in the Cactaceae subfamily Cactoideae. *Succulent Plant Research* 5: 1-173.

Benson L. **1982**. The Cacti of the United States and Canada. Stanford University Press. E.U.A.

Berger A. **1929**. Kakteen. Ulmer Verlag, Stuttgart, Alemania.

Bravo-Hollis H. y Sánchez-Mejorada H. **1991**. Las Cactáceas de México. Vol. II. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Britton N. and Rose J. **1922**. The Cactaceae. Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family. The Carnegie Institution of Washington. E.U.A.

Brockington S.F., Yang Y., Gandía-Herrero F., Covshoff S., Hibberd J.M., Sage R.F., Wong G.K.S., Moore M.J. and Smith S.A. **2015**. Lineage-specific gene radiations

underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist* 207 (4): 1170-1180.

Butterworth C., Cota-Sánchez H. and Wallace R. **2002**. Molecular systematics of tribe Cacteeae (Cactaceae: Cactoideae): a phylogeny based on *rpl16* intron sequence variation. *Systematic Botany* 27 (2): 257-270.

Chamberland M. **1991**. Biosystematics of the *Echinocactus polycephalus* Complex (Cactaceae). Tesis de Maestría. Universidad Estatal de Arizona, E.U.A.

Chamberland M. **1997**. Systematics of the *Echinocactus polycephalus* Complex (Cactaceae). *Systematic Botany* 22 (2): 303-313.

Coulter J.M. **1896**. Preliminary revision of the North American species of *Echinocactus*, *Cereus*, and *Opuntia*. *Contributions from the United States National Herbarium* 3 (7): 357-462.

Demesure B., Sodzi N. and Petit R.J. **1995**. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4 (1): 129-134.

De Luna E., Guerrero J.A. y Chew-Taracena T. **2005**. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica* 15 (3): 351-370.

De Pinna M.C. **1991**. Concepts and test of homology in the cladistics paradigm. *Cladistics* 7 (4): 367-394.

Doweld A.B. **2000**. The polyphyly of the genus *Echinocactus* as evidenced by its seed coat anatomy and morphology II. *Cactaceae-Review* 3 (1): 4-10.

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

Drummond A., Suchard M., Xie D. and Rambaut A. **2012**. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.8.4. *Molecular Biology and Evolution* 29 (8): 1969-1973.

Edgar R. **2004**. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32 (5): 1792-1797.

Eggl U. **1993**. Glossary of botanical terms with special reference to succulent plants. British Cactus & Succulent Society. Inglaterra.

Felker P., Stintzing F., Müssig E., Leitenberger M., Carle R., Vogt T. and Bunch R. **2007**. Colour inheritance in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits. *Annals of Applied Biology* 152: 307-318.

Ferguson D.J. **1992**. The genus *Echinocactus* Link & Otto, subgenus *Homalocephala* (Britton & Rose) *stat. nov.* *Cactus and Succulent Journal* 64: 169-172.

Figueroa M. **2015**. Filogeografía y genética de la conservación de *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Querétaro, México.

Hafner D. and Riddle B. **2011**. Boundaries and barriers of North American warm deserts: an evolutionary perspective. En Upchurch P., McGowan A.J. Slater C. S. *Palaeogeography and Palaeobiogeography: Biodiversity in Space and Time*. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, E.U.A.

Hamilton M.B. **1999**. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*. 8 (3): 521–523.

Hasegawa M., Kishino H. and Yano T.A. **1985**. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.

Hawkins J.A., Hughes C.E. and Scotland R.W. **1997**. Primary homology assessment, characters and character states. *Cladistics* 13 (3): 275-283.

Hernández H.M. and Bárcenas R.T. **1994**. Endangered Cacti in the Chihuahuan Desert: I. Distribution Patterns. *Conservation Biology* 9 (5): 1176-1188.

Hernández H.M. and Bárcenas R.T. **1995**. Endangered Cacti in the Chihuahuan Desert: II. Biogeography and Conservation. *Conservation Biology* 10 (4): 1200-1209.

Hernández H.M., Gómez-Hinostrosa C. and Goettsch B. **2004**. Checklist of the Chihuahuan Desert Cactaceae. *Harvard Papers in Botany* 9 (1): 51-68.

Hernández H.M. and Navarro M. **2007**. A new method to estimate areas of occupancy using herbarium data. *Biodiversity Conservation* 16: 2457-2470.

Hernández H.M. and Gómez-Hinostrosa C. **2011**. Mapping the Cacti of Mexico: Their Geographical Distribution Based on Referenced Records. dh books, Milborne Port, Inglaterra.

Hernández-Hernández T., Hernández H.M., De-Nova J., Puente R., Eguiarte L. and Magallón S. **2011**. Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany* 98 (1): 44-61.

Hernández-Hernández T., Brown J.W., Schlumpberger B.O., Eguiarte L.E. and Magallón S. **2014**. Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. *New Phytologist* 202: 1382-1397.

Hernández-Ledesma P. and Bárcenas R.T. **2016**. Phylogenetic utility of the *trnH-psbA* IGR and stem-loop diversity of the 3' UTR in Cactaceae (Caryophyllales). *Plant Systematics and Evolution* 303 (3): 299-315.

Holder M. and Lewis P.O. **2003**. Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. *Nature* 4: 275-284.

Huelsenbeck J.P. and Ronquist F. **2001**. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17 (8): 754-755.

Hunt D. **2016**. CITES Cactaceae Checklist. Tercera edición. Royal Botanical Gardens, Kew, Inglaterra.

Hunt D., Taylor N. and Charles G. **2006**. The New Cactus Lexicon. dh Books, Milborne Port, Reino Unido.

Kimura M. **1980**. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16 (2): 111-120.

Kimura M. **1987**. Molecular evolutionary clock and the neutral theory. *Journal of Molecular Evolution*. 26 (1-2): 24-33.

Kumar S., Stecher G. and Tamura K. **2015**. MEGA 7: Molecular evolutionary genetic analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870-1874.

Lakner C., van der Mark P., Huelsenbeck J.P., Larget B. and Ronquist F. **2008**. Efficiency of Markov chain Monte Carlo tree proposals in Bayesian phylogenetics. *Systematic Biology* 57 (1): 86-103.

Link J.H.F. and Otto C.F. **1827**. Verhandlungen des Vereins zur Beförderung. Gartenbaues in den Königlich Preussischen, Staaten 3: 420.

Lodé J. **2014**. *Kroenleinia* gen. nov. J. Lodé: a new genus for a well-known cactus: *Echinocactus grusonii*. *Cactus Adventures International* 102: 25-29.

Lodé J. **2015**. Taxonomy of the Cactaceae: The new classification of cacti mainly based on molecular data and explained. Primera edición. Cactus-Adventures. Versión online 3.16.

Maddison W.P. and Maddison D.R. **2015**. MESQUITE: a modular system for evolutionary analysis version 3.2. <http://mesquiteproject.org>

Mauseth J.D. **2006**. Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Annals of Botany* 98: 901-926.

Müller J, Müller K.F., Neinhuis C. and Quand D. **2007**. PhyDE, phylogenetic data editor Version 0.9971. <http://www.phyde.de>

Nixon K. **2002**. WINCLADA ver. 1.00.08. Universidad de Ithaca. Nueva York, E.U.A.

Patterson C. **1982**. Morphological characters and homology. En: Jorsey K.A. & Friday A.E. Problems of Phylogenetic Reconstruction. Academic Press, Londres & Nueva York, E.U.A.

Phillips S.J., Dudík M. and Schapire R.E. **2018**. Maxent software for modeling species niches and distributions (Version 3.4.1). http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/

Pohlert, T. **2014**. The pair wise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). R package. <http://CRAN.R-project.org/package=PMCMR>

Radford A.E. **1974**. Vascular plant systematics. Harper & Row Publishers, New York, E.U.A.

Rosenthal J. and Forstner M.R.J. **2014**. Effects of Plio-Pleistocene barrier on Chihuahuan Desert herpetofauna. En: Hoyt C.A. & Karges J. Proceedings of the Sixth Symposium on the Natural Resources of the Chihuahuan Desert Region. October 14–17.

Rydberg P.A. **1917**. Flora of the Rocky Mountains and adjacent plains. Publicado por el autor, New York, E.U.A.

Salywon A.M. and Hodgson W.C. **2012**. *Echinocactus*, (Cactaceae). En: Holmgren N.H., Holmgren P.K., Reveal J.L., y colaboradores. Intermountain Flora: Vascular Plants of the Intermountain West, USA, vol. 2A. New York Botanical Garden Press, E.U.A.

Schumann K. **1899**. Gesamtbeschreibung der Kakteen. Neudamm: J. Neumann, Alemania.

Simmons M.P. and Ochoterena H. **2000**. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 49: 369-38.

Stambouli-Essassi S., Zakraoui M., Bouzid S. and Harzallah-Skhiri F. **2017**. Sexual propagation of the Tunisian spinescent *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., morphogenetic deployment and polymorphism. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 45 (1): 50-58.

Small R.L, Cronn R.C. and Wendel J.F. **2004**. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Australian Systematic Botany* 17: 145-170.

Swofford D.L. **2002**. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. E.U.A.

Tavaré S. **1986**. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. En: Miura, R.M., Some Mathematical Questions in Biology—DNA Sequence Analysis; Ed.; American Mathematical Society: Providence, RI, USA.

Taberlet P., Gielly L., Pautou G. and Bouvet J. **1991**. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17 (5): 1105-1109.

Vargas-Luna M. **2008**. Biología y conservación de *Echinocactus parryi* (Cactaceae), una especie amenazada y endémica de Chihuahua. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

Vázquez-Lobo, A., Aguilar-Morales, G., Arias, S., Golubov, J., Hernández-Hernández, T. and Mandujano M.C. **2015**. Phylogeny and biogeographic history of *Astrophytum* (Cactaceae). *Systematic Botany* 40: 1022-1030.

Vázquez-Sánchez M., Terrazas T. y Arias S. **2012**. El hábito y la forma de crecimiento en la tribu Cacteeae (Cactaceae, Cactoideae). *Botanical Sciences* 90 (2): 97-108.

Vázquez-Sánchez M., Terrazas T., Arias S and Ochoterena H. **2013**. Molecular phylogeny, origin and taxonomic implications of the tribe Cacteeae (Cactaceae). *Systematics and Biodiversity* 11 (1): 103-116.

Wallace R.S. **1995**. Molecular systematic study of the Cactaceae: using chloroplast DNA variation to elucidate cactus phylogeny. *Bradleya* 13: 1-12.

Wilkins D.E. and Currey D.R. **1997**. Timing and extent of Late Quaternary paleolakes in the Trans-Pecos closed basin, west Texas and South-Central New Mexico. *Quaternary Research* 47: 306-315.

Yu Y., Harris A.J., Blair C. and He X. **2015**. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 87: 46-49.

9. APÉNDICES

9.1 Datos de los especímenes y claves de acceso de las secuencias.

El apéndice está ordenado alfabéticamente, empezando por el grupo interno y siguiendo con los grupos externos. Los especímenes fueron revisados en cinco herbarios: Herbario Nacional de México (MEXU), Herbario Jerzy Rzedowski de la Universidad Autónoma de Querétaro (QMEX), Herbario del Desert Botanical Garden (DES), Herbario de la Universidad Estatal de Arizona (ASU) y en el Herbario de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). Este último no se encuentra registrado aun en la red internacional de herbarios. Las terminales que presentan corchetes representan las secuencias generadas en este estudio con su respectiva clave de acceso a GenBank. La abreviación sin clave entre corchetes [SC] indica secuencias generadas en este estudio, las cuales aún no han sido depositadas en GenBank. Las terminales que sólo presentan paréntesis sin corchetes representan a las secuencias descargadas de GenBank.

Grupo Interno.

***Echinocactus grusonii*. MEXU**, Héctor Hernández 2442; Ortega Rafael SN; Leia Scheinvar 3177, 5742; Colector desconocido SN. **ASU**, D. J. Pinkava 14403. **QMEX**, Mario Vargas-Luna 92 (*atpB-rbcL* [MH129832]; *psbA-trnH* [MH129865]), 93, 134, 148, 157, 161, 190; Rolando Bárcenas 1584 (*atpB-rbcL* [MH129833]), 1588 (*psbA-trnH* [MH129866]). **Colección viva del Jardín Botánico Charco del Ingenio**, *CHB50 (*DODA* [MG149547]; *5GT* [MG149523]). **Secuencias descargadas del GenBank**, *trnL-trnF* (HM041257, HM041257); *matK* (FN997149). ***Echinocactus horizonthalonius*. MEXU**, Bárbara Goettsch 5, 124, 137, 527, 543, 622; Carlos Gómez-Hinostrosa 724, 1727, 1751, 1809, 1849, 1870, 1913, 1751, 2161, 2290, 2304, 2381; G. Navarro 23; Helia Bravo-Hollis SN264, SN455, SN279; Hernando Sánchez-Mejorada 2534, 3567; Héctor Hernández 1753, 1779, 1787, 1907, 1984, 2089, 2093, 2142, 2175, 2192, 2214, 2244, 2266, 2497, 2530, 2707, 2789, 3336,

3353, 3389, 3474, 3481, 3612, 3639, 3676, 3714, 3751; D. Chicharo SN1; David Brailovsky 8, 20, 36, 100, 172, 193, 220, 221, 321, 345, 359, 393, 448, 482, 497, 516, 533, 570, 741; Tania Hernández 61; Raúl Puente 2593, 2619; Miguel González Botello 102; Salvador Arias 1872; Rolando Bárcenas 90, 100, 115, 408, 542, 569, 1014, 1114, 1503; Verónica Alvarado 14; . **UACJ**, Patricia Olivas 908. **QMEX**, Mario Vargas-Luna 74 (*atpB-rbcL* [MH129821]; *psbA-trnH* [MH129853]; *5GT* [MG149506]), 75 (*atpB-rbcL* [MH129820]; *psbA-trnH* [MH129854], *DODA* [MG149542], *5GT* [MG149507]), 101, 107, 117 (*atpB-rbcL* [SC]; *psbA-trnH* [SC]), 118, 137, 139, 168, 185, 189, 193. **Secuencias descargadas del GenBank**, *trnL-trnF* (HM041258); *matK* (FN997104). ***Echinocactus horizonthalonius* var. *nicholii***. **ASU**, Bruner L. V. SN; Bruce Parfitt 2788; Blakley E. R. B-330; Gierisch R. K. 4065. **DES**, Lynda Kozak & Liz Ecker 109, 111; Blakley E. R. B-330; Lynda Kozak SN. **Colección viva del Jardín Botánico de Phoenix**, Ecker 111 (*atpB-rbcL* [MH129822]; *psbA-trnH* [MH129855]; *trnL-trnF* [MH138286]; *5GT* [MG149508]), 109 (*atpB-rbcL* [SC]). ***Echinocactus horizonthalonius* x *platyacanthus***. **ASU**, Wendy Hodgson SN (*atpB-rbcL* [SN]; *5GT* [MG149509]). ***Echinocactus parryi***. **MEXU**, Salvador Arias 1791. **UACJ**, Rafael Corral 3726, 3727, 3728, Patricia Olivas 881. **QMEX**, Mario Vargas-Luna 28 (*atpB-rbcL* [MH129826]; *psbA-trnH* [MH129859]; *DODA* [MG149544]; *5GT* [MG149513]), 30 (*psbA-trnH* [MH129860]), 38 (*psbA-trnH* [SC]; *DODA* [MG149545]), 41 (*atpB-rbcL* [MH129827]; *5GT* [MG149514]), 61 (*atpB-rbcL* [MH129828]; *5GT* [MG149515]), 64 (*atpB-rbcL* [SC]; *5GT* [MG149516]), 72 (*5GT* [MG149517]), 133 (*psbA-trnH* [MH129861]), 169. **Secuencias descargadas del GenBank**, *matK* (KC776965). ***Echinocactus platyacanthus***. **MEXU**, Helia Bravo-Hollis SN25; Hernando Sánchez-Mejorada 306, 2812; Héctor Hernández 2550, Salvador Arias 859, 933. **QMEX**, Mario Vargas-Luna 96, 108, 124, 135, 143, 152, 155, 166, 191, 192. *Mónica Figueroa C26M6 (*atpB-rbcL* [MH129817]; *DODA* [MG149541]; *5GT* [MG149505]; C16M1 (*psbA-trnH* [MH129850], *trnL-trnF* [MH138282]); C9M1 (*atpB-rbcL* [MH129818]; *trnL-trnF* [MH138283]); C9M3 (*psbA-trnH* [MH129851]); C13M1 (*psbA-trnH* [MH129852]); C18M15 (*atpB-rbcL*

[MH129819]); *trnL-trnF* [MH138284]). ***Echinocactus polycephalus* var. *polycephalus***. MEXU, Arthur Morley SN; Helia Bravo-Hollis SN304; I. W. Clokey 8432; Ralph K. Gierisch 4425; Michael Chamberland 45. ASU, Michael Chamberland 18, 23, 43, 44, 48, 90, 124, 125; Reeves 5426. DES, Jon P. Rebman 2887; J. Harry Lehr 618 (especimen determinado por Michael Chamberland como híbrido entre las dos variedades de *E. polycephalus*). QMEX, Mario Vargas-Luna 82 (*atpB-rbcL* [SC]; *psbA-trnH* [SC]), 83 (*atpB-rbcL* [SC]; *psbA-trnH* [SC]; DODA [MG149546]), 130, 171. Colección viva del Jardín Botánico de Phoenix, Michael Chamberland 51 (*atpB-rbcL* [MH129829]; *psbA-trnH* [MH129862]; *trnL-trnF* [MH138289]; 5GT [MG149519]); E. Anderson 6191 (5GT [MG149518]). Secuencias descargadas del GenBank, *matK* (FN997389). ***Echinocactus polycephalus* var. *xeranthemoides***. MEXU, Wendy Hodgson 9727. ASU, Michael Chamberland 66, 98, 108; Gierisch R. K. 4065, SN; Hevely SN; Gregory K. Brown 849. DES, Wendy Hodgson 24085, 24245, 24259, 24581, 25463 (*trnL-trnF* [MH138291]; 5GT [MG149521]), 26466, 30366 (*atpB-rbcL* [SC]; 5GT [MG149522]), 9727 (*atpB-rbcL* [MH129831]; *psbA-trnH* [MH129864]; Mario Vargas Luna 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180 (*atpB-rbcL* [MH129830]; *psbA-trnH* [MH129863]; *trnL-trnF* [MH138290]; 5GT [MG149520]), 181, 182, 183. ***Echinocactus texensis***. MEXU, Hernando Sánchez-Mejorada 2077, 3557; Héctor Hernández 2146, 2546, 3523, 3637; J. G. Martínez 421; Laura White Olascoaga 20; Carlos Gómez-Hinostrosa 2166; Salvador Arias 1866. ASU, Marc A. Baker 16617.2, 16596.1, 14286.1 (*atpB-rbcL* [MH129824], *psbA-trnH* [MH129857], 5GT [MG149510]), 14277, 16609 (*atpB-rbcL* [MH129825]; *psbA-trnH* [MH129858]; *trnL-trnF* [MH138287]; 5GT [MG149511]), D. J. Pinkava 5230. QMEX, Mario Vargas-Luna 98, 99, 127 (*atpB-rbcL* [MH129823]; *psbA-trnH* [MH129856]; DODA [MG149543]), 170. Colección viva del Jardín Botánico de Phoenix, Carter SN (*trnL-trnF* [MH138288]; 5GT [MG149512]). Secuencias descargadas del GenBank, *matK* (FN997302).

