



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

SISTEMÁTICA

Filogenia y Biogeografía del género *Neobuxbaumia* (Cactaceae)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. HÉCTOR JAVIER TAPIA SALCIDO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES
JARDÍN BOTÁNICO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
MUSEO DE ZOOLOGÍA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

México, Cd. Mx.

ENERO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de noviembre de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **TAPIA SALCIDO HÉCTOR JAVIER** con número de cuenta **97100908** con la tesis titulada: "**Filogenia y biogeografía del género *Neobuxbaumia* (Cactaceae)**", realizada bajo la dirección del **DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES**:

Presidente:	DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO
Vocal:	DRA. MARÍA HILDA FLORES OLVERA
Secretario:	DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
Suplente:	DRA. PATRICIA DOLORES DÁVILA ARANDA
Suplente	DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de diciembre de 2016.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por la provisión de medios y materiales para encender la luz del conocimiento.

Al CONACYT, por la beca de manutención (332595) otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

Al programa DGAPA-PAPIIT, por el financiamiento para desarrollar el trabajo de campo y de laboratorio necesario para la elaboración de esta investigación.
El apoyo fue otorgado a través de SA (IN208315).

A mi tutor principal, el Dr. Salvador Arias, por la confianza, por la paciencia y por el apoyo que siempre me brinda, en todo momento y en todo lugar.

A los miembros del Comité Tutor, Dra. Teresa Terrazas y Dr. Juan J. Morrone, quienes siempre me impulsaron para dar lo mejor de mí, conduciéndome con su sabiduría por encima de los diversos obstáculos que se presentaron.

Agradecimientos a título personal

A los miembros del jurado, Dra. Martha Martínez, Dra. Hilda Flores y Dra. Patricia Dávila, quienes amablemente revisaron el escrito y realizaron valiosas observaciones sobre su contenido.

Al Dr. David Gernandt, por el apoyo para la construcción del manuscrito en inglés correspondiente al segundo capítulo de esta tesis. Su conocimiento sobre la materia y su dominio sobre el idioma fueron de gran ayuda.

A Lidia Cabrera, por el espacio en el laboratorio a su cargo y por el apoyo para la realización del trabajo molecular.

A mis colegas, camaradas y cómplices en el trabajo de campo y de laboratorio: Gabriel Arroyo-Cosultchi, Daniel Sánchez, Alejandro. Rodríguez-Gaytán, David Aquino, Cristian Cervantes, Miguel Cruz, Marisela Yañez, Isaura Rosas-Reinhold, Daniel Franco, Daniel Martínez, Yolanda Morales, Maria Luisa Bárcenas-Argüello, Jorge Blanco, Dariana Guerrero y Duniel Barrios, porque todo trabajo serio tiene al menos una hora feliz.

A este país, a su gente, a sus lugares, a sus modos.

Dedicatoria

A *Berenice*, compañía y paz para mí, en la guerra, en la vida, en el amor.

A mis padres, *María* y *Jesús*, quienes conociendo mi 'intrepidez'
siempre están listos para detenerme en la caída, siempre atentos y
siempre expectantes ante mi próximo ensayo.

A mis hermanos, a mis sobrinos, a mis primos, a mis tíos, a mis abuelos...

a toda mi familia, porque son la mejor familia que podría pedir.

A los que se han ido, ellos siempre serán mi inspiración
y persistirán en mi contento.

A mis amigos, porque siempre están ahí, se les necesite o no.

¡Ustedes son el cúmulo de estrellas que me guía!

¡GRACIAS!

«La première vertu de la connaissance est la capacité à affronter ce qui n'est pas évident»

"La primera virtud del conocimiento es la capacidad de enfrentarse a lo que no es evidente"

— Jacques Lacan

Índice

Lista de figuras y cuadros	2
Resumen	4
Abstract	6
Introducción	8
Capítulo 1. El uso de espinas del tallo en la identificación de las especies de <i>Neobuxbaumia</i> (Cactaceae)	14
Capítulo 2. Does <i>Neobuxbaumia</i> belong to <i>Cephalocereus</i> ? A phylogenetic analysis and taxonomic assessment based on molecular and morphological evidence	28
Capítulo 3. Biogeographic analysis of the Mexican genus <i>Cephalocereus</i> (Cactaceae, Cactoideae, Echinocereae): Integrating cladistic and parametric methods	70
Discusión general	91
Literatura citada	97

Lista de figuras y cuadros.

Figura 1-1. Escala de medición y variables de las espinas	17
Figura 1-2. Patrones de espinación (gráficos circulares)	18
Cuadro 1-1. Caracterización de las espinas por especie	19
Cuadro 1-2. Longitud promedio de las espinas	20
Cuadro 1-3. Coeficientes estandarizados para las funciones discriminantes	21
Cuadro 1-4. Conteos para el análisis clasificatorio (AC)	22
Cuadro 1-5. Prueba de validación para el AC	23
Figura 1-3. Gráfico de las dos primeras dos funciones del análisis discriminante (AD)	24
Apéndice 1-1. Lista de especies y localidades de colecta	26
Apéndice 1-2. Clave para la identificación de las especies de <i>Neobuxbaumia</i>	26
Tratamiento taxonómico y clave para la identificación de las especies de <i>Cephalocereus</i>	44
Cuadro 2-1. Lista de taxa muestreados y números de accesoión	58
Cuadro 2-2. Regiones del cloroplasto y secuencias de los <i>primers</i> empleados	61

Cuadro 2-3. Lista de caracteres estructurales y estados de carácter	62
Cuadro 2-4. Matriz codificada para los caracteres estructurales	64
Cuadro 2-5. Estadísticos para el análisis de parsimonia	65
Figura 2-1. Árboles de Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana para los datos moleculares	66
Figura 2-2. Optimización de caracteres estructurales sobre el árbol de Inferencia Bayesiana para los datos combinados	67
Figura 2-3. Características distintivas para un grupo de especies representativas del género <i>Cephalocereus</i>	68
Cuadro 3-1. Matriz de ausencia/presencia para el cladograma de área	87
Figura 3-1. Mapa con las distribuciones de las especies de <i>Cephalocereus</i>	88
Figura 3-2. Cladograma de áreas para las especies de <i>Cephalocereus</i>	88
Figura 3-3. Cladograma general de áreas	89
Figura 3-4. Representación del análisis DEC para los nodos evolutivos	89
Figura 3-5. Reconstrucción de los eventos evolutivos y de las regiones geográficas que ocupan	90

Resumen

La presente tesis es una contribución a la sistemática y taxonomía de un grupo de cactáceas columnares que habita Norteamérica, el género *Neobuxbaumia* y sus parientes cercanos, *Cephalocereus* y *Pseudomitrocereus*. Estudios filogenéticos previos han recuperado parcialmente a este grupo de tres géneros como monofilético, pero sin una explicación clara y precisa sobre la naturaleza de sus relaciones. La investigación que se llevó a cabo aporta elementos para resolver tres preguntas sobre la evolución de este linaje de Cactáceas, cada una de las cuales se aborda en un capítulo de esta tesis. En el primer capítulo se plantea el propósito de corroborar el número de especies que pertenecen al género *Neobuxbaumia*, a partir de un enfoque cuantitativo y del empleo de la estadística multivariada, usando la organización (origen, tamaño y orientación) de las espinas, agrupadas en categorías homólogas predefinidas. Se propone que esta herramienta tiene utilidad para identificar especies en otros grupos de cactáceas, particularmente en aquellas que no cuentan con estructuras reproductivas la mayor parte del año. El segundo capítulo corresponde al estudio filogenético del grupo *Cephalocereus*, al cual pertenece *Neobuxbaumia*, usando datos de siete marcadores de cloroplasto y 46 caracteres estructurales. Los resultados soportan la afinidad de las especies del grupo y el nulo apoyo que tiene la propuesta de reconocer tres géneros, ya que *Neobuxbaumia* es parafilético y *Cephalocereus* polifilético. La presencia de una zona floral diferenciada, cefalio y pseudocefalio, no representa un carácter diagnóstico o una

sinapomorfía que permita diferenciar a los géneros *Neobuxbaumia* y *Pseudomitrocereus* de *Cephalocereus*. Se incluye una síntesis taxonómica, donde se reconoce un solo género: *Cephalocereus*. El tercer capítulo corresponde a un análisis biogeográfico del género *Cephalocereus*, siguiendo la nueva circunscripción, aquí propuesta. Para ello se contrastan dos métodos de análisis; uno tomado de la biogeografía cladística: Análisis de Parsimonia de Brooks (BPA), y otro de la biogeografía paramétrica: Análisis de la Evolución de las Distribuciones Geográficas por Dispersión, Extinción local y Cladogénesis (Lagrange-DEC). Los resultados muestran una compleja historia evolutiva, que incluye eventos de dispersión y de vicarianza, ocurridos entre el extremo norte de la región Neotropical y la Zona de Transición Mexicana. Particularmente, la Sierra Madre del Sur ha actuado como un importante centro de diversificación y como un corredor para taxones que se dispersaron a larga distancia, saltando hasta la Sierra Madre Oriental, a lo largo de la Costa Pacífica Mexicana o hacia el Golfo de México.

Abstract

The present dissertation contributes to the systematics and taxonomy of a group of columnar cacti inhabiting North America, the genus *Neobuxbaumia* and its close relatives, *Cephalocereus* and *Pseudomitrocereus*. Previous phylogenetic analyses have recovered this group of three genera as monophyletic, without a clear and precise explanation on the nature of their relationships. The research that we conducted is focused on three questions about the evolution of this cactus lineage, each of which is addressed in a separated chapter of this dissertation. In the first chapter, we aimed to corroborate the number of species belonging to the genus *Neobuxbaumia*, following a quantitative approach, based on multivariate statistics and using the organization (origin, size and orientation) of the spines, grouped in predefined homologous categories. We propose that this tool has utility to identify species in other groups of Cactaceae, particularly those that do not present reproductive structures most of the year. The second chapter corresponds to the phylogenetic study of the group *Cephalocereus*, to which *Neobuxbaumia* species belong, using data from 7 chloroplast markers and 46 structural characters. Results of this study reveal the affinity of the species of the group and the poor support of the proposal to maintain three separate genera, because *Neobuxbaumia* is paraphyletic and *Cephalocereus* is polyphyletic. The presence of a differentiated flowering region, cephalium and pseudocephalium, does not represent a diagnostic or a synapomorphic

character that allows to differentiate the genera *Neobuxbaumia* and *Pseudomitrocereus* from *Cephalocereus*. A taxonomic synthesis is included, recognizing only one genus: *Cephalocereus*. The third Chapter corresponds to a biogeographic analysis of the genus *Cephalocereus*, under the new circumscription proposal. Here, two different methods were contrasted; one from cladistic biogeography: Brooks Parsimony Analysis (BPA), and another from parametric biogeography: Likelihood Inference of Geographic Range Evolution by Dispersal, Local Extinction and Cladogenesis (Lagrange-DEC). The results shown a complex evolutionary history, including dispersal and vicariance events, occurring between the northern part of the Neotropical region and the Mexican Transition Zone. In particular, the Sierra Madre del Sur has acted as an important diversification center and as a biological corridor for taxa involved in long-distance dispersal events, bounding into the Sierra Madre Oriental, along the Mexican Pacific Coast or into the Gulf of Mexico.

Introducción

La familia Cactaceae incluye algunas de las formas vegetales más notables y representativas de las regiones áridas y semiáridas del continente americano, sobresaliendo el territorio de mexicano por la diversidad de especies que aquí habitan (Bravo-Hollis, 1978; Anderson, 2001). En gran medida, el éxito de las cactáceas en estos ambientes extremos se relaciona con las modificaciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas que las caracterizan (Gibson y Nobel, 1986). Entre estas modificaciones destacan la succulencia de sus tallos, que les permite almacenar agua durante las largas temporadas de sequía, la presencia de metabolismo CAM y la tendencia a la reducción de las hojas, lo que les ayuda a disminuir la evapotranspiración durante las horas de mayor insolación y temperatura, o la modificación de las hojas en espinas, proporcionando protección contra depredadores. Otra condición distintiva y diversa de esta familia es la forma de crecimiento, que cambia desde tallos simples hasta profusamente ramificados, con formas cilíndricas, aplanadas, globosas o deprimidas, epífitas, trepadoras y rastreras, entre otras, y hábitos que van de arbustivos a arbóreos (Gibson y Nobel, 1986).

Desde los comienzos de la taxonomía moderna, a mediados del siglo XVIII, las especies de la familia Cactaceae se han clasificado siguiendo criterios diversos, apoyados principalmente en atributos morfológicos. En esa época se describe el género *Cactus* L., conformado por 22 especies divididas en cuatro grupos heterogéneos, que representaban a la familia Cactaceae (Metzing y Kiesling, 2008). De manera similar, las especies columnares se clasificaron históricamente dentro de *Cereus* Mill., un género numeroso que agrupaba especies de orígenes distintos. Esta diversidad motivo la división del género en 18 subgéneros por Berger (1905), los cuales fueron elevados después a la categoría de género por Britton y Rose (1919-1923). Varios de estos géneros, establecidos a partir de la morfología, se han confirmado mediante estudios moleculares recientes, indicando una importante congruencia (Metzing y Kiesling, 2008), y algunos se mantienen en tratamientos taxonómicos recientes (Hunt *et al.*, 2006).

Backeberg (1938) sigue una tendencia divisionista al erigir a *Neobuxbaumia*, a partir de dos especies segregadas de *Cephalocereus*: *N. tetetzo* y *N. polylopha*. Esta distinción se apoyó en los siguientes atributos: ausencia de una región floral diferenciada, floración en corona, flores desnudas y frutos con pulpa blanca comestible. Dawson (1952a,b) y el mismo Backeberg (1960) extienden la circunscripción de *Neobuxbaumia*, para incluir hasta seis especies: *N. euphorbioides* (Haw.) Buxb. Ex Bravo, *N. macrocephala* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) E.Y. Dawson, *N. mezcalaensis* (Bravo) Backeb., *N. polylopha* (DC) Backeb., *N. scoparia* (Poselg.) Backeb., y *N. tetetzo* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Backeb. Posteriormente, Bravo-Hollis (1978) separa a *N. multiareolata* (Daws.) Bravo Scheinvar & Sánchez-Mej., considerada anteriormente como una variedad de *N. mezcalaensis*. Estas especies fueron descritas dentro de tres géneros: *Cereus*, *Pilocereus* y *Cephalocereus*, indicando una diversidad de criterios para delimitar taxones. Sólo las dos especies más recientes se describieron originalmente dentro del

género *Neobuxbaumia*: *N. squamulosa* Scheinvar & Sánchez-Mej. (1990) y *N. sanchezejoradae* Lau (1994), para alcanzar un total de nueve especies, reafirmando la idea de la distinción entre *Cephalocereus* y *Neobuxbaumia*.

La separación entre *Cephalocereus* y *Neobuxbaumia* se ha mantenido hasta la actualidad, enfrentando algunas controversias sobre la delimitación y la hermandad de estos dos géneros y sobre su relación con otros géneros de la subtribu Pachycereinae. Por ejemplo, el Grupo Internacional para la Sistemática de Cactaceae (Hunt y Taylor, 1986; 1990) incluye a *Neobuxbaumia* dentro de *Carnegiea*, a partir de atributos morfológicos como la forma de crecimiento y la posición de las flores. Esta propuesta es apoyada por otros autores (Barthlott y Hunt, 1993), pero finalmente se abandona en las revisiones taxonómicas más recientes (Hunt, 1999; Guzmán-Cruz *et al.*, 2003; Hunt *et al.*, 2006). Los niveles supragenéricos también han tenido cambios, como la tribu Echinocereae, representada por géneros como *Echinocereus* y *Bergerocactus*, que anteriormente se encontraba separada de Pachycereae (Gibson y Horak 1978). A través de estudios moleculares y de la reevaluación de los caracteres morfológicos se logra recuperar la identidad de Echinocereae y Pachycereae, donde se incluye a géneros como *Neobuxbaumia*, *Cephalocereus*, *Bergerocactus*, *Pachycereus*, *Stenocereus*, *Echinocereus*, *Myrtillocactus* y *Peniocereus*, y se recupera el nombre Echinocereae para la tribu (Bárcenas *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2014). La evaluación amplia y comprensiva de los datos morfológicos y moleculares, no se ha realizado para géneros como *Neobuxbaumia*, *Cephalocereus* y *Pseudomitrocereus*, los cuales se han encontrado asociados en diversos estudios moleculares y morfológicos, de manera parcial (Arias *et al.*, 2003, 2005; Arias y Terrazas, 2006).

La presente investigación tiene como objetivos tres aspectos relevantes para la sistemática del género: 1) la divergencia morfológica de las especies de *Neobuxbaumia* y su identificación a

partir de la organización de las espinas en la aréola vegetativa; 2) las relaciones filogenéticas de *Neobuxbaumia* respecto a los géneros *Cephalocereus* y *Pseudomitrocereus* y dentro de la subtribu Pachycereinae; y, 3) la evolución de este linaje dentro del espacio geográfico que ocupa. Estos aspectos son abordados de manera detallada en cada uno de los tres capítulos que conforman esta tesis, y cada capítulo se desarrolla como un artículo de investigación separado. Actualmente, el primero de ellos ya ha sido publicado y los dos restantes se encuentran en proceso de preparación para su publicación.

El capítulo I aborda la identificación de especies de *Neobuxbaumia*, a partir del uso de métodos de la estadística circular descriptiva y de la estadística multivariada. Primero se recurre a la descripción cuantitativa de la aréola vegetativa, siguiendo un esquema de desarrollo que permite comparar las espinas que surgen en posiciones homólogas. A continuación, se aplican los análisis discriminante y clasificatorio a los datos de organización de las espinas (posición, tamaño y orientación) para reconocer patrones de espinación y los agrupamientos existentes en dos niveles: los individuos que pertenecen a una misma especie y las especies que presentan un patrón de espinación semejante. Este método tiene el potencial para asignar correctamente a los individuos dentro de su especie hasta en un 90% de los casos. Por lo tanto, se propone como una alternativa para la identificación de especies en otros grupos de Cactáceas.

El capítulo II, corresponde al objetivo central de esta tesis, la construcción de una hipótesis filogenética sobre las relaciones de los géneros *Neobuxbaumia*, *Cephalocereus* y *Pseudomitrocereus*, y sobre la posición de estos tres géneros dentro de la subtribu Pachycereinae. Este trabajo se apoya en información molecular, procedente de secuencias de ADN pertenecientes a siete regiones del cloroplasto y la codificación simple de indels, además de 46 caracteres morfológicos seleccionados, los cuales han sido empleados para identificar a los géneros o

para proponer hipótesis filogenéticas previas. Los métodos de análisis empleados fueron la Máxima Parsimonia (MP) y la Inferencia Bayesiana (IB), los cuales mostraron congruencia respecto a los clados comunes que logran recuperar. Los resultados de este estudio indican que *Neobuxbaumia* es parafilético, respecto a *Cephalocereus*, el cual se recupera como polifilético, mientras *Pseudomitrocereus* se encuentra en una posición derivada, por lo que la separación de estos tres géneros no tiene apoyo. Dadas las relaciones descritas entre estos géneros, la presencia de una región floral diferenciada no tiene un valor taxonómico, mientras que otros atributos, como el casquete persistente y los cristales prismáticos en el sistema dérmico, apoyan la unión de *Neobuxbaumia* y *Pseudomitrocereus* dentro de *Cephalocereus*. Al final del capítulo se incluye un tratamiento taxonómico donde se indican los cambios propuestos.

El capítulo III recupera la información filogenética, obtenida en el análisis del capítulo previo, para reconstruir las relaciones entre las áreas de distribución y la historia evolutiva de las especies, en términos de los procesos que dieron lugar a su distribución actual: dispersión, vicarianza, extinción y cladogénesis (especiación). Para ello se emplean de manera concomitante dos enfoques de la biogeografía histórica: el Análisis de Parsimonia de Brooks (BPA), procedente de la biogeografía cladística, y el método paramétrico Lagrange-DEC, derivado de la biogeografía filogenética. Este análisis indica que la región Neotropical y sus interacciones con la Zona de Transición Mexicana, han tenido un papel importante en la evolución del grupo, existiendo diversos eventos de intercambio (dispersión) y de aislamiento (vicarianza) entre estas regiones. La evolución geográfica del grupo indica un desplazamiento desde los ambientes cálidos y húmedos del norte de la región Neotropical hacia las zonas más templadas y secas de las serranías.

Los resultados de este trabajo son congruentes con otros estudios recientes, donde destaca la separación de *Cephalocereus multiareolatus* (= *Neobuxbaumia multiareolata*) como un taxón distinto de *Cephalocereus mezcalaensis* (= *Neobuxbaumia mezcalaensis*), así como la monofilia de *Cephalocereus*, que al incluir a *Neobuxbaumia* y *Pseudomitrocereus* alcanza un total de 15 especies. La ampliación en el muestreo de taxones, de marcadores moleculares y de caracteres estructurales, ha contribuido de manera sustancial para resolver las hermandades entre las especies. Finalmente, la compleja historia geológica de norteamérica se refleja en la evolución de las distribuciones geográficas de las especies del género, desde las zonas más cálidas, cerca de la costa en el sur de México, hacia las zonas más altas y templadas en el centro del país. Futuros estudios podrían abordar problemas particulares, como el origen y la evolución de taxones conflictivos por su morfología, como *Cephalocereus fulviceps*, que presenta varias características únicas y distintivas. Estos atributos podrían estar relacionados con la adaptación a determinados factores ambientales, o bien, podrían deberse a procesos evolutivos no dicotómicos, como la hibridación, los cuales no son susceptibles de ser abordados mediante los métodos tradicionales.

Capítulo 1

Tapia H.J., Arias S., Yáñez-Espinosa L., & Terrazas T. (2016)

El uso de espinas del tallo en la identificación de las especies de *Neobuxbaumia* (Cactaceae).

Revista Mexicana de Biodiversidad **87**: 288–300



Taxonomía y sistemática

El uso de espinas del tallo en la identificación de las especies de *Neobuxbaumia* (Cactaceae)

Using stem spines in the identification of Neobuxbaumia species (Cactaceae)

Héctor J. Tapia^a, Salvador Arias^{a,*}, Laura Yáñez-Espinosa^b y Teresa Terrazas^c

^a Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-614, 04510, México D.F., México

^b Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Altair Núm. 200, Col. del Llano, 78377, San Luis Potosí, México

^c Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-233, 04510, México D.F., México

Recibido el 23 de junio de 2015; aceptado el 10 de febrero de 2016

Disponible en Internet el 19 de mayo de 2016

Resumen

Este estudio evaluó la morfometría de variables de orientación y tamaño de las espinas, con el objetivo de indagar sobre la utilidad de los patrones de espinación en la identificación de las especies del género *Neobuxbaumia* (Cactaceae: Cactoideae: Echinocereae). Este análisis se apoyó en un procedimiento de determinación taxonómica tradicional y en herramientas de estadística multivariada. Las variables se registraron en categorías preestablecidas en función de la organización de la areola. Se obtuvieron estadísticos circulares básicos y se construyeron los gráficos descriptivos que representan los patrones de espinación. Se aplicó un análisis canónico discriminante y un clasificador a partir de la asignación *a priori* de especies. La capacidad para asignar correctamente los individuos dentro de su especie fue de 89.6%, en promedio. La orientación y la longitud de las espinas mostraron potencial para identificar a la mayoría de las especies de *Neobuxbaumia*, además de la especie relacionada *Pseudomitrocereus fulviceps*. El uso complementario de otros atributos morfológicos vegetativos permite una identificación más robusta de las especies, como se refleja en la clave de identificación incluida. Se considera de valor taxonómico el reconocimiento de patrones de espinación para identificar especies en otros grupos de cactáceas en ausencia de estructuras reproductivas.

Derechos Reservados © 2016 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0.

Palabras clave: Morfometría; Patrón de espinación; Orientación de espinas

Abstract

This study evaluated the morphometry of spine variables, orientation and length, in order to investigate the utility of spination patterns for species identification within the genus *Neobuxbaumia* (Cactaceae: Cactoideae: Echinocereae). This analysis is based on a traditional taxonomic identification method and on multivariate statistical tools. Spine variables were recorded on preset categories relying on the areole organization. We obtained basic circular descriptive statistics and built graphs representing the spination pattern of each species. Canonical discriminant and classificatory analyses were applied from an *a priori* assignment of species. The ability to assign individuals to their species was 89.6%, on average. The orientation and length of the spines showed potential to identify most of the species of *Neobuxbaumia*, as well as the related species *Pseudomitrocereus fulviceps*. The complementary use of other vegetative morphological characters enables a more robust identification of species, as reflected on the identification key included. The recognition of spination patterns is considered of taxonomic value to identify species in other cacti groups in absence of reproductive structures.

All Rights Reserved © 2016 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. This is an open access item distributed under the Creative Commons CC License BY-NC-ND 4.0.

Keywords: Morphometry; Spination pattern; Orientation of spines

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: sarias@ib.unam.mx (S. Arias).

La revisión por pares es responsabilidad de la Universidad Nacional Autónoma de México.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2016.04.006>

1870-3453/Derechos Reservados © 2016 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0.

Introducción

La delimitación y la identificación de especies son actividades complementarias y recíprocas que han estimulado la labor de los sistemáticos durante los últimos años. Por una parte, la delimitación permite discernir entre linajes evolutivos distintos, conduciendo eventualmente al descubrimiento de nuevas especies (Wiens, 2007); por otra parte, la identificación permite la asignación de individuos dentro de las categorías definidas previamente (Edwards y Knowles, 2014). Estas actividades son particularmente importantes dentro de la sistemática puesto que permiten descubrir y describir a las especies, como condición primordial para darles nombre y clasificarlas (Morrone, 2013), pero también para formular hipótesis sobre sus relaciones filogenéticas (Wiens, 2007). La sistemática, como parte de la biología comparada, ostenta una notable influencia sobre disciplinas como la biogeografía, la ecología y la biología de la conservación (Reid y Carstens, 2012; Rissler y Apodaca, 2007; Wiens, 2007; Wiens y Servedio, 2000).

Los ejercicios de delimitación y de identificación son complejos en menor o mayor medida, dependiendo del grupo taxonómico, de las fuentes de información empleadas y de los métodos de análisis implementados (Edwards y Knowles, 2014; Rissler y Apodaca, 2007; Sites y Marshall, 2003; Wiens, 2007). La identificación de especies se apoya principalmente en información morfológica y es común el uso de métodos automatizados de análisis (Cope, Corney, Clark, Remagnino y Wilkin, 2012), pero también se admite información genética, ecológica, ambiental o de distribución geográfica y es posible contrastar distintos métodos de análisis (Cope et al., 2012; DeSalle, Egan y Siddall, 2005; Scheinvar, Toledo y Sánchez-Mejorada, 1976).

Neobuxbaumia Backeb. (Cactaceae: Cactoideae: Echinocereeae) es un género endémico de México, que se distribuye desde el centro (Puebla, Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí) hacia las vertientes del golfo de México (Tamaulipas y Veracruz) y del océano Pacífico (Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca) (Bravo-Hollis, 1978). Las especies se caracterizan por presentar hábito arbóreo, con un porte mayor a 5 m, tallos columnares con ramificación o simples, cristales prismáticos en la hipodermis, de 15 a 40 costillas excepto en *N. euphorbioides* (8 a 10), areolas relativamente próximas entre sí, con una depresión interareolar, espinas distribuidas regularmente en una serie radial y otra central; flores campanular-infundibuliformes cubiertas por brácteas, generalmente carentes de cerdas y tricomas; frutos verdes a pardos, con restos persistentes del perianto y dehiscencia vertical; semillas de 2-4 mm de largo y pardo-negras (Arias y Terrazas, 2006; Arias, Gama-López, Guzmán-Cruz y Vázquez-Benítez, 2012; Arroyo-Cosultchi, Terrazas, Arias y López-Mata, 2010; Bravo-Hollis, 1978). Los tratamientos taxonómicos más recientes reconocen hasta 9 especies de *Neobuxbaumia* (Guzmán-Cruz, Arias y Dávila, 2003; Hunt, 2006) (apéndice 1); algunas de ellas pueden identificarse con facilidad, mediante la comparación de atributos vegetativos como el número de costillas, el tamaño y la forma de las areolas. Otras presentan conflictos en su identificación, particularmente en las

regiones donde convergen sus áreas de distribución, debido a la similitud de las estructuras vegetativas. Estos conflictos persisten por la escasez y por la duración efímera de las estructuras reproductivas que son indispensables para su identificación, como flores, frutos y semillas, tanto en el campo como en las colecciones botánicas (Arias et al., 2012; Arroyo-Cosultchi et al., 2010; Bravo-Hollis, 1978). Por ejemplo, el estudio comparativo de *Neobuxbaumia multiareolata*, *N. macrocephala*, *N. polylopha* y *N. scoparia* realizado por Bravo-Hollis, Scheinvar y Sánchez-Mejorada (1970, 1971a, 1971b, 1973) reveló la existencia de combinaciones particulares en caracteres vegetativos y reproductivos que permitieron distinguirlas. Un análisis fenético realizado por Scheinvar et al. (1976), utilizando diferentes coeficientes de similitud y técnicas de agrupamiento permitió identificar 7 especies de *Neobuxbaumia*, a partir de un conjunto de caracteres morfológicos, distribución geográfica y altitud. Estos últimos autores no consiguieron distinguir a *N. squamulosa*, debido a la carencia de flores y frutos, identificándola equivocadamente como *N. mezcalaensis* y dejando para un tiempo posterior su descubrimiento (Scheinvar y Sánchez-Mejorada, 1990).

Un caso particular fue la controversia en la delimitación de *N. mezcalaensis* y *N. multiareolata*; mientras Bravo-Hollis et al. (1973) señalan que se trata de 2 especies distintas, para Hunt et al. (2006) se trata de una misma especie. El análisis multivariado realizado por Arroyo-Cosultchi et al. (2010) probó la ausencia de fenotipos intermedios y que estas taxa se agrupan claramente en 2 clases distintas; estos mismos autores encontraron 4 caracteres de la areola del tallo vegetativo (forma y tamaño de areola, tamaño de espina central y patrón de distribución de espinas radiales), más 9 caracteres reproductivos, con los valores de carga más altos. A partir de estos resultados será relevante conocer el valor de los caracteres de la areola del tallo vegetativo para identificar las especies del género en ausencia de estructuras reproductivas.

La areola es una región de crecimiento meristemático, característica de Cactaceae, donde emergen las espinas, además de tricomas, glóquidas, glándulas, flores o ramas (Gibson y Nobel, 1986). Nuestra propuesta parte de una descripción cuantitativa de la areola, como estructura vegetativa perenne que organiza el desarrollo de las espinas, como han sugerido diversos autores (Arroyo-Cosultchi et al., 2010; Baker, 2006; Moore, 1967; Scheinvar et al., 1976) y en el uso de herramientas de estadística multivariada aplicadas con anterioridad (Arroyo-Cosultchi et al., 2010). Estudiamos las especies de *Neobuxbaumia* y se emplearon las variables de longitud (lineal) y orientación (circular) de las espinas, agrupadas en categorías homólogas, definidas por el orden cronológico ontogenético de aparición (Gibson y Nobel, 1986). La hipótesis de trabajo fue que las espinas y su organización –longitud y orientación en relación con la areola– contienen suficiente información para identificar las 9 especies de *Neobuxbaumia* reconocidas actualmente. El objetivo de esta investigación fue evaluar la utilidad de la areola y sus espinas para la identificación de las especies de *Neobuxbaumia*, de manera alternativa ante la carencia de estructuras reproductivas durante la mayor parte del año.

