



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Origen y Diversificación de la tribu  
Pachycereeae (Cactaceae)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:**

**JOSÉ ANTONIO  
BARBA MONTOYA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. SUSANA AURORA MAGALLÓN PUEBLA**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Barba Montoya José Antonio 56558181 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 300502651</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. Susana Aurora Magallón Puebla</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruus</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr. Angel Salvador Arias Montes</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dra. Alejandra Vazquez Lobo Yurén</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Mtra. Tania Hernández Hernández</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Origen y Diversificación de la Tribu Pachycereeae (Cactaceae) 71 p 2009</p>

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Susana Magallón, por la dirección de este trabajo, por su gran apoyo y asesoría.

Al proyecto CONACYT # 46475, "Diversificación de Angiospermas de México: Relojes Moleculares, Tasas de Especiación, Biomecánico y Espacios Ecológicos" gracias al cual fue posible mi tesis.

A todos los integrantes del sínodo, a la Dra. Alejandra Vázquez Lobo, a la Mtra. Tania Hernández al Dr. Luis Eguiarte y al Dr. Salvador Arias, por sus excelentes comentarios y sugerencias que hicieron de éste, un mejor trabajo.

A los integrantes del laboratorio B-123 del Instituto de Biología UNAM, a Violeta Patiño por sus valiosas sugerencias, a Carla Sandoval por su gran ayuda en los análisis y por su gran auxilio en diversos puntos de mi tesis y a Arturo de Nova por su gran ayuda en los análisis y por su gran asesoría en las técnicas moleculares que desarrollé para mi tesis.

A quienes hicieron y hacen posibles los laboratorios de Biología Molecular en donde desarrollé todo el trabajo molecular de mi tesis.

A Laura Márques y a Marcelina García por su gran asesoría en técnicas moleculares.

Al Dr. Marc Olson, a Rosalinda Medina a Angélica Cervantes a Vanesa Rojas a Leonardo Alvarado y a Rodrigo González por el gran apoyo que me brindaron en el campo.

Al Instituto de Biología, UNAM por permitirme realizar mi tesis y proporcionarme el apoyo necesario.

## **INDICE**

<b>RESUMEN</b>	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	2
I.I La Familia Cactaceae (A. L. de Jussieu, 1789)	5
A. Origen y distribución geográfica de la familia	7
B. Características morfológicas vegetativas y reproductivas de la familia	8
I.II La tribu Pachycereeae (Buxbaum 1958)	12
A. Características morfológicas vegetativas y reproductivas de la tribu Pachycereeae	15
B. Reproducción y polinización	16
<b>II. ANTECEDENTES DEL PROYECTO</b>	20
II.I Historia de la clasificación de la familia Cactaceae	20
II.II Estudios filogenéticos de Pachycereeae	21
<b>III. OBJETIVOS</b>	27
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	27
<b>V. JUSTIFICACIÓN</b>	28
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	30
VI.I Muestreo y materiales utilizados	30
VI.II Extracción de DNA	32
VI.III Amplificación de marcadores de cloroplasto y núcleo	33
VI.IV Secuenciación de los marcadores	34

VI.V Edición y alineación de secuencias de DNA	35
VI.VII El marcador molecular	35
VI.VI Selección del modelo de sustitución molecular	36
VI.VIII Estimación filogenética	37
VI.IX Estimación del tiempo de origen y diversificación de los linajes de Pachycereeeae	40
VI.X Estimación de tasas de diversificación de todo el grupo y linajes dentro del grupo	43
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
VII.I Amplificación y secuenciación de los marcadores	45
VII.II Modelo de sustitución molecular	46
VII.III Estimación filogenética	47
VII.IV Tiempo de origen y diversificación de los linajes de Pachycereeeae	50
VII.V Estimación de tasas de diversificación de todo el grupo y linajes dentro del grupo	54
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
VIII.I Muestreo taxonómico de Pachycereeeae	56
VIII.II Interpretación de la filogenia	56
VIII.IV Estimación de las edades en la filogenia	62
VIII.V Análisis de las tasas de diversificación	65
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>X. REFERENCIAS</b>	<b>70</b>
<b>XI. ANEXOS</b>	<b>82</b>



***Neobuxbaumia polylopha***  
San Luis Potosí  
Foto: José Antonio Barba Montoya

## RESUMEN

Se infirió una filogenia para la tribu Pachycereeae (Cactaceae), mediante un análisis Bayesiano basado en una matriz de datos que contuvo 92 secuencias de 1550 pb del marcador rpl16 del cpDNA de un total de 88 especies, 86 del grupo interno, representando a todos los géneros de Pachycereeae sensu Anderson (2001) y dos representando el grupo externo (*Rhipsalis* y *Calymmanthium*). La filogenia se utilizó como marco de referencia para determinar la fecha de origen de la tribu y de algunos clados dentro de esta y para saber también la tasa de diversificación de la tribu y de algunos clados que conforman a la tribu. Las edades de la tribu Pachycereeae y de los clados fueron determinadas utilizando un reloj molecular relajado con distribución lognormal implementado por el programa BEAST1.4. La edad de la tribu Pachycereeae es 8.52m.a. para el grupo corona. Las tasas de diversificación fueron estimadas utilizando el modelo de nacimiento-muerte, con estimadores que consideran la diversidad de especies y la edad del clado. La tasa de diversificación que se obtuvo de Pachycereeae para el grupo corona es (0.595 -0.380) También observamos que si hay diferencia en las tasas de diversificación entre algunos clados de la tribu. Debido a las altas tasas de diversificación de Pachycereeae, si la comparamos con otros grupos de Angiospermas, y puesto que el grupo es muy joven suponemos que la diversidad del grupo es producto de una radiación reciente.

Palabras clave: tribu Pachycereeae (Cactaceae), marcador rpl16 cpDNA, reconstrucción filogenética, fecha, tasas de diversificación.

# I. INTRODUCCIÓN

México es un país con una alta diversidad biológica. El término biodiversidad se refiere al intervalo de variación o diferencias que exhiben los organismos biológicos y su ambiente (Barbier, 1997). La diversidad vegetal de México es una de las más altas del mundo. El número total de especies de angiospermas de México se calcula que es de entre 22,351 y 26,500 especies, (Villasaeñor, 2003). Las especies vegetales muestran una gran complejidad en cuanto a estrategias de supervivencia probablemente como resultado de la adaptación a la gran variedad de factores físicos, bioquímicos, genéticos, fisiológicos y ambientales que experimentan (Wright y Gaut, 2005). Al mismo tiempo, los atributos de cada individuo contribuyen a cada uno de los niveles biológicos temporales y espaciales de la biodiversidad, dando lugar a una gran variabilidad de interacciones entre especies (Flores-Abreu, 2007). Como resultado de lo anterior y de los distintos tipos de ambientes que conforman el país, México presenta un gran número de especies y de taxa endémicos.

En particular, queremos entender si la gran diversidad de plantas en México se debe a altas tasas de especiación, o sí lo que ha sucedido es que se han mantenido linajes muy viejos, debido a bajas tasas de extinción locales. Para aproximarnos a la resolución de esta pregunta compleja, planteamos un proyecto en el que se realizó un estudio evolutivo que consta de la propuesta de una hipótesis filogenética entre los miembros de la tribu Pachycereae, y la estimación de los tiempos de origen y diversificación de los principales linajes que la constituyen. Lo anterior proporciona elementos básicos pero

fundamentales para evaluar la distribución de la especiación y su tasa a lo largo del tiempo.

La amplia distribución geográfica, la variabilidad morfológica y la diversidad de Pachycereae han hecho difícil la clasificación de sus miembros, no se han logrado resolver claramente las relaciones filogenéticas dentro y fuera de la tribu (Nyffeleer, 2002; Wallace, 2002).

Todos los cactus que se definen como columnares son miembros de la subfamilia Cactoideae. No sólo comparten el hábito columnar (cereoide), también comparten muchas sinapomorfías en el genoma de sus cloroplastos. (Wallace, 2002). Una de las preguntas centrales de este trabajo de investigación son ¿cuándo se originó la tribu Pachycereae? y ¿cómo varían las tasas de diversificación entre los diferentes subgrupos que conforman la tribu?

Para resolver esta pregunta necesitamos de un árbol filogenético que incluya al mayor número las especies vivientes de la tribu. De esta manera se pueden mapear los atributos geográficos y ecológicos de las especies para, en un trabajo posterior a esta tesis, definir cuales han sido las posibles causas de especiación dentro de esta tribu.

La radiación es el incremento en diversidad de un linaje en un tiempo corto (Sanderson y Donoghue, 1994; Barraclough et al., 1996). De manera general el proyecto contempla un estudio evolutivo de la tribu Pachycereae (Cactaceae), para conocer mejor sus relaciones filogenéticas y los tiempos de origen de las especies para obtener una idea de cómo surgió la diversidad de

especies del grupo: sí mediante un proceso de especiación rápida, o bien, mediante la acumulación de especies a lo largo del tiempo.

## I.I La Familia Cactaceae (A. L. de Jussieu, 1789)

La posición taxonómica de Cactaceae en la botánica es la siguiente: Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; Caryophyllales; Cactaceae. (NCBI, 2008; Anderson, 2001). En la Figura 1 se muestra un árbol de las angiospermas con la posición de Caryophyllales, orden al cual pertenece la familia Cactaceae (Stevens, 2001), junto con otras 28 familias (APG II, 2003).

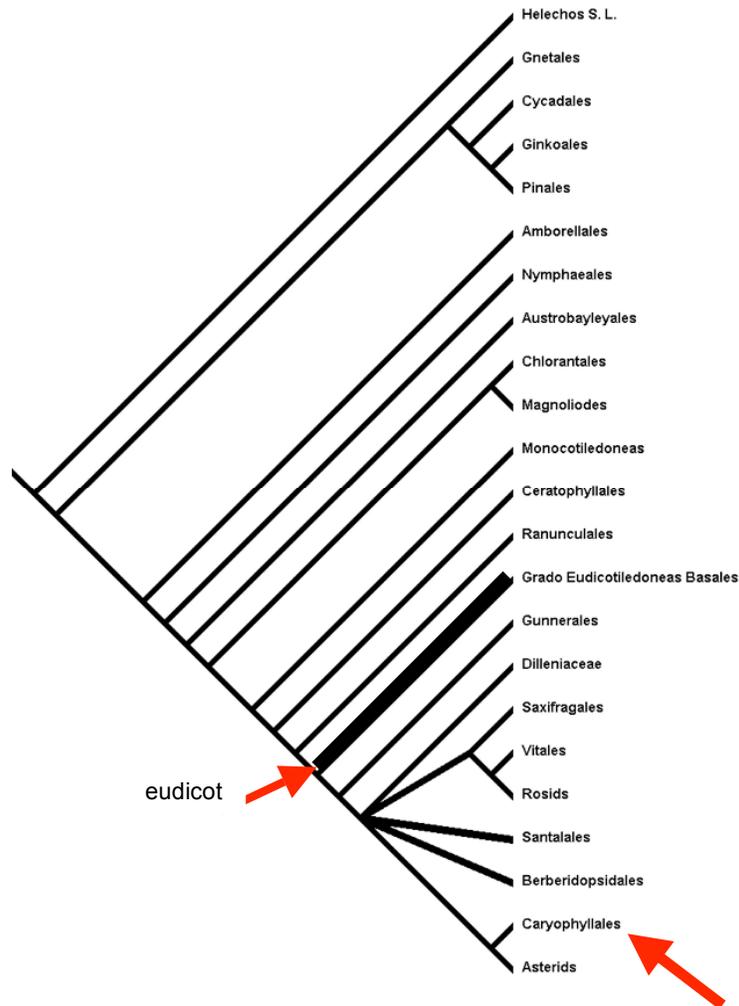


Figura 1 . Árbol de las Angiospermas mostrando la posición del Orden Cryophyllales al cual pertenece la Familia Cactaceae. (Imagen modificada a partir de Stevens 2009)

La familia Cactaceae es subclasificada en tres subfamilias (Barlhoft & Hunt 1999): Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae, siendo esta última la más rica en especies. Sin embargo Nyffeeler (2002) publicó una filogenia molecular con secuencias de *trnK/matK* y *trnL-trnF* en la que *Pereskia* no forma un grupo monofilético pero sí un grado basal. Las subfamilias Cactoideae y Opuntioideae se forman con un soporte alto. La tribu Pachycereae se encuentra formando parte del clado con un soporte alto ACHLP nombre derivado de los géneros *Austrocactus*, *Corryocactus*, y las tribus *Hylocereeae* *Leptocereae* y *Pachycereae*).



