



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Instituto de Biología  
Sistemática

**Sistemática de *Epithelantha* (Cactaceae)**

**TESIS**

Que para optar por el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
PRESENTA  
**DAVID ALEJANDRO AQUINO GARCÍA**

Tutor principal: Dr. Ángel Salvador Arias Montes

Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM

Comité tutor: Dr. David Sebastian Gernandt

Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM

Dr. Juan José Morrone Lupi

Facultad de Ciencias, UNAM

Cd. Mx. febrero de 2020



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

OFICIO CPCB/037/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

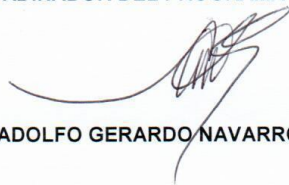
Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas, Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de noviembre de 2019, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **AQUINO GARCÍA DAVID ALEJANDRO** con número de cuenta **98264849** con la tesis titulada: "**SISTEMATICA DE EPITHELANTHA (CACTACEAE)**", realizada bajo la dirección del **DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES**, quedando integrado de la siguiente manera:

|             |   |
|-------------|---|
| Presidente: | DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO  |
| Vocal:      | DRA. ALEJANDRA CITLALLI MORENO LETELIER |
| Secretario: | DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI              |
| Suplente:   | DR. ULISES YUNUÉN ROSAS LÓPEZ           |
| Suplente    | DRA. ROSAURA GRETHER GONZÁLEZ           |

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 10 de enero de 2020.

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**

c.c.p. Expediente del alumno

**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE POSGRADO**

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX  
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

**Un gran poder conlleva una gran responsabilidad**

**Franklin D. Roosevelt**



## **Agradecimientos**

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Jardín Botánico del Instituto de Biología, instituciones a las cuales debo mi formación académica y personal a los largo de mis estudios de maestría y doctorado. A su vez, externo mi agradecimiento al CONACyT por el apoyo otorgado mediante la beca No. 263558 para sostener la manutención durante el transcurso de los estudios de doctorado.

A los miembros del comité tutor:

Por su apoyo, comentarios y sugerencias en las sesiones de tutoría durante estos ocho semestres. Sin duda alguna, cada una de las sesiones fue gratificante en cuanto al intercambio de puntos de vista y han culminado con la presentación de esta tesis.

Dr. Salvador Arias Montes por haber aceptado la propuesta inicial del proyecto y fungir como director del proyecto. Agradezco su apoyo desde el primer anteproyecto, pasando por el artículo de requisito y que concluye con la presentación de esta tesis.

Dr. David Sebastian Gernandt quien amablemente aceptó ser miembro del comité tutor, con sus sugerencias sobre el empleo de los marcadores moleculares, así como el apoyo en cuanto a la comprensión del marco teórico que se manejó en el proyecto y el apoyo para la publicación del artículo de requisito.

Dr. Juan José Morrone Lupi, como miembro del comité tutor, agradezco el tiempo invertido en las sesiones de tutoría, así como por sus críticas y observaciones sobre la comprensión de los conceptos de especie y que contribuyeron en hacer las correcciones pertinentes para concluir la presente tesis.

## **Agradecimientos a título personal**

Externo nuevamente mi agradecimiento al Jardín Botánico del Instituto de Biología y a la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradezco el apoyo del personal del Herbario Nacional de México (MEXU), en especial a la M. en C. María del Rosario García Peña por su apoyo en la búsqueda y obtención tanto de los ejemplares tipo y de los ejemplares depositados en herbarios fuera de México, de igual forma se extiende este agradecimiento al Dr. David S. Gernandt curador del herbario.

A los curadores de los herbarios consultados y a sus respectivas instituciones: José A. Villarreal (ANSM), Walter Fertig (ASU), Andrés E. Estrada-Castillón (CFNL), Andrew Salywon (DES), Rafael Fernández Nava (ENCB), George B. Hinton (GBH), Emmanuel Pérez Calix (IEB), Alan J. Paton (K), Carol A. McCormick (NCU), James Solomon (MO), Valentina Serrano Cárdenas (QMEX), Mare Nazaire (RSA-POM), José D. García Pérez (SLPM), Michael Powell (SRSC), Marcela González Álvarez (UNL) e Ingrid P. Lin (US). Gracias por el acceso a sus colecciones.

A los responsables del Laboratorio de Biología Molecular y Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud a cargo de la Dra. Lidia Cabrera y la M. en C. Laura Márquez, así como al Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad a cargo de la M. en C. Berenit Mendoza.

A los miembros del jurado: Dra. Teresa M. Terrazas Salgado, Dra. Alejandra Moreno-Letelier, Dr. Juan José Morrone Lupi, Dr. Ulises Rosas y Dra. Rosaura Grether, por sus observaciones y recomendaciones para realizar los ajustes finales a la presente tesis. Además, el punto de vista crítico de cada uno contribuirá en el enriquecimiento de cada capítulo para su posterior publicación.

Al Dr. Daniel Sánchez y la Dra. Montserrat Vázquez, por todo su apoyo en el proceso de secuenciación y análisis de datos moleculares. Al M. en C. Cristian Cervantes por apoyarme en el manejo de datos morfológicos y por su paciencia en la instrucción y manejo de la paquetería empleada en los análisis estadísticos. A la Dra. Alejandra Moreno por su apoyo en la estancia de investigación en su laboratorio para comprender el manejo de datos ambientes y por su apoyo en la

publicación del artículo correspondiente. A la Lic. Beatriz Aquino por su apoyo en la edición de las imágenes que ilustran la presente tesis.

Al M. en C. Miguel A. González-Botello, Dr. Leccinum García y Lic. Omar González-Zorzano por su apoyo en campo y por sus pláticas amenas en cuanto a lo que han conocido sobre *Epithelantha* y demás especies de cactáceas.

A la maestra Mary Yáñez y Miguel Ángel Cruz, por compartir sus conocimientos y por todas las aventuras que hemos tenido en todo este tiempo.

A los miembros del Laboratorio de Cactáceas del IBUNAM: “Don Dr.” Héctor Tapia, Daniel Quezada, David Gómez, Moisés Franco, Yolanda Morales e Isaura Rojas.

Finalmente, pero no menos importante al Dr. Salvador Arias Montes, por todo su apoyo académico incondicional durante toda la maestría y doctorado, por su confianza depositada en mi persona al invitarme en proyectos como la Flora del Bajío y Flora de Mesoamérica y por compartir sus vivencias con otros eminentes cactólogos (HBH† y HSM†) durante los viajes de campo que hemos tenido. Gracias por todo.

## **Dedicatoria**

Este trabajo está dedicado a

Mi mamá Juliana García Gaspar

Mi papá Leonor Aquino Rodríguez

Mi hermana Beatriz Aquino García

Gracias a ustedes estoy aquí una vez más.

## Índice general

|   |    |
|---|----|
| Resumen .....   | 1  |
| Abstract .....  | 2  |
| Introducción general .....  | 3  |
| Capítulo 1: Morfología de las semillas de <i>Epithelantha</i> (Cactaceae) .....   | 9  |
| Capítulo 2: Species delimitation and phylogeny of <i>Epithelantha</i> (Cactaceae) .....                                       | 32 |
| Capítulo 3: Efecto del clima y suelo para mantener la identidad de linajes en <i>Epithelantha</i> y aliados (Cactaceae) ..... | 49 |
| Conclusiones generales .....  | 78 |
| Literatura citada .....   | 80 |

## Índice de tablas y apéndices

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1.1. Media y desviación estándar (DS) calculados para las semillas de diez especies de <i>Epithelantha</i> .....  | 25 |
| Tabla 1.2. Coeficientes de correlación de Pearson calculados para cinco caracteres cuantitativos.<br>Clave de caracteres: Altura: altura de la semilla, largo: largo de la semilla, ancho: ancho de la semilla, LHILO: largo de la región hilar y AHILO: ancho de la región hilar. ....   | 26 |
| Tabla 1.3. Coeficientes de estructura canónica para cinco caracteres de la semilla. Los valores más significativos son remarcados en negritas. Clave de caracteres: Altura: altura de la semilla, largo: largo de la semilla, ancho: ancho de la semilla, LHILO: largo de la región hilar y AHILO: ancho de la región hilar .....   | 26 |
| Tabla 1.4. Distancias de Mahalanobis calculadas para cinco caracteres cuantitativos .....   | 27 |
| Tabla 1.5: Caracteres cuantitativos y cualitativos con mayor peso en los cuatro primeros componentes de acuerdo con el resultado derivado del PCA mix .....   | 28 |
| Tabla 2.1. Taxones reconocidos para <i>Epithelantha</i> de acuerdo con diferentes autores .....   | 34 |
| Tabla 2.2. Coeficientes de correlación de Pearson calculados para los caracteres cuantitativos: clave para los caracteres: SH: altura del tallo, SDIM: diámetro del tallo, Serie: número de series de espinas, SpiNu: número de espinas, USL: longitud de la espina superior, LSL: longitud de la espina inferior, LAR: largo de la areóla, WAR: ancho de la areóla, FLEn: largo de la flor ..... | 36 |
| Tabla 2.3. Coeficientes de estructura canónica para cinco caracteres cuantitativos. Caracteres más significativos remarcados en negritas .....  | 36 |

|   |    |
|---|----|
| Tabla 2.4. Caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos usados en el PCA mix para los cuatro primeros componentes (resaltados en negritas) .....  | 37 |
| Tabla 2.5. Análisis discriminante de mínimos parciales (ADMP) para 195 individuos determinados <i>a priori</i> para <i>Epithelantha</i> .....   | 38 |
| Tabla 2.6. Características de las secuencias empleadas para este estudio .....  | 39 |
| Tabla 2.7. Caracteres moleculares que permiten distinguir a las especies de <i>Epithelantha</i> .....   | 41 |
| Tabla 3.1. Coeficientes de correlación de Pearson calculados para las 19 variables bioclimáticas. La interpretación de las claves se enlista en el material suplementario 1 .....                   | 71 |
| Tabla 3.2. Promedios calculados para nueve variables bioclimáticas no correlacionadas + pH del suelo, calculadas para cada una de las terminales que integran el árbol calibrado .....              | 72 |
|   |    |
| Apéndice 1.1. Especie, país, estado, colector y herbario donde se depositaron los ejemplares de respaldo para <i>Epithelantha</i> spp. ....   | 23 |
| Apéndice 1.2. Codificación de los caracteres de la morfología seminal de <i>Epithelantha</i> spp. ....  | 24 |
|   |    |
| Apéndice 2.1: Especímenes representativos examinados para las especies de <i>Epithelantha</i> de acuerdo con nuestros resultados (especie, país, estado, colector, número de colecta y herbario). * |    |
| Especímenes usados en el análisis morfológico. Números de accesos a GenBank ( <i>petL-psbE</i> , <i>psbA-trnH</i> , <i>trnL-F</i> , <i>trnQ-rps16</i> ) .....                                       | 47 |

|  |    |
|--|----|
| Apéndice 2.2: Caracteres cuantitativos y cualitativos usados en el análisis morfológico. *Caracteres cuantitativos y cualitativos codificados para el análisis filogenético combinado (datos morfológicos + DNA). Los valores corresponden a la media .....  | 48 |
| MATERIAL SUPLEMENTARIO 3.1. Especímenes representativos para la reconstrucción de estados ancestrales en <i>Epithelantha</i> y aliados (especie, país, estado, colector, número de colecta y herbario). Número de accesos de GenBank ( <i>petL-psbE</i> , <i>psbA-trnH</i> , <i>trnL-F</i> , <i>trnQ-rps16</i> ). *—secuencia faltante ..... | 68 |
| MATERIAL SUPLEMENTARIO 3.2: Lista de variables bioclimáticas empleadas en el análisis. Se explica la clave y su significado .....  | 70 |



## Índice de figuras

- Fig. 1.1. Diagrama general de las semillas de *Epithelantha* mostrando los caracteres medidos en A) vista lateral 1: altura, 2: largo; B) vista superior 3: ancho y C) vista inferior 4: ancho de la región hilar y 5: largo de la región hilar ..... 29
- Fig. 1.2. Análisis Canónico Discriminante empleando solo caracteres cuantitativos, A) gráfica de la primera y segunda función canónica. Análisis de componentes principales con datos mixtos (PCA mix) empleando caracteres cuantitativos y cualitativos para evaluar la variación de las semillas de *Epithelantha*. B. Gráfica del primer y segundo componente. C. Gráfica del primer y tercer componente. D. Gráfica del primer y cuarto componente ..... 30
- Fig. 1.3. Morfología seminal de *Epithelantha* y aliados. A) Micrópilo y B) hilo separados en *Epithelantha* (DA305, MEXU). C) Micropilo y D) hilo separados en *Astrophytum* (DA303, MEXU). E) Microrrelieve de la pared periclinal plano en *E. cryptica* (DA 355, MEXU). F) Quilla y expansión del borde de la semilla en *E. greggii* (DA, 325 MEXU). G) Superficie lisa y microrrelieve de la pared periclinal cóncava en *E. polycephala* (DA 350, MEXU). H). Vista general de las semillas de *E. ilariae* (DA 307, MEXU). I) Microrrelieve de la pared periclinal convexo en *E. bokei* (DA 342, MEXU). J) Microrrelieve de la pared periclinal plano en *E. bokei* (DA 318, MEXU). K) Microrrelieve de la pared periclinal cóncavo y superficie rugosa en *E. pachyrhiza* (DA 305, MEXU). L) Expansión del borde de la semilla muy evidente en *E. pulchra* (DA 311, MEXU). ..... 31
- FIG. 2.1. Gráfica de las dos primeras funciones discriminantes usando caracteres vegetativos y reproductivos para los miembros de *Epithelantha* ..... 37

FIG. 2.2. Análisis de componentes principales con datos mixtos (PCA mix) empleando caracteres cuantitativos y cualitativos para los miembros de *Epithelantha*. A. Gráfica del primer y segundo componente. B. Gráfica del primer y tercer componente ..... 38

FIG. 2.3. Árbol de mayoría, obtenido por IB para para cuatro marcadores de cuatro marcadores de cpDNA. Los valores de las ramas corresponden a los valores de probabilidad posterior (izquierda) y de bootstrap (derecha). Un guion (-) indica BS < 50 ..... 40

FIG. 2.4. Árbol de mayoría, obtenido por IB para para cuatro marcadores de cuatro marcadores de cpDNA y diez caracteres morfológicos. Los valores de las ramas corresponden a los valores de probabilidad posterior (izquierda) y de bootstrap (derecha). Un guion (-) indica BS < 50..... 42

FIG. 2.5. Caracteres distintivos para reconocer a los miembros de *Epithelantha*. A. Espinas en *Epithelantha bokei* (D. Aquino 318, MEXU). B. Microfotografía de las espinas de *E. bokei* (D. Aquino 318, MEXU). C. Dimensiones de las flores de *E. cryptica* (D. Aquino 375, MEXU). D. Tallos en *E. greggii* (D. Aquino 312, MEXU). E. Tallos en *E. potosina* (D. Aquino 383, MEXU). F. Tallos en *E. polycephala* (D. Aquino 350, MEXU). G. Flores de *E. ilariae* (D. Aquino 307, MEXU). H. Espinas de *E. ilariae* (D. Aquino 323, MEXU), I. Flores de *E. micromeris* (D. Aquino 333, MEXU). J. Espinas de *E. pachyrhiza* (D. Aquino 305, MEXU). K. Espinas de *E. pulchra* (D. Aquino 309, MEXU). L. Tallos de *E. spinosior* (D. Aquino 334, MEXU). M. Microfotografías de las semillas de *E. pachyrhiza*, mostrando la expansión en el borde la región hilar (D. Aquino 305, MEXU). N. Escultura multicelular rugosa en las semillas de *E. pachyrhiza* (D. Aquino 305, MEXU). O. Escultura multicelular ausente en las semillas de *E. potosina* (D. Aquino 295, MEXU) ..... 43

Fig. 3.1. Distribución de *Epithelantha* y aliados, basado en registros georreferenciados para este trabajo ..... 73

|  |    |
|--|----|
| Fig. 3.2. Árbol calibrado para <i>Epithelantha</i> y géneros aliados (Tribu Cactaeae, Cactaceae) aplicando inferencia Bayesiana. Los valores en negritas y cursivas sobre las ramas corresponden a los valores de probabilidad posterior y los valores en cursivas sobre los nodos indican la edad aproximada de divergencia ..... | 74 |
| FIG. 3.3. Reconstrucción de estados ancestrales para cuatro variables ambientales con señal filogenética .....   | 75 |
| FIG. 3.4. Reconstrucción de estados ancestrales para tres variables ambientales cuya señal filogenética no es significativa .....  | 76 |
| FIG: 3.5. Distribución las especies de <i>Epithelantha</i> , basado en registros georreferenciados para este trabajo .....   | 77 |

## Resumen

*Epithelantha* es un género en donde el número de especies, la monofilia y relaciones filogenéticas son motivo de discusión. Se exploraron caracteres micromorfológicos (cualitativos y cuantitativos) de la semilla, se encontró que existen diferencias entre las especies putativas, siendo los caracteres más significativos el largo de la semilla, largo del hilo, presencia de quilla, la expansión del borde de la semilla y el relieve de la pared periclinal. Un estudio filogenético posterior con base en caracteres morfológicos y moleculares fue desarrollado, se analizaron nueve caracteres cuantitativos, empleando el análisis canónico discriminante (ACD) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados-parciales (AMC-P) y siete cualitativos, que en conjunto con los caracteres cuantitativos fueron analizados con el análisis de componentes principales con datos mixtos (PCA mix). Se emplearon cuatro regiones de cpDNA (*petL-psbE*, *psbA-trnH*, *trnL-F* y *trnQ-rps16*), las cuales se analizaron con inferencia Bayesiana (IB) y máxima verosimilitud (MV). El análisis morfológico permite el reconocimiento de nueve de once taxones nominales. Con las secuencias de cpDNA + morfología se reconocieron diez de once taxones, además se corroboró la monofilia del género, en tanto que *Turbinicarpus* es el género hermano. Para conocer el efecto del clima y suelo como factores para mantener la identidad de linajes en *Epithelantha* y aliados, se hizo reconstrucción de estados ancestrales con datos climáticos y pH. A la par, se realizó una prueba chi-cuadrada para analizar la frecuencia de los taxones por el tipo de suelo y geoformas. *Epithelantha* diversificó en suelos con pH entre 7.48-8-03, siendo más frecuentes en kastanozems háplicos y sistemas de piedemonte. Se concluye que la congruencia entre tres fuentes de información (morfología, cpDNA y barreras físico-ecológicas) permite proponer hipótesis más robustas para el reconocimiento de diez especies.

Palabras clave – Delimitación de especies, estadística multivariada, reconstrucción filogenética, reconstrucción de estados ancestrales.

## Abstract

*Epithelantha* is a genus where the number of species, monophyly and phylogenetic relationships are the subject of discussion. Seed micromorphological characters (qualitative and quantitative) were explored, and it was found that there are differences between the putative species, and that the most significant characters are seed length, hylum length, keel, expansion of the edge of the seed and the relief of the periclinal wall. A subsequent phylogenetic study based on morphological and molecular characters was carried out. Nine quantitative characters were analyzed using discriminant canonical analysis (DCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). The quantitative characters were combined with seven qualitative characters and analyzed with principal components analysis with mixed data (PCA mix). Four cpDNA sequences (*petL-psbE*, *psbA-trnH*, *trnL-F* and *trnQ-rps16*) were analyzed with Bayesian inference (BI) and maximum likelihood (ML). The morphological analysis allows the recognition of nine out of eleven nominal taxa, with the sequences of cpDNA and morphology ten of eleven taxa were recognized, and the monophyly of the genus was corroborated, with *Turbinicarpus* identified as the sister genus. To investigate the effect of climate and soil as factors to maintain the identity of lineages in *Epithelantha* and allies, ancestral state reconstruction with climatic data and pH was performed, and at the same time, a chi-square test was used to analyze the frequency of taxa by soil type and geoform. *Epithelantha* diversified in soils with pH between 7.48-8.03, being more frequent in haplic kastanozems and piedmont. The congruence between the three sources of information (morphology, cpDNA, physical-ecological barriers) allows us to propose more robust hypotheses for the recognition of ten species.

Keywords – Species delimitation, multivariate statistics, phylogenetic reconstruction, ancestral states reconstruction.

## Introducción general

Una de las tareas de la sistemática es identificar, clasificar y nombrar especies (Morrone, 2013). La necesidad de nombrar a los taxones tiene fines que van desde comprensión de mecanismos y procesos evolutivos, hasta el aprovechamiento de organismos con fines de investigación biotecnológica o de importancia comercial, así como aquellas que se encuentran listadas en alguna categoría de riesgo (Yesson et al. 2011; Frankham et al. 2012; Rannala 2015). Más recientemente, la necesidad de identificación de las especies se requiere para tener la oportunidad de ser incluidos en una lista de especies en peligro de extinción y de aplicar programas de conservación (Pante et al. 2015). Wiens (2007) define la delimitación de especies como un proceso que permite determinar las fronteras (o límites) de las especies y al mismo tiempo permite el descubrimiento de nuevas especies. De acuerdo con Frankham et al. (2012), este proceso se ha visto obstaculizado por el considerable número de conceptos de especies (hasta 26 según Crisci 1994). Una falta de consenso en cuanto a qué es una especie ocasionará el pobre desarrollo de métodos que permitan una identificación objetiva (Rannala 2015), por lo que Luckow (1995) sugiere señalar qué propiedades emergentes se están abordando para la resolución del conflicto de límites. El impulso de los estudios de delimitación de especies se debe a la aceptación del concepto general de especies (De Queiroz 2005), el cual propone que a partir de un elemento común que es un linaje, se pueden evaluar distintos atributos emergentes (morfología, flujo génico y aislamiento reproductivo, entre otros). No existe un método estandarizado para delimitar especies bajo el concepto general. Reeves y Richards (2010) proponen analizar datos genéticos y morfológicos para explicar problemas intrínsecos relacionados con los factores que han formado al linaje, al mismo tiempo, es necesario evaluar cuáles son los factores extrínsecos que han de mantener la identidad del linaje (Flores-Rentería et al. 2013). Schlick-Steiner et al. (2010) consideran que el uso de múltiples disciplinas

para resolver problemas taxonómicos ayuda a evitar fallas inherentes a disciplinas utilizadas de forma individual y aumenta el rigor en la delimitación de especies. Además, ante la eventual diferencia entre los resultados obtenidos entre las fuentes empleadas, Padial y De La Riva (2010) consideran que la explicación de esta discordancia se puede abordar desde la perspectiva evolutiva particular del linaje en estudio. Conix (2018) considera que la clave es tener una buena elección del atributo que se analiza y se evalúa si hay coherencia en las observaciones obtenidas. La delimitación de especies como disciplina se mantendrá vigente gracias al desarrollo de nuevas fuentes de información y modelos más apegados a los datos observados, así como mayor capacidad de los equipos de cómputo para su análisis. Es por ello que se han descrito nuevos métodos, incluso métodos existentes se han actualizado con nuevos conjuntos de datos y/o aplicaciones para descubrir y describir nuevas especies (Sites Jr. y Marshall 2003; Camargo y Sites Jr. 2013).

### **La delimitación de especies en Cactaceae**

No hay un consenso en cuanto al número de especies que integran la familia Cactaceae. Hunt et al. (2006) reconocen hasta 1438, mientras que Nyffeler y Eggli (2010) reconocen 1850. Por esta razón, se ha despertado el interés por corroborar, conocer y establecer límites entre las especies de Cactaceae. Numerosos estudios se basan en atributos morfológicos (Schmalzel et al. 2004; Sánchez et al. 2013; Martínez, 2016; Tapia et al. 2016; Vázquez-Benítez et al. 2016; Cervantes 2017). El empleo de la morfología es la base para la identificación de los organismos, de la cual depende la creación previa de un sistema de especies reconocidas (clasificación), lo cual se logra por medio de la cuantificación de estructuras como pueden ser hojas, flores, tallos, raíces (Remagnino et al. 2017). El conocimiento de la morfología tiene aplicaciones no solo en la sistemática, también se ha empleado en la agronomía e incluso ha servido para modelar el cambio

climático (Cope et al. 2012). No obstante, una de las críticas sobre el uso de la morfología es el eventual número limitado de caracteres, dificultad para obtener estructuras reproductivas, además de que no se pueden detectar especies crípticas (Agapow et al. 2004, Duminil y Di Michele 2009). Aun así, las diferencias en la forma y tamaño pueden indicar diferentes papeles funcionales, aun cuando se trate de la misma estructura (Zelditch et al. 2004). En la delimitación de especies con datos morfológicos se ha empleado la estadística multivariada, cuyas herramientas han permitido la resolución de complejos de especies en Cactaceae, gracias a que es posible la detección de incompatibilidad de caracteres entre taxones previamente tratados como una especie, se muestran cuáles son los caracteres de mayor peso en el análisis (Manly 1986; Baylac et al. 2003; Arroyo-Cosultchi et al. 2010). Una segunda herramienta es el empleo de la morfometría geométrica, que permite el análisis de los cambios generales en la forma mediante el uso de puntos de referencia en estructuras homólogas y que, por lo tanto, la forma de determinadas estructuras no obedece al azar (Castillo 2015; Schwarzfeld y Sperling 2014). Recientemente, se ha propuesto el análisis de la disposición de las espinas en las aréolas en Cactaceae, ya que estas siguen una sucesión de Fibonacci y, por lo tanto, al ser un carácter conservado y homólogo puede ser empleado en un método estandarizado para identificar especies (Tapia et al. 2016; Cervantes 2017).

El empleo de secuencias de DNA en trabajos de delimitación de especies en Cactaceae es el más limitado (Korotkova et al. 2011; Pérez et al. 2016). Las secuencias de DNA son mucho más versátiles en cuanto a hipótesis que se quieren poner a prueba. De acuerdo con Reeves y Richards (2010), la delimitación de especies con caracteres moleculares busca discernir patrones en datos consistentes con la evolución a lo largo del linaje. Por medio de secuencias de DNA ha sido posible inferir niveles de flujo génico, procesos de hibridación, resolver relaciones filogenéticas entre las posibles especies y descubrir especies crípticas (Bickford et al. 2007; Yang y Rannala, 2010). El



uso de secuencias de ADN ha proporcionado información útil para conocer las relaciones filogenéticas y en consecuencia la clasificación de Cactaceae, proporcionando caracteres independientes que pueden intentar inferir las relaciones evolutivas (Gorelick 2002). La utilidad de identificación de especies con DNA en Cactaceae depende de la dinámica mutacional de la región genómica en cuestión y del número de mutaciones por nucleótido secuenciado (Korotkova et al. 2011). El uso exclusivo de secuencias de DNA enfrenta problemas teóricos, al no considerar que la especiación haya ocurrido de forma reticulada, que hayan ocurrido eventos de diversificación rápida y reciente o que sean organismos clonales (Hughes y Eastwood 2006, Rieseberg y Willis 2007; Velasco 2009). En Cactaceae, se ha reportado que el uso de marcadores moleculares para delimitación de especies puede no ser efectivo debido al sorteo incompleto de linajes (Aquino 2014). Además, se debe considerar que al igual que en las demás familias vegetales, la tasa de mutación no es constante, por lo tanto, la capacidad de discriminación de las secuencias no siempre es efectiva (Taberlet et al. 2007).

Sólo cinco estudios sobre delimitación de especies conjuntan dos y hasta tres líneas de evidencia (Helsen et al. 2009; Harage et al. 2011; Porter et al. 2012; Baker y Butterworth 2013; Alvarado-Sizzo et al. 2018). Cabe mencionar que, bajo esta perspectiva, autores como Schlick-Steiner et al. (2010) apoyan la inclusión de la morfología junto con disciplinas que revelen información a partir de datos genéticos, por lo que son necesarios estudios de delimitación de especies con mayor número de atributos, dado que ahora se reconoce ampliamente que la integración de varias líneas de evidencia es la forma más eficiente y teóricamente fundamentada para delimitar especies (Pante et al. 2015). Además, la eventual discordancia entre los marcadores genéticos y morfológicos, puede ser resultado de una falta de revisión exhaustiva, por lo tanto, al no

tener una clara diferenciación morfológica, queda en duda el reconocimiento de especies crípticas (Ikabanga et al. 2017).

El uso exclusivo de secuencias de DNA está regresando a la delimitación de especies al antiguo enfoque tipológico de un sistema de un solo carácter (Will et al. 2005). Si bien, el uso de una sola fuente de información es válido, pues técnicas de identificación de especies como el código de barras de la vida, el cual se fundamenta en la identificación de organismos con base a una combinación de loci (CBOL Plant Working Group 2009). Por ello, Simpson (1951) al proponer el concepto evolutivo de especie, al definir a la especie como un linaje filético (secuencia ancestral descendiente de poblaciones entrecruzadas) que evoluciona independientemente de los demás, con sus propias tendencias evolutivas. Por ello, elementos como el aislamiento reproductivo o limitantes ecológicas, pueden ser considerados como factores que le dan identidad a un linaje, por lo que este concepto debe ser considerado como un precedente al concepto general de De Queiroz (2005). Por lo anterior, además de la morfología y DNA, otra fuente de información útil como herramienta es el modelado de nicho. Van Valen (1976) define a la especie como un linaje que ocupa un nicho ecológico diferente a otros linajes con zonas adaptativas diferentes. De acuerdo con Wilkins (2009), este concepto describe lo que es una especie de forma parcial, pero reconoce que puede ser complementario de otros conceptos. Por lo que Raxworthy et al. (2007) argumentan que el uso del modelado de nicho en la delimitación de especies puede proporcionar evidencia de aislamiento geográfico entre poblaciones (ya sea con nichos ecológicos conservados o divergentes), a su vez, al comprobar que los linajes ocupan nichos diferenciados, esta condición ayudará a mantener la identidad del linaje (Reeves y Richards 2010). En un ejemplo práctico, Alvarado-Sizzo et al. (2018) reforzaron su hipótesis de ausencia de flujo génico entre miembros del complejo *Stenocereus*

*griseus*, debido a barreras biogeográficas y a su vez, cada linaje identificado se establecía bajo una condición única de nicho.

*Epithelantha* F.A.C. Weber ex Britton & Rose (Cactaceae) es un género en el que el número de especies, así como su posición filogenética es motivo de discusión (Hernández-Ledesma et al. 2015). Por ello, esta investigación tiene como objetivo general realizar un estudio que ponga a prueba cuales especies se deben reconocer, cuáles son sus relaciones filogenéticas y conocer sus patrones de distribución. Los objetivos particulares son: explorar y evaluar con base en evidencias morfológicas (estadística multivariada) y moleculares (inferencia Bayesiana-IB y Máxima Verosimilitud-MV), la circunscripción de las especies que integran a *Epithelantha*, a la par, corroborar si *Epithelantha* es un grupo monofilético y cuál es su grupo hermano utilizando secuencias de cpDNA, en conjunto con los caracteres morfológicos estadísticamente significativos (IB y MV). Finalmente, conocer qué factores ambientales explican la distribución actual del género, así como poner a prueba la congruencia entre las variables ambientales con respecto a las especies delimitadas con morfología y cpDNA.

## **Capítulo 1**

### **Morfología de las semillas de *Epithelantha* (Cactaceae)**

D. Aquino, D. Sánchez, D. Gómez, Y. Morales, S. Arias

En preparación

La morfología de las semillas se ha documentado ampliamente en Cactaceae. Barthlott y Hunt (2000) mencionan que, gracias al empleo del microscopio electrónico de barrido ha sido posible documentar hasta 25 caracteres con potencial taxonómico y filogenético, pues al igual que en otras familias botánicas, la morfología de las semillas ha proporcionado conjuntos de caracteres relativamente estables, debido a la poca influencia de los factores ambientales y por lo tanto, son útiles para estudios comparativos en todos los niveles de la jerarquía taxonómica (Davitashvili y Karrer 2010; Mezzonato-Pires et al. 2017). Las propuestas de clasificación en Cactaceae se han basado en parte a características particulares de la semilla (Elizondo et al 1994). Kiel y McDade (2014) apoyan la inclusión de caracteres morfológicos seminales, pues se ha probado que son útiles en filogenias moleculares para la resolución de clados y además es posible comprender procesos evolutivos (Ghimire et al. 2016). El empleo de la morfología de las semillas es parte fundamental de las propuestas de categorías taxonómicas en la familia. Taylor y Clark (1983), así como Gaetzle y Presté (1986), fundamentan sus propuestas de clasificación infragenérica con base en caracteres seminales. El valor filogenético y la capacidad para reconocer a las especies permiten el uso de los caracteres de las semillas en sistemática, ejemplo de ello es el realizado en *Pachycereus* (A. Berger) Britton & Rose (Arias y Terrazas 2003), *Stenocereus* (A. Berger) Riccob. (Arroyo-Cosultchi et al. 2006), *Neobuxbaumia* Backeb. (Arroyo-Cosultchi et al. 2007), *Lophophora* (Šnicer et al. 2009) y *Strombocactus* (Arias y Sánchez-Martínez 2010).

*Epithelantha* F.A.C.Weber ex Britton & Rose es un género que comprende plantas con tallos globosos a cilíndricos, simples a ramificados, raíces adelgazadas a engrosadas, espinas presentes y dispuestas en dos o más series; flores de color blanco, rosado a amarillo que emergen en la zona apical del tallo; frutos de color rojo y semillas negras con lustre (Bravo-Hollis y Sánchez-

Mejorada 1991; Anderson 2001; Donati y Zanovello 2011). Su distribución abarca principalmente el Desierto Chihuahuense, en los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y San Luis Potosí en México, así como en Arizona y Texas en Estados Unidos (Hernández y Gómez-Hinostrosa 2011). Estudios sistemáticos recientes apoyan la monofilia del género y además se ha propuesto una nueva circunscripción de especies reconociendo diez taxones (Capítulo 2 de la presente tesis, Aquino et al. 2019). La morfología de la semilla en *Epithelantha* solo se ha documentado para *E. micromeris* (Engelm.) Britton & Rose (Barthlott y Hunt 2000). Aquino et al. (2019), exploraron parcialmente los caracteres presentes en la semilla como apoyo para la delimitación de especies que integran a *Epithelantha*. Es por ello que, el objetivo de este manuscrito es hacer una descripción más detallada de las semillas de las especies que conforman a *Epithelantha* y analizar la resolución de los caracteres tanto cuantitativos como cualitativos para identificar especies.

### **Material y métodos**

Se recolectaron semillas correspondientes a *Epithelantha bokei* L.D. Benson, *E. cryptica* D. Donati & Zanov., *E. greggii* (Engelm.) Orcutt, *E. ilariae* D. Donati & Zanov., *E. micromeris* (Engelm.) Britton & Rose, *E. pachyrhiza* (W.T. Marshall) Backeb., *E. polycephala* Backeb., *E. potosina* (D. Donati & Zanov.) Aquino & S. Arias, *E. pulchra* (D. Donati & Zanov.) Aquino & S. Arias y *E. spinosior* C. Schmoll (Aquino et al. 2019). Las semillas fueron obtenidas de ejemplares bajo resguardo de la colección de cactáceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM (Apéndice 1).

**Obtención y análisis de imágenes** – Se fotografiaron 20 semillas por cada localidad (Apéndice 1), con el apoyo de un microscopio Olympus SZ-61, con una cámara acoplada Infinity1. Sobre cada fotografía se realizaron las mediciones, utilizando el analizador de imágenes Infinity

Analyze and Capture 6.5.6 (Lumenera 2017). Se midieron cinco caracteres cuantitativos: altura, largo y ancho, así como el largo y ancho de la región hilar (Fig. 1).

Para la observación de los caracteres del microrrelieve de la testa, se seleccionaron seis semillas para observarlas en el microscopio electrónico de barrido. El tratamiento para eliminar el mucílago consistió en limpiar con una solución de 100 ml de agua a la que se adicionaron 10 gotas de detergente biológico Tween, a 70 °C aproximadamente y mantenerlas en agitación durante 10 minutos. Posteriormente, con un limpiador ultrasónico Branson 200, se retiró la mayor cantidad de mucílago adherido por 5 minutos. Una vez secas se montaron seis semillas por cada localidad (Apéndice 1), dos en posición lateral, dos en posición posterior y dos mostrando la región hilo-micropilar en un portamuestras de aluminio, las semillas se sujetaron con una cinta de carbón de doble cara y se recubrieron con oro a un grosor de 2  $\mu\text{Å}$  con un evaporador Quorum modelo Q150R ES. El montaje y la observación de las semillas se realizaron en el Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad (UNAM). Las semillas fueron observadas con un Microscopio Electrónico de Barrido Hitachi SU1510, en donde se fotografiaron cuatro en posiciones: vista general, vista superior, acercamiento de la testa y vista de la región hilo-micropilar. Los caracteres cualitativos tomados en cuenta hacen alusión a la apariencia (expansión próximo a la región hilar, quilla en la parte superior de la semilla), pared periclinal (microrrelieve y superficie) y región hilar (configuración).