Materiales y métodos

Se realizó un extenso trabajo de campo durante los años 2012 y 2013 para abarcar la distribución del género. Las localidades de estudio se seleccionaron a partir de ejemplares depositados en el Herbario Nacional de México (MEXU) y mediante la consulta de una base de datos especializada (REMIB). Se muestrearon 367 individuos de 36 localidades, pertenecientes a las 9 especies reconocidas de *Neobuxbaumia*; incluyendo 2 localidades de la especie relacionada *Pseudomitrocereus fulviceps*, con la finalidad de contrastar los patrones de espinación. El número de localidades por especie varió desde una hasta 7, para representar la amplitud de la distribución geográfica de cada una (apéndice 1).

Los especímenes recolectados se identificaron siguiendo un método taxonómico tradicional, a partir de claves de identificación y de ejemplares de herbario (MEXU, XAL). En cada localidad se recolectó un ejemplar de herbario y cuando fue posible se preservaron flores y frutos en solución fijadora (FAA; Ruzin, 1999) como material de apoyo para la identificación y como referencia; todos los ejemplares preservados se depositaron en MEXU.

Categorización de las espinas

Se tomó como base un esquema de desarrollo ontogenético de la areola, semejante al descrito por Gibson y Nobel (1986) para 2 especies de *Echinocactus* Link y Otto. Este esquema se adaptó para categorizar las posiciones en las cuales emergen las espinas en las especies de *Neobuxbaumia*, en función de un criterio de homología. Primero se distinguen las espinas radiales y centrales, considerando la posición relativa en la cual emergen, su forma, textura y coloración. Se reconocen los lados adaxial y abaxial de la areola, con relación al ápice de la planta. La adaxial corresponde a la región floral, mientras la abaxial corresponde a la zona espinífera (Bravo-Hollis, 1978). También se consideró la simetría de la areola, la cual sigue un patrón de desarrollo bilateral. El orden de aparición de las espinas va de la porción abaxial hacia la adaxial de la areola; inicia con una espina radial y posteriormente se van agregando en pares las siguientes espinas, de

manera consecutiva (fig. 1). El número de espinas radiales para las especies incluidas en este estudio varía de 1 a 13, siendo más comunes los individuos con 5 o 7 espinas. En cuanto a las espinas centrales, el número más común es de uno, pero pueden existir hasta 3 o 4. En la categoría de espinas centrales solo se consideró a la primera, por ser la única presente en la mayoría de los casos. Un número reducido de individuos (<10% del total) presentó una serie de espinas de crecimiento secundario, identificables por carecer de un orden y por las diferencias en el color, la forma, el tamaño o la consistencia, respecto a las espinas de crecimiento primario. Estos individuos se omitieron del análisis para evitar que influyeran en los estimadores de tamaño y orientación, principalmente en *N. euphorbioides* donde fueron evidentes.

Variables descriptoras y bases de datos

En cada localidad se tomaron fotografías de los tallos en 10 individuos, sin indicios de actividad reproductiva, empleando una escala métrica como referencia. A partir de las imágenes digitales se realizó la medición, usando la herramienta de análisis ImageJ ver. 1.48b (Abràmoff, Magalhães y Ram, 2004), integrada en el programa Bio7 ver. 1.7 (Austenfeld, 2012), para obtener simultáneamente las variables de longitud (cm) y orientación ($^{\circ}$) para cada espina. Se usó una escala de 0° - 360° para las espinas radiales (fig. 1.1) y de 0° - 180° para las espinas centrales (fig. 1.2). La asignación de las categorías (posiciones relativas) se realizó manualmente al integrar las mediciones en una matriz de datos agrupados, designando la primera espina radial (categoría media) con la letra *a*; de manera ascendente y consecutiva, se designaron las siguientes categorías con las letras *b - f*, y sus simétricas con las letras *b' - f'* (fig. 1.3). En esta matriz de datos cada fila representa una espina y cada registro incluye las variables categóricas (categoría de espina, número de areola, número de individuo, clave de localidad y clave de especie), así como las 2 variables numéricas (longitud y orientación). Esta base de datos está conformada por 21,115 registros, de los cuales 17,973 corresponden a espinas radiales y 3,142 a espinas centrales, los cuales fueron analizados mediante el programa

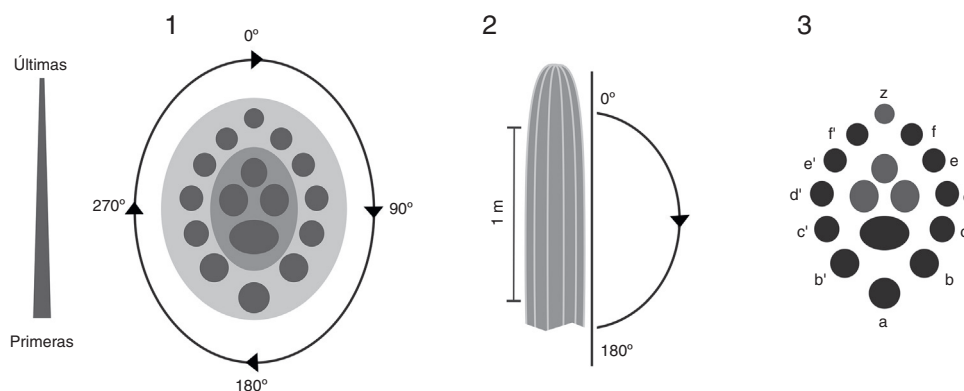


Figura 1. 1) Escala de medición de la dirección de las espinas radiales. 2) Escala de medición de la inclinación de la primera espina central, también se indica la región del tallo donde se realizaron las mediciones. 3) Categorías arbitrarias usadas para organizar los registros de las espinas radiales en la base de datos; la categoría *a* (espina radial media) se usó como referencia de medición y para establecer comparaciones; el resto de las espinas radiales (*b-f* y *b'-f'*) se consideraron como espinas laterales.

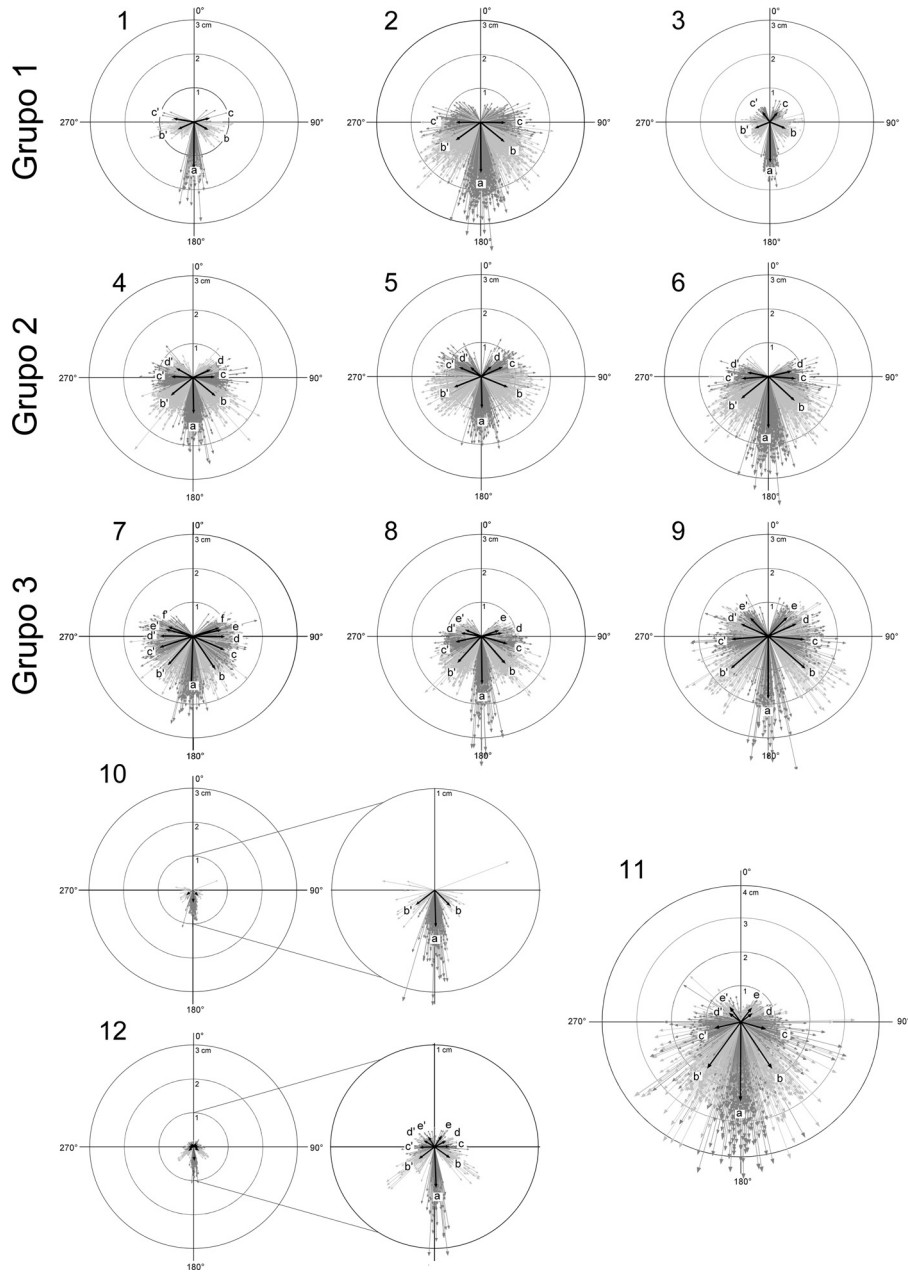


Figura 2. Gráficos circulares por especie y agrupaciones por similitud visual. Grupo A: 1) *Neobuxbaumia sanchezmejoradae*, 2) *N. multiareolata*, 3) *N. sp. 1*; grupo B: 4) *N. mezcalaensis*, 5) *N. scoparia*, 6) *N. squamulosa*; grupo C: 7) *N. macrocephala*, 8) *N. tetetzo*, 9) *P. fulviceps*; especies independientes: 10) *N. euphorbioides*, 11) *N. polylopha*, 12) *N. sp. 2*.

Oriana 4.0 (Kovach Computing Services, 2014) para obtener los estadísticos circulares básicos, como la media, la mediana, la varianza y la desviación estándar, además de proyectar los gráficos circulares (fig. 2). Estos gráficos representan la orientación de cada una de las espinas radiales, clasificadas hasta en 11 categorías predefinidas, así como la orientación promedio para cada categoría ponderada por su longitud promedio.

Análisis multivariados

Los datos agrupados se transformaron para adaptarlos a una matriz rectangular, donde los individuos ocupan las filas (n=367) y las variables numéricas (longitud, orientación) y

categorías (especie, localidad, individuo) ocupan las columnas. En total se incluyeron 60 variables numéricas divididas en 3 bloques: a) percentil menor (5%), b) mediana y c) percentil mayor (95%). Dichas estimaciones se incluyeron como una medida de la variabilidad de los datos y para acotar el sesgo de los registros extremos. Cada uno de estos 3 bloques se subdivide a su vez en las secciones longitud y orientación, cada una de las cuales está compuesta por 10 variables, 9 corresponden a espinas radiales (categorías e-a-e’; fig. 1.3, tabla 1) y la décima representa la primera espina central. Se aplicó una corrección de los valores en las 3 secciones que contienen variables de orientación, asignando el valor de 360° a las celdas vacías de las categorías b’-f’, en lugar de 0°. La base de datos generada en

Tabla 1
Caracterización de espinas radiales por especie.

Especie	# colecta	# esp.	Categorías	CA	GM	[r]
<i>N. euphorbioides</i>	HT001	3	<i>b,a,b'</i>	109-246	177	0.747
	HT005	3	<i>b,a,b'</i>	135-240	184	0.778
	HT045	3	<i>b,a,b'</i>	113-253	178	0.700
	Promedio	3	<i>b,a,b'</i>	130-238	181	0.751
<i>N. sanchezmejoradae</i>	HT039	5	<i>c,b,a,b',c'</i>	60-287	184	0.339
<i>N. macrocephala</i>	HT026	11	<i>f,e,d,c,b,a,b',c',d',e',f'</i>	63-296	182	0.207
	HT028	11	<i>f,e,d,c,b,a,b',c',d',e',f'</i>	57-301	188	0.160
	Promedio	11	<i>f,e,d,c,b,a,b',c',d',e',f'</i>	64-296	185	0.183
<i>N. mezcalaensis</i>	HT036	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	55-309	180	0.130
	HT037	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	58-308	175	0.116
	HT042	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	59-304	178	0.239
	HT043	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	43-321	176	0.147
	HT044	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	62-300	179	0.211
	Promedio	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	61-302	178	0.170
	HT034	5	<i>c,b,a,b',c'</i>	28-326	210	0.011
<i>N. multiareolata</i>	HT035	5	<i>c,b,a,b',c'</i>	57-305	184	0.105
	Promedio	5	<i>c,b,a,b',c'</i>	50-311	182	0.087
	HT007	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	33-327	180	0.137
<i>N. polylopha</i>	HT008	9	<i>e,d,c,b,a,b',c',d',e'</i>	30-334	171	0.014
	HT009	9	<i>e,d,c,b,a,b',c',d',e'</i>	30-329	192	0.077
	HT025	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	39-320	182	0.222
	Promedio	9	<i>e,d,c,b,a,b',c',d',e'</i>	31-332	192	0.003
	HT002	5	<i>c,b,a,b',c'</i>	55-308	182	0.036
<i>N. scoparia</i>	HT003	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	40-320	205	0.020
	HT004	5	<i>c,b,a,b',c'</i>	74-286	179	0.286
	HT010	5	<i>c,b,a,b',c'</i>	56-301	177	0.143
	Promedio	5	<i>c,b,a,b',c'</i>	65-295	355	0.062
	HT006(*)	5	<i>c,b,a,b',c'</i>	64-300	179	0.503
	HT011(*)	3	<i>b,a,b'</i>	112-240	177	0.685
	HT024(*)	5	<i>c,b,a,b',c'</i>	74-280	180	0.440
<i>N. squamulosa</i>	HT030	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	75-287	181	0.372
	HT031	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	68-292	182	0.294
	HT032	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	67-300	179	0.252
	HT033	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	50-318	180	0.204
	Promedio	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	71-292	179	0.277
	SNC	9	<i>e,d,c,b,a,b',c',d',e'</i>	65-300	179	0.203
	SA1413	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	77-288	177	0.370
	HT020	7	<i>d,c,b,a,b',c',d'</i>	75-289	180	0.375
	HT041	9	<i>e,d,c,b,a,b',c',d',e'</i>	59-308	178	0.210
	Promedio	9	<i>e,d,c,b,a,b',c',d',e'</i>	65-300	178	0.209
<i>N. sp. 1</i>	HT040	5	<i>c,b,a,b',c'</i>	36-327	166	0.031
<i>N. sp. 2</i>	HT038	9	<i>e,d,c,b,a,b',c',d',e'</i>	28-335	13	0.064
<i>P. fulviceps</i>	HT027	9	<i>e,d,c,b,a,b',c',d',e'</i>	38-320	2	0.023
	HT029	9	<i>e,d,c,b,a,b',c',d',e'</i>	43-320	177	0.065
	Promedio	9	<i>e,d,c,b,a,b',c',d',e'</i>	42-318	177	0.022

CA: cobertura angular (°) de espinas radiales, correspondiente al intervalo de confianza de 95%; categorías: categorías correspondientes a las espinas radiales presentes; # colecta: ejemplar de herbario de referencia para cada localidad según [Apéndice 1](#); # esp.: número de espinas radiales; GM: gran media (°); [r]: vector 'r'; - (*): especímenes originalmente identificados como *N. tetetzo*.

el paso anterior se visualizó mediante gráficos de variabilidad para identificar las posibles inconsistencias en los datos crudos. Posteriormente, se estandarizaron las variables numéricas de la matriz rectangular. Los estadísticos multivariados básicos se estimaron a partir de la matriz completa para reconocer el agrupamiento de los individuos sin ninguna restricción impuesta. Este análisis también permitió estimar el nivel de correlación entre las variables y la normalidad multivariada del conjunto de datos a partir de la distribución de las distancias de Mahalanobis. El análisis de valores atípicos permitió reconocer los registros con variación extrema; estos registros se descartaron de la matriz en las siguientes pruebas para mejorar el ajuste

con la normalidad multivariada y para reducir posibles errores de medición ([Dempster, 1971](#)). Los análisis multivariados y las pruebas de significación se obtuvieron mediante XLSTAT® ([Addinsoft Inc., 2014](#)) para Microsoft® Excel 2007.

Se realizó un análisis canónico discriminante para identificar el subconjunto de caracteres que permite discriminar las 12 clases incluidas en este estudio. Cada especie estuvo representada por un número variable de individuos y localidades, por lo que se ajustaron las probabilidades de presencia de cada una de manera proporcional. Para los fines del presente estudio, se buscó maximizar el poder discriminante reteniendo todas las variables en el análisis, descartando la reducción de la dimensionalidad y

la selección de variables. En este caso, se analizó la contribución aditiva del conjunto de variables y de la matriz de correlaciones. Después se aplicó un análisis discriminante clasificatorio (ADC) y una prueba de validación para corroborar la correcta asignación de los individuos dentro de la especie identificada por el análisis canónico discriminante, así como la probabilidad de cada individuo de pertenecer a una especie distinta. Para la prueba de validación, los individuos se distribuyeron aleatoriamente en los grupos de estimación y de validación. El primero se conformó por 287 individuos, los cuales representan el 80% del total de la base de datos, mientras el segundo grupo incluyó 70, que representan el 20% restante. El grupo de validación contó con representantes de cada localidad y de cada especie.

Resultados

Identificación de especies de *Neobuxbaumia*

El método taxonómico empleado para la identificación de individuos a priori permitió corroborar las especies en 31 de las 36 localidades estudiadas. Los individuos de 3 localidades de Oaxaca (*HT 006, 011, 024*) no correspondieron con la especie identificada previamente (*N. tetetzo*) y fueron determinados como *N. squamulosa* a partir de nuestro trabajo (tabla 1; apéndice 1); mientras que los individuos pertenecientes a las 2 localidades restantes (*HT 038, 040*) no se pudieron asignar a alguna de las especies conocidas (tabla 1; apéndice 1). Esta identificación de especies se conservó para los análisis subsiguientes mostrando un alto nivel de congruencia con los patrones de espinación observados, así como con los análisis estadísticos aplicados.

Patrones de espinación

La proyección de los gráficos circulares contribuyó a reconocer 3 conjuntos de especies, considerando el número y la longitud promedio de las espinas radiales, la relación entre la longitud de la espina radial media (*a*) y las espinas radiales

laterales (*b-f, b'-f'*; tabla 2), la cobertura angular de las espinas radiales (tabla 1), así como la longitud de la primera espina central (tabla 2). El primer conjunto está conformado por *N. sanchezmejoradae*, *N. multiareolata* y *N. sp. 1*, las cuales presentan 5 espinas radiales, con una longitud promedio de 0.7 cm, la espina *a* puede medir más del doble que las espinas laterales, la cobertura angular abarca de 60 a 300° y la espina central es pequeña o está ausente (grupo A, fig. 2; tabla 1). El siguiente conjunto incluye a *N. mezcalaensis*, *N. squamulosa* y *N. scoparia*, con 5 o 7 espinas radiales, de 0.8 a 1.1 cm de longitud, la espina *a* es ligeramente más grande que las espinas radiales laterales, la cobertura angular abarca de 50 a 310° (grupo B, fig. 2; tabla 1). El tercer conjunto lo conforman *N. tetetzo*, *N. macrocephala* y *P. fulviceps*, con 9 a 11 espinas radiales, llegando a presentarse ocasionalmente hasta 13 espinas en *N. macrocephala*, de 1 a 1.2 cm de longitud, la espina *a* es hasta 1.5 veces mayor que las espinas radiales laterales, la cobertura angular abarca de 40 a 320°; la espina central puede ser de gran tamaño (> 2 cm) (grupo C, fig. 2; tabla 1). Las 3 especies restantes presentan un patrón específico y reconocible con facilidad. *N. polylopha* mostró la mayor homogeneidad entre poblaciones, presenta de 7 a 9 espinas radiales, las cuales son de mayor longitud que en el resto de las especies (>1.2 cm), de tamaño decreciente a partir de la espina *a*, siendo considerablemente menores las categorías de la porción apical de la areola (categorías *e* y *e'*; tabla 2), la cobertura angular abarca de 31 a 332°; la espina central es relativamente pequeña en comparación con la longitud de las espinas radiales y surge casi perpendicular al eje del tallo (fig. 2.11; tabla 1). *N. euphorbioides* y *N. sp. 2* presentan la menor longitud y homogeneidad en espinas radiales (en promedio 0.3 cm), resultando casi imperceptibles en *N. sp. 2* (tabla 2). El patrón particular de *N. euphorbioides* consiste en presentar un menor número de espinas radiales (de 1 a 3), cortas (~3 mm), la cobertura angular abarca entre 90 y 270° y la espina central es mayor a las espinas radiales (fig. 2.10; tabla 1). En el caso de *N. sp. 2* presenta 9 espinas radiales, cortas (~3 mm), la cobertura angular abarca de 60 a 300° y la espina central es inconspicua o totalmente ausente (fig. 2.12; tablas 1, 2).

Tabla 2

Longitud promedio (cm) de espina central y espinas radiales. El bloque de espinas radiales está dividido hasta en 11 categorías, de acuerdo con la figura 1.3. Las categorías se agrupan en espinas laterales derechas (*b-f*), espina media (*a*), espinas laterales izquierdas (*b'-f'*) y media aritmética (μ).

Especie	Espina central	Espinass radiales											μ		
		Laterales derechas				Media				laterales izquierdas					
		<i>f'</i>	<i>e</i>	<i>d</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b'</i>	<i>c'</i>	<i>d'</i>	<i>e'</i>	<i>f'</i>			
<i>N. euphorbioides</i>	1.675					0.326	0.364	0.333							0.350
<i>N. sanchezmejoradae</i>	0.534				0.450	0.484	1.356	0.567	0.569						0.754
<i>N. macrocephala</i>	3.687	0.806	0.917	1.030	1.158	1.247	1.592	1.265	1.250	1.066	0.834	0.832			1.155
<i>N. mezcalaensis</i>	1.316			0.566	0.655	0.901	1.121	0.893	0.651	0.559					0.799
<i>N. multiareolata</i>	0.792				0.475	0.557	1.370	0.578	0.500						0.777
<i>N. polylopha</i>	1.408		0.519	0.451	0.863	1.729	2.436	1.805	0.861	0.457	0.538				1.200
<i>N. scoparia</i>	1.342			0.434	0.679	0.967	0.969	0.972	0.692	0.417					0.862
<i>N. squamulosa</i>	1.363			0.732	0.842	1.168	1.594	1.110	0.790	0.700					1.142
<i>N. tetetzo</i>	2.701		0.570	0.629	0.831	1.202	1.441	1.150	0.832	0.639	0.524				0.971
<i>N. sp. 1</i>					0.357	0.542	1.257	0.505	0.369						0.667
<i>N. sp. 2</i>	0.198		0.374	0.374	0.300	0.327	0.395	0.322	0.235	0.358	0.353				0.335
<i>P. fulviceps</i>	4.017		0.844	0.996	1.204	1.529	1.832	1.484	1.138	0.954	0.775				1.218

Tabla 3

Coefficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas. Los caracteres con valores más altos de contribución para cada función se resaltan en negrita.

Bloque	Variable	F1	F2
Orientación	EC	0.563	-0.090
	ER- <i>e</i>	0.815	-0.016
	ER- <i>d</i>	0.704	-0.247
	ER- <i>c</i>	0.535	-0.396
	ER- <i>b</i>	0.274	-0.510
	ER- <i>a</i>	0.106	-0.092
	ER- <i>b'</i>	-0.267	0.517
	ER- <i>c'</i>	-0.525	0.394
	ER- <i>d'</i>	-0.706	0.257
	ER- <i>e'</i>	-0.818	-0.019
	Longitud	EC	0.838
ER- <i>e</i>		0.841	-0.037
ER- <i>d</i>		0.768	-0.238
ER- <i>c</i>		0.591	-0.321
ER- <i>b</i>		0.394	-0.660
ER- <i>a</i>		0.299	-0.763
ER- <i>b'</i>		0.378	-0.672
ER- <i>c'</i>		0.598	-0.333
ER- <i>d'</i>		0.784	-0.248
ER- <i>e'</i>		0.824	-0.013

EC: espina central; ER: espina radial- categoría (en correspondencia con las claves de la figura 1.3).

Análisis canónico discriminante

Las primeras 2 funciones canónicas explican 59.2% de la variabilidad total; la función 1 explica 31.6% (valor propio = 7.4024), la función 2 el 27.6% (valor propio = 6.4562), y se requiere un total de 11 funciones para explicar el 100% de la variación. La prueba de lambda de Wilks, que evalúa la existencia de diferencias entre los vectores medios de las clases, indicó una diferencia significativa ($p < 0.0001$, $\alpha = 0.05$). Este resultado soporta la existencia de las clases establecidas a priori. La prueba de Fisher (LDA) corroboró que la distancia entre los centroides de las 12 clases fue significativamente diferente, mientras que la prueba unidimensional de igualdad de las medias, indicó la existencia de distintas medias para las clases en la mayoría de las variables ($p < 0.0001$, $\alpha = 0.05$), con excepción de una variable que presentó solo una media para todas las clases.

Las variables con mayor contribución en la primera función canónica fueron orientación y longitud de las espinas radiales *e* y *e'*, así como la longitud de la espina central (tabla 3). De manera particular, las variables orientación y longitud de las espinas radiales contribuyeron significativamente a la separación de los centroides en la primera función, presentando una gradación de menor a mayor valor desde la espina *a*. La primera función ubicó a las especies del grupo C con los valores más bajos, separadas de las especies de los grupos B y A, cuyos valores fueron más altos. Por su parte, las variables con mayor contribución en la segunda función canónica fueron la longitud de las espinas radiales en las categorías inferiores (*a*, *b* y *b'*). En este caso las variables también presentaron una gradación, de mayor a menor valor a partir de la espina *a*. Esta función separó las especies que no pertenecen a ningún grupo; *N. polylopha* presentó los valores

más elevados, mientras *N. euphorbioides* tuvo los valores más reducidos (tabla 3, fig. 3).

Análisis discriminante clasificatorio y prueba de validación

Neobuxbaumia tetetzo y *N. sp. 2* se agruparon correctamente en un 86% de los casos, mientras que *N. sanchezmejoradae*, *N. mezcalaensis* y *N. squamulosa* tuvieron el porcentaje de agrupación correcta más bajo (80 a 85%) y se pueden confundir con 2 o 3 clases distintas (tabla 4). En cuanto a la prueba de validación, el grupo de observaciones empleado para estimar la regla discriminante (80% del total) mostró como promedio 92% de individuos correctamente agrupados y presentó una variación entre las clases de 77.8 a 100%. Por su parte, el grupo de validación (20% del total) mostró un desempeño menor, con 78.6% de individuos correctamente asignados en promedio y una variación de 0 a 100% (tabla 5).

Finalmente, en la prueba de validación cruzada se obtuvo un 74.6% de individuos correctamente clasificados y una variación de 46.1 a 89.7% entre clases. En esta prueba, las especies con mayor número de individuos asignados en otras clases (~50%) fueron *N. mezcalaensis*, *N. multiareolata*, *N. squamulosa* y *N. tetetzo* debido a la semejanza que guardan con otras especies respecto a su espinación. Particularmente, *N. squamulosa* y *N. mezcalaensis* presentan individuos asignados en 3 clases distintas, además de la propia, indicando que estas especies son las más variables del género. Otro conjunto conformado por *N. euphorbioides*, *N. sanchezmejoradae*, *N. multiareolata*, *N. scoparia* y *N. tetetzo* presentan individuos asignados en 2 clases distintas; mientras *N. sp. 1*, *N. sp. 2* y *P. fulviceps* presentan individuos que se asignan en una sola clase distinta (datos no mostrados).

Discusión

Este estudio se centró en las variables de orientación, longitud y número de espinas, así como en la proporción entre las espinas radiales y centrales, para un conjunto amplio de localidades que representan a todas las especies conocidas de *Neobuxbaumia* y a *Pseudomitrocereus fulviceps*. Los datos se organizaron para establecer comparaciones únicamente entre espinas homólogas (categorías de espinas; tablas 1, 2). El nivel de correlación entre las variables de orientación fue alto en el conjunto de datos, particularmente entre las categorías opuestas (e.g.: *b-b'*; fig. 1.3), debido a la simetría bilateral que presenta la areola. Los resultados revelan que la organización de las espinas en la areola es de utilidad en la identificación de las 9 especies de *Neobuxbaumia*. Incluso, con base en estos análisis proponemos que los individuos encontrados en un par de localidades podrían representar especies aún no descritas.

De acuerdo con nuestros resultados, *N. polylopha* se identifica por presentar las espinas radiales más largas en el género para las categorías *a* (> 2.4 cm), *b* y *b'* (> 1.7 cm) (fig. 2.11; tabla 2), y las espinas radiales presentan la cobertura angular más amplia (tabla 1). Estos 2 caracteres, en conjunto con el número de costillas en el tallo (33 ± 0.74) y el tamaño de las areolas (0.26×0.19 cm) registrado por Arroyo-Cosultchi et al. (2010) permiten identificarla con certeza. *N. macrocephala*

Tabla 4
 Número de individuos clasificados correctamente por el análisis discriminante clasificatorio para las especies de *Neobuxbaumia* y *Pseudomitrocereus*. En negrita se resalta el número de individuos correctamente asignados a su especie.

	<i>N. euphor-</i> <i>bioides</i>	<i>N. sanchez-</i> <i>mejoradae</i>	<i>N. macro-</i> <i>cephala</i>	<i>N. mezza-</i> <i>laensis</i>	<i>N. multia-</i> <i>reolata</i>	<i>N. polylopha</i>	<i>N. scoparia</i>	<i>N. sp. 1</i>	<i>N. sp. 2</i>	<i>N. squa-</i> <i>mulosa</i>	<i>N. tetetzo</i>	<i>P. fulviceps</i>	Total	% correcto
<i>N. euphorbioides</i>	30	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	33	90.91%
<i>N. sanchezmejoradae</i>	0	8	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	10	80.00%
<i>N. macrocephala</i>	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	100.00%
<i>N. mezzaensis</i>	0	0	0	42	0	0	4	0	0	3	1	0	50	84.00%
<i>N. multiareolata</i>	0	1	0	0	18	0	0	0	0	1	0	0	20	90.00%
<i>N. polylopha</i>	0	0	0	0	0	38	0	0	0	0	0	0	38	100.00%
<i>N. scoparia</i>	0	0	0	2	0	0	42	0	0	1	0	0	45	93.33%
<i>N. sp. 1</i>	0	0	0	0	1	0	0	11	0	0	0	0	12	91.67%
<i>N. sp. 2</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	13	0	0	0	15	86.67%
<i>N. squamulosa</i>	2	0	0	5	3	0	0	0	0	56	0	0	66	84.85%
<i>N. tetetzo</i>	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	31	0	36	86.11%
<i>P. fulviceps</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	17	18	94.44%
Total													357	89.64%

Tabla 5
 Cuento clasificatorio para la regla discriminante (A) y para la prueba de validación (B).