Figura 2. Árbol de consenso estricto de los 62,850 árboles más-parsimoniosos para Cactaceae derivado del análisis de datos combinados *trnK/matK* y *trnL-trnF*, con valores de Bootstrap asociado a las ramas (Imagen modificada a partir de Nyffeeler, 2002)

## **A. Origen y distribución geográfica de la familia**

La familia Cactaceae se encuentra distribuida principalmente en las zonas áridas y semi-áridas desde América del Norte hasta América del Sur, aunque existen especies de cactáceas epífitas que habitan en bosques tropicales lluviosos. Son las plantas más conspicuas de las zonas áridas calientes de América, y muchas especies han sido introducidas en África, India y Australia. La familia comprende 1810 especies repartidas en 122 géneros (Singh, 2004).

El origen de las cactáceas debió de ocurrir después de que el continente americano y el africano estuvieran lo suficientemente separados, de tal manera, que no pudiera ocurrir dispersión de estas plantas entre estos dos continentes. Entonces las cactáceas tuvieron que originarse hasta el final del Cretácico o después (Anderson 2001). Según Mauseth (1990) el origen más antiguo posible para la familia Cactaceae debió haber sido hace 100 o 90 millones de años. Posteriormente Hershkovitz y Zimmer (1997) realizaron estudios de DNA que sugieren el origen de las cactáceas hace treinta millones de años en América, en el Terciario medio, seguido de una rápida diversificación en los nuevos desiertos de este continente. Un estudio molecular más reciente, basado en los marcadores de cloroplasto *rbcL* y *atpB* y el marcador nuclear *18S rDNA*, indica que el orden Caryophyllales, al cual pertenecen las cactáceas se originó aproximadamente entre 104 y 111 millones de años (m.a.) (Wikström, 2001).

Los ambientes áridos y semiáridos de México poseen una alta riqueza de especies, la cual en lo que respecta a vegetación tiene un componente muy importante aportado por la familia Cactaceae (Flores-Abreu, 2007). Según datos

de Dávila-Aranda, et al. (2002), en México se localizan por lo menos 850 especies de cactáceas repartidas en 51 géneros, lo que representa el 49% de los géneros y el 56% de las especies de la familia.

## **B. Características morfológicas vegetativas y reproductivas de la familia**

La familia Cactaceae se distingue por las siguientes características morfológicas: (1) tallos cortos que se han modificado en areolas, (2) meristemos apicales del tallo organizados en cuatro zonas distintas, y (3) ovarios hundidos en los receptáculos, cubiertos con brácteas y aréolas. (Gibson y Nobel, 1986; Nyffeler, 2002).

La mayoría de los grupos que conforman dichos linajes tienen las típicas características de un cacto: tallos suculentos, hojas efímeras o vestigiales, con metabolismo CAM y células especializadas del xilema con la capacidad de colapsarse para el almacenamiento de agua (Schleiden, 1845; Mauseth et al., 1995).

Sus flores tienen ovarios ínferos profundos y escondidos; también tienen brotes cortos especializados (aréolas con internodos muy reducidos) que producen espinas, nuevos tallos, glóquidas (en Opuntioideae) y flores. (Edwards, et al., 2005)

Las flores de las cactáceas surgen a partir de aréolas. Las aréolas son ramas laterales condensadas, altamente especializadas, de donde además de las flores surgen las espinas y las ramas. Las aréolas son una característica distintiva de la familia. Generalmente, una aréola produce únicamente una flor.

Estas pueden surgir en distintas partes del tallo, pero algunos cactus producen flores en el ápice del brote. Más comúnmente las flores se producen en la aréola ubicada en la punta del tubérculo. Sin embargo algunas especies tienen aréolas dimórficas con una porción que produce espinas y otra que produce flores.

Un cephalio es una rama altamente especializada en la que los internodos están muy reducidos y las aréolas que se encuentran en esta estructura producen flores que están protegidas por una densa cubierta de espinas y/o trichomas. (Gibson y Nobel, 1986).

La flor de las cactáceas (Figura 3) es una de las estructuras más distintivas de la familia y posee un gran número de caracteres de uso taxonómico. Ésta consiste en un conjunto de miembros del perianto que realizan diferentes funciones en el proceso de reproducción sexual (por ejemplo: protección de las partes reproductivas en desarrollo y atracción al polinizador). El meristemo floral tiene crecimiento determinado y se encuentra localizado en el receptáculo. En varios miembros de Caryophyllales, como la familia Cactaceae, el perianto no está diferenciado en sépalos y pétalos debido a que la parte basal del perianto evolucionó formando una copa o tubo y se fusionó con el ovario (Gibson y Nobel, 1986). Sólo hay un tipo de órganos llamativos llamados tépalos. Los tépalos realizan la función de proteger las estructuras internas que son más delicadas, y generalmente son muy llamativos para atraer a los polinizadores (Gibson y Nobel, 1986). En la cavidad que forma el tubo floral se encuentran los estambres. Estos consisten de filamentos y anteras en los que se producen los granos de polen. El pistilo o gineceo está compuesto por tres o

más carpelos fusionados, que dan lugar a una sola unidad que consiste de ovario unilocular, estilo y estigma. (Tcherkej, 2004). Las partes inferiores de la flor de las cactáceas se encuentran envueltas dentro del tejido de un brote o tallo. A este tejido se le llama pericarpelo o tubo floral. En el tubo floral se encuentran las bases de los estambres. La porción más baja del tubo floral es en donde se produce el néctar. El pericarpelo puede estar cubierto por escamas, que tienen areolas muy reducidas que producen lana o espinas en sus axilas. En la parte superior del tubo floral de origen receptacular se encuentran los tépalos que forman segmentos del perianto. El ovario se encuentra embebido en el pericarpelo, haciendo entonces que todas las flores de las cactáceas tengan ovario ínfero debido a que este se encuentra por debajo de todas las estructuras de la flor (Gibson,1987).

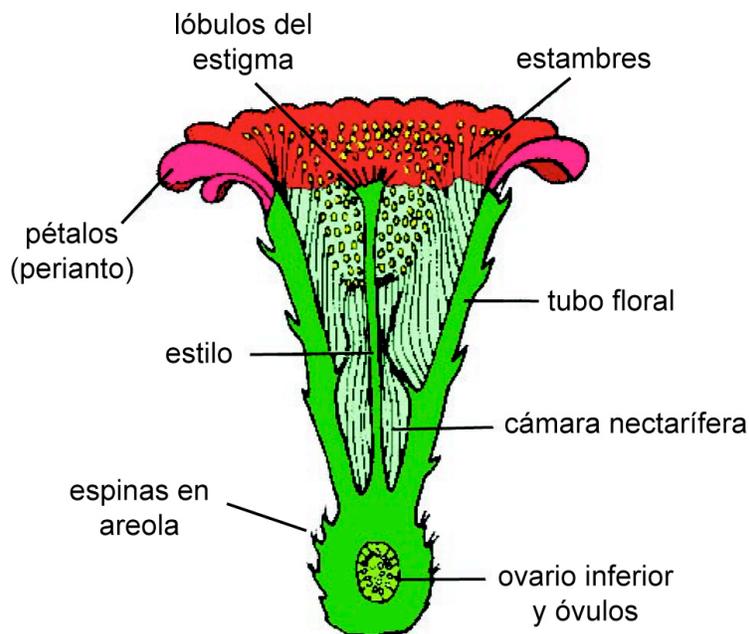


Figura 3. Corte longitudinal de una flor de *Stenocereus thurberi*  
Imagen modificada a partir de Gibson (1987)

La flor de las cactáceas es usualmente sécil (sin pedúnculo), son solitarias, bisexuales y con simetría radial, es decir son actinomorfas, aunque algunas flores polinizadas por aves tienen simetría bilateral (ej. *Stenocereus alamosensis* y *S. Kerberi*). Las flores de los cactus se dividen en cuatro tipos básicos según su síndrome de polinización: flores polinizadas por abejas (color amarillo y púrpura) , por mariposas nocturnas (color blanco), por colibríes (color rojo) y por murciélagos (color crema o blanco) (Anderson, 2001; Nobel, 2002).

La reproducción en Cactáceas tiene lugar por reproducción sexual o asexual. Entre las cactáceas, la reproducción por multiplicación vegetativa se produce por nuevas yemas a partir de los tejidos meristemáticos, las que después de separarse de la planta, integran un nuevo individuo. Este tipo de reproducción ocurre generalmente en algunos géneros de *Mammillaria* y *Ferocactus* y también es muy común en *Opuntia* (Bravo et al., 1999; Mandujano et al., 2001).

Es importante saber el diseño de las flores y los frutos, debido a que son algunas de las características que las distinguen de las demás especies de plantas, siendo los ovarios hundidos en los receptáculos, cubiertos con brácteas y aréolas la característica más distintiva de las flores de las cactáceas (Gibson, 1997). Sin embargo dentro de una familia tan grande y diversa como las cactáceas no es fácil encontrar caracteres presentes uniformemente o hacer generalizaciones que no tengan excepciones importantes.

## I.II La tribu Pachycereeae (Buxbaum 1958)

La tribu Pachycereeae comprende 175 especies en 16 géneros (Anderson 2001). Es una de las nueve tribus que forman la subfamilia Cactoideae. En la mayoría de los estudios moleculares y morfológicos que se han realizado para dilucidar las relaciones dentro de la tribu, se forman dos subtribus (Pachycereinae y Stenocereinae).

Ambas subtribus están distribuidas en Norteamérica, Centroamérica y el Caribe. El límite norte de su distribución es el sureste de E.U.A., extendiéndose hasta el sur de América del Norte y las Antillas. Aunque la tribu Pachycereeae tiene un intervalo de distribución muy amplio, la mayoría de sus especies se localizan en México (119 especies). Únicamente 56 especies no se encuentran en México. Existen algunas especies en Brasil, Perú, Chile, Colombia, Venezuela, América Central y el Caribe.

Un estudio sistemático molecular de la variación de *rbcL* cpDNA realizado por Wallace (2002), sugiere que el origen de la tribu Pachycereeae en Sudamérica se debió a que el centro de origen de los clados de la subfamilia Cactoideae más cercanamente relacionados a Pachycereeae, como Browningieae, se originaron en la parte central de América de Sur y se hipotetiza que migraron hacia el norte. (Figura 3)



Figura 4. Rutas de migración hipotética para la subfamilia Cactoideae a partir del posible punto de origen de las cactáceas en América del Sur (Wallace, 2003)  
(Imagen modificada a partir de Flemming 2003)

Sin embargo, Bravo (1978) plantea que el origen del ancestro común más reciente entre los miembros columnares ocupó territorios del Caribe y del norte de América del Sur. Esta interpretación deriva de la presencia en estas regiones de las especies del género *Leptocereus*, consideradas como las más primitivas entre los cereus. Dichos ancestros presuntamente emigraron hacia el norte, llegando hasta México, en donde se establecieron, y por las condiciones ecológicas, climáticas, edafológicas, fisiográficas, bióticas, genéticas, etcétera, se diversificaron formando la diversidad actual (Figura 3). Gibson y Nobel (1986) postularon que la radiación de *Pachycereeae* ocurrió en México y que las

especies con los caracteres plesiomórficos están localizadas en el sur de México, específicamente en el Valle de Tehuacán–Cuicatlán. También plantearon que los taxa más derivados radiaron de este valle en dos direcciones opuestas: hacia el norte, encontrándose en el noroeste de México y suroeste de E.U.A. y hacia el sur, encontrándose en Mesoamérica y las Antillas.

Las cactáceas tienen un registro fósil muy escaso. Esto se debe a que las características estructurales de estas plantas y a las características de los ambientes donde estas habitan, no son adecuadas para la preservación de fósiles. El fósil más antiguo que se ha de la tribu fue encontrado en Arizona y presuntamente pertenece a *Carnegia gigantea*, tiene aproximadamente 43,000 años (Van Devender, 1990).

Los resultados preliminares de T. Hernández con datos d moleculares (*rbcL*, *trnL-F*, *matk* y *rpL16*) (2009, com. pers.) sugieren que la edad de la tribu Pachycereeae es aproximadamente de 1.71 a 9.01 m.a. con una media de 5.04 m a. Esta edad fue obtenida calibrando en dos puntos la filogenia obtenida de Cactaceae y algunos representantes de otras familias como grupo externo. el primer punto de calibración es un fósil de una inflorescencia de la familia Caryophyllaceae y el segundo es un fósil de una infrutescencia de la familia Phytolaceaceae; ambas familias son grupos hermanos de la familia Cactaceae.