**Análisis estadísticos** – Para los caracteres cuantitativos se calculó el Coeficiente de correlación de Pearson (CCP), para detectar los caracteres que presentaban correlación, tanto positiva como negativa y que, por lo tanto, pueden sobrestimar el resultado (Walpole et al. 2012). Los caracteres no correlacionados fueron analizados con el Análisis Canónico Discriminante (ACD), donde cada variable es ponderada de acuerdo con su capacidad de discriminar (McGarigal

et al. 2000), posteriormente se calcularon las distancias de Mahalanobis, en tanto que la significancia se estimó mediante la prueba de distancias de Fisher (Martínez 2016). La segunda prueba implica el análisis conjunto de los caracteres cuantitativos y cualitativos, por lo que se utilizó el Análisis de Componentes Principales con datos mixtos (PCA mix, Chavent et al. 2014). Solo los caracteres cualitativos fueron tratados como estados de carácter, la codificación se detalla en el Apéndice 2. El cálculo de los promedios y desviación estándar, junto con el ACD y el PCA mix se realizaron RStudio 1.1.447 (RStudio Team, 2018) ejecutado en R 3.5.0 (R Development Core Team 2008). El cálculo de las distancias de Mahalanobis y la prueba de distancias de Fisher se realizaron en XLStat (Addinsoft SARL 2000).

## Resultados

**Características de las semillas** – Todas las semillas de *Epithelantha* son de color negro. La apariencia incluye una quilla en la parte superior de la semilla. Dicha estructura está presente en *E. bokei*, *E. greggii*, *E. micromeris*, *E. parvula*, *E. potosina* y *E. pulchra* y ausente en *E. cryptica*, *E. ilariae*, *E. polycephala* y *E. spinosior*. Existen dos apéndices próximos a la región hilar, que pueden ser expandidos (*E. greggii*, *E. pachyrhiza*, *E. polycephala* y *E. spinosior*) a muy expandidos (*E. cryptica*, *E. ilariae*, *E. micromeris* y *E. pulchra*). En *E. bokei* y *E. potosina*. Estos apéndices están ausentes y en raras ocasiones los apéndices son muy reducidos. Se observaron dos caracteres de la pared periclinal, el primero es la superficie que puede ser de dos tipos: lisa en siete especies (*E. bokei*, *E. cryptica*, *E. greggii*, *E. micromeris*, *E. polycephala*, *E. potosina* y *E. spinosior*). Las tres especies restantes poseen paredes periclinales rugosas (*E. ilariae*, *E. pachyrhiza* y *E. pulchra*). El segundo carácter corresponde microrrelieve de la pared periclinal, que puede ser de tres tipos: plano (*E. cryptica*, *E. micromeris*, *E. polycephala*, *E. pulchra* y *E. spinosior*), cóncavo (*E. greggii*, *E.*



*ilariae*, *E. pachyrhiza* y *E. potosina*), o convexo – plano (*E. bokei*). Se observó que en la configuración de la región hilar el micrópilo es disyunto, característica presente en las 10 especies.

**Análisis estadísticos** – A partir de los valores de la media del largo de las semillas (Tabla 1), se determinó que el largo de las semillas de *E. pachyrhiza* tienen en promedio 0.839 mm (muy pequeñas, según Barthlott y Hunt 2000), en tanto que las semillas de las demás especies (*E. bokei*, *E. cryptica*, *E. greggii*, *E. ilariae*, *E. micromeris*, *E. polycephala*, *E. potosina*, *E. pulchra* y *E. spinosior*) son de tamaño medio, ya que el promedio va de 1.110 mm en *E. pulchra* a 1.403 mm en *E. ilariae*.

El análisis de CCP (Tabla 2), indica que no hay correlación entre las variables (Dormann et al. 2013). Se analizaron los cinco caracteres cuantitativos en conjunto aplicando el ACD, la primera función canónica explica 59.78% de la variación, donde el carácter de mayor peso fue el largo de la semilla; la segunda función canónica explica 34.67% de la variación, siendo el carácter de mayor peso el largo del hilo. El 5.58% restante se distribuye entre las funciones 3 a la 5 (Tabla 3). La Figura 2A corresponde a la gráfica de la primera y segunda función canónica. Sobre el extremo derecho de los valores positivos de la primera función canónica se ubican los individuos cuyo valor promedio del largo es de 0.839 mm (p. ej. *E. pachyrhiza*), mientras que en el extremo opuesto son discriminados los individuos cuyo valor promedio es de 1.403 mm (p. ej. *E. ilariae*). Sobre el extremo superior de la función canónica son discriminados los individuos cuyo valor promedio del largo del hilo va de 0.713 mm a 0.741 mm y hasta 0.833 mm, mientras que en el extremo inferior se discriminan individuos con valor promedio de 1.121 mm (*E. polycephala*). La prueba de Fisher es significativa ( $P < 0.0001$ ), por lo que las distancias de Mahalanobis indican que sí existen diferencias en las distancias entre las nubes (Tabla 4).

El PCA mix se realizó con cinco caracteres cuantitativos y cuatro cualitativos, se encontró que los cuatro primeros componentes explican 61.42% de la variación observada (Tabla 5), en tanto que 38.54% de la variación restante se distribuye entre los componentes cinco al once. La Figura 2B corresponde a la gráfica del primer (21.10%) y segundo componente (15.21%). El carácter con mayor peso en el primer componente es la quilla, en el extremo de los valores positivos se posicionan los individuos cuyas semillas no presentan quilla (*E. ilariae*, *E. polycephala* y *E. spinosior*), en el extremo de los valores negativos se ubican aquellos individuos con presencia de quilla (p. ej. *E. bokei*, *E. pachyrhiza*). Sobre el eje del segundo componente, hacia los valores positivos, se ubican los individuos cuyos apéndices son expandidos (p. ej. *E. polycephala*) y hacia el extremo inferior con valores negativos, se ubican los individuos con apéndices muy expandidos (p. ej. *E. ilariae*, *E. pulchra*). La Figura 2C corresponde a la gráfica del primer y tercer componente (12.79%), en donde el carácter con mayor peso en el tercer componente es el tipo de microrrelieve. En el extremo superior de valores positivos se ubican los individuos cuyo relieve es convexo (*E. bokei*) y hacia el extremo inferior negativo se observan a los individuos cuyas semillas presentan relieves cóncavos (P. ej. *E. pachyrhiza*).

## Discusión

La morfología de las semillas de *Epithelantha* es diversa y se caracteriza por la disyunción del hilo con respecto al micrópilo (Figs. 4A-B). Este carácter es compartido con *Astrophytum* (Figs. 4C-D), otro miembro de la tribu Cactaeae, que representa uno de los primeros linajes que divergieron en la tribu, mientras que *Epithelantha* se resuelve en un clado que ha diversificado recientemente con respecto a *Astrophytum* (Vázquez-Sánchez et al. 2013). Se ha encontrado que los caracteres de la semilla son relevantes para explicar la evolución de Cactaceae. Ríos (2017) menciona que la

presencia de determinadas estructuras indica distintas rutas de desarrollo y que, tras un ejercicio de reconstrucción de estados ancestrales, reflejaría la historia evolutiva en cuestión. El arilo se caracteriza por la disyunción del hilo y el micropilo lo que tiene implicaciones filogenéticas, pues es posible que sea el estado ancestral del core Cactoideae (Ríos 2017). Este carácter está presente en las semillas de *Epithelantha*, por lo que una nueva pregunta es analizar qué genes se ven involucrados en el desarrollo del arilo y si son únicos para *Epithelantha*.

En la revisión de las descripciones de las especies de *Epithelantha* (Bravo-Hollis 1951; Backeberg 1954; Donati y Zanovello 2010), no se menciona la micro-morfología de las semillas como caracteres diagnósticos. Texeira et al. (2013) explica que los caracteres diagnósticos de la semilla cobran mayor relevancia cuando son estadísticamente significativos. De acuerdo con el ACD, el largo de la semilla y el largo del hilo son los caracteres más significativos, en tanto que para el PCA mix, la presencia de quilla, el tipo de apéndices y el tipo de microrrelieve son los caracteres de mayor peso. *Epithelantha micromeris* y *E. cryptica* son especies cuya longitud de las flores y de las areólas permite distinguir las (Aquino et al. 2019). Las semillas presentan caracteres semejantes como el microrrelieve de las células de tipo plano (Fig. 4E). Caracteres como el largo de la región hilar indican que no hay diferencias significativas entre los valores obtenidos (0.659 mm en *E. cryptica* y 0.713 mm en *E. micromeris*), lo cual es corroborado por el valor de  $D^2 = 0.989$ . Las semillas de *E. spinosior* también presentan relieve celular plano, sin embargo, el largo del hilo es de 0.818 mm en promedio. El valor de la  $D^2$  con respecto a *E. micromeris* es de 1.596, en tanto que el valor de  $D^2$  con respecto a *E. cryptica* es de 4.244.

*Epithelantha polycephala* y *E. potosina* fueron descritas como subespecies de *E. greggii* (Donati y Zanovello 2010). Análisis macro-morfológicos y moleculares revelan que representan tres especies diferentes (Aquino et al. 2019). Los caracteres de la semilla reafirman esta última

propuesta, además de la presencia de una quilla en la parte superior de la semilla y de apéndices en la región hilar (Fig. 4F), el largo de las semillas de *E. greggii* es de 1.103 mm y el largo del hilo es de 0.770 mm, lo cual difiere de *E. polycephala* y *E. potosina*. Con base en los valores de las distancias de Mahalanobis la distancia entre *E. greggii* y *E. polycephala* es de 2.5. Otros caracteres que permiten diferenciarlas es el microrrelieve cóncavo de la pared periclinal en *E. polycephala* (Fig. 4G). El valor de  $D^2$  entre *E. greggii* y *E. potosina* es de 4.056, el valor promedio del largo de la semilla en *E. potosina* es de 1.202 mm. Además, otro carácter cualitativo que permite diferenciar entre las semillas de estas dos especies es la ausencia del apéndice próximo a la región hilar, mientras que las semillas de *E. greggii* tienen dicha estructura.

*Epithelantha bokei* y *E. ilariae* morfológicamente difieren entre sí por el número de espinas por areóla: más de 60 en *E. bokei* y 33 a 49 en *E. ilariae*, principalmente (Aquino et al. 2019). Las semillas de ambas especies difieren entre sí por el largo de la semilla. En *E. ilariae* es de 1.403 mm, la superficie es rugosa y el relieve cóncavo (Fig. 4H), en tanto que en *E. bokei* el largo de la semilla es de 1.159 mm, la superficie es lisa y el relieve de la pared periclinal puede ser plano a convexo (Figs. 4I - J). La  $D^2$  entre las especies es de 9.832, por lo que estas diferencias son estadísticamente significativas.

*Epithelantha pachyrhiza* y *E. pulchra* son dos especies que comparten la forma engrosada de la raíz y difieren en el número de espinas por areóla: de 16 a 21 en *E. pachyrhiza* y 40 a 55 en *E. pulchra* (Aquino et al. 2019). Las semillas de *E. pachyrhiza* tienen apéndices expandidos y superficie rugosa (Fig. 4K) y el largo de la semilla es de 0.839 mm en promedio, mientras que en *E. pulchra* los apéndices son muy expandidos (Fig. 4L), la superficie es lisa y el largo de la semilla es de 1.110 mm en promedio, el valor de  $D^2$  es de 8.673, por lo que las diferencias entre los caracteres cuantitativos son significativas.

Los caracteres de las semillas complementan el conocimiento general de la morfología de las especies de *Epithelantha*, por lo que apoyan sustantivamente a la identificación de las especies, por ello, se aporta una clave de identificación de especies con caracteres morfológicos de la semilla, como apoyo complementario de la clave propuesta en el capítulo 2 de la presente tesis.

### Clave de identificación de especies a partir de caracteres morfológicos seminales

- 1. Superficie de la pared periclinal rugosa ..... 2
  - 2. Largo de la semilla de 0.6 a 0.8 mm ..... *E. pachyrhiza*
  - 2. Largo de la semilla mayor a 1.0 mm ..... 4
    - 4. Ancho de la región hilar 0.1 a 0.2 (0.3) mm, microrrelieve de la pared periclinal cóncavo ..... *E. ilariae*
    - 4. Ancho de la región hilar 0.3 a 0.5 mm, microrrelieve de la pared periclinal plano ..... *E. pulchra*
- 1. Superficie de la pared periclinal lisa ..... 3
  - 3. Apéndices próximos a la región hilar ausentes ..... 5
    - 5. Microrrelieve de la pared periclinal cóncavo ..... *E. potosina*
    - 5. Microrrelieve de la pared periclinal convexo a plano ..... *E. bokei*
  - 3. Apéndices próximos a la región hilar expandidos o muy expandidos ..... 6
    - 6. Largo de la región hilar de 0.8 a 1.2 mm ..... *E. polycephala*
    - 6. Largo de la región hilar menor de 0.75 mm ..... 7
      - 7. Ancho de la región hilar de 0.1 a 0.3 mm ..... *E. cryptica*
      - 7. Ancho de la región hilar mayor de 0.3 mm ..... 8
        - 8. Microrrelieve de la pared periclinal cóncavo ..... *E. greggii*
        - 8. Microrrelieve de la pared periclinal plano ..... 9
          - 9. Apéndices próximos a la región hilar expandidos, largo del hilo de 0.8 a 1.0 mm ..... *E. spinosior*
          - 9. Apéndices próximos a la región hilar muy expandidos, largo del hilo de 0.6 a 0.8 mm ..... *E. micromeris*

## Literatura citada

- Addinsoft SARL. 2008. XLStat version 2008.6.07. URL: <http://www.xlstat.com>
- Anderson, E. F. 2001. *The cactus family*. Timber Press. Portland.
- Arias, S. y T. Terrazas. 2003. Seed morphology and variation in the genus *Pachycereus* (Cactaceae). *Journal of Plant Research* **117**: 277–289.
- Arias, S. y E. Sánchez-Martínez. 2010. Una especie nueva de *Strombocactus* (Cactaceae) del río Moctezuma, Querétaro, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **81**: 619–624.
- Arroyo-Cosultchi, G., T. Terrazas, S. Arias y H. Arreola-Nava. 2006. The systematic significance of seed morphology in *Stenocereus* (Cactaceae). *Taxon* **55**: 983–992.
- Arroyo-Cosultchi, G., T. Terrazas, S. Arias y L. López-Mata. 2007. Morfología de las semillas de *Neobuxbaumia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **81**: 17–25.
- Aquino, D., C. Cervantes, D. Gernandt y S. Arias. 2019. Species delimitation and phylogeny of *Epithelantha* (Cactaceae). *Systematic Botany* **44**: 1–16.
- Backeberg, C. 1954. Monographie du genre *Epithelantha*: ses espèces et ses variétés. *Cactus (París)* **39**: 25–32.
- Barthlott, W y D.R. Hunt. 2000. Seed diversity in the Cactaceae subfamily Cactoideae. *Succulent Plant Research* **5**: 6–173.
- Bravo-Hollis, H. 1951. Nuevas especies del género *Epithelantha*. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica* **22**: 15–23.
- Bravo-Hollis, H. and H. Sánchez-Mejorada. 1991. *Las Cactáceas de México Vol. II*. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Chavent, M., V. Kuentz-Simonet, A. Labenne y J. Saracco. 2014. Multivariate analysis of mixed data: The PCA mix data R package. <http://arxiv.org/abs/1411.4911>.
- Davitashvili N. y G. Karrer, 2010. Taxonomic importance of seed morphology in *Gentiana* (Gentianaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **162**: 101–115.
- Donati, D. and C. Zanovello. 2010. *Epithelantha* F.A.C. Weber ex Britton & Rose. Nuovi dati su ontogenia, fertilità, simpatria e revisione del genere *Piante Grasse* **30**: 165–187.
- Donati, D. y C. Zanovello. 2011. *Epithelantha*. The Cactus Trentino Sudtirol Society. Trentino, Italy.
- Dormann, C. F., J. Elith, S. Bacher, C. Buchmann, G. Carl, G. Carré, J. R. Márquez, B. Gruber, B. Lafourcade, P.J. Leitão, T. Münkemüller, C. McClean, P.E. Osborne, B. Reineking, B. Schröder, A.K. Skidmore, D. Zurell y S. Lautenbach. 2013. Collinearity: a review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography* **36**: 27–46.
- Elizondo, J., J. Valdés, S. Arias y S. Hatch. 1994. Micromorfología de las semillas de algunas especies de la tribu Cactaeae (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **39**: 59–67.
- Ghimire, B., H. Lee, G. E. Choi, M. I. Jeong, G. U. Suh, C. H. Lee, K. Heo y S.W. Son. 2016. Seed morphology of 12 taxa of the genus *Thalictrum* L. (Thalictroideae, Ranunculaceae) and its systematic implication. *Phytotaxa* **283**: 281–285.
- Glaetzle W. y K.H. Prestlé. 1986. Seed-morphology of the genus *Notocactus*. *Bradleya* **4**: 79–96.
- Hernández, H. and C. Gómez-Hinostrosa. 2011. Mapping the cacti of México. *Succulent Plant Research* **7**: 6-128.
- Kiel, C.A. y L. A. McDade. 2014. The Mirandea Clade (Acanthaceae, Justicieae, *Tetramerium* Lineage): Phylogenetic signal from molecular data and micromorphology makes sense of

taxonomic confusion caused by remarkable diversity of floral form. *Systematic Botany* **39**: 950–964.

Leython, S. y D. Jáuregui. 2008. Morfología de la semilla y anatomía de la cubierta seminal de cinco especies de *Calliandra* (Leguminosae-Mimosoideae) de Venezuela. *Revista de Biología Tropical* **56**: 1075–1086.

Martínez, D. 2016. Delimitación taxonómica de las especies del Grupo *Selenicereus vagans* (Hylocereeae, Cactaceae). Tesis de licenciatura en biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México DF.

Mendelhall, W., R. J. Beaver y B. M. Beaver. 2010. *Introducción a la probabilidad y estadística*. Cengage Learning, México D.F.

Ríos, S. 2017. Ontogenia de los apéndices seminales en la familia Cactaceae. Tesis de maestría en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX.

RStudio Team, 2015. RStudio: Integrated development for R. RStudio, Inc. Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>.

Šnicer, J., J. Bohata y V. Myšák. 2009. The littlest *Lophophora*. *Cactus and Succulent Journal (Los Angeles)* **81**: 294-300.

Taylor, N.P. y J. Y. Clark. 1985. Seed-morphology and classification in *Ferocactus* subg. *Ferocactus*. *Bradleya* **1**: 3-16.

Texeira, R., A.M. Goulart y G. Peter. 2013. Seed morphology: an addition to the taxonomy of *Tephrosia* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae) from South America. *Plant Systematic and Evolution* **299**: 459–470.



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

Walpole, R.E., R.H. Myers, S.L. Myers y K. Ye. 2012. *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. Pearson Educación, México.

Apéndice 1. Especie, país, estado, colector y herbario donde se depositaron los ejemplares de respaldo para *Epithelantha* spp.

*Epithelantha bokei*: MEXICO. Coahuila, *D. Aquino* 318 (MEXU); *D. Aquino* 342 (MEXU); San Luis Potosí, *D. Aquino* 301 (MEXU). *Epithelantha cryptica*: MEXICO, Coahuila, *D. Aquino* 348 (MEXU); *D. Aquino* 355 (MEXU); *D. Aquino* 375 (MEXU). *Epithelantha greggii*: MEXICO, Coahuila, *D. Aquino* 304 (MEXU); *D. Aquino* 306 (MEXU); *D. Aquino* 339 (MEXU); *D. Aquino* 340 (MEXU); *D. Aquino* 341 (MEXU); *D. Aquino* 349 (MEXU); Nuevo León, *D. Aquino* 312 (MEXU); *D. Aquino* 325 (MEXU); *D. Aquino* 329 (MEXU). *Epithelantha ilariae*: MEXICO, Coahuila, *D. Aquino* 373 (MEXU); Nuevo León *D. Aquino* 307 (MEXU); *D. Aquino* 323 (MEXU). *Epithelantha micromeris*: MÉXICO, Coahuila, *D. Aquino* 335 (MEXU); *D. Aquino* 336 (MEXU); *O. González-Zorzano* 301 (MEXU); Nuevo León, *D. Aquino* 332 (MEXU); *D. Aquino* 333 (MEXU). *Epithelantha pachyrhiza*: MÉXICO, Coahuila, *D. Aquino* 305 (MEXU); *D. Aquino* 353 (MEXU). *Epithelantha polycephala*: MÉXICO, Coahuila, *D. Aquino* 350 (MEXU); *D. Aquino* 352 (MEXU); *D. Aquino* 370 (MEXU). *Epithelantha potosina*: MÉXICO, San Luis Potosí *D. Aquino* 295 (MEXU); *D. Aquino* 383 (MEXU); *J.G. Martínez-Ávalos* 1954 (UAT). *Epithelantha pulchra*: MEXICO Nuevo León, *D. Aquino* 309 (MEXU); *D. Aquino* 311 (MEXU); *D. Aquino* 313 (MEXU). *Epithelantha spinosior*: MEXICO Nuevo León, *D. Aquino* 317 (MEXU); *D. Aquino* 319 (MEXU); *D. Aquino* 321 (MEXU); *D. Aquino* 334 (MEXU).

Apéndice 2. Codificación de los caracteres de la morfología seminal de *Epithelantha* spp.

1. Lustre: 0) mate 1) lustroso
2. Apéndices próximos a la región hilar expandidos: 0) no presente 1) ligeramente expandido 2) muy expandido
3. Quilla de la semilla: 0) sin quilla, 1) con quilla
4. Microrrelieve de la pared periclinal: 0: plano, 1: convexo, 2: cóncavo
5. Superficie de la pared periclinal: 0) lisa, 1) rugosa

Tabla 1. Media y desviación estándar (DS) calculados para las semillas de diez especies de *Epithelantha*.

| Especie                   | N   | Largo |       | Ancho |        | Altura |        | Largo de hilo |        | Ancho de hilo |        |
|---------------------------|-----|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
|                           |     | Media | DS    | Media | DS     | Media  | DS     | Media         | DS     | Media         | DS     |
| <i>Epithelantha bokei</i> | 60  | 1.159 | 0.077 | 0.708 | 0.074  | 0.644  | 0.069  | 0.691         | 0.108  | 0.332         | 0.067  |
| <i>E. cryptica</i>        | 60  | 1.121 | 0.069 | 0.747 | 0.081  | 0.741  | 0.069  | 0.659         | 0.0702 | 0.272         | 0.053  |
| <i>E. greggii</i>         | 180 | 1.103 | 0.061 | 0.742 | 0.059  | 0.687  | 0.069  | 0.77          | 0.082  | 0.315         | 0.077  |
| <i>E. ilariae</i>         | 60  | 1.403 | 0.058 | 0.833 | 0.068  | 0.786  | 0.063  | 0.833         | 0.052  | 0.247         | 0.044  |
| <i>E. micromeris</i>      | 100 | 1.147 | 0.055 | 0.721 | 0.071  | 0.758  | 0.073  | 0.713         | 0.077  | 0.319         | 0.068  |
| <i>E. pachyrhiza</i>      | 40  | 0.839 | 0.037 | 0.690 | 0.088  | 0.649  | 0.095  | 0.618         | 0.057  | 0.339         | 0.063  |
| <i>E. polycephala</i>     | 60  | 1.189 | 0.060 | 0.779 | 0.071  | 0.711  | 0.100  | 1.121         | 0.068  | 0.35          | 0.096  |
| <i>E. potosina</i>        | 60  | 1.202 | 0.064 | 0.748 | 0.058  | 0.738  | 0.042  | 0.741         | 0.086  | 0.264         | 0.058  |
| <i>E. pulchra</i>         | 60  | 1.110 | 0.071 | 0.712 | 0.067  | 0.693  | 0.0599 | 0.841         | 0.049  | 0.304         | 0.0807 |
| <i>E. spinosior</i>       | 80  | 1.123 | 0.083 | 0.728 | 0.0702 | 0.713  | 0.073  | 0.818         | 0.061  | 0.35          | 0.095  |

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson calculados para cinco caracteres cuantitativos. Clave de caracteres: Altura: altura de la semilla, largo: largo de la semilla, ancho: ancho de la semilla, LHILO: largo de la región hilar y AHILO: ancho de la región hilar.

|        | Altura   | largo    | ancho    | LHILO   | AHILO |
|--------|----------|----------|----------|---------|-------|
| Altura | 1        |          |          |         |       |
| largo  | 0.289284 | 1        |          |         |       |
| ancho  | 0.156252 | 0.397075 | 1        |         |       |
| LHILO  | 0.053789 | 0.294045 | 0.251321 | 1       |       |
| AHILO  | -0.14747 | -0.13975 | 0.064907 | 0.10428 | 1     |

Tabla 3: Coeficientes de estructura canónica para cinco caracteres de la semilla. Los valores más significativos son remarcados en negritas. Clave de caracteres: Altura: altura de la semilla, largo: largo de la semilla, ancho: ancho de la semilla, LHILO: largo de la región hilar y AHILO: ancho de la región hilar.

|        | Can1         | Can2         | Can3        | Can4        | Can5        |
|--------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| LHILO  | -0.54356     | -0.83729     | -0.08351    | -0.01687    | 0.142489    |
| AHILO  | 0.166879     | -0.2605      | 0.374571    | 0.629775    | -0.64246    |
| largo  | -0.77008     | 0.540593     | 0.387478    | 0.115012    | 0.017746    |
| ancho  | -0.02404     | 0.114516     | -0.46083    | -0.65181    | -0.66424    |
| Altura | -0.14058     | 0.164104     | -0.7501     | 0.628324    | -0.00856    |
| %      | <b>59.78</b> | <b>34.67</b> | <b>3.04</b> | <b>1.98</b> | <b>0.53</b> |

Tabla 4. Distancias de Mahalanobis calculadas para cinco caracteres cuantitativos.

|                       | <i>E. bokei</i> | <i>E. cryptica</i> | <i>E. greggii</i> | <i>E. ilariae</i> | <i>E. micromeris</i> | <i>E. pachyrhiza</i> | <i>E. polycephala</i> | <i>E. potosina</i> | <i>E. pulchra</i> | <i>E. spinosior</i> |
|-----------------------|-----------------|--------------------|-------------------|-------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| <i>E. bokei</i>       | 0               | 4.448              | 2.924             | 9.832             | 2.585                | 13.075               | 5.77                  | 7.973              | 3.745             | 3.085               |
| <i>E. cryptica</i>    | 4.448           | 0                  | 3.083             | 8.722             | 0.989                | 10.027               | 8.168                 | 8.356              | 4.471             | 4.244               |
| <i>E. greggii</i>     | 2.924           | 3.083              | 0                 | 10.858            | 1.643                | 7.876                | 2.5                   | 4.056              | 0.371             | 0.54                |
| <i>E. ilariae</i>     | 9.832           | 8.722              | 10.858            | 0                 | 9.451                | 34.02                | 8.486                 | 6.841              | 12.39             | 11.356              |
| <i>E. micromeris</i>  | 2.585           | 0.989              | 1.643             | 9.451             | 0                    | 9.449                | 5.095                 | 6.235              | 2.354             | 1.596               |
| <i>E. pachyrhiza</i>  | 13.075          | 10.027             | 7.876             | 34.02             | 9.449                | 0                    | 17.778                | 21.683             | 8.673             | 9.645               |
| <i>E. polycephala</i> | 5.77            | 8.168              | 2.5               | 8.486             | 5.095                | 17.778               | 0                     | 1.672              | 2.423             | 1.699               |
| <i>E. potosina</i>    | 7.973           | 8.356              | 4.056             | 6.841             | 6.235                | 21.683               | 1.672                 | 0                  | 3.203             | 3.708               |
| <i>E. pulchra</i>     | 3.745           | 4.471              | 0.371             | 12.39             | 2.354                | 8.673                | 2.423                 | 3.203              | 0                 | 0.553               |
| <i>E. spinosior</i>   | 3.085           | 4.244              | 0.54              | 11.356            | 1.596                | 9.645                | 1.699                 | 3.708              | 0.553             | 0                   |

Tabla 5. Caracteres cuantitativos y cualitativos con mayor peso en los cuatro primeros componentes de acuerdo con el resultado derivado del PCA mix.

|            | dim.1        | dim.2        | dim.3                | dim.4        |
|------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|
| Quilla     | 0.5045       | 0.1091       | 5.23e <sup>-05</sup> | 0.0284       |
| Apéndices  | 0.3167       | 0.6129       | 0.5108               | 0.1423       |
| superficie | 0.0628       | 0.1475       | 0.2014               | 0.0752       |
| relieve    | 0.1540       | 0.0231       | 0.3305               | 0.8237       |
| Altura     | 0.2820       | 0.0786       | 7.72e <sup>-05</sup> | 0.0002       |
| largo      | 0.4527       | 0.0391       | 0.2575               | 0.0262       |
| ancho      | 0.2774       | 0.0175       | 0.0805               | 0.2103       |
| LHILO      | 0.2501       | 0.3359       | 0.0178               | 0.0107       |
| AHILO      | 0.0216       | 0.3097       | 0.0087               | 0.0387       |
| %          | <b>21.10</b> | <b>15.21</b> | <b>12.79</b>         | <b>12.32</b> |

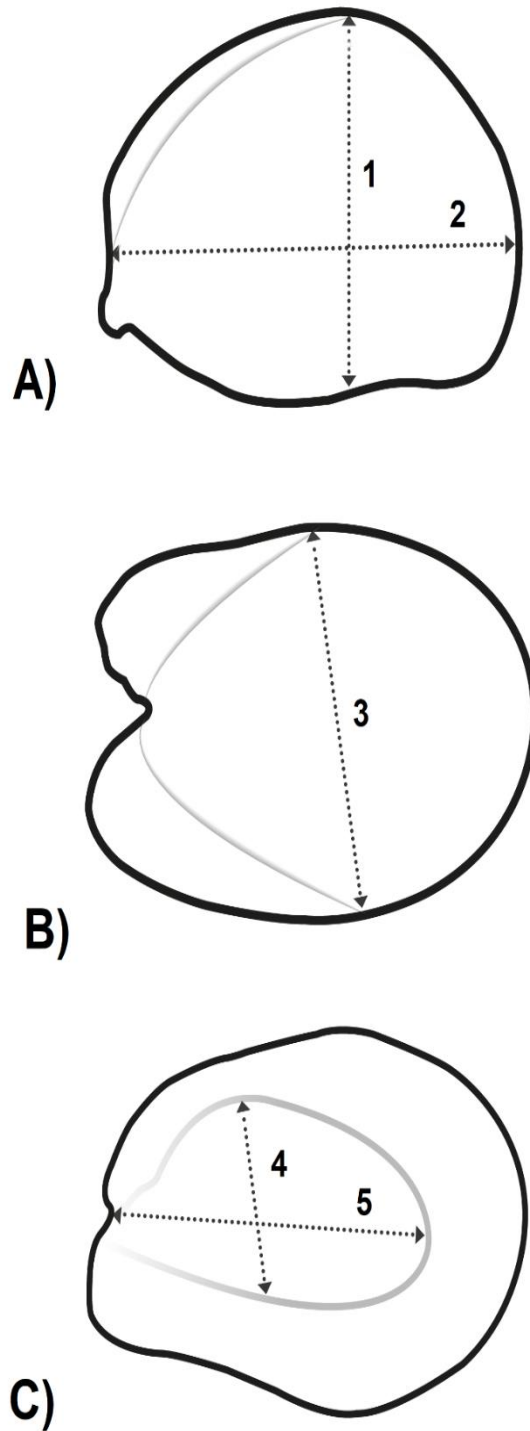


Fig. 1. Diagrama general de las semillas de *Epithelantha* mostrando los caracteres medidos: A) vista lateral 1: altura, 2: largo; B) vista superior 3: ancho y C) vista inferior 4: ancho de la región hilar y 5: largo de la región hilar.



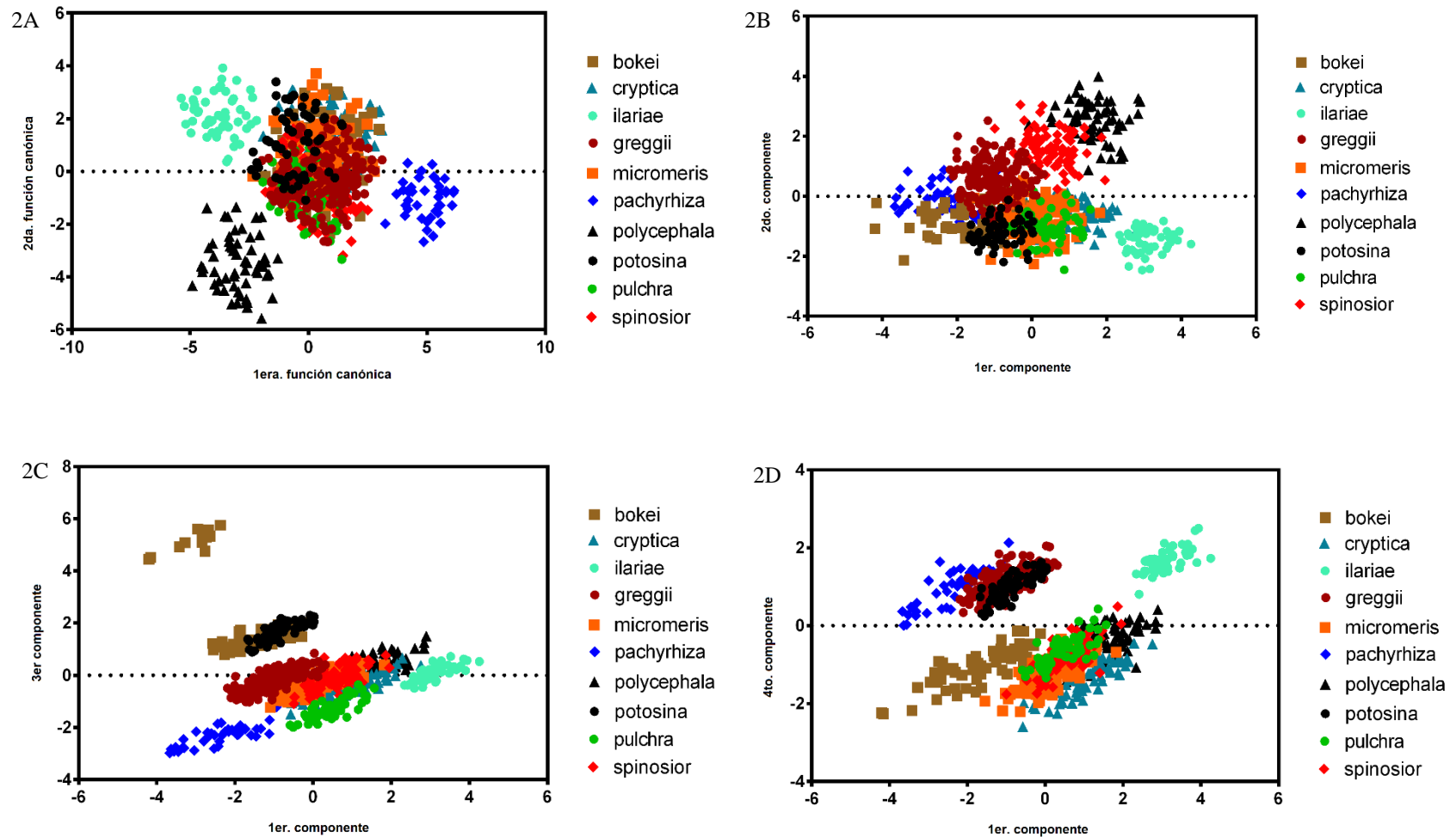


Fig. 2. Análisis Canónico Discriminante empleando solo caracteres cuantitativos, A) gráfica de la primera y segunda función canónica. Análisis de componentes principales con datos mixtos (PCA mix) empleando caracteres cuantitativos y cualitativos para evaluar la variación de las semillas de *Epithelantha*. B. Gráfica del primer y segundo componente. C. Gráfica del primer y tercer componente. D. Gráfica del primer y cuarto componente.