(A)	<i>N. euphorbioide</i>	<i>N. sanchezme- joradae</i>	<i>N. macrocephala</i>	<i>N. mezcalaensis</i>	<i>N. multireolata</i>	<i>N. polylopha</i>	<i>N. scoparia</i>	<i>N. sp. 1</i>	<i>N. sp. 2</i>	<i>N. squa- mulosa</i>	<i>N. tetetzo</i>	<i>P. fulviceps</i>	Total % correcto
<i>N. euphorbioide</i>	24	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	26
<i>N. sanchezmejoradae</i>	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
<i>N. macrocephala</i>	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>N. mezcalaensis</i>	0	0	36	0	0	0	1	0	0	2	1	0	40
<i>N. multireolata</i>	0	0	0	0	16	0	0	0	0	1	0	0	17
<i>N. polylopha</i>	0	0	0	0	0	29	0	0	0	0	0	0	29
<i>N. scoparia</i>	0	0	0	1	0	0	35	0	0	1	0	0	37
<i>N. sp. 1</i>	0	0	0	0	2	0	0	7	0	0	0	0	9
<i>N. sp. 2</i>	0	0	0	2	0	0	0	11	0	0	0	0	13
<i>N. squamulosa</i>	1	0	0	2	3	0	0	0	0	49	0	0	55
<i>N. tetetzo</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	27	0	30
<i>P. fulviceps</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	13
Total													287
(B)	<i>N. euphorbioide</i>	<i>N. sanchezme- joradae</i>	<i>N. macrocephala</i>	<i>N. mezcalaensis</i>	<i>N. multireolata</i>	<i>N. polylopha</i>	<i>N. scoparia</i>	<i>N. sp. 1</i>	<i>N. sp. 2</i>	<i>N. squa- mulosa</i>	<i>N. tetetzo</i>	<i>P. fulviceps</i>	Total % correcto
<i>N. euphorbioide</i>	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>N. sanchezmejoradae</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>N. macrocephala</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4
<i>N. mezcalaensis</i>	0	0	0	9	0	0	0	0	0	1	0	0	10
<i>N. multireolata</i>	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	3
<i>N. polylopha</i>	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	9
<i>N. scoparia</i>	0	0	0	1	0	0	7	0	0	0	0	0	8
<i>N. sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3
<i>N. sp. 2</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
<i>N. squamulosa</i>	1	0	0	3	0	0	0	0	0	7	0	0	11
<i>N. tetetzo</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	1	6
<i>P. fulviceps</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3	5
Total													70

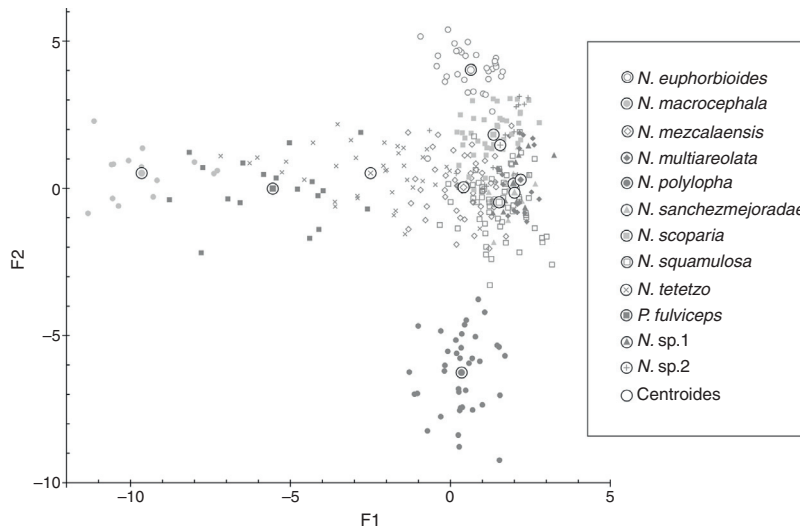


Figura 3. Gráfico de las 2 primeras funciones canónicas y los centroides de cada clase, para las 9 especies de *Neobuxbaumia* y *P. fulviceps*. Las observaciones de cada especie se distinguen con una marca específica, mientras los centroides están indicados con una marca de mayor tamaño.

presenta cierta similitud con *N. polylopha*, pero sus individuos se distinguen por presentar un mayor número de espinas radiales (11) y la espina central de mayor longitud (3.6 cm; tabla 2). Estos 2 caracteres, en combinación con la forma de la areola (obovada triangular) y el número de costillas (17-26) registrados por Arias et al. (2012) y Bravo-Hollis (1978) son consistentes para distinguir a esta especie.

Neobuxbaumia scoparia y *N. euphorbioides* también resultaron identificables con atributos de las espinas. La primera se caracteriza por presentar 5 espinas radiales, raramente 7, con una longitud homogénea de 0.8 cm en promedio. Este patrón de espinación se comparte con *N. mezcalaensis* y *N. squamulosa*, mostrando una gran similitud en el número y longitud promedio de las espinas radiales y centrales (figs. 2, 3; tabla 2). No obstante, al combinar los 3 atributos de las espinas radiales que encontramos en *N. scoparia* con otros caracteres vegetativos como la ramificación profusa, el diámetro de sus ramas (8-10 cm), la separación entre areolas (1.2-2 cm) y la presencia de una depresión interareolar marcada (Bravo-Hollis, 1978), se puede diferenciar claramente a esta especie. Por su parte, *N. euphorbioides* presenta el menor número (3) y la menor longitud (0.3 cm) de sus espinas radiales (tablas 1, 2). El ADC revela la presencia de un porcentaje bajo de individuos asignados a otras especies (tabla 4), los cuales representan el extremo de la variación morfológica de la especie. El patrón de espinación aquí reconocido para *N. euphorbioides* no se comparte con las otras especies analizadas. Además de los 2 caracteres que permiten discriminar a esta especie (número y tamaño menores de las espinas radiales), existen otros caracteres vegetativos que permiten identificarla de manera fiable, como el crecimiento monopódico del tallo, el número reducido de costillas (6-8), la altura de las costillas (3 cm) y la distancia entre areolas (ca. 1 cm) (Bravo-Hollis, 1978).

Neobuxbaumia sanchezmejoradae se conoce de una sola localidad, donde presenta una baja densidad poblacional, por lo que el número de individuos analizado es menor en relación con otras especies. Además, es el taxón más recientemente descrito

del género y no ha sido integrado en ningún estudio comparativo. La mayor similitud en los atributos de la areola fue con *N. multiareolata* (figs. 2.1, 2.2, 3) por compartir el número de espinas radiales, la proporción de la espina media a que es 2 o más veces más grande que el resto de las espinas radiales y el promedio de longitud de las espinas radiales es de 0.7 cm (tabla 2). Los caracteres que permiten identificar a *N. sanchezmejoradae* incluyen la cobertura angular intermedia y la proximidad de las espinas $b-c$ y $b'-c'$ (tabla 1; fig. 1). Otras características morfológicas distintivas de *N. sanchezmejoradae* son los tallos con ramificación y el número de costillas igual o mayor a 25. Por su parte, *N. multiareolata* se identifica por una cobertura angular amplia y por una mayor separación entre las espinas $b-c$ y $b'-c'$ (tabla 1; fig. 2.2). Otras características del tallo que permiten diferenciar a *N. multiareolata* de la especie anterior, son el número de costillas (≤ 20) y los tallos monopódicos (Arroyo-Cosultchi et al., 2010; Bravo-Hollis, 1978). Esta especie fue segregada de *N. mezcalaensis* por Bravo-Hollis et al. (1973) y más recientemente Arroyo-Cosultchi et al. (2010) reconocieron que no existen fenotipos intermedios y que los individuos se clasifican en sus respectivas especies. Nuestros resultados apoyan la separación de estos taxa y se registra por primera vez la semejanza de *N. multiareolata* con *N. sanchezmejoradae*, considerando únicamente atributos vegetativos.

Neobuxbaumia tetetzo comparte el patrón de espinación con *N. macrocephala* y *P. fulviceps* (fig. 2; tabla 1). El ADC indicó que el 13.9% de sus individuos se clasificó incorrectamente en *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* debido a que comparte la longitud de la espina central con la primera y el número y cobertura angular con la segunda (tablas 1, 2, 5), pero no se confunde con *P. fulviceps* en ningún caso. *N. tetetzo* tiene una distribución amplia en el sur de México, entre los estados de Puebla y Oaxaca, con una marcada variación en el número (7-9) y longitud (0.5-1.4 cm) de sus espinas radiales. Sin embargo, se puede identificar a partir de la longitud promedio de la primera espina central (2.7 cm), además de otros caracteres señalados por Bravo-Hollis (1978) y Arias et al. (2012) como la presencia

de podarios, depresión interareolar, número de costillas (13-17), distancia interareolar (7-35 mm), ramificación escasa y tallos de hasta 60 cm de diámetro.

N. squamulosa comparte el patrón de espinación con *N. mezcalaensis* y *N. scoparia* (fig. 2), mientras que el ADC revela que el 15.2% de sus individuos se asigna en *N. multiareolata*, *N. mezcalaensis* y *N. euphorbioides*. Los caracteres que permiten identificar a *N. squamulosa* son el número (3-7) y la longitud promedio de las espinas radiales (1.1 cm), con una cobertura angular intermedia (71° -292°). La amplia distribución geográfica de esta especie, en comparación con otras especies del mismo género (Jalisco a Oaxaca), puede relacionarse con la variabilidad morfológica registrada, la cual podría analizarse en un estudio particular. El atributo con una variación más evidente fue el número de espinas radiales: de 3 a 5 en las localidades meridionales (Oaxaca) y 7 en aquellas más septentrionales (costas de Jalisco, Colima, Michoacán y Guerrero) (tablas 1 y 2). Sin embargo, otros caracteres vegetativos fueron consistentes con datos documentados previamente (Scheinvar y Sánchez-Mejorada, 1990), como el número de costillas (18), el diámetro de las ramas (12-17.5 cm), una ramificación escasa y areolas de 5 × 4 mm con forma obovada. Los individuos de *N. squamulosa* del istmo de Tehuantepec y Valles Centrales, Oaxaca, fueron asignados previamente como *N. tetetzo* var. *nuda* (Bravo-Hollis, 1978) con base en algunos atributos vegetativos –altura de plantas, reducción de espinas–, pero no en el patrón de espinación o en las estructuras reproductivas. Los resultados indican que el patrón de espinación fue consistente entre las localidades de Oaxaca (H. Tapia 006, 011, 024) y las localidades de otros estados (tabla 1; fig. 2.6); del mismo modo, los análisis multivariados indican que nunca se confundieron los individuos de estas localidades con *N. tetetzo* (fig. 3; tabla 4). *N. mezcalaensis* presentó 16% de individuos clasificados en *N. squamulosa*, *N. scoparia* y *N. tetetzo*, pero nunca con *N. multiareolata*, como ya lo habían señalado Arroyo-Cosultchi et al. (2010). En particular, *N. mezcalaensis* se distingue de *N. scoparia* por presentar 7 espinas radiales y se distingue de *N. squamulosa* por una longitud promedio menor de sus espinas radiales. Otros caracteres vegetativos que permiten identificar a *N. mezcalaensis* son el tallo monopódico, el diámetro del tallo hasta 40 cm, el número de costillas (13 a 25), el margen angulado de sus costillas y la distancia interareolar (18 a 26 mm) (Bravo-Hollis, 1978; Arias et al., 2012).

Neobuxbaumia sp. 1 y *N. sp. 2* incluyen individuos de 2 localidades que no pudieron ser asignadas a ninguna de las especies reconocidas. *Neobuxbaumia* sp. 1 comparte el patrón de espinación con *N. sanchezmejoradae* y *N. multiareolata* (fig. 2), cuyo conjunto conforma un conglomerado muy estrecho en el gráfico de las funciones canónicas (fig. 3), siendo su principal diferencia la espina central ausente. Por su parte, *N. sp. 2* presenta un patrón de espinación único, considerando el número (9) y la longitud promedio de sus espinas radiales (< 0.3 cm), así como la reducción de la espina central. Otros atributos vegetativos no evaluados cuantitativamente, pero únicos para esta localidad, son la ramificación acrótona, la forma y la profundidad de las costillas, así como la forma y tamaño de la areola. Con base en la información para identificar especies contenida en las

espinas y su organización (longitud y orientación), consideramos la hipótesis de que los individuos encontrados en ambas localidades representan especies aún no descritas. Por su parte, *Pseudomitrocereus fulviceps* comparte el patrón de espinación con *N. macrocephala* y *N. tetetzo*. El tamaño de las espinas radiales de *P. fulviceps* fue ligeramente mayor que en las otras 2 especies (1.2 cm) y la primera espina central tuvo el promedio de longitud más grande de todas las especies analizadas (4 cm). Otros caracteres vegetativos que complementan la identificación de esta especie, incluyen la consistencia flexible de la espina central, el color de las espinas (moreno a amarillento), la forma (circular a obovada) y el tamaño de la areola (1 cm), el color del tallo (verde limón), la ramificación profusa, el número de costillas (11 a 14) y el diámetro del tronco (1 m) (Arias et al., 2012; Bravo-Hollis, 1978).

Los datos de espinación y el uso de análisis multivariados, incluidos los conteos clasificatorios, corroboraron que las especies asignadas a priori son unidades congruentes en todos los casos y que la variación morfológica es mayor entre individuos de diferentes especies que entre individuos de una misma especie procedentes de distintas localidades. Se consideró de alto valor predictivo el empleo de los atributos de las espinas del tallo para una correcta determinación de las especies de *Neobuxbaumia* y permitieron construir una clave de identificación (apéndice 2). Otros estudios morfométricos apoyan en algún grado esta propuesta (Arroyo-Cosultchi et al., 2010; Baker, 2006; Moore, 1967; Sánchez, Arias y Terrazas, 2013; Scheinvar et al., 1976). Los grupos de especies identificadas a partir de la similitud de sus patrones de espinación (fig. 2) representan hipótesis de homología que podrán someterse a prueba en un eventual análisis filogenético del género.

Se propone la aplicación de estos métodos de análisis en otros géneros de Cactaceae, considerando la dificultad para encontrar estructuras reproductivas durante la mayor parte del año debido a la corta duración de la floración (Valiente-Banuet, Rojas-Martínez, Arizmendi y Dávila, 1997); en muchos casos no es posible observar estructuras reproductivas durante largos periodos, pero sí se cuenta con estructuras persistentes como las areolas y sus espinas. Es evidente que otros caracteres morfológicos, anatómicos y genéticos, podrían sumarse a las variables propuestas en el presente estudio.

Agradecimientos

La presente contribución forma parte del proyecto de investigación de tesis del primer autor y se presenta como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias del Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM). El primer autor agradece la formación recibida en este programa de posgrado y al Conacyt por la beca de manutención (332595) otorgada para la realización de sus estudios de doctorado. Este estudio fue financiado por la DGAPA-PAPIIT (IN208315, SA). Agradecemos a O. Téllez y G. Arroyo-Cosultchi por compartir sus bases de datos de localidades de colecta y por el apoyo en campo (GA), así como a D. Sánchez, D. Aquino, Y. Morales y A. Rodríguez del Laboratorio de Cactáceas del Jardín Botánico, por el apoyo en campo y laboratorio. A los dos revisores anónimos y al Dr. Ramón Cuevas por sus valiosas recomendaciones.

Apéndice 1. Lista de especies y su procedencia (especie, autor: estado, municipio, localidad, coordenadas, colector, número de colecta). Todos los ejemplares de herbario se depositaron en el herbario MEXU

Neobuxbaumia euphorbioides (Haw.) Buxb. ex Bravo: Veracruz, Naolinco, Río Naolinco - San Nicolás, 19°34'38.7", -96°47'59.5", *H. Tapia 001*; Veracruz, Emiliano Zapata, Plan del Río, 19°25'08.3", -96°39'12.1", *H. Tapia 005*; Veracruz, Actopan, El Descabezadero, 19°32'19.6", -96°42'11.3", *H. Tapia 045*.

Neobuxbaumia macrocephala (F.A.C.Weber ex K.Schum.) E.Y. Dawson: Puebla, Zapotitlán de las Salinas, camino a Atolotitlán, 18°15'19.9", -97°29'38.9", *H. Tapia 026*; Puebla, Zapotitlán de las Salinas, carr. Zapotitlán - Huajuapán, 18°14'34.5", -97°32'52.5", *H. Tapia 028*.

Neobuxbaumia mezcalaensis (Bravo) Backeb.: Guerrero, Eduardo Neri, Xochipala, 17°47'43.5", -99°34'36.0", *H. Tapia 036*; Guerrero, Huitzuc de los Figueroa, Paso Morelos, 18°12'22.3", -99°11'31.3", *H. Tapia 037*; Morelos, Tlaltizapán, Las Estacas, 18°42'58.4", -99°05'45.4", *H. Tapia 042*; Puebla, Izúcar de Matamoros, carr. Cuautla, Mor. - Huajuapán, Oax., 18°28'49.1", -98°23'37.4", *H. Tapia 043*; Puebla, Petlalcingo, carr. Cuautla, Mor. - Huajuapán, Oax., 18°06'29.4", -97°57'44.6", *H. Tapia 044*.

Neobuxbaumia multiareolata (Daws.) Bravo, Scheinvar y Sánchez-Mej.: Guerrero, Juan R. Escudero, Tierra Colorada, 17°11'36.9", -99°30'37.5", *H. Tapia 034*; Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, Acahuizotla, 17°21'48.9", -99°27'39.9", *H. Tapia 035*.

Neobuxbaumia polylopha (DC.) Backeb.: Hidalgo, Eloxochitlán, Almolón, 20°43'41.0", -98°55'21.3", *H. Tapia 007*; Querétaro, Pinal de Amoles, Huajales, 21°12'36.2", -99°31'06.4", *H. Tapia 008*; Querétaro, Jalpan de Serra, Jalpan, 21°10'11.5", -99°27'05.4", *H. Tapia 009*; San Luis Potosí, Río Verde, San Sebastián, 21°43'51.3", -99°49'44.3", *H. Tapia 025*.

Neobuxbaumia sanchezmejoradae A.B.Lau: Oaxaca - Dto. Tlaxiaco, Santiago Nuyoo, Tierra Azul, 16°59'03.7", -97°45'00.4", *H. Tapia 039*.

Neobuxbaumia scoparia (Poselg.) Backeb.: Veracruz, Naolinco, Río Naolinco, 19°33'57.3", -96°46'50.6", *H. Tapia 002*; Veracruz, Actopan, camino Actopan - La Reforma, 19°30'45.7", -96°34'53.7", *H. Tapia 003*; Veracruz, Emiliano Zapata, Plan del Río, 19°25'04.9", -96°39'07.8", *H. Tapia 004*; Oaxaca - Dto. Juchitán, Juchitán de Zaragoza, carr. Matías Romero - Juchitán, 16°34'01.1", -94°54'34.0", *H. Tapia 010*.

Neobuxbaumia sp. 1 n/d: Oaxaca - Dto. Cuicatlán, n/d, n/d, n/d, *H. Tapia 040*.

Neobuxbaumia sp. 2 n/d: Oaxaca - Dto. Tlaxiaco, n/d, n/d, n/d, *H. Tapia 038*.

Neobuxbaumia squamulosa Scheinvar y Sánchez-Mej.: Oaxaca - Dto. Tlacolula, San Pedro Totolapa, San José de Gracia, 16°40'14.5", -96°06'01.4", *H. Tapia 006*; Oaxaca - Dto. Tehuantepec, Santa María Mixtequilla, carr. Tehuantepec - La Ventosa, 16°25'20.7", -95°13'36.3", *H. Tapia 011*; Oaxaca - Dto. Tlacolula, San Lorenzo Albarradas, Hierve el Agua, 16°52'01.6", -96°16'32.7", *H. Tapia 024*; Jalisco, La Huerta, Loma Alta, 19°20'55.1", -104°43'01.5", *H. Tapia 030*; Colima, Tecmán, La Salada, 19°03'10.7", -103°47'04.4", *H. Tapia 031*; Michoacán, Aguila, Mirador, 18°33'51.1", -103°38'46.3", *H. Tapia 032*; Guerrero, José Azueta, Zihuatanejo, 17°44'13.2", -101°37'07.0", *H. Tapia 033*.

Neobuxbaumia tetetzo (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Backeb.: Oaxaca Dto. Tlacolula, San Pedro Totolapa, carr. 190 km. 108, 16°40'33.2", -96°08'45.5", *H. Tapia 020*; Oaxaca Dto. Cuicatlán, San Juan Bautista Cuicatlán, Quiotepec, 17°53'04.1", -96°58'32.3", *H. Tapia 041*; Puebla, Zapotitlán de las Salinas, Jardín Botánico Helia Bravo, 18°20'00.7", -97°27'32.5", *S. Arias 1413*; Puebla, San José Miahuatlán, Paradero carr. Tehuacán - Oaxaca, 18°13'31.3", -97°17'48.0", *n/d SNC*.

Pseudomitrocereus fulviceps (F.A.C.Weber) Bravo y Buxb.: Puebla, Zapotitlán de las Salinas, camino a Atolotitlán, 18°15'19.9", -97°29'38.9", *H. Tapia 027*; Puebla, Tehuacán, Mesa de San Lorenzo, 18°26'37.0", -97°27'45.4", *H. Tapia 029*.

Apéndice 2. Clave para la identificación de especies de *Neobuxbaumia*, utilizando principalmente atributos de la areola del tallo no reproductivo. Los datos métricos se expresan como promedio

1. Espinas radiales 1 a 3, espina central mayor a 1.5 cm. *N. euphorbioides*
1. Espinas radiales 5 o más, espina central variable en tamaño
2. Espinas radiales menores a 0.5 cm de longitud, espina central ausente por lo general. *N. sp. 2*
2. Espinas radiales mayores a 0.6 cm de longitud, espina central presente
3. Espinas radiales 5 a 7
4. Espinas radiales 5, la radial media más larga que las laterales
5. Ramas con 25 costillas o más, plantas usualmente con ramificación *N. sanchezmejoradae*
5. Ramas con 20 costillas o menos, plantas monopódicas, solo ramifican por efecto de daño en el meristemo del eje central.
6. Espinas del ápice del tallo de color pardo a rojizo, espina central presente, tubo floral de color verde a rojizo *N. multiareolata*
6. Espinas del ápice del tallo de color blanco a amarillo, sin espina central, tubo floral amarillo o rojo *N. sp. 1*
4. Espinas radiales de 5 a 7, la radial media de tamaño uniforme respecto a las laterales
7. Plantas monopódicas, solo ramifican por efecto de daño, espinas radiales 7 *N. mezcalaensis*
7. Plantas con ramificación
8. Ramas con 18 costillas, ramificación moderada, espinas radiales 7, raramente 3 o 5 *N. squamulosa*
8. Ramas con 20 costillas o más, plantas muy ramificadas, espinas radiales 5, raramente 7 *N. scoparia*

3. Espinas radiales 9 o más
9. Espinas centrales y radiales amarillas uniformes en grosor y flexibilidad *N. polylopha*
9. Espinas centrales pardo-oscuro y radiales pardo-claras, desiguales en grosor y flexibilidad
10. Ramas con más de 17 costillas *N. macrocephala*
10. Ramas con menos de 17 costillas
11. Areolas 1-1.5 cm de longitud, obovadas a redondeadas, distantes entre sí 0.7 a 3.5 cm; espinas radiales de color gris. *N. tetetzo*
11. Areolas 0.8 a 1.0 cm de longitud, redondeadas a elípticas, distantes entre sí 1.0 a 1.5 cm; espinas radiales de color amarillo claro. *P. fulviceps*

Referencias

- Abramoff, M. D., Magalhães, P. J. y Ram, S. J. (2004). Image processing with image. *J. Biophotonics*, *11*, 36–42.
- Addinsoft Inc. (2014). XLSTAT. [consultado 10 Sep 2014]. Disponible en: <http://www.xlstat.com/es/>
- Arias, S., Gama-López, S., Guzmán-Cruz, U. y Vázquez-Benítez, B. (2012). *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 95, Cactaceae*. México, D.F.: Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arias, S. y Terrazas, T. (2006). Análisis cladístico del género *Pachycereus* (Cactaceae) con caracteres morfológicos. *Brittonia*, *58*, 197–216.
- Arroyo-Cosultchi, G., Terrazas, T., Arias, S. y López-Mata, L. (2010). Delimitación de *Neobuxbaumia mezcalaensis* y *N. multiareolata* (Cactaceae) con base en análisis multivariados. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, *86*, 53–64.
- Austenfeld, M. (2012). A graphical user interface for R in a rich client platform for ecological modeling. *Journal of Statistical Software*, *49*, 1–19.
- Baker, M. A. (2006). Circumscription of *Echinocereus arizonicus* subsp. *arizonicus*: phenetic analysis of morphological characters in section *Triglochidiatus* (Cactaceae), part II. *Madroño*, *53*, 388–399.
- Bravo-Hollis, H. (1978). *Las cactáceas de México. Vol. I* (2.ª edición). México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bravo-Hollis, H., Scheinvar, L. y Sánchez-Mejorada, H. (1970). Estudio comparativo del género *Neobuxbaumia* Backeberg. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, *15*, 75–82.
- Bravo-Hollis, H., Scheinvar, L. y Sánchez-Mejorada, H. (1971a). Estudio comparativo del género *Neobuxbaumia* Backeberg II. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, *16*, 3–14.
- Bravo-Hollis, H., Scheinvar, L. y Sánchez-Mejorada, H. (1971b). Estudio comparativo del género *Neobuxbaumia* Backeberg III. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, *16*, 75–83.
- Bravo-Hollis, H., Scheinvar, L. y Sánchez-Mejorada, H. (1973). Estudio comparativo del género *Neobuxbaumia* Backeberg IV. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, *18*, 59–67.
- Cope, J. S., Corney, D., Clark, J. Y., Remagnino, P. y Wilkin, P. (2012). Plant species identification using digital morphometrics: a review. *Expert Systems with Applications*, *39*, 7562–7573.
- Dempster, A. P. (1971). An overview of multivariate. *Journal of Multivariate Analysis*, *1*, 316–346.
- DeSalle, R., Egan, M. G. y Siddall, M. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *360*, 1905–1916.
- Edwards, D. L. y Knowles, L. L. (2014). Species detection and individual assignment in species delimitation: can integrative data increase efficacy? *Proceedings. Biological Sciences/The Royal Society*, *281*, 2–7.
- Gibson, A. y Nobel, P. (1986). *The cactus primer*. Cambridge: Harvard University Press.
- Guzmán-Cruz, U., Arias, S. y Dávila, P. (2003). *Catálogo de cactáceas mexicanas*. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Conabio.
- Hunt, D. R. (2006). *The new cactus Lexicon*. Milborne Port: DH Books.
- Kovach Computing Services. (2014). Oriana 4.0. [consultado 5 Oct 2014]. Disponible en: <http://www.kovcomp.co.uk/oriana/>
- Moore, W. O. (1967). The *Echinocereus enneacanthus-dubius-stramineus* Complex (Cactaceae). *Brittonia*, *19*, 77–94.
- Morrone, J. J. (2013). *Sistemática. Fundamentos, métodos, aplicaciones*. México, D.F.: Facultad de Ciencias, UNAM.
- Reid, N. M. y Carstens, B. C. (2012). Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. *BMC Evolutionary Biology*, *12*, 196.
- Rissler, L. J. y Apodaca, J. J. (2007). Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology*, *56*, 924–942.
- Ruzin, S. E. (1999). *Plant microtechniques and microscopy*. New York: Oxford University Press.
- Sánchez, D., Arias, S. y Terrazas, T. (2013). Análisis morfométrico de las especies de *Echinocereus* sección *Triglochidiati* (Cactaceae) en México. *Brittonia*, *65*, 368–385.
- Scheinvar, L. y Sánchez-Mejorada, H. (1990). *Neobuxbaumia squamulosa* sp. nov. Scheinvar et Sanchez-Mejorada. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, *35*, 13–18.
- Scheinvar, L., Toledo, J. A. y Sánchez-Mejorada, H. (1976). Algunas técnicas de taxonomía numérica aplicada al género *Neobuxbaumia* Backeb. emend Daws. *Buxbm. Hoehnea*, *6*, 55–94.
- Sites, J. W. y Marshall, J. C. (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, *18*, 462–470.
- Valiente-Banuet, A., Rojas-Martínez, A., Arizmendi, M. C. y Dávila, P. (1997). Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, central Mexico. *American Journal of Botany*, *84*, 452–455.
- Wiens, J. J. (2007). Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology*, *56*, 875–878.
- Wiens, J. J. y Servedio, M. R. (2000). Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proceedings. Biological Sciences/The Royal Society*, *267*, 631–636.

Capítulo 2

Tapia H.J., Arias S., Bárcenas-Argüello M.L. and Terrazas T.

(submitted)

Does *Neobuxbaumia* belong to *Cephalocereus*? A
phylogenetic analysis and taxonomic assessment
based on molecular and morphological evidence

[Plant Systematics and Evolution]

Tapia et al. – Phylogenetic analysis of *Neobuxbaumia*

Héctor J. TAPIA¹, Salvador ARIAS^{1,*}, María Luisa BÁRCENAS-ARGÜELLO¹ and Teresa TERRAZAS².

Belongs *Neobuxbaumia* to *Cephalocereus*? A phylogenetic analysis and taxonomic assessment based on molecular and morphological evidence

¹ Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-614, México 04510 DF, México.

² Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-233, México 04510 D.F., México.

* e-mail: sarias@ib.unam.mx

Abstract *Neobuxbaumia* (Cactaceae, Cactoideae, Echinocereae) is a genus of columnar cacti endemic to México, and a member of the *Cephalocereus* group (genera *Cephalocereus*, *Neobuxbaumia*, and *Pseudomitrocereus*). We explore Maximum Parsimony and Bayesian Inference methods to reconstruct the phylogeny of *Neobuxbaumia* and its allies, using molecular data from seven chloroplast regions (*petL-psbE*, *psbA-trnH*, *rpl16*, *rpl32-trnL^{UAG}*, *trnL-F*, *trnQ-rps16*, and *ycf1*), simple coded indels, and a set of 46 structural characters. The *Cephalocereus* group was recovered as monophyletic with high support values, while *Neobuxbaumia* appear as paraphyletic, due to the polyphyly of the gen. *Cephalocereus* and the derived position of *Pseudomitrocereus* within this group. Topology was mostly congruent among the different phylogenetic methods explored, from where were observed three pervasive clades. Two structural characters were confirmed as synapomorphies for the *Cephalocereus* group: prismatic crystals in dermal system and the perianth woody cap persistent in the fruit. The derived position of *Pseudomitrocereus* suggests to inquire for new hypothesis as the hybrid origin of this taxon and the possible introgression of characters. We propose the transference of all species of *Neobuxbaumia*, *Cephalocereus*, and *Pseudomitrocereus* to a single natural taxon, where *Cephalocereus* has priority over the other names. Based on our results, a new circumscription for gen. *Cephalocereus* is proposed, including new combinations and a species key.

Keywords Bayesian inference, *Cephalocereus*, combined analyses, Echinocereae, morphology, parsimony, *Pseudomitrocereus*.