Grupos externos

Amaranthus tricolor. Secuencias descargadas del GenBank, DODA (KP165399); 5GT (KP174810). ***Beta vulgaris***. Secuencias descargadas del GenBank, DODA (AJ583017); 5GT (AY526080). ***Astrophytum asterias***. MEXU, Hernando Sánchez-Mejorada 3701. Planta comprada en vivero, (*atpB-rbcL* [MH129812]); *psbA-trnH* [MH129845]. Secuencias descargadas del GenBank, *trnL-trnF* (KC776941); *matK* (FN997357). ***Astrophytum capricorne***. MEXU, Héctor Hernández 2095, 2117; *2320 (*atpB-rbcL* [MH129816]; *psbA-trnH* [MH129846]); Salvador Arias 1962. Secuencias descargadas del GenBank, *trnL-trnF* (KC776959); *matK* (FN997272). ***Astrophytum caput-medusae***. *Planta comprada en vivero, (*atpB-rbcL* [MH129813]; *psbA-trnH* [MH129847]). Secuencias descargadas del GenBank, *trnL-trnF* (KC776998); *matK* (FN997077). ***Astrophytum myriostigma***. QMEX, Mario Vargas-Luna 116 (*atpB-rbcL* [MH129814], *psbA-trnH* [MH129848]; DODA [MG149538]). Secuencias descargadas del GenBank, *trnL-trnF* (KC776951); *matK* (FN997366). ***Astrophytum ornatum***. MEXU, *Héctor Hernández 3703 (5GT [MG149504]). QMEX, Mario Vargas-Luna 95 (*atpB-rbcL* [MH129815]; *psbA-trnH* [MH129849]; DODA [MG149540]). Secuencias descargadas del GenBank, *trnL-trnF* (KC776947); *matK* (FN997293). ***Aztekium hintonii***. MEXU, Jerónimo Reyes 6212. Colección viva del Jardín Botánico de Zúrich, *ZSS991236 (*atpB-rbcL* [MH129810]; *psbA-trnH* [MH129843]; DODA [MG149537]). Secuencias descargadas del GenBank, *matK* (FN997040). ***Aztekium ritteri***. MEXU, González-Medrano SN; Hinton 25732; Hernando Sánchez-Mejorada 3723. Planta comprada en vivero, (*atpB-rbcL* [MH129811]; *psbA-trnH* [MH129844]). Secuencias descargadas del GenBank, *matK* (AY015290). ***Carnegiea gigantea***. QMEX, Mario Vargas-Luna 86 (*atpB-rbcL* [MH129808]; DODA [MG149536]; 5GT [MG149503]). Secuencias descargadas del GenBank, *trnL-trnF* (HM041236); *matK* (KT164775). ***Ferocactus echidne***. MEXU, *Rolando Bárcenas 49 (*atpB-rbcL* [MH129835]; *psbA-trnH* [MH129868]; 5GT [MG149530]). Secuencias descargadas del GenBank, *trnL-trnF* (HM041276); *matK* (FN997544). ***Ferocactus***

***glaucescens*. MEXU**, *Héctor Hernández 3701 (*atpB-rbcL* [MH129834]; *5GT* [MG149524]; *2425 (*psbA-trnH* [MH129867]). **Secuencias descargadas del GenBank**, *matK* (FN997274). ***Ferocactus hamatacanthus*. MEXU**, *Héctor Hernández 2096 (*atpB-rbcL* [MH129836]; *5GT* [MG149531]); *1467 (*psbA-trnH* [MH129870]). **Secuencias descargadas del GenBank**, *matK* (FN997248). ***Ferocactus histrix*. QMEX**, *Javier Álvarez B1 (*5GT* [MG149529]); B2 (*DODA* [MG149548]); *SLP1 (*atpB-rbcL* [MH129837]; *DODA* [MG149549]; *5GT* [MG149526]; *SLP3 (*DODA* [MG149550]; *5GT* [MG149527]); *SLP6 (*5GT* [MG149528]; *T8 (*DODA* [MG149551]); *T10 (*5GT* [MG149525]; *B1 (*5GT* [MG149529]; *TB11 (*DODA* [MG149552]). **MEXU**, *Rolando Bárcenas 557 (*psbA-trnH* [MH129869]). **Secuencias descargadas del GenBank**, *matK* (FN997287). ***Ferocactus latispinus*. QMEX**, Mario Vargas-Luna 90 (*atpB-rbcL* [MH129838]; *Javier Álvarez SN (*psbA-trnH* [MH129871]); *Rolando Bárcenas 1620 (*5GT* [MG149532]). **Secuencias descargadas del GenBank**, *trnL-trnF* (HM041278); *matK* (FN997246). ***Ferocactus lindsayi*. Jardín Botánico Charco del Ingenio**. *CHB10 (*atpB-rbcL* [MH129839]; *5GT* [MG149533]). **Secuencias descargadas del GenBank**, *matK* (FN997152). ***Ferocactus pilosus*. MEXU**, *Carlos Gómez-Hinostrosa 739 (*atpB-rbcL* [MH129840]; *psbA-trnH* [MH129872]; *5GT* [MG149534]). **Secuencias descargadas del GenBank**, *matK* Genbank (FN997133). ***Ferocactus wislizeni*. QMEX**, *Rolando Bárcenas 1565 (*psbA-trnH* [MH129873]; *5GT* [MG149535]; *1569 (*atpB-rbcL* [MH129841]). **Secuencias descargadas del GenBank**, *matK* (FN997459). ***Geohintonia mexicana*. MEXU**, *Jerónimo Reyes 3226 (*atpB-rbcL* [MH129809]; *psbA-trnH* [MH129842]). **Secuencias descargadas del GenBank**, *matK* (FN997326). ***Lophophora williamsii*. Secuencias descargadas del GenBank**, *DODA* (KR376285). ***Opuntia ficus-indica*. Secuencias descargadas del GenBank**, *atpB-rbcL* (JF787222); *psbA-trnH* (FJ026612); *trnL-trnF* (KJ735936); *matK* (FN997314); *DODA* (EU0899741); *5GT* (EU089744).

9.2 Lista de caracteres morfológicos y estados de carácter.

Embriones (1-3)

Para realizar las observaciones de los embriones en el microscopio estereoscópico, primero, la testa de las semillas fue removida manualmente con ayuda de pinzas de punta fina y agujas. Posteriormente, los embriones fueron fotografiados a través del microscopio utilizando como fondo escalas donde los espacios entre las barras blancas equivalen a 1 mm (Figura 12).

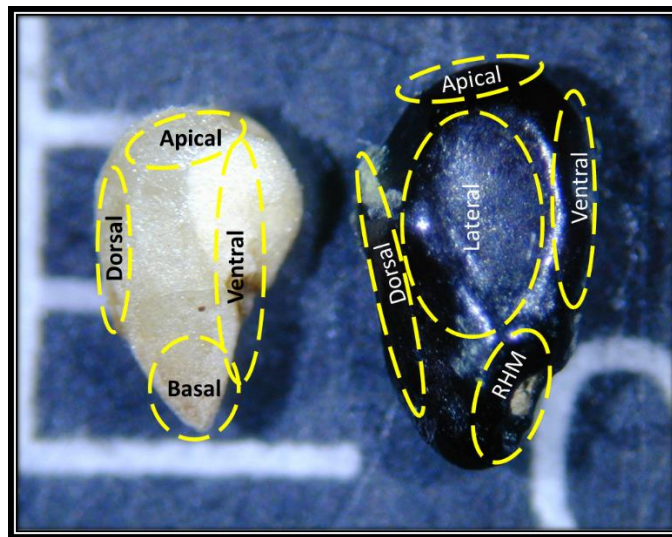


Figura 12. Regiones anatómicas del embrión y de la semilla de *Echinocactus platyacanthus*. Obsérvese la región apical de este embrión queda ubicada en la región apical de la semilla. Las siglas RHM, hacen referencia a la región hilo-micropilo.

Siguiendo la regionalización anatómica de las semillas de Barthlott y Hunt (2000), determinamos cuatro regiones anatómicas en los embriones. La región basal, corresponde al extremo del embrión ubicado cerca del micropilo de la semilla y donde una vez germinado el embrión se desarrolla la radícula; la región apical, corresponde al extremo del embrión que dependiendo de su curvatura se ubica en la parte apical o ventral de la semilla y es donde se desarrollan los cotiledones en el estado de plántula. Las otras dos regiones anatómicas de los embriones

corresponden a la región ventral y dorsal, ubicadas justo en estas dos regiones de las semillas (Fig. 12).

1.- Forma del embrión en sección transversal.

0: terete

1: semiterete

Descripción: En las especies estudiadas, podemos encontrar dos formas de embriones. En su gran mayoría, las especies presentan embriones en forma de terete, este puede estar curvo o no. Sin embargo, en las especies del género *Astrophytum*, el embrión se encuentra aplanado dorso-ventralmente y recto (fig. 13). Esto permite que al hacer un corte transversal a la mitad de los embriones podamos observar la forma terete en la mayoría de las especies, excepto en *Astrophytum* donde se observa semiterete.

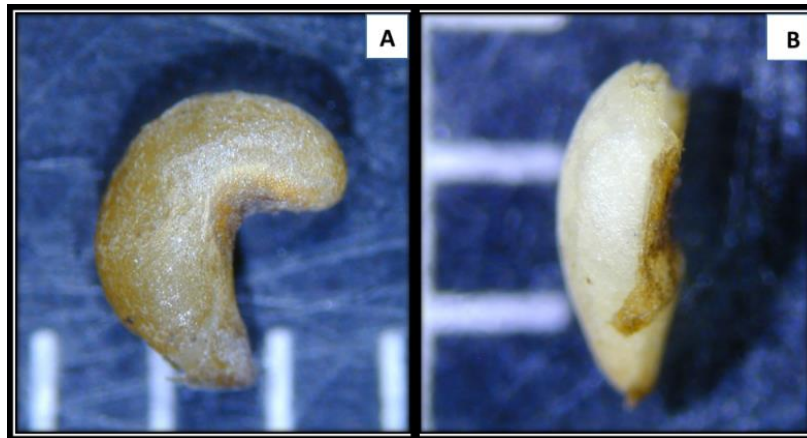


Figura 13.- Forma de los embriones. **A.** *Echinocactus texensis*, forma terete curvo. **B.** *Astrophytum ornatum*, forma semiterete recto. Los espacios entre las barras de las escalas corresponden a 1 mm.

2.- Tipo de embrión

0: ortótropo

1: anátropo

2: campilótrofo

Descripción: Para codificar este carácter, nos basamos en los tipos de embrión según su curvatura descritos por Benson (1982), (Figura 14).

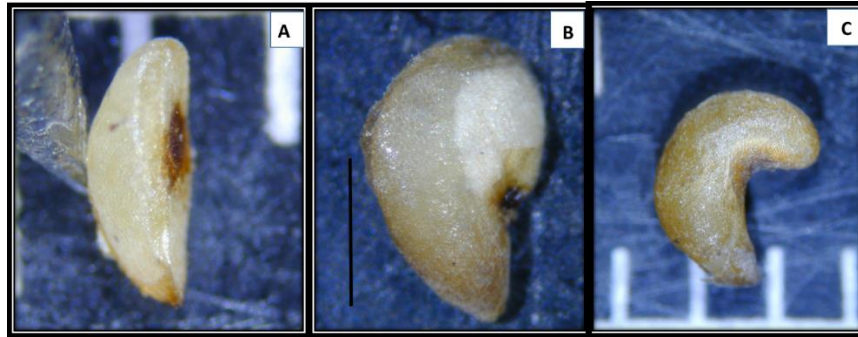


Figura 14.- Tipo de embrión. **A.** Ortótrofo en *Astrophytum capricorne*. **B.** Anátrofo en *Echinocactus grusonii*. **C.** Campilótrofo en *Echinocactus texensis*. Los espacios entre las líneas blancas de las escalas y la línea negra de la foto B, equivalen a 1 mm.

3.- Presencia de perispermo en los embriones

0: inconspicuo a ausente

1: poco conspicuo

2: muy conspicuo

Descripción: para codificar este carácter simplemente definimos si el perispermo es poco visible (poco conspicuo), muy visible (muy conspicuo) o si no se observa nada de perispermo (inconspicuo a ausente). La figura 14 muestra dos embriones con perispermo inconspicuo (A y C) y uno con perispermo muy conspicuo (B).

Plántulas (4-19)

Las semillas de todas las especies de *Echinocactus* fueron germinadas en contenedores de plástico de 250 ml, los cuales se colocaron afuera del laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva (LGMEE), de la Universidad Autónoma

de Querétaro, campus aeropuerto. Asumimos que todas las plántulas se desarrollaron, en general, bajo las mismas condiciones climáticas, ya que todas estaban en un mismo gabinete, además, intentamos mantener la misma humedad para todos los contenedores. Sin embargo, es importante mencionar que no se midió ninguna variable climática. Con el fin de obtener el mayor desarrollo posible de las plántulas, los contenedores se mantuvieron tapados para mantener la humedad y acelerar su crecimiento y desarrollo.

Algunos caracteres como la forma de los cotiledones fueron codificados sólo durante la primera semana y hasta el mes de edad, debido a que después de esta edad se dificulta su observación. Debido a que las plántulas detuvieron su crecimiento y mantuvieron una relativa estabilidad morfológica, primero entre los cuatro y seis meses y después aproximadamente al año de edad, decidimos codificar los caracteres morfológicos de plántulas a estas edades.

4.- Forma de la plántula (1era semana a un mes).

0: clavada

1: botuliforme

2: capitada

3: obcónica

4: cilíndrica

Descripción: la forma de las plántulas se describió a través una vista lateral en un microscopio estereoscópico. La codificación se realizó siguiendo las formas tridimensionales descritas por (Radford et al., 1974). La figura 15 muestra las cuatro formas determinadas en nuestro grupo de estudio. A pesar de que la fotografía de *Carnegia gigantea* fue obtenida de internet (Fig. 15), algunas plántulas que

cultivamos a partir de semillas de esta especie, presentaban también forma obcónica, sin embargo, lamentablemente, no lo documentamos con fotografías.

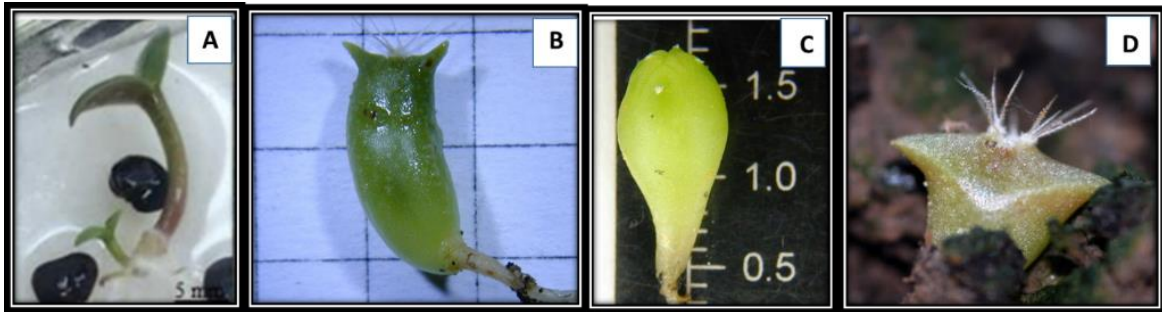


Figura 15. Forma de la plántula con una semana a un mes de edad. **A.** Cilíndrica en *Opuntia ficus-indica*. **B.** Botuliforme en *Echinocactus parryi*. **C.** Capitada en *Astrophytum asterias*. **D.** Obcónica en *Carnegiea gigantea*. La fotografía A, fue obtenida de Stambouli-Essassi et al. (2017). La fotografía D, fue descargada de la red (<http://deemhills.blogspot.mx/2016/05/giant-saguaros-from-tiny-seeds-to.html>). Los cuadros de la fotografía B equivalen a 1.5 cm por lado y los espacios entre las líneas blancas de la escala en la fotografía C, equivalen a 1 mm.

5.- Forma del ápice de los cotiledones (1era semana a un mes)

0: aguda

1: obtusa

2: redondeada

Descripción: La forma del ápice de los cotiledones la realizamos siguiendo las descripciones de las formas de ápices descritas en Egli (1993) y Radford et al. (1974), Figura 16.

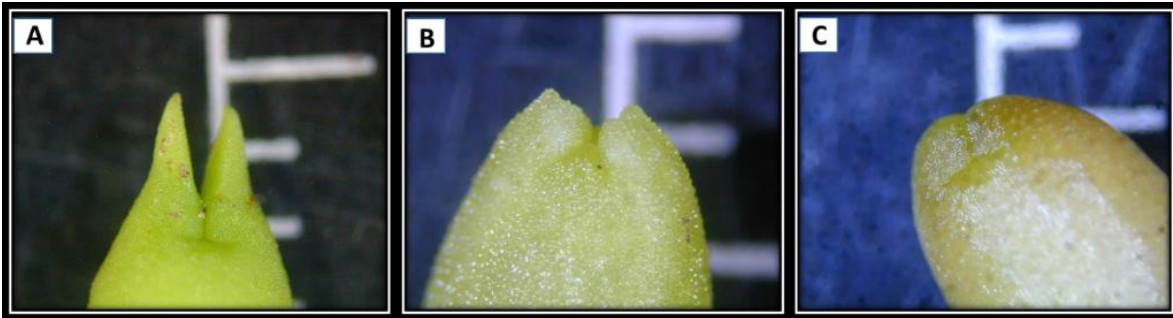


Figura 16.- Forma del ápice de los cotiledones. **A.** Aguda en *Echinocactus polycephalus*. **B.** Obtusa en *Astrophytum myriostigma*. **C.** Redondeada en *Echinocactus horizonthalonius*. Los espacios entre las barras blancas de la escala equivalen a 1 mm.

6.- Número de espinas por areola (4 meses).

0: pocas espinas (1 a 4)

1: número de espinas moderado (5 a 8)

2: muchas espinas (9 a 12)

Descripción: este carácter fue codificado a través del conteo de 25 areolas por especie y apartir de cinco individuos provenientes por lo menos de dos poblaciones. Con el fin de reducir el efecto de pseudorélicas, se calculó el promedio del número de espinas por plántula teniendo en total 421 conteos de los cuales sólo 88 fueron incluidos en el análisis estadístico como eventos únicos. La hipótesis de que existen tres grupos estadísticamente diferentes fue confirmada con una prueba de Kruskal-Wallis y por la prueba post-hoc de comparación de pares (Prueba de Nemeyi) conducida en R con el paquete estadístico PMCMR (Pohlert, 2014) (Fig. 17).

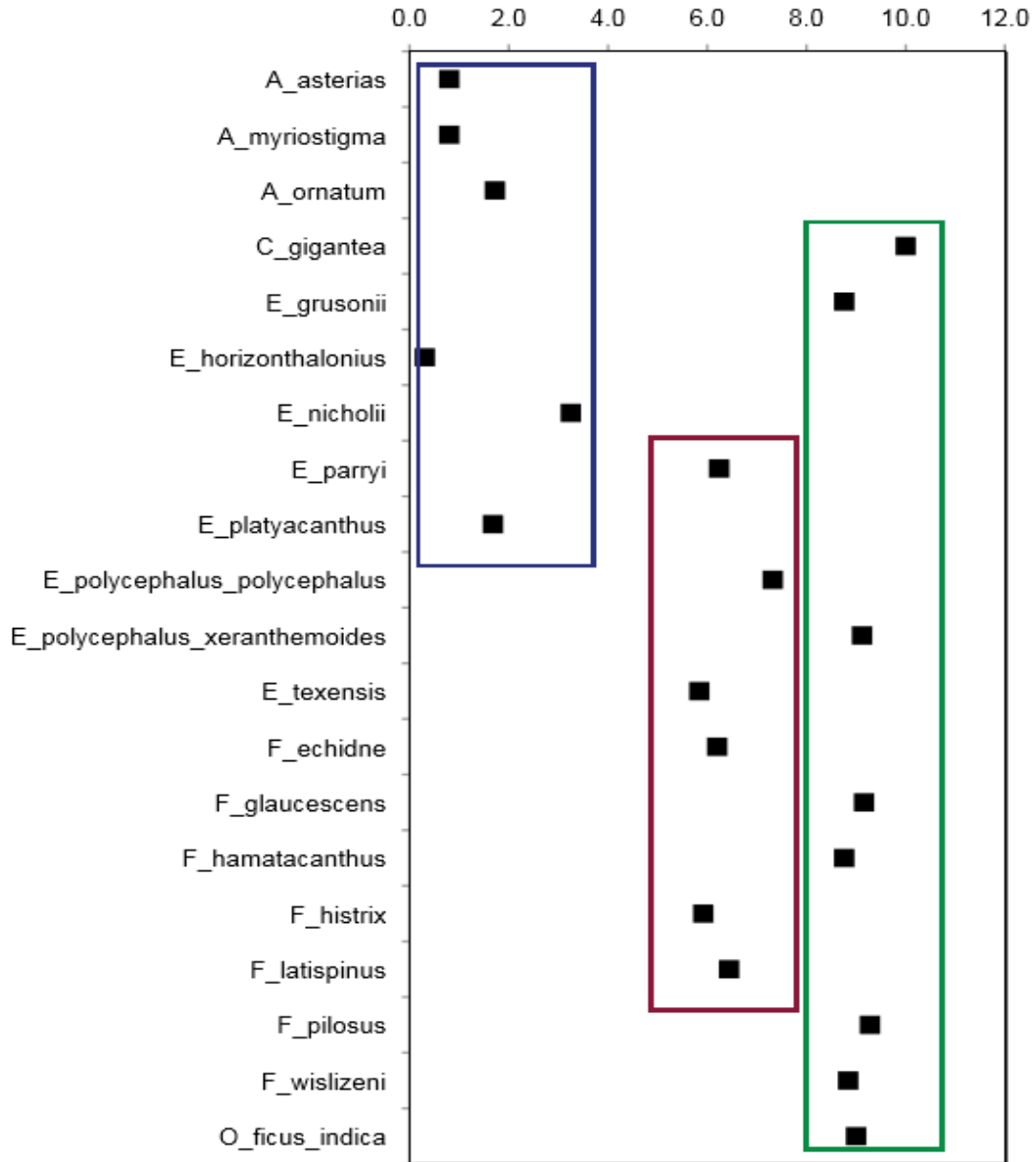


Figura 17. Estados de carácter codificados para el número de espinas por areola. Los estados de carácter fueron determinados a partir de la prueba de comparación de medias no paramétrica Kruskal-Wallis, aplicada a los valores promedios del número de espinas por areola por especie.