## **A. Características morfológicas vegetativas y reproductivas de la tribu Pachycereeae**

Los miembros de Pachycereeae son plantas generalmente altas, ocasionalmente rastreras, y frecuentemente columnares o candelabriformes. Sus tallos no son segmentados y tienen costillas comúnmente numerosas. Las flores de Pachycereeae comparten las características principales de la flor de las cactáceas, pero tienen algunos atributos propios. En casi todas las especies de la tribu Pachycereeae la flor muestra simetría radial, son sésiles y solitarias. En la tribu existen tres regiones de producción floral: algunas especies presentan flores en la región apical, otras en la región apical-lateral y otras únicamente en la lateral.

Las flores de Pachycereeae son pequeñas a medianas y se desarrollan en aréolas de ramas vegetativas o en aréolas de pseudocefalios o cefalios. Son generalmente nocturnas; raramente diurnas. Tienen perianto de conspicuo a pequeño, de color blanco, rojo o púrpura. El pericarpelo, como en todas las cactáceas, presenta generalmente escamas provistas de aréolas con lana, pelos, cerdas o espinas. En los géneros más recientes según su posición filogenética son desnudas o casi desnudas (Gibson y Nobel, 1989). El receptáculo es generalmente largo, de forma tubular hasta infundibuliforme, con los entrenudos alargados, los podarios recurrentes y las escamas con areolas generalmente reducidas, más o menos lanosas y espinosas, y hasta desnudas. Presentan una cámara nectarial bien desarrollada. Los estambres inferiores nacen en la saliente interna del receptáculo que cierra más o menos por arriba la cámara nectarial. Los estambres superiores son numerosos y se encuentran

adheridos a las paredes y a las gargantas del tubo receptacular. El fruto es carnoso, a veces muy espinoso y puede ser dehiscente o indehiscente, abriéndose de hendiduras irregulares, longitudinales. Las semillas son de tamaño variable, de medianas a grandes. El hilo y micrópilo están fusionados y no tienen apéndices (Bravo et al., 1995; Anderson, 2001).

En Pachycereae las flores de algunas especies de la tribu crecen en el ápice de las ramas reproductivas, esta región de la rama (cefalio) recibe su nombre del latín (cephalum=cabeza) por que aparenta una cabeza. El pseudocefalio (del latín= cabeza falsa) también es característico de algunas especies de la tribu, en estas especies las flores se forman únicamente en un lado del ápice del tallo, en donde cada aréola es cubierta por pelos muy largos. Como consecuencia las plantas maduras que han florecido durante muchos años presentan un panel vertical donde se localizan las flores. (Nobel, 1990)

## **B. Reproducción y polinización de Pachycereae**

La polinización, es decir, el transporte de polen desde las anteras al estigma, ha sido estudiada con un enfoque sistemático comparativo entre diferentes grupos de plantas, mostrando la alta diversidad que de este mecanismo en las angiospermas (Tcherkej, 2004). Se han realizado un gran número de estudios de polinización en cactus (Valiente-Banuet et al., 1996; 1997; Godínez-Álvarez, 2002), que sugieren que los vectores de polinización son animales que exhiben especificidad, pero no exclusividad. Las flores de los cactus se dividen en cuatro

tipos básicos según su síndrome de polinización: flores polinizadas por abejas, por mariposas nocturnas, por colibríes y por murciélagos (Nobel, 2002).

Uno de los aspectos más estudiados de las cactáceas son las interacciones planta-polinizador. Estas interacciones están relacionadas con los llamados síndromes de polinización propuestos por Faegri y Van Der Pijl (1979), en los cuales grupos distintos de plantas convergen en un cierto tipo de flor y de recompensa adecuados a un tipo particular de polinizador. Por otra parte, hay grupos de animales que dependen en mayor o menor grado de las flores para obtener su alimento, y que también presentan una convergencia adecuada a la forma de la flor para la utilización de ésta como recurso. Como resultado de dicha interacción, las flores pueden tener diferentes longitudes, formas y colores que atraen a tipos específicos de polinizadores (Bustamante y Búrquez, 2005). Inclusive existe una fuerte relación entre la evolución de las características florales y la adaptabilidad de los polinizadores a dichas características. En general, los síndromes de polinización de estas cactáceas corresponden a sus polinizadores efectivos (Bustamante, E. y Búrquez A., 2005).

Las flores quiropterófilas (polinizadas por murciélagos) son las más comunes en las cactáceas columnares. Son flores robustas, de gran tamaño, con forma de embudo angosto, y de color crema o blanco. Sus polinizadores son atraídos por el aroma de las flores, que producen como recompensa por los servicios de polinización, grandes cantidades de polen y néctar principalmente en el crepúsculo y la noche (Faegri y Van Der Pijl, 1979; Valiente-Banuet, 1996).

Los murciélagos son importantes polinizadores de las cactáceas columnares (Alcorn et al., 1959, 1962; Fleming et al., 1996; Horner, et al., 1998; Howell, 1974; Mc-Gregor et al., 1962; Nassar, 1991; Petit, 1997; Shaley, 1995; Valiente-Banuet, et al., 1996), y también son importantes dispersores de sus semillas (Sosa y Soriano, 1998; Valiente-Banuet, et al., 1996). Con base en la morfología floral y en la antesis nocturna, se estima que 42 especies de cactáceas columnares de la tribu Pachycereeae son polinizadas por murciélagos (Valiente-Banuet et al., 1996). La mayoría de los murciélagos nectarívoros especializados son pequeños y tienen la lengua muy larga; se mantienen en el aire volando mientras se alimentan, por lo que necesitan espacio para el movimiento de sus alas justo en frente de las flores (Nicolson et al., 2007).

Los murciélagos nectarívoros habitan principalmente en los trópicos y subtrópicos. Constituyen dos grupos filogenéticamente distantes: la familia Phyllostomidae, que incluye los murciélagos neotropicales, que se originaron a partir de los murciélagos insectívoros del grupo Microchiroptera y radiaron a nichos de murciélagos que visitan las flores y el suborden Megachiroptera esta formada por murciélagos frugívoros grandes y menos especializados que se restringen a regiones paleotropicales (Winter y Von Helverson, 2001).

Los murciélagos que visitan estos miembros de Pachycereeae pertenecen a la familia Phyllostomidae. Son 18 especies de murciélagos las que visitan cuando menos ocasionalmente a estas cactáceas. El néctar de las cactáceas es el componente principal de la dieta de la mayoría de las especies de la familia Phyllostomidae (Flemming & Valiente-Banuet, 2002). El área de distribución de

las especies de esta familia de murciélagos es muy similar a la de la tribu Pachycereae. Ellos se alimentan de néctar similar al de las aves, en algunas ocasiones comparten flores (Nicholson, et al. 2007).

Estos estudios proveen un contexto ecológico para determinar la gran importancia de las interacciones bióticas en la dinámica de las poblaciones de las cactáceas columnares (Soriano y Ruiz, 2002). Adicionalmente, existen caracteres morfológicos en la mayoría de los murciélagos que visitan a las cactáceas (orejas pequeñas, hocico largo y lengua larga), las cuales les permiten extraer el néctar de las flores.

La diversidad de los tipos florales en Pachycereae es un ejemplo de diversificación morfológica de las especies de esta tribu. Esta diversidad de formas se atribuye a que dentro de la tribu existen diferentes tipos de polinizadores (Nobel 1990). Un estudio exhaustivo de la evolución de la forma de las flores y del desarrollo reproductivo de estas en la tribu, junto con una filogenia resuelta podrían ser la clave para entender los procesos que subyacen a la diversificación de la tribu.

## II. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

### II.I Historia de la clasificación de la familia Cactaceae

En 1753 Linneo describe oficialmente 22 especies de cactáceas. Posteriormente Karl Schumann (1898) publica una clasificación detallada de la familia Cactaceae, en la cual reconoció 21 géneros que clasificó en tres subfamilias que actualmente siguen siendo utilizadas: Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae. Los cactos columnares quedaron agrupados en la tribu Echinocactae, dentro de la subfamilia Cactoideae. Aunque esta clasificación no estaba basada en relaciones filogenéticas, representó un gran progreso en el reconocimiento de géneros que fueron posteriormente utilizados. Britton y Rose (1920) realizaron una monografía de la familia que representa la base de la clasificación de las cactáceas. Los cactos columnares fueron agrupados dentro de la subfamilia Cactoideae, a la cual ellos nombraron tribu Cactaeae y dentro de la cual reconocieron 114 géneros repartidos en ocho subtribus. También subdividieron *Cereus*, los cactos columnares, en varios géneros. Algunos de los nombres de estos géneros se basaron en los nombres propuestos en 1905 por Alwyn Berger, quién dividió a *Cereus* en 18 subgéneros. Posteriormente a Britton y Rose, la sistemática de las cactáceas siguió tres direcciones. Una fue la escuela que estudiaba México y las Antillas, siguiendo la línea de Britton y Rose. Esta escuela junto con otros cactólogos describieron muchas especies desconocidas de América del Sur y modificaron las propuestas que ya habían sido establecidas anteriormente de Britton y Rose, replanteando los géneros que habían sido propuestos anteriormente. Entonces con las

nuevas aportaciones Curt Backeberg propuso en 1966 nuevos géneros y cientos de nuevas especies de América del Sur y realizó una revisión de los géneros de América del Norte. Publicó alrededor de 50 nuevos géneros, de los cuales muy pocos son entidades monofiléticas. Mientras, en Estados Unidos Lyman Benson realizó estudios de cactus nativos del norte de México y reclasificó todas las especies de cactus columnares como miembros del género *Cereus*. Todos los problemas que ha habido para clasificar a los grupos de cactáceas han tratado de solucionarse con el desarrollo de las filogenias de las especies, que componen esta familia.

Tiempo después Buxbaum (1970) publicó el sistema de clasificación filogenético para cactáceas utilizando caracteres reproductivos particularmente de las flores y las semillas. Aunque sus estudios filogenéticos eran bastante intuitivos, si los comparamos con el standard de las filogenias actuales (sus filogenias genéricas fueron realizadas con sets de datos incompletos), su nueva clasificación reacomodó una gran cantidad de géneros y especies, pero en algunos casos agrupó linajes de América del Norte y de América del Sur, con caracteres convergentes (Gibson y Nobel, 1986).

## II.II Estudios Filogenéticos de Pachycereeae

Buxbaum (1975) publicó una representación evolutiva de la tribu Pachycereeae, en la que se reconocen cuatro subtribus: Pachycereinae, Stenocereinae, Myrtillocatinae y Pterocereinae (Figura 5). La subtribu Stenocereinae agrupa 20

especies que tienen muchos triperenos glucocídicos, células perla, que son células pigmentadas esféricas que dan color al fruto, y semillas duras muy pequeñas. Las especies de este grupo presentan cuerpos de sílice en la epidermis; las que carecen de estos se agrupan en los géneros *Myrtillocactus*, *Escontria* y *Polaskia*. En la subtribu Pachycereinae se agrupan las especies que presentan alcaloides de tetrahidroisquinolina o cristales de oxalato de calcio y carecen de los atributos distintivos de la subtribu Stenocereinae. Este modelo difiere a estudios preliminares de parsimonia, por lo que se realizaron estudios posteriores en los que reconoce únicamente a las subtribus Stenocereinae y Pachycereinae (Gibson y Nobel 1986)

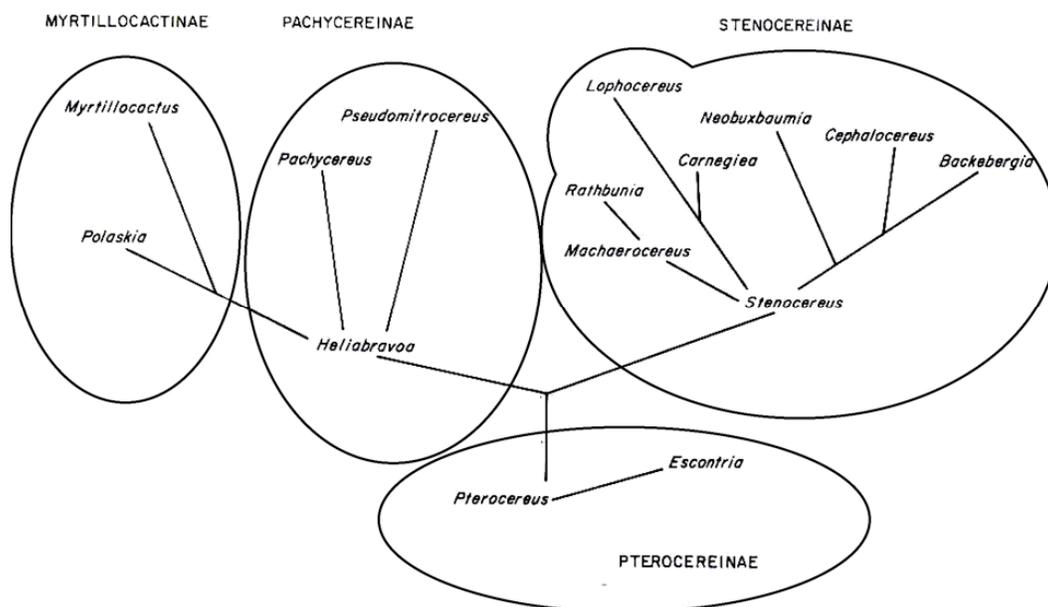


Figura 5. Representación evolutiva de la tribu Pachycereae (Buxbaum, 1975), en la que se reconocen cuatro subtribus. Imagen modificada a partir de (Gibson y Nobel 1986)

Barthlott y Hunt (1993) publicaron una clasificación de la familia Cactaceae. Esta clasificación ha sido corroborada en estudios moleculares posteriores, pero en algunos casos ha sido necesario cambiar de géneros o

tribus algunos taxa, como se ha dado el caso en Pachycaeeae. Los géneros que proponen dentro de la tribu son: *Bergerocactus*, *Carnegia*, *Cephalocereus*, *Escontria*, *Myrtillocactus*, *Neobuxbaumia*, *Pachycereus*, *Polaskia*, *Rathbunia* y *Stenocereus*.