Introduction

Neobuxbaumia Backeb. (Cactaceae, Cactoideae, Echinocereae) is a genus of columnar cacti that includes between eight and nine species recognized in recent taxonomic treatments (Guzmán-Cruz et al. 2003; Hunt et al. 2006). This genus is endemic to Mexico where it is distributed from Oaxaca in the southern to Tamaulipas in the northeastern, and to Jalisco in the western (Guzmán-Cruz et al. 2003). These species inhabit ample environmental gradients (e.g. precipitation regimes and edaphic conditions) along their geographic ranges, but occurs most commonly in association with tropical deciduous forest and thorn scrub (Bravo-Hollis et al. 1970, 1971a, b, 1973; INEGI 2014). *Neobuxbaumia* was erected by Backeberg (1938) to include giant columnar species with crown flowering, without a dense coverage of trichomes (non-differentiated flowering region), bare flowers, and edible fruits with white pulp, segregating it from *Cephalocereus*. Backeberg (1938) originally recognized only *N. tetetzo* (type species), and *N. polylopha*, treating as uncertain the assignment of *Cephalocereus scoparius* to *Neobuxbaumia*. During the following years, Dawson (1952a, b) and Backeberg (1960) extended the circumscription of *Neobuxbaumia* recognizing up to six species: *N. euphorbioides*, *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis*, *N. polylopha*, *N. scoparia*, and *N. tetetzo*. Later, Bravo-Hollis (1978) segregated *N. multiareolata* from *N. mezcalaensis*, reaching a total of seven *Neobuxbaumia* species, all of them transferred from three different genera: *Cereus* (*N. polylopha*, and *N. euphorbioides*), *Pilocereus* (*N. scoparia*, and *N. tetetzo*), and *Cephalocereus* (*N. macrocephala*, *N. mezcalaensis*, and *N. multiareolata*). More recently, the taxonomic synthesis by Hunt et al. (2006) recognized another two species originally described as members of *Neobuxbaumia* (*N. squamulosa* and *N. sanchezmejoradae*). Hunt et al. (2006) also considered *N. multiareolata* as infraspecific entity of *N. mezcalaensis*, although the morphometric study by Arroyo et al. (2010) brought enough evidence to validate that these taxa represent two distinct species.

Dawson (1952a) proposed a first relationship hypothesis based on partial similarities between *Neobuxbaumia* and *Carnegiea*. Later, Buxbaum (1958, 1961) considers that *Neobuxbaumia* is close to *Pachycereus*, *Lemaireocereus*, and particularly to *Cephalocereus* and *Backebergia*. However, this hypothesis was not supported by Gibson and Horak (1978), who conducted a comparative morpho-anatomical study on the columnar cacti of North America suggesting also a relationship with *Carnegiea*, based on similarities in the growth form and other morphological attributes of the stem, flower and fruit. Consequently, the International Cactaceae Systematic

Group proposed to include *Neobuxbaumia* in *Carnegiea* (Hunt and Taylor 1986, 1990), a view shared in some taxonomic synthesis of Cactaceae (e.g. Barthlott and Hunt 1993), but in others were retained as independent genera (Hunt 1999; Guzmán-Cruz et al. 2003; Hunt et al. 2006).

Recent studies show that *Neobuxbaumia* forms a monophyletic group together with the genera *Cephalocereus* and *Pseudomitrocereus* (*Cephalocereus* group), recovered in phylogenetic analyses based on molecular (*rpl16*, *trnL-F*, and the ITS region of nuclear ribosomal DNA) and morphological characters (Arias et al. 2003, 2005; Arias and Terrazas 2006). These studies recovered the *Cephalocereus* group as sister to *Pachycereus* and *Lemaireocereus* groups, and as clearly distinct from *Carnegiea*. Arias et al. (2003), analyzing chloroplast regions (*rpl16*, and *trnL-F*), recovered *Pseudomitrocereus fulviceps* as sister to the remaining species of the *Cephalocereus* group, while Hernández-Hernández et al. (2011) from nuclear (*ppc*) and plastid DNA regions (*trnK-matK*, *matK*, *trnL-trnF*, and *rpl16*) recovered this taxon in a more derived position. Morphological characters supporting the relationship of the *Cephalocereus* group include the presence of calcium oxalate crystals in hypodermis and epidermis (Terrazas and Loza-Cornejo 2002), the formation of a perianth woody cap persistent in the fruit, white pulp, and the longitudinal dehiscence (Arias and Terrazas 2006). *Neobuxbaumia* bear a non-differentiated flowering region (lacking a cephalium), while *Cephalocereus* has a differentiated flowering region, e.g. lateral cephalium in subgen. *Cephalocereus* (Vázquez-Sánchez et al. 2005, 2007) or apical pseudocephalium in subgen. *Neodawsonia* (Bravo-Hollis 1978; Bárcenas-Argüello 2006); while bare flower is an attribute that shares species of both genera. Besides having a differentiated flowering region, *Pseudomitrocereus* present large trichomes and bristles (modified spines) in the flower (Gibson and Horak 1978; Terrazas and Loza-Cornejo 2002; Arias and Terrazas 2006; Bárcenas-Argüello 2006; Hunt et al. 2006).

Recent phylogenetic studies at tribe or higher levels have shown varying results due to the poor sampling of taxa and the limited number of markers included. Phylogenetic analysis of Cactaceae by Bárcenas et al. (2011) based on *trnK-matK* region provided resolution only to recover *Neobuxbaumia* as a member of the tribe Echinocereeae, along with *Pachycereus*, *Peniocereus*, *Echinocereus*, and *Stenocereus*, among other genera. Hernández-Hernández et al. (2011) recovered seven species from the *Cephalocereus* group as monophyletic offering no resolution on relationships among the three genera. Thus, the phylogenetic relationships of *Neobuxbaumia* remain unclear. In the present study we undertook a more comprehensive phylogenetic analysis of

Neobuxbaumia using two different sets of characters: a) DNA sequence data from seven chloroplast markers (*petL-psbE*, *psbA-trnH*, *rpl16*, *rpl32-trnL^{UAG}*, *trnL-F*, *trnQ-rps16*, and *ycf1*), and b) 46 structural characters. Our goals are to reconstruct the phylogenetic relationships of *Neobuxbaumia*, within the *Cephalocereus* group, and to analyze the evolution of structural characters, in order to re-assess the circumscription and classification of these taxa. We expect that the inclusion of morphological data will be a complement to corroborate and strengthen the phylogeny produced with molecular data alone.

Materials and methods

Taxon sampling

To assess the monophyly of the gen. *Neobuxbaumia* we include all the fifteen recognized species of *Cephalocereus* group *sensu* Arias et al. (2003): nine species of *Neobuxbaumia*, five species of *Cephalocereus*, and the monotypic *Pseudomitrocereus*. We include more than one terminal in five species of *Neobuxbaumia* (*N. euphorbioides*, *N. mezcalaensis*, *N. scoparia*, *N. squamulosa*, and *N. tetetzo*), in order to represent the amplitude or the disjunction of their geographic ranges, and to assess the delimitation of each lineage. The functional outgroup includes ten terminals representing the tribe Echinocereae (subtribes Pachycereinae, and Echinocereinae), five from Hylocereae, one from Leptocereae, and one from Trichocereae. Included terminals belong to the subfamily Cactoideae, most of them specifically correspond to the PHB clade recovered by Hernández-Hernández et al. (2011), which is similar to the ACHLP clade referred by Nyffeler (2002). The only taxa external to these recognized clades was *Harrisia earlei*, from tribe Trichocereae (Nyffeler 2002; Hernández-Hernández et al. 2011). All newly sampled specimens belong to *Neobuxbaumia*, while the remaining vouchers were taken from previous studies (Arias et al. 2003, 2005; Vázquez-Sánchez et al. 2013; Sánchez et al. 2014) (Table 1).

DNA sequence data

Total DNA was extracted from silica gel dried samples, using the EZ-10 Spin Column Genomic Plant DNA mini-preps kit (BioBasic, Canada). The extraction conditions followed the manufacturer instructions, except for an increase in the time of tissue incubation from 20 to 90 min at 65 °C, to overcome problems with excessive mucilage. The presence of DNA was confirmed by agarose gel electrophoresis, stained with GelRed™ (Biotium, USA). DNA extractions were stored at -20 °C until required. Seven chloroplast regions were selected for phylogenetic analyses: *rpl16*,

trnL-F, *psbA-trnH*, *rpl32-trnL*, *trnQ-rps16*, *petL-psbE*, and *ycf1* (Table 2), based on previous studies on familial, tribal or generic levels. Although it has been used the ITS region in Cactaceae and related families there is considerable paralogy, and more efforts are needed in the knowledge of nuclear markers with a better performance (HersHKovitz and Zimmer 1997; Gorelick 2002; Nyffeler and Egli 2010; Korotkova et al. 2011). PCR conditions, concentrations, and custom thermal cycling profiles were adjusted to achieve quality amplifications for each region.

The extension step (72 °C) was set to 90 s for long fragments (1000-1500 bp), and to 60 s for short fragments (400-800 bp). The standard thermal cycling profile consisted of an initial denaturation step (94 °C, for 60 s), followed by 30 to 34 cycles of denaturation (94 °C / 30 s), annealing (variable temperature / 30 s), and extension (72 °C / variable time), and a final extension step (72 °C, for 10 min). Target regions were amplified in 25 or 50 µL volumes, depending on whether only external or both internal and external sequencing primers were required (Table 2). The standard 25 µL polymerase chain reactions contained: PCR Buffer [1 X], BSA [16 µg/µL], MgCl₂ [1.5 mM], dNTPs mix [200 µM], each primer [0.1 µM], Platinum® Taq polymerase (0.625 U per reaction; Invitrogen, USA), and DNA template [0.5 µg].

Unpurified PCR products were sent to the High-Throughput Genomics Center at the University of Washington (Seattle, WA), for Sanger sequencing. Chromatograms were assembled and edited in Sequencher® 4.8 (GeneCodes Corp., USA). BioEdit (Hall 1999) was used to stack individual sequences for each region and then primary aligned by ClustalW (Thompson et al. 1994) tool. Alignments were improved in MAFFT (KatoH and Standley 2013) using standard parameters and then corrected by eye. Ends were trimmed to remove low-quality data as required, before the concatenation of DNA sequences in Mesquite 3.04 (Maddison and Maddison 2015).

Concatenation of DNA matrices was justified given that the seven markers came from the chloroplast, which is uniparentally inherited and lacks recombination. Simple indel coding (Simmons and Ochoterena 2000; Ochoterena 2009) was applied in order to maximize the number of informative sites in the molecular data matrix. Sequences and concatenated DNA matrix were deposited in GenBank (Table 1) and DNA and structural datasets are available in TreeBASE (number in progress).

Structural data

A selection of structural characters was scored for a reduced set of taxa consisting of one terminal for each of the fifteen species from the *Cephalocereus* group, ten species representatives of other

genera from the tribe Echinocereae, and one from Leptocereae. The characters included were generated in the present study (Tables 3 and 4) by examination of specimens through fieldwork (among 2012–2015), as well as in herbaria (MEXU, XAL), living collections (Botanic Gardens of Instituto de Biología, UNAM), and bibliographic reviews (Gibson and Horak 1978; Vázquez-Sánchez 2001, 2007; Terrazas and Loza-Cornejo 2002; Flores-Ortiz 2004; Arias and Terrazas 2006; Bárcenas-Argüello 2006). A structural character matrix included morphological characters (35), followed by anatomical characters (9), and just two chemical characters were considered. Two complex characters referred as differentiated flowering region (characters 11-15), and nectarial chamber diaphragm (characters 19-21), were disaggregated into simple characters. Bracketed numbers along the next sections represent the characters listed in Table 3. The structural character matrix was coded with binary and multistate unordered characters and edited in Mesquite (Maddison and Maddison 2015).

Phylogenetic analyses

Two matrices were built to run separated analyses; the first included DNA sequences and indel coding [gaps] (molecular matrix), and the second comprised DNA sequences, gaps, and structural data (combined matrix). Molecular and combined matrices were analyzed using maximum parsimony (MP), and Bayesian inference (BI). For the molecular analysis parsimony ratchet analysis was conducted using PAUP (ver. 4.0b10), from a file generated with PRAP2 (Müller 2004); the number of iterations was 10,000, '*Multrees*' option was disabled, initial '*Maxtrees*' was set to 100, auto-increased by 100; the branch-swapping algorithm was the tree-bisection-reconnection (TBR). The trees with the best score were held in memory at each step and the strict consensus was saved from the gathered trees filtered by optimality criterion; Bootstrap (bts) and Jackknife (jck) support were then calculated from 10,000 replicates. The best-fit substitution model was determined by means of Bayesian Information Criterion (BIC), implemented with jModelTest (Darriba et al. 2012). The model selected by this method was GTR+I+G, which was applied to BI analyses for molecular data while the MK model was applied for structural data in the combined BI analysis. All BI analyses were implemented in MrBayes (Huelsenbeck and Ronquist 2001). The molecular matrix was partitioned into eight character datasets, permitting the probability rates of the substitution model to vary across partitions, all parameters were unlinked, four chains were run simultaneously for 10,000,000 generations, sampling parameters and trees each 1,000 generations, and saving branch lengths. The trees and their respective support values were edited for a better

visualization in TreeGraph 2 (Stöver and Müller 2010). The mapping of morphological characters was implemented on maximum clade credibility (BI) tree using Winclada (Nixon 2002).

Results

Data matrices and parsimony statistics

Preliminary analysis on single markers did not show strongly supported conflicts among different DNA regions (Wiens 1998), allowing the concatenation of single marker matrices. The full molecular matrix consists of 6918 characters, including 59 gap characters (Table 5). The mutational hotspot regions (524 characters) were excluded from molecular dataset before the MP and BI analyses were conducted as suggested by Borsch & Quandt (2009); excluded characters were arranged mainly in *ycf1* (454 characters). The total number of parsimony informative sites for the molecular matrix was 675; complete parsimony statistics for the seven markers and gaps are shown in Table 5. The region with the greatest number of informative sites was *ycf1* despite the difficulty to achieve PCR amplifications, followed by *rpl32-trnL^{UAG}*, *rpl16*, and *trnL-F* regions, which were less difficult to amplify. Missing data represent 3.6 % of the molecular matrix, mainly concentrated in three taxa (*Cephalocereus nizandensis*, *Marshallocereus aragonii*, and *Harrisia earlei*), and in the regions *ycf1* and *trnQ-rps16*. The resolution offered using single molecular sequences was very low, generating unresolved or unsupported topologies (data not shown) due to the low molecular divergence, and the closeness of taxa included. The incorporation of seven chloroplast DNA regions and gaps allowed us to improve consistently the resolution and the support values of the different analyses. Markers with the highest variability rates were also the longest (*ycf1*, *rpl32*, *trnL-F*, and *rpl16*) while the shorter markers have less variability and less informativeness (*psbA-trnH*, *petL-psbE* and *trnQ-rps16*). Meanwhile, the combined matrix includes 6964 characters, from which up to 448 are parsimony informative in the MP analysis (Table 5), and 6440 characters were included for BI analysis.

Phylogenetic analyses

The MP analysis of molecular data resulted in three most parsimonious trees, with a length of 2011 steps (CI=0.7573, RI=0.8023, RC=0.6076). The strict consensus tree shows that *Marshallocereus*, *Carnegiea*, and *Bergerocactus* are the sister genera of the *Cephalocereus* group (Fig. 1a) with poor support (MP: 52% bts, 60% jck). The monophyly of *Cephalocereus* group was recovered in the molecular analysis with the highest support values (MP: 100% bts, 100% jck; Fig. 1a). Within the

Cephalocereus group three clades appear resolved. The clade I includes *N. euphorbioides* and *N. polylopha* (100 % bts / 100 % jck). The clade II includes nine species, with low support, with two strongly supported subclades. Within the subclade II.1 *Neobuxbaumia tetetzo* is recovered as sister species of *Cephalocereus senilis* and *C. columna-trajani* (92% bts / 84% jck); while in the subclade II.2 *N. mezcalaensis* is recovered as the sister of *N. squamulosa*, and *N. multiareolata* (98% bts / 95% jck). In addition, *N. macrocephala* is revealed as sister species of subclade II.2, while *N. sanchezmejoradae* and *Pseudomitrocereus fulviceps* are sister species of both subclades with low support. The clade III (subgen. *Neodawsonia*) includes *C. apicicephalium*, *C. nizandensis*, and *C. totolapensis* (100% bts / 99% jck). The average standard deviation of split frequencies (< 0.001) and the effective sample size (> 5000) in the BI analysis indicated the convergence of the four independent runs. The majority rule consensus BI tree is congruent with the MP tree, also recovered the *Cephalocereus* group and the three clades observed in MP analysis but added greater support values (0.94-1.0 PP; Fig. 1b). Other relationships also gained support as *N. macrocephala* that appear nested within the clade II as sister of the subclade II.2 (0.94 PP), and *P. fulviceps* appear as the first taxon diversified of the clade II with a high support value (1.0 PP).

The statistics of MP analysis from combined data revealed slightly lower consistency, tree length and number of informative characters, than in the molecular dataset (Table 5). The topology of this analysis (not showed) was congruent with other molecular and combined analyses performed. The BI tree for combined data was similar in topologies and support values for the shared clades compared with the molecular trees, so we used this tree to map the structural characters over it (Table 3; Fig. 2). One remarkable difference among molecular and combined analyses consist in the increased support value for the sister relationship of the clades I and II with the clade III (*Neodawsonia*), backing the polyphyly of gen. *Cephalocereus* (Figs. 1 and 2).

Discussion

Paraphyletic *Neobuxbaumia*

Since Backeberg (1938) erected *Neobuxbaumia*, this genus has been subject of different interpretations about its relationships. While Buxbaum (1961) and Bravo-Hollis (1978) felt it was close to *Cephalocereus* based on flower and fruit characters, Gibson and Horak (1978) proposed a relationship with *Backebergia*, *Carnegiea*, and *Pseudomitrocereus* (= *Mitrocereus*), based on comparison of morphological, anatomical and phytochemical attributes. In one of the first and more

comprehensive phylogenetic analyses based on morphological and anatomical data for Pachycereeae sensu Barthlott and Hunt (1993; Echinocereae in part, sensu Hunt et al. 2006), Terrazas and Loza-Cornejo (2002) corroborate that crystals in the dermal system is a synapomorphy for the clade *Cephalocereus–Neobuxbaumia–Pseudomitrocereus*, pointing out the necessity to reevaluate this group. Results of our phylogenetic analyses, employing molecular and combined data, show that *Neobuxbaumia* is a paraphyletic genus because all species that comprise nest in a single clade and into subclades along with *Cephalocereus* subgen. *Cephalocereus*, *C.* subgen. *Neodawsonia*, and *Pseudomitrocereus fulviceps* having the highest support values (Figs. 1, 2), as foreshadowed in previous morphological and molecular analyses (Arias et al. 2003; Arias et al. 2005; Arias and Terrazas 2006; Hernández-Hernández et al. 2011). The present study also reveals one deletion (49 bp) on *trnQ-rps16* region, one deletion (11 bp) and one insertion (2 bp) on *trnL-F*, and several base changes representing molecular synapomorphies for the *Cephalocereus* group; meanwhile, crystals in the dermal system [42] and woody cap persistent in the fruit [34] are synapomorphies, and the white pulp [31] is homoplastic. Therefore, we propose to recognize *Cephalocereus* as a single natural genus, as well as the inclusion of *Neobuxbaumia* and *Pseudomitrocereus* with it (see Taxonomic treatment). Our results also corroborate that gen. *Cephalocereus* is sister of the *Pachycereus* group (sensu Arias et al. 2003). The relationship between genera *Cephalocereus* and *Carnegiea* is accepted because both are part of Pachycereinae, although the latter is sister taxon of *Pachycereus*, as suggested by the combined analysis and consistently confirmed in previous phylogenetic analyses (Arias and Terrazas 2006; Hernández-Hernández et al. 2011).

Monophyletic *Cephalocereus* and its interspecific relationships

The molecular and combined analyses indicated that *Neobuxbaumia scoparia* is sister to the remainder *Cephalocereus* species (Figs. 1, 2). Some distinctive attributes include plants highly branched, sympodial [1], subapical flowering region [11], and flower and fruit lack of spines [25, 32] (Fig. 3 a-b). Its distribution is disjoint in Veracruz (near Jalapa) and Oaxaca (Tehuantepec isthmus), growing on volcanic or limestone rocks, and is part of the tropical dry forest (Dawson 1952b; Bravo-Hollis 1978). Three species of *Cephalocereus* subgen. *Neodawsonia* conform a well-supported clade among molecular and combined analyses (clade III; Figs. 1, 2). This clade has an insertion of one triplet in *ycf1* and several punctual mutations as molecular synapomorphies; the morphological synapomorphy is the apical pseudocephalium [19] (Table 3; Figs. 2, 3 c-d; Vázquez-

Sánchez 2005 Bárcenas-Argüello 2006). This finding corroborates the monophyly of *Neodawsonia* as suggested by Bárcenas-Argüello (2006), based on morphological data. *Neodawsonia* was erected as a genus by Backeberg (1960), and later, transferred to a subgenus of *Cephalocereus* by Bravo-Hollis (1974), and accepted by Heath (1992) and Arias et al. (2012), while other authors dismissed any infrageneric classification (Gibson and Horak 1978; Anderson 2001; Hunt et al. 2006). The three species are distributed since Tehuantepec isthmus (Oaxaca) to Central Depression (Chiapas) in southeastern Mexico, and in some places cohabit with *N. scoparia* (e.g. Juchitán, Oaxaca). These species inhabit on tropical deciduous forest, at elevations below 700 m, growing mainly over rocky and shallow substrates (Bravo-Hollis 1978; Bárcenas-Argüello et al. 2010).

Neobuxbaumia euphorbioides and *N. polylopha* conforms the next group with strong support (clade I; Figs. 1, 2). These two species have three insertions in the *psbA-trnH* region as molecular synapomorphy, although no morphological synapomorphy was identified. The recognition of such relationship is quite relevant, because some morphological features show contrasting variation: *N. polylopha* have up to 40 ribs, and up to 7 radial spines [7], while *N. euphorbioides* has only 8-10 ribs, and three radial spines in the vegetative areole (Tapia et al. 2016; Fig. 3 e-i). No morphological synapomorphies was identified, and share just two homoplastic characters: monopodial stems [1], and mucronate scale apex [29] (Table 3; Fig. 2). The monopodial growth form is shared with other taxa from different clades (e.g. *N. mezcalaensis*) indicating some degree of convergent evolution. Buxbaum (1961) suggested a relationship among *N. euphorbioides* and *N. polylopha* based on the shared pericarpel podaria and scales, extrafloral nectars, and the color of outer perianth segments. These two species inhabit the Sierra Madre Oriental, from Guanajuato, Hidalgo, Queretaro, and San Luis Potosí, extending to Veracruz, and Tamaulipas associated with tropical deciduous forests, at elevations between 900 and 1500 m, and remarkably associated to rocky substrate (Bravo-Hollis 1978).

Cephalocereus columna-trajani, *C. senilis* (*Cephalocereus* type species), *Neobuxbaumia macrocephala*, *N. mezcalaensis*, *N. multiareolata*, *N. sanchezmejoradae* *N. squamulosa*, and *N. tetetzo* (*Neobuxbaumia* type species), represent the most inclusive and strongly supported clade identified within the gen. *Cephalocereus* according with present proposal (clade II; Figs. 1, 2). Molecular synapomorphies correspond only to punctual mutations in *ycf1*, while morphological ones are absent. Our results indicate that *C. columna-trajani*, *C. senilis*, and *N. tetetzo* constitute an unexpected subclade (II.1) strongly supported (Figs. 1, 2). Molecular synapomorphies for this

subclade are only punctual mutations, while the evident podaria in the reproductive region [17] is a morphological synapomorphy. Otherwise, the lateral cephalium [18] represent a synapomorphy for *C. columna-trajani* and *C. senilis* (Fig. 3 j-m). The hypotheses suggested by Bárcenas-Argüello (2006) that relate *Cephalocereus* subgen. *Cephalocereus* with subgen. *Neodawsonia* have not been confirmed through this study. Moreover, the differentiated flowering regions cephalium and pseudocephalium, show a pattern of convergent evolution because of the unique and distinctive attributes that defines each of these regions, as is revealed in *Backebergia militaris* and in other less related taxa (Vázquez-Sánchez et al. 2016). The inclusion of all recognized species from the *Cephalocereus* group sensu Arias et al. (2003), allows now explaining that these two subgenera represent lineages diverged on different evolutionary nodes. Among morphological characters evaluated here, none is shared only by these two subgenera. For example, the lateral cephalium (only shared by species of subgen. *Cephalocereus*) appeared as non-homologous to the apical pseudocephalium of subgen. *Neodawsonia* (Vázquez-Sánchez 2007). While *C. columna-trajani* and *N. tetetzo* inhabit the Tehuacan-Cuicatlan Valley (the latter occurs even to Central Valleys, Oaxaca), only *C. senilis* inhabit in a limited region in the Sierra Madre Oriental (Hidalgo and Veracruz). In fact, in the Tehuacan-Cuicatlan Valley has been reported a putative natural hybridizing populations between *C. columna-trajani* and *N. tetetzo* (Vite et al. 1996). These three species occur on seasonal thorn and tropical deciduous forests, between 900-2200 m. The other well supported subclade comprises *N. mezcalaensis*, *N. multiareolata*, and *N. squamulosa* (subclade II.2; Figs. 1, 2). Molecular synapomorphies consist of only punctual mutations, while the presence of spines on pericarpel and receptacular areoles [25] is a homoplastic character shared for this subclade. Historically, *N. mezcalaensis* and *N. multiareolata* have been recognized as closely related taxa (Dawson 1948; Bravo-Hollis et al. 1973; Arroyo-Cosultchi et al. 2010), but molecular and combined analyses (Figs. 1, 2) suggest that *N. multiareolata* and *N. squamulosa* are sister species, while *N. mezcalaensis* is the sister of both of them. *Neobuxbaumia squamulosa* was described by Scheinvar and Sánchez-Mejorada (1990), nonetheless, during our previous study on the identification of *Neobuxbaumia* species (Tapia et al. 2016), we found in Tehuantepec isthmus the same species that had been previously described in absence of flowers and fruits by Dawson (1948) as *Cephalocereus nudus* (see Taxonomic treatment; Fig. 3 n-o). Species of this subclade have the greater geographic distribution, occupying the provinces of Rio Balsas Basin, and Costa Pacifica Mexicana (partially Colima, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Morelos, Puebla, and Oaxaca;

Morrone 2005). *Neobuxbaumia macrocephala* and *N. sanchezmejoradae* belongs to the clade II, with support values ranging from moderate (MP) to strong (BI) in the molecular and combined analyses. *Neobuxbaumia macrocephala* has been related to *N. tetetzo* because they share growth form [1, 2], spination pattern [7-10] (Tapia et al. 2016), and partially their geographic distributions (Bravo-Hollis 1978; Arias et al. 2012). Its apical flowering region slightly modified with usually pinkish-black flexible spines, the spineless flowers, and fruits with few flexible spines distinguishes it. Based on our results this species is sister of subclade II.2, sharing only punctual mutations. Moreover, *N. sanchezmejoradae* was initially described as *Carnegiea laui* by Heath (1992; see Taxonomic treatment). Phylogenetic analysis supports that this species is part of clade II, as the sister species of the subclades II.1 and II.2. Molecular synapomorphies consist of punctual mutations in *ycf1*, and no morphological synapomorphies were observed. Their distributions are geographically restricted to Mixteca Baja, Oaxaca (*N. sanchezmejoradae*) and Tehuacan-Cuicatlan Valley, Puebla and Oaxaca (*N. macrocephala*).

In our analyses, *Pseudomitrocereus fulviceps* is resolved as sister to the remainder species in clade II, although support varied from weak to strong (Figs. 1, 2). This specie has a large number of molecular and morphological exclusive characters, as a wooly apical differentiated flowering region [19], flower completely covered by large trichomes, and wide pericarpel (Arias et al. 2012) as defining characters (Fig. 3 p-r). The significant amount of autapomorphies found in this taxon has led to an unstable taxonomic assignment and to the transfer through several genera as *Mitrocereus* (Bravo-Hollis 1954), *Pseudomitrocereus* (Buxbaum 1961), *Cephalocereus* (Moore 1975), *Pachycereus* (Hunt and Taylor 1991), and *Carnegiea* (Heath 1992). Finally, it was certainly included as an ally of *Cephalocereus* group (Arias et al. 2003) based on molecular data, although supported by morphological data (Terrazas and Loza-Cornejo 2002; Arias and Terrazas 2006), and confirmed through this study. Particular interest has been directed to the extreme variation found in the flower of *P. fulviceps*: flower shape and size, trichomes long and abundant, and bristles in the flower areoles, which were interpreted in previous studies as the retention of ancestral characters, also present in the sister gen. *Pachycereus*. Such discordance expresses the necessity for alternative explanations for dichotomic speciation concepts (Hausdorf 2011). Among others, reticulate evolution and hybridization are hypothesis that remain to be tested, as is shown in other Cactaceae species and in species of other plant families (Vite et al. 1996; Seehausen 2004). We suggest a particular study focused on the hypothesis of non-dichotomous evolutionary processes,

where its cohabiting related species (*N. tetetzo*, *N. macrocephala*, *C. columna-trajani*) will be included to explain the origin of the distinctive features of *P. fulviceps*.

Taxonomic implications of combine data

The combination of the different data matrices (molecular + structural) was responsible for a little variation in favor of one or another dataset but raised the resolution and support values for some of the nodes over congruent topologies. The plastid markers employed in this study were selected from a group of regions reported in the literature (Butterworth et al. 2002; Cúenoud et al. 2002; Nyffeler 2002; Arias et al. 2003, 2005; Shaw et al. 2005, 2007; Korotkova et al. 2010, 2011; Bárcenas et al. 2011; Hernández-Hernández et al. 2011; Franck et al. 2012; Vázquez-Sánchez et al. 2013; Sánchez et al. 2014), and their contribution to variability in decreasing order was *ycf1>rpl32-trnL>rpl16>psbA-trnH>trnL-F>trnQ-rps16>petL-psbE*, while the order of informativeness was *ycf1>rpl32-trnL>psbA-trnH>rpl16>trnL-F>trnQ-rps16>petL-psbE*, where *psbA-trnH* show an important contribution instead of its length as reported by Lahaye et al. (2008) and the CBOL Plant Working Group (2009) (Table 5).

On the other hand, among the 46 structural characters incorporated, a group of 5 vegetative attributes persisted as homoplasious (e.g. interareolar distance, number of radial spines, and coverage of radial spines). This subset of morphological characters has been pointed out several times as unreliable to define natural groups among the tribe Echinocereae (Gibson and Horak 1978) or entirely homoplasious (Terrazas and Loza-Cornejo 2002; Arias and Terrazas; Bárcenas-Argüello 2006). Other 10 homoplasious characters were identified in the reproductive region of the stems (e.g. position of the flowering region), flower (e.g. presence of spines), fruit (e.g. pulp color), and seed (e.g. keel). In fact, some of these characters also behaved as homoplasious in a phylogenetic analysis for *Pachycereus* by Arias and Terrazas (2006), which include species of *Cephalocereus*. Podaria evident and loss of chlorenchyma in the flowering region represent the synapomorphies for *C. senilis* + *C. columna-trajani*. These characters represent the obligated modifications in the flowering region to recognize it as cephalium; these characters are missing in the flowering regions called pseudocephalium indicating non-homologous but convergent origin for these complex characters, as already suggested Vázquez-Sánchez et al. (2005). However, cephalium occurs in the close taxon *Backebergia* (Echinocereae), and other distant taxa as *Melocactus* (Cereae) as reported by Vazquez-Sánchez et al. (2016). Our results confirm the hypothesis of Buxbaum (1964a, b) and supported by Terrazas and Loza-Cornejo (2002) that

cephalium has not phylogenetic information because it has evolved several times within Cactoideae. Prismatic crystals in dermal system and a woody cap from perianth remnants were confirmed as the synapomorphies for the gen. *Cephalocereus*. These characters were previously recognized as synapomorphies for some species of the *Cephalocereus* (Terrazas & Loza-Cornejo 2002), but here we extend the observations to include all the fifteen species of this group and corroborate that finding. Further studies on this group will explore speciation, the estimation of the divergence time between taxa, the geographic patterns of speciation, and the inheritance of geographic ranges.

Taxonomic treatment.