Este carácter está relacionado con el carácter 7 “disposición de las espinas” y el carácter 8 “base de las espinas” en plántulas de 4 meses. En términos generales, podemos diferenciar tres grupos de especies, en cuanto a este carácter,

las especies con pocas espinas por areola (1-4), curvas y con la base engrosada (ej. *Astrophytum* spp., y *E. platyacanthus*); y especies con más espinas (5 a 8) y (9 a 12) por areola, con disposición recta y sin engrosamiento en la base (ej. *Ferocactus* spp., *E. grusonii*, *E. texensis*, *E. parryi*, *E. polycephalus*). Las fotografías A y B de la figura 18, muestran areolas de dos especies con número moderado de espinas. Por otra parte, las fotografías C y D de la misma figura, corresponden a especies con pocas espinas por areola.

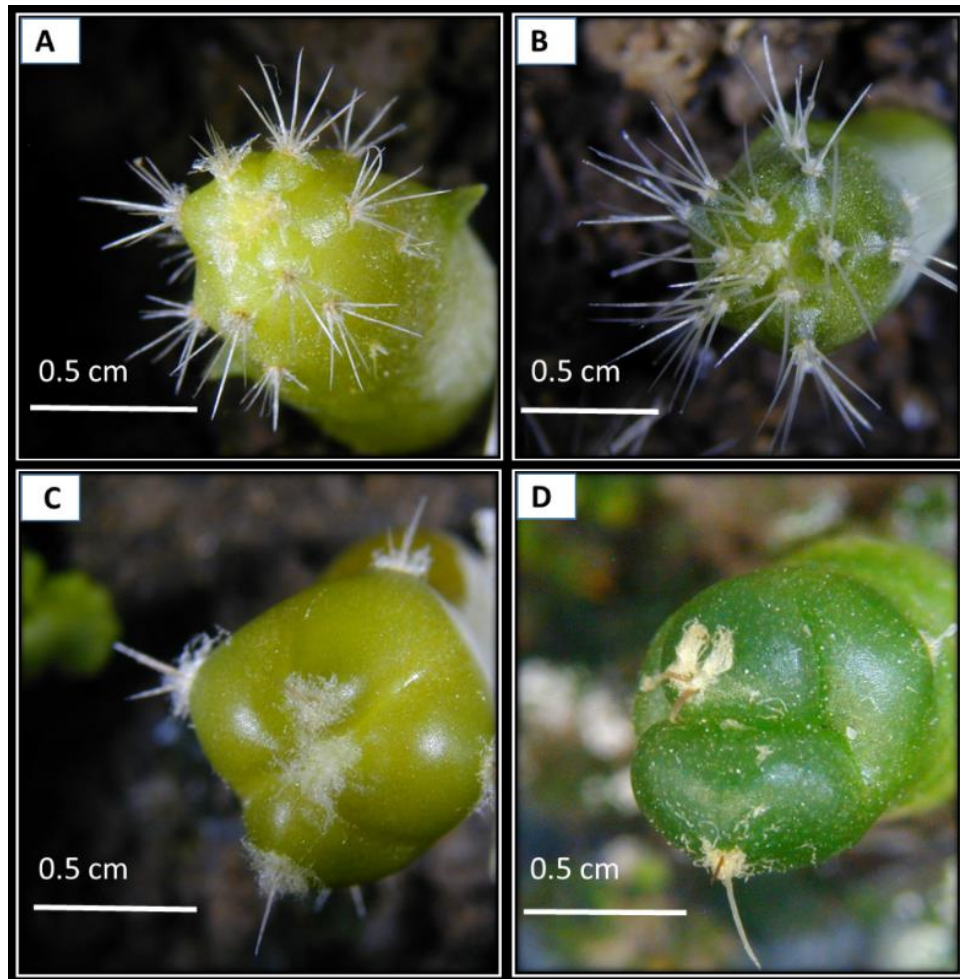


Figura 18. Número de espinas por areola en plántulas de 4 meses de edad. Plántulas con número de espinas moderado en *Echinocactus polycephalus* var. *polycephalus* (A) y *E. texensis* (B) y plántulas con número de espinas reducido en *E. platyacanthus* (C) y *E. horizontalonius* (D).

7.- Disposición de las espinas (4 meses).

0: recta

1: curva

Descripción: las observaciones de espinas de plántulas a través del estereoscopio nos permitieron determinar y codificar dos tipos de disposición de las espinas. Unas con disposición recta, en donde la parte distal de la espina apunta hacia afuera del epicótilo y las de disposición curva, en donde la parte distal esta curvada hacia adentro del tallo. En la fotografía B de la figura 19, se observa una espina con disposición curvada y en la fotografía F de la misma figura se muestran dos espinas rectas.

8.- Base de las espinas (4 meses).

0: no engrosada

1: engrosada

Descripción: la base de la espina es la parte proximal de la espina, la cual se inserta en la areola. En plántulas de 4 meses ésta puede estar engrosada o no. En las fotografías B y C de la figura 19 se observan dos ejemplos de espinas con base engrosada, contrario a la fotografía F de la misma figura donde se observan espinas con la base sin engrosamiento.

9.- Superficie de las espinas (4 meses).

0: glabra

1: pulverulenta

2: pubescente

Descripción: la superficie de las espinas de plántulas con 4 meses de edad puede ser glabra, pulverulenta o pubescentes. Las fotografías D, A y E de la figura 19 muestran una espina con superficie glabra, una con superficie pulverulenta y una pubescente, respectivamente. Las observaciones de la superficie de las espinas fueron hechas a través de un microscopio estereoscópico.

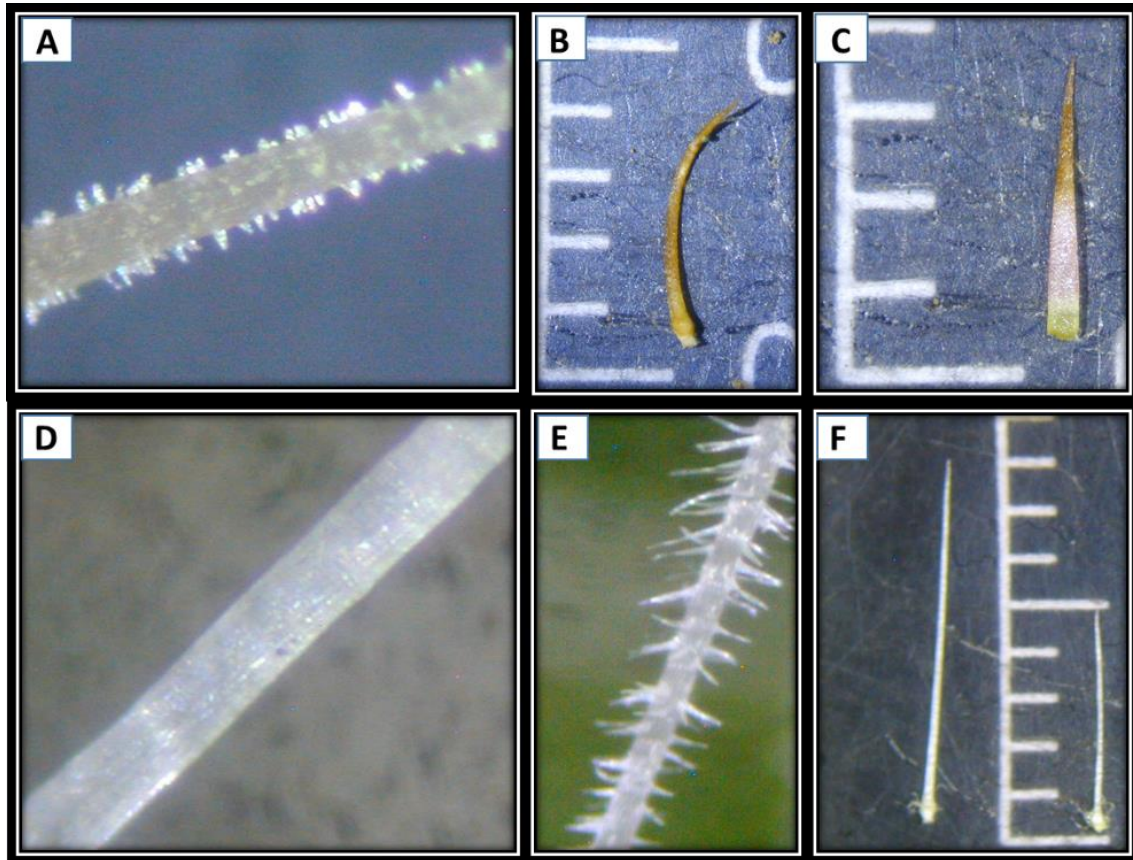


Figura 19. Caracteres morfológicos de espinas de plántulas de 4 meses. Espina pulverulenta en *E. platyacanthus* (A). Espinas curvadas (B) y engrosadas en la base de (C) *E. horzonthalonius*. (D) y (F) espinas glabras y rectas de *E. grusonii*, respectivamente. Espina pubescente de *Ferocactus glaucescens* (E). La distancia entre las barras blancas de las escalas equivale a 1 mm.

10.- Forma de la plántula (1 año).

0: obcónica

1: botuliforme

2: clavada

3: cilíndrica

4: oblonga

Descripción: la codificación de la forma de las plántulas se realizó siguiendo las formas tridimensionales descritas por Eggli (1993) y Radford et al. (1974). Al codificar la forma de la plántula no diferenciamos entre hipocótilo y epicótilo, por lo que, nos referimos a la forma completa de las plántulas. La figura 20 muestra plántulas de diferentes formas a 1 año de edad.

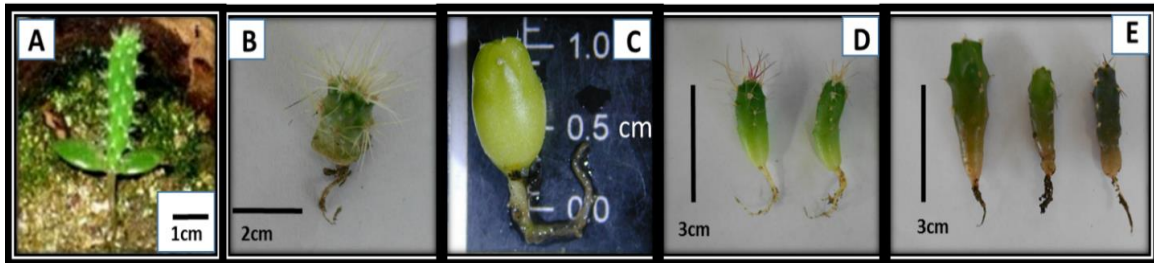


Figura 20. Forma de la plántula a 1 año de edad. **A.** Clavada en *Opuntia ficus-indica*. **B.** Obcónica en *Carnegiea gigantea*. **C.** Botuliforme en *Astrophytum asterias*. **D.** Cilíndrica en *Echinocactus parryi*. **E.** Las plántulas de *Echinocactus platyacanthus* son polimórficas y van de clavadas a oblongas. La fotografía A, fue obtenida en Stambouli-Essassi et al. (2017).

11.- Apariencia de las raíces (1 año).

0: raíz profunda

1: raíz somera

Descripción: la codificación de la apariencia de las raíces se generó en plántulas de un año y con base en nuestras observaciones, a través de las cuales pudimos determinar dos estados. De esta forma, las raíces profundas, se caracterizan por presentar una raíz primaria gruesa con pocas raíces secundarias; mientras que en

las raíces someras, se presenta una raíz primaria delgada y muchas raíces secundarias (Fig. 21).

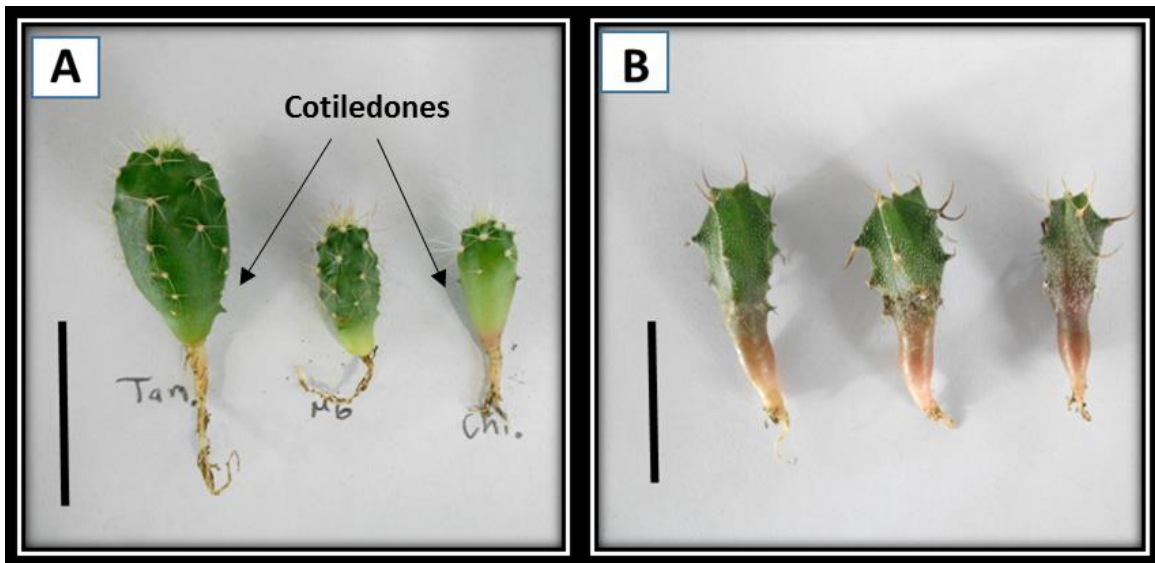


Figura 21. Apariencia de la raíces. **A.** Raíces profundas con raíz primaria gruesa en *Echinocactus texensis*. **B.** Raíces someras con raíz primaria delgada en *Astrophytum ornatum*.

12.- Presencia de cotiledones (1 año).

0: inconspicuos

1: conspicuos

Descripción: al cumplir un año de edad las plántulas que presentan cotiledones agudos, mantienen visibles dichos cotiledones, contrario a las plántulas con cotiledones obtusos y redondeados, en las cuales, estos se tornan inconspicuos. En la figura 21 podemos observar que *Echinocactus texensis* es una especie con cotiledones conspicuos, contrario a *Astrophytum ornatum* en la cual, estos desaparecen antes del primer año.

13.- Tipo de cotiledones (1 año).

0: confluentes

1: discretos

Descripción: existen plántulas como *Carnegiea gigantea* y otras especies de la tribu Phyllocacteeae, en las cuales los cotiledones se mantienen unidos por un borde (cotiledones confluentes), formando una especie de disco, sobre el cual se desarrolla el epicótilo. Por el contrario, en todas las especies de Cacteeae aquí estudiadas, los cotiledones están claramente separados (Fig. 22).



Figura 22. Tipos de cotiledones. **A.** *Carnegiea gigantea*, confluentes, obsérvese una base de forma elipsoide (elipse punteada), que mantiene el contacto entre los cotiledones y sobre la cual se va a desarrollar el epicótilo. **B.** *Echinocactus polycephalus*, con cotiledones claramente discretos. La distancia entre las líneas blancas de las escalas es equivalente a 1 mm.

14.- Color de las espinas (1 año).

0: hialinas

1: amarillentas a café claro

2: rojo a morado

Descripción: en términos generales, detectamos tres patrones de coloración: el primero, en el cual las espinas se mantienen hialinas hasta el primer año de edad

de las plántulas, el segundo, donde las espinas se tiñen de colores entre amarillo y café, y el tercero, en el cual las espinas se tiñen de colores que van de rojo a morado. Es importante aclarar que los colores sólo se presentan en algunas espinas y además, no se presentan en toda la superficie de la espina, más bien en manchones de diferentes longitudes. La fotografía B de la figura 24, muestra espinas con colores rojizos a morados y las fotografías D, E y F de la figura 19, son ejemplos de espinas hialinas.

15.- Forma del hipocótilo (1 año)

0: Cilíndrica

1: obcónica

2: botuliforme

Descripción: también la codificación de la forma del hipocótilo se realizó siguiendo las formas tridimensionales descritas por Radford et al. (1974) y Egli (1993). En figura 20 se observan algunas formas de hipocótilo a 1 año de edad. Por ejemplo, **A.** *Opuntia ficus-indica*, cilíndrica y **C.** *Astrophytum asterias*, botuliforme.

16.- Tipo de epicótilo (1 año).

0: con tubérculos en toda el epicótilo

1: con costillas

2: con tubérculos apicales

Descripción: este carácter se refiere al tipo de estructura presente en el epicótilo de plántulas de 1 año. En general, hay dos tipos de plántulas, unas con tubérculos y otras con costillas. Estos dos tipos de plántulas también se diferencian por su filotaxis. Las plántulas con tubérculos presentan filotaxis en espiral, a diferencia de las plántulas con costillas, las cuales tienen filotaxis en columnas (Mauseth, 2006).

Entre las plántulas de epicótilo con tubérculos estudiadas se distingue *Echinocactus horizonthalonius*, la cual presenta tubérculos sólo en la parte apical del epicótilo. En este caso se pudiera generar otro carácter a partir de este, es decir, tener un carácter para la presencia de costillas o tubérculos; y otro, para la distribución de los tubérculos, en todo el epicótilo, o sólo en el ápice. Sin embargo, decidimos tener solamente un carácter con tres estados porque los tubérculos apicales, es un estado autapomórfico de *Echinocactus horizonthalonius*. Por lo tanto, generar otro carácter no sería informativo. La figura 23 muestra ejemplos de los tres tipos de epicótilo determinados en este estudio.

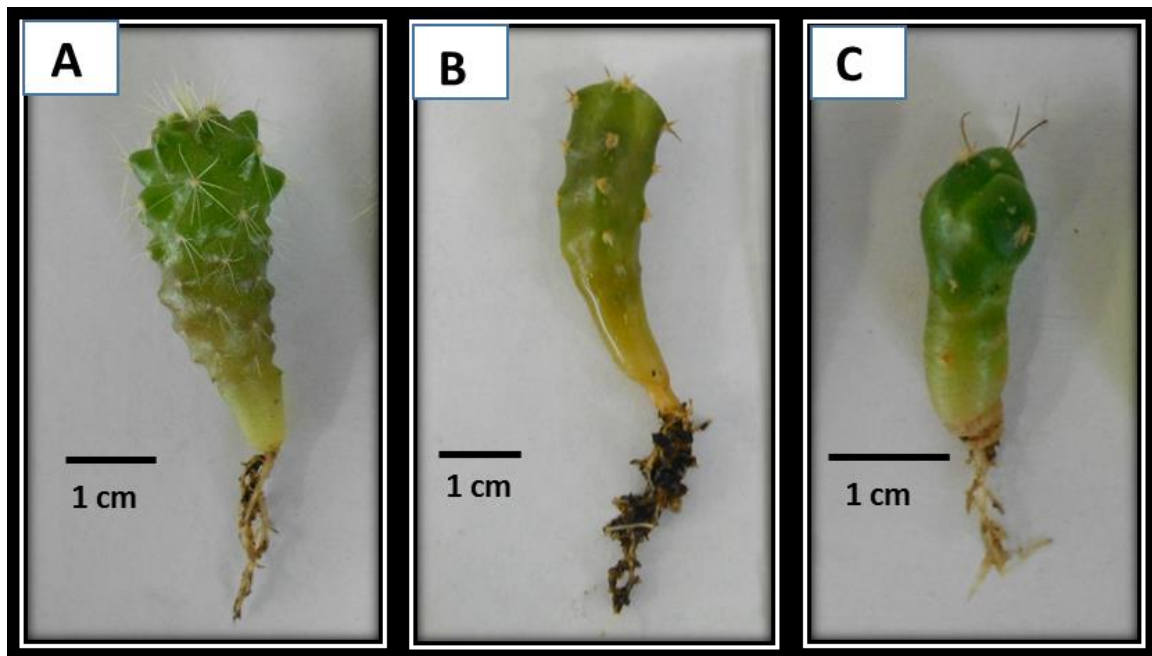


Figura 23. Tipo de epicótilo. **A.** Con tubérculos distribuidos en todo el epicótilo y filotaxis en espiral en *Echinocactus grusonii*. **B.** Con costillas y filotaxis en columnas en *E. platyacanthus*. **C.** Con tubérculos sólo en el ápice y filotaxis en espiral en *E. horizonthalonius*.

17.- Forma del epicótilo (1 año).