Cornejo y Simpson (1997) realizaron un estudio anatómico y morfológico en el que sugieren sugieren la formación de las subtribus Pachycereinae y Stenocereinae (Figura 7)

Posteriormente Wallace (2002) publicó la filogenia de las cactáceas mexicanas con base en caracteres moleculares (*rbcL*), en donde excluyó a todas a las especies de Pereskioideae y Opuntioideae y a las tribus Hylocereeae, Rhipsalideae y Cacteeae de la subfamilia Cactoideae. En el mismo año Terrazas y Loza-Cornejo (2002), realizaron un estudio cladista basado en datos anatómicos, morfológicos y químicos en el que incluyen a los géneros propuestos por Barthlott y Hunt en 1993. Nyffeler (2002) publicó el análisis filogenético más extensivo hasta ahora, usando datos moleculares para la familia Cactaceae (Figura 2). En este utilizó tres especies de la tribu Pachycereae *sensu* Anderson pertenecientes a los géneros *Echinocereus*, *Pachycereus* y *Escontria*. Posteriormente (Arias et al., 2005) reportaron la filogenia molecular más completa de Pachycereae (Figura 6) utilizando las secuencias del marcador *rpL16* de cpDNA. En el cual incluye a los géneros *Acanthocereus*, *Bergerocactus*, *Carnegia*, *Corryocactus*, *Cephalocereus*, *Dendrocereus*, *Echinocereus*, *Escontria*, *Leptocereus*, *Myrtillocactus*, *Neobuxbaumia*, *Pachycereus*, *Polaskia*, *Pseudoacanthocereus* y *Stenocereus*:

los resultados de este trabajo sugieren que Pachycereae es un grupo parafilético.

Más adelante se discutirán los resultados obtenidos por Cornejo y Simpson (1997) y por Arias et al. (2005) con los obtenidos en este trabajo.

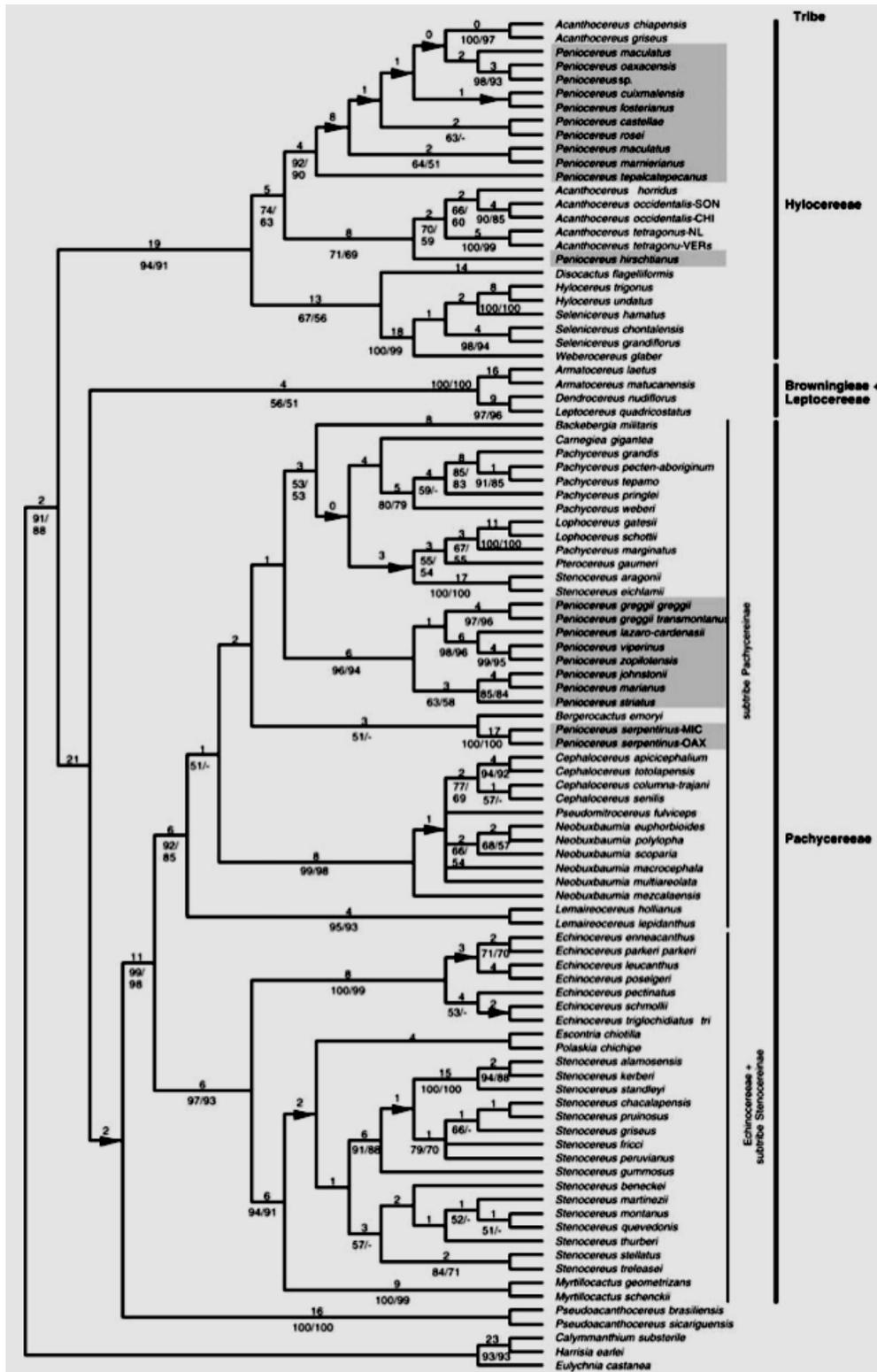


Figura 6. Uno de los 471 árboles igualmente parsimoniosos del análisis cladista combinando del intrón trnL, el espaciador trnL -F y rpl16 de Pachycereae. Las flechas indican ramas que se colapsan en el árbol consenso. los números encima de las ramas son sus longitudes, y por debajo son los porcentajes de bootstrap/jackknife (>50%) imagen obtenida de Arias et al (2005)

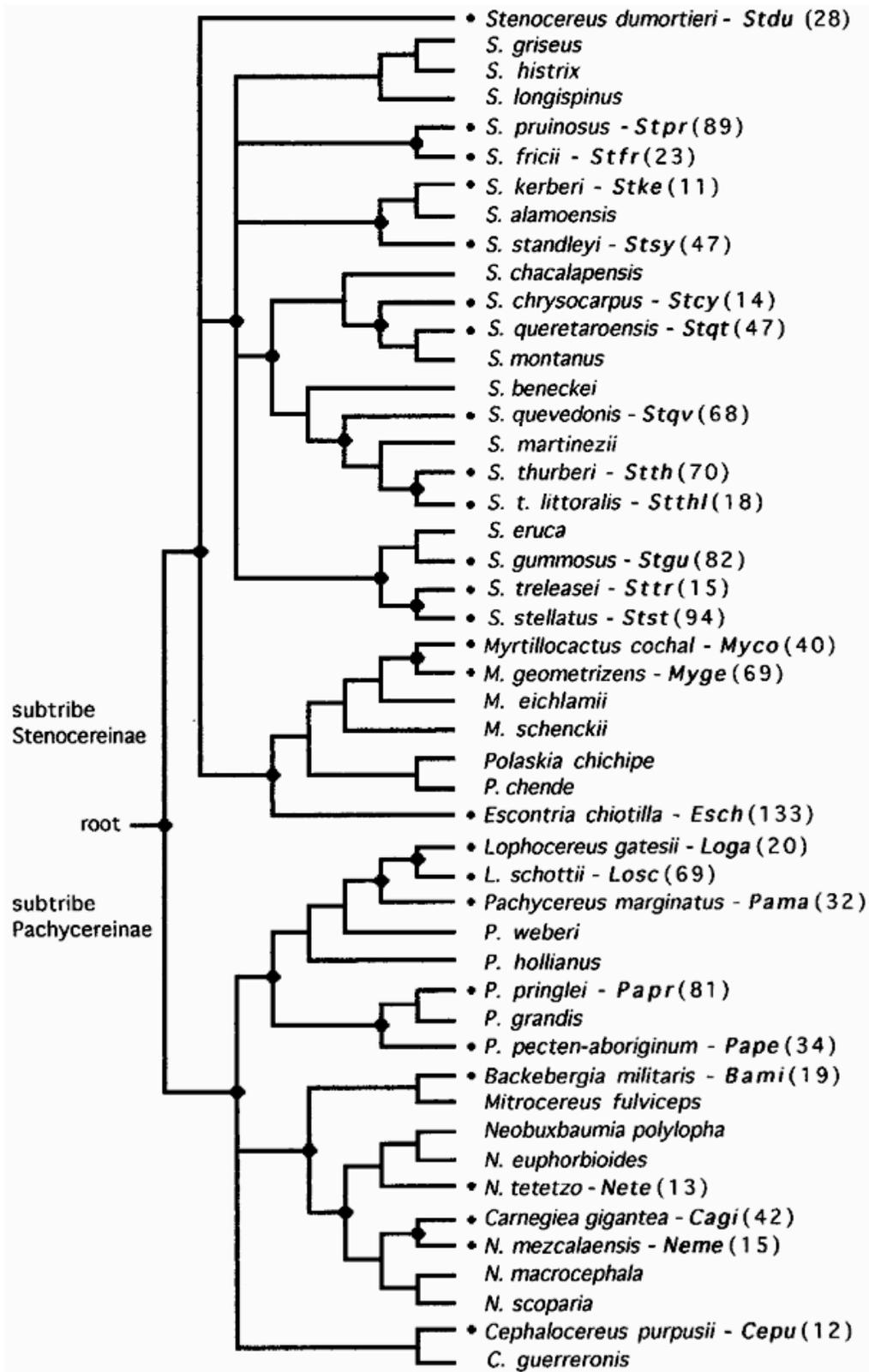


Figura 7. Filogenia para la tribu Pachycereeae. Basada en datos en anatómicos, morfológicos y químicos de algunas especies de Pachycereeae (Cornejo y Simpson 1997).

### **III. OBJETIVOS**

- Estimar tiempo de origen de las especies de Pachycereae, así como de diferentes linajes dentro de la tribu.
- Determinar la tasa de diversificación del grupo.

### **IV. HIPÓTESIS**

- La alta diversidad de la tribu Pachycereae es producto de una diversificación rápida.
- La tasa de diversificación no es constante al interior de la tribu.