Based on our results presented here, the 15 species accepted in gen. *Cephalocereus* are listed below. Two new combinations are included.

Cephalocereus Pfeiff., Allg. Gartenzeitung 6(18): 142. 1838. – Lectotype (designed by Britton & Rose, Contr. U.S. Natl. Herb. 12: 415. 1909): *Cactus senilis* Haw.

Haseltonia Backeb., Blätt. Sukkulantenk. 1: 3. 1949. –Type: *Pilocereus hoppenstedtii* Roetzl ex Rümpler.

Neobuxbaumia Backeb., Blätt. Kakteenf. 6. s.p. 1938. –Type: *Pilocereus tetetzo* F.A.C.Weber ex K.Schum.

Neodawsonia Backeb., Blätt. Sukkulantenk. 1. 4.1949. –Type: *Cephalocereus apicicephalium* E.Y.Dawson

Pilocereus Lem., Cact. Gen. Sp. Nov. 6. 1839. –Type: *Cereus senilis* Haw.

Rooksbya Backeb., Cactaceae (Backeberg) 4. 2165. 1960 ≡ *Carnegiea* subgen. *Rooksbya* Backeb., Cact. Succ. J. (Los Angeles) 22(5): 154. 1950. –Type: *Cereus euphorbioides* Haw.

Key to species of *Cephalocereus*

- 1a. Sympodial growth with basitome or mesotome branching 2
- 1b. Monopodial growth, simple stems, branches are produced only after an injury 11
- 2a. Plants with basitome pattern of branching, lateral cephalium present ***C. senilis***
- 2b. Plants with mesotome pattern of branching, variable degree of ramification, differentiated or undifferentiated flowering region 3
- 3a. Undifferentiated flowering region 4
- 3b. Flowering region differentiated in an apical pseudocephalium 8
- 4a. High degree of ramification, slender plagiotropic branches, subapical flowering, floral tube pinkish ***C. scoparius***
- 4b. Low to moderate degree of ramification, orthotropic branches variable in thickness, flowering variable in position, floral tube green often reddish 5
- 5a. Low degree of ramification, often simple stems, subapical flowering, papyraceous scales on flowers and fruits ***C. nudus***
- 5b. Moderate degree of ramification, apical to subapical flowering, fleshy scales on flowers and fruits when present 6

- 6a. Thin branches (<12 cm Ø), 25 ribs or more, reddish to brownish spines concentrated towards the stem apices, floral tube dark red colored *C. sanchezmejoradae*
- 6b. Thick stem and branches (>20 cm Ø), stems with less than 17 ribs, stem apices densely covered with trichomes or spines, floral tube green or reddish 7
- 7a. Reproductive stem apices covered with brownish trichomes, podaria evident near the apex, apical flowering *C. tetetzo*
- 7b. Whitish to reddish spines concentrated towards the apex, podaria not evident, subapical flowering *C. macrocephalus*
- 8a. Permanent yellowish apical pseudocephalium, thick stems (>20 cm Ø), red flowers densely covered with trichomes and bristles, lime-green stems *C. fulviceps*
- 8b. Intermittent apical pseudocephalium leaving annular remainings from flowering events, thin stems (<15 cm Ø), green bare flowers, green to dark green stems 9
- 9a. Tall plants, from 3 to 5 m in height, few branches (up to 5), often simple stems (up to 12 cm Ø), 24 to 28 ribs *C. totolapensis*
- 9b. Short plants, up to 2 m in height, with more than five branches 10
- 10a. Few branches (5 to 10), 8 to 10 cm Ø, 24 to 26 ribs *C. apicicephalium*
- 10b. Several branches (up to 20), up to 8 cm Ø, 21 to 23 ribs *C. nizandensis*
- 11a. Differentiated flowering region in a lateral cephalium *C. columna-trajani*
- 11b. Undifferentiated flowering region 12
- 12a. Flowering along the stem, less than 20 ribs, 5 to 7 radial spines in stem areoles 13
- 12b. Flowering concentrated below subapical region but can emerge scarcely along the stem, pinkish internal tepals, up to 20 ribs 14
- 13a. Thick stems up to 15 m height, 60 cm Ø, up to 16 ribs, floral tube green
..... *C. mezcalaensis*
- 13b. Thin stems up to 7 m height, 12 cm Ø, up to 20 ribs, floral tube reddish green
..... *C. multiareolatus*
- 14a. Numerous ribs (up to 40), thick stem up to 40 cm Ø, flower up to 6 cm in length, spines yellow, 7 to 9 radial spines in stem areoles *C. polylophus*
- 14b. Few (8 to 10) prominent ribs, thin stem up to 12 cm Ø, flower up to 10 cm in length, spines white to grey, 3 radial spines in stem areoles *C. euphorbioides*

- 1. *Cephalocereus apicicephalium*** E.Y.Dawson, Allan Hancock Found. Publ. Occas. Pap. 1: 10. 1948 ≡ *Neodawsonia apicicephalium* (E.Y.Dawson) Backeb., Blätt. Sukkulantenk. 1: 4. 1949 – Holotype: MÉXICO. Oaxaca, from lava cliffs and hills 17 km west of Tehuantepec, 27 Jan 1947, *E.Y. Dawson 2993* (RSA!, liquid).
 = *Neodawsonia guiengolensis* Bravo, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México 27: 12. 1956 –
Lectotype (designed here): [illustration] “Ejemplar de *Neodawsonia gu[i]engolensis* sp. nov. del cerro Gu[i]engola” in Bravo, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México 27(1): 14, fig. 6. 1956.
 = *Neodawsonia nana* Bravo, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México 27: 15. 1956 –**Lectotype (designed here):** [illustration] “*Neodawsonia nana* sp. nov. Ejemplares creciendo en La Ventosa” in Bravo, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México 27(1): 15, fig. 7. 1956.
- 2. *Cephalocereus columna-trajani*** (Karw. ex Pfeiff.) K.Schum., Gesamtbeschr. Kakt. 198. 1897 ≡ *Cereus columna-trajani* Karw. ex Pfeiff., Enum. Diagn. Cact. 76. 1837 ≡ *Cephalophorus columna-trajani* (Karw. ex Pfeiff.) Lem., Cact. Aliq. Nov. Desc. p. 1831 ≡ *Pilocereus columna-trajani* (Karw. ex Pfeiff.) Lem., Cact. Gen. Sp. Nov. 9. 1839 ≡ *Cephalocereus columna* (Karw. ex Pfeiff.) K.Schum., Nat. Pflanzenfam. 3(6a): 182. 1894 ≡ *Pachycereus columna-trajani* (Karw. ex Pfeiff.) Britton & Rose, Contr. U.S. Natl. Herb. 12(10): 421. 1909 ≡ *Mitrocereus columna-trajani* (Karw. ex Pfeiff.) Backeb. ex E.Y.Dawson, Allan Hancock Found. Publ. Occas. Pap. 1: 4. 1948 ≡ *Haseltonia columna-trajani* (Karw. ex Pfeiff.) Backeb., Cactaceae (Backeberg) 4: 2263. 1960 – Type: MÉXICO. [Puebla]: San Sebastián [Zinacatepec], *W. F. von Karwinsky*, not preserved. **Neotype (designed here):** MÉXICO. Oaxaca: Coixtlahuaca, Tepelmeme Villa de Morelos, aproximadamente 1 km S del Río Santa Lucía, 1285 m, *Ulises Guzmán Cruz 1065*, 27 Mar 1994 (MEXU 280206!).
 = *Pilocereus hoppenstedtii* Roezl ex Rümpler, Handb. Cacteenk. 667. 1886 ≡ *Cephalocereus hoppenstedtii* (Roezl ex Rümpler) K.Schum., Nat. Pflanzenr. 3(6a): 181. 1894 ≡ *Cereus hoppenstedtii* (Roezl ex Rümpler) A.Berger, Rep. (Annual) Missouri Bot. Gard. 16: 70. 1905 ≡ *Haseltonia hoppenstedtii* (Roezl ex Rümpler) Backeb., Sukkulantenkunde 1: 3. 1949 –Type: MÉXICO. *B. Roezl s.n.*, not preserved. **Neotype (designed here):** [illustration] “*Cephalocereus hoppenstedtii* asociación que existe cerca de San Antonio Texcala al suroeste de Tehuacán, Pue.” in Bravo-Hollis, Las Cact. México 1: 673, fig. 465. 1978.
- 3. *Cephalocereus euphorbioides*** (Haw.) Britton & Rose, Cact. 2: 33. 1920 ≡ *Cereus euphorbioides* Haw. Suppl. Pl. Succ. 75. 1819 ≡ *Cactus euphorbioides* Spreng., Syst. Veg.

[Sprengel] 2: 496. 1825 ≡ *Pilocereus euphorbioides* Rümpler, Handb. Cacteenk. 658. 1886 ≡ *Lemaireocereus euphorbioides* (Haw.) Werderm., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Sonderbeih. C t. 84. 1934 ≡ *Carnegiea euphorbioides* (Haw.) Backeb., Cact. Succ. J. (Los Angeles) 23(4): 121. 1951 ≡ *Neobuxbaumia euphorbioides* (Haw.) Buxb., Cactus (Paris) 40: 52. 1954 ≡ *Rooksbya euphorbioides* (Haw.) Backeb., Cactaceae (Backeberg) 4: 2167. 1960 –Type: not preserved. **Neotype (designed here)**: MÉXICO. Veracruz: Actopan, 7.9 km al NW de Trapiche del Rosario, 710 m, *Héctor J. Tapia 01*, 3 Mar 2012 (MEXU 1402251!) = *Cereus olfersii* Salm-Dyck, Hort. Dyck. 335. 1834 ≡ *Rooksbya euphorbioides* var. *olfersii* (Salm-Dyck) Backeb., Cactaceae (Backeberg) 4: 2170. 1960 ≡ *Neobuxbaumia euphorbioides* var. *olfersii* (Salm-Dyck) Bravo, Las Cact. Méx. 1: 660. 1978 ≡ *Carnegiea euphorbioides* var. *olfersii* (Salm-Dyck) P.V.Heath, Calyx 2(3): 108. 1992 –Type: not preserved. **Neotype (designed here)**: MÉXICO. Veracruz: Palo Gacho, *Hernando Sánchez-Mejorada 70-0407*, 25 Apr 1970 (MEXU 133842!).

4. *Cephalocereus fulviceps* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) H.E.Moore, Bailey 19: 165. 1975 ≡ *Pilocereus fulviceps* F.A.C.Weber ex K.Schum., Gesamtbeschr. Kakt. 176. 1897 ≡ *Cereus fulviceps* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) A.Berger, Rep. (Annual) Missouri Bot. Gard. 16: 64. 1905 ≡ *Mitrocereus fulviceps* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Backeb. ex Bravo, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México 24: 232. 1954 ≡ *Pseudomitrocereus fulviceps* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Bravo & Buxb., Bot. Stud. 12: 99. 1961; *Pachycereus fulviceps* (F.A.C.Weber ex Schumann) D.R.Hunt, Bradleya 9: 89. 1991 ≡ *Carnegiea fulviceps* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) P.V.Heath, Calyx 2(3): 108. 1992 – Type: MÉXICO. Puebla, Tehuacan, *F.A.C. Weber s.n.*, not preserved. **Neotype (designed here)**: MÉXICO. Puebla: Zapotitlán Salinas, 11 km sobre la terracería a San Luis Atolotitlán, 1800 m, 8 Aug 1990, *Salvador Arias 863* (MEXU 1302119!; isoneotypes, MEXU 1301778!, 1301777!).

5. *Cephalocereus macrocephalus* F.A.C.Weber ex K.Schum., Gesamtbeschr. Kakt. 197. 1897 ≡ *Pilocereus macrocephalus* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) F.A.C.Weber, Dict. Hort. [Bois] 2: 966. 1898 ≡ *Cereus macrocephalus* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) A.Berger, Rep. (Annual) Missouri Bot. Gard. 16: 62. 1905 ≡ *Neobuxbaumia macrocephala* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) E.Y.Dawson, Cact. Succ. J. (Los Angeles) 24: 173. 1952 ≡ *Carnegiea macrocephala* (K.Schum.) P.V.Heath, Calyx 2(3): 109. 1992 –Type: MÉXICO. [Puebla], Tehuacán, not preserved. **Neotype (designed here)**: MÉXICO. Puebla, Zapotitlán Salinas, 15

km W de Zapotitlán Salinas, 1575 m, *Hernando Sánchez-Mejorada 70-0401*, 12 Apr 1970 (MEXU 133824!).

= *Pilocereus ruficeps* F.A.C.Weber ex Rol.-Goss., Bull. Mus. Hist. Nat. (Paris) 11(6): 509. 1905 ≡ *Cereus ruficeps* (F.A.C.Weber ex Rol.-Goss.) Vaupel, Monatsschr. Kakteenk. 23: 27, 83. 1913 ≡ *Pachycereus ruficeps* (F.A.C.Weber ex Rol.-Goss.) Britton & Rose, Cactaceae (Britton & Rose) 2: 75. 1920 ≡ *Mitrocereus ruficeps* (F.A.C.Weber) Backeb., Cactaceae (Backeberg) 4: 2244. 1960 – Isotype: MÉXICO. [Puebla], Tehuacán, Cerro de San José Tochapa, *Léon Diguét s.n.* (US barcode 117101!).

6. *Cephalocereus mezcalaensis* Bravo, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México, 3: 378. 1932 ≡ *Pilocereus mezcalaensis* (Bravo) W.T.Marshall, Cactaceae 75. 1941 ≡ *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Bravo) Backeb., Beitr. Sukkulantenk. Sukkulantenpflege 3. 1941 ≡ *Carnegiea mezcalaensis* (Bravo) P.V.Heath, Calyx 2(3): 109. 1992 – Lectotype (designed by Scheinvar & Olalde, 2008): [illustration] “Grupo de *Cephalocereus mezcalaensis* sp. n. característico del Cañón del Zopilote” in Bravo, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México, 3: 382. fig. 8. 1932. = *Cephalocereus mezcalaensis* Bravo var. *robustus* E.Y.Dawson, Allan Hancock Found. Publ. Occas. Pap. 1: 9. 1948 ≡ *Neobuxbaumia mezcalaensis* var. *robusta* (E.Y.Dawson) Backeb., Cact. Succ. J. (Los Ángeles) 23: 122. 1951 ≡ *Neobuxbaumia mezcalaensis* var. *robusta* (E.Y.Dawson) E.Y.Dawson, Cact. Succ. J. (Los Ángeles) 24: 169. 1952 –Holotype: MÉXICO. Puebla, from hillsides of the Cañón del Rio Atoyac, *Elmer Y. Dawson 2998*, 6 Jan 1947 (RSA 0068734!).

7. *Cephalocereus multiareolatus* (E.Y. Dawson) H.J.Tapia & S.Arias **comb. nov.** ≡ *Cephalocereus mezcalaensis* Bravo var. *multiareolatus* E.Y. Dawson, Allan Hancock Found. Publ. Occas. Pap. 1: 9. 1948 ≡ *Neobuxbaumia mezcalaensis* var. *multiareolata* (E.Y.Dawson) E.Y.Dawson, Cact. Succ. J. (Los Angeles) 24: 169. 1952 ≡ *Neobuxbaumia multiareolata* (E.Y. Dawson) Bravo, Scheinvar & Sánchez-Mej., Cact. Suc. Mex. 17(4): 120. 1972 ≡ *Carnegiea mezcalaensis* var. *multiareolata* (E.Y. Dawson) P.V Heath, Calyx 2(3): 109. 1992 –Holotype: MÉXICO. Guerrero, from lava hills near Acahuizotl[a], *Elmer Y. Dawson 2996*, 1 Feb 1947 (RSA liquid!).

8. *Cephalocereus nizandensis* (Bravo & T.MacDoug.) Buxb., Kakteen and. Sukk. 16: 45. 1965 ≡ *Neodawsonia nizandensis* Bravo & T.MacDoug., Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México 29: 82. 1959 –Lectotype (designed here): [illustration] “*Neodawsonia nizandensis*, creciendo

en el cerro Nizanda” in Bravo & MacDougall, *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México* 29: 84. fig. 9. 1959.

9. *Cephalocereus nudus* E.Y.Dawson, *Allan Hancock Found. Publ. Occas. Pap.* 1: 12. 1948 ≡ *Neobuxbaumia tetetzo* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Backeb. var. *nuda* (E.Y.Dawson) E.Y. Dawson, *Cact. Succ. J. (Los Ángeles)* 24: 169. 1952 **syn. nov.** ≡ *Cephalocereus tetetzo* var. *nudus* E.Y.Dawson, *Desert Pl. Life* 24(3): 54. 1952 **syn. nov.** ≡ *Carnegiea tetetzo* var. *nuda* (E.Y.Dawson) P.V.Heath, *Calyx* 2(3): 108. 1992 **syn. nov.** –Holotype: MÉXICO. Oaxaca, Tehuantepec, *Elmer Y. Dawson 3002*, 1947 (RSA liquid!).

= *Neobuxbaumia squamulosa* Scheinvar & Sánchez-Mej., *Cact. Suc. Mex.* 35: 13. 1990 **syn. nov.** – Holotype: MÉXICO. Michoacán, Coalcomán, *Hernando Sánchez-Mejorada 4250*, 19 Oct 1987 (MEXU barcode 474887!).

10. *Cephalocereus polylophus* (DC.) Britton & Rose, *Contr. U.S. Natl. Herb.* 12(10): 419. 1909 ≡ *Cereus polylophus* DC., *Mém. Mus. Hist. Nat.* 17: 115. 1828 ≡ *Pilocereus polylophus* Salm-Dyck, *Cact. Hort. Dyck.* 24; ed. II. 1844 ≡ *Neobuxbaumia polylopha* (DC.) Backeb., *Beitr. Sukkulentenk. Sukkulentenpflege.* 1941: 3 ≡ *Carnegiea polylopha* (DC.) D.R.Hunt, *Bradleya* 6: 100. 1988 –Type: MÉXICO. Hidalgo, *Thomas Coulter 15*, not preserved.

Neotype (designed here): MÉXICO. Hidalgo, Metztitlán, *Hernando Sánchez-Mejorada 70-0406* (MEXU 133840!).

11. *Cephalocereus sanchezmejoradae* (A.B.Lau) H.J.Tapia & S.Arias **comb. nov.** ≡ *Neobuxbaumia sanchezmejoradae* A.B.Lau, *Cact. Suc. Mex.* 39: 3. 1994 –Holotype: MÉXICO. Oaxaca, Santiago Nuyoó, Tierra Azul, sobre formaciones de roca volcánica erosionada, 1600 m, *Alfred B. Lau 1378*, May 1976 (MEXU 01291728!; isotype MEXU 1291729!).

= *Carnegiea laui* P.V.Heath, *Calyx* 2(3): 109. 1992 ≡ *Neobuxbaumia laui* (P.V.Heath) D.R. Hunt, *Cactaceae Consensus Init.* 4: 5. 1997 –Holotype: [illustration] “Stem of the new *Neobuxbaumia* from Teotila”, in Lau, *Brit. Cact. Succ. J.* 4(4): 101. fig. 3. 1986.

= *Carnegiea nova* P.V.Heat, *Calyx* 2(3): 109. 1992 – Holotype [illustration]: cover illustration, in *Brit. Cact. Succ. J.* 4(4): cover. 1986.

12. *Cephalocereus scoparius* (Poselg.) Britton & Rose, *Contr. U.S. Natl. Herb.* 12(10): 419. 1905 ≡ *Pilocereus scoparius* Poselg., *Allg. Gartenzeitung (Otto & Dietrich)* 21: 126. 1853 ≡ *Cereus scoparius* A.Berger, *Rep. (Annual) Missouri Bot. Gard.* 16: 63. 1905 ≡ *Neobuxbaumia*

scoparia (Poselg.) Backeb., Beitr. Sukkulantenk. Sukkulantenpflege 3. 1941 ≡ *Carnegiea scoparia* (Poselg.) P.V. Heath, Calyx 2(3): 109. 1992 –Type: MÉXICO. Veracruz, “Nahe bei La Soledad”, *Poselger s.n.*, not preserved. **Neotype (designed here)**: MÉXICO. Veracruz, cerca de Jalapa, *Helia Bravo Hollis s.n.*, 1957 (MEXU 70513!).

= *Lemaireocereus setispinus* E.Y.Dawson, Allan Hancock Found. Publ. Occas. Pap. 1: 19. 1948 – Syntypes: MEXICO. Oaxaca, at base of volcanic hill a few kilometers east of Juchitan, *Elmer Yale Dawson 3007*, 26 Jan 1947 (RSA!)

13. *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. Allg. Gartenzeitung 6: 142. 1838 ≡ *Cactus senilis* Haw., Philos. Mag. J. 63: 41. 1824 ≡ *Cereus senilis* (Haw.) DC., Prodr. 3: 464. 1828 ≡ *Cephalophorus senilis* (Haw.) Lem., Cact. aliq. nov. XII. 1838 ≡ *Echinocactus senilis* (Haw.) Beaton, Gard. Mag. & Reg. Rural Domest. Improv. 15: 550. 1839 ≡ *Pilocereus senilis* (Haw.) Lem., Cact. Gen. Sp. Nov. 7. 1839 ≡ *Cephalocereus senilis* (Haw.) K.Schum., Nat. Pflanzenfam. 3 (6a): 181. 1894 –Type: MÉXICO. not preserved. **Neotype (designed here)**: MÉXICO. Hidalgo, Metztlán, 17 Jun 2005, *Gabriel Arroyo-Cosultchi 23* (MEXU XXXX)

= *Cactus bradypus* Lehm., Ind. Sem. Hort. Hamburg. 17. 1826 –Type: not preserved.

14. *Cephalocereus tetetzo* (F.A.C.Weber ex J.M.Coult.) Diguet, Cactac. util. Mex. (Archiv. Hist. Nat. Acclim. France) 4. 370. 1928 ≡ *Cereus tetazo* F.A.C.Weber ex J.M.Coult., Contr. U.S. Natl. Herb. 3(7): 409. 1896 ≡ *Carnegiea tetazo* (F.A.C.Weber ex J.M.Coult.) P.V.Heath, Calyx 2(3): 108. 1992.

= *Pilocereus tetetzo* F.A.C.Weber ex K.Schum., Gesamtbeschr. Kakt. 175. 1897 ≡ *Cephalocereus tetetzo* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Vaupel, Monatsschr. Kakteenk. 19. 73. 1909 ≡ *Pachycereus tetetzo* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Ochot., Cactac. de Mexico 17. 1922 ≡ *Neobuxbaumia tetetzo* (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Backeb., Blätt. Kakteenf. 6. 24. 1938 – Syntypes: MÉXICO. Puebla, Mit *Pilocereus Hoppenstedtii* Web. bei Zapotitlán in der Nähe von Tehuacán, *Frederic A. C. Weber s.n.*, 1866, 1869 (MO 2212310!, 2212312!).

15. *Cephalocereus totolapensis* (Bravo & T.MacDoug.) Buxb., Kakteen and. Sukk. 16: 45. 1965 ≡ *Neodawsonia totolapensis* Bravo & T.MacDoug., Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México 29: 74. 1959 –**Lectotype (designed here)**: [illustration] “*Neodawsonia totolapensis*, creciendo cerca de Tequisistlán” in Bravo and MacDougall, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México 29: 75. fig. 1. 1959.

Acknowledgments

The present study is a fragment of the Dissertation of HT and is presented as partial requirement to opt for a PhD degree in Biological Sciences at Posgrado en Ciencias Biológicas (PCB), UNAM. The first author thanks to CONACyT for the scholarship granted (332595). We are grateful to David Gernandt for the revisions to preliminary manuscript, Lidia Cabrera (Instituto de Biología, UNAM), Montserrat Vazquez-Sánchez (CIIDIR, IPN), Gabriel Arroyo-Cosultchi (UAM-Xochimilco), Daniel Sánchez, Isaura Rosas, Daniel Franco, David Aquino, Miguel Cruz, Marisela Yañez, and Yolanda Morales (Instituto de Biología, UNAM) for supporting the laboratory and field work, and Fernando Chiang by nomenclatural opinion. We also thank the curators of the herbaria MEXU and XAL for loaning specimens critical for this study, as well as the program UNAM-DGAPA-PAPIIT <IN208315> to SA, which supported this work.

Bibliography

- Arias S, Gama-López S, Guzmán-Cruz U, Vázquez-Benítez B (2012) Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 95: Cactaceae. Instituto de Biología, UNAM
- Arias S, Terrazas T (2006) Análisis cladístico del género *Pachycereus* (Cactaceae) con caracteres morfológicos. *Brittonia* 58:197-216
- Arias S, Terrazas T, Arreola-Nava HJ, Vázquez-Sánchez M, Cameron KM (2005) Phylogenetic relationships in *Peniocereus* (Cactaceae) inferred from plastid DNA sequence data. *J Plant Res* 118:317-328 doi: 10.1007/s10265-005-0225-3
- Arias S, Terrazas T, Cameron KM (2003) Phylogenetic Analysis of *Pachycereus* (Cactaceae, Pachycereeae) based on Chloroplast and Nuclear DNA Sequences. *Syst Bot* 28:547-557
- Arroyo-Cosultchi G, Terrazas T, Arias S, López-Mata L (2010) Delimitación de *Neobuxbaumia mezcalaensis* y *N. multiareolata* (Cactaceae) con base en análisis multivariados. *Bol Soc Bot Méx* 86:53-64
- Backeberg C (1938) Systematische Übersichtsarbeit, Blätter für Kakteenforschung, 1938–6. Volksgesellschaft, Bez. Hamburg
- Backeberg C (1960) Die Cactaceae: Handbuch der Kakteenkunde, Band IV, Veb Gustav Fischer Verlag, Jena
- Bárcenas-Argüello ML (2006) Filogenia del género *Cephalocereus* Pfeiff. (Cactaceae) sensu Anderson con base en caracteres estructurales. M.S. Thesis, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México
- Bárcenas RT, Yesson C, Hawkins JA (2011) Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics* 27:470-489
- Bárcenas-Argüello ML, Gutiérrez-Castorena MC, Terrazas T, López-Mata L (2010) Rock-soil preferences of three (Cactaceae) species of tropical dry forests. *Soil Sci Soc Am J* 74:1374-1382 doi: 10.2136/sssaj2009.0310
- Barthlott W, Hunt DR (1993) Cactaceae. In *The Families and Genera of Vascular Plants*, Vol. 2 (Kubitzki K, Rohwer G, Bittrich V eds.) Springer-Verlag, Berlin.
- Borsch T., Quandt D. (2009). Mutational dynamics and phylogenetic utility of noncoding chloroplast DNA. *Plant Syst Evol*, 282:169-199 doi: 10.1007/s00606-009-0210-8
- Bravo-Hollis H (1954) Un nuevo género de la familia de las Cactáceas: *Backebergia*. *Anales Inst Biol Univ Nac México*, México, DF

- Bravo-Hollis H (1974) Nuevas combinaciones II. *Cact Suc Méx* 19:47
- Bravo-Hollis H (1978) *Las Cactáceas de México*, Vol. I, 2nd edn. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF
- Bravo-Hollis H, Scheinvar L, Sánchez-Mejorada H (1970) Estudio comparativo del género *Neobuxbaumia* Backeberg. *Cact Suc Méx* 15:75-82
- Bravo-Hollis H, Scheinvar L, Sánchez-Mejorada H (1971a) Estudio comparativo del género *Neobuxbaumia* Backeberg II. *Cact Suc Méx* 16:3-14
- Bravo-Hollis H, Scheinvar L, Sánchez-Mejorada H (1971b) Estudio comparativo del género *Neobuxbaumia* Backeberg III. *Cact Suc Méx* 16:75-83
- Bravo-Hollis H, Scheinvar L, Sánchez-Mejorada H (1973) Estudio comparativo del género *Neobuxbaumia* Backeberg IV. *Cact Suc Méx* 18:59-67
- Butterworth CA, Cota-Sánchez JH, Wallace RS (2002) Molecular Systematics of Tribe Cactaceae (Cactaceae: Cactoideae): A Phylogeny Based on *rpl16* Intron Sequence Variation. *Syst Bot* 27:257-270
- Buxbaum F (1958) The phylogenetic division of the subfamily Cereoideae, Cactaceae. *Madroño* 14:177-206
- Buxbaum F (1961) Die Entwicklungslinien der Tribus Pachycereeae F. Buxb. (Cactaceae-Cereoideae). In *Botanische Studien*. Vol. 12. Jena: Veb Gustav Fischer Verlag
- Buxbaum F (1964a) Was ist ein Cephalium? *Kakteen und andere Sukkulenten* 15: 28-31
- Buxbaum F (1964b) Was ist ein Cephalium? *Kakteen und andere Sukkulenten* 15: 43-48
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci* 106:12794-7 doi: 10.1073/pnas.0905845106
- Cúenoud P, Savolainen V, Chatrou LW, et al (2002) Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18s rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* sequences. *Am J Bot* 89:132-144 doi: 10.3732/ajb.89.1.132
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772 doi: 10.1038/nmeth.2109
- Dawson E Y (1948) *New cacti of southern Mexico*. Allan Hancock Foundation Publications, Occasional Papers, University of Southern California Press 1:1-69
- Dawson E Y (1952a) Field observations on some cacti of Oaxaca and Puebla, Mexico. *Desert Plant Life* 24(3): 53-58

- Dawson E Y (1952b) Notes on *Neobuxbaumia*. Cact. Succ J (Los Angeles) 24(6): 167-173
- Flores-Ortiz CM (2004) Quimiotaxonomía del género *Neobuxbaumia*. Thesis, UNAM, FES-Iztacala, México
- Franck AR, Cochrane BJ, Garey JR (2012) Low-copy nuclear primers and *ycf1* primers in Cactaceae. Am J Bot 99:e405-7 doi: 10.3732/ajb.1200128
- Gibson AC, Horak KE (1978) Systematic Anatomy and Phylogeny of Mexican Columnar Cacti. Ann Missouri Bot Gard 65:999-1057
- Gorelick R (2002) DNA sequences and cactus classification - a short review. Bradleya 20:1-4.
- Guzmán-Cruz U, Arias S, Dávila P (2003) Catálogo de Cactáceas Mexicanas. UNAM, CONABIO, México, DF
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser 41:95-98
- Hausdorf B (2011) Progress toward a general species concept. Evolution 65:923-931 doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01231.x
- Heath PV (1992) The restoration of *Rathbunia* Britton & Rose. Calyx 2(3):102-115.
- Hernández-Hernández T, Hernández HM, De-Nova JA, et al (2011) Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). Am J Bot 98:44-61 doi: 10.3732/ajb.1000129
- Hershkovitz MA, Zimmer EA (1997) On the Evolutionary Origins of the Cacti. Taxon 46:217-232.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics (Oxford) 17:754-5
- Hunt DR (1999) CITES Cactaceae Checklist. Royal Botanic Gardens Kew / International Organization for Succulent Plant Study, England
- Hunt DR, Taylor NP, Charles G (2006) The New Cactus Lexicon. DH Books
- Hunt DR, Taylor NP (1986) The genera of Cactaceae: towards a new consensus. Bradleya 4:65-78
- Hunt DR, Taylor NP (1990) The genera of Cactaceae: Progress towards consensus Report of the IOS Working Party, 1987-90. Bradleya 8:85-107
- Hunt DR, Taylor NP (1991) Notes on miscellaneous genera of Cactaceae. Bradleya 9:81-93
- INEGI (2014) Mapa digital de México. Available at: <http://gaia.inegi.org.mx/mdm6/>

- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772-780. doi: 10.1093/molbev/mst010
- Korotkova N, Borsch T, Quandt D, Taylor NP, Müller KF, Barthlott W (2011) What does it take to resolve relationships and to identify species with molecular markers? An example from the epiphytic Rhipsalideae (Cactaceae). *Am J Bot* 98:1549-1572 doi: 10.3732/ajb.1000502
- Korotkova N, Zabel L, Quandt D, Barthlott W (2010) A phylogenetic analysis of *Pfeiffera* and the reinstatement of *Lymanbensonia* as an independently evolved lineage of epiphytic Cactaceae within a new tribe Lymanbensonieae. *Willdenowia* 40:151-172 doi: 10.3372/wi.40.40201
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, et al. (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2923-8 doi: 10.1073/pnas.0709936105
- Maddison WP, Maddison DR (2015) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Ver. 3.04 available at: <http://mesquiteproject.org>
- Moore HE (1975) Nomenclatural notes for hortus third. Cactaceae. *Baileya* 19:165-166.
- Morrone JJ (2005) Hacia una síntesis biogeográfica de México - Toward a synthesis of Mexican biogeography. *Rev Mex Biodivers* 76:207-252
- Müller K (2004) PRAP-computation of Bremer support for large data sets. *Mol Phylogenet Evol* 31:780-2 doi: 10.1016/j.ympev.2003.12.006
- Nixon KC (2002) WinClada ver. 1.00.08 Published by the author. Ithaca, NY
- Nyffeler R (2002) Phylogenetic Relationships in the Cactus Family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL-trnF* sequences. *Am J Bot* 89:312-326 doi: 10.3732/ajb.89.2.312
- Nyffeler R, Eggli U (2010) Disintegrating Portulacaceae: A new familial classification of the suborder Portulacineae (Caryophyllales) based on molecular and morphological data. *Taxon* 59:227-240.
- Ochoterena H (2009) Homology in coding and non-coding DNA sequences: a parsimony perspective. *Plant Syst Evol* 282:151-168 doi: 10.1007/s00606-008-0095-y

- Plume O, Straub SCK, Tel-Zur N, Cisneros A, Schneider B, Doyle JJ (2013) Testing a Hypothesis of Intergeneric Allopolyploidy in Vine Cacti (Cactaceae: Hylocereeae). *Syst Bot* 38:737-751 doi: 10.1600/036364413X670421
- Sánchez D, Arias S, Terrazas T (2014) Phylogenetic relationships in *Echinocereus* (Cactaceae, Cactoideae). *Syst Bot* 39: 1183-1196
- Sánchez D, Arias S, Terrazas T, Grego-Valencia D (Submitted) Phylogeny in *Echinocereus* (Cactaceae) based on combined morphological and molecular evidence: taxonomic implications.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am J Bot* 84:1120-1136
- Scheinvar L, Sánchez Mejorada H (1990) *Neobuxbaumia squamulosa* Scheinvar et Sánchez Mejorada sp. Nov. *Cact Suc Méx* 35:13-18
- Seehausen O (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends Ecol Evol* 19:198-207 doi: 10.1016/j.tree.2004.01.003
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, et al. (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot* 92:142-166
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am J Bot* 94:275-288
- Simmons MP, Ochoterena H (2000) Gaps as Characters in Sequence-Based Phylogenetic Analyses. *Syst Biol* 49:369-381.
- Stöver BC, Müller KF (2010) TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. 9:1–9. doi: 10.1186/1471-2105-11-7
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17:1105-9
- Tapia HJ, Arias S, Yáñez-Espinosa L, Terrazas T (2016) El uso de espinas del tallo en la identificación de las especies de *Neobuxbaumia* (Cactaceae). *Rev Mex Biodivers* 87:288–300. doi: 10.1016/j.rmb.2016.04.006
- Tate JA, Simpson BB (2003) Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and Diverse Origins of the Polyploid Species. *Syst Bot* 28:723-737 doi: 10.1043/02-64.1

- Terrazas T, Loza-Cornejo S (2002) Phylogenetic Relationship of Pachycereae: A Cladistic Analysis based on Anatomical-Morphological Data. In: Fleming TH, Valiente-Banuet A (eds) Columnar Cacti and their mutualists: Evolution, Ecology, and Conservation. The University of Arizona Press
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Vázquez-Sánchez M, Terrazas T, Arias S (2005) Morfología y anatomía del cefalio de *Cephalocereus senilis* (Cactaceae). *An Jardín Bot Madrid* 62:153-161
- Vázquez-Sánchez M, Terrazas T, Arias S (2007) Morphology and anatomy of the *Cephalocereus columna-trajani* cephalium: why tilting? *Plant Syst Evol* 265:87-99 doi: 10.1007/s00606-007-0520-7
- Vázquez-Sánchez M, Terrazas T, Arias S (2016). Comparative morphology and anatomy of *Backebergia militaris* (Echinocereae–Cactaceae) cephalium. *Plant Syst Evol*, 302:245–256 doi:10.1007/s00606-015-1256-4
- Vázquez-Sánchez M, Terrazas T, Arias S, Ochoterena H (2013) Molecular phylogeny, origin and taxonomic implications of the tribe Cacteae (Cactaceae). *Syst Biodivers* 11:103-116 doi: 10.1080/14772000.2013.775191
- Vite F, Portilla E, Zavala-Hurtado A, Valverde PL, Díaz-Solís A (1996) A natural hybrid population between *Neobuxbaumia tetetzo* and *Cephalocereus columna-trajani* (Cactaceae). *J Arid Environ* 32:395-405
- Wiens J J (1998) Combining data sets with different phylogenetic histories. *Syst Biol* 47:568-581 doi: 10.1080/106351598260581

Table 1. List of taxa sampled in this study and accession numbers. Markers and GenBank accessions are presented in the following order: *rpl16* / *trnL-F* / *psbA-trnH* / *rpl32-trnL* / *trnQ-rps16* / *petL-psbE* / *ycf1*. The sequences lacking for a locus/specimen were marked with dash (-), and sequences not submitted yet were marked with an asterisk (*).

Species	Provenance, Voucher, Herbarium	GenBank accessions
<i>Acanthocereus tetragonus</i> (L.) Hummelinck	Nuevo León, MX, Arias 1450, MEXU	KU598021 / KU598074 / KU597969 / * / KU598127 / * / KU598178
<i>Berberocactus emoryi</i> Britton & Rose	Baja Cal., MX, Arias 1307, CHAPA	DQ099994 / DQ099925 / KF783478 / * / KF783697 / * / *
<i>Carnegiea gigantea</i> Britton & Rose	Arizona, US, NYGB s/n, (cult.)	AY181591 / AY181619 / * / * / * / * / *
<i>Cephalocereus apicicephalium</i> E.Y.Dawson	Oaxaca, MX, Arias 1257, (cult.)	DQ099996 / DQ099927 / * / * / * / * / *
<i>C. columna-trajani</i> (Karw.) K.Schum.	Puebla, MX, Arias 1377, CHAPA	AY181599 / AY181648 / * / * / * / * / -
<i>C. nizandensis</i> (Bravo & T.MacDoug.) Buxb.	Oaxaca, MX, Terrazas 633, CHAPA	DQ099997 / DQ099928 / * / * / - / * / -
<i>C. senilis</i> Pfeiff.	Hidalgo, MX, Terrazas 529, CHAPA	AY181616 / AY181638 / * / * / * / * / *
<i>C. totalapensis</i> (Bravo & T.MacDoug.) Buxb.	Oaxaca, MX, Terrazas 628, CHAPA	* / * / * / * / * / * / *
<i>Escontria chiotilla</i> Rose	Puebla, MX, Arias 891, MEXU	AY181608 / AY181622 / * / * / * / * / *
<i>Harrisia earlei</i> Britton & Rose	Saint Croix Bot. Garden, US, Fleming 118, (cult.)	DQ100008 / DQ099939 / * / * / - / * / -
<i>Lemaireocereus hollianus</i> Britton & Rose	Puebla, MX, Arias 1373, CHAPA	KU598012 / KU598064 / KU597959 / * / KU598117 / * / KU598169
<i>Leptocereus quadricostatus</i> Britton & Rose	Cabo Rojo, PR, Arias 1464, MEXU	KF783620 / KF783690 / AY851582 / * / KF783768 / * / *
<i>Marshallocereus aragonii</i> (F.A.C.Weber) Backeb.	NI, HBG 66864, (cult.)	AY181611 / AY181630 / * / * / - / * / -
<i>M. eichlamii</i> (Britton and Rose) Buxb.	Yucatán, MX, Arias 1363, MEXU	AY181610 / AY181629 / * / * / * / * / *
<i>Myrtillocactus geometrizans</i> Console	Queretaro, MX, Terrazas 557, CHAPA	DQ100012 / DQ099943 / * / * / * / * / *

Species	Provenance, Voucher, Herbarium	GenBank accessions
<i>Neobuxbaumia euphorbioides</i> (Haw.) Buxb. Ex Bravo	Veracruz, MX, Tapia 01, MEXU	* / * / * / * / * / * / *
<i>N. euphorbioides</i> (Haw.) Buxb. Ex Bravo	Tamaulipas, MX, Hamman s/n, (cult.)	AY181595 / AY181635 / * / * / * / * / *
<i>N. macrocephala</i> (F.A.C.Weber ex K.Schum.) E.Y. Dawson	Puebla, MX, Arias 1048, MEXU	DQ100013 / DQ099944 / * / * / * / * / *
<i>N. mezcalaensis</i> (Bravo) Backeb.	Puebla, MX, Tapia 44, MEXU	* / * / * / * / * / * / *
<i>N. mezcalaensis</i> (Bravo) Backeb.	Morelos, MX, Tapia 42, MEXU	* / * / * / * / * / * / *
<i>N. mezcalaensis</i> (Bravo) Backeb.	Guerrero, MX, Terrazas 533, CHAPA	AY181600 / AY181645 / * / * / * / * / *
<i>N. multiareolata</i> (Daws.) Bravo Scheinvar & Sánchez-Mej.	Guerrero, MX, Terrazas 531, CHAPA	AY181594 / AY181636 / * / * / * / * / *
<i>N. polylopha</i> (DC) Backeb.	Hidalgo, MX, Terrazas 530, CHAPA	AY181597 / AY181644 / * / * / * / * / *
<i>N. sanchezmejoradae</i> Lau	Oaxaca, MX, Tapia 39, MEXU	* / * / * / * / * / * / *
<i>N. scoparia</i> (Poselg.) Backeb.	Oaxaca, MX, Hamman s/n, (cult.)	AY181596 / AY181625 / * / * / * / * / *
<i>N. scoparia</i> (Poselg.) Backeb.	Veracruz, MX, Tapia 02, MEXU	* / * / * / * / * / * / *
<i>N. squamulosa</i> Scheinvar & Sánchez-Mej.	Oaxaca (a), MX, Tapia 24, MEXU	* / * / * / * / * / * / *
<i>N. squamulosa</i> Scheinvar & Sánchez-Mej.	Oaxaca (b), MX, Tapia 11, MEXU	* / * / * / * / * / * / *
<i>N. squamulosa</i> Scheinvar & Sánchez-Mej.	Jalisco, MX, Tapia 30, MEXU	* / * / * / * / * / * / *
<i>N. tetetzo</i> (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Backeb.	Puebla, MX, Arias 1376, CHAPA	AY181592 / AY181632 / * / * / * / * / -
<i>N. tetetzo</i> (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Backeb.	Oaxaca (c), MX, Tapia 20, MEXU	* / * / * / * / * / * / *
<i>N. tetetzo</i> (F.A.C.Weber ex K.Schum.) Backeb.	Oaxaca (d), MX, Tapia 41, MEXU	* / * / * / * / * / * / *
<i>Pachycereus pringlei</i> Britton & Rose	Baja Cal. Sur, MX, Arias 1348, CHAPA	AY181589 / AY181642 / KF783549 / * / JX111635 / * / -

Species	Provenance, Voucher, Herbarium	GenBank accessions
<i>Pseudomitrocereus fulviceps</i> (F.A.C.Weber) Bravo & Buxb.	Puebla, MX, Tapia 29, MEXU	AY181602 / AY181621 / * / * / * / * / *-
<i>Pterocereus gaumeri</i> (Britton & Rose) Th.MacDougall & Miranda	Yucatán, MX, Arias 1360, MEXU	AY181606 / AY181626 / * / * / * / * / *
<i>Selenicereus grandiflorus</i> Britton & Rose	Veracruz, MX, Guzmán 1365, MEXU	DQ100039 / DQ099970 / KU597971 / * / KU598129 / * / KU598180
<i>S. testudo</i> (Karw. ex Zucc.) Buxb.	Oaxaca, MX, Yañez 01, MEXU	* / * / * / * / * / * / *
<i>S. testudo</i> (Karw. ex Zucc.) Buxb.	SV, Veliz 19628, (cult.)	* / * / * / * / * / * / *
<i>S. wittii</i> (K.Schum.) G.D.Rowley	-, Schlumpberger B05X138, (cult.)	* / * / * / * / * / * / -
<i>Stenocereus stellatus</i> Riccob.	Puebla, MX, Arias 1375, MEXU	AY181590 / AY181640 / KF783555 / * / KF783766 / * / *

Table 2. Plastid regions amplified and primer sequences. T(a) = annealing temperature.

Plastid region	Reference	Primer sequences (5'-3')	Expected size (bp)	T(a)
<i>rpl16</i>	(Hernández-Hernández et al. 2011)	F(1F): GCT ATG CTT AGT GTG TGA CTC GTT	900-1200	63°C
		R(3R): CTT CTA TTT GTC TAG GCG TGA TCC		
		F(c): CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG		
<i>trnL-F</i>	(Taberlet et al. 1991)	R(f): ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	700-1100	55°C
		F-int(e): GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC		
		R-int(d): GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC		
<i>psbA-trnH</i>	(Sang et al. 1997)	F(psbA): GTT ATG CAT GAA CGT AAT C	300-700	52°C
	(Tate and Simpson 2003)	R(trnH2): CGC GCA TGG TGG ATT CAC A		
	(Shaw et al. 2007)	F(rpl32): CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C		
<i>rpl32-trnL</i>	(Plume et al. 2013)	R(trnL ^{UAG}): CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT	500-1400	52°C
		F-int: GTA ACT CTT GAA ATC ATT ATT TC		
		R-int: GTT ATC TTA GGT TTC AAC AAA CC		
<i>trnQ-rps16</i>	(Shaw et al. 2007)	F(trnQ ^{UUG}): GCG TGG CCA AGY GGT AAG GC	600-1500	52°C
		R(rps16 ^{X1}): GTT GCT TTY TAC CAC ATC GTT T		
<i>petL-psbE</i>	(Shaw et al. 2007)	F(petL): AGT AGA AAA CCG AAA TAA CTA GTT A	400-700	52°C
		R(psbE): TAT CGA ATA CTG GTA ATA ATA TCA GC		
<i>ycf1</i>	(Franck et al. 2012)	F(4182): AAA TAY RRA TAG AAA ATA TTT KGA TT	900-1100	44°C
		R(5248): GAA TTC TYA ATT CTC TAC GAC G		

Table 3. Character and character states for the morphological data matrix. [*] = characters mapped, but excluded from phylogenetic analyses.

Character\character states	State 0	State 1	State 2	State 3
1. Apical dominance	Monopodial	Sympodial	---	---
2. Position of the first branch	Do not apply	Basitone	Mesotone	---
3. Areole length (mm)	3-4	5-6	9-10	12
4. Interareolar distance (mm)	2-8	10-12	15-18	20-25
5. Stem podaria	Absent	Present	---	---
6. Interareolar depression	Absent	Present	---	---
7. Number of radial spines	3-7	9-11	13-15	20
8. Medial to radial spine ratio	Equal	>1.5	---	---
9. Central to radial spine ratio	Minor	Equal	Major	---
10. Radial coverage	<180°	180-270°	>270°	---
11. Flowering region	Apical	Subapical	Along stem	---
12. Areole size (relative to vegetative region)	Equal	Larger	---	---
13. Spine number modification	Diminish	No changes	Increase	---
14. Spine consistency	Rigid	Flexible	---	---
15. Trichome density	Equal	Higher	---	---
16. Chlorenchyma	Absent	Present	---	---
17. Podaria evident	Absent	Present	---	---
18. Cephalium [*]	Absent	Present	---	---
19. Pseudocephalium [*]	Absent	Present	---	---
20. Ovary form	Obovate depressed	Obovate	Wide obovate	Ovate
21. Projection of axial tissue delimiting nectarial chamber	Absent	Present	---	---
22. Bend at the base of the first stamen row	Absent	Present	---	---
23. First stamen rows fused	Free	Adnate	---	---
24. Floral shape	Short tubular	Campanulate	Tubular infundibuliform	Long tubular
25. Spines in the flower	Absent	Present	---	---
26. Scale shape (receptacular tube)	Do not apply	Acute	Obtuse	---
27. Scale shape (pericarpel)	Do not apply	Acute	Obtuse	---
28. Scale margin	Entire	Erose	---	---
29. Scale apex form	Obtuse	Mucronate	Acuminate	---
30. Pericarpel with trichomes	Scarce	Abundant	---	---
31. Pulp color	White	Red	---	---
32. Spines in the fruit	Absent	Present	---	---
33. Podaria in the fruit	Absent	Present	---	---
34. Woody cap persistence	Deciduous	Persistent	---	---
35. Periclinal wall microrelief	Not evident	Minutely warty	Verrucose	---
36. Periclinal wall form	Plain	Concave	Convex	---
37. Keel	Absent	Present	---	---

Character\character states	State 0	State 1	State 2	State 3
38. Terpenoids	Absent	Present	---	---
39. Alkaloids	Absent	Present	---	---
40. Cuticle texture	Smooth	Grooved	---	---
41. Cuticle thickness	Thin	Thick	Very thick	---
42. Prismatic crystals in dermal system	Absent	Present	---	---
43. Stomata position	Superficial	Sunken	---	---
44. Hypodermal cellular layers	Scarce	Numerous	Very numerous	---
45. Hypodermal thickness	Thin	Thick	---	---
46. Vessel element density	Scarce	Numerous	Very numerous	---
47. Vessel element proportion (free/aggregated)	Majority free	Majority aggregated	---	---
48. Mucilage cells	Absent	Present	---	---

Table 4. Structural data matrix

Species	Characters
	0000000001111111111222222222233333333333444444444 123456789012345678901234567890123456789012345678
<i>N. euphorbioides</i>	000111002021210000010000100010010110100011001?01
<i>N. macrocephala</i>	122110102111211000021100021101001100100011011101
<i>N. mezcalaensis</i>	001111002121100000001100121020011101101001001?01
<i>N. multiareolata</i>	000111011120110000021100021000001101101??1??????
<i>N. polylopha</i>	000011112220110000011110011010001110100??1??????
<i>N. sanchezmejoradae</i>	120011010110110000001100022020001102100??1??????
<i>N. scoparia</i>	120211002110210000011110000000001100101011001101
<i>N. squamulosa</i>	122111002111111000011100021020011111100??1??????
<i>N. tetetzo</i>	123111112101011000011100021010001100101011001?01
<i>P. fulviceps</i>	122200112201011010121111122001011110100021021?01
<i>C. apicicephalum</i>	111010101101101010100110022000000101000101000000
<i>C. columna-trajani</i>	001010202211111101020110000000000100101011011201
<i>C. nizandensis</i>	11111020120110101010011002200000010?000??1??????
<i>C. senilis</i>	112010302111111101020110000000000110100??1??????
<i>C. tototalapensis</i>	00011010110110101010011002200000010?000011020100
<i>P. pringlei</i>	1221001011210010000300010220211110000000101?1?01
<i>P. gaumeri</i>	11020010102010000000010002202010101?1010100?0?01
<i>S. stellatus</i>	123210101121100000001011122000111012010000011?01
<i>E. chiotilla</i>	122000101101100000000001011020101022010010001010
<i>M. eichlamii</i>	1211100011111000000110110221000110021010100?1?10
<i>C. gigantea</i>	12230020220100100000000102202010101000111011110?
<i>B. emoryi</i>	112000301220100000000001122000111010000010001201
<i>L. hollianus</i>	112310102200100000000002122011111000101010000?11
<i>M. geometrizans</i>	122300001020100000000001000000100002010120021000
<i>A. tetragonus</i>	122310000120100000030003111010110000000??0??????
<i>L. quadricostatus</i>	122310100200100000000000111000110010000??0??????

Table 5. Parsimony statistics for molecular data single marker, gaps, concatenated molecular matrices (MM), and combined (molecular + morphological) matrices (CM).

Dataset	<i>rpl16</i>	<i>trnL-F</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>trnQ-rps16</i>	<i>petL-psbE</i>	<i>ycf1</i>	[gaps]	MM	CM
Terminals	40	40	40	40	40	40	40	40	40	26
Length (bp)	1159	1096	550	1380	603	573	1498	59	6918	6964
Excluded characters	11	19	6	28	6	0	454	0	524	524
Indels per marker	4	9	4	23	1	3	15	-	-	-
Uninformative characters	100	87	46	137	36	38	179	0	623	549
Informative characters	60	44	34	159	16	11	292	59	675	448
Tree length (steps)	212	160	103	420	68	57	857	77	2011	1668
CI	0.8396	0.8500	0.8835	0.8238	0.8382	0.9474	0.6989	0.8052	0.7573	0.6906
HI	0.1604	0.1500	0.1165	0.1762	0.1618	0.0526	0.3011	0.1948	0.2427	0.3094
RI	0.7821	0.8588	0.8776	0.8150	0.7105	0.8800	0.8173	0.9118	0.8023	0.7096
RC	0.6566	0.7300	0.7753	0.6714	0.5956	0.8337	0.5712	0.7341	0.6076	0.4901
% informative	5.2	4.0	6.2	11.5	2.6	1.9	19.5	100	9.7	6.4

Figure 1. – Phylogenetic trees for molecular dataset. MP consensus tree for 3 most parsimonious trees showing support values for *bootstrap* (above branches), and *jackknife* (below branches) [left], and clade credibility tree for BI analysis, posterior probabilities are shown above branches [right].

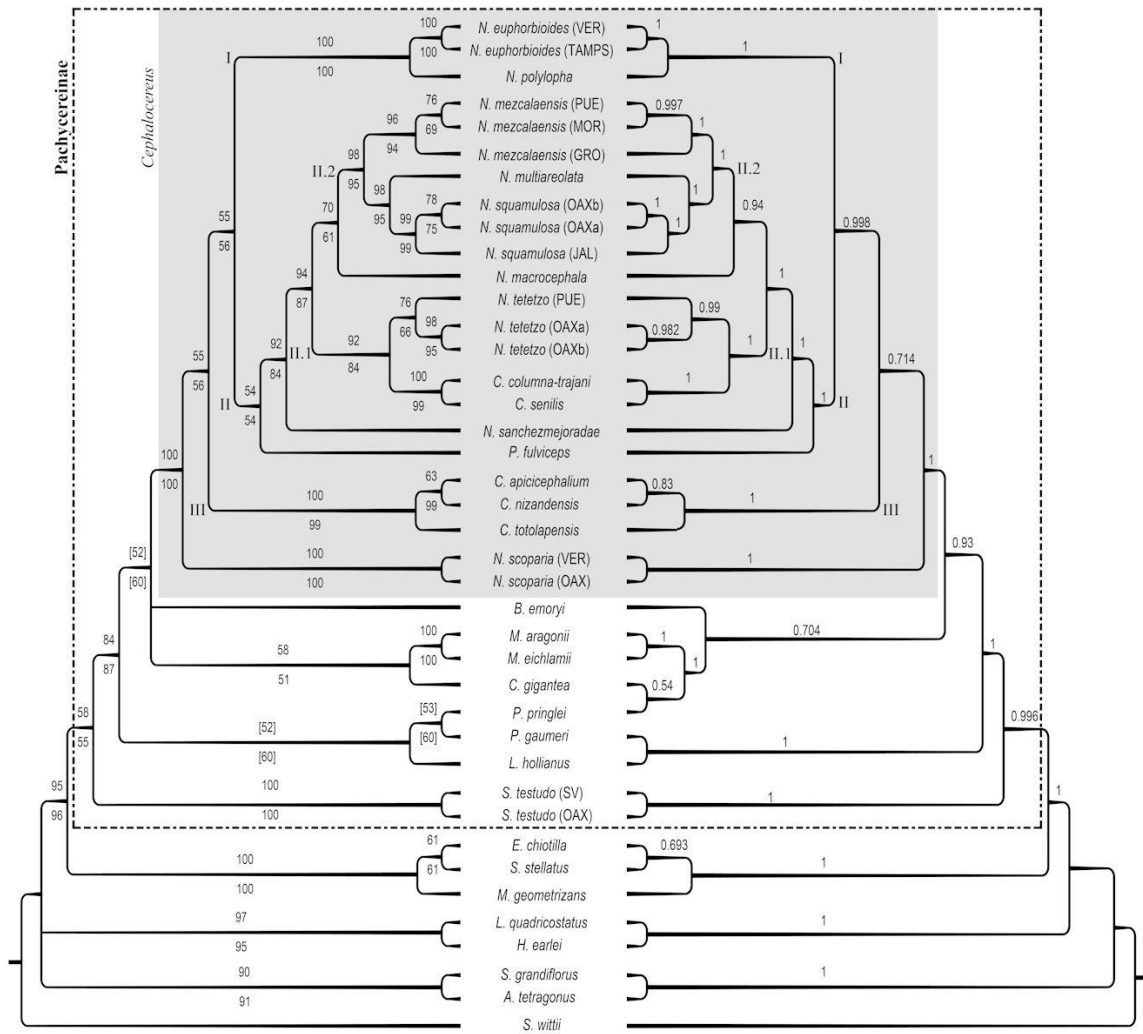


Figure 2. – BI tree from combined (molecular + morphological) data. Bold lines represent 1.0 posterior probabilities; the lower values appear annotated above branches. Character mapping (morphological dataset) are shown over branches: characters are designated with numbers and the character state is annotated below each number (Table 3). Branch lengths are only intended to show the characters assigned to each branch. Synapomorphies are highlighted with bold numbers and brackets.

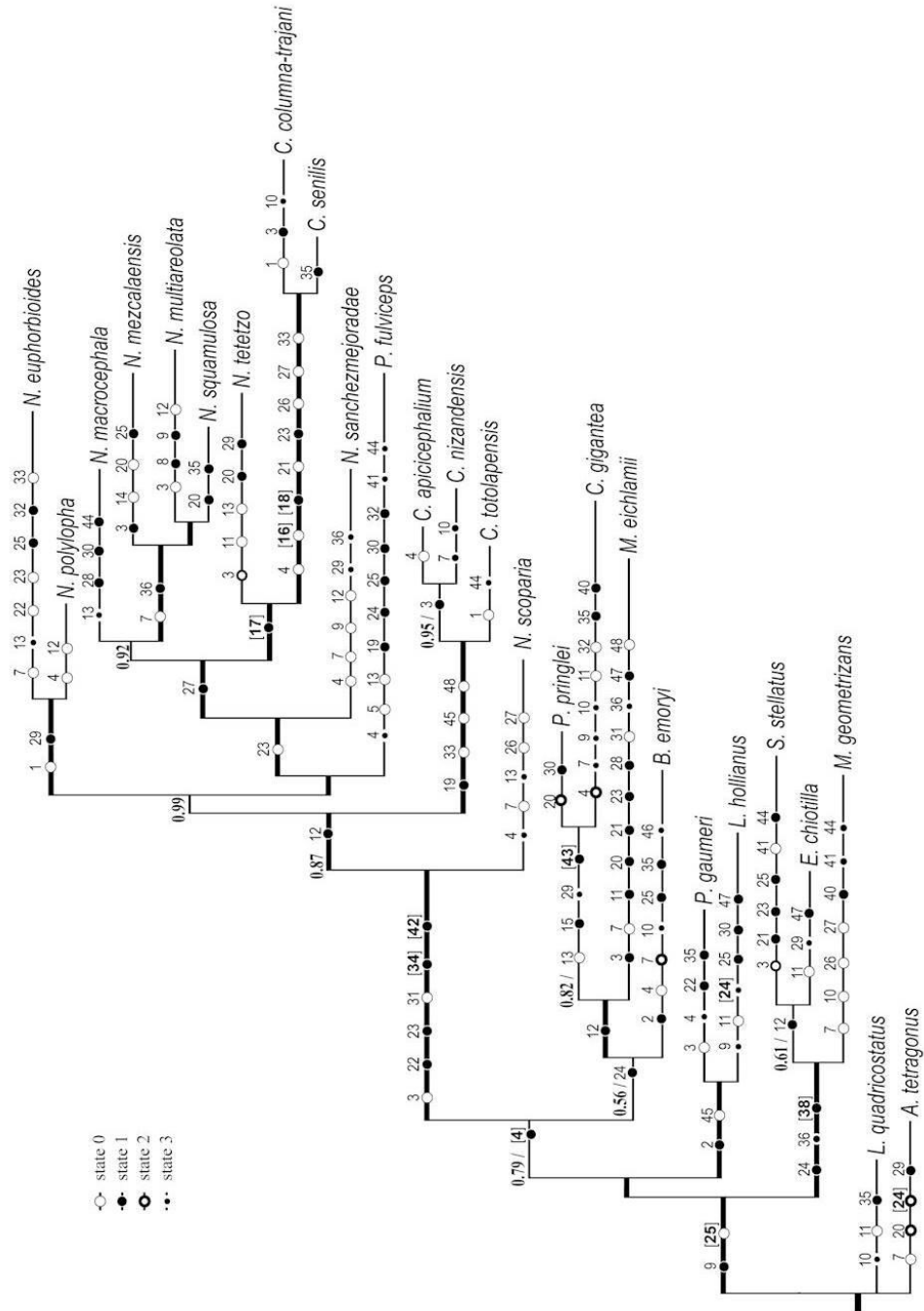
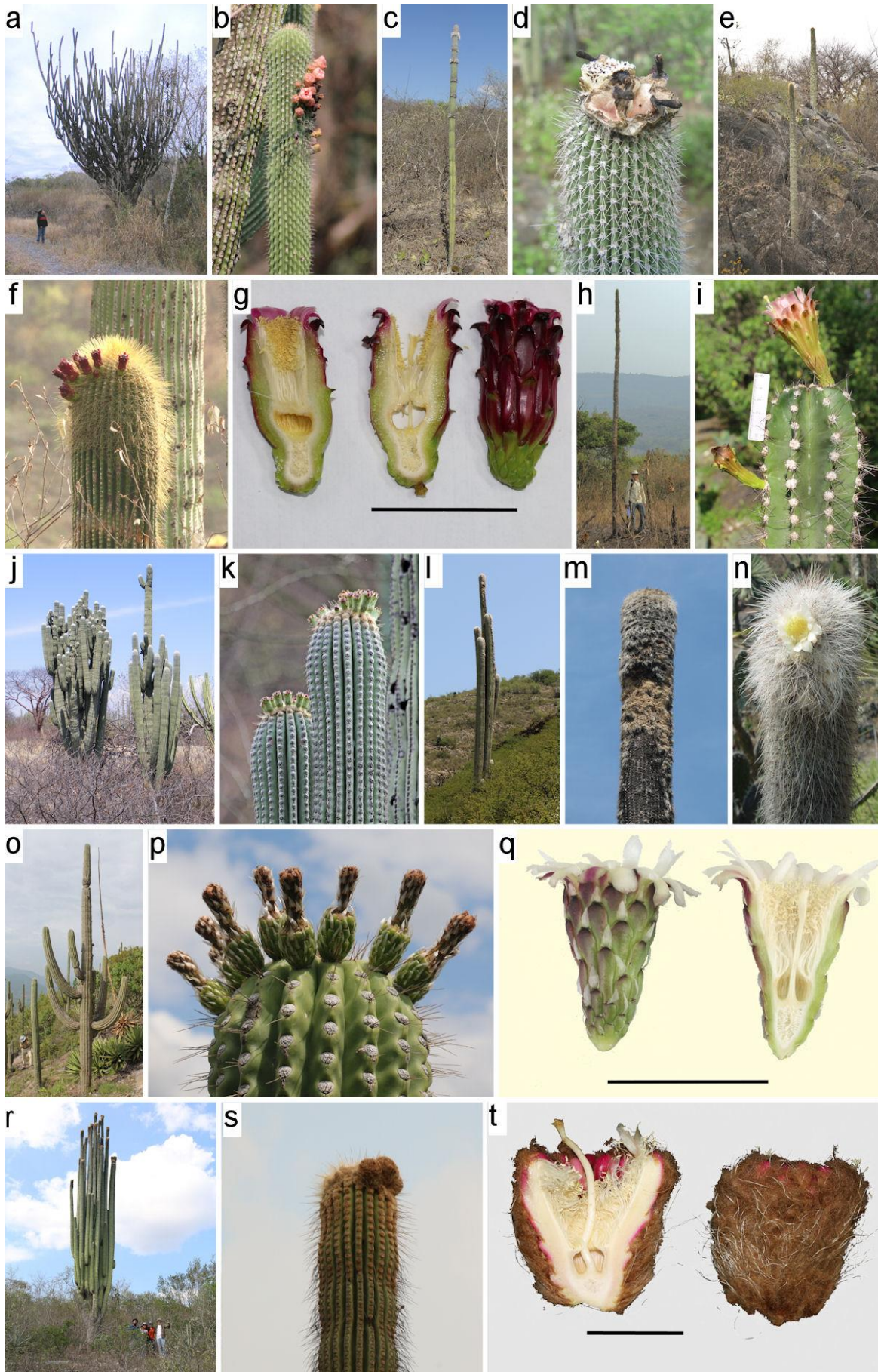


Figure 3. – Representative species from the redefined gen. *Cephalocereus* (see Taxonomic treatment), and some of its distinctive features. *C. scoparius*: a) highly branched sympodial growth, and, b) slender branch with subapical flower buds; *C. totolapensis*: c) a plant with monopodial growth, and, d) apical pseudocephalium (clade *Neodawsonia*); *C. polylophus*: e) monopodial growth, f) stem with numerous ribs and golden spiny on branch apex, and, g) longitudinal section of flower; *C. euphorbioides*: h) monopodial growth, i) stem apex with few ribs, flower in anthesis and flower bud; *C. tetetzo*: j) sympodial growth, k) branch with apical flower buds and podaria evident; *C. senilis*: l) basitome sympodial growth, m) mature lateral cephalium, n) early development of cephalium with flower; *C. nudus*: o) sympodial growth, p) branch apex with immature fruits, q) flower in longitudinal section [papyraceous scales evident]; *C. fulviceps*: r) massive sympodial growth, s) yellowish apical pseudocephalium, t) flower densely covered with trichomes and bristles in longitudinal section. Scale bar = 5 cm.