0: globoso

1: cilíndrico

2: cuadrangular

Descripción: la mayoría de las especies estudiadas presentan epicótilo de globoso a cilíndrico, sin embargo, un pequeño grupo de cuatro especies, *Echinocactus platyacanthus*, *Astrophytum myriostigma*, *A. capricorne* y *A. ornatum*, se caracterizan por presentar epicótilo cuadrangular (Fig. 24). Este carácter está estrechamente relacionado con el carácter 16, “tipo de epicótilo”, ya que las especies con epicótilo de forma cuadrangular, son aquellas que rápidamente durante las primeras etapas del desarrollo, sus areolas se ordenan primero en cuatro ejes verticales y luego en cinco, formando costillas evidentes.

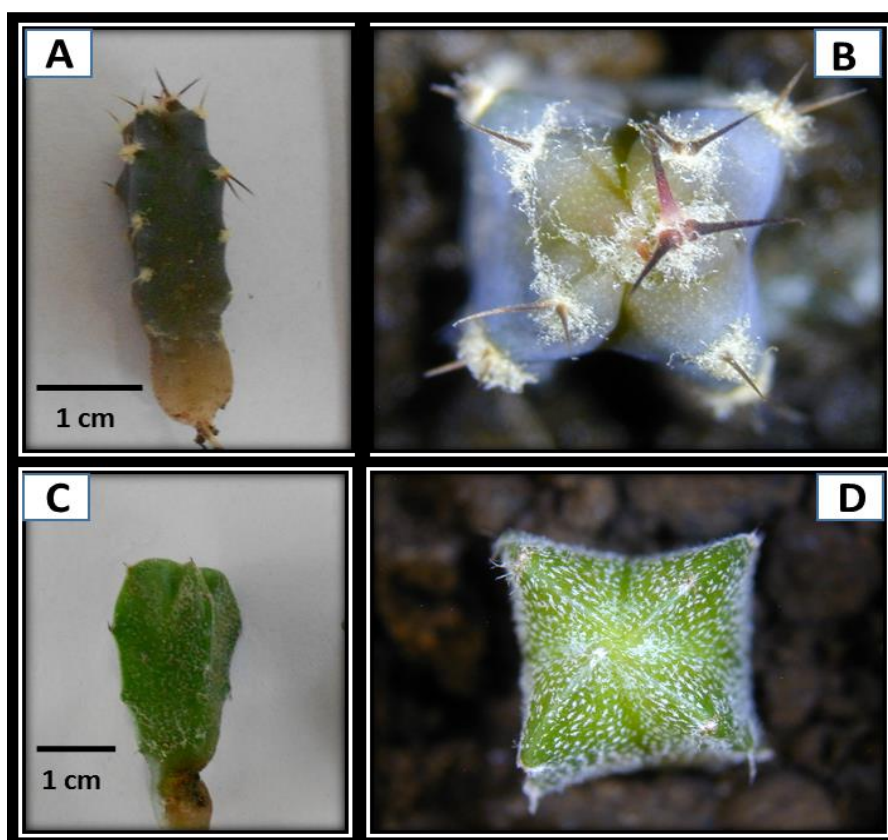


Figura 24. Epicótilo de forma cuadrangular. **A y B.** Vista lateral y apical de *Echinocactus platyacanthus*, respectivamente. **C y D.** Vista lateral y apical de *A. myriostigma*, respectivamente. Obsérvese en la fotografía D la epidermis del tallo con tricomas característicos de las especies de *Astrophytum*.

18.- Desarrollo del epicótilo (1 año).

0: poco desarrollado

1: muy desarrollado (elongado)

Descripción: este carácter fue codificado a partir de fotografías de plántulas tomadas cada 15 días, desde la primera semana de edad, hasta los 18 meses. Durante este tiempo, observamos que hay especies en las cuales el crecimiento apical del epicótilo es reducido, por ejemplo, *Astrophytum asterias*. Por el contrario, el epicótilo en especies como *Echinocactus platyacanthus* tiene un crecimiento apical mucho mayor (epicótilo elongado). Esto parece estar relacionado con la forma del tallo en estado adulto de las especies. En el caso de *A. asterias*, los individuos adultos presentan tallo depreso, por lo tanto, gran parte de su crecimiento es en diámetro, contrario a *E. platyacanthus*, que en estado adulto presenta tallos que van de toneliformes o columnares, por lo tanto, tiene un mayor crecimiento apical. Las fotografías C y E de la figura 20, muestran plántulas de un año de *A. asteria* y *E. platyacanthus*, respectivamente. Obsérvese la diferencia en el desarrollo del epicótilo entre las dos especies.

19.- Superficie del epicótilo (1 año).

0: tricomatoso

1: glabro

Descripción: este carácter es sinapomórfico para las especies del género *Astrophytum*, en las cuales, el tallo está cubierto por tricomas o “estigmas”. Las fotografías C y D de la figura 24, muestran una plántula de *A. myriostigma*, con epicótilo cubierto por tricomas, los cuales se observan como puntos blancos sobre la plántula.

Individuos adultos, incluidas flores y frutos (20-69)

La codificación de los caracteres morfológicos en estado adulto (incluye flores y frutos) fue realizada a través de observaciones y fotografías en el campo, así como de las descripciones en literatura especializada en las Cactaceae (Benson, 1982; Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1991; Anderson, 2001; Hunt et al. 2006), en las Cactaceae (Vázquez-Sánchez et al., 2012) y en *Echinocactus* (Chamberland, 1991, 1997; Ferguson, 1992).

20.- Tipo de crecimiento

0: simple

1: cespitoso

Descripción: en nuestro grupo de estudio podemos encontrar especies que tienen un crecimiento simple, es decir, la planta está compuesta por un solo tallo y especies con crecimiento cespitoso con múltiples ramificaciones. En *Echinocactus* la mayoría de las especies presentan tallos simples, con excepción de *E. parryi*, la cual rara vez presenta ramificaciones y *E. polycephalus s.l.* en la cual es común encontrar plantas compuestas por más de un solo tallo (Fig. 25).

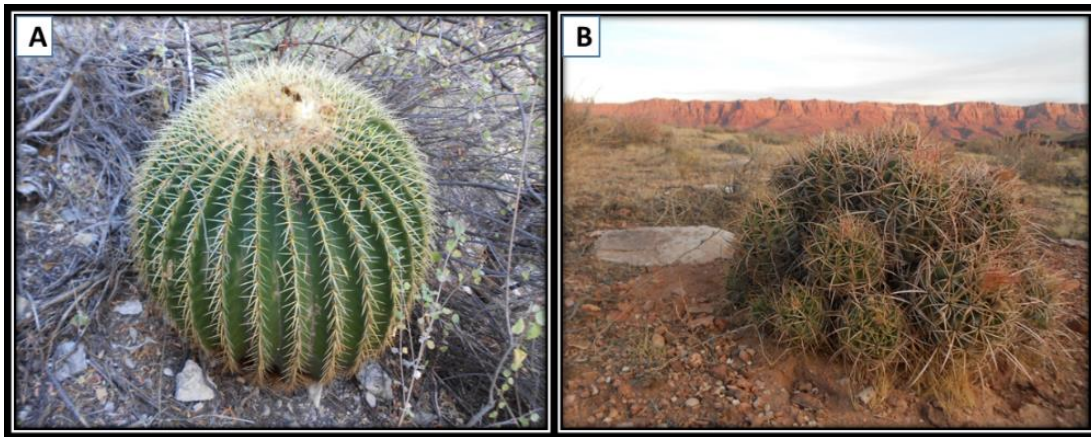


Figura 25. Tipo de crecimiento. **A.** Simple en *Echinocactus grusonii*. **B.** Crecimiento cespitoso en *E. polycephalus* var. *xeranthemoides*.

21.- Tipo de ramificación

0: basítona

1: mesótona

2: acrótona

Descripción: para determinar los estados de este carácter, nos basamos en los tipos de ramificación de las Cacteeae descritos en Vázquez-Sánchez et al. (2012). Según los autores, la ramificación en las Cacteeae es basítona cuando la ramificación se presenta en la base de los tallos como en *Ferocactus pilosus*, mesótona cuando se presenta aproximadamente en la parte media de los tallos, como en *Echinocactus polycephalus s.l.*, o acrótona cuando la ramificación es en la parte apical de los tallos, como en *Opuntia ficus-indica*. En la figura 26 se observan los tres tipos de ramificación. Debido a que no tenemos fotografías de *Opuntia ficus-indica* para ejemplificar la ramificación tipo acrótona, para este fin, utilizamos una fotografía de *Opuntia tomentosa* (fotografía C, figura 26).



Figura 26. Tipo de ramificación. **A.** Basítona en *Ferocactus hamatacanthus*. **B.** Mesótona en *Carnegiea gigantea*. **C.** Acrótona en *Opuntia tomentosa*, donde también se muestra la forma del tallo obovada en el recuadro ubicado en el extremo inferior derecho.

22.- Forma del tallo

0: obovado

1: columnar

2: toneliforme

3: cilíndrico

4: globoso

5: depreso

6: geofítico

Descripción: la forma del tallo la determinamos basados en las descripciones de la forma de crecimiento propuestas en Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada (1991); Anderson (2001); Hunt et al. (2006); Prado et al. (2010); Vázquez-Sánchez et al., (2012). En la figura 25 se observa un tallo toneliforme de *Echinocactus grusonii* y tallos de globosos a cilíndricos en *E. polycephalus* var. *xeranthemoides*. En la figura 26 se muestra un tallo columnar en *Carnegiea gigantea* y tallos obovados en los cladodios de *Opuntia tomentosa*.

23.- Color del tallo

0: verde claro

1: verde glauco

Descripción: para codificar el color del tallo nos basamos en fotografías de las especies tomadas en campo y en las descripciones de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991), Anderson (2001) y Hunt et al. (2006). Según nuestras observaciones y descripciones en la literatura de las especies estudiadas, el color verde claro solo se presenta en *Echinocactus grusonii* (Fig. 27).

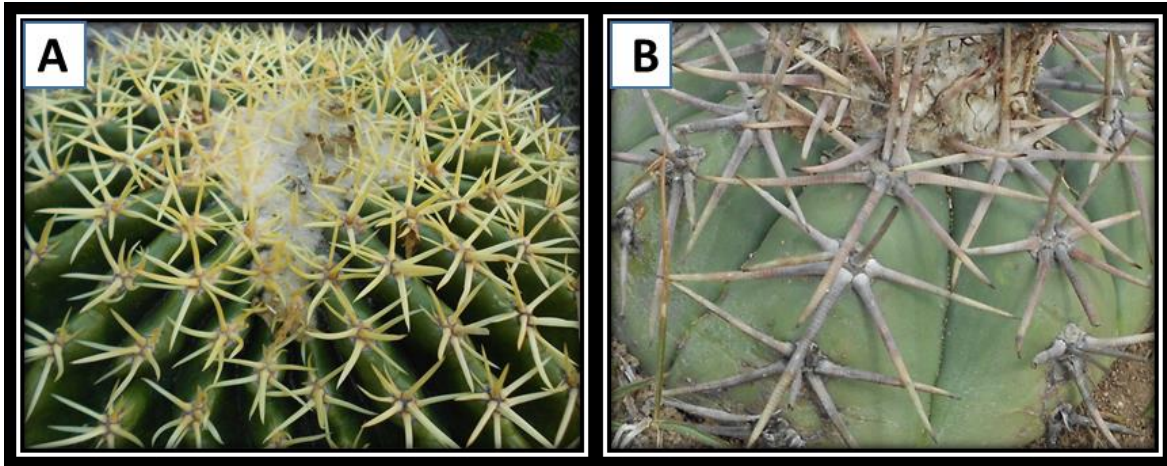


Figura 27. Color del tallo. **A.** Verde claro en *Echinocactus grusonii*. **B.** Verde glauco en *E. horizontalonius*.

24.- Tipo de epidermis del tallo

0: glabra

1: tricomatosa

Descripción: este es un carácter sinapomórfico de *Astrophytum* y se refiere a que el tallo se recubre de tricomas o “estigmas”. La epidermis tricomatosa en *Astrophytum* es una característica que se manifiesta desde las primeras etapas del desarrollo (Fig. 24).

25.- Pubescencia del ápice del tallo

0: glabro

1: ligeramente cubierto por tricomas

2: densamente cubierto por tricomas (pseudocefalio)

Descripción: debido a la dificultad que implica hacer este carácter cuantitativo, decidimos generar tres estados nominales tomando como base nuestras observaciones de campo, fotografías, especímenes de herbario y las descripciones de los tratados taxonómicos citados previamente. La figura 28 muestra la apariencia de dos especies con ápice densamente cubierto por tricomas, en una de las cuales (B) incluso se llega a formar un pseudocefalio y de otras dos especies con ápice ligeramente cubierto por tricomas.

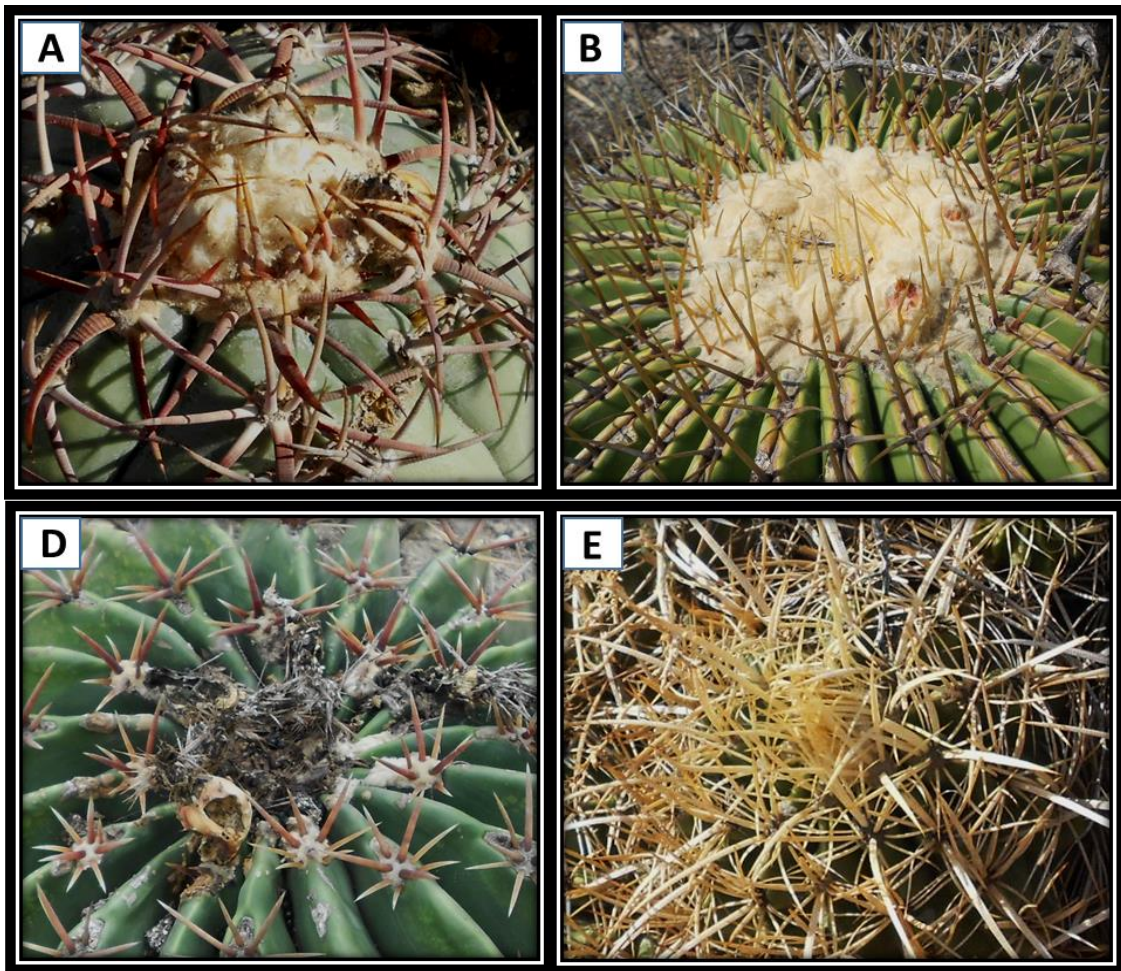


Figura 28. Apariencia del ápice en especies de *Echinocactus*. **A.** De ligeramente a fuertemente cubierto por tricomas, *E. horizontalionius*. **B.** Fuertemente cubierto por tricomas, *E. platyacanthus*. **D y E.** ligeramente cubierto por tricomas, *E. texensis* y *E. polycephalus* var. *xeranthemoides*, respectivamente.

26.- Forma de las costillas

0: aguda

1: obtusa

Descripción: en *Echinocactus* pudimos determinar dos formas de costillas, unas donde la parte distal es aguda y otras donde es obtusa. En el caso de *E. texensis*, *E. parryi* y *E. polycephalus* s.l., las costillas desde las primeras etapas del desarrollo se tornan agudas y se mantiene así durante las demás etapas. Por otra parte, *E. horizonthalonius* y *E. platyacanthus* en la etapa juvenil (5 a 10 cm de diámetro) presentan costillas obtusas. En el caso de individuos adultos de *E. platyacanthus*, las costillas aparentan una forma aguda, sin embargo, al observar detenidamente, se distingue que son obtusas, e incluso forma un surco en la parte distal de las costillas producto de sus areolas confluentes. Con el objetivo de apreciar mejor los dos estados de carácter, utilizamos fotografías de individuos juveniles (Fig. 29).

La forma de las costillas es uno de los caracteres que Ferguson (1992) utilizó para proponer la división infragenérica de *Echinocactus*. Este autor describió al subgénero *Echinocactus* como especies con costillas obtusas (*E. platyacanthus* y *E. grusonii*) y al subgénero *Homalocephala* con costillas agudas (*E. texensis*, *E. parryi* y *E. polycephalus*).

27.- Margen de las costillas

0: ondulado

1: recto

Descripción: el margen es la parte más distal de las costillas. En *Echinocactus* se pueden distinguir dos tipos, uno muy evidente y ondulado como en *E. polycephalus* var. *xeranthemoides* y *E. parryi* y otro, donde es menos evidente y se encuentra en línea recta, como en *E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius* (Fig. 29).

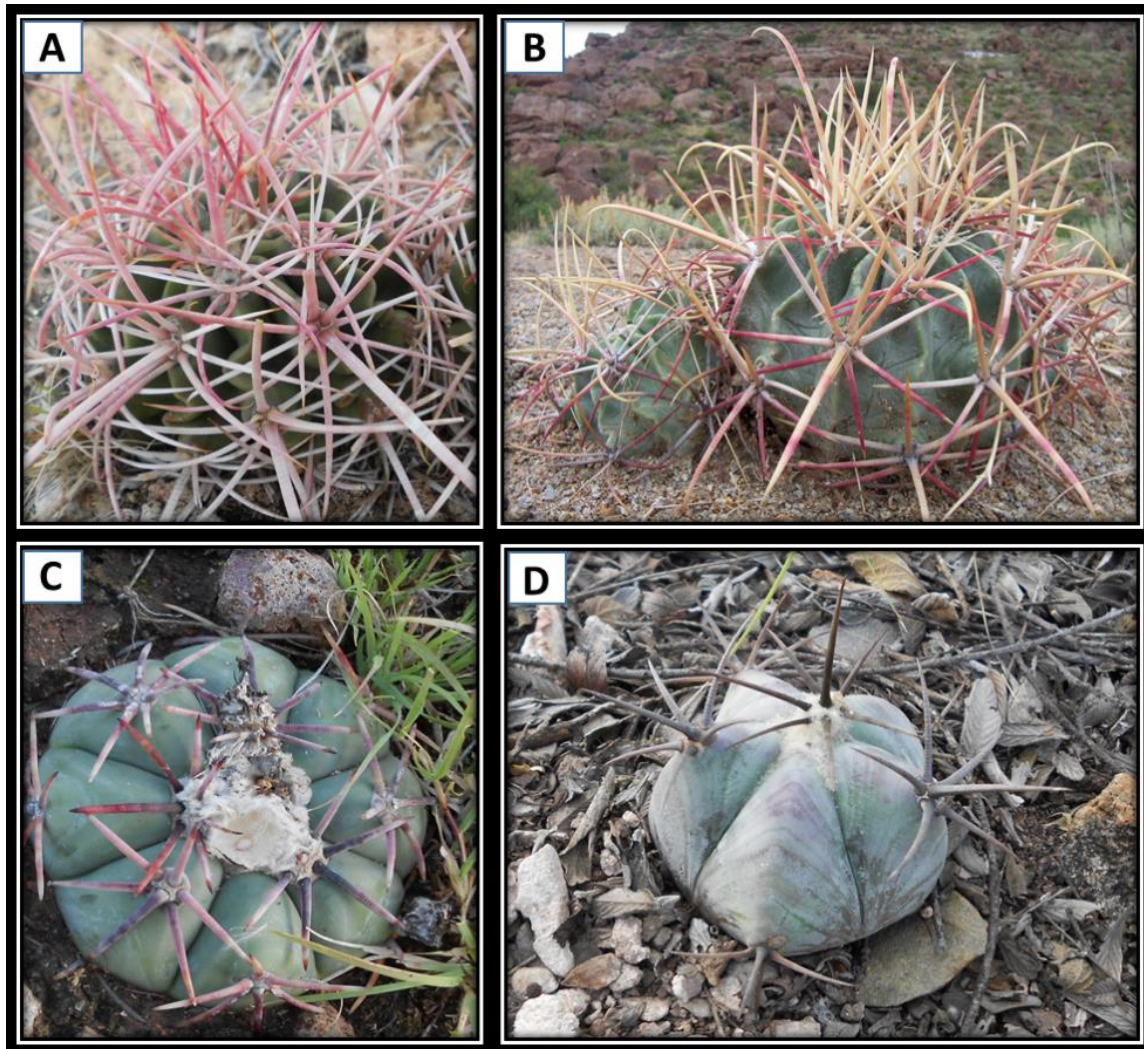


Figura 29. Forma de las costillas en *Echinocactus*. **A y B.** Costillas agudas con margen ondulado, *E. polycephalus* var. *xeranthemoides* y *E. parryi*, respectivamente. **C y D.** Costillas obtusas con margen recto, *E. horizontalonius* y *E. platyacanthus*, respectivamente.