## V. JUSTIFICACIÓN

Las cactáceas son un buen modelo para realizar estudios evolutivos pues tienen una gran diversidad, tanto en número de especies como en variedad morfológica. Han logrado mantenerse vivas en ambientes inhóspitos como resultado de las fuerzas de adaptación y selección. Descifrar la historia evolutiva de Pachycereeeae ha sido complicado debido a la amplia distribución de la tribu, a su variabilidad morfológica, a su riqueza de especies y a que estas son muy cercanas entre sí. Las cactáceas columnares presentan una gran variabilidad biológica, por lo que los estudios que han investigado sus relaciones evolutivas han sido inconclusivos. (Wallace, 2002). Además algunos de los problemas de estas plantas presentan cuando se trata de elucidar sus relaciones son la evolución paralela, la neotenia y la plasticidad fenotípica que ocurre con mucha frecuencia dentro de la familia (Wallace, 2002). Realizar estudios evolutivos en Pachycereeeae es importante debido a que son plantas dominantes en zonas áridas y semi-áridas de México, pudiendo formar bosques de hasta 1200 individuos por hectárea. (Valiente-Banuet. 1997)

Las cactáceas, junto con otras plantas suculentas, ofrecen un modelo único para realizar estudios ecológicos y evolutivos de la arquitectura de la madera y morfológicos (Cornejo y Simpson, 1997). En el caso de la tribu Pachycereeeae, la evolución de la forma floral puede ser de gran ayuda para poder entender la evolución de Pachycereeeae. Adicionalmente si consideramos la importancia económica, cultural y ecológica de las cactáceas columnares, debe ser una prioridad de investigación conocer los factores que controlan la

distribución y abundancia de estas especies que son emblemaicas de las zonas áridas y semiáridas, especialmente por que se sabe que estas especies son muy frágiles ante un disturbio (Bustamante y Búrquez, 2005).

No se ha publicado ningún trabajo donde se fechen y comparen los tiempos de origen de la tribu Pachycereea, entonces consideramos que este será un paso importante para entender las causas de la diversidad y los patrones en la tribu.

## VI. Material y Métodos

### VI.I Muestreo y materiales utilizados

El objetivo del muestreo en Pachycereeae fue representar la diversidad morfológica, ecológica y taxonómica del grupo para obtener una filogenia con todos los géneros (Tabla 1) y casi todas las especies descritas hasta el momento por Anderson (2001), así como un grupo externo que incluye especies de los géneros *Calymmanthium* y *Rhipsalis*.

<b>Tabla 1. Miembros de la tribu Pachycereeae (Anderson, 2001) distribuidos en México e incluidos en el trabajo</b>			
<b>Géneros</b>	<b>Total de especies</b>	<b>Spp. en México</b>	<b>Spp. incluidas en el Trabajo</b>
<i>Acanthocereus</i>	6	4 (66.66%)	5
<i>Bergerocactus</i>	1	1 (100%)	1
<i>Carnegiea</i>	1	1 (100%)	1
<i>Corryocactus</i>	12	0 (0%)	1
<i>Cephalocereus</i>	5	5 (100%)	4
<i>Dendrocereus</i>	2	0 (0%)	1
<i>Echinocereus</i>	61	59(98.33)	7
<i>Escontria</i>	1	1 (100%)	1
<i>Leptocereus</i>	14	0 (0%)	1
<i>Myrtillocactus</i>	4	3 (1.71%)	4
<i>Neobuxbaumia</i>	9	9 (100%)	8
<i>Pachycereus</i>	13	12 (92.3)	12
<i>Peniocereus</i>	18	18 (100%)	19spp.+ 2var.
<i>Polaskia</i>	2	2 (100%)	2
<i>Pseudoacanthocereus</i>	2	0 (0%)	2
<i>Stenocereus</i>	24	22 (91.66)	21
<b>TOTAL</b>	<b>175</b>	<b>119 (68%)</b>	<b>90(51.4%)</b>

No fueron incluidas especies de hábito columnar de otros géneros como *Browningia*, *Cereus* y *Cleistocactus* entre otros, debido a que en la filogenia de la familia Cactaceae (Nyffeler 2002) fueron reportados como parte de otros

grupos y según Anderson (2001), no pertenecen a la tribu Pachycereeae. En el Apéndice se muestra la tabla de especies utilizadas para el análisis filogenético.

Para este trabajo se obtuvieron secuencias del GenBank de representantes de Pachycereeae, completando el muestreo con secuencias obtenidas a partir del DNA de ejemplares frescos y congelados, que fueron colectados en el campo y en el Jardín Botánico de la UNAM.

En la Tabla 2 se muestra un registro de todos los ejemplares que fueron colectados en el campo para ser depositados en el Herbario Nacional MEXU y en el banco de DNA de cactáceas del laboratorio de la Dra. Susana Magallón Puebla. No todos los ejemplares colectados y depositados en el Herbario Nacional MEXU fueron utilizados en este trabajo. Posteriormente (Tabla 5) se muestran los ejemplares colectados que sí fueron utilizados en el trabajo.

<b>Tabla 2. Registro de colecta de ejemplares depositados en el Herbario Nacional MEXU y muestras aportadas al banco de DNA.</b>				
(x) significan que hay DNA disponible y (-) que no se obtuvo DNA				
<b>No. colecta</b>	<b>Especie</b>	<b>Localidad</b>	<b>Colector</b>	<b>DNA</b>
001	<i>Stenocereus dumortieri</i>	San Luis Potosí, Santa María del Río	J. A. Barba	x
003	<i>S. griseus</i>	Tamaulipas	J. A. Barba	x
006	<i>S. griseus</i>	Querétaro, Tancama	J. A. Barba	-
008	<i>S. queretaroensis</i>	Querétaro, Jalpan de Serra	J. A. Barba	x
009	<i>S. queretaroensis</i>	Querétaro, Jalpan de Serra	J. A. Barba	-
010	<i>S. queretaroensis</i>	Guanajuato, Carcillo	J. A. Barba	x
011	<i>S. dumortieri</i>	Guanajuato, Xichú	J. A. Barba	-
012	<i>S. griseus</i>	Guanajuato, Xichú	J. A. Barba	-
013	<i>S. stamleyi</i>	Sinaloa	J. A. Barba	x
014	<i>S. kerberi</i>	Sinaloa, Mazatlán	J. A. Barba	x
015	<i>S. alamosensis</i>	Sinaloa, Ahome	J. A. Barba	-
016	<i>Acanthocereus occidentalis</i>	Sinaloa	J. A. Barba	-
017	<i>S. alamosensis</i>	Sonora	J. A. Barba	-
018	<i>Pachycereus schottii</i>	Sonora	J. A. Barba	x
019	<i>S. alamosensis</i>	Sinaloa, Álamos	J. A. Barba	x
020	<i>S. montanus</i>	Sonora, El Chinal	J. A. Barba	x
021	<i>S. stamleyi</i>	Jalisco	J. A. Barba	-
022	<i>Neobuxbaumia squamulosa</i>	Colima	J. A. Barba	x

14	<i>Pachycereus marginatus</i>	Oaxaca, Chapulco	T. Hernández y J. A. Barba	x
16	<i>Polaskia chichipe</i>	Oaxaca, Chapulco	T. Hernández y J. A. Barba	-
19	<i>Stenocereus stellatus</i>	Puebla, Tehuacán	T. Hernández y J. A. Barba	-
21	<i>Pachycereus hollianus</i>	Puebla, Zapotitlán	T. Hernández y J. A. Barba	-
22	<i>Cephalocereus columna-trajani</i>	Puebla, Zapotitlán	T. Hernández y J. A. Barba	x
27	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Puebla, Zapotitlán	T. Hernández y J. A. Barba	x
28	<i>Pachycereus fulviceps</i>	Puebla, Zapotitlán	T. Hernández y J. A. Barba	-
29	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Puebla, Zapotitlán	T. Hernández y J. A. Barba	x
30	<i>Stenocereus stellatus</i>	Puebla, Zapotitlán	T. Hernández y J. A. Barba	-
33	<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	Puebla, Zapotitlán	T. Hernández y J. A. Barba	-
34	<i>N. macrocephala</i>	Puebla, Zapotitlán	T. Hernández y J. A. Barba	x
37	<i>N. mezcalensis</i>	Oaxaca, Santiago CH	T. Hernández y J. A. Barba	-
39	<i>Escontria chiotilla</i>	Oaxaca, Santiago CH	T. Hernández y J. A. Barba	-
43	<i>Stenocereus pruinosus</i>	Oaxaca, Huajapán	T. Hernández y J. A. Barba	x
45	<i>Pachycereus fulviceps</i>	Oaxaca, Santiago N.	T. Hernández y J. A. Barba	-
48	<i>P. weberi</i>	Oaxaca, San Juan B.	T. Hernández y J. A. Barba	-

## VI.II Extracción de DNA

El DNA total de cada ejemplar fue extraído utilizando el kit de extracción DNeasy plant Mini Kit 250 (Qiagen, E.U.) para muestras de tejido de 100mg a 1g, siguiendo las modificaciones reportadas en Nyffeler (2004). Se obtuvieron alícuotas de 80 a 100  $\mu$ l; estas fueron secadas hasta obtener el pellet de DNA y se adicionaron 50  $\mu$ l de buffer AE del mismo kit de extracción. Estas muestras se encuentran actualmente almacenadas a -20°C.

Este es el método básico, pero en la práctica cada especie necesitó modificaciones específicas para realizar una extracción exitosa.

### VI.III Amplificación de marcadores de cloroplasto y núcleo

La Amplificación del DNA se realizó mediante la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), esta técnica permite replicar miles de veces, en el transcurrir de pocas horas pequeñas cantidades de DNA. La técnica se basa, en su forma más simple, en la realización de tres reacciones (desnaturalización, *alineamiento* y extensión) sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces, obteniendo como resultado la amplificación del segmento de DNA delimitado por los oligonucleótidos (*primers*).

El DNA obtenido de las extracciones no resultó en todos los casos en una banda bien definida ni muy intensa al ser corrida en un gel de agarosa al 1%. Sin embargo se pudo utilizar directamente. Las secuencias de los primers utilizados para las PCR y para las reacciones de secuenciación se muestran en la Tabla 3. La secuencia de los primers de rpl161F y rpl163R fueron obtenidas por T. Hernández (*en prep.*). Todas las reacciones se hicieron con Taq polimerasa (Fermentas o Qiagen E.U.). En la Tabla 4 se muestra el ciclo de tiempo/temperatura que utilizamos para amplificar todos los fragmentos.

Estos ciclos fueron obtenidos de Arias et al (2003) y fueron modificados hasta obtener los resultados deseados. Los productos se almacenaron a 4° C hasta ser corridos en un gel de agarosa al 1%, empleando bromuro de etidio como marcador, para así calcular tanto el tamaño mediante la comparación con el marcador (ladder) de 100pb Invitrogen como la concentración.

<b>Tabla 3. Secuencia de Primers para PCR y secuenciación (5´ - 3´)</b>	
rpl161F	GCT ATG CTT AGT GTG TGA CTC GTT
rpl163R	CTT CTA TTT GTC TAG GCG TGA TCC

<b>Tabla 4. Ciclo empleado para la amplificación del marcador rpl16</b>	
Ciclo	Temperaturas y tiempos
Desnaturalización inicial	94°C/ 5min
Número de ciclos	35
Alineamiento	63°C/1min
Extensión	72°C/2min
Termociclador	MJ Research PTC-225 DNA Engine Tetrad Cyclor

## VI.IV Secuenciación de los marcadores

Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1% para verificar que la amplificación había resultado correcta. Dichos productos de PCR y alícuotas de los primers utilizados para sus reacciones de PCR fueron enviados a UW (University of Washington) en donde fueron secuenciados por High-Throughput Genomics.

## VI.V Edición y alineación de las secuencias de DNA

Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos de interés se realizó la edición manual con el programa Sequencher 4.7 (1991-2007, Gene Codes Corporation). Se revisó secuencia por secuencia, evaluando la nitidez y fuerza de la señal en cada sitio. Posteriormente se procedió hacer una búsqueda BLAST en (GenBank) para cada secuencia, con el objetivo de saber cual de todas las secuencias contenidas en la base de datos se parece más a la nuestra. Esta búsqueda sirvió como control para saber si el fragmento amplificado corresponde cuando menos al grupo del organismo deseado.

Las secuencias de calidad de *rpL16* se alinearon utilizando los programas MUSCLE (Edgar, 2004) y Se-AL v2.0a11 (Rambaut, 2002), en este último se realizaron la matriz del alineamiento y una revisión manual de la alineación de las secuencias de este marcador.