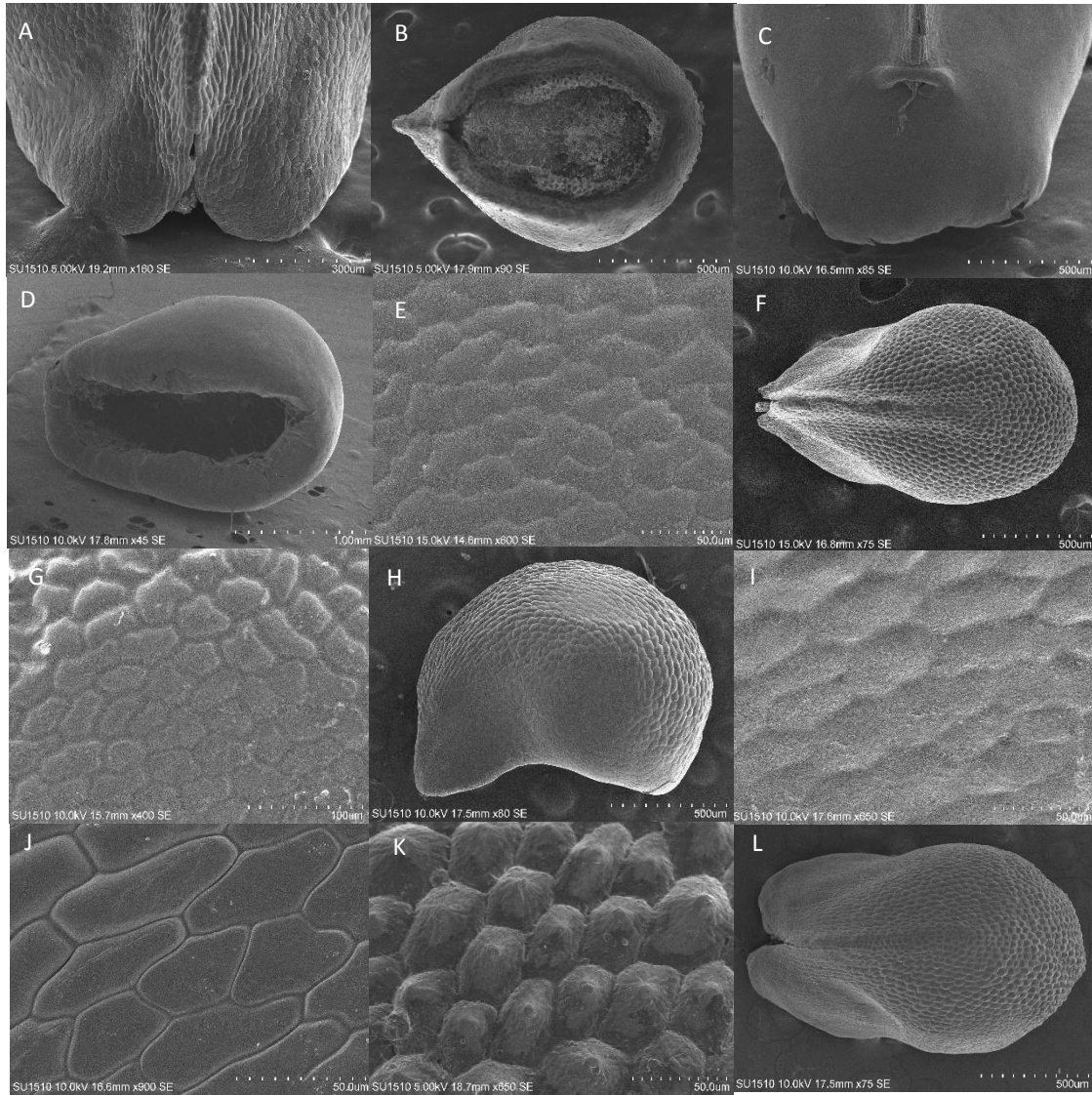


Fig. 3. Morfología seminal de *Epithelantha* y aliados. A) Micrópilo y B) hilo separados en *Epithelantha* (DA305, MEXU). C) Micropilo y D) hilo separados en *Astrophytum* (DA303, MEXU). E) Microrrelieve de de la pared periclinal plano en *E. cryptica* (DA 355, MEXU). F) Quilla y expansión del borde de la semilla en *E. greggii* (DA, 325 MEXU). G) Superficie lisa y microrrelieve de la pared periclinal cóncava en *E. polycephala* (DA 350, MEXU). H). Vista general de las semillas de *E. ilariae* (DA 307, MEXU). I) Microrrelieve de la pared periclinal convexo en *E. bokei* (DA 342, MEXU). J) Microrrelieve de la pared periclinal plano en *E. bokei* (DA 318, MEXU). K) Microrrelieve de la pared periclinal cóncavo y superficie rugosa en *E. pachyrhiza* (DA 305, MEXU). L) Expansión del borde de la semilla muy evidente en *E. pulchra* (DA 311, MEXU).

## **Capítulo 2**

### **Species Delimitation and Phylogeny of *Epithelantha* (Cactaceae)**

**David Aquino, R. Cristian Cervantes, David S. Gernandt, and Salvador Arias.**

Systematic Botany 2019. 44: 600 - 615.

DOI: <https://doi.org/10.1600/036364419X15620113920635>

## Species Delimitation and Phylogeny of *Epithelantha* (Cactaceae)

David Aquino,<sup>1</sup> R. Cristian Cervantes,<sup>1</sup> David S. Gernandt,<sup>2</sup> and Salvador Arias<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-614, México 04510 D. F., México

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

<sup>3</sup>Author for correspondence (sarias@ib.unam.mx)

Communicating Editor: Martin F. Wojciechowski

**Abstract**—The genus *Epithelantha* (Cactaceae, Cactoideae, Cactaceae) is native to Mexico and the southern USA and includes several uncertain species and ambiguous phylogenetic relationships. We applied multivariate analysis to a set of nine quantitative characters and six qualitative characters and we used Bayesian inference and maximum likelihood to reconstruct the phylogeny of *Epithelantha* using molecular data from four chloroplast regions (*petL-psbE*, *psbA-trnH*, *trnL-F*, and *trnQ-rps16*). Eleven taxa were collected in 39 localities where digital images of five individuals were taken. A correlation analysis allowed us to eliminate correlated characters. A discriminant canonical analysis (DCA) for quantitative characters and principal components analyses with mixed data (PCA mix) for quantitative and qualitative characters identified the length of the flower, number of spines, areole length/width ratio, the expansion of the hilar region of the seed, multicellular sculpture, and the relief of the periclinal wall as the most variable characters. The partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) allowed us to recognize nine of eleven taxa. As a complement, the molecular data matrix included 68 substitutions and 12 indels between the four markers. The 39 terminals analyzed were recovered in nine strongly supported clades, confirming the results of multivariate analyses. *Epithelantha* was recovered as a monophyletic group strongly supported by four substitutions and an indel, with *Turbiniacarpus* being the sister group. Based on our results, we include a taxonomic synthesis of *Epithelantha* where we recognize ten species, propose two new combinations, designate seven lectotypes, and provide a key for species.

**Keywords**—Cactaceae, morphometric analysis, taxonomy.

The genus *Epithelantha* was erected by Britton and Rose (1922) based on a previous informal proposal by Weber, who used this name as a synonym of *Mammillaria micromeris* described by Engelmann (1856). *Epithelantha* is distributed from Arizona and Texas in the USA to Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, and San Luis Potosí in Mexico, in a widespread region defined as the Chihuahuan Desert (Hernández and Gómez-Hinostroza 2011). Usually it grows in open areas. Plants are solitary to branched, up to 6 cm in diameter, and tuberculate; areoles are small at podaria tips, spines are in single or several series not distinguishable as radials and centrals; flowers are borne at the tip of young podaria at the stem apex, up to 0.5 cm long, white to pink, pericarpels are naked; fruits are elongated, red, up to 2 cm long, indehiscent; and seeds are oval, up to 1.5 mm long (Bravo-Hollis and Sánchez-Mejorada 1991; Anderson 2001). The number of species that integrate *Epithelantha* is uncertain (Table 1) as is its phylogenetic position (Hernández-Ledesma et al. 2015). Different proposals on how many species should be recognized have been based on reviews that discuss the limits of the species that integrate the genus and as part of monographic reviews at the family level. *Epithelantha* was revised by Bravo-Hollis (1951), who recognized five species based on comparison of morphological attributes. Backeberg (1954) recognized three species and six varieties. For this author, the branching pattern, the shape of the stem, and enlarged storage roots are the characters that allow the recognition of species. Glass and Foster (1978) in their taxonomic revision of *Epithelantha*, recognized one species with six varieties, concluding that the morphological characters with taxonomic value are minimal due to a wide range of distribution. In a more recent but partial review, Donati and Zanovello (2010, 2011) recognized seven species and nine subspecies based on a qualitative set of morphological characters. However, the latter authors did not include a revision of herbarium material and did not test the set of characters observed under any statistical method. In monographic studies at the

family level, Benson (1982) recognized two species: *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britton & Rose and *E. bokei* L.D. Benson, clearly distinguishable by the number of radial spines and by flower size. In contrast, Bravo-Hollis and Sánchez-Mejorada (1991) recognize the same species, including five varieties in *E. micromeris*. More recently, Hunt et al. (2006) and Hunt (2016) recognize the same species, distinguishable from each other by the number of spines (50 to 90 in *E. bokei* and 20 to 35 in *E. micromeris*).

Phylogenetic studies focused on Cactaceae reveal that *Epithelantha* is part of this tribe (Butterworth et al. 2002; Vázquez-Sánchez et al. 2013), but the position of the genus is incongruent between the two studies. According to Butterworth et al. (2002), *Epithelantha* belongs to a clade that also includes *Turbiniacarpus* (Backeb.) Buxb. & Backeb. (s. l.) and *Pediocactus* Britton & Rose, which is sister to a clade including *Ariocarpus* Scheidw. and *Turbiniacarpus* (s. s.); together, these two clades constitute the “ATEP” clade. Butterworth et al. (2002) included a single chloroplast marker (*rpl16*) and the sampling included only one sample of *E. bokei*. More recently Vázquez-Sánchez et al. (2013) used five chloroplast markers (*matK*, *rbcL*, *rpl16*, *psbA-trnH*, and *trnL-F*) and one sample of *E. micromeris*, and recovered *Epithelantha* as sister to two major subclades that include in addition to the previously mentioned genera, also *Acharagma* (N.P. Taylor) A.D. Zimmerman ex Glass, *Coryphantha* (Engelm.) Lem., *Cumarinia* Buxb., *Escobaria* Britton & Rose, *Lophophora* J.M. Coult., *Mammillaria* Haw., *Neolloydia* Britton & Rose, *Ortegocactus* Alexander, *Obregonia* Frič ex A. Berger, and *Pelecophora* Ehrenb. Hernández-Hernández et al. (2011) used four chloroplast markers (*matK*, *rpl16*, *trnL-trnF*, and *trnK-matK*) and one nuclear marker (*ppc*) and one sample of *E. micromeris*. These authors found that *Epithelantha* was sister to *Turbiniacarpus*, *Ariocarpus*, and *Strombocactus*, a result more consistent with that found by Butterworth et al. (2002). However, the phylogenetic analysis carried out by Bárcenas et al. (2011), using *trnK-matK* does not recover the sister relationship of *E. micromeris* (four terminals) and *E. bokei* (one terminal).

TABLE 1. Taxa recognized in *Epithelantha*, according to several authors.

| Britton and Rose (1922) | Bravo-Hollis (1951)  | Backeberg (1954)                            | Glass and Foster (1978)                      | Donati and Zanovello (2010, 2011)             | Hunt et al. (2006), Hunt (2016) |
|-------------------------|----------------------|---|--|---|---------------------------------|
| <i>E. micromeris</i>    | <i>E. micromeris</i> | <i>E. micromeris</i>                        | <i>E. micromeris</i>                         | <i>E. micromeris</i>                          | <i>E. micromeris</i>            |
|                         |                      |   | <i>E. micromeris</i> var. <i>bokei</i>       | <i>E. bokei</i>                               | <i>E. bokei</i>                 |
|                         | <i>E. densispina</i> | <i>E. micromeris</i> var. <i>densispina</i> | <i>E. micromeris</i> var. <i>greggii</i>     | <i>E. greggii</i> subsp. <i>greggii</i>       | <i>E. micromeris</i>            |
|                         | <i>E. rufispina</i>  | <i>E. micromeris</i> var. <i>rufispina</i>  | <i>E. micromeris</i> var. <i>greggii</i>     | <i>E. greggii</i> subsp. <i>greggii</i>       | <i>E. micromeris</i>            |
|                         |                      | <i>E. micromeris</i> var. <i>unguispina</i> | <i>E. micromeris</i> var. <i>unguispina</i>  | <i>E. unguispina</i> subsp. <i>unguispina</i> | <i>E. micromeris</i>            |
|                         | <i>E. pachyrhiza</i> | <i>E. pachyrhiza</i> var. <i>pachyrhiza</i> | <i>E. micromeris</i> var. <i>pachyrhiza</i>  | <i>E. unguispina</i> subsp. <i>huastecana</i> | <i>E. micromeris</i>            |
|                         |                      | <i>E. pachyrhiza</i> var. <i>elongata</i>   | <i>E. micromeris</i> var. <i>pachyrhiza</i>  | <i>E. pachyrhiza</i> subsp. <i>pachyrhiza</i> | <i>E. micromeris</i>            |
|                         |                      |   |  | <i>E. pachyrhiza</i> subsp. <i>elongata</i>   | <i>E. micromeris</i>            |
|                         |                      |   |  | <i>E. pachyrhiza</i> subsp. <i>parvula</i>    | <i>E. micromeris</i>            |
|                         |                      |   |  | <i>E. pachyrhiza</i> subsp. <i>pulchra</i>    | <i>E. micromeris</i>            |
|                         |                      | <i>E. micromeris</i> var. <i>greggii</i>    | <i>E. micromeris</i> var. <i>greggii</i>     | <i>E. greggii</i> subsp. <i>greggii</i>       | <i>E. micromeris</i>            |
|                         |                      | <i>E. polycephala</i>                       | <i>E. micromeris</i> var. <i>polycephala</i> | <i>E. greggii</i> subsp. <i>polycephala</i>   | <i>E. micromeris</i>            |
|                         |                      |   |  | <i>E. greggii</i> subsp. <i>potosina</i>      | <i>E. micromeris</i>            |
|                         | <i>E. spinosior</i>  | <i>E. micromeris</i> var. <i>unguispina</i> | <i>E. micromeris</i> var. <i>unguispina</i>  | <i>E. unguispina</i> subsp. <i>unguispina</i> | <i>E. micromeris</i>            |
|                         |                      |   |  | <i>E. ilariae</i>                             | <i>E. micromeris</i>            |
|                         |                      |   |  | <i>E. cryptica</i>                            | <i>E. micromeris</i>            |

The disagreement in the delimitation of species in *Epithelantha* is replicated in other Cactaceae, where the number of species is estimated between 1438 (Hunt et al. 2006) and 1870 (Nyffeler and Eggl 2010). This difference is in principle the result of ignorance of the variability of taxa (Sánchez-Mejorada 1982), therefore studies focused on the delimitation of species are required.

This level of study has intensified thanks to new techniques that enable the analysis of morphological and molecular data (Sites and Marshall 2003). The possibility of using molecular data as a practical and standardized tool for identifying organisms and discovering new taxa was raised by Kress et al. (2005); however, molecular characters are not efficient when there are hybridization events, incomplete lineage sorting, or intergenomic transfer (Naciri and Linder 2015). That is why the use of two or more sources of information can provide more robust hypotheses to propose independence between two or more lineages (Pante et al. 2014). A complementary source is morphology. Valcárcel and Vargas (2010) consider that it is an emergent property that reflects divergence between two lineages, and Will et al. (2005) point out that even a single morphological character that is highly predictive and allows to differentiate between species will be valid, since it is the result of a common evolutionary history. This approach has been applied in several groups of plants, for example: *Ophrys* Section *Pseudophrys* (Orchidaceae, Bernardos et al. 2005), the *Gnetum* clade of Gnetales (Gnetaceae, Hou et al. 2016), and *Quercus* distributed in Europe (Fagaceae, Rellstab et al. 2016). The comparative approach between morphology and data obtained from molecular sequences has not been widely applied in Cactaceae, which are limited to two studies: species delimitation in *Opuntia* Mill. from the Galapagos Islands (Helsen et al. 2009) and *Coryphantha* Section *Robustispina* (Baker and Butterworth 2013). Considering that there are no phylogenetic and morphological analyses focused on *Epithelantha*, the aims of this study are: 1) delimit the *Epithelantha* species using a set of vegetative and reproductive morphological characters, through a morphometric analysis (Sokal 1973; Henderson 2006; Valcárcel and Vargas 2010), 2) perform a phylogenetic analysis based on chloroplast DNA sequences, which allows corroborating the monophyly of *Epithelantha* and its relationship with the genera of the "ATEP" clade (sensu Butterworth et al. 2002), and 3) analyze the phylogenetic relationships between the recognized species of

*Epithelantha* and complement the morphometric analysis indicated above to delimit the species (Donoghue 1985; De Queiroz and Donoghue 1988). Based on the results obtained, a taxonomic treatment is proposed for the genus.

#### MATERIALS AND METHODS

**Taxa and Sampling**—We sampled 11 taxa based on recent taxonomic proposals (Table 1). Each species and subspecies is treated as a hypothesis of an independent lineage based on the application of two delimitation criteria. Herbarium collections were examined to identify the localities of the putative species (ANSM, ASU, CFNL, DES, ENCB, GBH, GH, IEB, K, NCU, MEXU, MO, QMEX, RSA-POM, SLPM, SRSC, and UNL, acronyms sensu Thiers 2018). Based on the information from the herbarium specimens and literature (Donati and Zanovello 2011), collections were made in 39 localities of Coahuila, Nuevo León, and San Luis Potosí (Appendix 1). In each locality, digital images of five individuals with reproductive structures or indications of them were obtained, as a reference of being adult plants. In each image, a metric scale was used to reference the dimensions of the structures and subsequent morphological analyses. Stem tissue was then obtained, which was dehydrated in silica gel for the subsequent extraction of DNA. Geographical coordinates and elevation were taken with a GPS (global positioning system) Garmin eTrex Vista H WGS84. It was not possible to collect samples from *Epithelantha pachyrhiza* (W.T. Marshall) Backeb. subsp. *pachyrhiza* and *Epithelantha pachyrhiza* (W.T. Marshall) Backeb. subsp. *elongata* (Backeb.) D. Donati & Zanov. The outgroup includes 23 terminals that represent the subfamily Cactoideae + *Leuenbergeria* Lodé, with a terminal of the tribe Echinocereae (*Leptocereus* Britton & Rose), one of Trichocereae (*Harrisia* Britton), and 20 of Cactaceae (Hunt et al. 2006). All recently sampled specimens belong to *Epithelantha* and related genera, whereas the remaining vouchers were taken from previous studies (Vázquez-Sánchez et al. 2013) (Appendix 1).

**Species Delimitation**—Nine quantitative characters (counts and measurements) and six qualitative characters were analyzed at the beginning. These were obtained from 195 individuals registered in 39 localities (characters, coding, and description are in Appendix 2). Observation of the vegetative structures was carried out in the middle region of the stem to avoid bias due to location or development. The spines in *Epithelantha* are arranged in series (1–6 series). The measurements correspond to the spines of the most basal series. The AxioVision Rel 4.8 image analyzer (Carl Zeiss Imaging Solution 2009) was used for the measurements. The counts were made manually and directly on the images. The six qualitative characters were coded between alternative states of presence or absence (Appendix 2). Seeds were washed in Tween solution (10%) and then in ultrasound (Branson 200) until the mucilage residues were eliminated. Observations were made with a Hitachi Scanning Electronic Microscope SU1510. The data corresponding to the outgroup were taken from Barthlott and Hunt (2000); *Ariocarpus*, *Aztekium* Boed., *Echinocactus* Link & Otto, *Leptocereus*, *Lophophora*, *M. mammillaris* H. Karst., *Obregonia*, *Ortegocactus*, *Pediocactus*, and *Pelecyphora*, Arias and Sánchez-Martínez (2010); *Strombocactus*, and Jiménez-Durán et al. (2014); *Leuenbergeria lychnidiflora* (DC.) Lodé, as well as preparations made for the five remaining species (*Coryphantha*, *Escobaria*



*missouriensis* (Sweet) D.R. Hunt subsp. *asperispina* (Boed.) N.P. Taylor, *M. mystax*, *Rapicactus* Buxb. & Oehme, and *Turbiniacarpus*. Seeds of *Astrophytum capricorne* (A. Dietr.) Britton & Rose, *E. cubensis* (Britton & Rose) D.R., and *Harrisia earlei* Britton & Rose were not included. The coding of the characters followed the nomenclature of Barthlott and Hunt (2000).

The Pearson correlation coefficient (PCC), which measures the possible association between two variables, expressed in Pearson's linear correlation (Walpole et al. 2012), was calculated for the quantitative characters with a Pearson correlation threshold of 0.60. With this analysis, characters with positive or negative correlations were detected and eliminated to avoid overestimating the result. The quantitative characters that did not present correlation were retained and analyzed using discriminant canonical analysis (DCA) to identify the traits that best discriminate a priori groups based on a set of two or more discriminant variables, where each variable is weighted according to its capacity to discriminate (McGarigal et al. 2000). In a second analysis, both quantitative and qualitative characteristics were concatenated into a single matrix and principal components analysis with mixed data (PCA mix) was used to compare *n* observations described by *p*1 numerical variables and *p*2 categorical variables simultaneously (Chavent et al. 2014). The third analysis used was partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), which is a predictive algorithm that combines dimensionality reduction and discriminant analysis in one; in addition, PLS-DA does not assume that the data have to adapt to a particular distribution and therefore is more flexible than other discriminant algorithms (Chuen et al. 2018). All analyses were performed in RStudio (RStudio Team 2015) and the resulting graphs were edited in GraphPad Prism v. 6 (GraphPad Software, Inc. 2012).

**DNA Extraction, Amplification, and Sequencing**—DNA extractions were from 50 mg of stem tissue of the specimens obtained in the 39 localities. After a dehydration period of about one week, the samples were stored in a deep freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$  and 24 hr later they were triturated in TissueLysar II (Qiagen, Venlo, Netherlands) at 28 rpm for 30 sec. Extraction was performed with the EZ-10 spin column genomic plant DNA mini-prep kit (BioBasic Inc., Ontario, Canada) following the manufacturer's protocol. The aliquots obtained were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Four chloroplast markers were sequenced, including three intergenic spacers (*petL-psbE*, *psbA-trnH*, and *trnQ-rps16*) and one intron (*trnL-F*). The *petL-psbE* intergenic spacer was amplified with *petL* and *psbE* primers (Shaw et al. 2007). Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the DNA under the following conditions: initial denaturation of the DNA for 2 minutes at  $94^{\circ}\text{C}$ ; followed by 30 cycles of 1 minute at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 sec at  $52^{\circ}\text{C}$ , and 1 minute at  $72^{\circ}\text{C}$ ; and a final extension of 5 minutes at  $72^{\circ}\text{C}$ . The *psbA-trnH* intergenic spacer was amplified with the primers CApsbA and CAtrnH (Korotkova et al. 2010). The PCR conditions were 2 minutes at  $94^{\circ}\text{C}$ ; followed by 29 cycles of 30 s at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s at  $52^{\circ}\text{C}$ ; and 1 min at  $72^{\circ}\text{C}$ ; and a final extension of 7 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . The *trnQ-rps16* intergenic spacer was amplified with *trnQ2* and *rps16x1* primers (Shaw et al. 2007). The PCR conditions were 2 minutes at  $95^{\circ}\text{C}$ ; followed by 35 cycles of 30 sec at  $95^{\circ}\text{C}$ , 1 minute at  $55^{\circ}\text{C}$ , and 1 minute at  $72^{\circ}\text{C}$ ; and a final extension of 10 minutes at  $72^{\circ}\text{C}$ . The *trnL-F* region, which includes the *trnL* intron and spacer, was amplified using the primers C and F designed by Taberlet et al. (1991). The PCR conditions were 2 minutes at  $94^{\circ}\text{C}$ ; followed by 29 cycles of 30 sec at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 sec at  $52^{\circ}\text{C}$ , and 1 minute at  $72^{\circ}\text{C}$ ; and a final extension of 7 minutes at  $72^{\circ}\text{C}$ . All PCRs were performed using Invitrogen *Taq* Platinum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and the Invitrogen dNTP kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). Each PCR tube was prepared as follows: sterilized water, PCR Buffer [1 $\times$ ], mixed dNTPs [200 mM], BSA [16 mg/mL],  $\text{MgCl}_2$  [1.5 mM], each primer [0.10  $\mu\text{M}$ ], Platinum<sup>®</sup> *Taq* polymerase (0.625 U per reaction; Invitrogen Corp., Carlsbad, California), and DNA template [0.5  $\mu\text{g}$ ]. The amplification was performed in an ESCO thermocycler, model MX-BCL-1.

The PCR products were sequenced with the Sanger method in an Applied Biosystems Sequencer Model 3730xL in the Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología, UNAM. All regions were sequenced with the amplification primers. The *trnL-F* spacer was sequenced using external primers c and f, as well as with the internal primers d and e (Taberlet et al. 1991). The GenBank accession numbers of all the sequences used in the phylogenetic analysis are provided in Appendix 1.

**Phylogenetic Analysis**—DNA chromatograms were assembled with Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation 2007). The sequences were exported in FASTA format and aligned with MAFFT 7.0 (Katoh et al. 2002) using the default parameters. The matrix was exported in NEXUS format, and Mesquite 2.75 (Maddison and Maddison 2002) was used for additional manual corrections to the alignment. The number of variable and parsimony-informative characters was calculated with MEGA 7 (Kumar et al. 2016).

Each matrix was analyzed independently with jModelTest 2 (Darriba et al. 2012) to choose the model that best fit the data. We evaluated the 11 default models using the Akaike information criteria test at the 95% level to obtain the best model. The models with the best fit were as follows: *petL-psbE* (TPM1uf + G), *psbA-trnH* (TPM1uf + G), *trnL-F* (TIM1 + G), and *trnQ-rps16* (TPM1uf + G). The matrices corresponding to each region were concatenated. Indels were coded with SeqState 1.4.1 (Müller 2005), which used the simple coding method of Simmons and Ochoterena (2000).

Bayesian inference (BI) was conducted in MrBayes 3.2.1 (Huelsenbeck and Ronquist 2001). *Leuconbergia lychnidiflora* was designated as the outgroup, and ambiguously aligned sites were excluded. The analysis consisted of four Markov chain Monte Carlo chains (nchains = 4) of four million generations (Ngen = 4000000), sampling trees every 1000 generations (samplefreq = 1000) and discarding 25% of the sampled trees (burnin = yes burninfrac = 0.25). Parameter convergence was monitored using Tracer 1.5 (Rambaut 2013). If it was found that the chains had not reached equilibrium, the analysis was repeated using a greater number of generations. Complementarily, the matrix was analyzed with maximum likelihood (ML) using RAXML 8 (Stamatakis 2014). The conditions of both character exclusion and outgroup designation were the same as in BI. A heuristic search of 4000 replicates was performed to obtain the best tree using the GTR + GAMMA model. The trees obtained were visualized and edited in TreeGraph 2 (Stöver and Müller 2010).

Additionally, a phylogenetic analysis was performed combining the molecular character matrix with morphological characters. Six qualitative characters encoded in binary or multistate form (Appendix 2) were chosen. The quantitative characters were selected based on their significance in the first two canonical functions (DCA), as well as in the first and second components (PCA mix). The taxa coded for these characters included the species delimited for *Epithelantha* and the outgroup taxon *Mammillaria mystax* Mart. The resulting matrix was concatenated with the matrix of DNA sequences analyzed with BI. The partition corresponding to the morphological characters was analyzed using the Mkv model (Lewis 2001). The analysis again consisted of four MCMC chains and four million generations. Under ML, two partitions were considered: the DNA sequences were analyzed under the GTR + GAMMA model and the morphological partition under the Mkv model. The CAT command was used to estimate the heterogeneity of rates and to apply the Lewis correction model (2001) for the transition matrix between multistate characters. A heuristic search included 4000 replicates and the calculation of the bootstrap values based on 4000 replicates. The alignments and the resulting trees were deposited in the Dryad Digital Repository (Aquino et al. 2019).

## RESULTS

**Species Delimitation With Morphological Characters**—The PCC indicated that stem height, stem diameter, number of spine series, total number of spines per areole, width of the areole, length of the areole, and length of the lower spine are strongly correlated (Table 2). Consequently, the number of spine series and the length of the lower spine were excluded from the subsequent analyses, and the remaining four characters were transformed into stem height/diameter ratio and areole length/width ratio.

For the DCA, the first canonical function explains 56.6% of the variation, where the character with the greatest weight was the length of the flower (Table 3). Negative values include individuals with flowers smaller than 1 cm in length, e.g. *E. micromeris* (0.6–0.7 cm; Fig. 1). At the opposite extreme, with more positive values, individuals with longer flowers are found, e.g. *E. ilariae* D. Donati & Zanov. (1.7–1.8 cm; Fig. 1). The second canonical function explains 25.1% of the variation and the character with the greatest weight is the number of spines (Table 3). With more negative values are individuals with more spines (e.g. *E. bokei* with 60–70), whereas the most positive values are for those individuals with fewer than 22 spines (e.g. *E. pachyrhiza* (W.T. Marshall) Backeb. subsp. *parvula* D. Donati & Zanov. and *E. cryptica* D. Donati & Zanov.) (Fig. 1). The third through fifth canonical functions explain the remaining variation (18.3%).

TABLE 2. Pearson correlation coefficients calculated for quantitative as qualitative characters. Key to characters: SH = stem height, SDIM = stem diameter, Serie = number of spines series, SpiNu = number of spines, USL = upper spine length, LSL = lower spine length, LAR = length of areole, WAR = width of areole, FLEn = flower length.

|       | SH       | SDIM     | Serie    | SpiNu    | USL      | LSL      | LAR      | WAR      | FLEn     |
|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SH    | 1        | 0.426529 | -0.29323 | -0.38309 | 0.562395 | 0.251776 | 0.34854  | 0.575574 | 0.32748  |
| SDIM  | 0.426529 | 1        | -0.31318 | -0.28085 | 0.369655 | 0.472195 | 0.510013 | 0.47281  | 0.316251 |
| Serie | -0.29323 | -0.31318 | 1        | 0.848153 | -0.31759 | -0.52914 | -0.69376 | -0.32149 | 0.0014   |
| SpiNu | -0.38309 | -0.28085 | 0.848153 | 1        | -0.51573 | -0.6716  | -0.78616 | -0.52191 | -0.05575 |
| USL   | 0.562395 | 0.369655 | -0.31759 | -0.51573 | 1        | 0.617135 | 0.689187 | 0.683615 | 0.026226 |
| LSL   | 0.251776 | 0.472195 | -0.52914 | -0.6716  | 0.617135 | 1        | 0.815759 | 0.530323 | 0.162634 |
| LAR   | 0.34854  | 0.510013 | -0.69376 | -0.78616 | 0.689187 | 0.815759 | 1        | 0.606141 | 0.093399 |
| WAR   | 0.575574 | 0.47281  | -0.32149 | -0.52191 | 0.683615 | 0.530323 | 0.606141 | 1        | 0.381172 |
| FLEn  | 0.32748  | 0.316251 | 0.0014   | -0.05575 | 0.026226 | 0.162634 | 0.093399 | 0.381172 | 1        |

The joint analysis of quantitative and qualitative characters (PCA mix) reveals that components one, two, and three explain 30.9%, 18.2%, and 16.3% of the variation found, respectively (total = 65.4%), with the remaining variation (34.6%) distributed between components four through thirteen. The characters with the most significance in the first component are expansion at the edge of the seed, relief of periclinal wall, and appendages in spines (Appendix 2, character 12). In the second component, the most important character is the areole length/width ratio, whereas in the third component the surface of the seed is the character with greater weight (Table 4). In the first component and with positive values are the individuals of *E. bokei*, *E. greggii* (Engelm.) Orcutt subsp. *potosina* D. Donati & Zanov., and *E. micromeris*, taxa that have no expansion at the edge of the seed. The flat relief of the periclinal wall and the presence of appendages in the spines are characters present only in *E. bokei*, whose individuals are at the extreme of the positive values of the first component. With negative values of the first component are the other taxa whose individuals present expansion at the edge of the seed (Fig. 2A). In the second component and with positive values are individuals with areoles whose length and width are equal (*E. bokei*, *E. greggii* subsp. *greggii*, *E. greggii* subsp. *potosina*, *E. greggii* subsp. *polycephala*, *E. ilariae*, *E. pachyrhiza* subsp. *parvula*, and *E. pachyrhiza* subsp. *pulchra*). Between the values 0 and -2 of the second component are located the individuals with areoles that are twice as long as they are wide (*E. cryptica*, *E. unguispina* (Boed.) D. Donati & Zanov. subsp. *unguispina* and *E. unguispina* subsp. *huastecana* D. Donati & Zanov.), while individuals close to -4 correspond to *E. micromeris*, where the length of the areole is four times longer than the length (Fig. 2A). In the third component and with positive values close to 2, are individuals of *E. pachyrhiza* subsp. *parvula* and *E. pachyrhiza* subsp. *pulchra*, whose

TABLE 3. Canonical structure coefficients for the five quantitative characters analyzed. Significant characters in each function are highlighted in bold.

|                                | Can1           | Can2            | Can3           | Can4           | Can5          |
|--------------------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|---------------|
| Stem height/<br>diameter ratio | 0.20757        | 0.1112          | 0.41986        | 0.8589         | -0.17479      |
| Number of spines               | -0.04347       | <b>-0.87176</b> | -0.45009       | 0.06265        | -0.17787      |
| Upper spine<br>length          | 0.06866        | 0.46961         | 0.49338        | -0.2676        | -0.67802      |
| Areole length/<br>width ratio  | -0.79264       | 0.47156         | -0.38382       | 0.04422        | -0.00892      |
| Flower length                  | <b>0.94826</b> | 0.17853         | -0.26069       | 0.02504        | -0.01858      |
| % Explanation                  | <b>56.6662</b> | <b>25.1668</b>  | <b>13.2468</b> | <b>3.26625</b> | <b>1.6539</b> |

multicellular sculpture (seeds) is rugose; in contrast, all other individuals do not present multicellular sculpture (Fig. 2B).

The results derived from the PLS-DA indicate that the taxa with 100% of their individuals assigned correctly and therefore classified in their own species were: *Epithelantha bokei*, *E. cryptica*, *E. greggii* (Engelm.) Orcutt subsp. *potosina*, *E. greggii* subsp. *polycephala* (Backeb.) D. Donati & Zanov., *E. ilariae*, *E. micromeris*, *E. pachyrhiza* subsp. *parvula*, *E. pachyrhiza* subsp. *pulchra* D. Donati & Zanov., and *E. unguispina* subsp. *huastecana*. The set of taxa with less than 85% are and *E. greggii* (Engelm.) Orcutt subsp. *greggii* and *E. unguispina* subsp. *unguispina* (Table 5).

**Phylogenetic Relationships**—We aligned 245 sequences, 156 of which correspond to unpublished sequences of *Epithelantha*, 87 were from Vázquez-Sánchez et al. (2013), and two were downloaded from GenBank (Appendix 1). Four markers were amplified for both the ingroup and outgroup, with three exceptions: *trnQ-rps16* was not obtained for *Obregonia denegrii* Frič and *Lophophora williamsii* (Salm-Dyck) J.M. Coult., and *petL-pebE* was not obtained for *Pediocactus simpsonii* (Engelm.) Britton & Rose. The aligned matrix of the four concatenated plastid sequences and the encoded indels had a length of 4286 bp, of which only 839 consisted of variable sites, and 440 of those variable sites were parsimoniously informative (PI). The sequences with the greatest number of informative characters were *trnL-F*, followed by *psbA-trnH*, *petL-psbE*, and *trnQ-rps16* (Table 6). An inversion in *psbA-trnH* with a length of 32 bp was observed in 36 of 39 terminals of *Epithelantha* and in *A. capricorne*. No other structural mutations were observed. We excluded 1065 sites of which 852 bp corresponded to an insertion present only in *Leuenbergeria lychnidiflora*, which is not informative, the remaining 213 bp correspond to sites whose alignment was not possible because they are highly variable.

For the BI analysis, the majority-rule consensus (Fig. 3) was calculated from 8002 trees, while the best tree obtained by ML has a likelihood value of -11396.175937. *Epithelantha* is a monophyletic group, supported by three substitutions in *trnL-F*, a substitution in *psbA-trnH*, and an indel in *petL-psbE*, and whose branch support obtained by both BI and ML is elevated (PP = 1.0 and BS = 100). Within the clade, two branches were recovered, the first referred to here as the “E1 clade” has high branch support (PP = 1.0 and BS = 100). *Epithelantha ilariae* is sister to *E. greggii* subsp. *potosina*, *E. bokei*, *E. unguispina* subsp. *unguispina* + *E. unguispina* subsp. *huastecana*, and *E. micromeris* + *E. cryptica* (PP = 1.0 and BS = 96). The second branch, referred to here as the “E2 clade,” is also strongly supported (PP = 1.0 and BS = 100).