28.- Forma de las areolas

0: circulares

1: ovoides

2: elípticas

3: obcordiformes

4.- oblongas

Descripción: este carácter fue codificado sólo a partir de las descripciones en las referencias citadas con anterioridad.

29.- Tipo de areola

0: confluyente

1: discreta

Descripción: el tipo de areola fue determinado a partir de observaciones en campo, revisión de especímenes de herbario y literatura. En el caso de areolas confluentes, estas se encuentran fusionadas unas con otras, contrario a las discretas donde existe un espacio de tallo entre las areolas. Las areolas confluentes se presentan en individuos muy grandes de especies con tallo toneliforme como, *Echinocactus grusonii* y *E. platyacanthus*. La figura 30 muestra los dos tipos de areola.

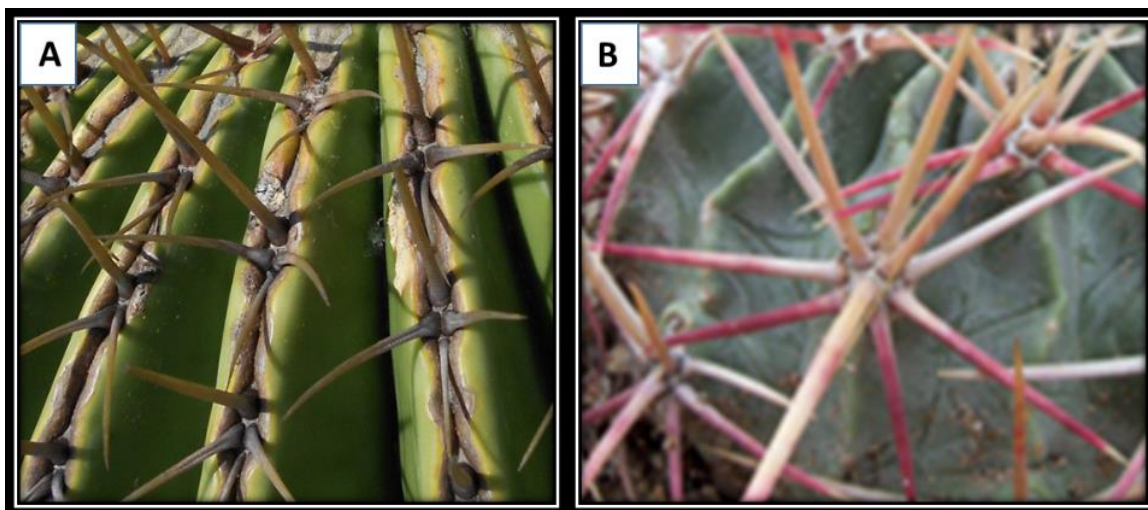


Figura 30. Tipo de areola. **A.** Confluyente en *Echinocactus platyacanthus*. Obsérvese el surco que conecta a las areolas y la disposición recta del surco. **B.** Discreta en *E. parryi*. Obsérvese el espacio de tallo entre las areolas y el margen ondulado.

30.- Superficie de las espinas

0: glabra

1: pubescente

Descripción: la superficie de las espinas de *Echinocactus parryi*, *E. polycephalus* var. *polycephalus* y *E. polycephalus* var. *xeranthemoides* fue estudiada por Chamberland (1991), quien determinó que los primeros dos taxones presentan superficie pubescente y el tercer taxón glabra. Chamberland observó las espinas a través de imágenes de SEM, donde vio que algunas espinas maduras principalmente del ápice del tallo presentan un recubrimiento de tricomas. Las espinas pubescentes tienen una apariencia grisácea cuando están secas, pero cuando se humedecen después de las lluvias adquieren un color rojizo. La figura 31 muestra fotografías tomadas a través de un microscopio estereoscópico de una espina con epidermis glabra y otra con epidermis pubescente.

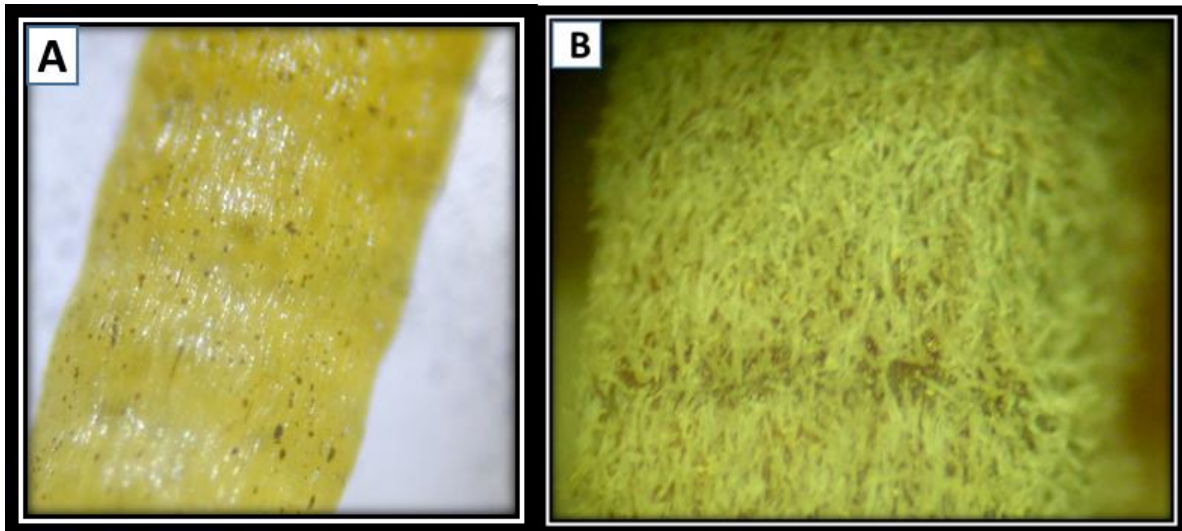


Figura 31. Superficie de las espinas. **A.** Superficie glabra de *Echinocactus grusonii*. **B.** Superficie pubescente en *E. texensis*. La fotografía B fue tomada del espécimen (Baker 16609, ASU).

Flores

Los caracteres morfológicos de las flores fueron codificados a partir de ejemplares de herbario y ejemplares fijados en alcohol al 76%, generados en este estudio. Para determinar las formas de las diferentes estructuras de la flor seguimos las formas tridimensionales y dimensionales descritas por Radford et al. (1974) y Egli (1993). Para completar algunos caracteres faltantes, utilizamos las descripciones de Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada (1991) y en menor medida las de Hunt et al. (2006).

Para evitar comparaciones erróneas y sólo comparar estructuras homologas, seguimos el esquema de las regiones anatómicas de la flor de *Echinocactus* de Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada (1991), (Fig. 32).

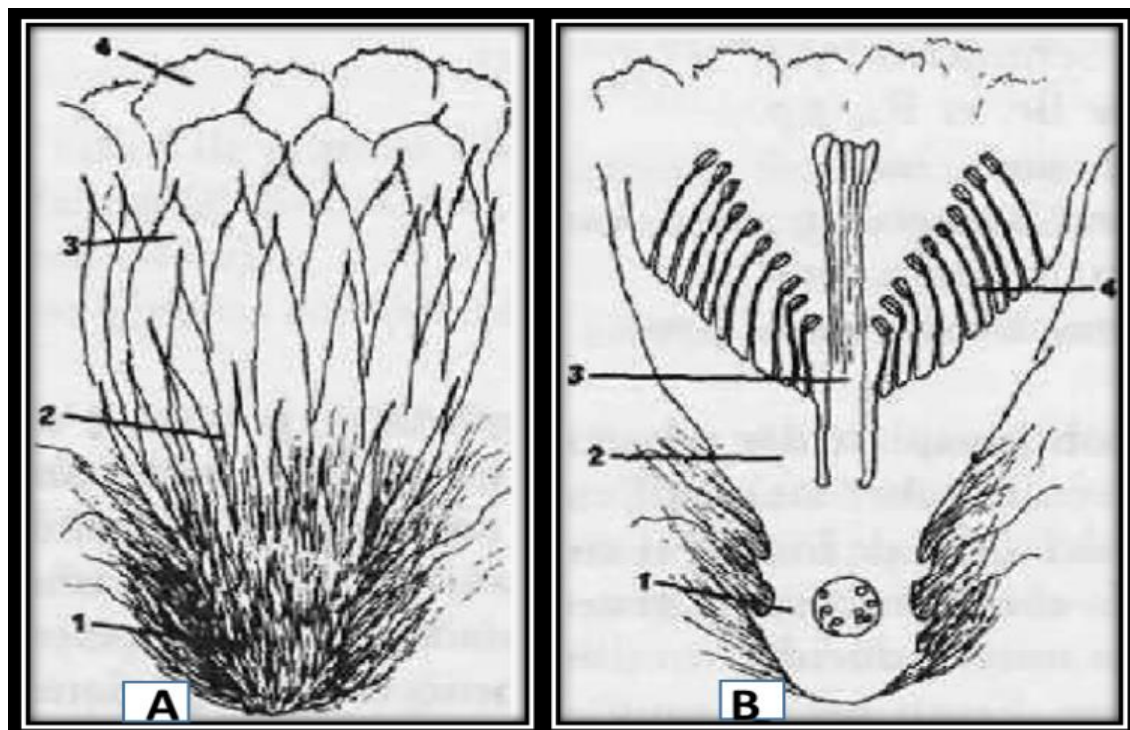


Figura 32. Dibujo esquemático de una flor de *Echinocactus*. **A.** Aspecto exterior de la flor: 1, pericarpelo, 2, tubo receptacular o receptáculo, 3, segmentos externos del perianto y 4, segmentos internos del perianto. **B.** Corte longitudinal de la flor mostrando: 1, pericarpelo, 2, tubo receptacular, 3, estilo y 4, estambres. Esquema tomado de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991).

31.- Longitud de los tricomas de las areolas floríferas

0: pequeños

1: grandes

Descripción: los tricomas de las areolas floríferas codificados como pequeños, son aquellos que no cubren todo el pericarpelo de la flor, (ej. *Echinocactus texensis*, *E. parryi* y *E. polycephalus s.l.*). Por otra parte, en *E. platyacanthus*, *E. texensis* y *E. grusonii*, las areolas floríferas producen tricomas que cubren a todo el pericarpelo. La figura 33 muestra un ejemplo de cada estado de carácter, la fotografía A corresponde a una flor de *E. platyacanthus* (Sánchez-Mejorada H. 2112, MEXU) y la fotografía B corresponde a una flor de *E. texensis* (Arias S. 1866, MEXU).

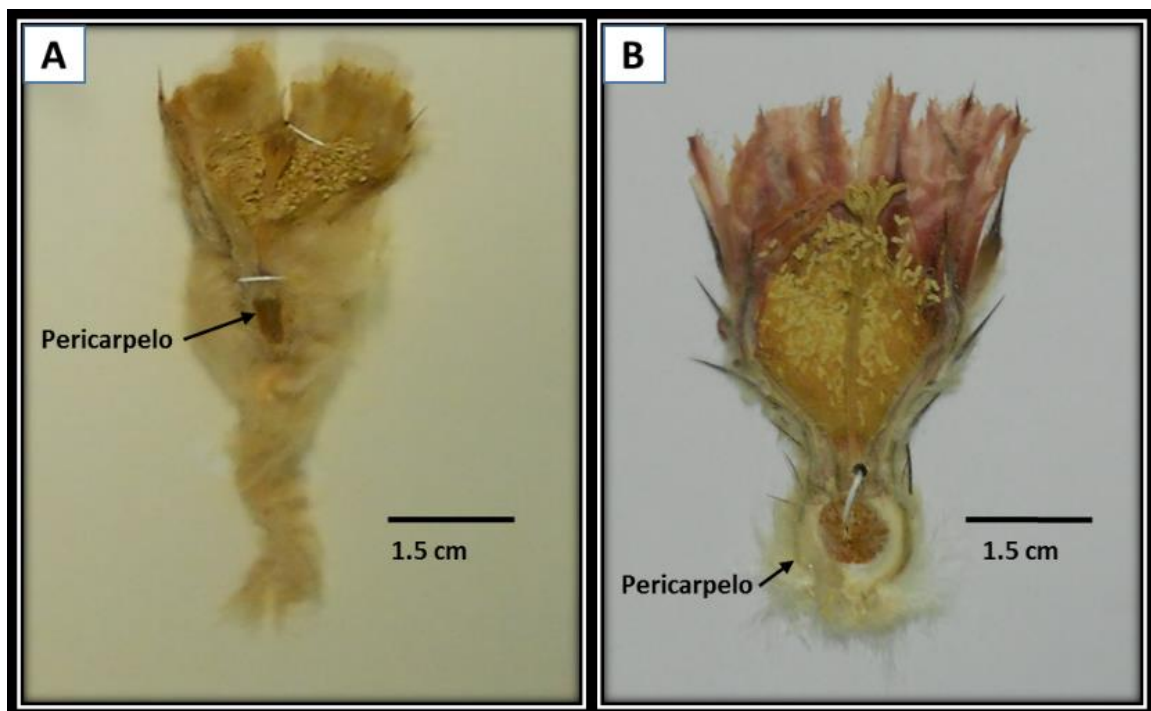


Figura 33. Longitud de los tricomas de las areolas floríferas. **A.** tricomas grandes que cubren a todo el pericarpelo en *Echinocactus platyacanthus*. **B.** tricomas pequeños que no cubren a todo el pericarpelo en *E. texensis*. En la fotografía A se puede observar el gran tamaño de los tricomas, los cuales alcanzan una extensión de más de 1.5 cm.

32.- Forma de la flor

0: campanulada

1: tubular

Descripción: la forma de la flor fue determinada siguiendo la terminología de Egli (1993). En *Echinocactus* pudimos determinar dos formas de flor, una campanulada y otra tubular (Fig. 34). La primera es característica de *E. grusonii*, *E. platyacanthus* y *E. horizonthalonius* y la segunda de *E. texensis*, *E. parryi* y *E. polycephalus s.l.*

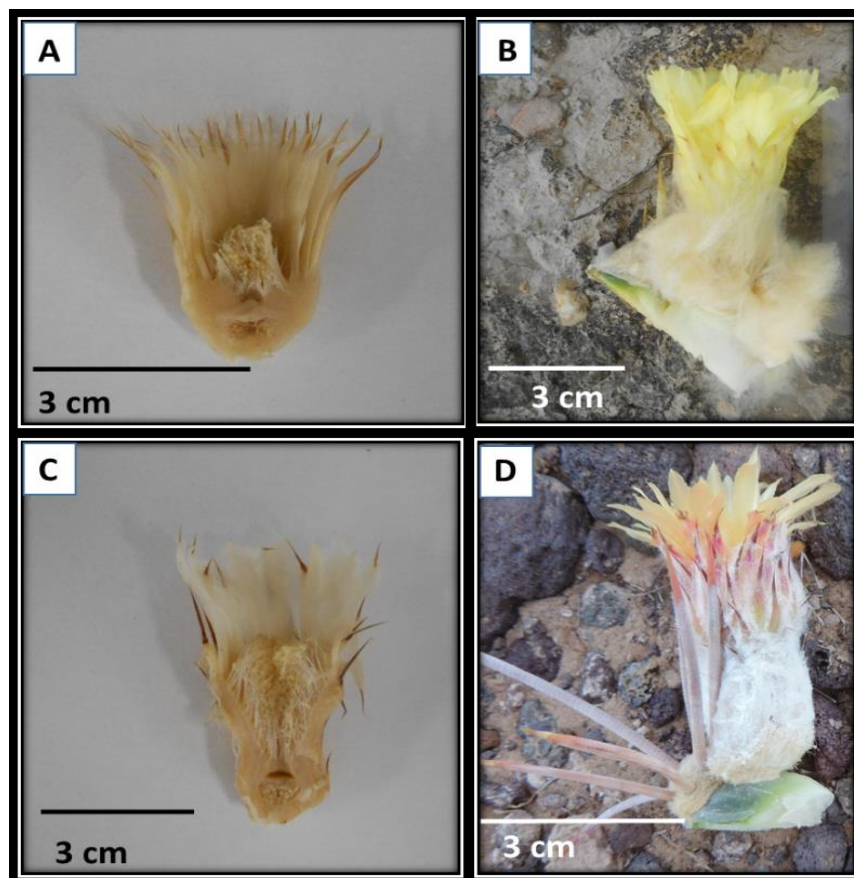


Figura 34. Forma de la flor en *Echinocactus*. **A.** Corte longitudinal de una flor campanulada de *E. grusonii*. **B.** Flor campanulada cubierta por grandes tricomas de *E. platyacanthus*. **C.** Corte longitudinal de una flor tubular de *E. texensis*. **D.** Flor tubular sin tricomas grandes en la areola florífera de *E. polycephalus* var. *polycephalus*.

33.- Posición de las areolas reproductivas

0: apical

1: subapical

Descripción: la posición de las areolas reproductivas se determinó siguiendo las descripciones de Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada (1991) y observaciones en campo. En nuestro grupo de estudio, incluyendo los grupos externos podemos encontrar especies cuyas flores y frutos emergen en la zona central del ápice, por ejemplo *Echinocactus texensis* y otras donde emergen alrededor del ápice formando una especie de corona, por ejemplo, en *Ferocactus histrix*. La figura 35 muestra flores y frutos en posición subapical de *F. histrix* y flores y frutos de *E. texensis* en posición apical.

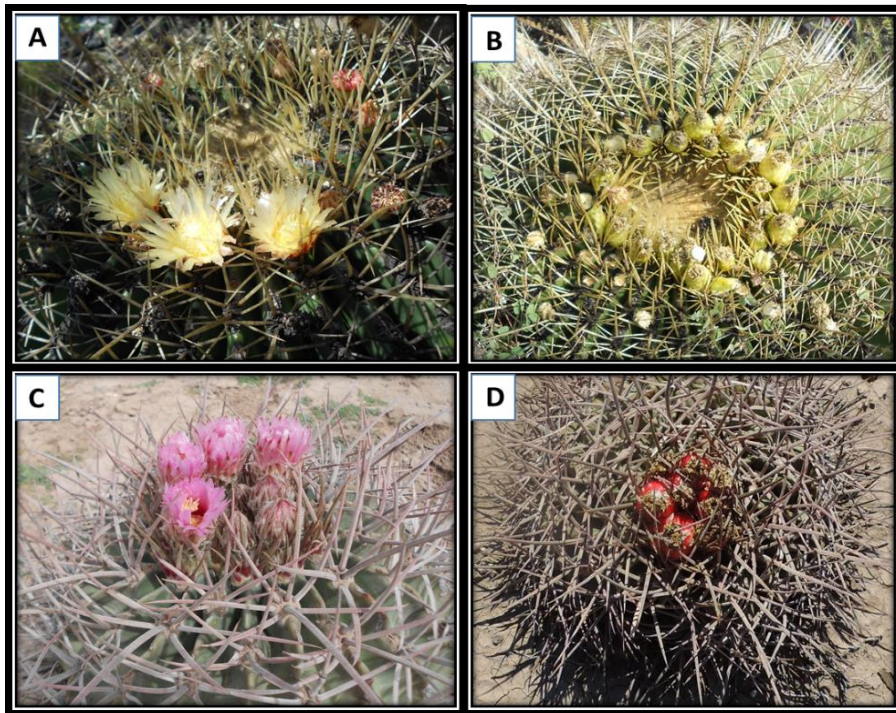


Figura 35. Posición de las areolas reproductivas en el tallo. **A y B.** Flores y frutos en posición subapical de *Ferocactus histrix*, respectivamente. **C y D.** Flores y frutos en posición apical de *Echinocactus texensis*, respectivamente.