## VI.VI El marcador molecular

El gen *rpL16* pertenece al grupo de los “split genes” del cloroplasto (genes en los que la secuencia genómica está interrumpida por intrones que realizan “splicing” o edición de intrones) (Crick, 1979), este codifica la proteína ribosomal L16. El gen *rpL16* está conformado por dos exones separados por un intrón (Durante et al., 2007), que varía en longitud desde 1000 pares de bases (*pb*) hasta 1500 *pb* aproximadamente (Schnabel y Wendel, 1998). Este intrón se encuentra en el gen *rpL16* en la mayoría pero no en todas las plantas

terrestres, como las familias Geraniaceae, Goodeniaceae y Pumbaginaceae, que no tienen este intrón.(Downie, 2000).

Las secuencias del intron *rpL16* evolucionan relativamente rápido y proveen información filogenética a nivel de género e infragenérico (Zhang, 2000). El intrón *rpL16* tiene como ventajas su fácil amplificación debido a que únicamente requiere dos primers anclados en los extremos del intrón para amplificar el intrón completo, y que la alineación entre taxa cercanamente emparentados es relativamente sencilla (Downie et al., 2000).

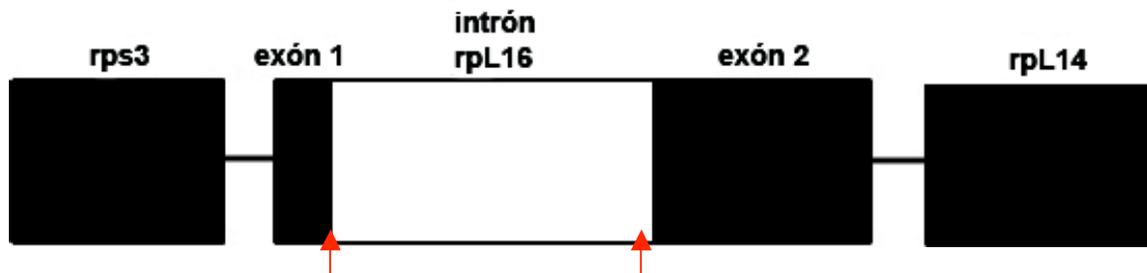


Figura 8. Esquema representativo del intrón *rpL16* del cDNA. Las flechas rojas indican la posición de los primers (Imagen modificada a partir de Downie et al., 2000)

## VI.VII Selección del modelo de sustitución molecular

Es importante elegir un modelo de sustitución molecular que describa mejor los datos de nuestra matriz para generar un mejor árbol. La selección del modelo de sustitución se realizó con el programa MODELTEST (Posada y Crandall, 1998). Este es un programa que realiza la selección del modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajusta a una matriz de datos. El programa elige entre 56 modelos e implementa tres marcos de selección del modelo: pruebas jerárquicas del cociente de verosimilitud (hLRTs), el Criterio de

información de Akaike (AIC) y el criterio de información bayesiano (BIC) (Posada y Buckley, 2004). La selección del modelo de sustitución molecular en *Pachycereae* requirió de la valoración de ajuste de todos los modelos disponibles en el programa ModelTest (Posada y Crandall, 1998) a la matriz de datos del marcador (*rpL16*).

## VI.VIII Estimación filogenética

Las filogenias son una herramienta fundamental para reconstruir la historia evolutiva de la vida (Huelsenbeck, 2001). Están compuestas por nodos y ramas, los nodos conectan tres ramas adyacentes, excepto el nodo-raíz del árbol. Los nodos terminales representan unidades taxonómicas (agrupaciones de organismos que contienen la información sobre sus características). Las unidades taxonómicas representadas por los nodos pueden ser especies (o taxa superiores), poblaciones, individuos o genes. Las ramas definen las relaciones entre las unidades taxonómicas en términos de descendencia y ancestría. El aspecto del árbol filogenético (su topología) sólo está dado por las conexiones entre sus nodos (Li, 1999). En otras palabras las filogenias representan las relaciones de ancestría común entre organismos o secuencias de DNA (Holder y Lewis 2003).

En este trabajo la filogenia se estimó mediante inferencia Bayesiana que está basada en la probabilidad posterior de un árbol. La noción de la probabilidad de una filogenia Bayesiana no se refiere únicamente a una topología postulada sino, también a las longitudes de ramas postuladas para esa

topología y a los parámetros del modelo de sustitución molecular que subyace al proceso que generó el árbol. La probabilidad posterior de un árbol indica que tan creíble es que una filogenia refleje la historia de ramificaciones que realmente ocurrió, por esto es muy importante que la información a priori sobre el modelo de sustitución sea correcta. El árbol de mayor probabilidad posterior (PP) puede escogerse como la mejor estimación de la filogenia (Rannala y Yang, 1996) Para formular la probabilidad posterior de un árbol se utiliza el método Monte Carlo de Cadenas de Markov (Metropolis et al, 1953).

Utilizamos la inferencia filogenética Bayesiana porque presenta muchas ventajas sobre otros métodos de inferencia filogenética, incluyendo, la capacidad de incluir información a priori, rapidez de obtención de topología y valores de apoyo y algunas ventajas computacionales (Huelsenbeck y Ronquist, 2005).

La filogenia fue estimada utilizando el programa MrBayes3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), considerando un modelo de sustitución de seis parámetros (GTR), tomando en cuenta una proporción de sitios invariables, la cual debe seguir una distribución gamma. No utilizamos el modelo obtenido para la matriz de datos del intrón *rpL16* (1550pb) de acuerdo con el AIC (K81uf+I+G) debido a que tiene ocho parámetros y por lo tanto no se puede utilizar en el programa.

Se le pidió al programa que explorara tanto las topologías como los demás parámetros del modelo y que generara el consenso de mayoría con longitudes de rama para cada terminal. Se generaron dos corridas paralelas e independientes las cuales se iniciaron con un árbol aleatorio en cuatro distintas

cadenas de Markov siguiendo el algoritmo MCMC, cuando estas cadenas convergen en una misma región del espacio esta es tomada como aquella de mayor probabilidad posterior (PP).

Utilizamos como grupo externo a *Rhipsalis baccifera*. Se realizaron 5,000,000 generaciones muestreando un árbol cada 200 descartando 500000 generaciones (2500 árboles) como burn-in, después de hacer una confirmación visual de la convergencia en la gráfica de valores de verosimilitud contra el número de generaciones se excluyeron los árboles propuestos en estas primeras generaciones debido a que inicialmente, la cadena inicia en un punto al azar del espacio de parámetros y estas tendrán valores de probabilidades posteriores muy bajas.

Posteriormente se seleccionó la topología con la máxima probabilidad posterior (MAP) de todas las generadas por las dos cadenas. Esta topología MAP se utilizó posteriormente como un filtro sobre todos los filogramas (con longitudes de ramas) que no fueron eliminados en el burn-in obtenidos de las dos corridas independientes y obtuvimos únicamente aquellos cuyas topologías fueran idénticas a la topología MAP. De esta manera le pudimos asignar los valores de rama a nuestra topología seleccionada (MAP). Se obtuvieron dos filogramas con la misma topología pero con diferentes longitudes de rama, de los cuales elegimos el que presentaba menos ramas de longitud igual a cero. Los valores de apoyo de rama del filograma elegido fueron obtenidas del árbol consenso que se generó en las dos corridas.

## VI.IX Estimación del tiempo de origen y diversificación de los linajes de Pachycereeae

El programa BEAST1.4 (Drumond y Rambaut, 2007) se utiliza para realizar análisis Bayesianos MCMC de secuencias moleculares. Este programa está orientado a la estimación de filogenias enraizadas y calibradas, inferidas utilizando modelos de reloj molecular estricto o relajado. BEAST está diseñado tanto para reconstrucción filogenética, como para un marco de referencia para probar hipótesis sin condicionarlas a la topología de un árbol.

Para realizar la fechación con BEAST fue necesario realizar un cronograma en r8s1.70 (Sanderson 2004). Para realizar el cronograma utilizamos como punto de partida uno de los dos árboles con longitudes de rama muestreado por las cadenas bayesianas que es topológicamente idéntico al MAP. Elegimos únicamente el árbol que presentaba menor número de ramas iguala cero y de ramas cortas ya que el programa r8s1.70 no funciona adecuadamente con este tipo de ramas, debido a esto se requiere colapsar las ramas muy pequeñas o igual a cero. (Sanderson 2004). Las ramas terminales igual a cero pueden ser inferidas con una tasa de cero, por lo que hay que reducir los grupos donde se encuentran este tipo de ramas a un solo ejemplar (Sanderson, 2004).

El árbol elegido fue sometido a r8s1.70 para obtener las tasas absolutas y las edades del árbol, fueron eliminados del análisis *Myrtillocactus schenkii*, *Stenocereus martinezi* y *S. pruinusus* por tener longitudes de rama igual a cero. Debido a que la fecha preliminar de origen de la tribu obtenida por Tania Hernández se encuentra dentro de un amplio intervalo de tiempo (1.71-9.093m.a.), se realizaron dos fechaciones con calibraciones distintas, uno con 2

m.a. y el otro con 9.0 m.a. De estos dos análisis elegimos únicamente el archivo calibrado en 9 m.a. (con smothing factor de 100) porque el calibrado en 2 m.a. asignó fechas muy recientes a los clados dentro de la tribu que no coinciden con ningún evento Geológico que pudiera haber causado su rápida diversificación y por que la fecha del grupo hermano de Pachycereeeae (Hylocereeeae) es mayor.

Obtuvimos un cronograma que fue utilizado posteriormente por el programa BEAST1.4 (Drumond y Rambaut) como punto de partida. Se calibró el cronograma en BEAST utilizando como fecha de diversificación del grupo corona de Pachycereeeae una distribución normal entre 8m.a y 10 m.a, elegimos una distribución normal debido a que existe la misma probabilidad de que un evento ocurra en cualquier punto entre este intervalo. El grupo corona es un clado que incluye a todos los representantes actuales del clado, más todas las especies extintas que divergieron posteriormente a la divergencia más antigua que originó dos especies actuales. El grupo troncal contiene al grupo corona más todas las especies extintas que se encuentran entre la divergencia del grupo corona y su clado hermano (Figura 9).

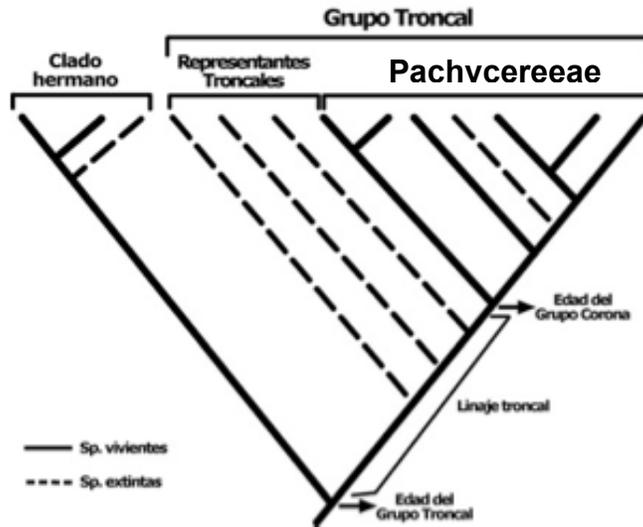


Figura 9. En esta filogenia hipotética se demuestra gráficamente la definición de los grupos troncal y corona. La línea continua representa especies vivientes mientras que la punteada a especies extintas. Figura tomada de Magallón y Sanderson (2001)

Se le pidió al programa que especificara las fechas como años antes del presente, que utilizara como modelo de sustitución GTR, que las frecuencias de base fueran empíricas y como heterogeneidad del modelo gamma+sitios invariantes con un número de 4 categorías gamma. Se le indicó también al programa que utilizara un modelo de reloj molecular relajado lognormal no correlacionado, y como modelo de especiación nacimiento-muerte, este es un modelo estocástico que describe la especiación y extinción de linajes en clados en el cual se asume que la especiación y la extinción ocurren con una tasa constante, haciendo el proceso homogéneo en el tiempo, de esta manera podemos observar si existe un aumento o disminución en la diversidad a lo largo del tiempo. (Magallón y Sanderson, 2001).

Para el método MCMC se le indicó al programa que realizara 10,000,000 de generaciones guardando la información cada 200. Se obtuvieron 5001

árboles. Posteriormente en el programa TRACER (Drumond y Rambaut, 2003) se evaluó la convergencia de las corridas y se revisó el tamaño de muestra efectiva.