Capítulo 3

Tapia H.T., Arias S., and Morrone J.J.

(In preparation)

Biogeographic analysis of the Mexican genus

Cephalocereus (Cactaceae, Cactoideae,

Echinocereae): Integrating cladistic and

parametric methods.

[Journal of Biogeography]

Biogeographic analysis of the Mexican genus *Cephalocereus* (Cactaceae, Cactoideae, Echinocereae)

Héctor Tapia¹, Salvador Arias¹, and Juan J. Morrone² *.

¹ Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-614, 04510 Ciudad de México, México.

² Museo de Zoología, “Alfonso L. Herrera”, Departamento de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-399, 04510 Ciudad de México, México

* e-mail: juanmorrone2001@yahoo.com.mx

ABSTRACT

Aim. This study presents an integrative point of view to analyze the evolutionary biogeographic history of the Mexican genus *Cephalocereus*. The concomitant use of cladistic and phylogenetic methods is expected to contribute to untangle the processes and events that shaped the actual distribution of this genus.

Location. México, including the entire distribution of the species of *Cephalocereus* in the southern states of Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca and Chiapas, extending to the northeastern states of Guanajuato, Hidalgo, San Luis Potosí, Queretaro, Tamaulipas and Veracruz.

Methods. Two methods from historical biogeography were implemented: BPA, taken from cladistic biogeography, and the Lagrange-DEC analysis, from phylogenetic biogeography. Both methods employed phylogenetic and distributional information, bringing an insight into the evolutionary history of the genus, and presenting historical relationships among the geographic areas they occupy.

Results. The distributional pattern of *Cephalocereus* showed a probable division between northern and southern species. The southern areas have a higher diversity, where the Sierra Madre del Sur province is outstanding area for the diversification, dispersion and maintenance of the species of *Cephalocereus*. The occurrence of species in the northern areas is explained by long-dispersal events, from southern ancestors in the Sierra Madre del Sur province and the Tehuacán-Cuicatlán Valley area, and posterior vicariance events.

Main conclusions. The existence of a hard geographic barrier across the Transmexican Volcanic Belt has restricted the distribution of most species of *Cephalocereus* to the southern areas. A combination of different dispersal and vicariance events have worked to shape the actual distribution of the species of *Cephalocereus*. The Mexican Transition Zone has a great influence in the *Cephalocereus* evolution, driving the adaptation of species to the coldest and wettest conditions found at higher altitudes.

INTRODUCTION

The genus *Cephalocereus* Pfeif. is one of the most appealing genus among the North American columnar cacti from tribe Echinocereae (Bravo-Hollis, 1978; Sánchez et al., 2014). The latest circumscription of *Cephalocereus* recognizes 15 species, including species that were previously placed into *Neobuxbaumia* and *Pseudomitrocereus* (Tapia et al., submitted). The species of this genus grow to heights of 12 m or more, with a simple stem (e.g. *C. euphorbioides*), to profusely branched stems originated from the base (e.g. *C. senilis*) or from 1-2 m above the base (e.g. *C. scoparius*). The main stem, up to 40 cm in diameter, has 8 to 40 vertical ribs. The number of spines per areole is variable among species (3-17), but three basic patterns can be identified in terms of organization: number, orientation, and size of spines (Tapia et al., 2016). Differentiated flowering region occur in some species as cephalium (e.g. *C. columna-trajani*) or pseudocephalium (e.g. *C. fulviceps*), therefore a non-differentiated flowering and vegetative regions occurs in others species (e.g. *C. polylophus*). The white to red-colored flowers are typically bare, but in some cases trichomes and spines occurs (e.g. *C. fulviceps*). The semi-fleshy fruits, 3-6 cm long, present a woody cap from the perianth remaining, and split open, revealing the white pulp and many tiny black-brownish seeds. The presence of prismatic crystals in the dermal system is a synapomorphy for *Cephalocereus* (Bravo-Hollis, 1978; Terrazas & Loza-Cornejo, 2002; Tapia et al., submitted).

The geographic distribution of *Cephalocereus* includes the species richest region of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, where up to 5 species can be found: *C. columna-trajani*, *C. fulviceps*, *C. macrocephalus*, *C. mezcalaensis*, and *C. tetetzo*. The convergence of different biogeographic provinces in this region appears to be a key factor to reach this diversity. Four species spread from here towards the Balsas Basin, Pacific Lowlands and Sierra Madre del Sur provinces (following Morrone, 2014). This group includes the most widespread and morphologically variable specie, *C. nudus*, along with the also widespread *C. mezcalaensis*, and two geographically restricted species, *C. multiareolatus* and *C. sanchezmejoradae* (Tapia et al., submitted). Three species inhabit the Tehuantepec Isthmus: *C. apicicephalium*, *C. nizandensis*, and *C. totolapensis*. Two species occupy the Sierra Madre Oriental province: *C. polylophus* and *C. senilis*. The remaining species, *C. euphorbioides* and *C. scoparius*, have

disjunct distributions. The first inhabits isolated areas in the north and center of the Gulf of Mexico province; and, the second inhabits the Gulf of Mexico and the Pacific Lowlands provinces. Figure 1 shows the geographic distribution of *Cephalocereus* species. The habitat of these species includes deciduous seasonal forests, and thorn scrubs. In a wide scale, these habitats have varying precipitation and temperature parameters but, at small scale, *Cephalocereus* microhabitats apparently have more arid and hot conditions than the surroundings, sometimes being strongly associated with rock emergences or particular types of soil (Bárcenas-Argüello et al., 2010). This fact, together with the slow-growth and the low fecundity of established individuals, may explain the patch-like distribution and the scarcity of individuals at population level for most species (Godínez-Álvarez et al., 2003; Godínez-Álvarez & Valiente-banuet, 2004; Esparza-Olguín et al., 2005).

In biogeography, the processes related to time and space can be studied in a variety of forms, from the ecological to deep geological times, and from a single place to planetary scales (Morrone, 2004, 2007; Lomolino et al., 2005; Sanmartín, 2012). Biogeographic patterns can help explain and understand evolutionary processes, which rely precisely on the intersection between time and space (Morrone, 2004). This multidimensional point of view represents historical character of the evolutionary processes, which is more likely to produce a non-repeatable and non-reversible sequence of events. So, the distributional patterns among different taxa are expected to reflect existing area relationships through time.

Traditionally, the field of historical biogeography has been occupied by proponents of two approaches, named dispersalism and vicarianism. The proponents of these schools, sometimes conflicting, preponderate respectively dispersal and vicariance as the main process that shapes the actual distributional patterns of species (Espinosa Organista et al., 2002; Morrone, 2004, 2007; Sanmartín, 2012). This emphasis has been compatible with the development of methods and with the agreement of involved biogeographers, although the methodological distinction and separation of dispersal and vicariance explanations may seem unreasonable. Other intangible division has been usually recognized between ecological and historical biogeography. The first is devoted to the proximate causes of distributions, as environmental factors in small space and time scales, while the second is dedicated to ultimate causes, as geological factors, and to the bigger space and time scales (Morrone,

2004, 2012). Cladistic biogeography is a preponderant approach in historical biogeography, based on principles of Croizat's panbiogeography and phylogenetic systematics (Morrone & Crisci, 1995; Espinosa Organista et al., 2002; Morrone, 2004). Other major approach corresponds to phylogenetic biogeography, which relies mainly on phylogenetic trees, distributions of taxa, and statistic or probabilistic modelling (Ronquist & Sanmartín, 2011; Sanmartín, 2012). The field of phylogenetic biogeography has experimented significant advances in recent years, based on the development of different parametric models (Ronquist & Sanmartín, 2011).

An integrative point of view is proposed by some biogeographers, who argue in favor of an evolutionary biogeography, combining different assumptions and methods to untangle evolutionary biotic histories (Morrone, 2007). The present study explores two methods from cladistic and phylogenetic biogeography, in order to identify congruent patterns, as well as to integrate information about speciation, inheritance of distributional ranges, local extinction, dispersal and vicariance events that could have shaped the current distribution of *Cephalocereus* species. The concomitant approach of these cladistic and phylogenetic methods is expected to provide valuable insights into the evolutionary and geographic history of *Cephalocereus*.

MATERIAL AND METHODS

Taxonomic sampling and distributions

The taxonomic sampling comprises the 15 recognized species of *Cephalocereus* (Table 1, Tapia et al., submitted). Initial exploration of preserved specimens in the National Herbarium of Mexico (MEXU) and the Herbarium of the Institute of Ecology A.C. (XAL) led to identification of collecting sites and to the delineation of distributional areas for all taxa. Additional records were obtained from a specialized online database (REMIB), and from two specialists who work with some *Cephalocereus* species (O. Tellez and G. Arroyo-Cosultchi). Field work was planned to encompass the distributional ranges of each species, to confirm the current records and to increase the number of localities. A total of 256 records were gathered from the different sources, each of which was cross validated for taxonomic and geographic correctness.

Phylogenetic analysis

The phylogenetic analysis included 7 chloroplast regions and codified indels, comprised in an alignment of 6918 characters. A total of 42 terminals were included in the analysis, considering three terminals for widespread species and two terminals for disjunct species in the ingroup. The criterion to obtain the phylogenetic trees was Bayesian Inference (BI). Four chains were run for ten thousand generations, GTR+I+ Γ model was applied, and all the parameters were unlinked. Entire tree and additional details for BI analysis appear in the phylogenetic analysis of Tapia et al. (submitted). This BI tree was pruned to remove outgroups, keeping the genus *Cephalocereus* with a single terminal for each species.

Regionalization and biogeographic analyses

This study is based on a Neotropical regionalization proposed by Morrone (2014). The provinces considered here are: Pacific Lowlands, Sierra Madre Oriental, Veracruz, Balsas Basin, Sierra Madre del Sur, and Transmexican Volcanic Belt. An additional subdivision was employed for the Tehuacán-Cuicatlán Valley, which is located in the southeastern part of Transmexican Volcanic Belt province. It was considered as independent area because the rest of the province lacks *Cephalocereus* species, and apparently represent a hard geographic barrier for the group. The regionalization and punctual distributions were projected using the software QGIS ver. 2.16 (2016), in order to assign the areas to the corresponding species.

Brooks Parsimony Analysis BPA

The BI phylogenetic tree was translated into an area cladogram, following the regionalization described above. Nodes were numbered ascending from the root of the tree, and the areas corresponding to each node/terminal were annotated. A presence/absence matrix of areas was codified for 19 characters whose reflect relationships between areas: thirteen internal nodes and six widespread terminals (Figure 2; Table 1). Four of these terminals are presents in two areas, and two terminals are presents in three areas. This input matrix was introduced in TNT (Goloboff et al., 2008) to perform the parsimony analysis. The search was implemented using the swapping algorithm of Tree Bisection Reconnection (TBR) and starting with a Wagner tree. Ten random addition sequences were done. The tree was rooted using hypothetical outgroup, coded with all '0'.

Lagrange DEC model

The RASP software ver. 3.0, included in the S-DIVA package (Yu et al., 2010), was employed to run Lagrange DEC model. We used a single BI tree and a distribution matrix for the 15 *Cephalocereus* species. The maximum areas allowed at each node was set to 5, and no dispersal constraints were imposed. No distributional ranges for fossils nor most recent common ancestors (MRCA) were indicated. The number of iterations was 100. The DEC model is implemented under the Maximum Likelihood (ML) framework, allowing the hypothesis testing for dispersal, vicariance, extinction and cladogenesis (speciation events). The evolutionary nodes were numbered from 16 to 29,

RESULTS

BPA

The parsimony analysis of the presence/absence matrix resulted in two most parsimonious area cladograms with a total length of 27 steps. A total of 872 rearrangements were examined. The best score was hit one out of ten times, for the random addition of sequences. The consistency and retention indices were high (CI=0.70, RI=0.64). The consensus tree produces a polytomy between four areas: Pacific Lowlands, Balsas Basin, and Sierra Madre del Sur provinces and the Tehuacán-Cuicatlán Valley area. This polytomy is promoted by the mixed signals that relate the Pacific Lowlands or the Tehuacán-Cuicatlán Valley as sisters of the Sierra Madre del Sur province. Each of these competing hypotheses is represented in one of the two most parsimonious area cladograms found. The Sierra Madre Oriental and the Gulf of Mexico provinces appear in a grade relationship as successive sister areas of the group described previously (Figure 3).

DEC analysis

This analysis reveal 13 evolutionary nodes where dispersal, vicariance, and extinction can be inferred, alone or in combinations, and one node where speciation/cladogenesis occurs sympatrically. Dispersal/vicariance appear as a combined explanation in two nodes (17 and 25), a combination of dispersal/extinction is recovered in one node (21), and the 10 remaining nodes correspond to dispersal or vicariance only events. A total of 15 dispersal and five vicariance events were detected in the different nodes. Three single-areas were identified for

nodes where at least two species converge. These areas are Pacific Lowlands, Sierra Madre del Sur and Tehuacán-Cuicatlán Valley. The remaining identified areas were of composite type, formed from two or up to four single-areas. The graphic representation of the BI tree and DEC evolutionary nodes appears in Figure 4, with the probabilities for reconstructed areas showed as percentage.

The first evolutionary node (29) represents a vicariance event ($ACF \rightarrow AF/C$, $P=0.0793$) where the Sierra Madre del Sur becomes separated from Veracruz and Pacific Lowlands provinces. The composite area ACF had the highest probabilities as the ancestral distribution ($P=0.1530$); other composite areas with lower probabilities were AC (0.1123) and CF (0.1088). This node corresponds to the basal derivation of *C. scoparius*. The next node (28) comprises the Sierra Madre del Sur as a single-area distribution with high probability (C, $P=0.5183$); composite areas that include the Sierra Madre del Sur Province (e.g. AC, CF and CE) have lower probabilities ($P < 0.1232$). This node represents a dispersal event from the Sierra Madre del Sur to the Pacific Lowlands provinces ($C \rightarrow AC$, $P=0.2413$). Two nodes were derived from here (25 and 27). The next node (27) corresponds to a dispersal event from the Sierra Madre del Sur to the Pacific Lowlands ($C \rightarrow AC$, $P=0.8466$). The derived node (26) reveals the unique event of sympatric speciation/cladogenesis ($P=1.0$), which occurs between *C. apicicephalum* and *C. nizandensis*, near the Tehuantepec Isthmus, in the Pacific Lowlands province.

The node 25 embodies the major radiation of the genus *Cephalocereus*, indicating that the Sierra Madre del Sur province (C, $P=0.55$) had an important evolutionary role on it. Other composite areas including this single area reach lower probabilities (CF, $P=0.1867$; CE, $P=0.1589$; CEF, $P=0.1044$). Three dispersal and one vicariance events were inferred here ($C \rightarrow CEF \rightarrow C/EF$, $P=0.2949$). These dispersals represent separated events of range expansion from the Sierra Madre del Sur to the Tehuacán-Cuicatlán Valley area, Veracruz and Sierra Madre Oriental provinces. The next derived node (24) indicates a vicariance event between the Sierra Madre Oriental and Veracruz provinces ($EF \rightarrow E/F$, $P=0.8337$), after the dispersal of the ancestor of these species from the Sierra Madre del Sur province. The composite ancestral areas correspond to the Sierra Madre Oriental and Veracruz provinces (EF, $P=0.8337$), and with lower probabilities the Sierra Madre del Sur, Sierra Madre Oriental, and

Veracruzian provinces joined (CEF, $P=0.1663$). This evolutionary node marks the separation between the species *C. euphorbioides* (Veracruzian) and *C. polylophus* (Sierra Madre Oriental).

The next node (23) gives place to the first dispersal event from the Sierra Madre del Sur to the Tehuacán-Cuicatlán Valley ($CD \rightarrow C/D$, $P=0.4336$), corresponding to the species *C. fulviceps*. The ancestral area corresponds to the single area of Sierra Madre del Sur province (C, $P=0.6432$), while the composite area Sierra Madre del Sur plus Tehuacán-Cuicatlán Valley provinces had lower probabilities (CD, $P=0.2614$), followed by the single area Tehuacán-Cuicatlán Valley (D, $P=0.1625$). The same relation of dispersal is observed in the node 22, where the species *C. sanchezmejoradae* diverge and the sister group migrates from the Sierra Madre del Sur to Tehuacán-Cuicatlán Valley ($C \rightarrow CD$, $P=0.4110$). The ancestral areas include the single area Sierra Madre del Sur and the composite area Sierra Madre del Sur province plus Tehuacán-Cuicatlán Valley area (C, $P=0.6741$; CD, $P=0.3259$).

The node 21 represents one event of dispersal from the Sierra Madre del Sur to the Tehuacán-Cuicatlán Valley and the unique extinction predicted in the Sierra Madre del Sur ($P=0.1513$). The ancestral area with the highest probabilities was the composite one integrated by Sierra Madre del Sur and Tehuacán-Cuicatlán Valley (CD, $P=0.6097$), followed by a single-area (D, $P=0.2486$) and other composite-area that includes the Pacific Lowlands (ACD, $P=0.1416$). One clade composed by three species colonized the Tehuacán-Cuicatlán Valley, and extends its distributional range towards Sierra Madre Oriental. The node 20 represents two dispersal events ($D \rightarrow CDE$, $P=0.6754$), and the ancestral areas correspond to the single area of Tehuacán-Cuicatlán Valley (D, $P=0.6754$) and the composite areas CD ($P=0.2254$), and DE ($P=0.0993$). The derived taxon is *C. tetetzo*, which occupies the Sierra Madre del Sur and Tehuacán-Cuicatlán Valley areas. The derived node (19) indicates a vicariant event between the Tehuacán-Cuicatlán Valley and Sierra Madre Oriental provinces ($DE \rightarrow D/E$, $P=1.0$), where the sister taxa *C. columna-trajani* and *C. senilis* were separated, after the colonization of the Sierra Madre Oriental by *C. senilis*.

Finally, a clade composed of four species reveals some dispersal events. First, the node 18, where the species *C. macrocephalus* diverged, shows a single ancestral area in the Tehuacán-Cuicatlán Valley (D, $P=0.3673$), and composite areas with lower probabilities, the Tehuacán-

Cuicatlán Valley plus Sierra Madre del Sur areas (CD, $P=0.3528$), and other composite areas comprising the Tehuacán-Cuicatlán Valley area, the Sierra Madre del Sur, Pacific Lowlands, and Balsas Basin provinces (ACD, $P=0.1366$; ABCD, $P=0.0769$; BCD, $P=0.0664$). The next node (17) represents two dispersal events from the Tehuacán-Cuicatlán Valley and Sierra Madre del Sur areas to the Balsas Basin and the Pacific Lowlands, and then one vicariant event ($CD \rightarrow ABCD \rightarrow BCD/A$, $P=0.0675$). One dispersal event involves the species *C. mezcalaensis*, derived directly of this node. This species inhabits the Sierra Madre del Sur, Tehuacán-Cuicatlán Valley and Balsas Basin (BCD). The ancestral area for this node include the Tehuacán-Cuicatlán Valley plus the Sierra Madre del Sur (CD, $P=0.2771$); other composite areas with lower probabilities that include the Balsas Basin and Pacific Lowlands provinces ($P < 0.1612$). The last node (16) involves two dispersal events from Pacific Lowlands to Balsas Basin, and to the Sierra Madre del Sur ($A \rightarrow ABC$, $P=0.4299$). The single ancestral area corresponds to the Pacific Lowlands ($P=0.4299$), while composite areas have lower probabilities (AC, $P=0.3461$; AB, $P=0.1276$; and, ABC, $P=0.0964$). This node represents the derivation of the species *C. multiareolatus*, which inhabit the Pacific Lowlands province, and *C. nudus*, which extends from Balsas Basin to Pacific Lowlands and to Sierra Madre del Sur (ABC).

DISCUSSION

Biogeographic and evolutionary history of *Cephalocereus*

The predominantly Mexican tribe Echinocereae appears to be derived from a Neotropical ancestor, which inhabited southeastern Mexico or Central America, and that was involved in several dispersal events through the Mexican Transition Zone (MTZ), even reaching the Nearctic region. Particularly, the ancestor of genus *Cephalocereus* shows a close association with provinces of the MTZ (Sierra Madre del Sur, Transmexican Volcanic Belt, Sierra Madre Oriental), which act as barrier in some cases and as corridor in others. The

The results of BP analysis are consistent with the existence of a hard barrier across the Transmexican Volcanic Belt, consisting of a stripe of tempered highlands that runs between the 19°0' and 20°30'N, from Jalisco to Puebla. There, the *Cephalocereus* species are absent probably because of the freezing temperatures and the higher humidity found at higher elevations. This barrier divides the *Cephalocereus* distributions into southern and northern

regions. The southern region is represented by 11 species, which inhabit the provinces of Pacific Lowlands, Sierra Madre del Sur, Balsas Basin and the Tehuacán-Cuicatlán Valley area. The northern region only presents three species inhabiting the Sierra Madre Oriental and Veracruz provinces. The Veracruz province is represented in both sides of the barrier, but disjunct distributions of inhabiting species (one northern and one southern) supported the extension of the gap to the coast in the Gulf of México.

The grouping of four areas in the southern region represents the major diversification in the genus, and involves several dispersal events that obscure the primary association of areas (Figure 3). Particularly, the association between the Sierra Madre del Sur and Tehuacán-Cuicatlán Valley compete with the association between the Sierra Madre del Sur and Pacific Lowlands, producing the polytomy observed in the area cladogram (Figure 3). In this analysis, the successive separation of the northern areas (Sierra Madre Oriental and Veracruz provinces) implies dispersal events, through the Transmexican Volcanic Belt, and subsequent vicariance from the southern relatives in two different moments. First, the species *C. euphorbioides* and *C. polylophus* diverge in the Sierra Madre Oriental and Veracruz provinces, from ancestors in the Sierra Madre del Sur; and, second, the species *C. senilis* diverge from an ancestor in the Tehuacán-Cuicatlán Valley. The number of terminals included, the widespread and redundant distributions have limited the resolution power of the cladistic method employed, but reveal the major evolutionary events over the geographic areas.

The phylogenetic method, by counterpart, offers a detailed explanation at each evolutionary node, and the uncertainty here is understood as undefined areas of distribution. It occurs in the nodes 17 and 29, where many ancestral areas with low probabilities are recovered. The inferred ancestral area for the entire genus *Cephalocereus* (node 29) comprises the intersection of three areas: Pacific Lowlands, Veracruz and Sierra Madre del Sur provinces, in the the confluence of the Neotropical region and the Mexican Transition Zone. This ancestor underwent a vicariance process which led to the divergence of *C. scoparius* in the regions Veracruz and Pacific Lowlands, and the ancestor for the remaining *Cephalocereus* becomes detached into the Sierra Madre del Sur. Then a group of three species diversified from this ancestor (node 28); the first of them inhabiting the Sierra Madre

del Sur and the Pacific Lowlands (*C. tototalapensis*, node 27), and the other two diversified sympatrically in the Pacific Lowlands, close to the Tehuantepec Isthmus (*C. apicicephalium* and *C. nizandensis*; node 26). These four species occupy the warmest and wettest areas, possibly resembling that of the ancestor habitat for the entire genus.

The ancestor of other two species get derived into the Sierra Madre del Sur and long-distance dispersed to the Sierra Madre Oriental and Veracruz provinces, as a composite area (node 24). The hard geographic barrier of Transmexican Volcanic Belt province was crossed for the first time, and then these species vicariate: *C. polylophus* remains in the Sierra Madre Oriental, and *C. euphorbioides* in the Veracruz province (node 24). The habitat of these species is slightly less warm and wet, but the height above mean sea level is greater.

The Sierra Madre del Sur province sustains continuously a pool of species inhabiting, and occasionally these species disperse through neighbor regions and/or derive into new species. The case of *C. fulviceps* involves diversification and dispersal through the Tehuacán-Cuicatlán Valley (node 23). The next node involves the diversification within the Sierra Madre del Sur of *C. sanchezmejoradae*, and the dispersal of the node 21 ancestor into the Tehuacán-Cuicatlán Valley. This ancestor originated two clades: 20 and 18. The first clade includes the specie *C. tetetzo*, which derived in the Tehuacán-Cuicatlán Valley and then dispersed into the Sierra Madre del Sur, and their sister species *C. columna-trajani* derived in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, and *C. senilis* gets dispersed and vicariate into the Sierra Madre Oriental. This second long-distance dispersal event also crossed the Transmexican Volcanic Belt, without intermediate current records, perhaps assisted by migratory birds or bats. The association of bats and columnar cacti has been recognized in different species, as pollinators and seed dispersers (Valiente-Banuet et al., 1997; Valiente-Banuet, 2002; Bustamante et al., 2016). The species which inhabit the SMS and TCV regions occupy the driest and coolest areas.

A second clade dispersed and diversified through the Balsas Basin, Pacific Lowlands and returns secondarily to the Sierra Madre del Sur (node 18). The first species derived of this clade (*C. macrocephalus*) is endemic to the Tehuacán-Cuicatlán Valley, while *C. mezcalaensis* extended its distributional range through the Balsas Basin and the Sierra Madre del Sur. These species have been studied demographically, finding environmental and

reproductive factors that could account for the distributional differences (Esparza-Olguín et al., 2002, 2005; Godínez-Álvarez & Valiente-banuet, 2004). Two species more are comprised in this clade, the geographically restricted *C. multiareolatus*, which inhabits a small area of the Pacific Lowlands and the widely distributed *C. nudus*, which extends from Balsas Basin through Pacific Lowlands to the Sierra Madre del Sur.

The polytomy recovered in the resolved area cladogram (Figure 3) is sustained mainly by distributional data of widespread species *C. nudus* and *C. mezcalaensis*. The derived position of these taxa indicated that such relationship could be recent instead of historical, obscuring other relationships specified by single-area distributions. The existence of vicariance events through the Transmexican Volcanic Belt is explained better by the phylogenetic method, although several nodes are resolved with uncertainty about the ancestral areas. The events agreed by both methods are the separation of northern and southern distributions, delimited by the Transmexican Volcanic Belt barrier, the strong association of southern distributions, and the gradual isolation of areas in the northern distributions. The resolving power of these methods could be improved by the addition of terminals taken from a finest regionalization or by the inclusion of other cohabiting taxa with available phylogenetic information. Further studies could explore geographic processes in related taxa, in a finest or broadest sense, to understand other evolutionary trends in the North American columnar cacti (tribe Echinocereae).

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study is a fragment of the Dissertation of HT and is presented as partial requirement to opt for a PhD degree in Biological Sciences at Posgrado en Ciencias Biológicas (PCB), UNAM. The first author thanks to CONACyT for the scholarship granted (332595). We are grateful to O. Tellez-Valdez (UNAM-FES Iztacala) and G. Arroyo-Cosultchi (UAM-Xochimilco) for sharing their distributional databases, Daniel Sánchez (FES Iztacala), Isaura Rosas, Daniel Franco, David Aquino, Miguel Cruz, Marisela Yañez, and Yolanda Morales (Instituto de Biología, UNAM) for supporting the laboratory and field work. We also thank the program UNAM-DGAPA-PAPIIT <IN208315> to SA, which supported this work.

REFERENCES

- Bárcenas-Argüello M.L., Gutiérrez-Castorena M. del C., Terrazas T., & López-Mata L. (2010) Rock–soil preferences of three (Cactaceae) species of tropical dry forests. *Soil Science Society of America Journal*, **74**, 1374–1382.
- Bravo-Hollis H. (1978) *Las Cactáceas de México, vol. I*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.
- Bustamante E., Búrquez A., Scheinvar E., & Eguiarte L.E. (2016) Population genetic structure of a widespread bat-pollinated columnar cactus. *Plos One*, **11**, e0152329.
- Esparza-Olguín L., Valverde T., & Mandujano M.C. (2005) Comparative demographic analysis of three *Neobuxbaumia* species (Cactaceae) with differing degree of rarity. *Population Ecology*, **47**, 229–245.
- Esparza-Olguín L., Valverde T., & Vilchis-Anaya E. (2002) Demographic analysis of a rare columnar cactus (*Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, Mexico. *Biological Conservation*, **103**, 349–359.
- Espinosa Organista D., Morrone J.J., Llorente Busquets J., & Flores Villela O. (2002) *Introducción al análisis de patrones en biogeografía histórica*. UNAM. Facultad de Ciencias., México, DF.
- Godínez-Álvarez H. & Valiente-banuet A. (2004) Demography of the columnar cactus *Neobuxbaumia macrocephala*: a comparative approach using population projection matrices. *Plant Ecology*, **174**, 109–118.
- Godínez-Álvarez H., Valverde T., & Ortega-Baes P. (2003) Demographic trends in the Cactaceae. *The Botanical Review*, **69**, 173–201.
- Goloboff P., Farris J.S., & Nixon K.C. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, **24**, 774–786.
- Lomolino M. V, Riddle B.R., & Brown J.H. (2005) *Biogeography*. Sinauer Associates,
- Morrone J.J. (2004) *Homología Biogeográfica. Las coordenadas espaciales de la vida*. UNAM. Instituto de Biología, México, DF.