34.- Superficie del pericarpelo

0: desnuda

1: con estructuras accesorias (espinas y/o escamas)

Descripción: la superficie del pericarpelo en nuestro grupo de estudio puede presentar diferentes estructuras, como espinas y tricomas en *Opuntia ficus-indica*, escamas y tricomas en *Carnegiea gigantea*, *Astrophytum*, *Echinocactus* y *Ferocactus*, o ser desnuda como en *Geohintonia* y *Aztekium*.

35.- Tipo de estructura accesorio del pericarpelo

0: escama

1: espina

Descripción: en nuestro grupo de estudio, incluidos los externos, podemos determinar dos tipos de estructuras accesorias en el pericarpelo. Las espinas son características de *Opuntia ficus-indica* y *Carnegiea gigantea* y las escamas lo son en *Astrophytum*, *Echinocactus* y *Ferocactus*.

36.- Presencia de tricomas en las areolas del pericarpelo

0: ausentes

1: presentes

Descripción: este carácter se codificó revisando las descripciones de la literatura, los especímenes de herbario y a través de observaciones de flores colectadas en campo. La presencia de tricomas en las areolas del pericarpelo es característico de las especies de *Echinocactus s.l.* y *Astrophytum*.

37.- Color del pericarpelo en anthesis

0: verde

1: verde amarillento

2: morado a rosa

3: marrón

Descripción: el color del pericarpelo fue codificado tomando como base las descripciones de las referencias bibliográficas y a través de observación de ejemplares de herbario y colectas de campo.

38.- Forma de las escamas del pericarpelo

0: ovada

1: filiforme a ligeramente triangular

Descripción: para codificar los estados de carácter seguimos las descripciones de las estructuras simétricas planas descritas en Radford et al. (1974) y las formas de dos dimensiones de Egli (1993). Decidimos unir a la forma filiforme y ligeramente triangular en un solo estado porque en algunas especies de *Astrophytum* y *Echinocactus* se presentan los dos estados y aparentemente, la forma filiforme se presenta cuando la escama no alcanzó a desarrollarse totalmente. Por otra parte, la escama ovada es común en las especies de *Ferocactus*. La figura 36 muestra la forma filiforme a linear triangular de las escamas del pericarpelo en especies de *Astrophytum* y *Echinocactus* y una escama ovada de *Ferocactus histrix*.

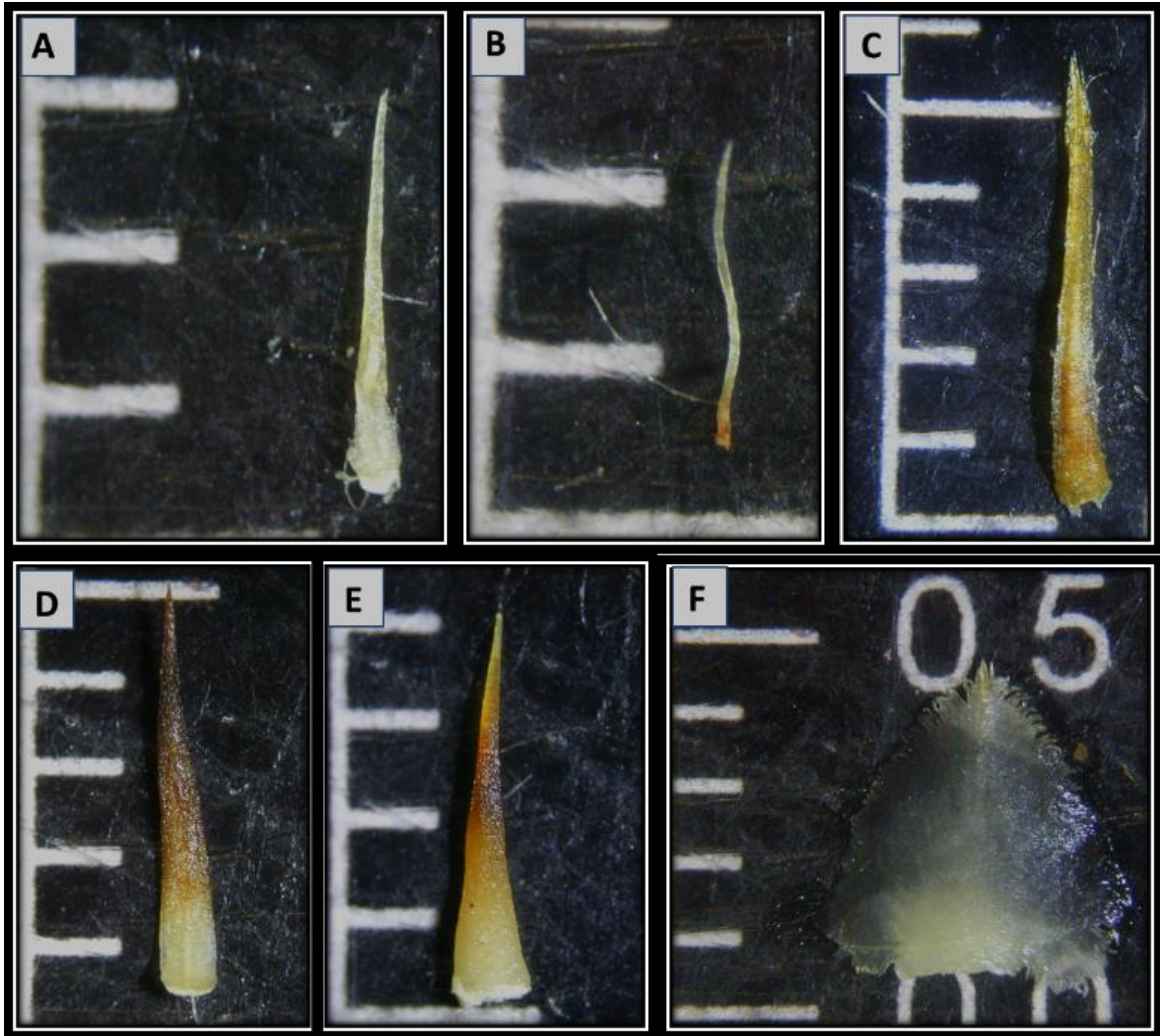


Figura 36. Forma de las escamas. **A, B, C, D y E.** Escamas de filiformes a linear triangular, *Echinocactus grusonii*, *Astrophytum asterias*, *A. ornatum*, *E. horizontalonius* y *E. parryi*, respectivamente. **F.** Escama ovada de *Ferocactus histrix*. Los espacios entre las líneas blancas de las escalas corresponden a 1 mm.

39.- Consistencia de las escamas del pericarpelo

0: carnososa

1: papirácea

2: esclerosa

Descripción: este carácter se codificó a partir de flores preservadas en alcohol al 76% y de las descripciones de Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada (1991). Las escamas de consistencia carnosa se presenta en algunas especies de *Ferocactus* y *Carnegiea gigantea*, las de consistencia esclerosa se presentan en todas las especies de *Echinocactus* y algunas de *Ferocactus* y las de consistencia papirácea en tres especies de *Astrophytum*. Una distinción entre escamas de consistencia papirácea y esclerosa, es que las primeras son frágiles como papel y no penetran la piel cuando se toma la flor con las manos y las de consistencia esclerosa son resistentes y penetran la piel a manera similar de una espina.

40.- Tipo de escama del pericarpelo

0: indiferenciada

1: diferenciada

Descripción: en este estudio pudimos diferenciar a través de un microscopio estereoscópico dos regiones morfológicas en algunas escamas del pericarpelo. En las escamas diferenciadas se distingue una parte basal que es de color claro y una región apical que es de color más oscuro, esta característica, cuando se presenta es independiente a la forma de la escama. En la figura 36, las fotografías A, B y C, son ejemplos de escamas indiferenciadas y las fotografías D, E y F, son ejemplos de escamas diferenciadas.

41.- Margen de las escamas del pericarpelo

0: entero

1: ciliado

Descripción: este carácter se codificó siguiendo las descripciones de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991) y a partir de observaciones de escamas del pericarpelo a través de un microscopio estereoscópico. Las fotografías A-E de la figura 36

muestran escamas con márgenes enteros y la fotografía F muestra una escama con margen ciliado.

42.- Ápice de las escamas del pericarpelo

0: acuminado

1: mucronado

Descripción: se determinaron dos tipos de ápice según lo descrito por Radford et al. (1974) y Eggli (1993). Ápices acuminados presentes en la mayoría de las especies de *Astrophytum* y *Echinocactus* y ápices mucronados presentes en especies de *Ferocactus* y *Carnegiea gigantea*. Las fotografías A, C, D y E de la figura 36, muestran escamas con ápice acuminado y la fotografía F muestra una escama con ápice mucronado.

43.- Superficie abaxial de las escamas del pericarpelo

0: glabra

2: pubescente

Descripción: la superficie abaxial de las escamas fue vista a través de un microscopio estereoscópico, logrando distinguir superficies glabras en la mayoría de las especies y pubescentes sólo en *Echinocactus parryi*, *E. texensis* y *E. polycephalus* var. *polycephalus*. Este carácter está relacionado con el que Chamberland (1997), codificó como “pubescencia de las escamas del hipanto del fruto”, ya que las escamas de la flor permanecen adheridas hasta la etapa de fructificación.

44.- Forma de las escamas del receptáculo

0: triangular

1: ensiforme

2: trulada

3: ovada

Descripción: para codificar los diferentes estados de carácter seguimos las descripciones de las estructuras simétricas planas descritas en Radford et al. (1974) y las formas de dos dimensiones de Egli (1993). La forma de las escamas de *Echinocactus grusonii* no coincide con ninguna de las figuras descritas por estos autores, sin embargo, decidimos codificarla como forma trulada según Radford et al. (1974) (Fig. 37).

45.- Consistencia del ápice de las escamas del receptáculo

0: carnososa

1: papirácea

2: esclerosa

Descripción: este carácter fue codificado igual que el número 39.

46.- Margen de las escamas del receptáculo

0: entero

1: ciliado

Descripción: este carácter fue codificado igual que el número 41.

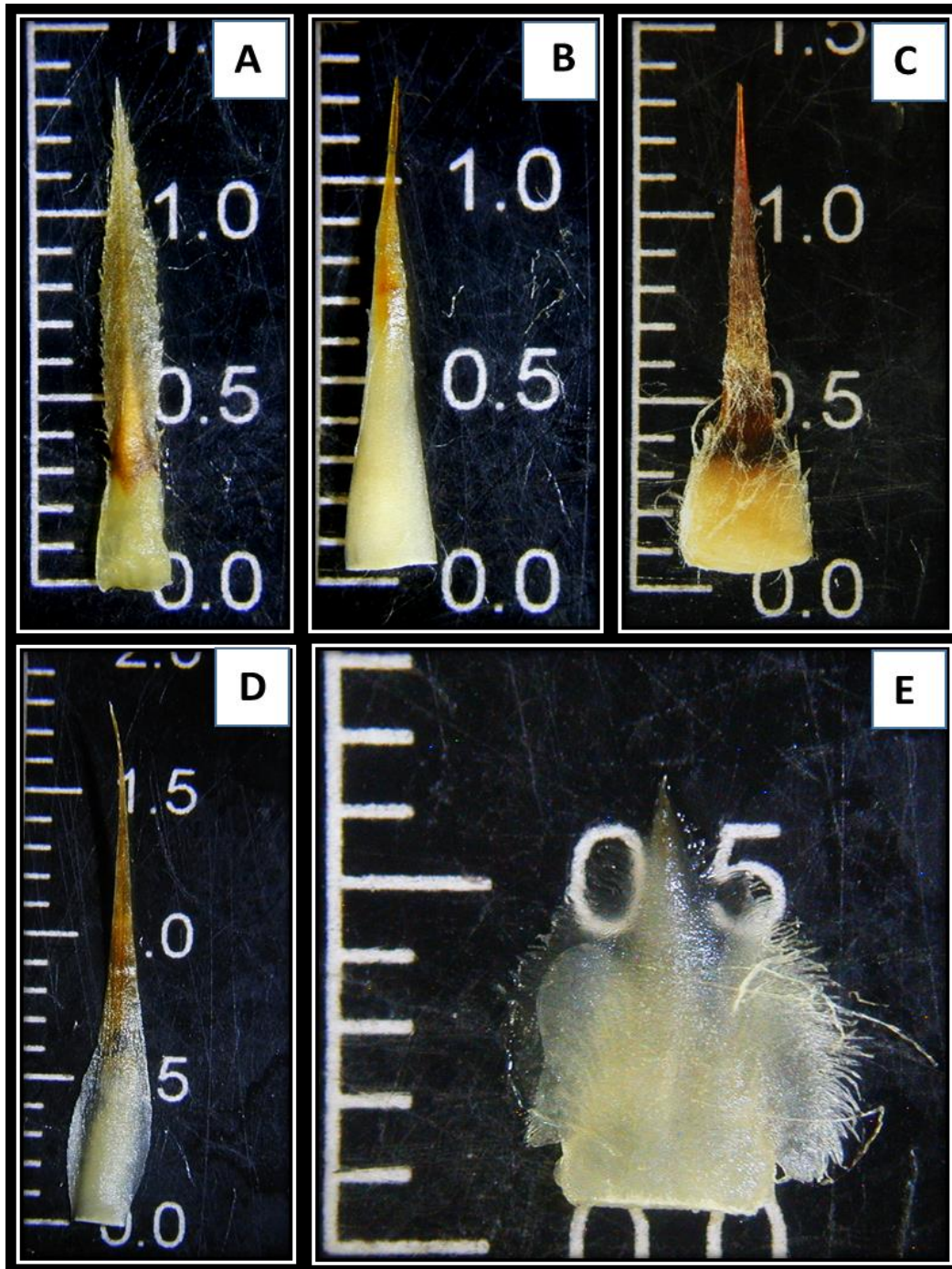


Figura 37. Forma de las escamas del receptáculo. **A.** Escama ensiforme de *Astrophytum ornatum*. **B.** Escama triangular de *Echinocactus platyacanthus*. **C.** Escama de triangular a ensiforme de *E. texensis*. **D.** Escama trulada de *E. grusonii*. **E.** Escama ovada de *Ferocactus glaucescens*.

47.- Ápice de las escamas del receptáculo

0: acuminado-cuspidado

1: mucronado

2: aristado

Descripción: algunas especies presentan ápices en las escamas del receptáculo que van de acuminadas a cuspidadas, por esto decidimos agrupar en un solo estado estas dos formas similares. Las fotografías A-D de la figura 37 muestran escamas con ápices acuminados a cuspidados y la fotografía E un ápice mucronado. La forma aristada sólo fue determinada para *Astrophytum asterias*.

48.- Superficie abaxial de las escamas del receptáculo

0: glabra

1: pubescente

Descripción: Este carácter fue codificado igual que el número 43. En la fotografía C de la figura 37 se observa ligeramente la pubescencia de las escamas del receptáculo de *Echinocactus texensis*.

49.- Forma de los segmentos externos del perianto (petaloides externos)

0: obovada

1: oblanceolada

2: elíptica

3: oblonga

4: lanceolada

Descripción: este carácter fue codificado al igual que el número 38 y 44 siguiendo las formas planas de Radford et al. (1974). La figura 38 muestra tres ejemplos de formas de segmentos externos del perianto en *Echinocactus*.



Figura 38. Forma de los segmentos externos del perianto en *Echinocactus*. **A.** Forma oblonga en *E. platyacanthus*. **B.** Forma oblanceolada en *E. polycephalus*. **C.** Forma elíptica en *E. grusonii*.

50.- Tipo de segmento externo del perianto

0: indiferenciado

1: diferenciado

Descripción: este carácter fue codificado igual que el número 40.

51.- Margen de los segmentos externos del perianto

0: entero

1: ciliado

Descripción: este carácter fue codificado igual que el número 41.

52.- Ápice de los segmentos externos del perianto

0: mucronado

1: cuspidado

2: apiculado

3: acuminado

4: obtuso

Descripción: para codificar este carácter, nos basamos en las formas de ápices de Radford et al. (1974) y Eggli (1993), así como en las descripciones de Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada (1991). Las fotografías A y B de la figura 38 muestran dos segmentos externos del perianto con ápice apiculado y la fotografía C, es un ejemplo de ápice cuspidado.

53.- Patrón de coloración de los segmentos externos del perianto

0: homogéneo

1: heterogéneo

Descripción: en nuestro grupo de estudio, incluyendo grupos externos, se presentan dos tipos de coloración de los segmentos externos del perianto. Uno homogéneo, donde el segmento es de un sólo color y el otro heterogéneo, donde el segmento es de dos colores. La fotografía A de la figura 39 muestra una flor con segmentos externos de coloración homogénea, contrario a las fotografías B, C y D, donde los segmentos externos presentan coloración heterogénea.

54.- Patrón de coloración heterogénea de los segmentos externos del perianto

0: base y ápice de diferente color

1: vena central y margen de diferente color

Descripción: cuando la coloración de los segmentos externos del perianto es heterogénea, esta puede presentar dos patrones. El primero donde la base y el ápice del segmento presentan colores diferentes, por ejemplo, los segmentos externos de *E. parryi* con base rojiza y ápice amarillo. El segundo patrón de coloración, presenta la vena central y el margen del segmento con diferentes colores, por ejemplo, en los segmentos de *F. hystrix* en los cuales la vena central es rojiza y el margen amarillo (Figura 39).

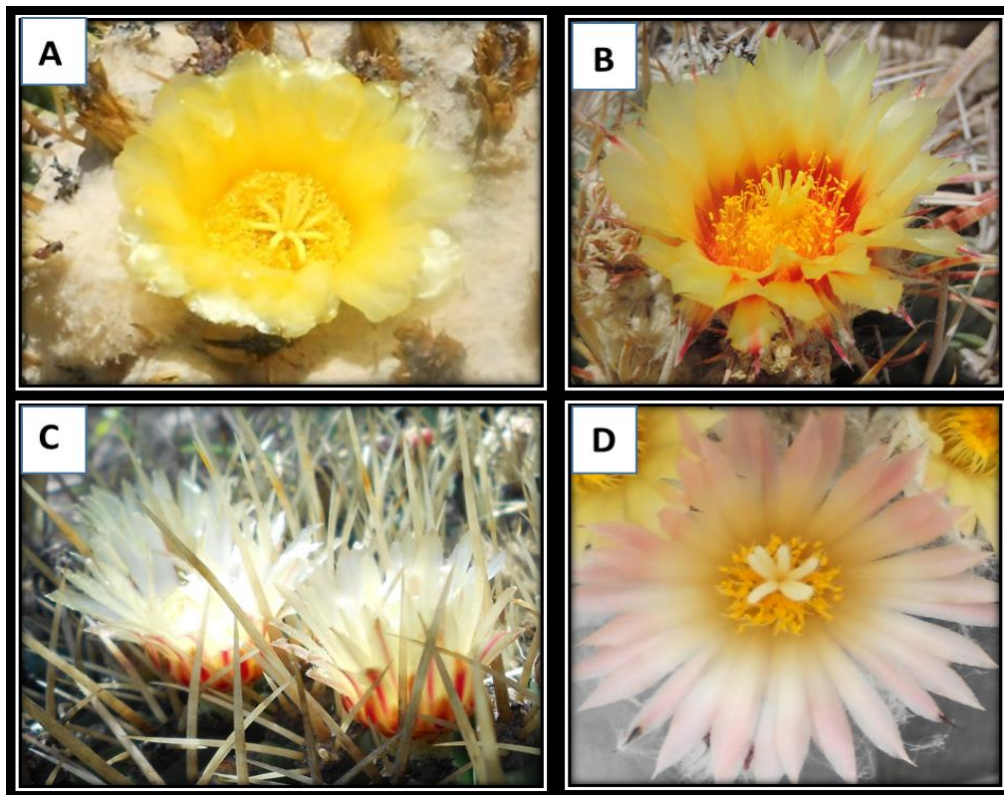


Figura 39. Patrones de coloración de los segmentos externos del perianto. **A.** Homogéneo en *Echinocactus platyacanthus*. **B y D.** Heterogéneo con la base y el ápice del segmento de diferentes colores en *E. parryi* y *Astrophytum myriostigma*. **C.** Heterogéneo con la vena central y el margen de diferentes colores en *Ferocactus hystrix*.

55.- Forma de los segmentos internos del perianto

0: cordiformes

1: obovados

2: oblanceolados

3: ligeramente elípticos

4: estrechamente romboides

5: lanceolados

Descripción: este carácter fue codificado igual que los caracteres 38, 44 y 49, siguiendo las figuras planas de Radford et al. (1974). Las fotografías A y B de la figura 40, representan segmentos externos de forma oblanceolada, característicos de las especies de *Astrophytum* y *Echinocactus*, excluyendo a *E. grusonii*, especie que presenta segmentos ligeramente romboides, fotografía C.

56.- Margen de los segmentos internos del perianto

0: entero

1: ciliado

2: aserrado

Descripción: carácter codificado igual que los caracteres 41,46 y 51, siguiendo las descripciones de Radford et al. (1974).