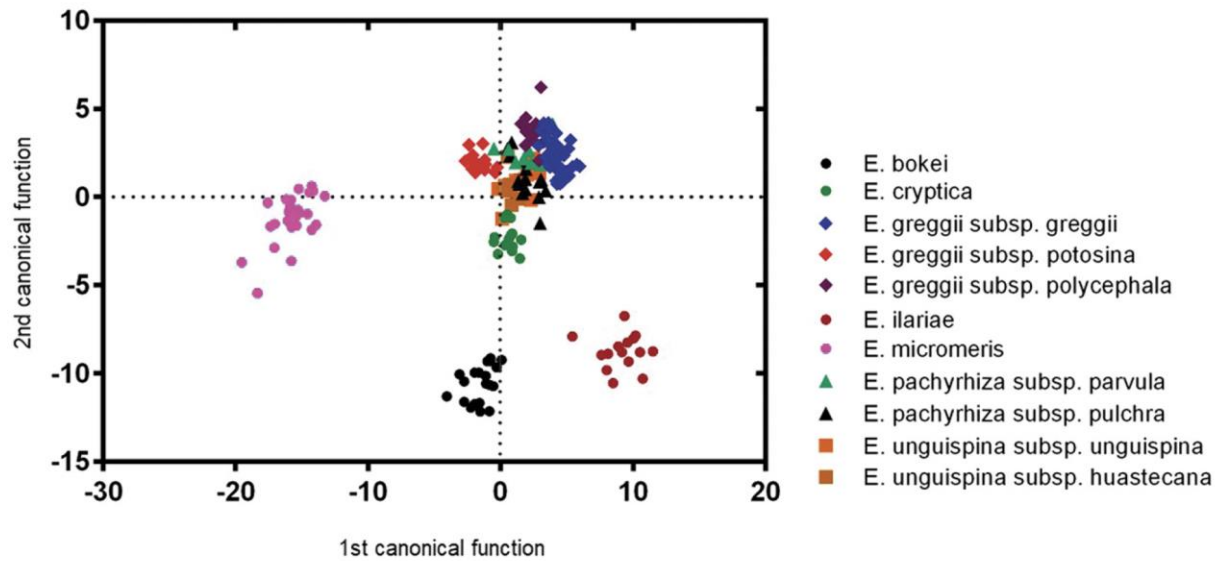


FIG. 1. Graph of the first two discriminant canonical functions using vegetative and reproductive characters for members of *Epithelantha*.

*Epithelantha greggii* (Engelm.) Orcutt subsp. *greggii* and *E. pachyrhiza* (W.T. Marshall) Backeb. subsp. *pulchra* D. Donati & Zanov. are strongly supported sister groups (PP = 1.0 and BS = 100), as are *E. pachyrhiza* (W.T. Marshall) Backeb. subsp. *parvula* D. Donati & Zanov. and *E. greggii* subsp. *polycephala* (PP = 1.0 and BS = 98). *Epithelantha* is sister to *Turbinicarpus*, but with low support (PP = 0.73 and BS < 50). *Ariocarpus*, *Rapicactus*, and *Strombocactus* together with *Epithelantha* and *Turbinicarpus* make up the C1 clade (PP = 0.99 and BS < 50).

**Molecular Analysis and Species Delimitation**—A total of 68 substitutions and 12 indels distributed among the four markers allowed the delimitation of species with molecular markers. From the BI tree (Fig. 3), nine exclusive lineages were recognized from the 39 terminals of *Epithelantha*. A first set of species with multiple individuals grouping together and supported by high support values includes *Epithelantha bokei* (PP = 1.0 and BS = 100), *E. ilariae* (PP = 1.0 and BS = 100), *E. greggii* subsp. *greggii* (PP = 1.0 and BS = 100), *E. greggii* subsp. *polycephala* (PP = 1.0 and BS = 100), *E. greggii* subsp. *potosina* (PP = 1.0 and BS = 100), *E. pachyrhiza* subsp. *parvula* (PP = 1.0 and BS = 100), and *E. pachyrhiza* subsp. *pulchra* (PP = 1.0 and BS = 100). Each of these species is supported by four or more substitutions and up to two indels in three or four

markers (Table 7). A second set includes two putative species, *E. unguispina* subsp. *unguispina* and *E. unguispina* subsp. *huastecana*, united with high to moderate support (PP = 1.0 and BS = 86) and sharing the one substitution in *petL-psbE* and another in *trnQ-rps16*. The third and final set comprises eight terminals representing either *E. micromeris* or *E. cryptica* occurring in a clade with high to low support (PP = 0.98 and BS = 77). Five terminals of *E. micromeris* are resolved in a subclade with high to low support (PP = 0.99 and BS = 61) sustained by a substitution in *trnQ-rps16*, whereas the three terminals of *E. cryptica* form an unresolved group (Fig. 3).

The spines number and flower length were the characters with the greatest weight in the DCA, while the areole length/width ratio is the quantitative character of greater weight in the PCA mix. The comparison of means of Tukey shows that there are significant differences for the three characters. Flower length ( $p < 2.2e^{-16}$ , 188 degrees of freedom) was divided into five-character states, spines number ( $p$  value  $< 2.2e^{-16}$ , 188 degrees of freedom) into six-character states, and the areole length/width ratio ( $p$  value  $< 2.2e^{-16}$ , 188 degrees of freedom) into four-character states (Appendix 2). Additionally, seven qualitative characters analyzed in the PCA mix were included (Appendix 2). The BI and ML resulting from the combination

TABLE 4. Qualitative and quantitative morphological characters in the PCA mix for the first four components (highlighted in bold).

|                                   | Comp. 1            | Comp. 2            | Comp. 3                 | Comp. 4              |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|----------------------|
| Stem height/diameter ratio        | 0.217534357        | 0.145673028        | 0.366876032             | 0.004288231          |
| Number of spines                  | 0.61105423         | 0.215958025        | 8.99327E <sup>-05</sup> | 0.07214056           |
| Upper spine length                | 0.32324628         | 0.122916406        | 0.000440164             | 0.04608423           |
| Areole length/width ratio         | 0.037920641        | <b>0.653567084</b> | 0.022947525             | 0.032146947          |
| Flower length                     | 0.301086609        | 0.335584397        | 0.214554976             | 0.098290007          |
| Appendages in spines              | <b>0.65628785</b>  | 0.172490416        | 0.037726459             | 6.27E <sup>-06</sup> |
| Form of root                      | 0.039575724        | 0.147834885        | 0.566678758             | 5.12E <sup>-06</sup> |
| Hypogeous stem                    | 0.503388306        | 0.074464832        | 0.157064093             | 0.007600763          |
| Expansion at the edge of the seed | <b>0.783220559</b> | 0.071218959        | 0.04494479              | 0.687228568          |
| Keel of the seed                  | 0.141528269        | 0.017688405        | 0.106931903             | 0.495871863          |
| Relief of periclinal wall         | <b>0.679472118</b> | 0.432883997        | 0.176277099             | 0.277852697          |
| Multicellular sculpture           | 0.044067602        | 0.160011444        | <b>0.594199112</b>      | 0.009889937          |
| % Explanation                     | <b>30.98844675</b> | <b>18.21637056</b> | <b>16.34807746</b>      | <b>12.36717998</b>   |



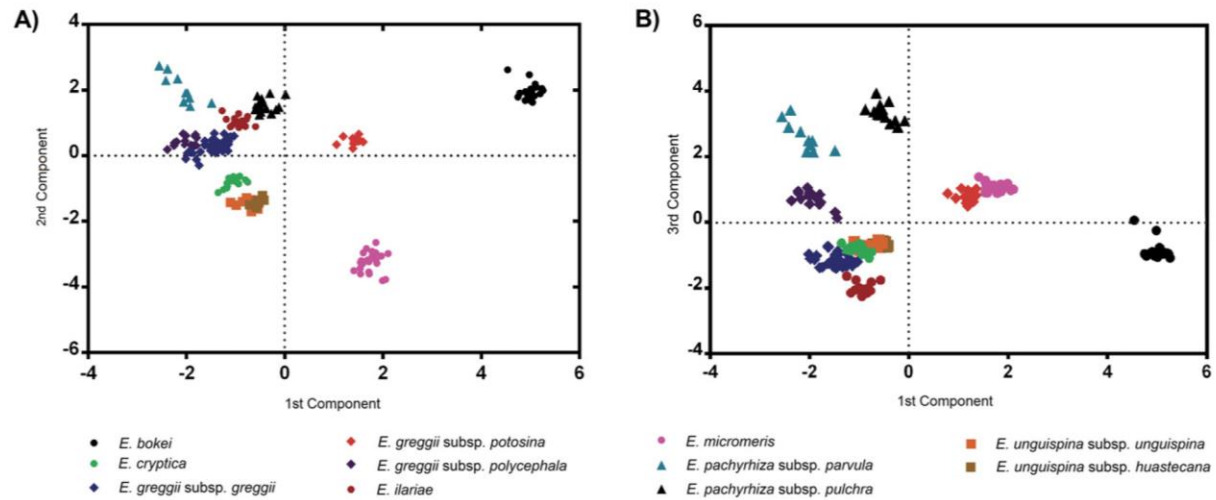


FIG. 2. Principal component analysis for mixed data (PCA mix) where quantitative and qualitative characters are included for the members of *Epithelantha*. A. Graph of the first and second components. B. Graph of the first and third component.

of four cpDNA markers and ten morphological characters (Fig. 4) shows that polytomy between the four terminals of *E. micromeris* and three of *E. cryptica* was resolved into two exclusive lineages: the first corresponds to *E. micromeris* (PP = 1.0 and BS = 98), supported by the morphological characters flower length (< 0.68 cm) and the areole length/width ratio ( $\geq 4.0$ ). The three terminals of *E. cryptica* are moderately supported (PP = 0.91 and BS = 100), with the areole length/width ratio (2.2–2.3) supporting the recovery of the three terminals in an exclusive lineage. The number of spines (> 67) is the morphological apomorphy for *E. bokei* (PP = 1.0 and BS = 100), whereas the average length of the flower (< 1.68 cm) distinguishes *E. ilariae* (PP = 1.0 and BS = 100). Morphological apomorphies were not recognized for the other species. The topology of the *Epithelantha* clade is congruent with the plastid DNA tree, recovering the two branches

corresponding to the clades E1 (PP = 1.0 and BS = 100) and E2 (PP = 1.0 and BS = 100).

#### DISCUSSION

**Phylogenetic Relationships in *Epithelantha***—The inclusion of multiple terminals (39) in the chloroplast sequence analysis, allowed us to corroborate the monophyly of *Epithelantha*, which is strongly supported (PP = 1.0 and BS = 100; Figs. 3, 4). Two previous phylogenetic studies that included *Epithelantha* could not corroborate monophyly of the genus because they only included one species (Butterworth et al. 2002; Vázquez Sánchez et al. 2013). However, Bárcenas et al. (2011) included two terminals corresponding to the same number of species. They reported that *Epithelantha* is not monophyletic, probably because only one marker was used (*trnK/matK*).

TABLE 5. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for 195 individuals determined a priori from *Epithelantha*.

|   | <i>E. bokei</i> | <i>E. cryptica</i> | <i>E. greggii</i> subsp. <i>greggii</i> | <i>E. greggii</i> subsp. <i>polycephala</i> | <i>E. greggii</i> subsp. <i>potosina</i> | <i>E. ilariae</i> | <i>E. micromeris</i> | <i>E. pachyrhiza</i> subsp. <i>parvula</i> | <i>E. pachyrhiza</i> subsp. <i>pulchra</i> | <i>E. unguispina</i> subsp. <i>unguispina</i> | <i>E. unguispina</i> subsp. <i>huastecana</i> | Total |
|---|-----------------|--------------------|---|---|--|-------------------|----------------------|--|--|---|---|-------|
| <i>E. bokei</i>                               | 20              | 0                  | 0                                       | 0   | 0  | 0                 | 0                    | 0  | 0  | 0   | 0   | 20/20 |
| <i>E. cryptica</i>                            | 0               | 15                 | 0                                       | 0   | 0  | 0                 | 0                    | 0  | 0  | 0   | 0   | 15/15 |
| <i>E. greggii</i> subsp. <i>greggii</i>       | 0               | 0                  | 38                                      | 7   | 0  | 0                 | 0                    | 0  | 0  | 0   | 0   | 38/45 |
| <i>E. greggii</i> subsp. <i>polycephala</i>   | 0               | 0                  | 0                                       | 15  | 0  | 0                 | 0                    | 0  | 0  | 0   | 0   | 15/15 |
| <i>E. greggii</i> subsp. <i>potosina</i>      | 0               | 0                  | 0                                       | 0   | 15                                       | 0                 | 0                    | 0  | 0  | 0   | 0   | 15/15 |
| <i>E. ilariae</i>                             | 0               | 0                  | 0                                       | 0   | 0  | 15                | 0                    | 0  | 0  | 0   | 0   | 15/15 |
| <i>E. micromeris</i>                          | 0               | 0                  | 0                                       | 0   | 0  | 0                 | 25                   | 0  | 0  | 0   | 0   | 25/25 |
| <i>E. pachyrhiza</i> subsp. <i>parvula</i>    | 0               | 0                  | 0                                       | 0   | 0  | 0                 | 0                    | 10   | 0  | 0   | 0   | 10/10 |
| <i>E. pachyrhiza</i> subsp. <i>pulchra</i>    | 0               | 0                  | 0                                       | 0   | 0  | 0                 | 0                    | 0  | 15   | 0   | 0   | 15/15 |
| <i>E. unguispina</i> subsp. <i>unguispina</i> | 0               | 0                  | 0                                       | 0   | 0  | 0                 | 0                    | 0  | 0  | 7   | 3   | 7/10  |
| <i>E. unguispina</i> subsp. <i>huastecana</i> | 0               | 0                  | 0                                       | 0   | 0  | 0                 | 0                    | 0  | 0  | 0   | 10  | 10/10 |
| % explanation                                 | 100             | 100                | 84.4                                    | 100   | 100                                      | 100               | 100                  | 100  | 100  | 70  | 100   |       |

TABLE 6. Characteristics of the sequences used in this study.

|  | <i>petL-psbE</i> | <i>psbA-trnH</i> | <i>trnL-F</i> | <i>trnQ-rps16</i> | Indels    | Combination |
|--|------------------|------------------|---------------|-------------------|-----------|-------------|
| Number of sequences per marker           | 61               | 62               | 62            | 60                | 62        | 62          |
| Position in the alignment                | 1–1743           | 1744–2468        | 2469–3639     | 3640–4263         | 4264–4286 | 1–4286      |
| Length in the alignment                  | 1743             | 725              | 1171          | 624               | 23        | 4286        |
| Variation of the unaligned length        | 384–1345         | 318–593          | 839–1097      | 294–601           | 23        | 1947–3426   |
| Mean length unaligned                    | 609              | 434              | 976           | 430               | 23        | 2450        |
| Number of variable sites                 | 211              | 194              | 282           | 129               | 23        | 839         |
| Number of variable and informative sites | 87               | 133              | 142           | 55                | 23        | 440         |
| Number of excluded characters            | 852              | 69               | 108           | 36                | —         | 1065        |
| Inversions                               | 0                | 1                | 0             | 0                 | —         | 1           |
| Substitution model                       | TPM1uf + G       | TPM1uf + G       | TIM1 + G      | TPM1uf + G        | —         | —           |

This phylogenetic hypothesis is partially congruent with the results of Butterworth et al. (2002), who found that *E. bokei* is the sister of *Turbincarpus* s. l., *Pediocactus*, and *Ariocarpus*. In the present analysis, *Epithelantha*, *Turbincarpus*, *Ariocarpus*, *Rapicactus*, and *Strombocactus* make up the C1 clade (with low support), which is sister to the C2 + C3 clades. The sister relationship between *Oregonia* and *Lophophora* recovered here with high support (PP = 1.0 and BS = 100) agrees with results from previous studies (Butterworth et al. 2002; Hernández-Hernández et al. 2011; Vázquez-Sánchez et al. 2013). The clade C3 is equivalent to the “Mammilloide clade” sensu Butterworth et al. (2002), which is strongly supported (PP = 1.0 and BS = 99). Together, clades C1, C2, and C3 make up the “core Cactaceae” (Vázquez-Sánchez et al. 2013). Two clades within *Epithelantha*, E1 and E2, are recovered with high support. The E1 clade (PP = 1.0 and BS = 100) is composed of five taxa; *E. ilariae*, the sister species of the remaining members of the E1 clade, has the greatest floral length (1.7–1.8 cm), compared to less than 1.2 cm in the other species. Four taxa are well defined with high support (*E. bokei*, *E. ilariae*, *E. greggii* subsp. *potosina*, and two subspecies of *E. unguispina*; Fig. 4). The E2 clade (PP = 1.0 and BS = 100) includes four taxa that share the presence of enlarged roots, except for *E. greggii* subsp. *greggii*, which possesses ordinary slender roots sensu Stone-Palmquist and Mauseth (2002).

**Contribution of Coded Markers and Indels**—The inclusion of four markers (*petL-psbE*, *psbA-trnH*, *trnL-F*, and *trnQ-rps16*) allowed the recovery of monophyletic groups. These markers offered resolution at the genus and species level. Korotkova et al. (2011) used two of the same markers used here (*psbA-trnH* and *trnQ-rps16*) and were able to infer the phylogeny of Rhipsalideae, while delimiting species within the genus *Rhipsalis* Gaertn. The contribution of *petL-psbE* in this study was significant because in this sequence an indel is presented that supports the monophyly of *Epithelantha*, as well as providing one of the two characters that support the identity of *E. unguispina*. This marker was also relevant in other phylogenetic analyses in Cactaceae, both at the infraspecific level (*Cereus* Mill., Silva et al. 2016), and in the delimitation of genera and major categories (*Gymnocalycium* Pfeiff. ex Mittler, Demaio et al. 2011; *Pilosocereus* Byles & G.D. Rowley, Calvente et al. 2016). The *trnL-F* spacer had the greatest number of phylogenetically informative sites, including three synapomorphies that support the monophyly of *Epithelantha* and it contributes characters in the delimitation of six of the eleven putative species. This marker has been used mainly in phylogenetic analyses (Vázquez-Sánchez et al. 2013; Cruz et al. 2016; Korotkova et al. 2017, among others), and we confirm that it provided resolution at both the species and genus levels.

**Species Delimitation in *Epithelantha***—The combined morphological and molecular analysis has shown utility in the delimitation of species in taxonomically complex groups. The combination of these two sources of information is useful in the identification of the taxa involved. The agreement of phenotypes with genotypes helps in the definition of boundaries between species, which is why it is recommended that the individuals employed in the morphological analysis are the same as those used in molecular analysis (Andrés-Sánchez et al. 2009). In the molecular and morphometric analysis, the E1 clade is composed of six species. *Epithelantha bokei* is characterized by having the greatest number of spines per areole (60–80) with small persistent appendages on them (Fig. 5A–B), as well as six substitutions in the plastid markers included in this study (Table 7). *Epithelantha ilariae* has fewer than 40 spines per areole, with no appendages on the spines and flowers of 1.7–1.8 cm in length (Fig. 5G–H), and eight substitutions (Table 7). The three terminals of *E. greggii* subsp. *potosina* (sensu Donati and Zanovello 2010) are recovered in a different clade from the *E. greggii* subsp. *greggii* (Figs. 3, 4). On the other hand, the DCA and PCA mix allow corroborating that the morphological attributes analyzed are discriminating between the two supposed subspecies. In addition, PLS-DA confirms that all individuals assigned to the first subspecies are classified in their own group. Therefore, we postulate the hypothesis that *E. greggii* subsp. *potosina* corresponds to an exclusive lineage (see Taxonomic Treatment) and is recognized by stems smaller than 6.5 cm in diameter, 39–43 spines per areole, and the presence of enlarged roots, as well as five substitutions (Fig. 5E; Table 7). Terminals of *E. unguispina* subsp. *unguispinia* and *E. unguispina* subsp. *huastecana* are maintained in a single subclade with good support (Fig. 4). The morphological characters considered with DCA and PCA mix are similar as is the number of spines (19–25), the presence of hypogeous stem, and the areole length/width ratio (1.2–2.1; Fig. 5L). Donati and Zanovello (2010) described *E. unguispina* subsp. *huastecana* based on similarities in the development and early disposition of the spines on the areole (not evaluated here). They also pointed out that they share the same ecological requirements (both are established on slopes with calcareous soils). Based on our results, the variation in “*E. unguispina* subsp. *huastecana*” fits within the variation of *E. unguispina* (see Taxonomic Treatment). A review of the characters of *E. spinosior* C. Schmoll allows us to conclude that there are no differences with respect to *E. unguispina*. From the description of Schmoll (1951), the diameter of the stem in *E. spinosior* is 4.5 cm while *E. unguispina* is 5.0 cm and in both taxa the elliptical areole is present. Therefore, we consider that the morphological variation of *E. spinosior* agrees with that of *E. unguispina* (see Taxonomic Treatment). A nomenclatural

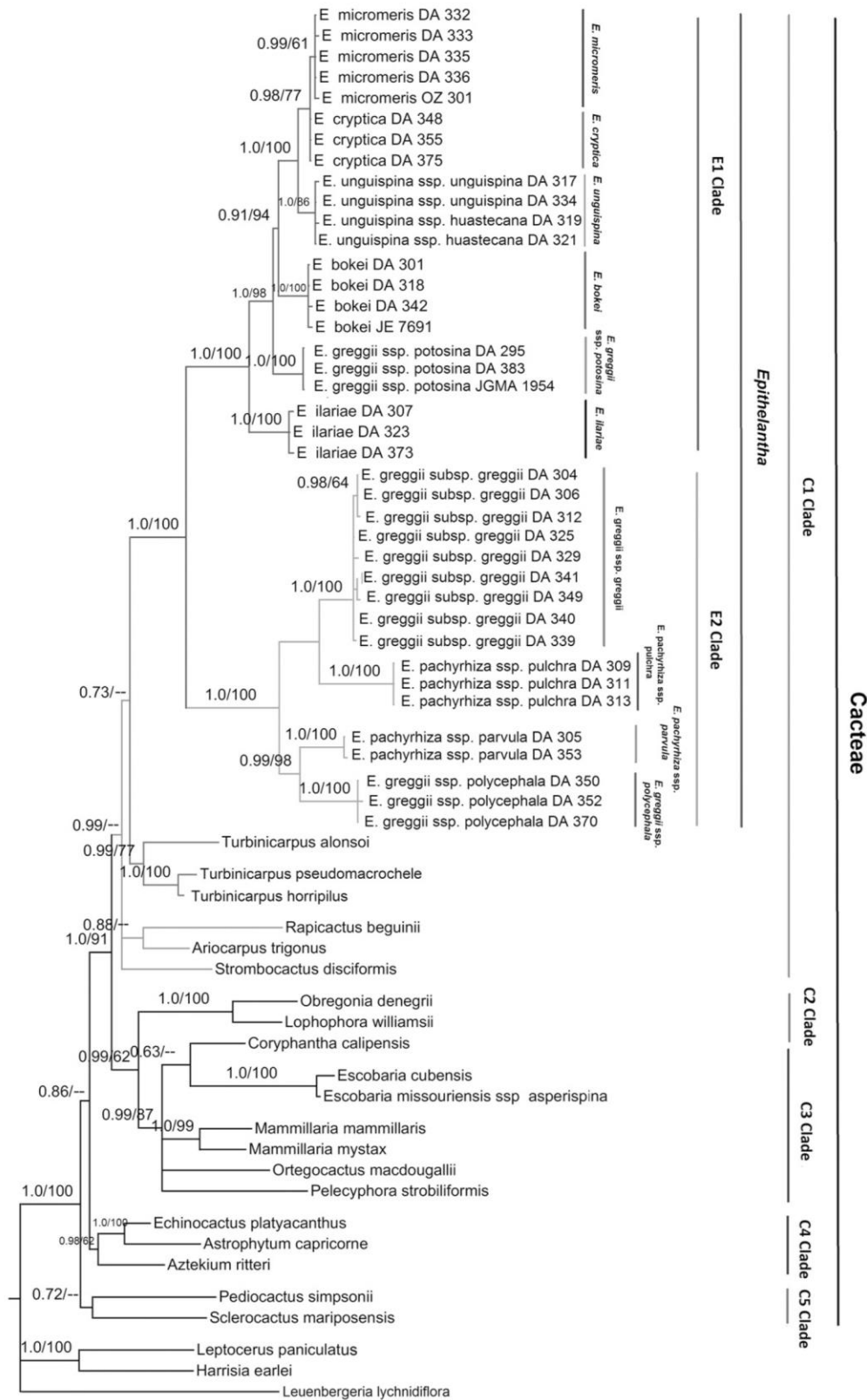


FIG. 3. Majority-rule consensus tree resulting from BI with four cpDNA markers. The values on the branches correspond to the BI posterior probability (right) and the ML bootstrap (left). A dash (-) represents BS < 50.

TABLE 7. Molecular characters that distinguish the species of *Epithelantha*.

| Taxon   | Number of characters | Type of character, marker in which it is found, and position in the general alignment where it is located   |
|---|----------------------|---|
| <i>Epithelantha bokei</i>                               | 8                    | Substitutions: <i>petL-psbE</i> (1636), <i>psbA-trnH</i> (1791, 1866, 2442), <i>trnL-F</i> (2477), <i>trnQ-rps16</i> (4202).<br>Indels: <i>petL-psbE</i> (1481–1489), <i>trnQ-rps16</i> (3843–4078)   |
| <i>Epithelantha cryptica</i>                            | N/A                  | —   |
| <i>Epithelantha greggii</i> subsp. <i>greggii</i>       | 6                    | Substitutions: <i>petL-psbE</i> (84), <i>psbA-trnH</i> (2153, 2249, 2255) <i>trnQ-rps16</i> (4029).<br>Indels: <i>petL-psbE</i> (1481–1489)   |
| <i>Epithelantha greggii</i> subsp. <i>polycephala</i>   | 12                   | Substitutions: <i>psbA-trnH</i> (2107, 2113, 2139, 2162, 2172, 2174, 2181, 2184), <i>trnL-F</i> (2828, 3011)<br>Indels: <i>petL-psbE</i> (75–78), <i>trnQ-rps16</i> (4147–4156)   |
| <i>Epithelantha greggii</i> subsp. <i>potosina</i>      | 5                    | Substitutions: <i>psbA-trnH</i> (2366), <i>trnL-F</i> (2490, 3186, 3492), <i>trnQ-rps16</i> (4205)  |
| <i>Epithelantha ilariae</i>                             | 12                   | Substitutions: <i>petL-psbE</i> (90, 1668), <i>psbA-trnH</i> (2366), <i>trnL-F</i> (3091, 3276, 3295, 3367), <i>trnQ-rps16</i> (4162)<br>Indels: <i>petL-psbE</i> (467–1400), <i>trnL-F</i> (2502–2503, 2657–2827), <i>trnQ-rps16</i> (3802–4087) |
| <i>Epithelantha micromeris</i>                          | 1                    | Substitutions: <i>trnQ-rps16</i> (3650)   |
| <i>Epithelantha pachyrhiza</i> subsp. <i>parvula</i>    | 15                   | Substitutions: <i>petL-psbE</i> (785), <i>psbA-trnH</i> (1796, 1942, 2142, 2249, 2306), <i>trnL-F</i> (2626, 3288, 3509), <i>trnQ-rps16</i> (3732, 3744, 3985)<br>Indels: <i>psbA-trnH</i> (2160–2187, 2196–2242), <i>trnL-F</i> (2481–2621)      |
| <i>Epithelantha pachyrhiza</i> subsp. <i>pulchra</i>    | 19                   | Substitutions: <i>petL-psbE</i> (1453, 1629), <i>psbA-trnH</i> (2085, 2106, 2271, 2243, 2299, 2301, 2314, 2360, 2361), <i>trnL-F</i> (2806, 3072, 3161, 3518, 3519, 3520, 3521, 3522)   |
| <i>Epithelantha unguispina</i> subsp. <i>unguispina</i> | 2                    | Substitutions: <i>petL-psbE</i> (96), <i>trnQ-rps16</i> (4260)  |
| <i>Epithelantha unguispina</i> subsp. <i>huastecana</i> | N/A                  | —   |

reconsideration on name priority for species level is required, in accordance with the ICN (Turland et al. 2018, Art. 11.2; see Taxonomic Treatment). The last subclade contains five terminals of *Epithelantha micromeris* and three of *E. cryptica*, of which only *E. micromeris* is supported by a single apomorphy (*trnQ-rps16*). The combination of morphological data and DNA sequences allowed the resolution of this subclade. Pante et al. (2014) mention that lineages in which the speciation process is in progress requires an alternative source of information so that the lineage identity hypothesis can be more or less consistent. According to the results of the DCA and the PCA mix, the length of the flowers (0.6–0.7 in *E. micromeris*, 1.1–1.2 cm in *E. cryptica*; Fig. 5C, I), as well as the areole length/width ratio (greater than 4 in *E. micromeris* and 1.1–1.2 in *E. cryptica*) are the characters that allow individuals to be discriminated. In a phylogenetic context, these are the apomorphies of each taxon. The PLS-DA recovers the individuals of both species in their respective groups with 100% success, so we consider that they should be treated as distinct species.

The E2 clade is composed of four species according to molecular analysis. *Epithelantha greggii* subsp. *greggii* and *E. greggii* subsp. *polycephala* are recovered as exclusive lineages, both with high support (PP = 1.0 and BS = 100). Six apomorphies support *E. greggii* subsp. *greggii* (Figs. 3, 4; Table 7) and twelve are present in *E. greggii* subsp. *polycephala* (Figs. 3, 4; Table 7). The PLS-DA recovers 84.4% of the individuals identified as *E. greggii* subsp. *greggii* and 100% as *E. greggii* subsp. *polycephala* in their respective groups, where only an individual determined as *E. greggii* subsp. *greggii* was classified in *E. greggii* subsp. *polycephala*. According to the PCA mix, the character that distinguishes them is the presence of an ordinary slender root in *E. greggii* subsp. *greggii* (Fig. 5D), whereas in *E. greggii* subsp. *polycephala* the roots are enlarged (Fig. 5F). The samples DA 339 and DA 340 correspond to individuals identified as *Epithelantha rufispina* Bravo. The results indicate that it is not possible to segregate it from

*E. greggii*, the molecular analysis recovers the two terminals in a clade strongly supported (PP = 1.0 and BS = 100), and in addition, the PLS-DA recovered all the individuals in a single set with *E. greggii*. Therefore, we consider that *E. rufispina* does not merit recognition at the species level. The sample DA 306 corresponds to *E. densispina* Bravo, the morphological characters as the spines number observed in the location DA 306 goes from 20 to 25 and the flower length is from 1.25 cm to 1.36 cm, while, in the individuals of the eight locations corresponding to *E. greggii*, the spines number is from 19 to 30 and the flower length is 1.21 cm to 1.36 cm, therefore, the DCA does not discriminate between individuals determined a priori. This result is supported by molecular evidence; together, the nine terminals are strongly supported (PP = 1.0 and BS = 100), therefore *E. densispina* can not be recognized as an exclusive lineage. It was not possible to obtain localities records corresponding to *E. petri* Halda & Horáček. The diagnostic characters are: presence of ordinary slender root, stem height of 80 mm high, cylindrical, and brown spines (Halda et al. 2002). From this information and complementing it with observations of specimens collected in the type locality (*Elizondo* 423 034833 ANSM, *Hernández* 2283 0649031/1027418 MEXU), *E. petri* does not merit recognition, because the root type (ordinary slender root), length of the stem (more than 8.0 cm), shape of the areole (circular), number of spines (from 18 to 21) and the spines color that varies from white to brown, even with reddish tones, allow us to confirm that the variation range of *E. petri* is congruent to that of *E. greggii*. The PCA mix reveals that multicellular sculpture is a significant character, where the absence of this sculpture is common in most of the *Epithelantha* taxa (Fig. 5O). However, *E. pachyrhiza* subsp. *pulchra* and *E. pachyrhiza* subsp. *parvula* present a rugose multicellular sculpture (Fig. 5N), as well as an expansion at the edge of the seed (Fig. 5M). These two differences support our proposal to recognize these two taxa as different lineages. The support values for *E. pachyrhiza* subsp. *parvula* are high (PP = 1.0 and

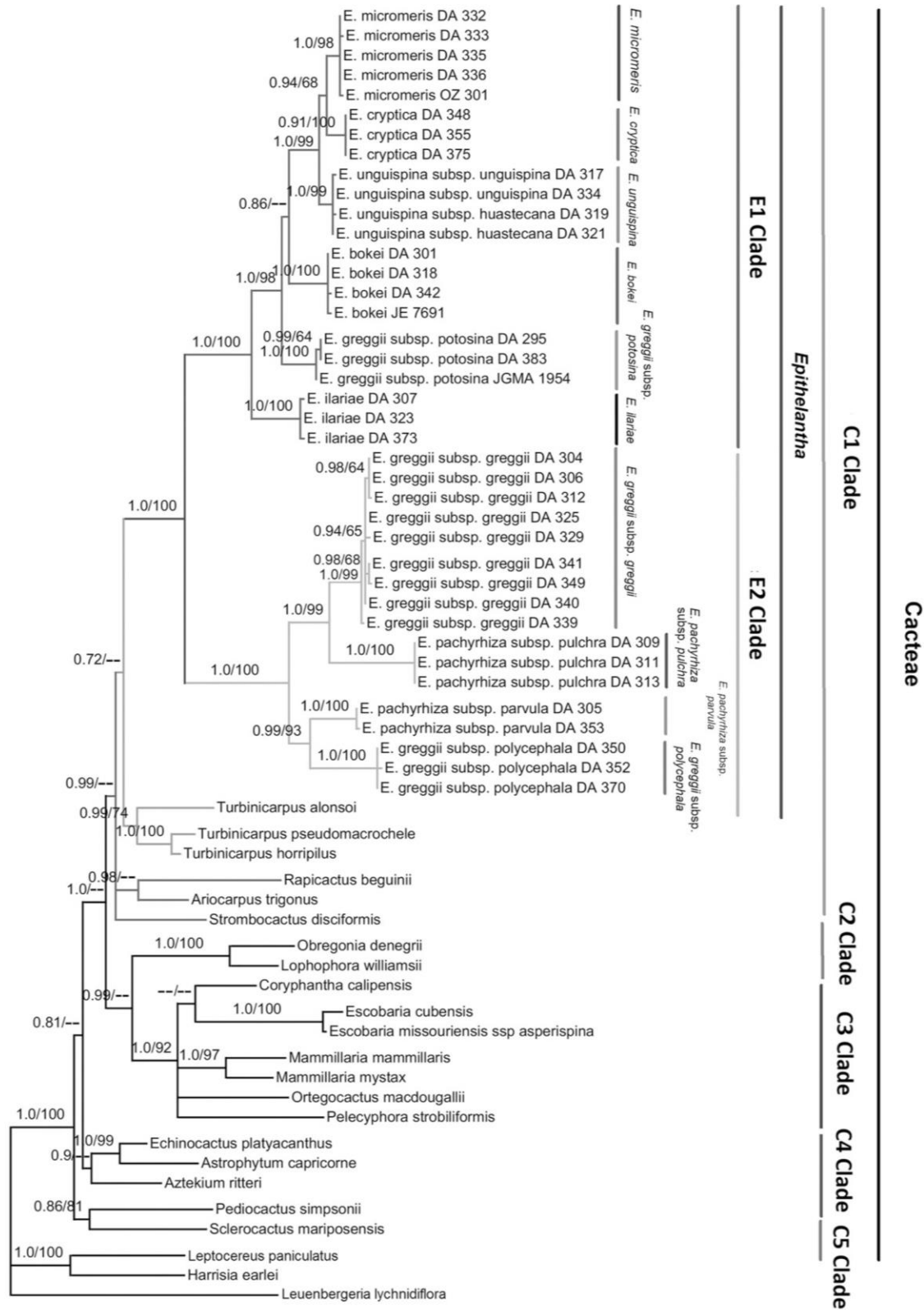


FIG. 4. Majority-rule consensus tree from BI resulting from the combination of four cpDNA markers and ten morphological characters. The values on the branches correspond to the BI posterior probability (right) and the ML bootstrap (left). A dash (-) represents BS < 50.