En Tree AnnotatorV1.4.8 (Drumond y Rambaut, 2007) se eliminaron 500 como burnin, y se le pidió al programa que únicamente guardara los árboles con un límite de probabilidad posterior de 0.5 y se eligió el árbol de suma máxima de credibilidad de clado. Tree AnnotatorV1.4.8 es un programa que agrupa la información de una muestra de árboles a un solo árbol, la información resumida incluye la PP de nodos en un árbol, estimados posteriores y límites HPD de los pesos de cada nodo y en el caso de relojes moleculares relajados las tasas (Drummond et al., 2007). Posteriormente el árbol fechado fue visualizado en el programa FigTree1.2 (Rambaut, 2008).

## VI.X Estimación de tasas de diversificación de todo el grupo y linajes dentro del grupo

Las tasas de diversificación fueron estimadas utilizando el modelo de nacimiento-muerte (Kendall, 1948), utilizando estimadores que consideran la diversidad de especies y la edad del clado (Magallón y Castillo 2009). Con estos estimadores obtuvimos estimados absolutos de la tasa de diversificación de un clado, en este caso, estos estimadores están condicionados al número de especies en el presente, estos estimadores pueden diferenciar entre la tasa de diversificación de un grupo corona o un grupo troncal (Ecuaciones 6 y 7 de Magallón y Sanderson 2001), (Ecuación 1 y 2 ).

**Ecuación 1.** Estimador de tasas absolutas de diversificación para grupo corona

$$\hat{r}_{\epsilon} = \frac{1}{t} \log[n(1 - \epsilon) + \epsilon]$$

**Ecuación 2.** Estimador de tasas absolutas de diversificación para grupo troncal

$$\hat{r}_{\epsilon} = \frac{1}{t} \left\{ \log \left[ \frac{1}{2} n(1 - \epsilon^2) + 2\epsilon \right. \right. \\ \left. \left. + \frac{1}{2} (1 - \epsilon) \sqrt{n(n\epsilon^2 - 8\epsilon + 2n\epsilon + n)} \right] - \log 2 \right\}$$

donde:

La tasa de extinción relativa ( $\epsilon$ ) se define como  $\epsilon = \mu/\lambda$   
t= tiempo (después del origen del clado)  
n= diversidad de especies vivientes al tiempo t

Como las tasas absolutas de especiación y extinción ( $\lambda$ ,  $\mu$ ) de Pachycereae y los clados internos son desconocidas, las tasas de diversificación fueron estimadas asumiendo que la extinción relativa ( $\epsilon$ ) puede estar dentro del intervalo  $\epsilon=0.0$  que implica cero extinción, y  $\epsilon=0.9$  que implica una tasa alta de extinción relativa. (Magallón y Snderson 2001)

También realizamos una gráfica de los linajes a través del tiempo (LTT) (Figura 10) para entender el patrón general de diversificación de la tribu, este tipo de análisis permite identificar la heterogeneidad de tasas de diversificación dentro de un clado (Wong, 2007) y el ritmo de diversificación (Nee et al, 1994). La obtención de una gráfica de linajes a través del tiempo requirió de una filogenia ultramétrica fechada (en la cual todas las terminales del árbol terminan

en el presente) que se tradujo en una gráfica de linajes en diferentes intervalos de tiempo. El cambio en las tasas de diversificación puede ser calculado visualmente a partir de una gráfica de linajes a través del tiempo al transformar el eje de los linajes a escala logarítmica (Nee, 1992)

## VII RESULTADOS

### VII.I Amplificación y secuenciación de los marcadores

Se obtuvo una matriz de 1647 pb de 95 taxa, de la cual fueron excluidas las regiones terminales (97 pb) y dos taxa: *Stenocereus quevedonis* debido a que se obtuvo una secuencia muy corta y *Cephalocereus totolapensis* debido a que era una secuencia de muy baja calidad que afectaban el alineamiento. En total se analizaron 1550pb de 93 taxa. En la Tabla 5. se muestran las especies de las cuales se obtuvieron secuencias del intrón *rpl16* y que fueron utilizadas para construir la matriz de taxa por caracteres en la que se basaron todos lo análisis.

<b>Tabla 5. Secuencias obtenidas en el laboratorio incluídas en el trabajo.</b>	
<b>Especie</b>	<b>Tamaño de la secuencia del intrón rpl16</b>
<i>Corryocactus aureus</i>	1135 pb
<i>Myrtillocactus cochal</i>	1067 pb
<i>Myrtillocactus eichlamii</i>	1055 pb
<i>Neobuxbaumia squamulosa</i>	882 pb
<i>Neobuxbaumia laui</i>	1148 pb
<i>Polaskia chende</i>	1076 pb
<i>Rhipsalis baccifera</i>	1082 pb
<i>Stenocereus quevedonis</i>	499 pb (excluída del análisis)
<i>Stenocereus eruca</i>	1064 pb
<i>Cephalocereus totolapensis</i>	922 pb (excluída del análisis)

## VII.II Modelo de sustitución molecular

Aunque los valores de la tasa de heterogeneidad con distribución gamma (G) y la proporción estimada de sitios invariables (I) es muy similar, los dos métodos eligieron un modelo distinto. Nosotros seleccionamos el modelo de sustitución con mejor ajuste a los datos moleculares del intrón *rpL16* de acuerdo al Criterio de Información de Akaike debido a que este presenta grandes ventajas sobre el método HRTLs para las estimaciones filogenéticas, por ejemplo penaliza el incremento en el número de parámetros en el modelo, no solo considera el incremento en el ajuste del modelo más complejo sino también la varianza en los parámetros estimados (Posada y Burckley 2004) (Tabla 6).

<b>Tabla 6. Proporción de sitios invariables y valores gamma asociados al modelo de sustitución elegido por AIC hLRTs</b>		
	<b>AIC</b>	<b>hLRTs</b>
Modelo seleccionado	K81uf+I+G	F81+I+G
Tasa de heterogeneidad con distribución gamma (G)	0.7683	0.7906
Proporción estimada de sitios invariables (I)	0.4319	0.4428

Se seleccionó el modelo de sustitución molecular con base al menor valor el cual resultó ser un modelo de ocho parámetros con un valor de AIC de 13103.7822 (Tabla 7).

<b>Tabla 7. Modelo de sustitución seleccionado de acuerdo al AIC</b>	
Modelo seleccionado	K81uf+I+G
-LnL	6544.8911
K	7
AIC	13103.7822

### VI.III Estimación filogenética

La matriz de datos contuvo 93 taxa con 1550 caracteres, representando a todos los géneros de Pachycereeae y un grupo externo (*Rhipsalis* y *Calymmanthium*)

La filogenia resultante del análisis bayesiano para el grupo Pachycereeae se muestra en la Figura 10.

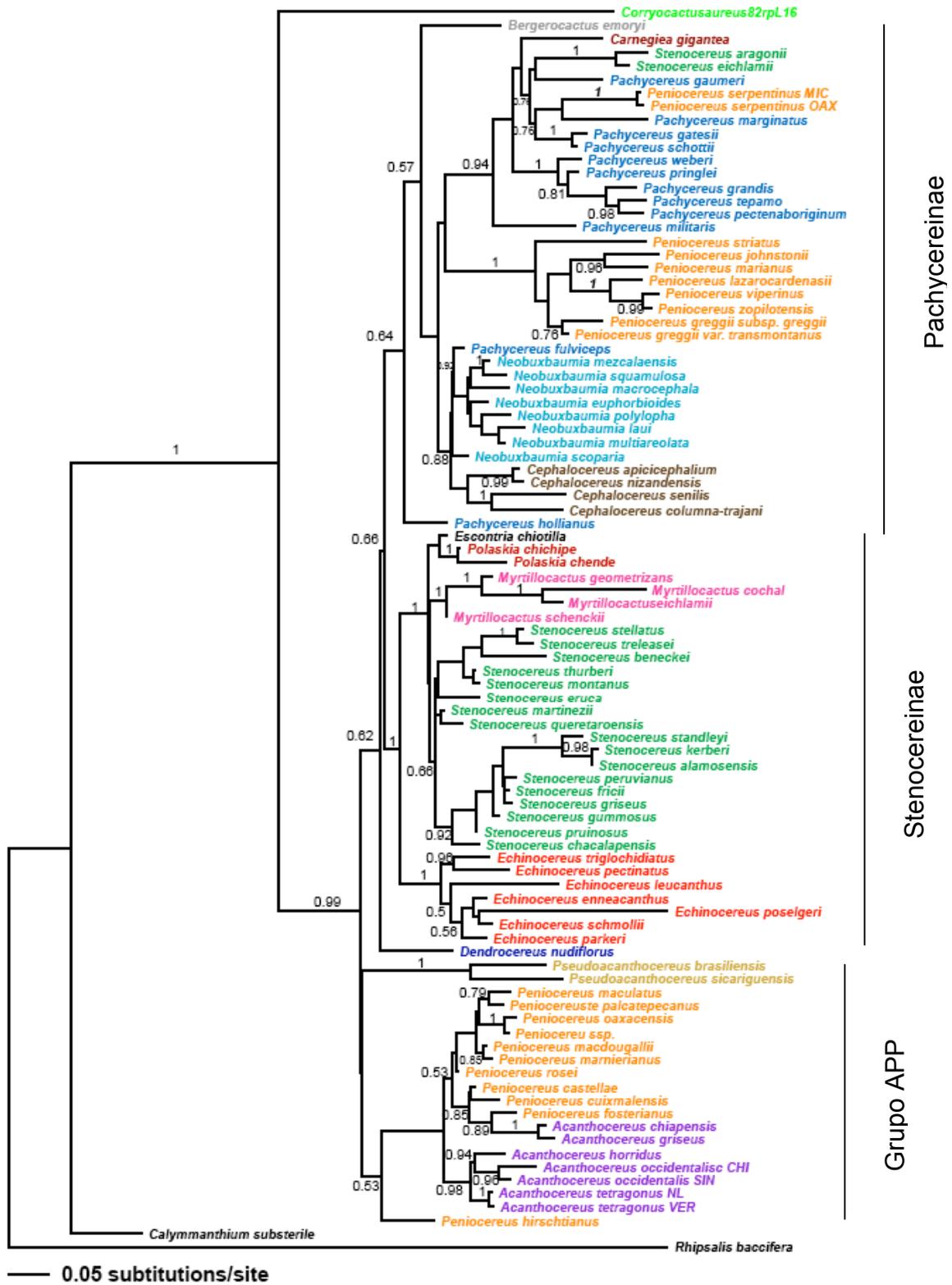


Figura 10. Topología MAP (maximum aposteriori probability) con longitudes de rama. La filogenia fue construida con las secuencias del marcador *rpL16*. Los números asociados a las ramas indican las probabilidades posteriores bayesianas. Cada color indica un género diferente.

La subtribu Pachycereinae obtiene un valor de apoyo de PP de nodo de 0.66 y es monofilética únicamente si *Stenocereus argonii* y *S. eichlamii* son considerados como pertenecientes a ésta. La subtribu Stenocereinae se agrupa con un apoyo de PP de 1.0. *Dendrocereus* comparte ancestría con las subtribus (Stenocereinae y Pachycereinae) y es grupo hermano de éstas. Se forma también un clado hermano a Stenocereinae, Pachycereinae y *Dendrocereus*, con un apoyo de nodo de PP de 0.56, al cual nombramos Grupo APP, está conformado por especies de los géneros *Acanthocereus*, *Peniocereus* y *Pseudoacanthocereus*. *Corryocactus* es grupo hermano del grupo conformado por las dos subtribus, *Dendrocereus* y Gruppo APP.

La subtribu Pachycereinae está conformada por los géneros: *Bergerocactus*, *Pachycereus*, *Carnegieae*, *Peniocereus*, *Cephalocereus* y *Neobuxbaumia*. Los géneros *Bergerocactus* y *Carnegieae* son monoespecíficos; *Cephalocereus* es un género monofilético con un soporte de PP de 0.99 y los géneros *Neobuxbaumia*, *Pachycereus* y *Peniocereus* son parafiléticos

La subtribu Stenocereinae está conformada por los géneros: *Escontria*, *Stenocereus*, *Polaskia*, *Myrtillocactus* y *Echinocereus*. Los géneros monofiléticos que conforman a la tribu Stenocereinae son: *Polaskia* con un soporte de nodo de PP de 1.0, *Myrtillocactus* con un soporte de PP de 1.0, *Stenocereus* (si consideramos a *Stenocereus argonii* y *S. eichlamii* pertenecientes a Pachycereinae.) y *Echinocereus* con un soporte de PP de 1.0.