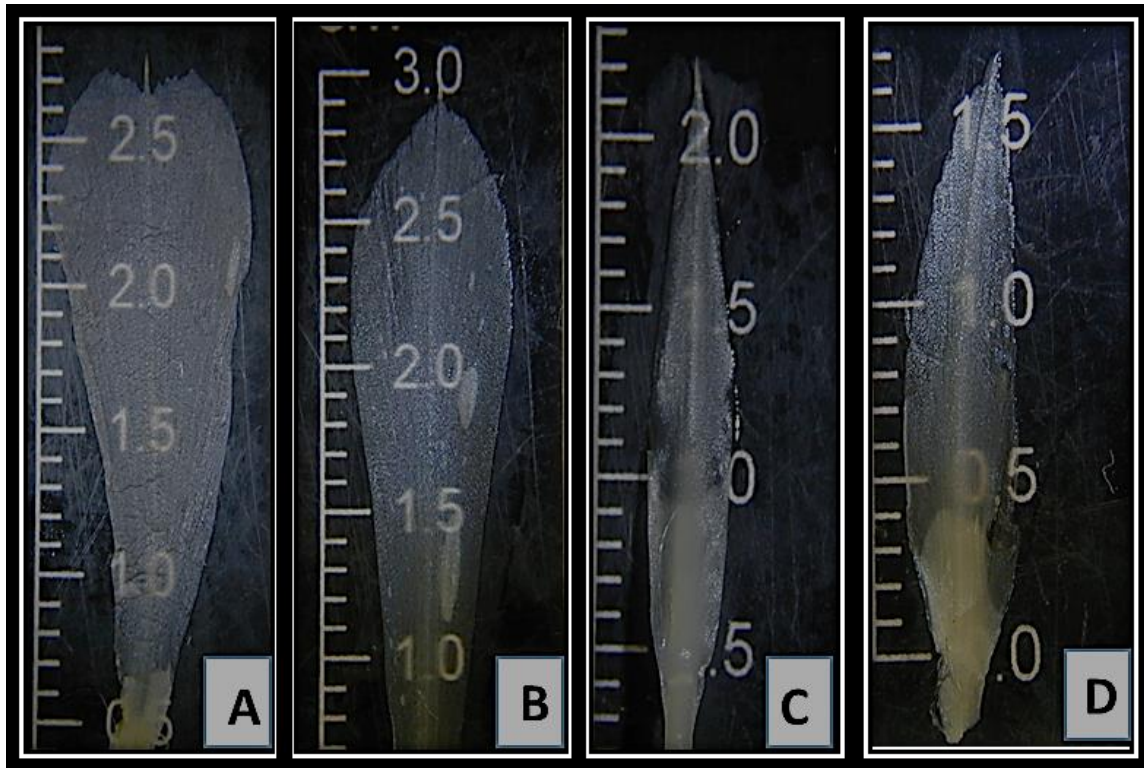


Figura 40. Forma de los segmentos internos del perianto. **A y B.** Forma oblanceolada en *Echinocactus horizonthalonius* y *Astrophytum capricorne*. **C.** Forma ligeramente romboide en *E. grusonii*. **D.** Forma lanceolada en *Ferocactus echidne*.

57.- Ápice de los segmentos internos del perianto

0: mucronado

1: obtuso

2: apiculado

3: acuminado

Descripción: los tipos de ápices de los segmentos internos fueron determinados a partir de observaciones a través de un microscopio estereoscópico y utilizando las descripciones de Radford et al. (1974) y Egli (1993). Algunas especies fueron codificadas a partir de las descripciones de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada

(1991). Las fotografías A y B de la figura 40 son ejemplos de segmentos internos del perianto con ápice apiculado, contrario a las fotografías C y D de la misma figura, donde se muestran segmentos con ápices acuminados.

58.- Patrón de coloración de los segmentos internos del perianto

0: homogéneo

1: heterogéneo

Descripción: este carácter fue codificado de la misma manera que el número 53.

59.- Patrón de coloración heterogénea de los segmentos internos del perianto

0: base y ápice de diferente color

1: vena central y margen de diferente color

Descripción: este carácter fue codificado de la misma manera que el número 54.

60.- Forma del estilo

0: piriforme

1: cilíndrica

Descripción: Debido a que no tuvimos al alcance flores de *Opuntia ficus-indica* y a que sólo encontramos una breve descripción de la forma del estilo de esta especie, en la cual se describe como abultada (Benson, 1982), utilizamos en su lugar flores de *Opuntia tomentosa*. En las especies estudiadas pudimos distinguir dos formas de estilo floral. Uno de forma piriforme, presente sólo en *Opuntia tomentosa* y otro con forma cilíndrica, presente en el resto de las especies. La fotografía A de la figura 41 muestra un estilo piriforme, a diferencia de las fotografías B y C de la misma figura, donde se muestran estilos cilíndricos.

61.- Superficie del estilo

0: lisa

1: surcada

Descripción: para codificar este carácter, observamos los estilos de especímenes fijados en alcohol al 76% a través de un microscopio estereoscópico. Pudimos determinar dos estados de carácter, uno donde la superficie del estilo es lisa (Fig. 41, B) y la otra donde se observan unos surcos longitudinales (Fig. 41, C).

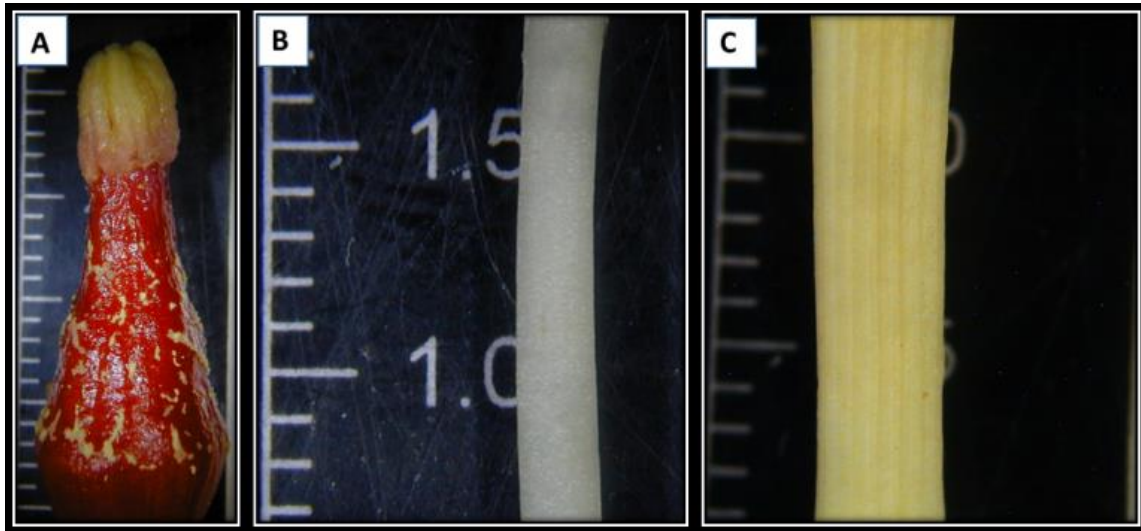


Figura 41. Forma y superficie del estilo. **A.** Estilo piriforme y superficie surcada de *Opuntia tomentosa*. **B.** Estilo en forma de terete y superficie lisa de *Echinocactus horizonthalonius*. **C.** Estilo en forma de terete y superficie surcada de *E. texensis*. El espacio entre las barras de las escalas equivale a 1 mm.

Frutos

62.- Forma del fruto

0: ovoide

1: globoso

2: claviforme

Descripción: siguiendo las formas tridimensionales descritas por Egli (1993), y las descripciones de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991), determinamos tres estados de carácter. La descripción de la forma del fruto se restringió a la parte donde se encuentran las semillas (barras negras de las fotografías de la figura 42) y excluimos la parte apical correspondiente a los restos secos del perianto. La figura 42 muestra dos frutos ovoides y uno globoso correspondientes a especies de *Echinocactus*.

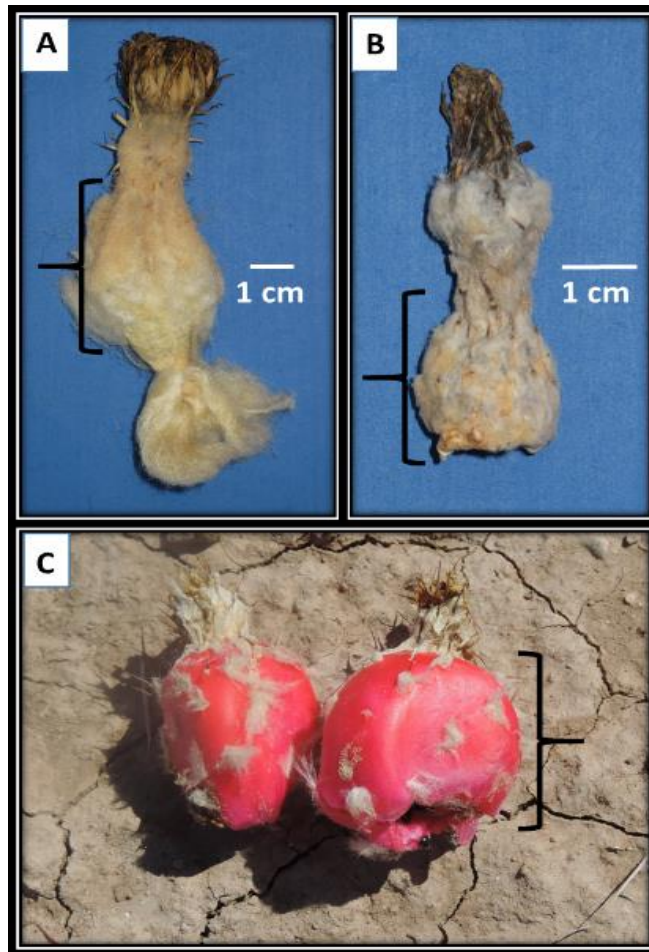


Figura 42. Forma del fruto. **A y B.** Frutos ovoides cubiertos por escamas y tricomas de *Echinocactus platyacanthus* y *E. parryi*, respectivamente. **C.** Fruto globoso de *E. texensis* con pocas escamas y tricomas. Las barras negras indican la parte considerada como fruto, excluyendo los restos secos de perianto de la parte apical.

63.- Tipo de fruto en estado maduro

0: seco

1: carnosos

Descripción: siguiendo las descripciones de Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada (1991), Anderson (2001) y Hunt et al., (2006), determinamos dos estados de carácter para el tipo de fruto. Aun cuando todos los frutos estudiados son carnosos al principio, unos se deshidratan rápidamente al madurar (frutos secos) y otros se mantiene carnosos al madurar (carnosos). Las fotografías A y B de la figura 42 muestran dos frutos secos y la fotografía C a uno carnosos.

64.- Pared del fruto

0: glabra

1: con areolas y estructuras accesorias (espinas, tricomas y/o escamas)

Descripción: siguiendo las descripciones de las referencias citadas con anterioridad y nuestras observaciones de los frutos a través del microscopio estereoscópico, determinamos frutos con una pared desnuda o glabra y otros con presencia de areolas con diferentes estructuras como espinas, tricomas y escamas. Como se observa en la figura 42, los frutos de las especies de *Echinocactus* se caracterizan por presentar escamas y tricomas.

65.- Presencia de espinas en el fruto

0: ausentes

1: presentes

66.- Presencia de tricomas en el fruto

0: ausentes

1: presentes

67.- Presencia de escamas en los frutos

0: ausentes

1: presentes

68.- Forma de las escamas de la pared del fruto

0: ovadas

1: ligeramente triangular

Descripción: aun cuando Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991), describen varias formas de escamas del fruto en *Ferocactus*, como cordiformes, semicirculares, entre otras, decidimos codificar una sola forma para estas especies, ya que todas tienen una forma general ovada. Por otra parte, para las especies de *Echinocactus* las escamas del fruto son comúnmente ligeramente triangulares. La figura 43 muestra un ejemplo de cada una de las formas generales codificadas para este carácter.

69.- Margen de las escamas de la pared del fruto

0: entero

1: ciliado

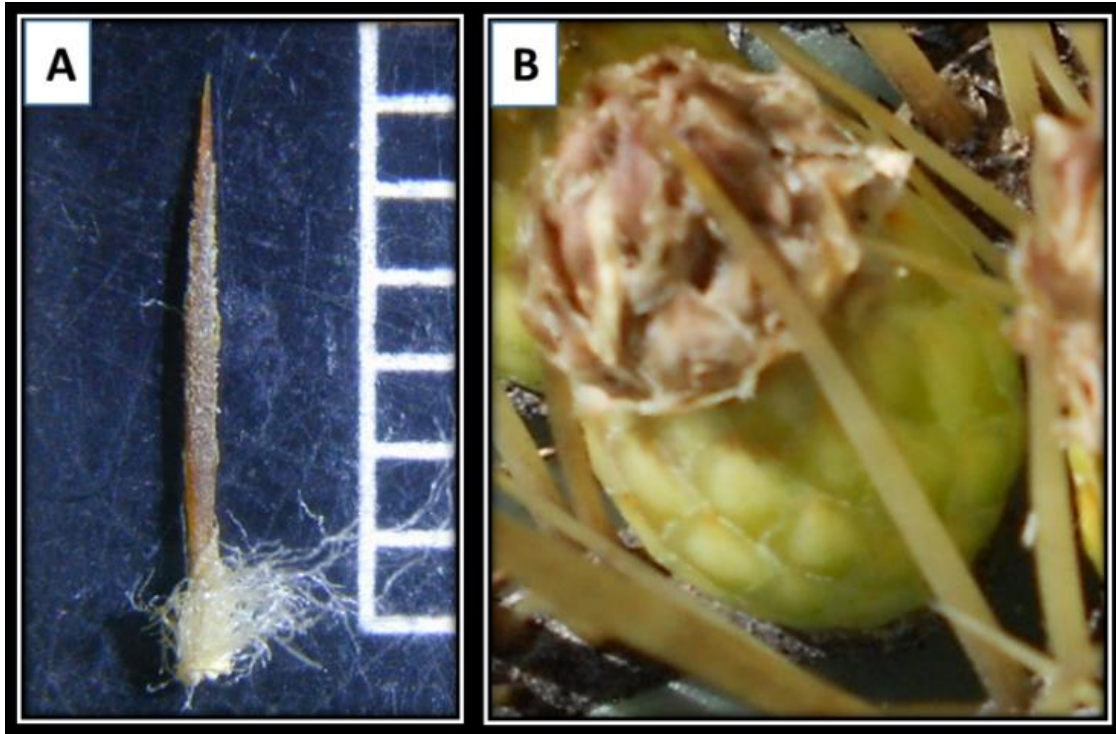


Figura 43. Forma de las escamas del fruto. **A.** Escama ligeramente triangular en *E. texensis*. **B.** Escamas ovadas en fruto de *Ferocactus histrix*.

Semillas (70-87)

Los caracteres morfológicos de las semillas fueron codificados siguiendo la terminología de Barthlott y Hunt (2000). Incluso, varios caracteres fueron codificados a partir sólo de las descripciones e imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM), por sus siglas en inglés, de estos autores. Esto fue complementado con descripciones e imágenes de SEM de especies particulares, por ejemplo, para algunas especies de *Echinocactus*, nos basamos también en el trabajo de Doweld (2000).

70.- Forma de la semilla

0: circular/orbicular (< 1.09)

1: casi ovalada/ovada/ovoide (1.10-1.49)

2: oval (1.50-1.99)

Descripción: para codificar este carácter consideramos la forma de la semillas determinada por Barthlott y Hunt (2000). La obtención de la forma de las semillas se hace a través de dividir la longitud del eje más grande, entre el eje más corto (valor de radio). Los autores determinaron cuatro formas dependiendo del valor obtenido en la división de la longitud del eje grande entre el eje menor (valor de radio).

Para corroborar la forma de las semillas de las especies de *Echinocactus* tomamos al azar 10 semillas provenientes de diferentes poblaciones, estas fueron visualizadas y fotografiadas a través de un microscopio estereoscópico. Posteriormente, tomamos las medidas correspondientes a los dos ejes de las semillas en el software imageJ (Abramoff et al. 2004) y obtuvimos el valor promedio para cada eje de las 10 semillas y con esto, estimamos el valor de radio promedio.

La figura 44 muestra una semilla oval de *E. grusonii*, donde se observan los dos ejes medidos en imageJ. En este ejemplo, vemos que el eje más grande mide 1.41 mm y el menor 0.87 mm. Al dividir el primer valor entre el segundo resulta en un valor de radio de 1.62, por lo tanto, esta es una semilla oval. No obstante, al tomar las medidas de las 10 semillas de *E. grusonii*, obtuvimos un valor promedio para el eje mayor de 1.29 mm y para el eje menor se obtuvo un promedio de .89 mm, resultando en un valor de radio promedio de 1.44. Por lo tanto, la semilla de *E. grusonii* fue codificada como forma ovada.

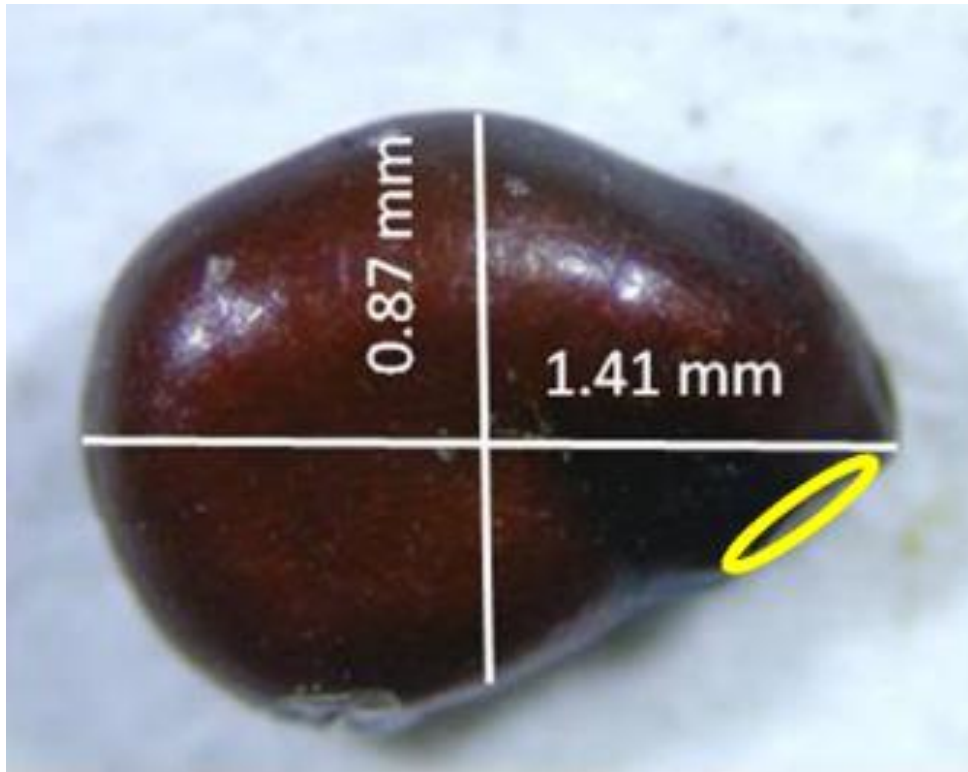


Figura 44. Semilla de *Echinocactus grusonii*. Las líneas blancas indican el eje mayor (1.41 mm) y menor (0.87 mm). Obsérvese la región hilo-micrópilo RHM (aro amarillo), en posición oblicua respecto al eje mayor.

71.- Tamaño de la semilla

- 0: muy pequeña (0.3-0.8 mm)
- 1: pequeña (0.9-1.1 mm)
- 2: mediana (1.2-1.9 mm)
- 3: grande (2.0-2.9 mm)
- 4: muy grande (3.0-3.9)
- 5: extremadamente grande (4.0-4.8 mm)

Descripción: para codificar este carácter, simplemente consideramos el promedio de la longitud del eje mayor de las diez semillas muestreadas y seguimos los estados propuestos por Barthlott & Hunt (2000).

72.- Posición del hilo

0: basal

1: oblicua

2: perpendicular

Descripción: la ubicación del hilo en las especies estudiadas puede tener tres orientaciones con respecto al eje de mayor longitud, oblicua, basal o perpendicular. Este carácter es similar al que Barthlott y Hunt (2000) describieron como orientación de la RHM. Sin embargo, debido a la relativa gran separación que existe entre el hilo y el micrópilo en las especies de *Astrophytum*, decidimos sólo considerar la posición del hilo para codificar este carácter. La figura 45 muestra los tres estados de carácter codificados para la posición del hilo. La fotografía de las semillas de *Aztekium riterii* de la figura 45 fue descargada de internet (<http://cactus-aventures.com/TaxonomySeedGallery/Seeds%20album/slides/>).