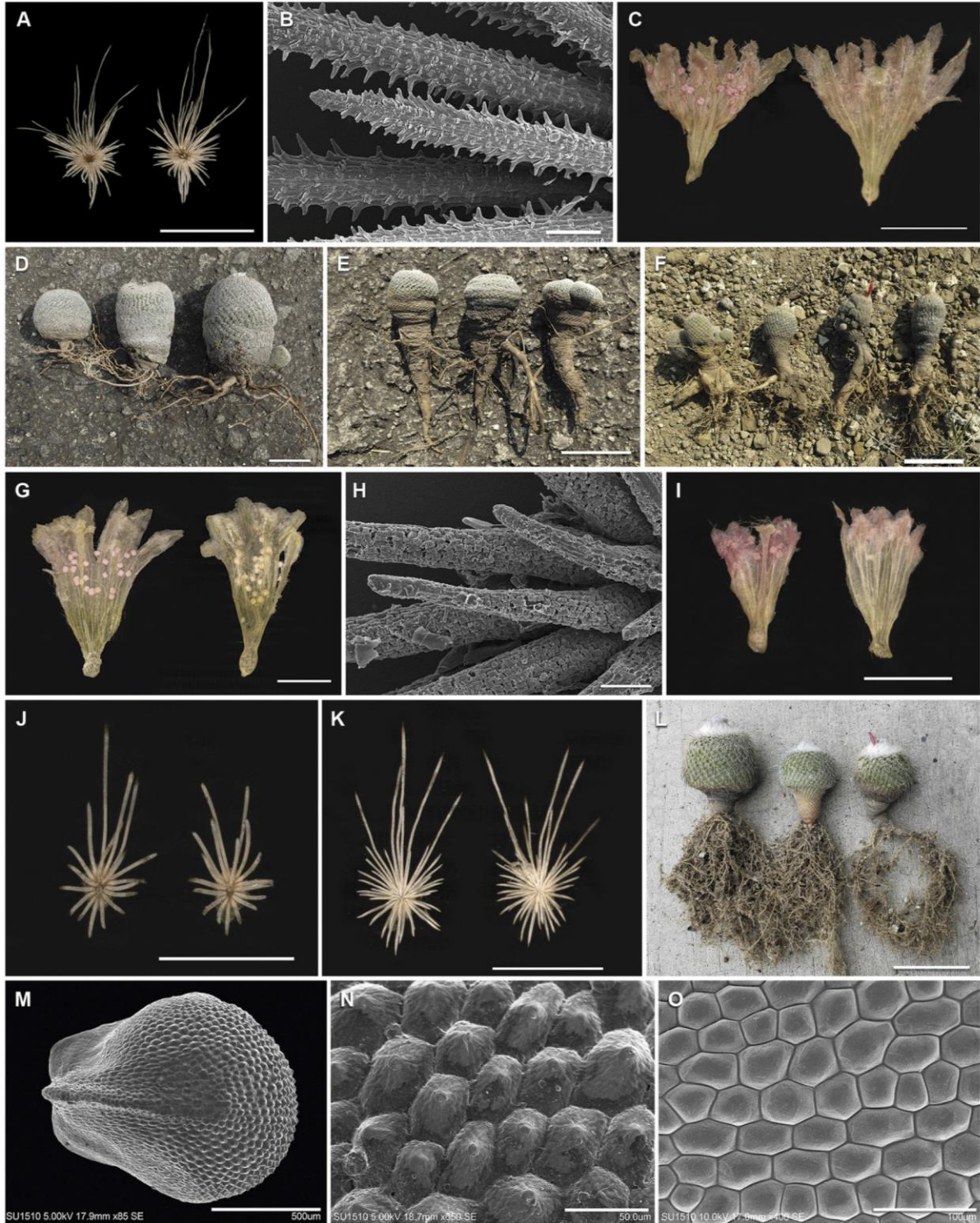


FIG. 5. Distinctive characters of members recognized in *Epithelantha*. A. Spines in *Epithelantha bokei* (D. Aquino 318, MEXU). B. Micrograph of *E. bokei* spines (D. Aquino 318, MEXU). C. Dimensions of *E. cryptica* flowers (D. Aquino 375, MEXU). D. Stems in *E. greggii* (D. Aquino 312, MEXU). E. Stems in *E. potosina* (D. Aquino 383, MEXU). F. Stems in *E. polycephala* (D. Aquino 350, MEXU). G. Flowers of *E. ilariae* (D. Aquino 307, MEXU). H. Spines in *E. ilariae* (D. Aquino 323, MEXU). I. Flowers of *E. micromeris* (D. Aquino 333, MEXU). J. Spines in *E. pachyrhiza* (D. Aquino 305, MEXU). K. Spines in *E. pulchra* (D. Aquino 309, MEXU). L. Stems in *E. spinosior* (D. Aquino 334, MEXU). M. Micrograph of *E. pachyrhiza* seed, showing an expansion at the edge of the hilar region (D. Aquino 305, MEXU). N. Multicellular sculpture rugose in *E. pachyrhiza* seed (D. Aquino 305, MEXU). O. Multicellular sculpture absent in *E. potosina* seed (D. Aquino 295, MEXU).

BS = 100). The two terminals are supported by 15 apomorphies (Table 7). In turn, the PLS-DA recovers 100% of the individuals determined a priori in their own species, and the DCA indicates that the number of spines (16–21) and the areole length/width ratio (1.5–1.7) distinguish this taxon (Fig. 5j). The three terminals of *E. pachyrhiza* subsp. *pulchra* were united with high branch support (PP = 1.0 and BS = 100) and are supported by 19 apomorphies (Table 7). The morphological characters that distinguish it are the number of spines (40–55), and the areole length/width ratio (equal to 1). Finally, the PLS-DA recovers in its own group 100% of the individuals determined a priori. The descriptions of *E. pachyrhiza* subsp. *pachyrhiza* and *E. pachyrhiza* subsp. *elongata* are short and not informative (Marshall 1944; Backeberg 1954). Based on data from Donati and Zanolli (2010, 2011) and our results, we consider that the two taxa cited + *E. pachyrhiza* subsp. *parvula* make up only one species. This is based on similarity in spines number (18 to 34 in *E. pachyrhiza* subsp. *pachyrhiza*, 18 to 36 in *E. pachyrhiza* subsp. *elongata*, and 16 to 21 in *E. pachyrhiza* subsp. *parvula*), and besides that, all three taxa exhibit elliptical areoles. On the contrary, the number of spines (40 to 55) and the circular areole shape allow us to recognize *E. pachyrhiza* subsp. *pulchra* as an independent species (see Taxonomic Treatment).

#### TAXONOMIC TREATMENT

In this work, ten species of *Epithelantha* are recognized. Two new combinations, seven lectotypes, and one epitype are proposed.

EPITHELANTHA F.A.C. Weber ex Britton & Rose, Cactaceae 3: 92. 1922. TYPE: *Mammillaria micromeris* Engelm., Proc. Amer. Acad. Arts 3: 260. 1856.

1. EPITHELANTHA BOKEI L.D. Benson, Cact. Succ. J. (Los Angeles) 41: 185. 1969 = *Epithelantha micromeris* (Engelm.) Britton & Rose var. *bokei* (L.D. Benson) Glass & R.A. Foster, Cact. Succ. J. (Los Angeles) 50: 185. 1978 = *Epithelantha micromeris* (Engelm.) Britton & Rose subsp. *bokei* (L.D. Benson) U. Guzmán, Cactaceae Syst. Init. 16: 17. 2003. TYPE: USA. Texas, Brewster, Limestone hills near Boquillas Canyon, 12 July 1955, N. Boke s.n. (holotype: POM 285740!).
2. EPITHELANTHA CRYPTICA D. Donati & Zanov., *Epithelantha* 55. 2011. TYPE: MÉXICO. Coahuila, Castaños, La Muralla, 23 Feb 2011, G. S. Hinton & D. Donati 29258 (holotype: GBH 029258!; isotype: MEXU 1347949!).
3. EPITHELANTHA GREGGII (Engelm.) Orcutt, Cactography 5. 1926 = *Mammillaria micromeris* Engelm. var. *greggii* Engelm., Proc. Amer. Acad. Arts 3: 261. 1856 = *Mammillaria greggii* (Engelm.) Saff., Annual Rep. U.S. Natl. Mus. 531. 1908 = *Cephalomammillaria micromeris* (Engelm.) Frič var. *greggii* (Engelm.) Frič, Českoslov. Zahradn. Listy 120. 1924 = *Epithelantha micromeris* (Engelm.) Britton & Rose var. *greggii* (Engelm.) Borg, Cacti 212. 1937 = *Epithelantha micromeris* (Engelm.) Britton & Rose subsp. *greggii* (Engelm.) N.P. Taylor, Cactaceae Consensus Init. 5: 12. 1998. LECTOTYPE (designated by Benson, 1969): MÉXICO. Coahuila, "near Saltillo" 1848, J. Gregg 508 (lectotype: MO 209558!; isolectotype: GH 00063154!). Note: lectotype specimen included additional data: Mountain ridge between La Azufrosa and Perros Bravos, 22 Sept 1848.
  - = *Epithelantha densispina* Bravo, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México 22: 19. 1951. TYPE: MÉXICO. Coahuila (not preserved). LECTOTYPE (designated here): illustration of "*Epithelantha densispina* n. sp." in Bravo, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México. 19: Fig. 3. 1951.
  - = *Epithelantha rufispina* Bravo, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México 22: 22. 1951. TYPE: MÉXICO. Coahuila (not preserved). LECTOTYPE (designated here): illustration of "*Epithelantha rufispina* n. sp." in Bravo, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México. 22: Fig. 5. 1951.
  - = *Epithelantha petri* Halda & Horáček, Acta Mus. Richnov., Sect. Nat. 7: 72. 2000. TYPE: MÉXICO. Coahuila, Mexico septentrionalis, (Cerro Bala [Bola]) in declivibus petrosis, solo calcareo, 1700 m, 13 May 1985, J.J. Halda & L. Horáček 850513 (holotype PR Not observed).
4. EPITHELANTHA ILARIAE D. Donati & Zanov., Piante Grasse 30: 186. 2010. TYPE: MÉXICO. Nuevo León, Ciénega de Flores, North of Ciénega de Flores, 9 June 2009, G. S. Hinton & D. Donati 29075 (holotype: GBH 029075!; isotype: MEXU 1347950!).
5. EPITHELANTHA MICROMERIS (Engelm.) Britton & Rose, Cactaceae 3: 93. 1922 = *Mammillaria micromeris* Engelm., Proc. Amer. Acad. Arts 3: 260. 1856 = *Cactus micromeris* (Engelm.) Kuntze, Revis. Gen. Pl. 1: 260. 1891 = *Echinocactus micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber, Dict. Hort. 804. 1898 = *Cephalomammillaria micromeris* (Engelm.) Frič, Zivot v Prirode 29: 9. 1925. LECTOTYPE (designated by Benson, 1982): USA. Texas, From El Paso eastward to the San Pedro river, 1851, C. Wright (Lectotype: MO 2239950!; isolectotype: POM 317816!). Note: lectotype specimen included additional data: From to the San Filipe creek to the Pecos.
6. EPITHELANTHA PACHYRHIZA (W.T. Marshall) Backeb., Cactus (Paris) 39: 31. 1954 = *Epithelantha micromeris* (Engelm.) Britton & Rose var. *pachyrhiza* W.T. Marshall, Cact. Succ. J. (Los Angeles) 16: 161. 1944 = *Epithelantha micromeris* (Engelm.) Britton & Rose subsp. *pachyrhiza* (W.T. Marshall) N.P. Taylor, Cactaceae Consensus Init. 5: 13. 1998. TYPE: MÉXICO. Coahuila, Rancho San José de Perral, eighteen miles southeast of Saltillo, R. E. Flores s.n. (not located). LECTOTYPE (designated here): illustration of "*Epithelantha micromeris* var. *pachyrhiza* var. nov." in Marshall, Cact. Succ. J. (Los Angeles) 16: 161. Figure 150. 1944.
  - = *Epithelantha pachyrhiza* (W.T. Marshall) Backeb. var. *elongata* Backeb., Cactus (Paris) 39: 32. 1954 = *Epithelantha pachyrhiza* (W.T. Marshall) Backeb. subsp. *elongata* (Backeb.) D. Donati & Zanov., Piante Grasse 30: 185. 2010. TYPE: MÉXICO. Coahuila, Inconnue, probablement aussi Coahuila. F. Schwarz s.n. (not preserved). LECTOTYPE designated here: illustration of "*Epithelantha pachyrhiza* var. *elongata* Backbg. n. var." in Backeberg, Cactus (Paris) 39: 32. Figure 17. 1954.
  - = *Epithelantha pachyrhiza* (W.T. Marshall) Backeb. subsp. *parvula* D. Donati & Zanov., Piante Grasse 30: 185. 2010. TYPE: MÉXICO. Coahuila, Ramos Arizpe, Hipólito, 24 Oct 2010. G. S. Hinton & D. Donati 29211 (holotype: GBH 029211!).



7. *EPITHELANTHA POLYCEPHALA* Backeb., *Cactus* (Paris) 39: 32. 1954 = *Epithelantha micromeris* (Engelm.) Britton & Rose var. *polycephala* (Backeb.) Glass & R.A. Foster, *Cact. Succ. J.* (Los Angeles) 50: 187. 1978 = *Epithelantha micromeris* (Engelm.) Britton & Rose subsp. *polycephala* (Backeb.) Glass, *Guía Identific. Cact. Amenazadas México* 1: Ep/mi ssp. *polycephala*. 1997 = *Epithelantha greggii* (Engelm.) Orcutt subsp. *polycephala* (Backeb.) D. Donati & Zanov., *Piante Grasse* 30: 185. 2010. TYPE: MÉXICO. Coahuila. Ramos Arizpe, Près de Ramos Aris[z]pe, lieux ensoleillés, collines schisteuses (!), sol pauvre. F. Schwarz s.n. (not preserved). LECTOTYPE (designated here): illustration of "*Epithelantha polycephala* Backbg. n. sp." in Backeberg, *Cactus* (Paris) 39: 32. Figure 18. 1954.
8. *EPITHELANTHA POTOSINA* (D. Donati & Zanov.) Aquino & S. Arias comb. et stat. nov. = *Epithelantha greggii* (Engelm.) Orcutt subsp. *potosina* D. Donati & Zanov., *Piante Grasse* 30: 186. 2010. TYPE: MÉXICO. San Luis Potosí, Guadalcázar, East of Charco Blanco, 30 Sept 2010, G. S. Hinton & D. Donati 29229 (holotype: GBH 029229!).
9. *EPITHELANTHA PULCHRA* (D. Donati & Zanov.) Aquino & S. Arias comb. et stat. nov. = *Epithelantha pachyrrhiza* (W.T. Marshall) Backeb. subsp. *pulchra* D. Donati & Zanov., *Piante Grasse* 30: 185. 2010. TYPE: MÉXICO. Nuevo León, Mina, Icamole, 9 June 2009, G. S. Hinton & D. Donati 29078 (holotype: GBH 029078!).
10. *EPITHELANTHA SPINOSIOR* C. Schmoll, *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México* 22: 11. 1951. TYPE: MÉXICO. Coahuila, C. Schmoll, s.n. (not preserved). LECTOTYPE (designated here): illustration of "*Epithelantha spinosior* n. sp." in C. Schmoll, *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. México*. 22: Fig. 1. 1951. EPITYPE (designated here): MÉXICO. Nuevo León, El Salitre, 28 May. 2004 G.B. Hinton 28272 (MEXU 1309347!).
- = *Mammillaria micromeris* Engelm. var. *unguispina* Boed., *Monatsschr. Deutsch. Kakteen-Ges.* 4, 118. 1932 = *Epithelantha micromeris* (Engelm.) Britton & Rose var. *unguispina* (Boed.) Backeb., *Cactus* (Paris) 39: 31. 1954 = *Epithelantha micromeris* (Engelm.) Britton & Rose subsp. *unguispina* (Boed.) N.P. Taylor, *Cactaceae Consensus Init.* 5: 12. 1998. *Epithelantha unguispina* (Boed.) D. Donati & Zanov., *Piante Grasse* 30: 186. 2010. TYPE: MÉXICO. Nuevo León, Bei Monterrey, F. Ritter s.n. (not preserved). LECTOTYPE (designated here): illustration of "*Mam. micromeris* Engl. Natürl. Größe" in Boedecker, *Monatsschr. Deutsch. Kakteen-Ges.* 4: 118. Fig. s.n. 1932.
- = *Epithelantha unguispina* (Boed.) D. Donati & Zanov. subsp. *huastecana* D. Donati & Zanov., *Piante Grasse* 30: 186. 2010. TYPE: MÉXICO. Nuevo León, Santa Catarina, Cañón Huasteca, 30 Sept 2010, G. S. Hinton & D. Donati 29228 (holotype: GBH 029228!).

KEY TO SPECIES OF *EPITHELANTHA*

1. Spines provided with persistent appendages, from 60 to 80 ..... 1. *E. bokei*  
 1. Spines devoid of appendages, number less than 55 ..... 2  
 2. Number of spines from 40 to 55 ..... 9. *E. pulchra*  
 2. Number of spines fewer than 40 ..... 3  
 3. Evening bloom, Flower length from 1.7 to 1.8 cm ..... 4. *E. ilariae*  
 3. Diurnal bloom, flower length less than 1.5 cm ..... 4  
 4. Areole width from 0.020 to 0.030 cm, flower length from 0.6 to 0.7 cm ..... 5. *E. micromeris*  
 4. Areole width greater than 0.045 cm, flower length 0.9 cm or more ..... 5  
 5. Number of spines from 39 to 43, areole length from 0.05 to 0.07 cm ..... 8. *E. potosina*  
 5. Number of spines less than 30, areole length more than 0.08 cm ..... 6  
 6. Plants with enlarged roots ..... 7  
 7. Areole width 0.045–0.055 cm, spines white ..... 6. *E. pachyrrhiza*  
 7. Areole width 0.090–0.180 cm, spines brown ..... 7. *E. polycephala*  
 6. Plants with ordinary slender roots ..... 8  
 8. Plants with hypogeous stems present ..... 10. *E. spinosior*  
 8. Plants with hypogeous stems absent ..... 9  
 9. Areole oval, width 0.060–0.075 cm ..... 2. *E. cryptica*  
 9. Areole circular, width 0.115–0.150 cm ..... 3. *E. greggii*

## ACKNOWLEDGMENTS

This study is part of the first author's dissertation and is presented as a partial requirement for the Ph.D. in Biological Sciences in the Posgrado de Ciencias Biológicas (PCB), UNAM. The first author thanks CONACyT for grant No. 263558. We thank Lidia Cabrera, Laura Márquez, and Julio Cesar Montero (Instituto de Biología, UNAM), Omar González-Zorzano (Jardín Botánico, UNAM), Hector Tapia (Facultad de Ciencias, UNAM), Miguel A. González-Botello (Sociedad de Cactáceas y Suculentas del Estado de Nuevo León, A.C.), Montserrat Vázquez-Sánchez (Colegio de Posgraduados), Daniel Sánchez (Universidad de Guadalajara), Juan Antonio Encina (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro), and Beatriz Aquino (Facultad de Artes y Diseño, UNAM) for their support in the field and laboratory. Thanks also to the curators of the herbaria consulted and to María del Rosario García Peña, responsible for the loan program of MEXU; to Kanchi N. Gandhi (Harvard University) for his nomenclatural support; as well as to the anonymous reviewers and the Associate Editor Martin F. Wojciechowski for their relevant comments that improved this version.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

DA and SA designed and performed the research; DA, RCC, and SA analyzed the data; DA, DSG, and SA wrote the paper.

## LITERATURE CITED

- Anderson, E. F. 2001. *The Cactus Family*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Andrés-Sánchez, S., E. Rico, A. Herrero, M. Santos-Vicente, and M. M. Martínez-Ortega. 2009. Combining traditional morphometrics and molecular markers in cryptic taxa: Towards an updated integrative taxonomic treatment for *Veronica* subgenus *Pentasepalae* (Plantaginaceae sensu APG II) in the western Mediterranean. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 68–87.
- Aquino, D., R. C. Cervantes, D. Gernandt, and S. Arias. 2019. Data from: Species delimitation and phylogeny of *Epithelantha* (Cactaceae). Dryad Digital Repository. <https://doi.org/10.5061/dryad.1hn74p5>.



- Arias, S. and E. Sánchez-Martínez. 2010. Una especie nueva de *Strombocactus* (Cactaceae) del río Moctezuma, Querétaro, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 619–624.
- Backeberg, C. 1954. Monographie du genre *Epithelantha*: Ses espèces et ses variétés. *Cactus (Paris)* 39: 25–32.
- Baker, M. A. and C. A. Butterworth. 2013. Geographic distribution and taxonomic circumscription of populations within *Coryphantha* section *Robustispina* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 100: 984–997.
- Bárceñas, R. T., C. Yesson, and J. A. Hawkins. 2011. Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics* 27: 470–489.
- Barthlott, W. and D. Hunt. 2000. Seed diversity in the Cactaceae subfamily Cactoideae. *Succulent Plant Research* 5: 6–173.
- Benson, L. D. 1969. The cacti of the United States and Canada. New names and nomenclatural combinations. *Cactus and Succulent Journal of America* 41: 185–189.
- Benson, L. D. 1982. *The Cacti of the United States and Canada*. Stanford, California: Stanford University Press.
- Bernardos, S., A. Crespi, F. del Rey, and F. Amich. 2005. The section *Pseudophrys* (*Ophrys*, Orchidaceae) in the Iberian Peninsula: A morphometric and molecular analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 148: 359–375.
- Bravo-Hollis, H. 1951. Nuevas especies del género *Epithelantha*. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica* 22: 15–23.
- Bravo-Hollis, H. and H. Sánchez-Mejorada. 1991. *Las Cactáceas de México Vol. II*. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Britton, N. L. and J. N. Rose. 1922. *The Cactaceae. Vol. III*. Washington, DC: The Carnegie Institution.
- Butterworth, C. A., H. J. Cota-Sanchez, and R. S. Wallace. 2002. Molecular systematics of tribe Cacteeae (Cactaceae: Cactoideae): A phylogeny based on *rpl16* intron sequence variation. *Systematic Botany* 27: 257–270.
- Calvente, A., E. M. Moraes, P. Lavour, I. S. Bonatelli, P. Nacaguma, L. M. Versieux, N. P. Taylor, and D. C. Zappi. 2016. Phylogenetic analyses of *Pilosocereus* (Cactaceae) inferred from plastid and nuclear sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 182: 1095–1109.
- Carl Zeiss Imaging Solution. 2009. AxioVision Rel 4.8. <http://www.zeiss.com/>.
- Chavent, M., V. Kuentz-Simonet, A. Labenne, and J. Saracco. 2014. Multivariate analysis of mixed data: The PCA mix data R package. <http://arxiv.org/abs/1411.4911>.
- Chuen, L., C. Liong, and A. A. Jemain. 2018. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: A review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. *Analyst (London)* 143: 3526–3539.
- Cruz, M. A., S. Arias, and T. Terrazas. 2016. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Disocactus* (Cactaceae), based on the DNA sequences of six chloroplast markers. *Willdenowia* 46: 145–164.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. jModelTest 2: More models, new heuristic and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- De Queiroz, K. and M. J. Donoghue. 1988. Phylogenetic systematics and the species problem. *Cladistics* 4: 317–338.
- Demaio, P. H., M. H. J. Barfuss, R. Kiesling, W. Till, and J. O. Chiappella. 2011. Molecular phylogeny of *Gymnocalycium* (Cactaceae): Assessment of alternative infrageneric system, a new subgenus, and trends in the evolution of the genus. *American Journal of Botany* 98: 1841–1854.
- Donoghue, M. J. 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *The Bryologist* 88: 172–181.
- Donati, D. and C. Zanovello. 2010. *Epithelantha* F.A.C. Weber ex Britton & Rose. Nuovi dati su ontogenia, fertilità, simpatría e revisione del genere. *Piante Grasse* 30: 165–187.
- Donati, D. and C. Zanovello. 2011. *Epithelantha*. Trentino: The Cactus Trentino Sudtirolo Society.
- Engelmann, G. 1856. Synopsis of the Cactaceae of the Territory of the United States and Adjacent Regions. Cambridge, Massachusetts: Metcalf and Company.
- Font Quer, P. 1979. *Diccionario de Botánica*. Barcelona: Editorial Labor.
- Gene Codes Corporation. 2007. Sequencher 4.8. Ann Arbor, Michigan: Gene Codes Corporation.
- Glass, C. and R. Foster. 1978. A revision of the genus *Epithelantha*. *Journal of the Cactus and Succulent Society of America* 50: 184–187.
- GraphPad Software, Inc. 2012. GraphPad Prism v. 6. San Diego, California: GraphPad.
- Halda, J. J., L. Fischer, P. Hertus, L. Horáček, L. Hovorka, J. Chalupa, J. Chvstak, M. Malina, I. Milt, K. Kracik, P. Kupčák, P. Panarotto, J. Sladkovský, and V. Sorma. 2002. Notes on the descriptions, published as “Short communications” in *Acta Musei Richnoviensis Sect. natur. Acta Musei Richnoviensis Section natur.* 9: 1–50.
- Helsen, P., R. A. Browne, D. J. Anderson, P. Verdyck, and S. Van Dongen. 2009. Galapagos *Opuntia* (prickly pear) cacti: Extensive morphological diversity, low genetic variability. *Botanical Journal of the Linnean Society* 96: 451–461.
- Henderson, A. 2006. Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 103–111.
- Hernández, H. and C. Gómez-Hinostrosa. 2011. Mapping the cacti of México. *Succulent Plant Research* 7: 6–128.
- Hernández-Hernández, T., H. M. Hernández, J. A. De-Nova, R. Puente, L. E. Eguiarte, and S. Magallón. 2011. Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany* 98: 44–61.
- Hernández-Ledesma, P., W. G. Berendsohn, T. Borsch, S. von Mering, H. Akhiani, S. Arias, I. Castañeda-Noa, U. Eggli, R. Eriksson, H. Flores-Olvera, S. Fuentes-Bazán, G. Kadereit, C. Klak, N. Korotkova, R. Nyffeler, G. Ocampo, H. Ochoterena, B. Oxelman, R. K. Rabeler, A. Sanchez, B. O. Schlumpberger, and P. Uotila. 2015. A taxonomic backbone for the global synthesis of species diversity in the angiosperm order Caryophyllales. *Willdenowia* 45: 281–383.
- Hou, G., N. Wikström, J. S. Strijk, and C. Rydin. 2016. Resolving phylogenetic relationships and species delimitations in closely related gymnosperms using high-throughput NGS, Sanger sequencing and morphology. *Plant Systematics and Evolution* 302: 1345–1365.
- Huelsensbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Hunt, D. R., N. P. Taylor, and G. Charles, eds. 2006. *The New Cactus Lexicon, Text and Atlas*. Milbourne Port: DH Books.
- Hunt, D. R. 2016. *CITES Cactaceae Checklist*. London: Royal Botanic Gardens Kew.
- Jiménez-Durán, K., S. Arias, A. Cortes-Palomec, and J. Marques-Guzmán. 2014. Embryology and seed development in *Pereskia lychnidiflora* (Cactaceae). *Haseltonia* 19: 3–12.
- Katoh, K., K. Misawa, K. Kuma, and T. Miyata. 2002. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059–3066.
- Korotkova, N., L. Zabel, D. Quandt, and W. Barthlott. 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: 151–171.
- Korotkova, N., T. Borsch, D. Quandt, N. P. Taylor, K. F. Müller, and W. Barthlott. 2011. What does it take to resolve relationships and to identify species with molecular markers? An example from the epiphytic Rhipsalideae (Cactaceae). *American Journal of Botany* 98: 1549–1572.
- Korotkova, N., T. Borsch, and S. Arias. 2017. A phylogenetic framework for the Hylocereae (Cactaceae) and implications for the circumscription of the genera. *Phytotaxa* 327: 1–46.
- Kress, W. J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt, and D. H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 8369–8374.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.
- Lewis, P. O. 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology* 50: 913–925.
- Maddison, W. P. and D. R. Maddison. 2002. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, v. 2.75. Tucson, Arizona: University of Arizona. <http://mesquiteproject.org>.
- Marshall, W. T. 1944. A new variety of cactus. *Journal of the Cactus and Succulent Society of America* 16: 161.
- McGarigal, K., S. Cushman, and S. Stanford. 2000. *Multivariate Statistics for Wildlife and Ecology Research*. New York: Springer-Verlag.
- Mosco, A. 2009. Micro-morphology and anatomy of *Turbincarpus* (Cactaceae) spines. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 119–128.
- Müller, K. 2005. SeqState: Primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA datasets. *Applied Bioinformatics* 4: 65–69.
- Naciri, Y. and H. P. Linder. 2015. Species delimitation and relationships: The dance of the seven veils. *Taxon* 64: 3–16.
- Nyffeler, R. and U. Eggli. 2010. Disintegrating Portulacaceae: A new familial classification of the suborder Portulacineae (Caryophyllales) based on molecular and morphological data. *Taxon* 59: 227–240.
- Pante, E., C. Schoelincx, and N. Puillandre. 2014. From integrative taxonomy to species description: One step beyond. *Systematic Biology* 64: 152–160.

- Rambaut, A. 2013. Tracer v. 1.5. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Rehder, C., A. Bühler, R. Graf, C. Folly, and F. Gugerly. 2016. Using joint multivariate analyses of leaf morphology and molecular-genetic markers for taxon identification in three hybridizing European white oak species (*Quercus* spp.). *Annals of Forest Science* 73: 669–679.
- RStudio Team. 2015. RStudio: Integrated development for R. Boston, Massachusetts: RStudio, Inc. <http://www.rstudio.com/>.
- Sánchez-Mejorada, H. 1982. Consideraciones generales sobre la clasificación de las cactáceas. *Cactaceas y Suculentas Mexicanas* 27: 3–9.
- Schmoll, C. 1951. Una nueva especie de *Epithelantha*. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica* 22: 11–14.
- Shaw, J., E. B. Lickey, E. E. Schilling, and R. L. Small. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare. *American Journal of Botany* 94: 275–288.
- Silva, G. A. R., C. L. Jojima, E. M. Moraes, A. Antonelli, M. H. Manfrin, and F. F. Franco. 2016. Intra and interspecific sequence variation in closely related species of *Cereus* (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 65: 137–142.
- Simmons, M. P. and H. Ochoterena. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 49: 369–381.
- Sites, W. Jr. and J. C. Marshall. 2003. Delimiting species: A renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 462–470.
- Sokal, R. R. 1973. The species problem reconsidered. *Systematic Zoology* 22: 360–374.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *BMC Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- Stone-Palmquist, M. E. and J. D. Mauseth. 2002. The structure of enlarged storage roots in cacti. *International Journal of Plant Sciences* 163: 89–98.
- Stöver, B. and K. Müller. 2010. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11: 7.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Thiers, B. M. 2018. Index herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/> (accessed on April 29, 2016).
- Turland, N. J., J. H. Wiersma, F. R. Barrie, W. Greuter, D. L. Hawksworth, P. S. Herendeen, S. Knapp, W.-H. Kusber, D.-Z. Li, K. Marhold, T. W. May, J. McNeill, A. M. Monro, J. Prado, M. J. Price, and G. F. Smith. 2018. *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Shenzhen Code) Adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017*. *Regnum Vegetabile* 159. Glashütten, Hesse: Koeltz Botanical Books.
- Valcárcel, V. and P. Vargas. 2010. Quantitative morphology and species delimitation under the general lineage concept: Optimization for *Hedera* (Araliaceae). *American Journal of Botany* 97: 1555–1573.
- Vázquez-Sánchez, M., T. Terrazas, S. Arias, and H. Ochoterena. 2013. Molecular phylogeny, origin and taxonomic implications of the tribe Cactaeae (Cactaceae). *Systematics and Biodiversity* 11: 103–116.
- Walpole, R. E., R. H. Myers, S. L. Myers, and K. Ye. 2012. *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. México, D. F.: Pearson Educación.
- Will, K. W., B. D. Mishler, and Q. D. Wheeler. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 4: 844–851.
- APPENDIX 1. Representative specimens of *Epithelantha* species examined (species, country, state, collector, collection number, and herbarium) and corresponding GenBank accession numbers (*petL-psbE*, *psbA-trnH*, *trnL-F*, *trnQ-rps16*). An asterisk (\*) indicates specimens used in morphometric analyses.
- Epithelantha bokei* L.D. Benson. México.** —COAHUILA: \*D. Aquino 318 (MEXU), MK283983, MK284044, MK284104, MK284165; \*D. Aquino 342 (MEXU), MK283984, MK284045, MK284105, MK284166, D. Aquino 346 (MEXU), C. Gómez-Hinostrosa 1759 (MEXU), O. González-Zorzano 307 (MEXU), G.B. Hinton 29326 (GBH), J.G. Martínez-Ávalos 2010 (UAT), D.J. Pinkava 6136a (ASU), \*J. Reyes 7691 (MEXU), MK283985, MK284046, MK284106, MK284167, B. Velázquez s.n. (ANSM). —CHIHUAHUA: D. Estrada 19766 (CFNL), Nuevo León A. Flores-Valdez s.n. (UNL), H. Sánchez-Mejorada 3777 (MEXU), San Luis Potosí, \*D. Aquino 301 (MEXU), MK283982, MK284043, MK284103, MK284164, D. Aquino 419 (MEXU), F. Sánchez 180 (SLPM), F. Sánchez 527 (SLPM), USA, Texas, N. H. Boke s.n. (POM), N. H. Boke 488 (NCU), J.E. Jardy 296 (SRSC), M.K. Terry s.n. (SRSC), R.D. Worthington 8932 (ASU). ***Epithelantha cryptica* D. Donati & Zanov. México.** —COAHUILA: \*D. Aquino 348 (MEXU), MK283992, MK284053, MK284113, MK284174, \*D. Aquino 355 (MEXU), MK283993, MK284054, MK284114, MK284175, \*D. Aquino 375 (MEXU), MK283994, MK284055, MK284115, MK284176, D. Aquino 376 (MEXU), J.L. Elizondo 481 (ANSM), G.B. Hinton 29258 (GBH), G.B. Hinton 29259 (GBH). ***Epithelantha greggii* (Engelm.) Orcutt. México.** —COAHUILA: E. Aguirre s.n. (MEXU), \*D. Aquino 304 (MEXU), MK284004, MK284065, MK284125, MK284186, \*D. Aquino 306 (MEXU), MK284005, MK284066, MK284126, MK284187; D. Aquino 328 (MEXU), \*D. Aquino 339 (MEXU), MK284011, MK284072, MK284132, MK284193, \*D. Aquino 340 (MEXU), MK284012, MK284073, MK284133, MK284194; \*D. Aquino 341 (MEXU), MK284009, MK284070, MK284130, MK284191, D. Aquino 347 (MEXU), \*D. Aquino 349 (MEXU), MK284010, MK284071, MK284131, MK284192, D. Aquino 354 (MEXU), D. Aquino 356 (MEXU), D. Aquino 374 (MEXU), D. Aquino 377 (MEXU), S. Arias 2097 (MEXU), R. Bárcenas 1696 (QMEX), R. Bárcenas 1706 (QMEX), R. Bárcenas 1722 (QMEX), G. Borja 261 (ENCB), H. Bravo-Hollis s.n. (MEXU), H. Bravo-Hollis s.n. (MEXU), H. Cota-Sánchez s.n. (MEXU/ENCB), F. Díaz 10 (QMEX), J.L. Elizondo 245 (ANSM), J.L. Elizondo 309 (ANSM), J.L. Elizondo 423 (ANSM), J.L. Elizondo 489 (ANSM), B. Goettsch 406 (MEXU), B. Goettsch 430 (MEXU), B. Goettsch 506 (MEXU), C. Gómez-Hinostrosa 1737 (MEXU), C. Gómez-Hinostrosa 1912 (MEXU), C. Gómez-Hinostrosa 2298 (MEXU), J. Gregg 508 (GH), U. Guzmán 3014 (IEB), H. Hernández 2092 (MEXU), H. Hernández 2106 (MEXU), H. Hernández 2119 (MEXU), H. Hernández 2127 (MEXU), H. Hernández 2155 (MEXU), H. Hernández 2191 (MEXU), H. Hernández 2207 (MEXU), H. Hernández 2246 (MEXU), H. Hernández 2257 (MEXU), H. Hernández 2283 (MEXU), H. Hernández 2319 (MEXU), H. Hernández 3345 (MEXU), H. Hernández 3386 (MEXU), H. Hernández 3402 (MEXU), H. Hernández 3754 (MEXU), G.B. Hinton 27838 (MEXU), J. C. Montero 135 (MEXU), D.J. Pinkava 3998 (ASU), D.J. Pinkava 4126 (ASU/DES), D.J. Pinkava 5280 (ASU), D.J. Pinkava 5392 (ASU), J.L. Pinkava 5499 (ASU), D.J. Pinkava 6143 (ASU), D.J. Pinkava 13035 (ASU), D.J. Pinkava 13874 (ASU), D.J. Pinkava 13881 (ASU), A. Rodríguez 291 (ANSM), H. Sánchez-Mejorada 2564 (MEXU), J. Saucedo s.n. (UNL), J. Wehbe 200 (ANSM), Nuevo León \*D. Aquino 312 (MEXU), MK284006, MK284067, MK284127, MK284188, D. Aquino 314 (MEXU), D. Aquino 316 (MEXU), \*D. Aquino 325 (MEXU), MK284007, MK284068, MK284128, MK284189, D. Aquino 326 (MEXU), D. Aquino 327 (MEXU), \*D. Aquino 329 (MEXU), MK284008, MK284069, MK284129, MK284190, D. Aquino 331 (MEXU), M.A. González-Botello 14 (CFNL), M.A. González-Botello 109 (CFNL), M.A. González-Botello 110 (CFNL), M.A. González-Botello 180 (CFNL), M.A. González-Botello 186 (CFNL), M.A. González-Botello 193 (CFNL), G.B. Hinton 28310 (MEXU), G.B. Hinton 28315 (MEXU), J. Saucedo s.n. (ANSM), J. Saucedo s.n. (UNL), J. Saucedo s.n. (UNL). ***Epithelantha ilariae* D. Donati & Zanov. México.** —COAHUILA: \*D. Aquino 373 (MEXU), MK283988, MK284049, MK284109, MK284170. —NUEVO LEÓN: \*D. Aquino 307 (MEXU), MK283986, MK284047, MK284107, MK284168, \*D. Aquino 323 (MEXU), MK283987, MK284048, MK284108, MK284169; M.A. González-Botello 22 (CFNL), M.A. González-Botello 161 (CFNL), M.A. González-Botello 162 (CFNL), G.B. Hinton 29075 (GBH/MEXU), J. Saucedo s.n. (ANSM). ***Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britton & Rose. México.** —COAHUILA: \*D. Aquino 335 (MEXU), MK283997, MK284058, MK284118, MK284179, \*D. Aquino 336 (MEXU), MK283998, MK284059, MK284119, MK284180, D. Aquino 338 (MEXU), S. Arias 2238 (MEXU), M.A. Carranza s.n. (ANSM), \*O. González-Zorzano 301 (MEXU), MK283999, MK284060, MK284120, MK284181, H. Hernández 2312 (MEXU), H. Hernández 3622 (MEXU), G.B. Hinton 29448 (GBH), H. Sánchez-Mejorada 2540 (MEXU), F. Schwartz s.n. (MEXU), Chihuahua G. Borja 411 (ENCB). —NUEVO LEÓN: \*D. Aquino 332 (MEXU), MK283995, MK284056, MK284116, MK284177, \*D. Aquino 333 (MEXU), MK283996, MK284057, MK284117, MK284178, D. Aquino 427 (MEXU), M. Barba 312 (CFNL), E. Estrada 123 (CFNL), E. Estrada 127 (CFNL), M.A. González-Botello 40 (CFNL), M.A. González-Botello 152 (CFNL). **USA.** —NEW MEXICO: R.D. Worthington 28152 (ASU), R.D. Worthington 34158 (ASU), R.D. Worthington 34624 (ASU), R.D. Worthington 35511 (ASU). —TEXAS: R.D. Worthington 19904 (DES), R.D. Worthington 19760 (DES), C. Wright 227 (K). ***Epithelantha pachyrhiza* (W.T. Marshall) Backeb. México.** —COAHUILA: \*D. Aquino 305 (MEXU), MK284013, MK284074, MK284134, MK284195, \*D. Aquino 353 (MEXU), MK284014, MK284075, MK284135, MK284196, S. Arias 1961 (MEXU), W.A. Fitz-Maurice 1788 (MEXU), G.B. Hinton 27352 (GBH), G.B. Hinton 29211 (GBH). ***Epithelantha polycephala* Backeb. México.** —COAHUILA: \*D. Aquino 350 (MEXU), MK284018, MK284079, MK284139, MK284200, D. Aquino 351 (MEXU), \*D. Aquino 352 (MEXU), MK284019, MK284080, MK284140, MK284201, D. Aquino 357 (MEXU), \*D. Aquino 370 (MEXU), MK284202, MK284081, MK284141, MK284202, W.A. Fitz-Maurice 1781 (MEXU), W.A. Fitz-Maurice 1792 (MEXU), J. Wehbe 119 (ANSM). ***Epithelantha potosina* (D. Donati & Zanov.) Aquino & S. Arias. México.**

—SAN LUIS POTOSÍ: \**D. Aquino* 295 (MEXU), MK283989, MK284050, MK284110, MK284171, \**D. Aquino* 383 (MEXU), MK283990, MK284051, MK284111, MK284172, *D. Aquino* 417 (MEXU), R.T. Bárcenas 1001 (MEXU), H. Hernández 3201 (MEXU), G.B. Hinton 29229 (MEXU), \*J.G. Martínez-Ávalos 1954 (UAT), MK283991, MK284052, MK284112, MK284173, J. Rzedowski 6486a (ENCB), F. Sánchez 96 (SLPM), R. Torres-Colín 15814 (MEXU). *Epithelantha pulchra* (D. Donati & Zanov.) Aquino & S. Arias. México. —NUEVO LEÓN: \**D. Aquino* 309 (MEXU), MK284015, MK284076, MK284136, MK284197, \**D. Aquino* 311 (MEXU), MK284016, MK284077, MK284137, MK284198, \**D. Aquino* 313 (MEXU), MK284017, MK284078, MK284138, MK284199, M.A. González-Botello 139 (CFNL), M.A. González-Botello 178 (CFNL), M.A. González-Botello 379 (CFNL), G.B. Hinton 29078 (GBH), J. Saucedo s.n. (UNL), J. Saucedo s.n. (ANSM). *Epithelantha spinosior* C. Schmoll. México. —COAHUILA: S. Arias 1507 (MEXU), H. Hernández 2165 (MEXU). —NUEVO LEÓN: \**D. Aquino* 317 (MEXU), MK284000, MK284061, MK284121, MK284182, \**D. Aquino* 319 (MEXU), MK284002, MK284063, MK284123, MK284184, \**D. Aquino* 321 (MEXU), MK284003, MK284064, MK284124, MK284185, \**D. Aquino* 334 (MEXU), MK284001, MK284062, MK284122, MK284183, M.A. González-Botello s.n. (MEXU), H. Hernández 2329 (MEXU), G.B. Hinton 28272 (MEXU), G.B. Hinton 29228 (GBH), J. Saucedo s.n. (UNL), S. Zamudio 9461 (IEB).