- Morrone J.J. (2007) Hacia una biogeografía evolutiva. *Revista Chilena de Historia Natural*, **80**, 509–520.
- Morrone J.J. (2012) *Sistemática, biogeografía, evolución. Los patrones de la biodiversidad en tiempo-espacio*. UNAM. Facultad de Ciencias., México, DF.
- Morrone J.J. (2014) Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistics*, **30**, 202–214.
- Morrone J.J. & Crisci J.V. (1995) Historical Biogeography: Introduction to Methods. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **26**, 373–401.
- QGIS Development Team (2016) QGIS Geographic Information System. .
- Ronquist F. & Sanmartín I. (2011) Phylogenetic Methods in Biogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **42**, 441–464.
- Sánchez D., Arias S., & Terrazas T. (2014) Phylogenetic relationships in *Echinocereus* (Cactaceae, Cactoideae). *Systematic Botany*, **39**, 1183–1196.
- Sanmartín I. (2012) Historical biogeography: evolution in time and space. *Evolution: Education and Outreach*, **5**, 555–568.
- Tapia H.J., Arias S., Yáñez-Espinosa L., & Terrazas T. (2016) El uso de espinas del tallo en la identificación de las especies de *Neobuxbaumia* (Cactaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **87**, 288–300.
- Terrazas T. & Loza-Cornejo S. (2002) Phylogenetic relationship of Pachycereeae: A cladistic analysis based on anatomical-morphological data. *Columnar Cacti and their mutualists: Evolution, Ecology, and Conservation* (ed. by T.H. Fleming and A. Valiente-Banuet), pp. 371. The University of Arizona Press,
- Valiente-Banuet A. (2002) Vulnerability of pollination systems of columnar cacti of Mexico. *Vulnerabilidad de los sistemas de polinización de cactáceas columnares de México*, **75**, 99–104.
- Valiente-Banuet A., Rojas-Martínez A., Arizmendi M. del C., & Dávila P. (1997) Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia*

macrocephala) in the Tehuacan Valley, central Mexico. *American Journal of Botany*, **84**, 452–455.

Yu Y., Harris a J., & He X. (2010) S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**, 848–50.

TABLES

Table 1. Presence/absence matrix for the area cladogram.

Area	Region	Binary code
A	Pacific Lowlands	11111 01110 11010 0011
B	Balsas Basin	11101 01110 11011 0000
C	Sierra Madre del Sur	11111 01111 11011 1110
D	Tehuacán-Cuicatlán Valley	11101 01111 10101 1100
E	Sierra Madre Oriental	11101 11101 00100 0001
F	Veracruzán	11100 10000 00000 0000
G	Outgroup	00000 00000 00000 0000

FIGURES

Figure 1. Map with the distributions of the species of *Cephalocereus*.

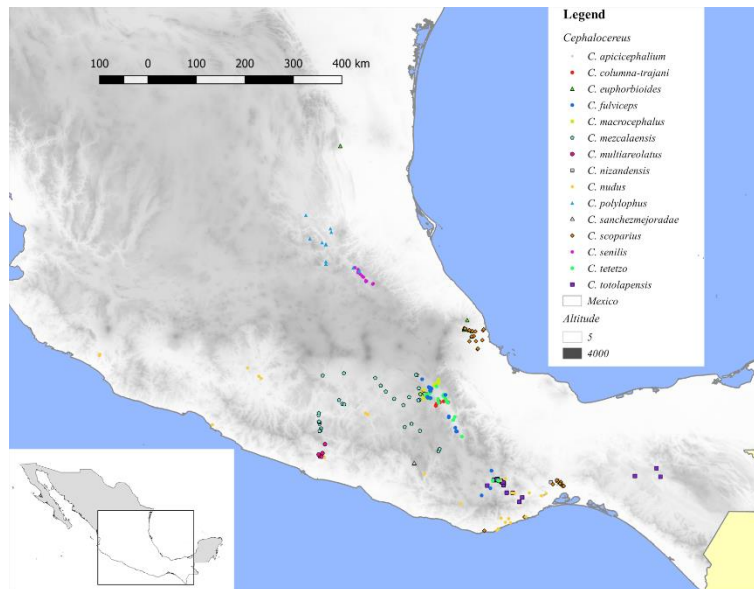


Figure 2. Area cladogram for the species of *Cephalocereus*. Informative characters are annotated in the nodes and widespread terminals, from the base, corresponding with characters in the Table 1.

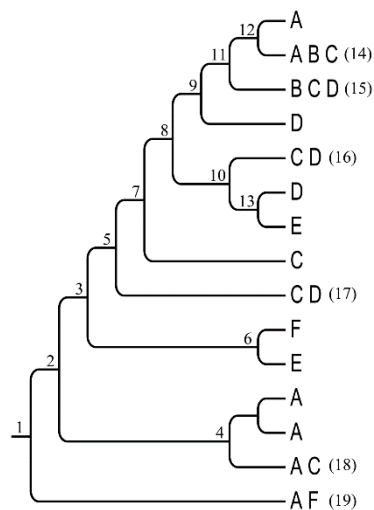


Figure 3. Area cladogram of *Cephalocereus*.

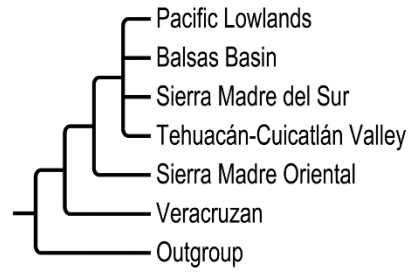


Figure 4. DEC representation of evolutionary nodes over the BI tree. The letters A-F correspond to the distributional areas as shown in Table 1. Other distributional areas with low probability values are denoted with asterisk.

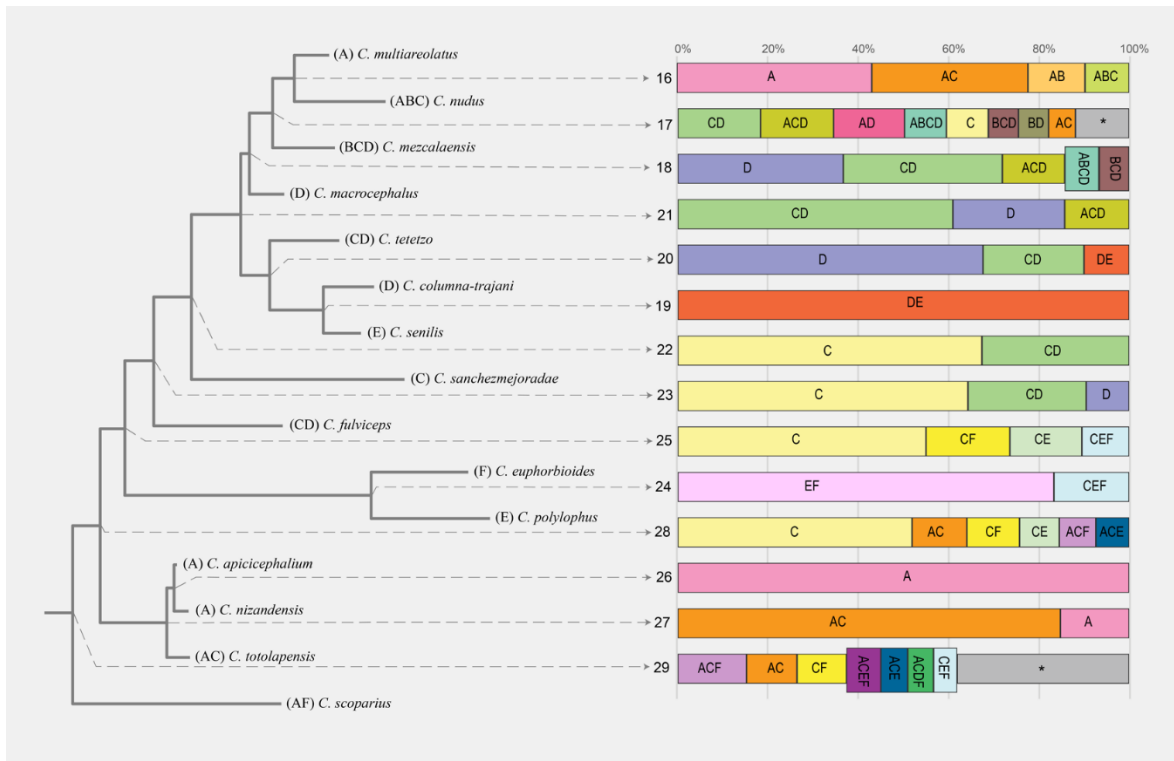
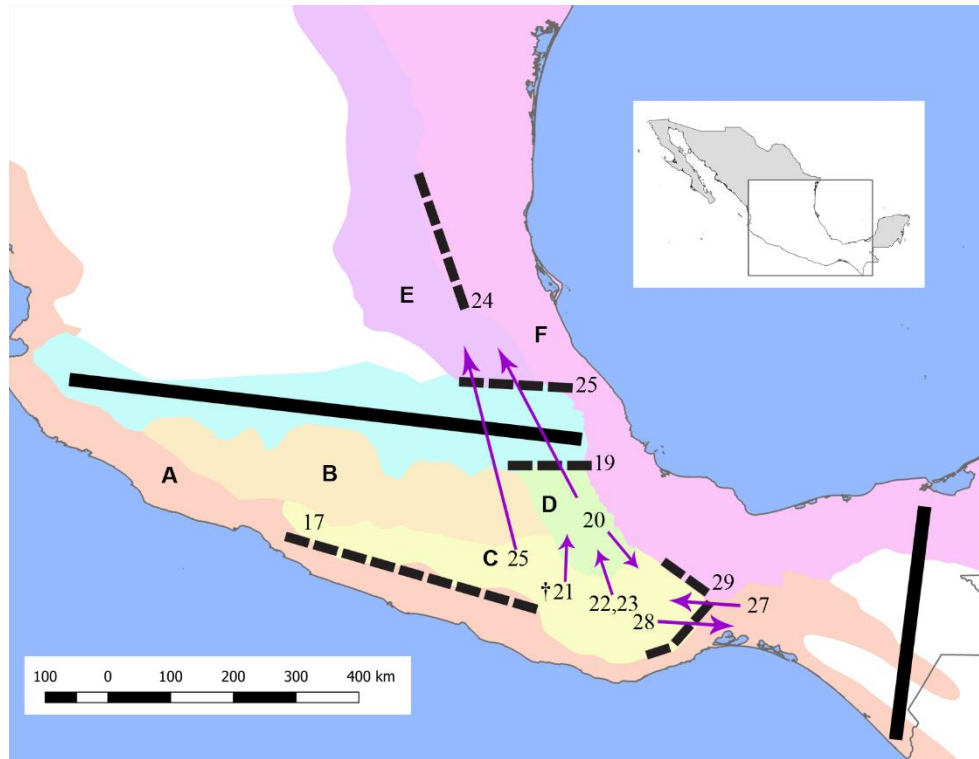


Figure 5. Evolutionary and geographic events involved in the *Cephalocereus* diversification. Dotted lines represent vicariant events, arrows represent dispersal events and entire lines represent hard geographic barriers. The bold letters A-F correspond to the areas as shown in Table 1, and the numbers indicate the evolutionary nodes as in Figure 4.



Discusión general

El estudio de *Neobuxbaumia* no ha sido ajeno a las controversias taxonómicas, particularmente sobre la extensión y la afinidad de este género, respecto a otros géneros relacionados, aunque su reconocimiento ha sido estable desde que se erigió. Para Backeberg (1938) la presencia de una región floral no diferenciada (*gimnocerei*) tiene valor para separar a *Neobuxbaumia* de *Cephalocereus*, donde si existe una región floral diferenciada en cefalio o pseudocefalio (*cephalocerei*). Esta propuesta se ha sostenido hasta la actualidad, concordando en la mayoría de las síntesis taxonómicas recientes (Anderson, 2001; Guzmán-Cruz *et al.*, 2003; Hunt *et al.*, 2006). Los cambios más notables en este género han sido sobre el número de especies que lo componen. La propuesta original sólo incluía a *N. tetetzo* y a *N. polylopha*, y se tomó como incierta la asignación de *Cephalocereus scoparius* dentro de *Neobuxbaumia* (Backeberg, 1938). Posteriormente se agregaron otras especies hasta contabilizar un total de nueve, la mayoría de las cuales fueron transferidas desde los géneros *Cereus*, *Pilocereus* y *Cephalocereus*, indicando diferentes interpretaciones para la morfología de estas plantas. Sólo las dos especies descritas más recientemente se describen dentro de *Neobuxbaumia*: *N. squamulosa* (Scheinvar y Sánchez-Mejorada, 1990) y *N. sanchezmejoradae* (Lau, 1994), y son las únicas que no cuentan con sinónimos dentro de *Cereus*, *Pilocereus* o *Cephalocereus*.

Diversos estudios han abordado la morfología de *Neobuxbaumia*, considerándolo como un género separado de *Cephalocereus*. En dichos trabajos se describe a las especies (Bravo-Hollis et al., 1970, 1971a, 1971b, 1973), se reconoce cuantitativamente asociaciones entre especies (Scheinvar et al., 1976), se describe la micro-morfología de la semilla (Arroyo-Cosultchi et al., 2007), se delimitan especies (Arroyo-Cosultchi et al., 2010), o se examina la relación del género con otros miembros de la tribu Pachycereeae (=Echinocereae) (Gibson y Horak, 1978; Terrazas y Loza-Cornejo, 2002). Estos estudios dan cuenta del amplio conocimiento existente sobre las especies, los caracteres taxonómicos útiles para su identificación y también revelan detalles sobre su relación con *Cephalocereus*.

El presente estudio parte de la distinción actual que existe entre ambos géneros. A partir de esta circunscripción, se avanzó en el estudio de los patrones de espinación en las especies de *Neobuxbaumia*, aplicando la estadística circular y siguiendo un esquema de desarrollo de la aréola, semejante al modelo que plantean Gibson y Nobel (1986), para dos especies de *Echinocactus*. Dicho modelo supone la existencia de un orden definido para la aparición de cada espina dentro de la aréola. De manera semejante, Dawson (1948) señala que en la aréola de *Cephalocereus nudus* están presentes los primordios de hasta 10 espinas, pero sólo se desarrollan las tres inferiores. En los dos casos referidos, *Echinocactus* y *C. nudus*, al igual que en las especies de *Neobuxbaumia*, se presenta la misma secuencia de surgimiento de las espinas: de la porción abaxial a la porción adaxial de la aréola, como se muestra en la figura 1-1. En contraste, existe una gran variación interespecífica en cuanto al número de espinas que se presentan, la longitud, la textura y el color de éstas. Los tres patrones generales de espinación encontrados entre las especies de *Neobuxbaumia* (Tapia et al., 2016) podrían contrastarse con otros grupos de la subfamilia Cactoideae para reconocer las similitudes y diferencias en el desarrollo, y para establecer comparaciones entre distintos patrones de espinación. Por su parte, el patrón de espinación en las especies de *Cephalocereus* presenta ligeras diferencias respecto a *Neobuxbaumia*, en cuanto al número y textura de las espinas, pero también se ha observado el desarrollo secundario de espinas, inducido por la reactivación de los meristemas en aréolas viejas (Bárcenas-Argüello, 2006).

La aplicación de dos métodos de la estadística multivariada, el análisis discriminante (AD) y el análisis clasificatorio (AC), permitió evaluar cuantitativamente el potencial para identificar especies, a partir de los datos de espinación. Este ejercicio arrojó un porcentaje alto de individuos clasificados correctamente dentro de su propia especie, incluso en especies de distribución amplia y de alta variabilidad intraespecífica, como *Cephalocereus nudus* (= *Neobuxbaumia squamulosa*), indicando que los patrones de espinación tienen valor taxonómico (Tapia *et al.*, 2016). El uso de información complementaria de otras estructuras vegetativas y reproductivas podría mejorar la capacidad para diferenciar estadísticamente entre linajes evolutivos distintos, como lo sugieren Arroyo-Cosultchi *et al.* (2010). Incluso, el patrón de espinación podría contener información para identificar o para delimitar especies en otros grupos de Cactaceae, ante la carencia de estructuras reproductivas durante la mayor parte del año. En este caso, los análisis estadísticos condujeron a la identificación y asignación certera de los individuos dentro de la especie correspondiente, como un paso previo para incluir a los representantes de cada especie en el análisis filogenético.

Ambas tareas, la identificación de especies y la reconstrucción de las relaciones filogenéticas, son actividades centrales de los sistemáticos (Wiens y Servedio, 2000; Wiens, 2007), representan etapas complementarias de un mismo proceso y ejercen una influencia mutua. En el análisis filogenético (Tapia *et al.* sometido) se incluyeron terminales que representan los extremos de la variación morfológica en las especies con distribución geográfica amplia o disyunta (Tabla 2-1). Esta precisión en el muestreo nos permitió evaluar la cohesión de cada especie como linaje evolutivo. El muestreo de taxa se extendió a todas las especies reconocidas de los géneros *Cephalocereus*, *Neobuxbaumia* y *Pseudomitrocereus* (Grupo *Cephalocereus*, *sensu* Arias *et al.*, 2003), permitiendo evaluar la hipótesis de monofilia de cada uno de los géneros y del grupo.

Los métodos empleados, Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (BI), ofrecieron reconstrucciones filogenéticas congruentes respecto a la topología, mientras los valores de soporte fueron ligeramente superiores en el análisis de BI (Figura 2-1). El resultado más importante de este análisis es que se recupera la monofilia del grupo *Cephalocereus*, incluyendo los tres géneros, con los valores de soporte más altos. Por su

parte, *Neobuxbaumia* aparece como parafilético, *Cephalocereus* es polifilético y *Pseudomitrocereus fulviceps* se recupera en una posición derivada, y no basal, como se proponía en estudios filogenéticos anteriores (Arias *et al.*, 2003, 2005; Arias y Terrazas, 2006). La parafilia de *Neobuxbaumia* se puede resolver al integrar las especies de todo el grupo en un solo género: *Cephalocereus*. El volumen de los datos moleculares y estructurales incluidos dan un fuerte soporte a esta hipótesis, por lo que se procedió a realizar una revisión minuciosa de la taxonomía del grupo. La síntesis de esta revisión se presenta en el tratamiento taxonómico al final del segundo capítulo.

La evaluación de los caracteres estructurales, a la luz de la evidencia filogenética, indica que la región floral diferenciada, cefalio o pseudocefalio, no tiene valor taxonómico a nivel de género para distinguir a *Neobuxbaumia* y *Pseudomitrocereus* de *Cephalocereus*. Esta afirmación es contraria a la propuesta taxonómica de Backeberg (1938) y, por lo tanto, se reconoce aquí la integración de los tres nombres en un género. En la literatura se pueden encontrar otros ejemplos donde las regiones florales se desarrollan de manera gradual, como en *Cephalocereus*, donde se aprecian distintos grados de modificación, o bien espontánea, como en *Backeberegia militaris*, donde ninguna especie cercana presenta modificaciones en la región floral. Estos cambios pueden aparecer en especies de un mismo género, pero también en géneros pertenecientes a tribus distintas, de manera convergente, como en Cereeae y Echinocereae (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2005; 2007; 2016). Otro caso ocurre en especies como *Pilosocereus leucocephalus* (Poselg.) Byles & G.D.Rowley, pertenecientes a la tribu Cereeae, las cuales fueron incluidas en algún momento en *Cephalocereus* (Echinocereae), debido a la presencia de un pseudocefalio. Estas especies se segregaron de *Cephalocereus* con base en caracteres de la flor, indicando que la región floral diferenciada (cefalio o pseudocefalio) tiene poco valor para definir grupos (Byles y Rowley, 1957).

La presente propuesta de circunscripción para el género *Cephalocereus*, incluyendo a las especies de *Neobuxbaumia* y *Pseudomitrocereus*, se apoya en un carácter del fruto: casquete persistente formado por los restos del perianto, y en un carácter anatómico: cristales prismáticos en el sistema dérmico (Terrazas y Loza-Cornejo, 2002; Tapia *et al.*, sometido). Por su parte, la pulpa blanca es un carácter casi exclusivo, el cual se comparte

únicamente con las dos especies de *Marshallocereus*, género relacionado con *Cephalocereus* (Tapia *et al.*, sometido). Estos tres caracteres, sumados a la evidencia molecular, ubican claramente a *P. fulviceps* como parte de *Cephalocereus*. Otros caracteres morfológicos han conducido a tratamientos taxonómicos disimiles, que ubican a *Cephalocereus fulviceps* dentro de géneros como *Cereus*, *Pilocereus*, *Cephalocereus*, *Mitrocereus* o *Pachycereus*. Esta controversia ha sido ocasionada debido a que presenta caracteres apomórficos en la flor (tricomas y cerdas abundantes), en el tallo (color y dimensiones), en las costillas (tamaño y forma) y en las espinas (color y consistencia), principalmente.

El análisis biogeográfico, realizado a partir de evidencias filogenéticas y de distribución, revela una compleja historia evolutiva de *Cephalocereus* (*sensu* Tapia, esta tesis), que involucra varios intercambios entre la región Neotropical y la Zona de Transición Mexicana (Morrone, 2014). Por una parte, el análisis cladístico indica una división temprana entre las especies que ocupan las regiones al norte y al sur de la Faja Volcánica Transmexicana. Este resultado es congruente con la hipótesis de una barrera geográfica, la cual está determinada posiblemente por factores como la elevación (>2500msnm) y las bajas temperaturas. Por otra parte, el análisis paramétrico es congruente con la existencia de una barrera que corre a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana, pero además ofrece detalles sobre la divergencia de las especies y la evolución de sus distribuciones. El género *Cephalocereus* parece provenir de un ancestro Neotropical, que pudo habitar en el sur de México o en Centroamérica. Los primeros eventos de dispersión condujeron a la colonización de la Sierra Madre del Sur y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, ocasionando también un evento de vicarianza entre las tierras bajas del Istmo de Tehuantepec y la Sierra Madre del Sur. Distintos eventos de dispersión y vicarianza condujeron a la colonización de la Sierra Madre Oriental, por un lado, mientras otros eventos de dispersión, desde el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, permitieron la colonización de la Cuenca del Balsas, la Costa Pacífica Mexicana y, secundariamente, de la Sierra Madre del Sur. Los trabajos biogeográficos anteriores sobre cactáceas columnares son escasos y sus aportaciones son de tipo narrativo, más que analítico. Estos trabajos carecen de datos cuantitativos para realizar pruebas de hipótesis y se basan primordialmente en la descripción de las distribuciones y en suposiciones que no están sujetas a verificación (*e.g.* Gibson y Horak, 1978).

El estudio sistemático que se realizó sobre este grupo ha conducido a formular afirmaciones sustentadas en datos y en análisis explícitos. En primer lugar, cabe resaltar que los patrones de espinación contienen información útil para identificar y/o delimitar especies dentro del género y que este modelo podría replicarse en otros grupos de Cactaceae. Por otra parte, el análisis filogenético indicó la necesidad de integrar a *Neobuxbaumia* y a *Pseudomitrocereus* como parte de *Cephalocereus*, considerando tanto la información molecular como la estructural. Finalmente, la divergencia de las especies de *Cephalocereus* ha involucrado distintos eventos de expansión y fragmentación de la distribución, donde sobresalen la Sierra Madre del Sur y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán por su diversidad de especies y por su participación en la colonización de amplias áreas al sur y al norte de la Faja Volcánica Transmexicana. Futuros estudios podrían abordar aspectos evolutivos a nivel poblacional (filogeografía), así como procesos no dicotómicos de especiación, que pudieron haber actuado sobre especies taxonómicamente conflictivas como *C. fulviceps*.

Literatura citada

- Anderson, E.F. (2001). The Cactus Family. Timber Press, Portland, Oregon, EE.UU.
- Arias, S. y Terrazas, T. (2006). Análisis cladístico del género *Pachycereus* (Cactaceae) con caracteres morfológicos. *Brittonia* 58:197–216.
- Arias, S., Terrazas, T., Arreola-Nava H.J., Vázquez-Sánchez, M. y Cameron, K.M. (2005). Phylogenetic relationships in *Peniocereus* (Cactaceae) inferred from plastid DNA sequence data. *Journal of Plant Research* 118:317–328. doi: 10.1007/s10265-005-0225-3
- Arias, S., Terrazas, T. y Cameron, K.M. (2003). Phylogenetic analysis of *Pachycereus* (Cactaceae, Pachycereae) based on Chloroplast and Nuclear DNA Sequences. *Systematic Botany* 28:547–557.
- Arroyo-Cosultchi, G., Terrazas, T., Arias, S. y López-Mata, L. (2007). Morfología de la semilla en *Neobuxbaumia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81:17–25.
- Arroyo-Cosultchi, G., Terrazas, T., Arias, S. y López-Mata, L. (2010). Delimitación de *Neobuxbaumia mezcalaensis* y *N. multiareolata* (Cactaceae) con base en análisis multivariados. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 86:53–64.

- Backeberg, C. (1938). Cactaceae - Systematic synopsis. Blätter für Kakteenforschung/
Bulletin of Cactus Research, 4.
- Backeberg, C. (1960). Die Cactaceae: Handbuch der Kakteenkunde, Band IV, Veb
Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Bárcenas-Argüello, M.L. (2006). Filogenia del género *Cephalocereus* Pfeiff. (Cactaceae)
sensu Anderson con base en caracteres estructurales. Tesis. Texcoco, México.
- Bárcenas R.T., Yesson C., y Hawkins J.A. (2011). Molecular systematics of the
Cactaceae. *Cladistics* 27:470–489.
- Barthlott, W. y Hunt, D.R. (1993). Cactaceae. In *The Families and Genera of Vascular
Plants*, Vol. 2 (Kubitzki K, Rohwer G, Bittrich V eds.) Springer-Verlag, Berlin.
- Bravo-Hollis, H. (1978). Las Cactáceas de México, vol. I, Segunda. Universidad
Nacional Autónoma de México, México, DF.
- Bravo-Hollis, H., Scheinvar, L. y Sánchez-Mejorada, H. (1970). Estudio comparativo
del género *Neobuxbaumia* Backeberg I. Cactáceas y suculentas mexicanas
15:75–80.
- Bravo-Hollis, H., Scheinvar, L. y Sánchez-Mejorada, H. (1971a). Estudio comparativo
del género *Neobuxbaumia* Backeberg II. Cactáceas y suculentas mexicanas
16:3–14.
- Bravo-Hollis, H., Scheinvar, L. y Sánchez-Mejorada, H. (1971b). Estudio comparativo
del género *Neobuxbaumia* Backeberg III. Cactáceas y suculentas mexicanas
16:75–82.
- Bravo-Hollis, H., Scheinvar, L. y Sánchez-Mejorada, H. (1973). Estudio comparativo del
género *Neobuxbaumia* Backeberg IV. Cactáceas y suculentas mexicanas 18:59–
67.
- Byles, R.S. y Rowley, G.D. (1957). *Cactus and Succulent Journal of Great Britain*
19(3):67.

- Dawson, E.Y. (1948). New cacti of Southern Mexico. Allan Hankook Foundation, Occasional Paper 1-2:1-23.
- Dawson, E.Y. (1952a). Field observations on some cacti of Oaxaca and Puebla, Mexico. *Desert Plant Life* 24(3):53-58.
- Dawson, E.Y. (1952b). Notes on *Neobuxbaumia*. *Cactus and Succulent Journal* (Los Angeles) 24(6):167-173.
- Gibson, A.C. y Horak, K.E. (1978). Systematic Anatomy and Phylogeny of Mexican Columnar Cacti. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65:999-1057.
- Gibson, A.C. y Nobel, P. (1986). *The cactus primer*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.
- Guzmán-Cruz, U., Arias, S. y Dávila, P. (2003). *Catálogo de Cactáceas Mexicanas*. UNAM, CONABIO, México, DF.
- Hunt, D.R. (1999). CITES Cactaceae Checklist. Royal Botanic Gardens Kew / International Organization for Succulent Plant Study, England.
- Hunt, D.R. y Taylor, N.P. (1986). The genera of Cactaceae: towards a new consensus. *Bradleya* 4:65-78.
- Hunt, D.R. y Taylor, N.P. (1990). The genera of Cactaceae: Progress towards consensus Report of the IOS Working Party, 1987-90. *Bradleya* 8:85-107.
- Hunt, D.R., Taylor, N.P. y Charles G. (2006). *The New Cactus Lexicon*. dh Books.
- Lau, A. (1994). *Neobuxbaumia sanchezmejoradae* Lau. *Cactáceas y suculentas mexicanas* 39:3-8.
- Metzing, D. y Kiesling, R. (2008). The Study of Cactus Evolution: The Pre-DNA Era. *Haseltonia*, 14:6-25.

- Morrone, J.J. (2014). Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistics* 30:202–214.
- Sánchez, D., Arias, S. y Terrazas, T. (2014). Phylogenetic relationships in *Echinocereus* (Cactaceae, Cactoideae). *Systematic Botany* 39:1183-1196.
- Scheinvar, L. y Sánchez-Mejorada, H. (1990). *Neobuxbaumia squamulosa* Scheinvar et Sanchez Mejorada sp. Nov. *Cactáceas y suculentas mexicanas* 35:13–18.
- Scheinvar, L., Toledo, J.A. y Sánchez-Mejorada, H. (1976). Algunas técnicas de taxonomía numérica aplicada ao gênero *Neobuxbaumia* Backeb. emend Daws. *Buxbm. Hoehnea* 6:55–94.
- Tapia, H.J., Arias, S., Yáñez-Espinosa, L. y Terrazas, T. (2016). El uso de espinas del tallo en la identificación de las especies de *Neobuxbaumia* (Cactaceae). *Revista mexicana de biodiversidad* 87:288–300. doi: 10.1016/j.rmb.2016.04.006
- Tapia, H.J., Arias, S., Bárcenas-Argüello, M.L. y Terrazas, T. (sometido). Does *Neobuxbaumia* belong to *Cephalocereus*? A phylogenetic analysis and taxonomic assessment based on molecular and morphological evidence.
- Terrazas, T. y Loza-Cornejo, S. (2002). Phylogenetic Relationship of Pachycereeae: A Cladistic Analysis based on Anatomical-Morphological Data. In: Fleming, T.H. y Valiente-Banuet, A. (eds) *Columnar Cacti and their mutualists: Evolution, Ecology, and Conservation*. The University of Arizona Press.
- Vázquez-Sánchez, M., Terrazas, T. y Arias, S. (2005). Morfología y anatomía del cefalio de *Cephalocereus senilis* (Cactaceae). *Anales del Jardín Botánico Madrid* 62:153–161.
- Vázquez-Sánchez, M., Terrazas, T. y Arias, S. (2007). Morphology and anatomy of the *Cephalocereus columna-trajani* cephalium: why tilting? *Plant Systematics and Evolution* 265:87–99. doi: 10.1007/s00606-007-0520-7

- Vázquez-Sánchez, M., Terrazas, T. y Arias, S. (2016). Comparative morphology and anatomy of *Backebergia militaris* (Echinocereae–Cactaceae) cephalium. *Plant Systematics and Evolution* 302:245–256. doi: 10.1007/s00606-015-1256-4
- Wiens, J.J. (2007). Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology* 56:875–878. doi: 10.1080/10635150701748506
- Wiens, J.J. y Servedio, M.R. (2000). Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences* 267:631–636. doi: 10.1098/rspb.2000.1049