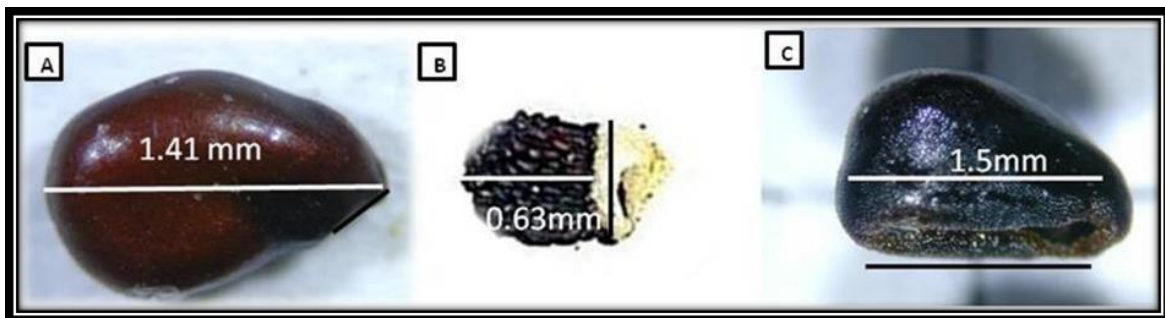


Figura 45. Posición del hilo. **A.** Oblicua en *Echinocactus grusonii*. **B.** Perpendicular en *Aztekium riterii*. **C.** Paralela en *Astrophytum ornatum*. Las líneas blancas corresponden al eje de mayor longitud de la semilla y las líneas negras a la posición del hilo.

73.-Color de la testa

0: negro

1: negro-pardo

2: pardo-rojizo

3: negro-grisáceo

Descripción: el color de la testa se determinó siguiendo las tres categorías descritas por Barthlott y Hunt (2000). Sin embargo, nosotros describimos cuatro categorías, semillas con testa negra, por ejemplo, las semillas de *Echinocactus texensis*, *E. parryi*, *E. polycephalus s.l.* Las de testa negra-parda, presentes en varias especies de *Astrophytum*. Las semillas de testa parda-rojiza como las de *E. grusonii* y las semillas con testa de color negro-grisáceo, como *E. horizonthalonius* (Figura 46). Si bien el color de la testa varía dependiendo del estado de madurez de las semillas (Barthlott & Hunt, 2000), es necesario realizar estudios cronológicos que documenten los cambios de coloración a través del tiempo, en este estudio y para el grupo interno, los cambios aparentan ser mínimos, ya que se analizaron semillas de diferentes poblaciones con diferentes estados de madurez, sin detectar cambios considerables.

74.- Textura de la testa

0: lisa

1: rugosa

2: ruminada

Descripción: Barthlott y Hunt (2000), con imágenes de (SEM), determinaron tres niveles de ornamentación de la testa: 1) ornamentación multicelular, incluye arrugas, surcos y rugosidad en general, 2) patrones individuales de ornamentación, incluye la uniformidad y forma de las células, así como, las características de los

límites de las paredes periclinales y 3) el microrrelieve de las paredes celulares periclinales.



Figura 46. Color de la testa. **A.** Testa negra de *Echinocactus parryi*. **B.** Testa negra-parda de *Astrophytum ornatum*. **C.** Testa parda-rojiza de *E. grusonii*. **D.** Testa parda-grisácea de *E. horizonthalonius*.

En nuestro estudio, el carácter textura de la testa, se refiere a como se observa la testa a través de un microscopio estereoscópico. A este nivel de magnificación pudimos determinar texturas lisas o texturas rugosas. Utilizando las descripciones en la literatura referente a semillas de las especies estudiadas,

complementamos nuestras descripciones y codificamos un tercer estado, el ruminado, presente en algunas semillas de *Ferocactus* Barthlott & Hunt (2000).

En las fotografías A,B,D de la figura 46, se observan semillas de textura rugosa, a diferencia de la fotografía C de la misma figura, la cual muestra semillas de textura lisa. Aun cuando sabemos que la textura de las semillas de *Echinocactus grusonii* no es totalmente lisa (Barthlott & Hunt, 2000), decidimos codificarla como lisa porque existe una diferencia clara con respecto a la textura de la testa de semillas de especies como *E. parryi* y *E. polycephalus* var. *polycephalus*, las cuales vistas a través del microscopio estereoscópico son claramente rugosas.

75.- Región dorsal de la semilla

0: indiferenciada

1: quillada

Descripción: la región dorsal de las semillas se encuentra en el lado opuesto al hilo, esta puede ser elevada (quillada) o no elevada (indiferenciada) (Fig. 47). Este carácter es uno de los que Ferguson (1992), utilizó para distinguir entre los subgéneros *Homalocephala* y *Echinocactus*.

76.- Borde de la testa

0: no engrosado

1: engrosado

Descripción: el borde, es la parte de la testa adyacente a la RHM, este puede estar engrosado como en las especies de *Astrophytum*, o no, como en las especies de *Echinocactus* (Barthlott & Hunt, 2000) (Fig. 48).

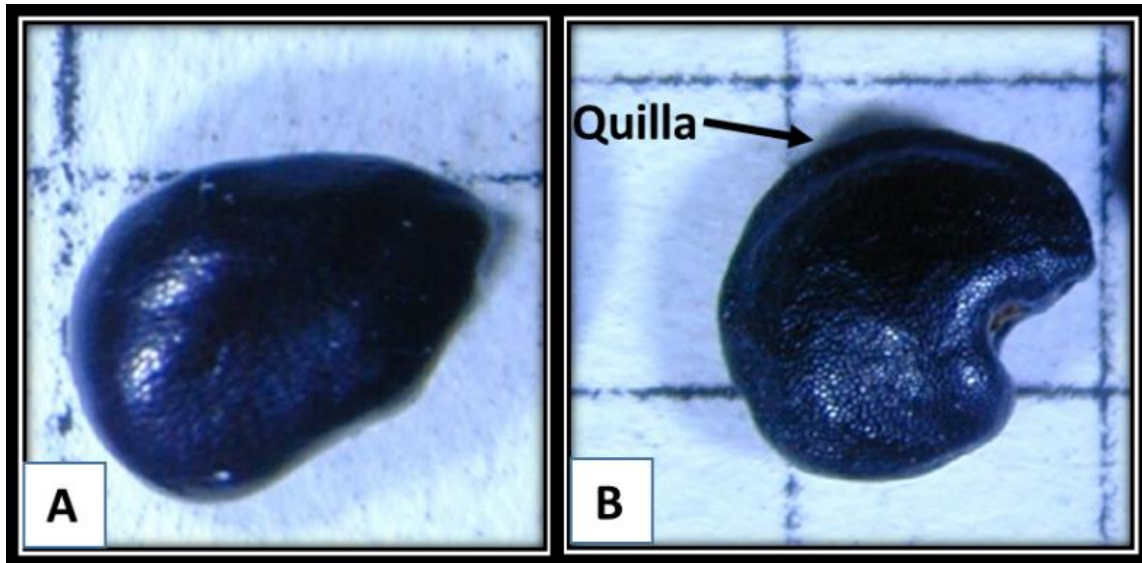


Figura 47. Región dorsal de las semillas. **A.** Semilla de *Echinocactus platyacanthus* con región dorsal indiferenciada. **B.** Semilla de *E. texensis* con región dorsal quillada.

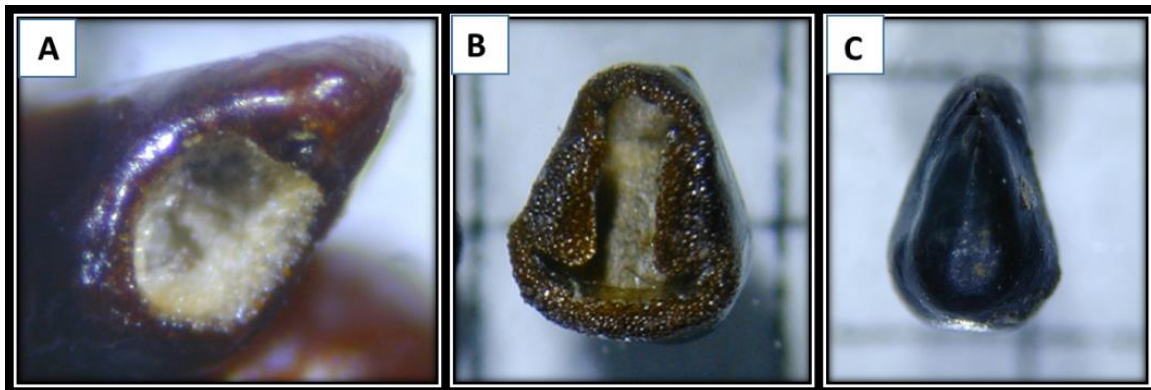


Figura 48. Borde de la testa. **A.** Vista ventral de una semilla de *Echinocactus grusonii* con el borde no engrosado y RHM impresa. **B.** Vista ventral de una semilla de *Astrophytum myriostigma* con el borde engrosado y RHM profundamente impresa. **C.** Vista dorsal de una semilla de *A. capricorne*, obsérvese como sobre sale la parte ventral de la semilla debido al borde engrosado.

77.- Tamaño de las células de la testa

0: uniforme

1: gradualmente más pequeñas hacia el borde

Descripción: debido a que para codificar este carácter es necesario observar las células de la testa a través de imágenes de SEM, nosotros lo codificamos a partir de las descripciones e imágenes de Barthlott y Hunt (2000). En el caso de semillas con células de tamaño uniforme no se observa una disminución en el tamaño de las células cercanas al borde, contrario a algunas semillas que muestran una reducción en el tamaño de las células conforme se aproximan al borde.

78.- Forma de las células de la testa

0: isométricas (tetragonales)

1: elongadas (tetragonales)

2: elongadas (poligonales, generalmente hexagonales)

Descripción: al igual que el carácter anterior, la forma de las células fue codificada a partir de lo publicado por Barthlott y Hunt (2000).

79.- Relieve de los límites entre las células de la testa

0: inconspicuo

1: acanalado

2: elevado

Descripción: para la determinación y codificación de este carácter fueron empleadas imágenes de SEM y descripciones del relieve entre las células de la testa publicadas en Chamberland (1991); Barthlott & Hunt (2000) y Doweld (2000). La figura 49, muestra dos fotografías obtenidas de (Doweld, 2000), en una se observa un relieve acanalado y en la otra uno elevado.

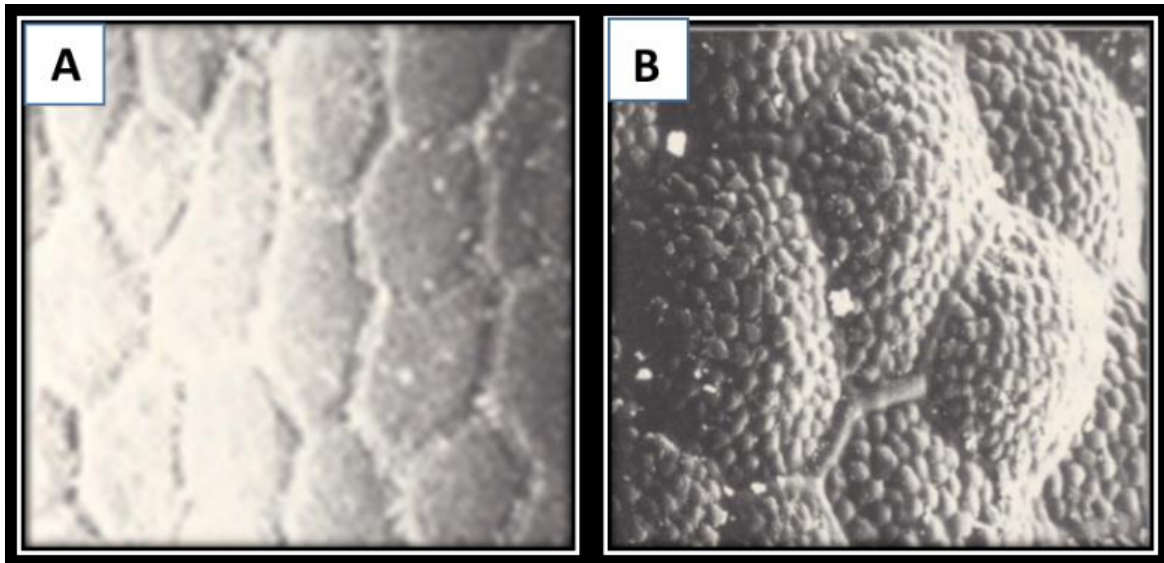


Figura 49. Límite entre las células de la testa. **A.** Acanalado en semillas de *E. polycephalus* var. *xeranthemoides*. **B.** Elevado en semillas de *E. horizonthalonius*. Fotografías tomadas de Doweld (2000).

80.- Relieve de las paredes periclinales de las células de la testa

0: convexo

1: cóncavo

Descripción: Barthlott y Hunt (2000), determinaron que el relieve de las paredes periclinales puede ser plano, cóncavo o convexo. Después de analizar semillas de diferentes especies de Cactaceae, decidieron incluir otros dos estados de carácter, parcialmente cóncavo y parcialmente convexo. Estos dos últimos estados, hacen referencia a que sólo una parte de la pared es cóncava o convexa.

Para codificar este carácter nos basamos en las imágenes de SEM y descripciones de literatura previamente citada. A diferencia de lo propuesto por Barthlott & Hunt (2000), nosotros sólo codificamos dos estados convexo o cóncavo y debido a que en nuestro grupo interno (*Echinocactus*), todos los relieves son convexos, pero con diferentes elevaciones, generamos otro carácter, “elevación de

las paredes periclinales con relieve convexo”, para diferenciar aquellas paredes periclinales con poca elevación o muy elevadas.

En el caso de las paredes periclinales poco elevadas, estas, sólo distinguen a través de imágenes SEM, contrario a las paredes muy elevadas, las cuales se distinguen casi a simple vista en forma de verrugas o papilas. La figura 49 muestra dos ejemplos de semillas con paredes periclinales convexas poco elevadas y la figura 50, muestra un ejemplo de una semilla con relieve convexo muy elevado.

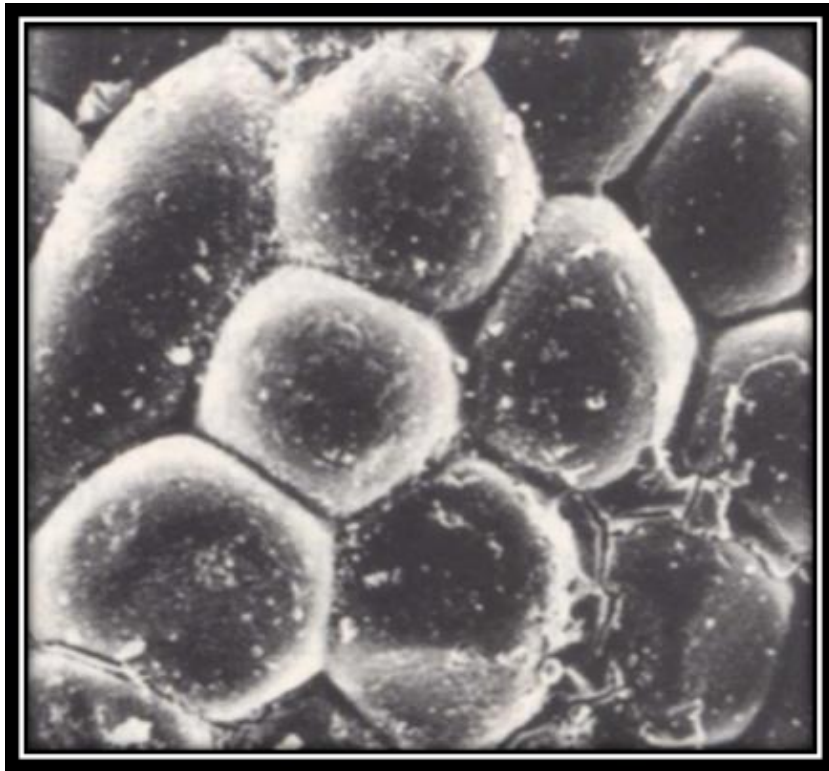


Figura 50. Paredes periclinales con relieve convexo muy elevado en las células de la testa de *Echinocactus polycephalus*. Fotografía tomada de Doweld (2000).

81.- Elevación de las paredes periclinales con relieve convexo

0: poco elevado

1: muy elevado

Descripción: este carácter se describió junto con el relieve de las paredes periclinales (carácter 80).

82.- Microrrelieve

0.- glabro

1.- verrugoso

2.- estriado

Descripción: este carácter hace referencia a las paredes periclinales de cada célula de la testa por individual. Por ejemplo, en la fotografía A de la figura 49 y la figura 50 se observan paredes periclinales glabras, contrario a la fotografía B de la figura 49, donde se observan células con paredes periclinales verrugosas.

83.- Tamaño (RHM)

0: pequeño

1: mediano

2: grande

3: muy grande

Descripción: el tamaño de la RHM fue codificado a partir de observaciones de las semillas a través del microscopio estereoscópico y de las descripciones de la literatura. Los diferentes estados de carácter se refieren simplemente al tamaño de la RHM con respecto al tamaño de la semilla. En la fotografía A de la figura 48, se observa una RHM de tamaño mediano en *Echinocactus grusonii*, a diferencia de la RHM muy grande de la semilla de *A. myriostigma* de la fotografía B, de la misma figura.

84.- Posición de (RHM) relativa al anillo de la testa

0: superficial

1: impreso

2: profundamente impreso (testa generalmente plana)

Descripción: este carácter hace referencia a que tan profundo es la hendidura de la RHM con respecto a la circunferencia de la semilla. En este sentido, las fotografías A y B de la figura 48, muestran ejemplos de una semilla con una RHM impresa y otra con RHM profundamente impresa, respectivamente.

85.- Configuración del hilo y el micrópilo

0: disjunta

1: conjunta pero separada por tejido esclerificado

Descripción: este carácter según Barthlott y Hunt (2000), tiene significancia taxonómica y filogenética. Este se refiere a si el hilo y el micrópilo están separados o forman un complejo de diferentes formas. La figura 51 muestra un ejemplo de cada uno de los estados de carácter.

86.- Forma del hilo

0: circular

1: cerradura

2: transversalmente elíptico

3: elíptico

4: obovado

Descripción: este carácter está muy ligado al carácter denominado forma del complejo hilo-micrópilo (Barthlott & Hunt 2000). Sin embargo, debido a que las

especies de *Astrophytum* y *Echinocactus* tienen el hilo y el micrópilo disjuntos, nosotros sólo nos basamos en la forma del hilo para codificar los diferentes estados. La fotografía B de la figura 48, muestra una semilla con hilo en forma de cerradura y las fotos A y B de la figura 51 muestran semillas con hilo circular.

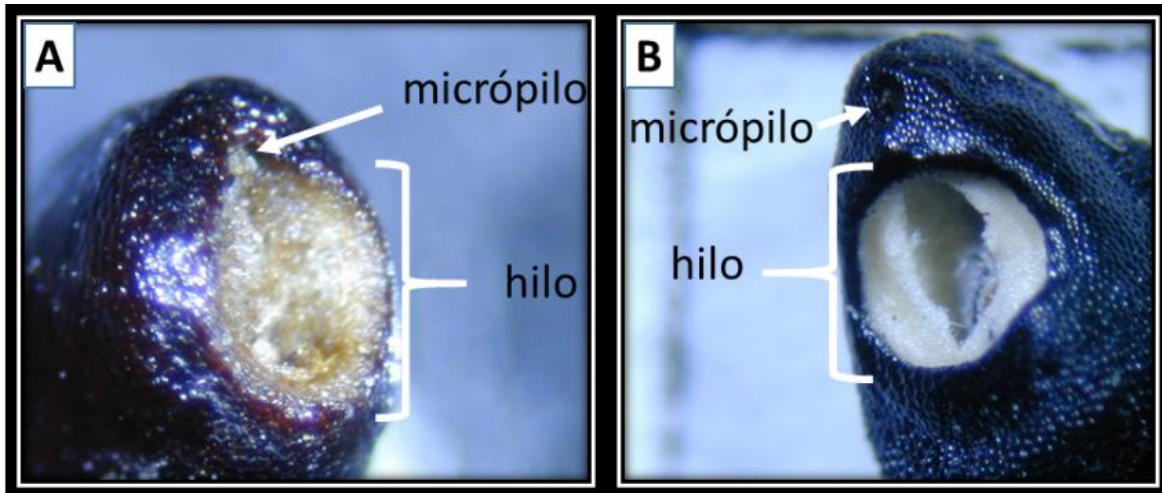


Figura 51. Configuración del hilo y el micrópilo. **A.** Configuración conjunta en semilla de *Carnegiea gigantea*. **B.** Configuración disjunta en semilla de *Echinocactus parryi*.

87.- Presencia de apéndices

0.- ausentes

1.- presencia de estrofiolo

2.- presencia de arilo

Descripción: en las especies estudiadas algunas semillas presentan excrescencias seminales (estrofiolo), como las semillas *Aztekium* y *Geohintonia* o, remanentes del funículo adheridos a toda la superficie de la semilla (arilo), como en *Opuntia ficus-indica*.