**OUTGROUP: *Astrophytum capricorne* (A.Dietr.) Britton & Rose. México.** —COAHUILA: *D. Aquino* 303 (MEXU), MK284038, MK284100, MK284160, MK284219. *Ariocarpus trigonus* (F.A.C. Weber) K. Schum. México. —TAMAULIPAS: S. Arias 1993 (MEXU), MK284027, MK284089, MK284149, MK284208. *Aztekium ritteri* Boed. México. —NUEVO LEÓN: S. Arias 1868 (MEXU), MK284039, MK284101, MK284161, MK284220. *Coryphantha calipensis* Bravo ex S. Arias, U. Guzmán & S. Gama-López. México. —OAXACA: B. Vázquez-Benítez 2555 (MEXU), MK284029, MK284091, MK284151, MK284210. *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto. México. —QUERÉTARO: S. Arias 1679 (MEXU), MK284037, MK284099, MK284159, MK284218. *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) D.R. Hunt. Cuba. —HOLGUÍN: D. Barrios 24 (HAJB), MK284030, MK284092, MK284152, MK284211. *Escobaria missouriensis* (Sweet) D.R. Hunt subsp. *asperispina* (Boed.) N.P. Taylor. México. —NUEVO LEÓN: S. Arias 1945 (MEXU), MK284031, MK284093, MK284153, MK284212. *Harrisia earlei* Britton & Rose. Cuba. —PINAR DEL RÍO: D. Barrios 21 (HAJB), MK284041, KY624665, MK284163, MK284222. *Leptocereus paniculatus* (Lam.) D.R. Hunt. Cuba. cultivated, D. Barrios 19 (HAJB), MK284040, MK284102, MK284162, MK284221. *Leuobergeria lychnidiflora* (DC.) Lodé. México. —OAXACA: *Anonymous* (CIIDIR): MK284042, KU597972, KU598077, KU598130. *Lophophora williamsii* (Lem. ex Salm-Dyck) J.M. Coult. México. —SAN LUIS POTOSÍ: S. Arias 1849 (MEXU), MK284026, MK284088, MK284148, —. *Mammillaria mammillaris* H. Karst. Colombia. T. Terrazas 956 (MEXU), MK284032, MK284094, MK284154, MK284213. *Mammillaria mystax* Mart. México. —PUEBLA: *D. Aquino* 225 (MEXU), MK284033, MK284095, MK284155, MK284214. *Obregonia denegrii* Frič. México. —TAMAULIPAS: H. Sánchez-Mejorada 3670 (MEXU), MK284025, MK284087, MK284147, —. *Ortegocactus macdougallii* Alexander. México. —OAXACA: J. Reyes 4009. (MEXU), MK284034, MK284096, MK284156, MK284215. *Pediocactus simpsonii* (Engelm.) Britton & Rose. USA. cultivated, *D. Aquino* s.n. (MEXU), —, MK284085, MK284145, MK284206. *Pelecyphora strobiliformis* (Werderm.) Frič & Schelle ex Kreuz. México. —NUEVO LEÓN: H. Sánchez-Mejorada 3844 (MEXU), MK284035, MK284097, MK284157, MK284216. *Rapicactus beguinii* (N.P. Taylor) Lüthy. México. —NUEVO LEÓN: S. Arias 1854 (MEXU), MK284024, MK284086, MK284146, MK284207. *Sclerocactus mariposensis* (Hester) N.P. Taylor. México. —

COAHUILA: *D. Aquino* 343 (MEXU), MK284036, MK284098, MK284158, MK284217. *Strombocactus disciformis* (DC.) Britton & Rose. México. —QUERÉTARO: S. Arias 1738 (MEXU), MK284028, MK284090, MK284150, MK284209. *Turbincarpus alonsoi* Glass & S. Arias. México. —GUANAJUATO: A. García 24 (MEXU), MK284021, MK284082, MK284142, MK284203. *Turbincarpus horripilus* (Lem.) V. John & Ríha. México. —HIDALGO: J. M. Chalet 201 (MEXU), MK284023, MK284084, MK284144, MK284205. *Turbincarpus pseudomacrolele* (Backeb.) Buxb. & Backeb. México. —HIDALGO: *Turbincarpus* Collector Group 9101 (MEXU), MK284022, MK284083, MK284143, MK284204.

APPENDIX 2. Quantitative and qualitative characters used in the morphological analysis. An asterisk (\*) indicates quantitative and qualitative characters coded for phylogenetic analysis combining (morphological data + DNA). The values correspond to the mean.

1) Stem height (SH, cm): Height of the stem from ground level to the apex, not including the spines (Baker and Butterworth 2013). 2) Stem diameter (SDIM, cm): Maximum diameter of the stem measured from each extreme in a horizontal position (Baker and Butterworth 2013). 3) Spines series number (Serie): Total number of series arranged in areole (Donati and Zanovello 2011). 4)\* Spines number (SpiNu): Total amount of spines arranged in all series for each areole (Donati and Zanovello 2011): 0: < 9, 1: 17–25, 2: 28–30 3: 39–41, 4: 45–46 5: > 67. 5) Upper spine length (USL, cm): Dimension of the spine located in the first series towards the upper part of the areole (proposed here). 6) Lower spine length (LSL, cm): Dimension of the spine located in the first series towards the lower part of the areole (proposed here). 7) Length of areole (LAR, cm): The longest dimension in horizontal direction (proposed here). 8) Width of areole (WAR, cm): The longest linear dimension in the horizontal direction (proposed here). 9)\* Flower length (FLEn, cm): Length of flower from the base of the pericarpel to the tip of the longest tepal (Baker and Butterworth, 2013): 0: < 0.68, 1: 1.01–1.06, 2: 1.19–1.28, 3: 1.7–1.8 4: > 1.9. 10) Stem height/diameter ratio (SIND): The quotient of the division between the maximum height of the stem and the diameter (proposed here). 11)\* Areole length/width ratio (AIND): The quotient of the division between the length and the width of the areole (proposed here): 0: > 4, 1: 2.2–2.3, 2: 1.4–1.9, 3: 0.9–1.3. 12)\* Appendages in spines (Appendage): When the cells of the epidermis break, they can form appendages that may or may not persist throughout the development of the individual (Mosco 2009; Donati and Zanovello 2011): 0: persistent, 1: non-persistent. 13)\* Root form (Root): The roots can be thin to thickened, depending on the thickened roots having a greater amount of metaxylem and secondary xylem as a product of the expansion of the parenchyma proliferation (Stone-Palmquist and Mauseth 2002; Donati and Zanovello 2011): 0: ordinary slender root, 1: enlarged root. 14)\* Hypogeous stem (HST): Hypogeous stems are those that develop below the soil (Font Quer 1979): 0: absent, 1: present. 15)\* Expansion at the edge of the seed (RHSapen): Two projections flanking the hilar region were observed, whose limit may arrive just at the edge of the seed or surpass the edge (here proposed): 0: without expansion, 1: slightly expanded, 2: very expanded. 16)\* Keel of the seed (Keel): A projection from the micropilar region to the apical region was observed on the dorsal region of the seed (Barthlott and Hunt 2000): 0: without keel, 1: with keel. 17)\* Relief of periclinal wall (RPW): The periclinal walls can be flat, concave to convex (Barthlott and Hunt 2000): 0: flat, 1: concave, 2: convex. 18)\* Multicellular sculpture (MULT): The multicellular sculpture may be absent, or rugose or ruminant (Barthlott and Hunt 2000): 0: absent, 1: rugose.

### Capítulo 3

**“Efecto del clima y suelo para mantener la identidad de linajes en *Epithelantha* y aliados (Cactaceae)”**

**David Aquino,<sup>1</sup> Alejandra Moreno-Letelier,<sup>1</sup> Miguel A. González-Botello,<sup>2</sup> and Salvador Arias<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-614, México 04510 D. F., México. <sup>2</sup> Sociedad de Cactáceas y Suculentas del Estado de Nuevo León, A.C. México.

New Phytologist (en preparación)

Autor por correspondencia:

Salvador Arias

Tel: +56229048

Email: sarias@ib.unam.mx

*Resumen* — El uso de variables ambientales como fuente de información en estudios sistemáticos ha cobrado relevancia para apoyar el reconocimiento de linajes. Este trabajo tiene como objetivo conocer y caracterizar las variables de nicho climático y de hábitat que permitieron la diversificación de *Epithelantha* y aliados, además de definir si la distribución de las especies de *Epithelantha* está limitada por barreras físico-ecológicas. A partir de una matriz mixta (cpDNA y caracteres morfológicos) se obtuvo una filogenia calibrada y para cada terminal se analizaron 6 variables bioclimáticas, seleccionadas con el coeficiente de correlación de Pearson y pH del suelo y a partir de los valores de la media, se aplicaron métodos de reconstrucción de estados ancestrales. Las variables cualitativas (tipo de suelo y geoforma) se analizaron mediante tablas de frecuencia. Se encontró que el pH del suelo, la isotermalidad, la estacionalidad de la temperatura y la precipitación anual tienen señal filogenética y son las variables que influyeron en la diversificación de *Epithelantha*. La temperatura media anual, la temperatura media del cuarto más seco, temperatura media del cuarto más frío no presentaron señal filogenética; sin embargo, apoyaron la divergencia de nicho entre *E. micromeris* y *E. cryptica* que son especies hermanas. *Epithelantha* es frecuente en sistemas de piedemonte, en tanto que el tipo de suelo donde se establece con mayor frecuencia es kastanozem háplico. La propuesta de reconocimiento de linajes es mucho más robusta cuando se consideran factores ambientales que a su vez, aportan elementos para discutir su influencia en la presencia de endemismos en Cactaceae.

Palabras clave: Reconstrucción de estados ancestrales, características del suelo, geoformas, variables bioclimáticas.

## Introducción

*Epithelantha* F.A.C. Weber ex Britton & Rose es un género de la tribu Cacteeae, anidado en un clado compuesto por *Ariocarpus* Scheidw., *Rapicactus* Buxb. & Oehme, *Strombocactus* Britton & Rose y *Turbinicarpus* (Backeb.) Buxb. & Backeb., denominado “clado C1” (Crozier, 2005; Hernández-Hernández *et al.*, 2011; Aquino *et al.*, 2019). Los cinco géneros se distribuyen principalmente la ecorregión denominada Desierto Chihuahuense, con poblaciones adyacentes en los Bosques de pino-encino de la Sierra Madre Oriental, el Matorral espinoso tamaulipeco y el Matorral central mexicano (Fig. 1). De acuerdo con Hernández-Hernández *et al.*, (2014) la tribu Cacteeae al igual que otros linajes de Cactaceae diversificaron a partir de eventos de cambio climático. Sin embargo, no se ha profundizado en este tipo de estudios entre los géneros, ni su comparación con sus respectivos grupos hermanos, por lo que se desconoce qué factores externos intervinieron en el proceso de diversificación de *Epithelantha*. Recientemente se ha aceptado que la comprensión de los procesos de diversificación se ven reforzados con la inclusión de datos bioclimáticos y geográficos, ejemplo de ello es el trabajo de Jones *et al.*, (2014) con *Pericallis* D. Don (Asteraceae) y Nevado *et al.*, (2018) con *Lupinus* L. (Fabaceae). La aplicación de variables bioclimáticas en Cactaceae sigue un enfoque hacia la conservación de especies en riesgo. Algunos ejemplos de ellos es la predicción de la distribución potencial con base en requerimientos de nicho para *Nopalxochia* (= *Disocactus*) *phyllanthoides* (DC.) Britton & Rose (Iberri, 2009), *Echinocereus reichenbachii* (Terscheck ex Walp.) J.N. Haage (Butler *et al.*, 2012), *Astrophytum coahuilense* (H. Möller) Kayser (Cardoza-Martínez *et al.*, 2019) y *Thelocactus* Britton & Rose (Mosco, 2019). De manera secundaria se ha seguido un enfoque en el cual, el conocimiento del nicho es aplicado para reforzar hipótesis evolutivas, ejemplo de ello es el trabajo de Guerrero *et al.*, (2011) para *Eriogyne* Puill. subgénero *Neoporteria* (Britton & Rose) Katt. (tribu Notocacteeae). Las diferencias climáticas han sido empleadas como soporte para diferenciar entre *Rapicactus* y *Turbinicarpus*, géneros que han sido tratados como sinónimos (Donati *et al.*, 2017).

Un segundo factor que podría explicar la diversificación de linajes son los atributos del suelo. De acuerdo con Bárcenas-Argüello *et al.*, (2013), las características del suelo a menudo juegan un papel esencial en la determinación de la distribución de las comunidades de plantas y por ende determinan la presencia de taxones endémicos. Del Castillo (1996) hizo una distinción entre especies en función de la preferencia de sustratos: calcífugas y calcícolas, siendo los ambientes con suelos calizos aquellos con mayor número de especies endémicas. La condición en la cual el suelo

es el factor limitante en la distribución de las especies se ha reportado en *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto (tribu Cacteeae), el cual se establece sobre rocas sedimentarias calizas (Trujillo, 1984), de igual forma, las especies reconocidas para *Ariocarpus* deben su distribución restringida a la presencia de minerales de calcio en el suelo (Aguilar-Morales *et al.*, 2011). Esta condición no es exclusiva de Cacteeae, pues se ha reportado que la asociación por un tipo particular de sustrato es frecuente en *Cephalocereus* Pfeiff. (tribu Echinocereae, Bárcenas-Argüello *et al.*, 2010), así como en *Opuntia* Mill. y *Cylindropuntia* (Engelm.) F.M. Knuth (Subfamilia Opuntioideae) Lebgue-Keleng *et al.*, (2014).

Aquino *et al.*, (2019) reconocen diez especies de *Epithelantha* con base en una combinación de caracteres morfológicos y moleculares; sin embargo, *E. micromeris* (Engelm.) Britton & Rose y *E. cryptica* D.Donati & Zanov. solo son reconocibles por medio de caracteres morfológicos, por lo que la caracterización del hábitat permitirá reforzar el reconocimiento de ambos linajes, aunque no estén resueltos con marcadores moleculares, probablemente con una condición única de nicho que le de identidad a cada linaje (Rissler & Apodaca, 2007). Además, los datos ambientales han sido empleados para reforzar hipótesis de divergencia entre linajes, ejemplo de ello es el apoyo en el reconocimiento de especies crípticas en *Leucaena* Benth. (Fabaceae, Govindarajulu *et al.*, 2011) y en complejos de especies de *Nolina* (Asparagaceae, Ruíz-Sánchez & Specht, 2014). Más recientemente, Alvarado-Sizzo *et al.*, (2018) incluyeron datos de distribución y clima para reforzar la hipótesis de aislamiento reproductivo entre los linajes, que integran el complejo *Stenocereus griseus* (Haw.) Buxb.

Con el propósito de comprender el posible conservadurismo de nicho, los objetivos de este trabajo son: 1) caracterizar variables de nicho climático y edáfico que permitieron la diversificación de *Epithelantha*, con respecto a los demás miembros del clado C1 (Aquino *et al.*, 2019); 2) definir si la distribución de las especies de *Epithelantha* está limitada por barreras físico-ecológicas, que mantienen la identidad de los linajes y 3) corroborar la presencia de diferencias de nicho entre *Epithelantha micromeris* y *E. cryptica*.

## Material y métodos

### Base de datos



Se consultaron 15 herbarios para obtener registros correspondientes a *Epithelantha*, *Ariocarpus*, *Rapicactus*, *Strombocactus* y *Turbiniacarpus* (ANSM, ASU, CFNL, DES, ENCB, GBH, IEB, MEXU, MO, NCU, QMEX, SLPM, UAMIZ, UNL y US, acrónimos según la nomenclatura de Thiers, 2015), géneros que, de acuerdo con Aquino *et al.*, (2019) conforman el clado C1. Con excepción de *Strombocactus*, el trabajo de campo se enfocó en complementar los registros de los cuatro géneros restantes en los estados de Coahuila, Nuevo León, San Luís Potosí y Tamaulipas. Con los registros obtenidos se depuraron aquellos con localidades imprecisas, duplicadas y aquellos cuyas localidades de una misma especie encuentren a una distancia de 5 km o menos, para ello se empleó Geographic Distance Matrix Generator 1.2.3 (Ersts, 2018). La base quedó conformada con 101 registros para *Epithelantha*, 91 para *Ariocarpus*, 26 de *Rapicactus*, 11 de *Strombocactus* y 66 de *Turbiniacarpus*. Adicionalmente, se incluyeron registros correspondientes a *Coryphantha* (Engelm.) Lem. (575 registros), *Echinocactus* Link & Otto (111 registros), *Lophophora* J.M. Coult. (71 registros) y *Mammillaria* Haw. (1726 registros), que fungen como grupo externo.

### **Consideraciones taxonómicas**

Las especies de *Epithelantha* aquí reconocidas son: *Epithelantha bokei* L.D. Benson, *E. cryptica*, *E. greggii* (Engelm.) Orcutt, *E. ilariae* D. Donati & Zanov., *E. micromeris*, *E. pachyrrhiza* (W.T. Marshall) Backeb., *E. polycephala* Backeb., *E. potosina* (D. Donati & Zanov.) Aquino & S. Arias, *E. pulchra* (D. Donati & Zanov.) Aquino & S. Arias y *E. spinosior* C. Schmoll (Aquino *et al.*, 2019).

La circunscripción de *Ariocarpus*, *Lophophora*, *Echinocactus* y *Strombocactus* se apoya en el trabajo de Vázquez-Sánchez *et al.*, (2013), en tanto que en *Turbiniacarpus* y *Rapicactus* seguimos el trabajo de Donati *et al.*, (2017). La circunscripción de *Coryphantha* es la propuesta por Vázquez-Benítez *et al.*, (2016) y finalmente para *Mammillaria* nos referimos al trabajo de Hunt *et al.*, (2006).

### **Matriz combinada de caracteres morfológicos y moleculares**

Las secuencias seleccionadas corresponden a cuatro marcadores de cpDNA: *petL-psbE*, *psbA-trnH*, *trnL-F* y *trnQ-rps16*. El método de extracción, amplificación y secuenciación se detalla en el trabajo de Aquino *et al.*, (2019), en tanto que los números de acceso a GenBank de todas las secuencias usadas para este análisis filogenético son mostrados en el material suplementario 1. Tanto la codificación de indels, como los estados de caracteres y sus respectivas descripciones están referenciados en el trabajo de Aquino *et al.*, (2019).

### **Calibración de la filogenia**



Se estimaron tiempos de divergencia y se reconstruyeron los estados de caracteres ancestrales utilizando una muestra de taxones. Se eligió un representante de cada una de las especies de *Epithelantha*, además de los parientes cercanos del género (*Turbincarpus alonsoi* Glass & S. Arias, *T. pseudomacrolele* (Backeb.) Buxb. & Backeb., *T. horripilus* (Lem.) V. John & Říha, *Rapicactus beguinii* (N.P. Taylor) Lüthy, *Ariocarpus trigonus* (F.A.C. Weber) K. Schum. y *Strombocactus disciformis* (DC.) Britton & Rose. Los grupos externos utilizados fueron: *Lophophora williamsii* (Lem. ex Salm-Dyck) J.M. Coult., *Coryphanta calipensis* Bravo ex S. Arias, U. Guzmán & S. Gama-López, *Mammillaria mystax* Mart. y *Echinocactus platycanthus*. Se utilizaron dos puntos de calibración basados en la filogenia fechada y publicada por Hernández-Hernández *et al.*, (2014). El primer punto para marcar la divergencia entre *Echinocactus* con respecto al grupo *Mammilloide* es de 15.27 Ma (HDP95% 10.94-21.85; Hernández-Hernández *et al.*, 2014) y el segundo punto que marca la divergencia del core *Mammilloide* (*Coryphanta* y *Mammillaria*) + *Lophophora*. Con respecto a *Epithelantha*, *Turbincarpus*, *Rapicactus*, *Ariocarpus* y *Strombocactus*, el cual fue puesto en 8.62 ma (HDP 95% 5.83-12.56; Hernández-Hernández *et al.*, 2014). En ambos casos se utilizó una distribución normal, con una media correspondiente al punto de calibración y una desviación estándar de 2. Se utilizó un modelo de evolución GTR+G, reloj molecular relajado Lognormal y el modelo Yule de especiación. El análisis se realizó usando BEAST 1.7.4 (Drummond *et al.*, 2012), con 10 millones de cadenas. La convergencia de las estimaciones y los árboles se analizaron con Tracer 1.6 y TreeAnnotator 1.7, respectivamente (Rambaut *et al.*, 2014; Drummond *et al.*, 2012). El alineamiento y el árbol resultante se depositaron en Dryad Digital Repository.

### **Reconstrucción de caracteres ancestrales**

Se utilizaron 19 capas bioclimáticas (WorldClim Global Climate 1.4; Hijmans *et al.*, 2005). Su codificación y significado se detallan en el material suplementario 2. Además, se incluyó el pH para los suelos de México (Cruz-Cárdenas *et al.*, 2014) y para Estados Unidos (World Soil Information, 2014. <https://www.isric.org/explore/soil-geographic-databases>), el tipo de suelo (FAO, 2007, <http://www.fao.org/geonetwork/srv/en/metadata.show?id=14116>) y geoformas (Pineda *et al.*, 2014). La extracción de las variables se realizó con QGIS 2.1.8 (QGIS Development Team, 2009). Las capas tienen una resolución especial aproximadamente de 1 km<sup>2</sup>. Las variables bioclimáticas que contribuyen a la varianza entre las especies fueron analizadas con el índice de correlación de Pearson (ICP), reteniendo las variables no correlacionadas (ICP  $\leq$   $\pm$ 0.7 según Dormann *et al.*, 2013). Con la base de datos que incluye las variables bioclimáticas y el pH se calculó la media

(Tabla 2) y con el árbol calibrado se hizo la reconstrucción de estados ancestrales empleando phytool (Revell, 2012) que utiliza como interfaz a RStudio (RStudio Team, 2015). Se estimó la señal filogenética mediante K de Blomberg y Lambda de Pagel. Se seleccionó el modelo que mejor se ajustó a los datos utilizando el criterio de información de Akaike (AIC). Para evaluar la dirección de los cambios se aplicó el método de contrastes independientes de Felsenstein, para inferir el estado de carácter de los nodos del árbol y estimar el intervalo de confianza y la varianza. Finalmente se hizo el mapeo de caracteres ancestrales sobre la filogenia utilizando el paquete R phytools (Revell, 2012; RStudio Team, 2015).

### **Caracterización ambiental**

Las variables categóricas (tipo de suelo y geofformas) se analizaron mediante una matriz de contingencia, en donde se registró para cada taxón, la frecuencia con que fueron observados por cada variable categórica, a partir de la cual se calculó la matriz de observaciones esperadas y se obtuvo el Residuo de Pearson para finalmente aplicar la prueba Chi-cuadrada y comparar la posible diferencia entre las frecuencias observadas con respecto a las esperadas dada una determinada hipótesis (Gómez-Gómez *et al.*, 2003). Se hicieron dos tratamientos, con los registros de *Epithelantha* se estimó la frecuencia de la afinidad por una variable categórica, con respecto a *Ariocarpus*, *Rapicactus*, *Strobocactus* y *Turbinicarpus*. En el segundo tratamiento se aplicó esta prueba únicamente entre las 10 especies que integran a *Epithelantha*. Todos los análisis estadísticos, tanto con las variables continuas como categóricas se ejecutaron en el ambiente RStudio 1.1.447 (RStudio Team, 2018) ejecutado en R 3.5.0 (R Development Core Team 2008).

## **Resultados**

### **Fechado y reconstrucción de estado ancestrales**

Se estimó que *Epithelantha* divergió con respecto a su grupo hermano hace 9.09 millones de años (Ma) aproximadamente, con un intervalo de credibilidad (IE) entre 6.48 y 10.38 Ma (95% de densidad posterior más alta (HPD)). Un segundo evento hacia el interior de *Epithelantha* permitió la divergencia en dos clados hace aproximadamente 6.71 Ma [intervalo de credibilidad entre 4.57 y 8.37 Ma (95% HPD)], siendo el clado E2 integrado por *E. greggii*, *E. pachyrhiza*, *E. polycephala* y *E. pulchra*, el más antiguo [4.53 Ma con un intervalo de credibilidad entre 2.55 y 5.83 Ma (95% HPD)]. El clado E1, por lo tanto, es el más recientemente diversificado [3.03 Ma IE = 1.99 y 5.44

Ma (95% HPD)] y en él se resuelven *E. bokei*, *E. cryptica*, *E. ilariae*, *E. micromeris*, *E. potosina* y *E. spinosior* (Fig. 2).

El ICP encontró que Bio1, Bio3, Bio4, Bio9, Bio11 y Bio12 son las variables que contribuyen más a la varianza y no están correlacionadas entre sí (Tabla 1), por lo que, en conjunto con los valores de pH, fueron empleados para hacer la reconstrucción de caracteres ancestrales sobre el árbol obtenido mediante reloj molecular. Se hizo la reconstrucción de estados ancestrales y se calculó el valor K de Blomberg y Lambda de Pagel para cuatro variables con señal filogenética (Fig. 3): pH del suelo (K = 1.511694;  $\lambda$  = 1.022611); Bio3: isotermalidad (K = 1.164444;  $\lambda$  = 0.9818318), Bio4: estacionalidad de la temperatura (K = 0.8811825;  $\lambda$  = 0.7242332) y Bio12: precipitación anual (K = 0.7216596;  $\lambda$  = 0.8884284). El pH del suelo donde se establecen las especies que integran a *Epithelantha* tienden hacia la alcalinidad, siendo la novedad evolutiva en este clado, en donde el promedio de pH va de 7.84 a 8.03, siendo *E. ilariae* que soporta el pH más bajo del promedio (pH promedio = 7.84), carácter que comparte con *Ariocarpus* (pH promedio = 7.81) y *Rapicactus* (pH promedio = 7.84). En tanto que los géneros hermanos *Turbinicarpus* y *Strombocactus* comparten la condición de establecerse en suelos neutros (pH de 7.01 a 7.18). El rango de isotermalidad (Bio3) que ocupa *Epithelantha* va de 49.31 a 51.56, siendo los valores menores de isotermalidad, los que indican que la temperatura es más variable a lo largo del año. *Epithelantha potosina* se distribuye en el extremo sur del rango del género, por lo que mantiene la condición ancestral de soportar valores de isotermalidad cercanos a 63 y la temperatura es menos variable, al igual que en los géneros hermanos (*Ariocarpus*, *Rapicactus*, *Strombocactus* y *Turbinicarpus*) y el grupo externo (*Coryphantha*, *Echinocactus*, *Lophophora* y *Mammillaria*) que crecen en suelos cuyo valor promedio de pH van de 58.62 a 66.8. Las especies de *Epithelantha* diversificaron en ambientes donde la estacionalidad de la temperatura (Bio4) es mayor a lo largo del año (desviación estándar de 52.58 a 56.63). *Epithelantha potosina* es la especie que comparte con el grupo hermano, *Turbinicarpus* la preferencia por hábitats en donde la estacionalidad es menor (desviación estándar: 23.91 a 29.28). La precipitación anual (Bio12) indica que la condición ancestral para *Epithelantha* es un hábitat en donde la precipitación anual va de 311.68 a 482.2 mm (Fig. 3d), sin embargo, en el clado integrado por *E. greggii* y *E. polycephala*, hay un cambio que permitió adaptarse a sitios cuya precipitación anual es menor (254.5 a 302 mm). Por otra parte, *E. ilariae* es la especie que prefiere sitios con mayor precipitación anual (544.5 mm). Esta condición la comparte con *Strombocactus* (586.81 mm) y *Turbinicarpus* (632 mm).

Los valores K de Blomberg y Lambda de Pagel indican que no hay señal filogenética para Bio1 ( $K = 0.1694556$ ;  $\lambda = 6.761339e^{-05}$ ), Bio9 ( $K = 0.4216433$ ;  $\lambda = 6.761339e^{-05}$ ) y Bio11 ( $K = 0.264773$ ;  $\lambda = 0.4094559$ ). La reconstrucción de estados ancestrales se muestra en la figura 4. La diferencia en la precipitación media anual (Bio1) favoreció la divergencia entre *Epithelantha micromeris* (17.175 mm) y *E. cryptica* (19.6 mm). A su vez, la condición de mayor precipitación favoreció la divergencia de *E. ilariae* (22.05 mm). De igual forma, la temperatura promedio del trimestre más frío (Bio11) solo fue informativa para explicar la divergencia entre *E. micromeris* (9.79 °C) y *E. cryptica* (12.33 °C). La temperatura promedio del trimestre más seco (Bio9) no es informativa, ya que, tanto *Epithelantha* como los géneros afines ocupan un mismo nicho climático, a excepción de *E. micromeris* y *E. cryptica* que divergieron hacia hábitats en donde la temperatura promedio del trimestre más seco es de 13.04 °C.

### Caracterización ecológica

El análisis Chi-cuadrada aplicado para evaluar la preferencia por un tipo de suelo en particular fue significativo ( $p = 0.00269$ ). El valor más alto es para *Epithelantha pachyrhiza* ( $r$  de Pearson = 3.372), por lo que su asociación por los suelos tipo xerosol cálcico es la más fuerte. *Epithelantha bokei* es frecuente en regosoles calcáreos ( $r$  de Pearson = 3.662), en tanto que *E. pulchra* y *E. spinosior* se establecen en kastanozems lúvicos, ( $r$  de Pearson = 3.36). *Epithelantha micromeris* presenta una fuerte asociación por yermosol cálcico ( $r$  de Pearson = 2.212); sin embargo, *E. micromeris* es frecuente en otros tres tipos de suelos: regosoles eutríficos, xerosoles lúvicos y yermosoles lúvicos ( $r$  de Pearson = 2.114 para cada uno). En contraparte, su especie hermana, *E. cryptica*, no tiene preferencia por un tipo de suelo en particular. *Epithelantha ilariae* y *E. greggii* son frecuentes en kastanozems háplicos ( $r$  de Pearson = 2.07 y 1.647, respectivamente). La asociación de *E. polycephala* con respecto a litosol es débil ( $r$  de Pearson = 1.76), en tanto que *E. potosina* no presenta afinidad por un tipo particular de suelo.

Se evaluó la asociación por el tipo de suelo para *Epithelantha* con respecto a sus géneros hermanos, la prueba Chi-cuadrada fue significativa ( $p = 4.096e^{-08}$ ). *Epithelantha* presenta una fuerte asociación por kastanozems háplicos ( $r$  de Pearson = 3.749) y su asociación por rendzinas es negativa ( $r$  de Pearson = -2.617). *Turbinicarpus*, que es el género hermano, presentó una correlación moderada por rendzinas ( $r$  de Pearson = 1.667). En cuanto a los géneros restantes, *Rapicactus* es frecuente en rendzinas ( $r$  de Pearson = 3.192) y litosoles ( $r$  de Pearson = 2.231); *Ariocarpus* se establece en tres tipos de suelo: regosol eutrífico ( $r$  de Pearson = 2.754) y kastanozem

cálcico ( $r$  de Pearson = 1.761) y su asociación es negativa por kastanozem háplicos ( $r$  de Pearson = -2.078). Finalmente, *Strombocactus* se establece en dos tipos de suelo: xerosol cálcico ( $r$  de Pearson = 2.848) y kastanozem lúvico ( $r$  de Pearson = 1.173), en tanto que su asociación por litosoles es negativa ( $r$  de Pearson = -2.053).

La segunda variable evaluada, utilizando Chi-cuadrada es la geoforma, que también resultó significativa ( $p = 0.008966$ ). Las especies que se establecen en sistemas de piedemonte son *Epithelantha pachyrhiza* ( $r$  de Pearson = 3.009) y *E. greggii* ( $r$  de Pearson = 2.121). *Epithelantha polycephala* ( $r$  de Pearson = 2.58), *E. spinosior* ( $r$  de Pearson = 2.719) y *E. ilariae* ( $r$  de Pearson = 0.745) son frecuentes en montañas de plegamiento. *Epithelantha potosina* es frecuente en sistemas kársticos ( $r$  de Pearson = 1.569) y en planicies ( $r$  de Pearson = 1.564), en tanto que *E. micromeris* es frecuente en sistemas kársticos ( $r$  de Pearson = 2.014), llanuras lacustres y planicies ( $r$  de Pearson = 1.716 en ambos casos). Por otro lado, *Epithelantha micromeris* exhibe asociación negativa por dos geoformas: sistemas de piedemonte ( $r$  de Pearson = -1.824) y montañas de plegamiento ( $r$  de Pearson = -1.721). El análisis de correlación entre geoformas y géneros resultó significativo ( $p = 6.941e^{-11}$ ). *Epithelantha* es frecuente en sistemas de piedemonte ( $r$  de Pearson = 4.055), pero su asociación por planicies es negativa ( $r$  de Pearson = -2.737). En contraste, *Turbinicarpus* se distribuye frecuentemente en planicies ( $r$  de Pearson = 3.133) y su asociación por sistemas de piedemonte es negativa ( $r$  de Pearson = -2.412). Los resultados para los géneros restantes indican que *Strombocactus* se distribuye en sistemas fluviales ( $r$  de Pearson = 3.827) y sistemas con relieve volcánico ( $r$  de Pearson = 3.389), en tanto que para *Ariocarpus* y *Rapicactus*, los residuos de Pearson no indican asociación por un tipo de sistema en particular.

## Discusión

De acuerdo con Arakaki *et al.*, (2011) y Hernández-Hernández *et al.*, (2014), Cactaceae es un grupo que diversificó a mediados del Mioceno y finales del Plioceno ( $\approx 32$  Ma), lo cual coincide con la formación de las regiones áridas de Norteamérica. *Epithelantha* diversificó hace  $\approx 9.09$  Ma con un IE entre 6.48 y 10.38 Ma en el Mioceno. Wiens *et al.*, (2013) explica que hay una relación positiva entre el tiempo en que se da un cambio de régimen climático y la riqueza de especies, por lo que regiones áridas pueden ser también ricas en diversidad. El uso de métodos de reconstrucción filogenética ofrece la oportunidad de comprender como los linajes vegetales pueden haber

evolucionado en un contexto selectivo muy dinámico y con fuertes presiones selectivas (Bárcenas-Argüello *et al.*, 2013). Entre estos factores se encuentra el suelo como elemento que determina la distribución de las especies de Cactaceae. Patrones similares se han observado en otras familias vegetales y que, visto desde un enfoque filogenético, cobra mayor relevancia. De Kok (2002) señala que la capacidad de crecer en suelo de serpentina se considera como un carácter plesiomórfico para *Oxera* Labill. (Lamiaceae) y *Guioa* Cav. (Sapindaceae). La distribución actual de *Epithelantha* que se limita al Desierto Chihuahuense (Fig. 1) es el resultado de la interacción entre el clima y el suelo, siendo este último factor el más importante. *Epithelantha* se asocia fuertemente con los suelos kastanozems háplicos, que se caracterizan por acumulaciones de carbonatos secundarios y una capa de humus reducida, propios de ambientes que están en transición con zonas áridas (FAO, 2014), en sitios donde el pH va de 7.84 a 8.03, siendo la variable ambiental de mayor relevancia y que mejor explica la divergencia de *Epithelantha*. Cuatro especies presentan una fuerte asociación por el sustrato: *E. bokei*, *E. pachyrhiza*, *E. pulchra* y *E. spinosior*, de las cuales *E. bokei* se distribuye ampliamente en el Desierto Chihuahuense, seguida de *E. pulchra* y *E. spinosior*, distribuidas hacia las estribaciones de los Bosques de pino-encino de la Sierra-Madre Oriental (Fig. 5), en tanto que *E. pachyrhiza* es la especie de distribución más restringida de todo el género (Fig. 5). La influencia las variables del suelo se ha reportado para *Cephalocereus totolapensis*, en donde se registró en un rango de pH de 5.5 a 6.9 (Bárcenas-Argüello *et al.*, 2010), más recientemente se ha reportado que *C. parvispinus* se establece en suelos ricos en yeso (Arias *et al.*, 2019), en donde el pH del suelo tiende hacia la alcalinidad, por lo que probablemente el tipo de suelo ha influido en el proceso de diversificación del género (Fig. 3a). Una consecuencia debida a la interacción suelo-planta y que sería importante abordar, es la incorporación de grandes cantidades de calcio en forma de cristales en sus tejidos. De acuerdo con Bárcenas-Argüello *et al.*, (2010), los cristales de calcio tienen importancia filogenética al ser reflejo de la interacción de la planta con el ambiente, por lo tanto, no se debe descartar la presencia de estas estructuras en *Epithelantha*. En los géneros aliados, *Turbinicarpus* y *Rapicactus* se han reportado estas estructuras y cada linaje posee un tipo particular (De la Rosa-Tilapa *et al.*, 2018), probablemente por la interacción con el tipo de suelo en donde se establecen, ya que, de acuerdo con nuestros resultados, *Turbinicarpus* es más frecuente en rendzinas, mientras que *Rapicactus* es frecuente tanto en rendzinas como en litosoles.

Se ha encontrado que especies distribuidas en el Desierto Chihuahuense deben su patrón de distribución a cambios climáticos (Scheinvar *et al.*, 2016). La principal condición climática que

influye en la distribución de *Epithelantha* es la isothermalidad (Bio3), cuyo valor promedio es de 51.23, por lo que la oscilación de las temperaturas de día a noche en relación con las oscilaciones anuales es variable (O'Donell & Ignizio, 2012). *Epithelantha potosina* se establece en hábitats donde el valor de isothermalidad de 63, y de acuerdo con nuestros resultados, esta condición puede considerarse una reversión con respecto a *Turbinicarpus* (Fig. 3b). *Epithelantha potosina* se distribuye hacia el sur del Desierto Chihuahuense (Fig. 5), en un área donde se reportan 15 de las aproximadamente 20 especies conocidas de *Turbinicarpus* (Grupo San Luis, 2004). *Epithelantha* comparte un patrón semejante con *Thelocactus*. Mosco (2019) reporta que la isothermalidad es una de las variables ambientales que influye en la distribución de este último género, por lo que esta condición extrema de oscilación de temperatura fue un factor de presión en la fisiología en ambos linajes que permitió procesos de diversificación. López (2017) propone que efectos de la estacionalidad de la temperatura favorecieron la radiación adaptativa en *Mammillaria* spp., distribuidas en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. La precipitación anual (Bio12), definida como la suma de todos los valores totales de precipitación mensual (O'Donell & Ignizio, 2012), es significativa para *E. greggii* y *E. polycephala* que son las especies que divergieron en nichos con regímenes de precipitación reducido (Fig. 3d, Bio12 = 254.5 a 302 mm). *Epithelantha greggii* es una especie de amplia distribución, que sigue una dirección de oriente a poniente del Desierto Chihuahuense, en contraste, *E. polycephala* solo se distribuye en la zona central de la misma ecorregión (Fig. 5). El tipo de suelo es el elemento del nicho que las diferencia, *E. greggii* es frecuente en kastanozems háplicos y *E. polycephala* se asocia con litosoles, por lo que, en conjunto con evidencias morfológicas y moleculares, se apoya la propuesta de reconocer dos especies distintas (Aquino *et al.*, 2019). Por otra parte, *Epithelantha ilariae* es la especie distribuida en ambientes con mayor humedad (544.5 mm). Su distribución se restringe entre el Desierto Chihuahuense y el Matorral Espinoso Tamaulipeco (Fig. 5).

El sistema de piedemonte es la geoforma en donde *Epithelantha* se distribuye con mayor frecuencia, en tanto que *Turbinicarpus* se establece en planicies. *Epithelantha pachyrhiza*, *E. polycephala* y *E. spinosior* son las especies que presentan una fuerte asociación con una determinada geoforma, seguidos en importancia por *E. micromeris*, *E. greggii* y *E. potosina*. Son exiguos los reportes sobre la asociación entre especies y geoformas. Trujillo (1984) reporta que la densidad de individuos de *Echinocactus platyacanthus* tiende a disminuir hacia los sistemas de piedemonte y planicies en donde predomina el estrato arbustivo. Por su parte, Bárcenas-Argüello *et*

*al.*, (2010) reportan para *Cephalocereus*, que la preferencia por un sitio particular dentro de una geoforma garantiza que el sustrato esté bien drenado y por lo tanto la distribución será más restringida. La asociación entre un linaje con respecto a la geoforma debe cobrar relevancia, ya que leves variaciones climáticas dentro de una geoforma y al ser ambientes edáficamente diversos pueden promover el aislamiento de las poblaciones (Kozak & Wiens, 2006; Mendoza, 2017). Además, el desarrollo de una geoforma implica fenómenos dinámicos como el movimiento de capas tectónicas, así como la intemperización y arrastre de materiales del suelo que influyen en la supervivencia de comunidades vegetales (Huggett, 2011). La dinámica dentro de una geoforma ha sido relevante en la evolución del Desierto Chihuahuense. Wondzell *et al.*, (1996) ejemplifican que pequeños aumentos o disminución de la humedad en una geoforma pueden favorecer determinadas comunidades vegetales, por lo que, desde nuestro punto de vista, podrían explicar procesos evolutivos de linajes de cactáceas y con ello contribuir a la comprensión de eventos como la distribución simpátrica de especies de un mismo género.

La temperatura media anual (Bio1) y la temperatura media del trimestre más frío (Bio11) no presentaron señal filogenética. Sin embargo, ambas variables explican la divergencia de nicho entre especies hermanas, en este caso, entre *Epithelantha micromeris* y *E. cryptica* (Figs. 4a y 4c). Aquino *et al.*, (2019) explican que no es posible delimitar ambos taxones únicamente con secuencias de cpDNA, por lo que se requiere una combinación de caracteres morfológicos para reconocerlas. La reconstrucción de estados ancestrales es congruente con la propuesta de reconocer ambos linajes. *Epithelantha micromeris* prefiere nichos con regímenes anuales de precipitación bajos (17.17 mm) y temperaturas muy bajas durante el cuarto más frío (9.79 °C). Por el contrario, *E. cryptica* prefiere nichos con regímenes con mayor precipitación anual (19.6 mm) y mayor temperatura durante el trimestre más frío (12.33 °C). Por otra parte, la preferencia por nichos más extremos explica la amplia distribución de *E. micromeris*. Wiens *et al.*, (2013) señalan que las especies cuyos rangos se extienden a condiciones más extremas son capaces de tolerar una mayor gama de condiciones que otras y tienen una amplitud de nicho mayor, lo cual puede explicar la distribución de *E. micromeris* entre el Desierto Chihuahuense y los Bosques de pino-encino de la Sierra Madre Oriental (Fig. 5), además, es la única especie capaz de asociarse con tres tipos distintos de geoformas y cuatro tipos distintos de suelo, en contraparte *E. cryptica* tiene una menor distribución, en la porción nororiental del Desierto Chihuahuense y no tiene una asociación particular por tipo de suelo o geoforma (Fig. 5).



La combinación de tres fuentes de información (morfología, moléculas y datos ambientales), tiene un amplio potencial en la delimitación de especies. Este trabajo refuerza la hipótesis de que *Epithelantha* y las especies que lo integran forman linajes separados y conservan más o menos los mismos nichos que sus ancestros, de modo que las especies estrechamente relacionadas serán ecológicamente similares (Donoghue & Edwards, 2014). Finalmente, los datos derivados del conocimiento del nicho son importantes en estudios de conservación. Un número importante de especies que integran a los cuatro géneros hermanos de *Epithelantha* se caracterizan por presentar poblaciones cuya área de distribución es menor de 10 km<sup>2</sup> (Hernández *et al.*, 2010). A partir de nuestros datos, *E. pachyrhiza* es la especie de distribución más restringida y con más restricciones con respecto al nicho que habita, por lo que bajo la nueva circunscripción y los requerimientos ambientales aquí descritos, el siguiente paso es proponer un modelo de nicho más completo para las especies de *Epithelantha*, con el fin de conocer la distribución potencial, así como sus interacciones bióticas (polinizadores, dispersores de semillas, patógenos), los cuales permitan justificar la inclusión de las especies dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y UICN.

### **Agradecimientos**

Este estudio es parte del trabajo de tesis del primer autor y presentado como requisito parcial para optar por el título de Doctor en Ciencias en el Posgrado de Ciencias Biológicas (PCB-UNAM) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No. 263558. Agradecemos a Omar González-Zorzano (Jardín Botánico, UNAM), Leccinum García-Morales (Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria), Cristian Cervantes (Jardín Botánico, UNAM), Beatriz Aquino (Facultad de Artes y Diseño, UNAM) y a Rigel Nava (Universidad Autónoma de Nuevo León) por su apoyo en campo y laboratorio.

### **Contribución de los autores**

DA y SA diseñaron y realizaron la investigación; DA, AML, MAGB y SA analizaron los datos; DA, AML y SA redactaron el artículo.

### Literatura citada

- Aguilar-Morales G, Martínez-Peralta C, Arroyo-Feria P, Golubov J, Mandujano MC. 2011.** Distribución geográfica del género *Ariocarpus* Scheidweiler (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. **56**: 49–63.
- Alvarado-Sizzo H, Casas A, Parra F, Arreóla-Nava H, Terrazas T y Sánchez C. 2018.** Species delimitation in the *Stenocereus griseus* (Cactaceae) species complex reveals a new species, *S. huastecorum*. *PLoS ONE*. **13**: e0190385.
- Arakaki M, Christin PA, Nyffeler R, Lendel A, Eggli U, Ogburn RM, Spriggs RM, Moore MJ, Edwards EJ. 2011.** Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *PNAS*. **108**: 8379–8384.
- Aquino D, Cervantes C, Gernandt D, Arias S. 2019.** Species delimitation and phylogeny of *Epithelantha* (Cactaceae). *Systematic Botany*. **44**: 600–615.
- Arias S, Tapia HJ, Guzmán U. 2019.** A new species of *Cephalocereus* (Cactaceae) from southern Mexico. *Phytotaxa*. **392**: 147–156.
- Bárcenas-Argüello MA, Gutiérrez-Castorena M, Terrazas T, López-Mata L. 2010.** Rock–soil preferences of three *Cephalocereus* (Cactaceae) species of tropical dry forests. *Soil Science Society American Journal*. **74**: 1374–1382.
- Bárcenas-Argüello MA, Gutiérrez-Castorena M, Terrazas T. 2013.** The role of soil properties in plant endemism – A revision of conservation strategies. In: Hernandez MH, ed. *Soil processes and current trends in quality assessment*. Croatia: InTech, 381–398.
- Butler CJ, Wheeler EA, Stabler B. 2012.** Distribution of the threatened lace hedgehog cactus (*Echinocereus reichenbachii*) under various climate change scenarios. *Journal of the Torrey Botanical Society*. **139**: 46–55.
- Cardoza-Martínez G, Becerra-López JL, Esparza-Estrada C, Estrada-Rodríguez JL, Czaja A, Ehsan M, Baltierra-Trejo E, Romero-Méndez U. 2019.** Shifts in climatic niche occupation in *Astrophytum coahuilense* (H. Möller) Kayser and its potential distribution in Mexico. *Sustainability*. **11**: 1138.
- Crozier B. 2005.** *Systematics of Cactaceae Juss.: phylogeny, cpDNA evolution, and classification, with emphasis on the genus Mammillaria Haw.* PhD thesis, University of Texas at Austin, TX, USA.

- Cruz-Cárdenas G, López-Mata L, Ortiz-Solorio C, Villaseñor JL, Ortiz E, Silva J, Estrada-Godoy F. 2014.** Interpolation of mexican soil properties at a scale of 1:1,000,000. *Geoderma*. **213**: 29–35.
- De Kok R. 2002.** Are plant adaptations to growing on serpentine soil rare or common? A few case studies from New Caledonia. *Adanisonia*. **24**: 229–238.
- De la Rosa-Tilapa A, Vázquez-Sánchez M, Terrazas T. 2018.** Stem anatomy of *Turbiniacarpus* s.l. (Cactaceae, Cactaceae) and its contribution to systematics. *Plant Biosystems*.  
<https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1527791>
- Del Castillo R. 1996.** Ensayo sobre el fenómeno calcícola-calcífuga en cactáceas mexicanas. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. **41**: 3–11.
- Donati D, Bianchi C, Pezzi G, Conte L, Hofer A, Chiarucci A. 2017.** Biogeography and ecology of the genus *Turbiniacarpus* (Cactaceae): environmental controls of taxa richness and morphology. *Systematic Biodiversity*. **15**: 361–371.
- Donoghue MJ, Edwards EJ. 2014.** Biome shifts and niche evolution in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic*. **45**: 547–72.
- Dormann CF, Elith J, Bacher S, Buchmann C, Carl G, Carré G, Márquez JR, Gruber B, Lafourcade B, Leitão PJ, Münkemüller T, McClean C, Osborne PE, Reineking B, Schröder B, Skidmore AK, Zurell D, Lautenbach S. 2013.** Collinearity: a review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography*. **36**. 27–46
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012.** Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. **29**: 1969–1973.
- Ersts, PJ. 2018.** Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. URL:  
[http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg). [Accessed 15 february 2018].
- Gómez-Gómez M, Danglot-Banck C, Vega-Franco L. 2003.** Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuando usarlas. *Revista Mexicana de Pediatría*. **70**: 91–99.
- Govindarajulu R, Hughes CE, Bailey CD. 2011.** Phylogenetic and population genetic analyses of diploid *Leucaena* (Leguminosae; Mimosoideae) reveal cryptic species diversity and patters of divergent allopatric speciation. *American Journal of Botany*. **98**: 2049–2063.
- Guerrero PC, Arroyo MT, Bustamante RO, Duarte M, Hagemann TK, Walter HE. 2011.** Phylogenetics and predictive distribution modeling provide insights into the geographic

divergence of *Eriosyce* subgen. *Neoporteria* (Cactaceae). *Plant Systematic and Evolution*. **297**: 113–128.

**Grupo San Luis. 2004.** *The genus Turbinicarpus in San Luis Potosí*. Cactus & Co. Libri.

**Hernández H, Gómez-Hinostrosa C, Hoffmann G. 2010.** Is geographical rarity frequent among the cacti of the Chihuahuan Desert? *Revista Mexicana de Biodiversidad*. **81**: 163–175.

**Hernández-Hernández T, Hernández HM, De-Nova JA, Puente R, Eguiarte LE, Magallón S. 2011.** Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany* **98**: 44–61.

**Hernández-Hernández T, Brown JW, Schlumpberger BO, Eguiarte L, Magallón S. 2014.** Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. *New Phytologist*. **202**: 1382–1397.

**Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. 2005.** Very high-resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal Climatology*. **25**. 1965–1978.

**Huggett R. 2011.** *Fundamentals of geomorphology*. London UK: Routledge Taylor & Francis Group.

**Hunt DR, Taylor NP, Charles G, eds. 2006.** *The New Cactus Lexicon, text and atlas*. Milbourne Port, UK: DH Books.

**Iberri F. 2009.** *Distribución geográfica de Nopalxochia phyllanthoides (DC.) Britton et Rose (Cactaceae): modelos predictivos y conservación*. Bachelor's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, CdMx, MX.

**Jones KE, Reyes-Betancourt A, Hiscock S, Carine MA. 2014.** Allopatric diversification, multiple habitat shifts, and hybridization in the evolution of *Pericallis* (Asteraceae), a Macaronesian endemic genus. *American Journal of Botany*. **101**: 637–651.

**Kozak KH, Wiens JJ. 2006.** Does niche conservatism promote speciation? A case study in North American salamanders. *Evolution* **60**: 2604–2621.

**Lebgue-Keleng T, Aviña-Domínguez YE, Soto-Cruz RA, Quiñonez-Martínez M, Cortés-Palacios L, Melgoza-Castillos A, Morales-Nieto C, Vélez-Sánchez-Verín C, Balderrama-Castañeda S. 2014.** Mineralogía del suelo y su relación con las especies de cactáceas en el sureste de Chihuahua, México. *Ecología Aplicada*. **13**: 205–209.

- López N. 2017.** *Filogeografía y diversificación de Mammillaria*. Master's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, CdMx, MX.
- Mendoza ME. 2017.** Geformas. In: Villaseñor G.L. ed. *La biodiversidad en Michoacán. Estudio de Estado 2, vol. I.*, MX: CONABIO, 35–44.
- Mosco A. 2019.** Specific habitat requirements and niche conservatism for nine species of the Mexican genus *Thelocactus* (Cactaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*. **90**: e902246.
- Nevado B, Contreras-Ortiz N, Hughes C, Filatov DA. 2018.** Pleistocene glacial cycles drive isolation, gene flow and speciation in the high-elevation Andes. *New Phytologist*. **219**: 779–793.
- O'Donnell MS, Ignizio DA. 2012.** *Bioclimatic predictors for supporting ecological applications in the conterminous United States*. Virginia, US: US Geological Survey Data Series
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2007.** *Digital soil map of the world*. URL. <http://www.fao.org/geonetwork/srv/en/metadata.show?id=14116#>. [Accessed 5 may 2018].
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2014.** *Base referencial mundial del recurso suelo*. Roma IT: FAO.
- Pineda N, Ochoa R, Espinosa L, Palacio J, Flores P, Balderas M, Magaña D, Canchola Y, Reyna M, Reyes I y García G. 2014.** IX Reunión nacional de geomorfología. Resúmenes. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca.
- QGIS Development Team, 2009.** QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation. URL <http://qgis.osgeo.org> [Accessed 5 May 2018].
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. 2014.** Tracer v1.6. URL <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> [Accessed 12 June 2018].
- Restrepo L, González J. 2007.** De Pearson a Spearman. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **20**: 183–192.
- Revell LJ. 2012.** Phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*. **3**: 217–223.
- Rissler LJ, Apodaca JJ. 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.

- R Development Core Team. 2018.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. [Accessed 11 june 2018].
- RStudio Team. 2018.** *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc. Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>. [Accessed 11 june 2018].
- Ruiz-Sánchez E, Specht CD. 2014.** Ecological speciation in *Nolina parviflora* (Asparagaceae): lacking spatial connectivity along of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *PLoS ONE*. **9**: e98754.
- Scheinvar E, Gámez N, Castellanos-Morales G, Aguirre-Planter E, Eguiarte L. 2016.** Neogene and Pleistocene history of *Agave lechuguilla* in the Chihuahuan Desert. *Journal of Biogeography*. **44**: 322–334.
- Thiers BM. 2015.** Index herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/> [Accessed 20 april 2018].
- Trujillo S. 1984.** Distribución geográfica y ecológica de *Echinocactus platyacanthus*, un ejemplo de distribución disyunta. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. **29**: 75–80.
- Vázquez-Benítez B, Arias S, Cervantes-Sandoval A. 2016.** Variación morfológica de *Coryphantha* (Cactaceae): un enfoque multivariado. *Acta Botánica Mexicana*. **116**: 21-47.
- Vázquez-Sánchez M, Terrazas T, Arias S, Ochoterena H. 2013.** Molecular phylogeny, origin and taxonomic implications of the tribe Cacteeae (Cactaceae). *Systematic and Biodiversity* **11**: 103–116.
- Walpole RE, Myers RH, Myers SL, Ye K. 2012.** *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. CdMx, MX: Pearson Educación.
- Wiens JJ, Kozak KH, Silva N. 2013.** Diversity and niche evolution along aridity gradients in North American Lizards (Phrynosomatidae). *Evolution*. **67**: 1715–1728.
- Wondzell SM, Cunningham GL, Bachelet D. 1996.** Relationships between landforms, geomorphic processes, and plant communities on a watershed in the northern Chihuahuan Desert. *Landscape Ecology*. **11**: 351–362.
- World Soil Information. 2014.** Soil geographic databases. <https://www.isric.org/explore/soil-geographic-databases> [Accessed 5 may 2018].

MATERIAL SUPLEMENTARIO 1: Especímenes representativos para la reconstrucción de estados ancestrales en *Epithelantha* y aliados (especie, país, estado, colector, número de colecta y herbario). Número de accesos de GenBank (*petL-psbE*, *psbA-trnH*, *trnL-F*, *trnQ-rps16*). \*— secuencia faltante.

*Ariocarpus trigonus* (F.A.C. Weber) K. Schum. MEXICO Tamaulipas, S. Arias 1993 (MEXU), MK284027, MK284089, MK284149, MK284208; *Coryphantha calipensis* Bravo ex S. Arias, U. Guzmán & S. Gama-López. MÉXICO Oaxaca, B. Vázquez-Benítez 2555 (MEXU), MK284029, MK284091, MK284151, MK284210; *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto. MÉXICO Querétaro, S. Arias 1679 (MEXU), MK284037, MK284099, MK284159, MK284218; *Epithelantha bokei* L.D. Benson, MEXICO. Coahuila D. Aquino 318 (MEXU), MK283983, MK284044, MK284104, MK284165; *Epithelantha cryptica* D. Donati & Zanov. MEXICO, Coahuila, D. Aquino 355 (MEXU), MK283993, MK284054, MK284114, MK284175; *Epithelantha greggii* (Engelm.) Orcutt MEXICO, Nuevo León, D. Aquino 329 (MEXU), MK284008, MK284069, MK284129, MK284190; *Epithelantha ilariae* D. Donati & Zanov. MEXICO, Nuevo León, D. Aquino 323 (MEXU), MK283987, MK284048, MK284108, MK284169; *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britton & Rose MÉXICO, Nuevo León, D. Aquino 333 (MEXU), MK283996, MK284057, MK284117, MK284178; *Epithelantha pachyrhiza* (W.T. Marshall) Backeb. MÉXICO, Coahuila, D. Aquino 305 (MEXU), MK284013, MK284074, MK284134, MK284195; *Epithelantha polycephala* Backeb. MÉXICO, Coahuila, D. Aquino 352 (MEXU), MK284019, MK284080, MK284140, MK284201, D. Aquino 357 (MEXU); *Epithelantha potosina* (D. Donati & Zanov.) Aquino & S. Arias MÉXICO, San Luís Potosí, D. Aquino 383 (MEXU), MK283990, MK284051, MK284111, MK284172; *Epithelantha pulchra* (D. Donati & Zanov.) Aquino & S. Arias MEXICO Nuevo León; D. Aquino 311 (MEXU), MK284016, MK284077, MK284137, MK284198; *Epithelantha spinosior* C. Schmoll. MEXICO, Nuevo León, D. Aquino 334 (MEXU), MK284001, MK284062, MK284122, MK284183; *Lophophora williamsii* (Lem. ex Salm-Dyck) J.M. Coult. MÉXICO San Luís Potosí, S. Arias 1849 (MEXU), MK284026, MK284088, MK284148, —; *Mammillaria mystax* Mart. MÉXICO Puebla, D. Aquino 225 (MEXU), MK284033, MK284095, MK284155, MK284214; *Rapicactus beguinii* (N.P. Taylor) Lüthy. MÉXICO Nuevo León, S. Arias 1854 (MEXU), MK284024, MK284086, MK284146, MK284207; *Strombocactus disciformis* (DC.) Britton & Rose. MÉXICO Querétaro, S. Arias 1738

(MEXU), MK284028, MK284090, MK284150, MK284209. *Turbinicarpus alonsoi* Glass & S. Arias. MÉXICO Guanajuato, A. García 24 (MEXU), MK284021, MK284082, MK284142, MK284203. *Turbinicarpus horripilus* (Lem.) V. John & Říha. MÉXICO Hidalgo, J. M. Chalet 201 (MEXU), MK284023, MK284084, MK284144, MK284205. *Turbinicarpus pseudomacrochele* (Backeb.) Buxb. & Backeb. MÉXICO Hidalgo, *Turbinicarpus* Collector Group 9101 (MEXU), MK284022, MK284083, MK284143, MK284204.



MATERIAL SUPLEMENTARIO 2. Lista de variables bioclimáticas empleadas en el análisis. Se explica la clave y su significado.

Bio1: Temperatura media anual

Bio2: Rango medio diario (promedio mensual (temperatura máxima - temperatura mínima))

Bio3: Isotermalidad (BIO2/BIO7) (\* 100)

Bio4: Estacionalidad de la temperatura (desviación estándar \* 100)

Bio5: Temperatura máxima del mes más cálido

Bio6: Temperatura mínima del mes más frío

Bio7: Rango de temperatura anual (BIO5-BIO6)

Bio8: Temperatura media del trimestre más húmedo

Bio9: Temperatura media del trimestre más seco

Bio10: Temperatura media del trimestre más caliente

Bio11: Temperatura media del trimestre más frío

Bio12: Precipitación anual

Bio13: Precipitación del mes más húmedo

Bio14: Precipitación del mes más seco

Bio15: Estacionalidad de la precipitación (Coeficiente de variación)

Bio16: Precipitación del trimestre más húmedo

Bio17: Precipitación del trimestre más seco

Bio18: Precipitación del trimestre más caliente

Bio19: Precipitación del trimestre más frío

TABLA 1. Coeficientes de correlación de Pearson calculados para las 19 variables bioclimáticas. La interpretación de las claves se enlista en el material suplementario 1.

|       | bio1   | bio2   | bio3   | bio4   | bio5   | bio6   | bio7   | bio8   | bio9   | bio10  | bio11  | bio12  | bio13  | bio14  | bio15  | bio16  | bio17  | bio18  | bio19  |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| bio1  | 1      | 0.9901 | 0.991  | -0.100 | -0.049 | 0.1012 | -0.110 | -0.019 | 0.1199 | -0.039 | 0.100  | -0.011 | -0.067 | -0.014 | -0.175 | -0.029 | 0.046  | -0.023 | 0.0851 |
| bio2  | 0.990  | 1      | 0.996  | -0.115 | -0.106 | 0.0083 | -0.076 | -0.100 | 0.0873 | -0.134 | 0.032  | 0.0041 | -0.092 | -0.010 | -0.200 | -0.014 | 0.063  | 0.0170 | 0.1301 |
| bio3  | 0.991  | 0.9965 | 1      | -0.135 | -0.130 | 0.0446 | -0.119 | -0.112 | 0.0965 | -0.138 | 0.054  | 0.0136 | -0.070 | -0.004 | -0.188 | -0.005 | 0.075  | 0.0176 | 0.1361 |
| bio4  | -0.10  | -0.115 | -0.135 | 1      | 0.563  | -0.642 | 0.8647 | 0.619  | -0.507 | 0.704  | -0.723 | -0.607 | -0.343 | -0.453 | 0.100  | -0.524 | -0.617 | -0.554 | -0.534 |
| bio5  | -0.049 | -0.106 | -0.130 | 0.5633 | 1      | 0.0234 | 0.6377 | 0.884  | 0.2286 | 0.8771 | 0.070  | -0.210 | -0.054 | -0.196 | 0.191  | -0.167 | -0.285 | -0.247 | -0.303 |
| bio6  | 0.101  | 0.0083 | 0.044  | -0.642 | 0.023  | 1      | -0.755 | 0.054  | 0.6499 | 0.0552 | 0.950  | 0.3864 | 0.397  | 0.3048 | 0.087  | 0.337  | 0.363  | 0.2235 | 0.1756 |
| bio7  | -0.11  | -0.076 | -0.119 | 0.8647 | 0.637  | -0.755 | 1      | 0.537  | -0.350 | 0.5326 | -0.685 | -0.435 | -0.342 | -0.363 | 0.058  | -0.370 | -0.467 | -0.334 | -0.334 |
| bio8  | -0.019 | -0.100 | -0.112 | 0.6196 | 0.884  | 0.0548 | 0.5376 | 1      | 0.0837 | 0.9381 | 0.047  | -0.440 | -0.242 | -0.361 | 0.038  | -0.406 | -0.463 | -0.446 | -0.539 |
| bio9  | 0.119  | 0.0873 | 0.096  | -0.507 | 0.228  | 0.6499 | -0.350 | 0.083  | 1      | 0.0164 | 0.740  | 0.3401 | 0.247  | 0.1818 | 0.213  | 0.335  | 0.249  | 0.2464 | 0.2815 |
| bio10 | -0.03  | -0.134 | -0.138 | 0.7040 | 0.877  | 0.0552 | 0.5326 | 0.938  | 0.0164 | 1      | -0.020 | -0.416 | -0.123 | -0.310 | 0.167  | -0.365 | -0.453 | -0.480 | -0.523 |
| bio11 | 0.100  | 0.0326 | 0.054  | -0.723 | 0.070  | 0.9506 | -0.685 | 0.047  | 0.7404 | -0.020 | 1      | 0.4450 | 0.347  | 0.3246 | 0.015  | 0.378  | 0.419  | 0.3188 | 0.2374 |
| bio12 | -0.011 | 0.0041 | 0.013  | -0.607 | -0.210 | 0.3864 | -0.435 | -0.440 | 0.3401 | -0.416 | 0.445  | 1      | 0.879  | 0.8887 | 0.242  | 0.971  | 0.883  | 0.8774 | 0.7838 |
| bio13 | -0.067 | -0.092 | -0.070 | -0.343 | -0.054 | 0.3979 | -0.342 | -0.242 | 0.2475 | -0.123 | 0.347  | 0.8797 | 1      | 0.8072 | 0.526  | 0.906  | 0.707  | 0.7073 | 0.5919 |
| bio14 | -0.014 | -0.010 | -0.000 | -0.453 | -0.196 | 0.3048 | -0.363 | -0.361 | 0.1818 | -0.310 | 0.324  | 0.8887 | 0.807  | 1      | 0.066  | 0.818  | 0.910  | 0.7462 | 0.7621 |
| bio15 | -0.175 | -0.200 | -0.188 | 0.1001 | 0.191  | 0.0876 | 0.0580 | 0.038  | 0.2133 | 0.1674 | 0.015  | 0.2426 | 0.526  | 0.0662 | 1      | 0.422  | -0.11  | 0.1628 | -0.111 |
| bio16 | -0.029 | -0.014 | -0.005 | -0.524 | -0.167 | 0.3378 | -0.370 | -0.406 | 0.3354 | -0.365 | 0.378  | 0.9716 | 0.906  | 0.8181 | 0.422  | 1      | 0.771  | 0.8528 | 0.695  |
| bio17 | 0.046  | 0.0638 | 0.075  | -0.617 | -0.285 | 0.3633 | -0.467 | -0.463 | 0.2499 | -0.453 | 0.419  | 0.8833 | 0.707  | 0.9106 | -0.110 | 0.771  | 1      | 0.7947 | 0.9009 |
| bio18 | -0.023 | 0.017  | 0.017  | -0.554 | -0.247 | 0.2235 | -0.334 | -0.446 | 0.246  | -0.480 | 0.318  | 0.8774 | 0.707  | 0.7462 | 0.162  | 0.852  | 0.794  | 1      | 0.7422 |
| bio19 | 0.085  | 0.1301 | 0.136  | -0.534 | -0.303 | 0.1756 | -0.334 | -0.539 | 0.2815 | -0.523 | 0.237  | 0.7838 | 0.591  | 0.7621 | -0.111 | 0.695  | 0.900  | 0.7422 | 1      |

TABLA 2. Promedios calculados para nueve variables bioclimáticas no correlacionadas + pH del suelo, calculadas para cada una de las terminales que integran el árbol calibrado.

| Taxon                     | bio1       | bio3       | bio4       | bio9       | bio11      | bio12      | pH         |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>E. bokei</i>           | 19.1875    | 52.3125    | 50.300625  | 14.5125    | 12.26875   | 311.6875   | 7.94830063 |
| <i>E. cryptica</i>        | 19.6       | 49.6666667 | 53.2       | 13.8666667 | 12.3333333 | 309.333333 | 7.93560667 |
| <i>E. greggii</i>         | 20.6914286 | 49.3142857 | 52.586     | 15.7457143 | 13.4714286 | 279.171429 | 7.96439257 |
| <i>E. ilariae</i>         | 22.05      | 44.75      | 56.63      | 15.95      | 14.225     | 544.5      | 7.7728425  |
| <i>E. micromeris</i>      | 17.175     | 51.5625    | 55.745     | 13.04375   | 9.79375    | 374.9375   | 7.92974313 |
| <i>E. pachyrhiza</i>      | 20.4333333 | 51         | 50.0866667 | 15.0666667 | 13.6       | 302        | 7.96687333 |
| <i>E. polycephala</i>     | 19.25      | 51         | 46.175     | 14.325     | 12.975     | 254.5      | 8.0324375  |
| <i>E. potosina</i>        | 19.36666   | 63         | 30.4983333 | 18.2666667 | 14.8666667 | 493        | 7.84777833 |
| <i>E. pulchra</i>         | 20.7142857 | 49.2857143 | 48.3414286 | 15.6714286 | 13.9571429 | 333.428571 | 7.90127571 |
| <i>E. spinosior</i>       | 19.3       | 50.4285714 | 45.1171429 | 14.4       | 13.1       | 365.142857 | 7.98402    |
| <i>Turbiniarpus</i> (s.s) | 17.9       | 64         | 29.28      | 17.2       | 17.2       | 632        | 7.01684    |
| <i>T. pseudomachele</i>   | 18.1       | 66.8       | 23.918     | 15.4       | 14.84      | 482.2      | 7.18777    |
| <i>T. horripilus</i>      | 21.3       | 64         | 24.8       | 14.5       | 14.5       | 440        | 7.00517    |
| <i>Ariocarpus</i>         | 19.5274725 | 58.6263736 | 39.8185714 | 15.5318681 | 13.9714286 | 410.296703 | 7.81286528 |
| <i>Strombocactus</i>      | 21.2818182 | 63.2727273 | 28.9818182 | 18.1272727 | 17.2363636 | 586.818182 | 7.07793636 |
| <i>Rapicactus</i>         | 17.4846154 | 61.6923077 | 34.5838462 | 13.7884615 | 12.6692308 | 471        | 7.84864846 |
| <i>Lophophora</i>         | 19.6732394 | 61.5070423 | 35.7250704 | 16.2901409 | 14.684507  | 407.140845 | 7.61183563 |
| <i>Mammillaria</i>        | 19.0948406 | 64.9124638 | 25.3548348 | 16.6916522 | 15.5761159 | 613.90087  | 6.9824279  |
| <i>Coryphantha</i>        | 18.6626527 | 63.3123909 | 29.1519721 | 15.7207679 | 14.5965096 | 516.708552 | 7.25711621 |
| <i>Echinocactus</i>       | 18.9       | 63.74      | 31.8       | 16         | 14.4       | 453.18     | 7.61       |

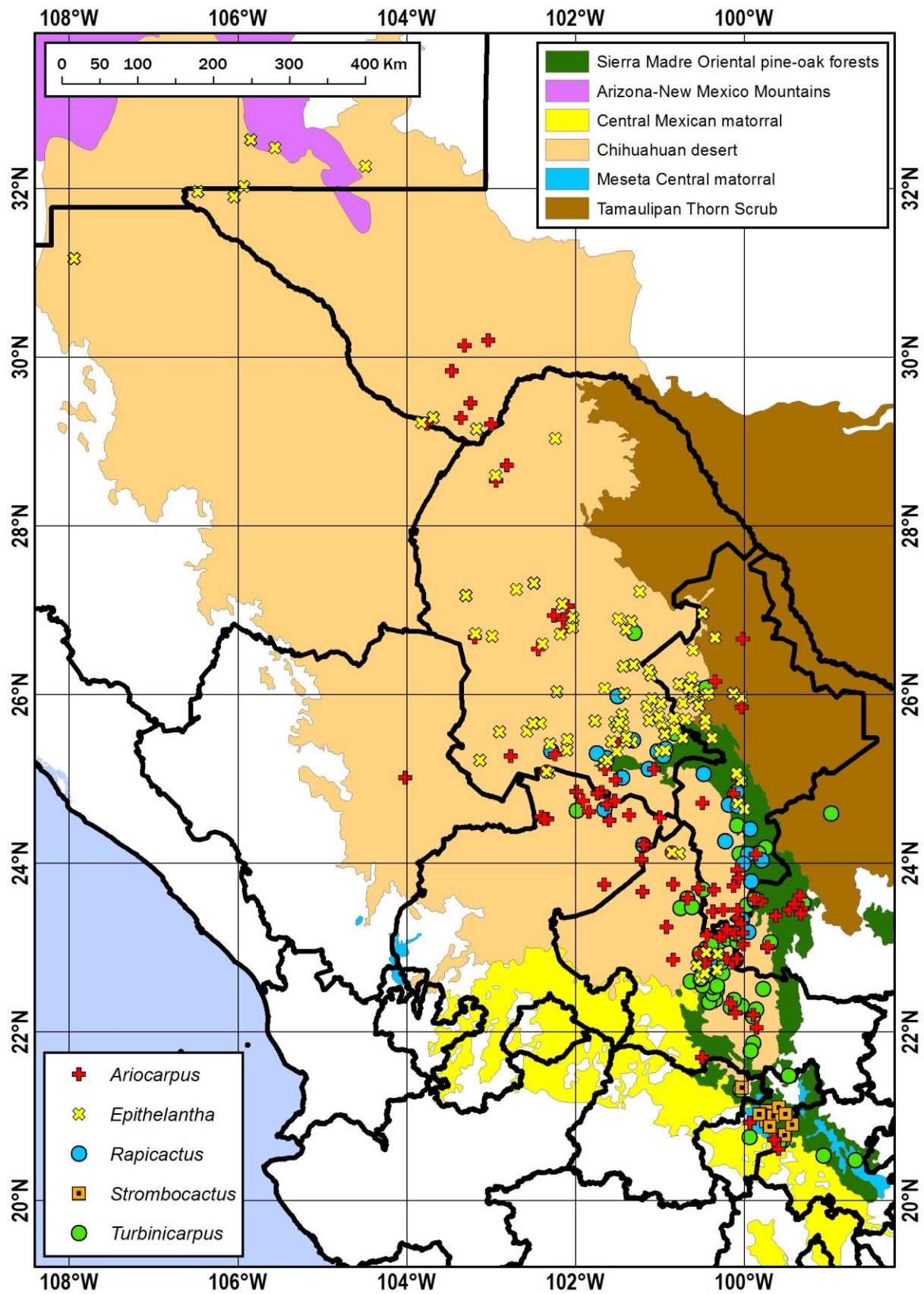


Fig. 1. Distribución de *Epithelantha* y aliados, basado en registros georreferenciados para este trabajo.

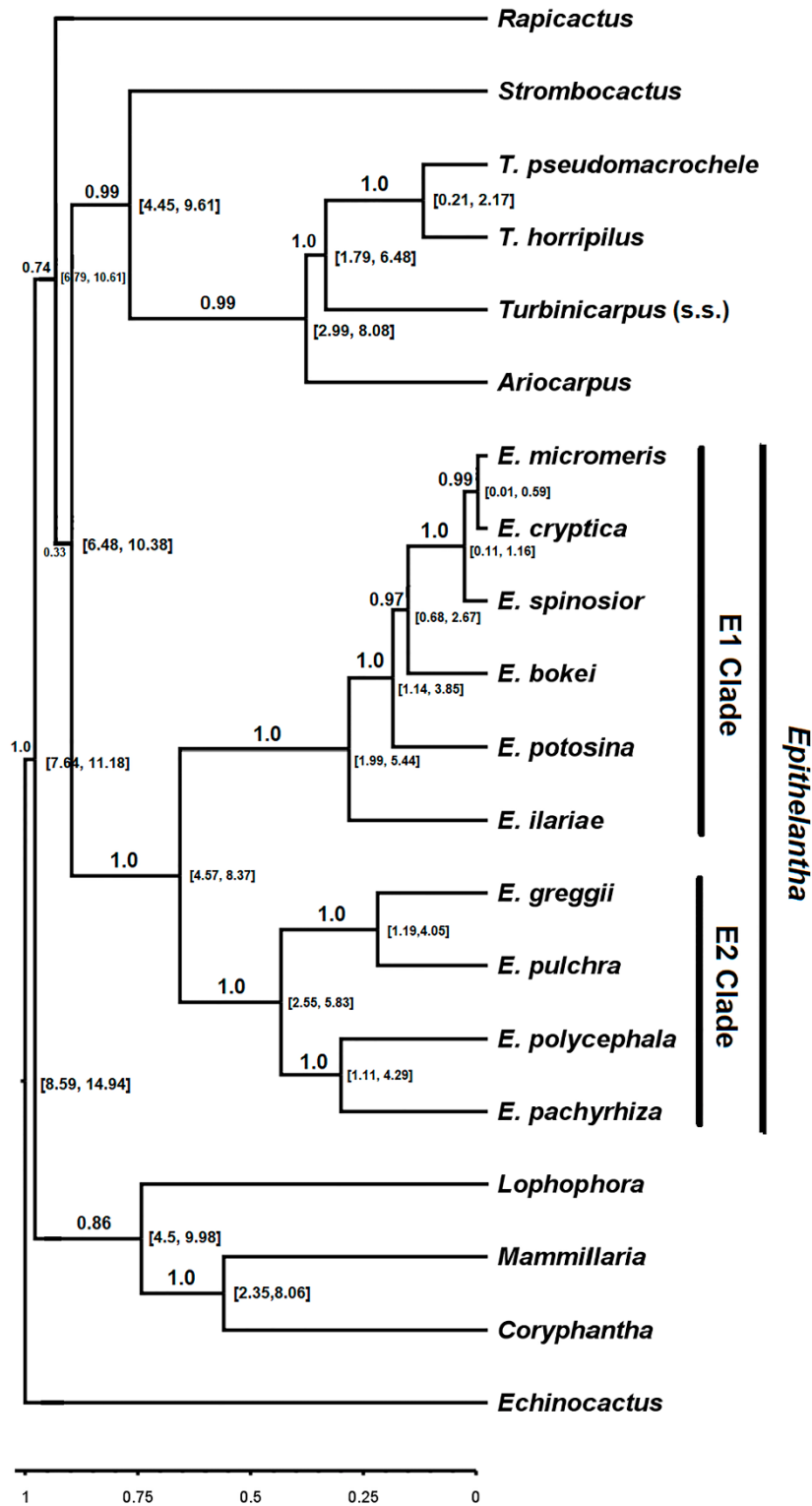
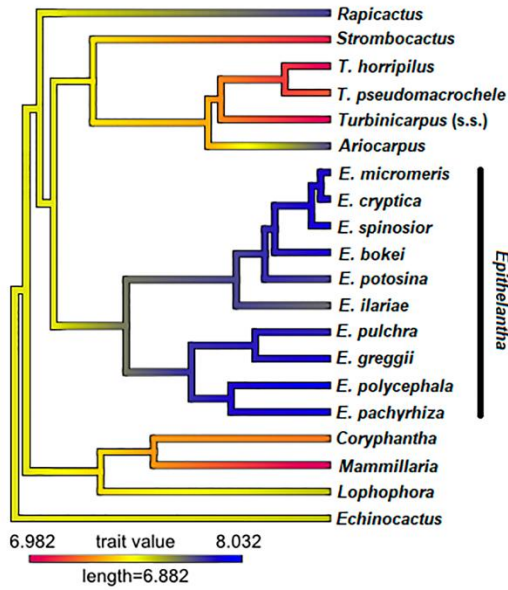


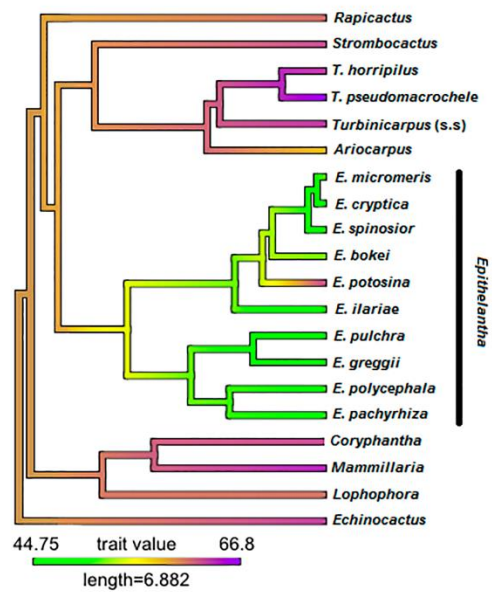
Fig. 2. Árbol calibrado para *Epithelantha* y géneros aliados (Tribu Cactaeae, Cactaceae) aplicando inferencia Bayesiana. Los valores en negritas sobre las ramas corresponden a los valores de probabilidad posterior y los valores entre corchetes sobre los nodos indican la edad aproximada de divergencia.

3a



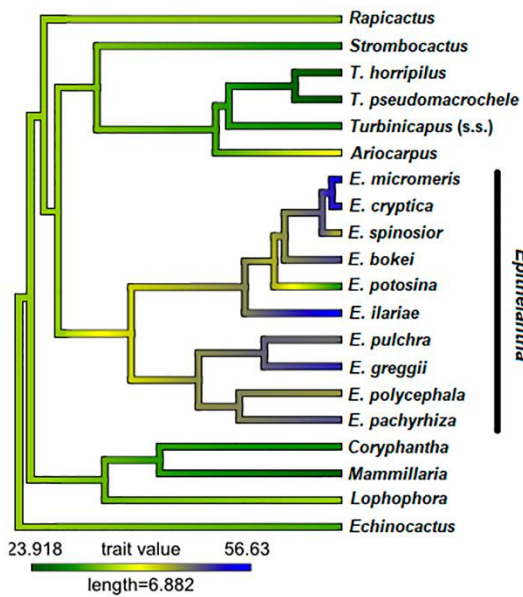
pH: potencial de hidrógeno del suelo

3b



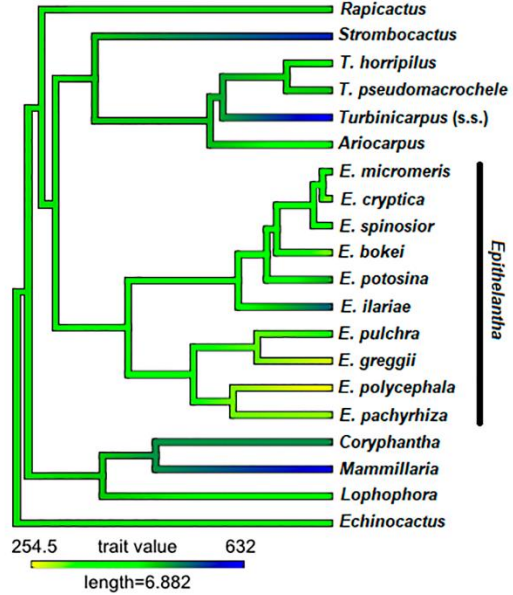
Bio3: Isotermalidad (rango medio/rango anual)

3c



Bio4: Estacionalidad de la temperatura

3d



Bio12: Precipitación anual

Fig. 3. Reconstrucción de estados ancestrales para cuatro variables ambientales con señal filogenética



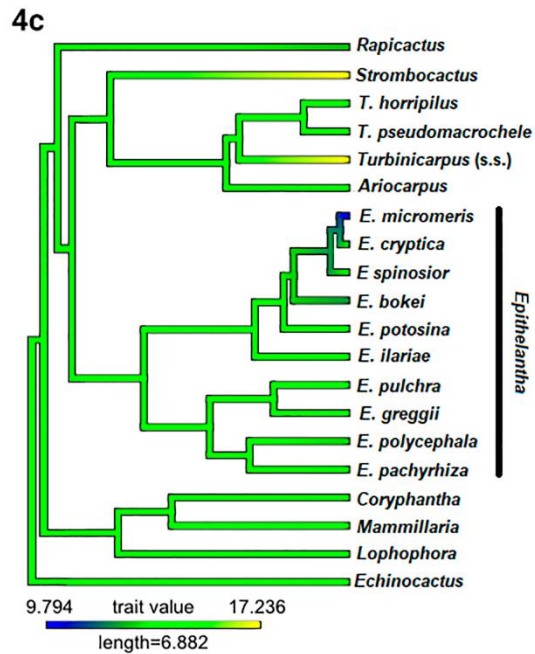
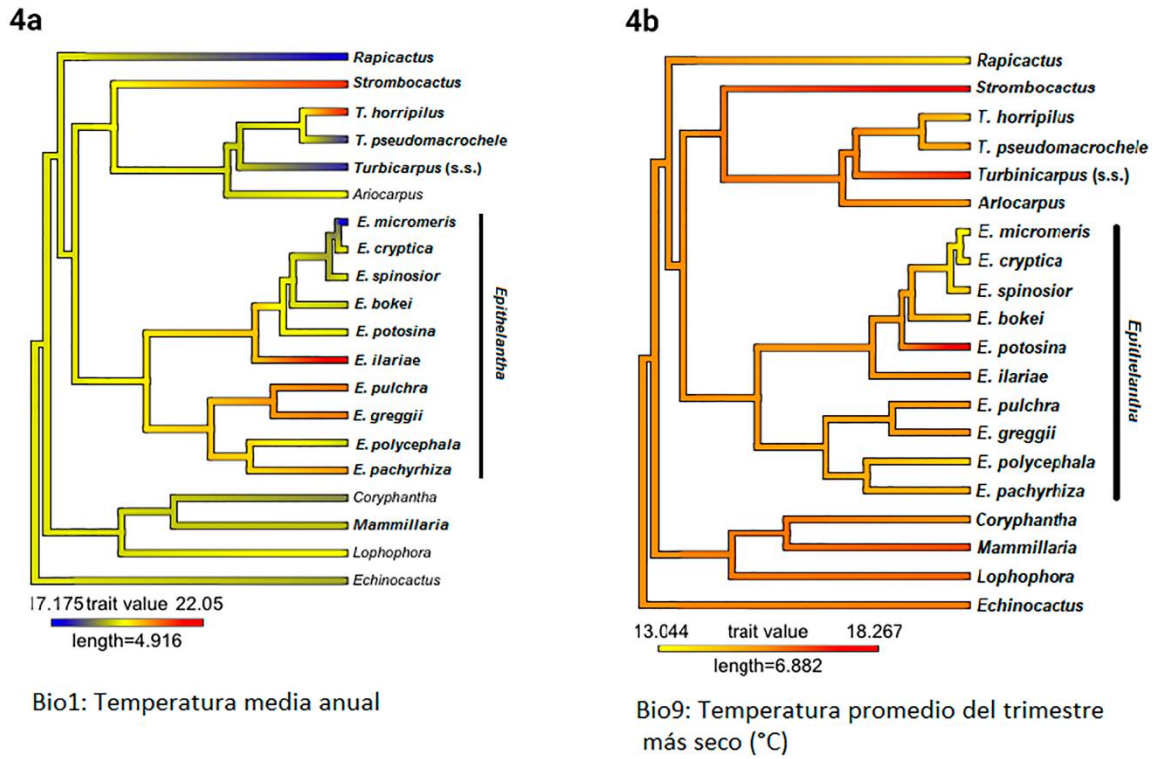


Fig. 4. Reconstrucción de estados ancestrales para tres variables ambientales cuya señal filogenética no es significativa.

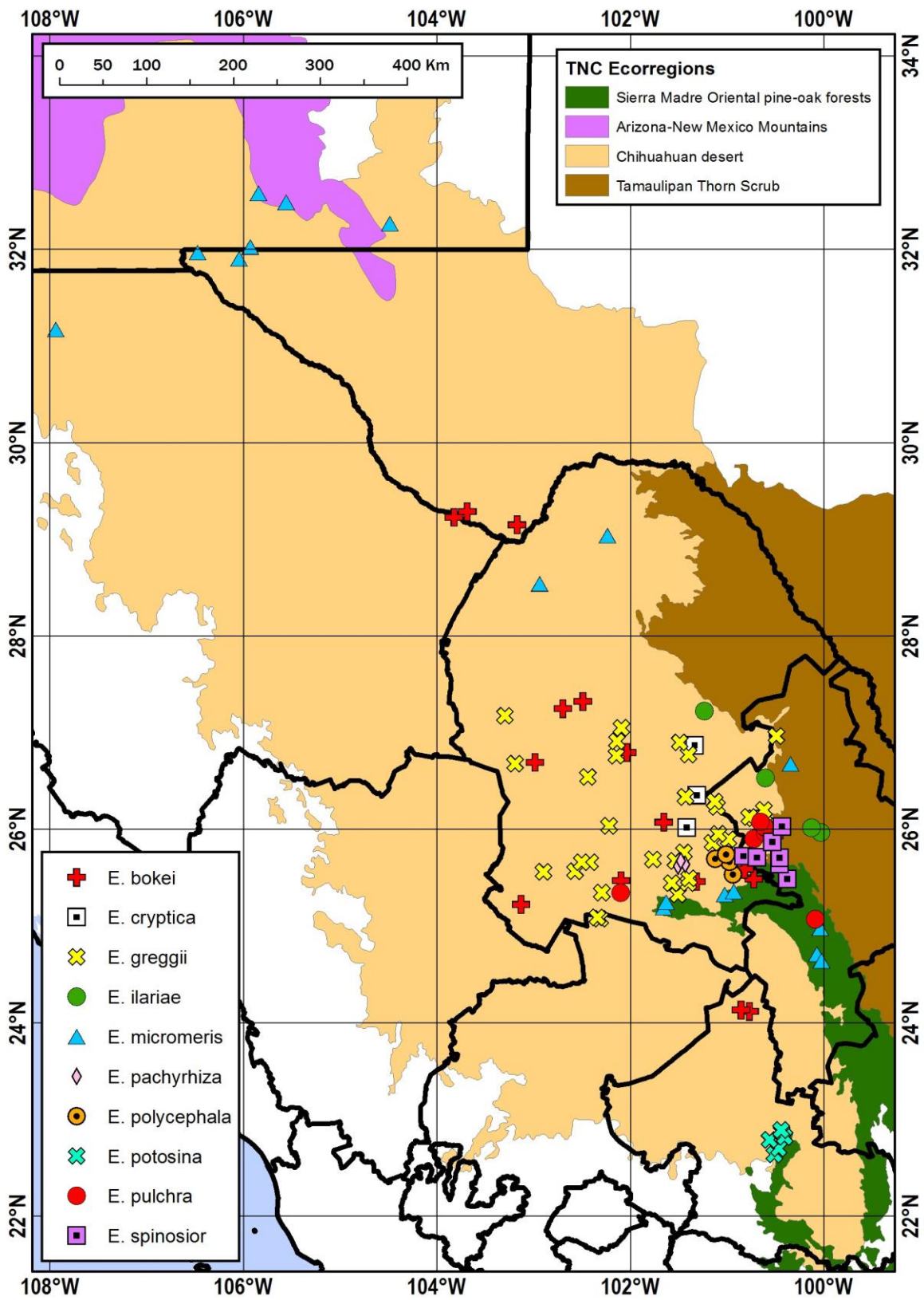


Fig. 5. Distribución de las especies de *Epithelantha*, basada en registros georreferenciados para este trabajo.



## Conclusiones generales

Si bien, el concepto general de especie permite conciliar las distintas fuentes de información, aún debe discutirse sobre un “método general” que permita su aplicación para caracterizar a los linajes. El concepto morfológico ha sido aplicado mayoritariamente en los estudios de delimitación de especies en Cactaceae, sin embargo, a partir de nuestros resultados, una especie puede ser caracterizada morfológica, filogenética y ecológicamente, lo que de acuerdo con De Queiroz (2005) corresponden a propiedades que le dan identidad a un linaje, además, la suma de estas propiedades permite proponer hipótesis más robustas e identificar que propiedades ameritan ser evaluadas a profundidad.

A partir del análisis micromorfológico de las semillas de *Epithelantha*, además de reportar la disyunción entre el hilo y el micrópilo, el estudio aportó una serie de caracteres seminales que diferencian a las especies putativas.

De los caracteres morfológicos tanto vegetativos como reproductivos, el análisis estadístico indica que el número de espinas, la longitud de la flor, la relación ancho/largo de la areóla, la expansión de la región hilar de la semilla, la escultura multicelular y el relieve de la pared periclinal permiten la identificación de las especies de *Epithelantha*. En conjunto con el análisis filogenético desarrollado con cuatro secuencias de cpDNA (*petL-psbE*, *psbA-trnH*, *trnL-F* y *trnQ-rps16*), permite concluir que se deben de reconocer diez especies, de las cuales *Epithelantha bokei*, *E. greggii*, *E. ilariae*, *E. pachyrhiza*, *E. polycephala*, *E. potosina*, *E. pulchra* y *E. spinosior* se detectaron apomorfías por cada uno de los taxones, mientras que *E. cryptica* y *E. micromeris* solo pueden ser distinguidas mediante atributos morfológicos.

*Epithelantha* es un grupo monofilético fuertemente soportado (PP = 1.0 y BS = 100). Se identificaron tres sustituciones en *trnL-F*, una sustitución en *psbA-trnH* y un indel en *petL-psbE*, como las sinapomorfías del género. *Turbinicarpus* se resuelve como el grupo hermano con un bajo

soporte (PP = 0.73 y BS < 50) y en conjunto con *Ariocarpus*, *Rapicactus* y *Strombocactus* conforma un clado (PP = 0.99 y BS < 50), el cual es congruente con la hipótesis filogenética propuesta por Butterworth et al. (2002).

A partir de la reconstrucción de estados ancestrales con una filogenia calibrada y seis variables bioclimáticas + pH del suelo, se concluye que la influencia del pH y la isothermalidad explican la distribución del género. Con base en el análisis Chi-cuadrada aplicado al tipo de suelo y geoforma se concluye que *E. bokei*, *E. greggii*, *E. micromeris*, *E. pachyrhiza*, *E. polycephala*, *E. pulchra* y *E. spinosior* están fuertemente asociados con un tipo particular de suelo o geoforma. *Epithelantha ilariae* está asociada moderadamente con un tipo de suelo, en tanto que *E. potosina* está moderadamente asociada a una geoforma y *E. cryptica* no presenta restricciones en su distribución. Este análisis refuerza una hipótesis generada en el análisis morfológico, de que *E. cryptica* y *E. micromeris* deben ser reconocidas como linajes independientes, puesto que ocupan nichos diferenciados: *E. micromeris* se establece en condiciones donde el régimen anual de precipitación es bajo (17.17 mm), las temperaturas durante el cuarto más frío son bajas (9.79 °C), es frecuente en regosoles éutricos, xerosoles lúvicos y yermosoles lúvicos y prefiere establecerse en sistemas kársticos. Por el contrario, *E. cryptica* prefiere nichos con regímenes de mayor de precipitación (19.6 mm), mayor temperatura durante el trimestre más frío (12.33 °C) y no tiene preferencia por un tipo particular de suelo y geoforma.

Con la nueva circunscripción aquí propuesta, nuevas preguntas de índole ecológico y de conservación deben ser planteadas. Se requiere una nueva evaluación de estatus de riesgo, tanto en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 como en la lista roja de UICN, por lo tanto ¿Qué especies deben ser incluidas en dichas normas? Criterios como tamaños de poblaciones, número de poblaciones viables, el área de distribución, niveles de explotación reales o potenciales, el efecto de taxones introducidos, hibridación, patógenos, contaminantes, competidores o parásitos

serán necesarios para complementar la información para incluir a los taxones (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2010; Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales 2012). Por otra parte, en este estudio se reporta la relevancia del suelo en los procesos de diversificación, por lo que cabría preguntarse, si además del pH, qué macro y micronutrientes pueden restringir la distribución de las especies. Este trabajo deberá generar un impacto positivo en el conocimiento del género *Epithelantha*, por lo que estudios posteriores contribuirán al conocimiento del género, incluso el método de trabajo puede ser llevado a otros grupos taxonómicos con conflictos en cuanto a los límites que definen a las especies.

#### Literatura general citada

- Agapow, P.L., O.R. Bininda-Emonds, K.A. Crandall, J.L. Gittleman, G.M. Mace, J.C. Marshall y A. Purvis. 2004. The impact of the species concept on biodiversity studies. *The Quarterly Review of Biology*. **79**: 161–179.
- Alvarado-Sizzo, H., A. Casas, F. Parra, H.J. Arreola-Nava, T. Terrazas y C. Sánchez. 2018. Species delimitation in the *Stenocereus griseus* (Cactaceae) species complex reveals a new species, *S. huastecorum*. *PLoS One*. **13**: e0190385.
- Aquino, D. 2014. Delimitación de las especies de *Mammillaria*, serie *Polyedrae* (Cactaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Instituto de Biología, UNAM. CdMx.
- Arroyo-Cosultchi, G., T. Terrazas, S. Arias y L. López-Mata. 2010. Delimitación de *Neobuxbaumia mezcalaensis* y *N. multiareolata* (Cactaceae) con base en análisis multivariados. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **86**: 53–64.

- Baker, M. A. y C. A. Butterworth. 2013. Geographic distribution and taxonomic circumscription of populations within *Coryphantha* section *Robustispina* (Cactaceae). *American Journal of Botany*. **100**: 984–997.
- Baylac, M., C. Villemant y G. Simbolotti. 2003. Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biological Journal of the Linnean Society*. **80**: 89–98.
- Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Shodi, P. Ng, R. Meier, K. Winker, K. K. Ingram y I. Dras. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. **22**: 148–155.
- Camargo, A. y Sites Jr., J. 2013. Species delimitation: a decade after the Renaissance. In: Pavlinov Y.I., Rijeka (eds.). *The species problem – ongoing issues*. INTECH. p. 225–247.
- Castillo, J. 2015. *Morfogénesis en superficies dinámicas*. Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación de Estudios del Posgrado, México DF.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 12794-12797.
- Cervantes, C. 2017. Delimitación de las especies del complejo *Echinocereus parkeri* (Cactaceae). Tesis de Maestría en Ciencias, Instituto de Biología, UNAM, México DF.
- Conix, S. 2018. Integrative taxonomy and the operationalization of evolutionary independence. *European Journal of Philosophy of Science*. **8**: 587–603.
- Cope, J.S., D. Corney, J. Y. Clark, P. Remagnino y P. Wilkin. 2012. Plant species identification using digital morphometrics: A review. *Expert Systems with Applications*. **39**: 7562–7573.

- Crisci, J. 1994. La especie: realidad y conceptos. En Llorente, J. y I. Luna-Vega (eds.). *Taxonomía biológica*. Fondo de Cultura Económica, UNAM, México. 53–64.
- De Queiroz, K. 2005. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences*. **56**: 196–215.
- Duminil, J. y M. Di Michele. 2009. Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystematic*. **143**: 1–15.
- Flores-Rentería, Ll., A. Wegier, D. Ortega, A. Ortiz-Medrano, D. Piñero, A.V. Wipple, F. Molina-Freaner y C. Domínguez. 2013. Genetic, morphological, geographical and ecological approaches reveal phylogenetic relationships in complex groups, an example of recently diverged pinyon pine species (Subsection Cembroides). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **69**: 940–949.
- Frankham, R., J. D. Ballou, M. R. Dudash, M. Eldridge, C. Fenster, R. Lacy, J. R. Mendelson, I. J. Porton, K. Ralls y O. A. Ryder. 2012. Implications of different species concepts for conserving biodiversity. *Biological Conservation*. **153**: 25–31.
- Gorelick, R. 2002. DNA sequences and cactus classification – a short review. *Bradleya*. **20**: 1- 4.
- Harage, M., Y. Sasaki, J. Nakajima, N. Fukumori, M. Yoshizawa, Y. Suzuki, S. Kitagawa, K. Mori, S. Ogino, I. Yasuda y S. Nagumo. 2011. Peyote identification on the basis of differences in morphology, mescaline content, and *trnL/trnF* sequence between *Lophophora williamsii* and *L. diffusa*. *Journal of Natural Medicines*. **65**: 103–110.
- Helsen, P., R. A. Browne, D. J. Anderson, P. Verdyck y S. Van Dongen. 2009. Galapagos *Opuntia* (prickly pear) cacti: extensive morphological diversity, low genetic variability. *Biological Journal of the Linnean Society*. **96**: 451–461.

- Hernández-Ledesma P., W. G. Berendsohn, T. Borsch, S. von Mering, H. Akhiani, S. Arias, I. Castañeda-Noa, U. Eggli, R. Eriksson, H. Flores-Olvera, S. Fuentes-Bazán, G. Kadereit, C. Klak, N. Korotkova, R. Nyffeler, G. Ocampo, H. Ochoterena, B. Oxelman, R. K. Rabeler, A. Sanchez, B. O. Schlumpberger y P. Uotila. 2015. A taxonomic backbone for the global synthesis of species diversity in the angiosperm order Caryophyllales. *Willdenowia*. **45**: 281–383.
- Hughes, C. y R. Eastwood. 2006. Island radiation on a continental scale: Exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**: 10334–10339.
- Hunt, D.R., N. P. Taylor y G. Charles eds. 2006. *The New Cactus Lexicon, text and atlas*. The Manse. Melbourne Port.
- Ikabanga, D.U., T. Stévant, K.G. Koffi, F.K. Monthé, E.C. Doubindou, G. Bauby, A. Souza, M. B'Batchi y O.J. Hardy. 2017. Combining morphology and population genetic analysis uncover species delimitation in the widespread African tree genus *Santiria* (Burseraceae). *Phytotaxa* **321**: 166–180.
- Korotkova, N., T. Borsch, D. Quandt, N. P. Taylor, K. F. Müller y W. Barthlott. 2011. What does it take to resolve relationships and to identify species with molecular markers? An example from the epiphytic Rhipalideae (Cactaceae). *American Journal of Botany*. **98**: 1549–1572.
- Luckow, M. 1995. Species concepts: assumptions, methods and applications. *Systematic Botany*. **20**: 589–605.
- Manly, B. F. 1986. *Multivariate statistical methods*. Chapman & Hall. London.
- Martínez, D. 2016. Delimitación taxonómica de las especies del Grupo *Selenicerus vagans* (Hylocereeae, Cactaceae). Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México DF.

- Morrone, J.J. 2013. *Sistemática. Fundamentos, métodos, aplicaciones*. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF.
- Nyffeler, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL-trnF* sequences. *American Journal of Botany*. **89**: 312–326.
- Nyffeler, R y U. Eggly. 2010. A farewell to dated ideas and concepts – molecular phylogenetics and a revised suprageneric classification of the family Cactaceae. *Schumannia*. **6**: 109–149.
- Padial, J.M. e I. De la Riva. 2010. A response to recent proposals for integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*. **101**: 747–756.
- Pante, E., C. Schoelinck y N. Puillandre. 2015. From integrative taxonomy to species description: one step beyond. *Systematic Biology*. **64**: 152–160.
- Perez, M., B. C. Carstens, G. L. Rodrigues, E. M. Moraes. 2016. Anonymous nuclear markers reveal taxonomic incongruence and long-term disjunction in a cactus species complex with continental-island distribution in South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **95**: 11–19.
- Porter, J. M., J. Cruse-Sanders, L. Prince, y R. Lauri. 2012. Species status of *Sclerocactus brevispinus*, *S. wetlandicus*, and *S. glaucus*: inferences from morphology, chloroplast DNA sequences, and AFLP markers. *Aliso*. **30**: 69–83.
- Rannala, B. 2015. The art and science of species delimitation. *Current Zoology*. **61**: 846–853.
- Raxworthy, C.J., C.M. Ingram, N. Rabibisoa y R.G. Pearson. 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: A review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology*. **56**: 907–923.

- Reeves, P.A. y C.M. Richards. 2010. Species delimitation under the general lineage concept: An empirical example using wild North American hops (Cannabaceae: *Humulus lupulus*). *Systematic Biology*. **60**: 45–59.
- Remagnino, P., S. Mayo, P. Wilkin, J. Cope y D. Kirkup. 2017. *Computational Botany*. Springer-Verlang, Berlín.
- Rieseberg, L.H. y J.H. Willis. 2007. Plant speciation. *Science*. **317**: 910–914.
- Sánchez, D., S. Arias y T. Terrazas. 2016. Análisis morfométrico de las especies de *Echinocereus* sección *Triglochidiati* (Cactaceae) en México. *Brittonia*. **65**: 368–385.
- Schlick-Steiner, B.C., F.M. Steiner, B. Seifert, C. Stauffer, E. Christian y R.H. Crozier. 2010. Integrative taxonomy: A multisource approach to exploring biodiversity. *The Annual Review of Entomology*. **55**: 421–438.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo*. CdMx.
- Simpson, G. 1951. The species concept. *Evolution*. **5**: 285–298.
- Sites Jr, W., y J. C. Marshall. 2003. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*. **18**: 462–470.
- Schmalzel, R.J., R.T. Nixón, A.L. Best y J.A. Tress Jr. 2004. Morphometric variation in *Coryphantha robustispina* (Cactaceae). *Systematic Botany*. **29**: 553–568.



- Schwarzfeld, M.D. y F.A. Sperling 2014. Species delimitation using morphology, morphometrics, and molecules: definition of the *Ophion scutellaris* Thomson species group, with descriptions of six new species (Hymenoptera, Ichneumonidae). *ZooKeys* **462**: 59–114.
- Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, L. Gielly, C. Miquel, A. Valentini, T. Vermet, G. Corthier, C. Brochmann y E. Willerslev. 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*. **35**: e14.
- Tapia, H. S. Arias, L. Yáñez-Espinosa y T. Terrazas. 2016. El uso de espinas del tallo en la identificación de las especies de *Neobuxbaumia* (Cactaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*. **87**: 288–300.
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales. 2012. *Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1*. Cambridge.
- Van Valen, L. 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*. **25**: 233–239.
- Vázquez-Benítez, B., S. Arias y A. Cervantes-Sandoval. 2016. Variación morfológica de *Coryphantha* (Cactaceae): un enfoque multivariado. *Acta Botanica Mexicana*. **116**: 21–47.
- Velasco, J. D. 2009. When monophyly is not enough: exclusivity as the key to defining a phylogenetic species concept. *Biology & Philosophy*. **24**: 473–483.
- Wiens, J. 2007. Species delimitation: New approaches for discovering diversity. *Systematic Biology* **56**. 875–878.
- Wilkins, J. S. 2009. *Species. A history of the idea*. University of California Press. Berkeley.
- Will, K.W., B.D. Mishler y Q.D. Wheeler. 2005. The perils of DNA Barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*. **54**: 844–851.

- Yang, Z. y B. Rannala. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. **107**: 9264–9269.
- Yesson, C., R.T. Bárcenas, H. Hernández, M. Ruíz-Maqueda, A. Prado, V.M. Rodríguez y J. Hawkins. 2011. DNA barcodes for Mexican Cactaceae, plants under pressure from wild collecting. *Molecular Ecology Resources*. **11**: 775–783.
- Zelditch, M. L., D. Swiderski., H. Sheets y W. L. Fink. 2004. *Geometric morphometric for biologists*. Elsevier. Michigan.