El Grupo APP está conformado por los géneros monofiléticos *Pseudoacanthocereus* con un soporte de 1.0 y *Acanthocereus* con un soporte PP de 0.98. El género parafiletico *Peniocereus* también es parte de este grupo.

Es importante realizar una clasificación para el género *Peniocereus* pues existen especies que son clasificadas dentro de la tribu Hylocereeae y otras dentro de Pachycereeae (Arias et al., 2005), de esta manera la tribu Pachycereeae es parafilética.

#### VII.IV Tiempo de origen y diversificación de Pachycereeae

El Cronograma obtenido por el programa BEAST1.4 (Figura 10) (Drummond y Rambaut, 2007) asignó una edad para Pachycereeae de 8.52m.a. para el grupo corona. La Figura 11 representa los intervalos de credibilidad de 95% HPD y los nodos de los grupos corona y troncal de algunos clados dentro de la tribu.

Las edades asignadas para algunos clados dentro de la tribu fueron: para el la subtribu Pachicereaine asignó una edad para el grupo corona de 4.65m.a. y para el grupo troncal 5.73, para la subtribu Stenocereinae asignó una edad al grupo corona de 4.29 y para el grupo troncal 5.73, para el género *Myrtillocactus* asignó 2.82m.a. para el grupo corona y para el grupo troncal 3.68 m.a., para el género *Cephalocereus* asignó 1.62 m.a para el grupo corona y para el grupo troncal 2.02 m.a., y para el género *Stenocereus* 2.39 m.a. para el grupo corona y 3.68 m.a. para el grupo troncal (Tabla 8.)

<b>Tabla 8. Edades e intervalos de credibilidad (95% HPD) obtenidos en BEAST</b>			
Nodo del árbol	Equivalencia taxonómica	Edad (m.a.)	Intervalo de credibilidad 95%HPD
1	GC Tribu Pachycereeae	8.52	[8.008,9.837]
10	GC subtribu Pachycereinae	4.65m	[3.216,6.897]
9	GT subtribu Pachycereinae	5.73	[3.644, 7.502]
4	GC subtribu Stenocereinae	4.29	[2.761,6.297]
9	GT subtribu Stenocereinae	5.73	[3.644, 7.502]
2	GC Grupo A	6.6	[3.648,8.564]
3	GT Grupo A	7.59	[4.184,,8.319]
12	GC género Cephalocereus	1.62	[1.099,3.826]
11	GT género Cephalocereus	2.02	[1.5094,532]
5	GC género Myrtillocactus	2.82m.a	[0.913,3.189]
7	GT género Myrtillocactus	3.68	[1.766,4.6951]
6	GC género Stenocereus	2.39	[1.363,3.859]
7	GT género Stenocereus	3.68	[1.766,4.6951]
GC = Grupo Corona, GT= Grupo Troncal			

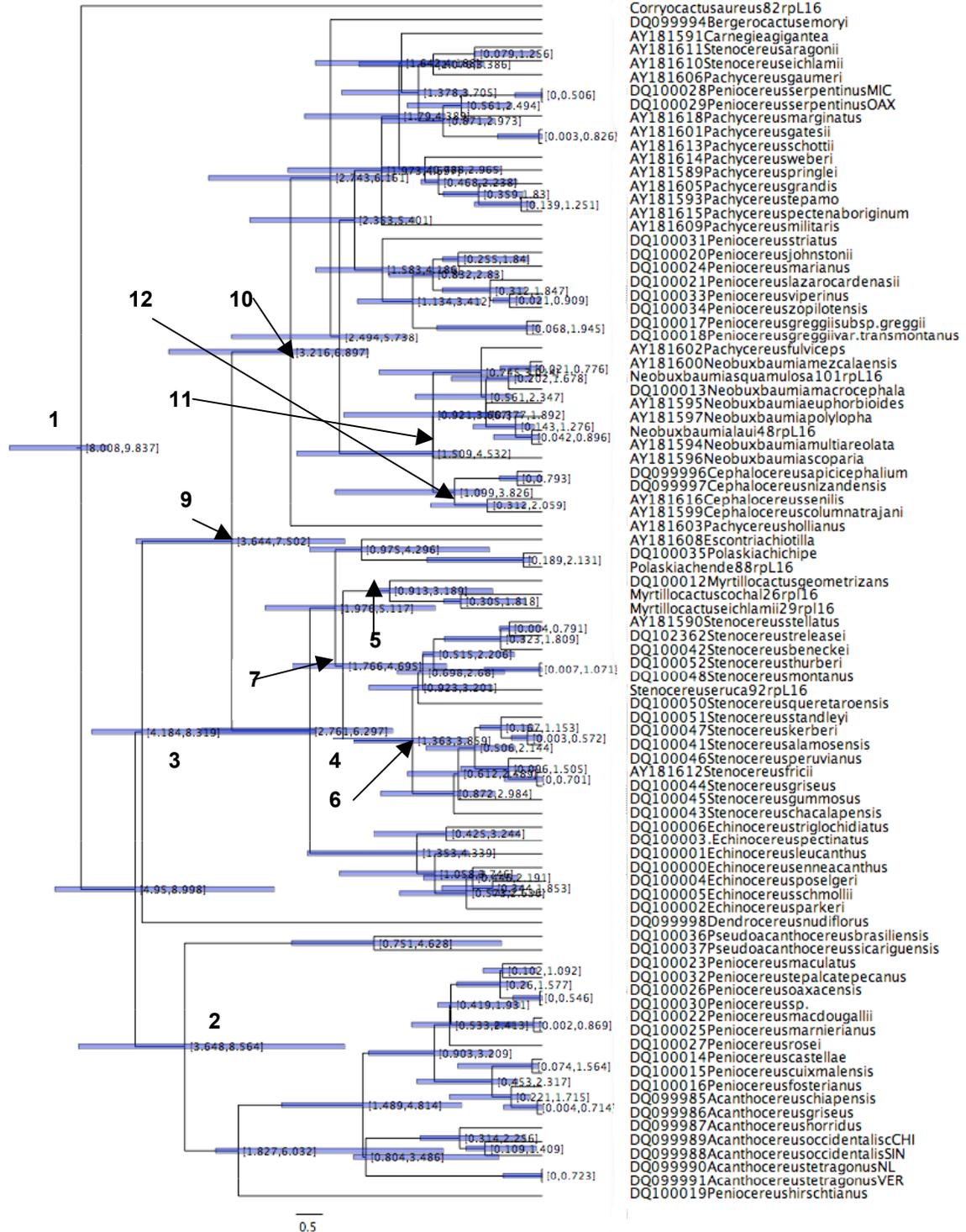


Figura 11. Arbol con fechas correspondientes a máxima credibilidad obtenida en BEAST Dummond y Rambaut, (2007), indicando las fechas de Pachycereae. Los números asociados indican los intervalos de edades estimadas con inferencia Bayesiana, las barras indican un intervalo de credibilidad (95% HPD). Como punto de calibración se utilizó la edad de Pachycereae entre 8 y 10 millones de años. Los números del 1 al 12 indican los nodos de grupos corona y grupo troncal de algunos grupos.

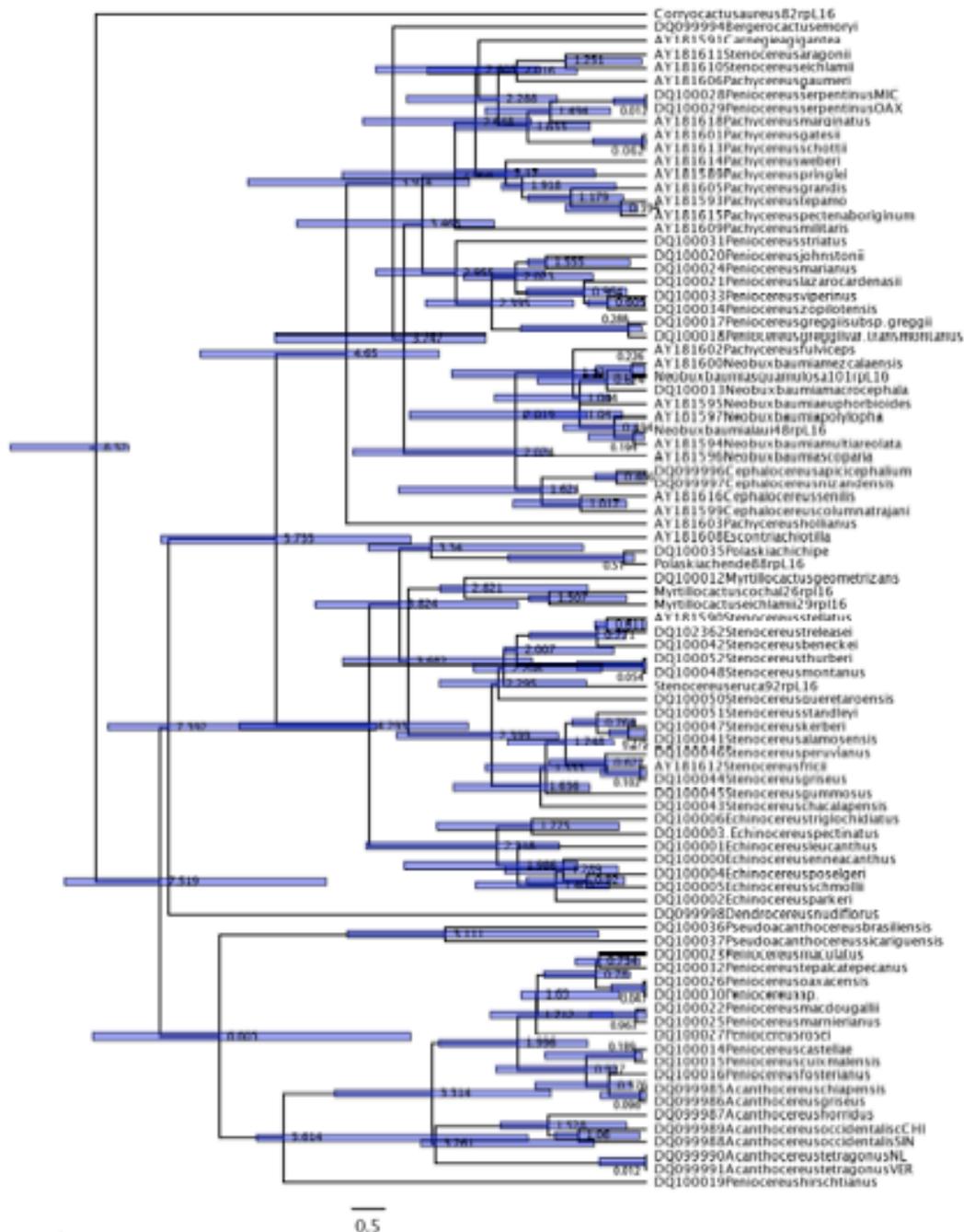


Figura 12. Arbol con fechas correspondientes a máxima credibilidad obtenida en BEAST Dummond y Rambaut, (2007), indicando las fechas de Pachycereeae. Los números asociados indican las edades estimadas con inferencia Bayesiana, las barras indican un intervalo de credibilidad (95% HPD). Como punto de calibración se utilizó la edad de Pachycereeae entre 8 y 10 millones de años.

## VII.V Estimación de tasas de diversificación de todo el grupo y linajes dentro del grupo

Las tasas de diversificación calculadas para la tribu Pachycereeae y para las subtribus Stenocereinae y Pachycereinae basadas en la edad del grupo troncal y el grupo corona derivadas de las edades obtenidas en el programa BEAST1.4 (Drummond y Rambaut, 2007), y la tasa de extinción relativa  $\epsilon=0.0$  y  $\epsilon=0.9$  se muestran en la siguiente tabla.

Clado	# especies	Edad		Tasas de diversificación			
		Crupe troncal	Grupo corona	Grupo troncal $\epsilon=0.0$	Grupo troncal $\epsilon=0.9$	Grupo corona $\epsilon=0.0$	Grupo corona $\epsilon=0.9$
Pachycereeae	175	-	8.52	-	-	0.595	0.380
Stenocereinae	31	5.73	4.29	0.594	0.241	0.638	0.31
Pachycereinae	39	5.73	4.65	0.639	0.273	0.638	0.326
<i>Myrtillocactus</i>	4	3.68	2.81	0.376	0.071	0.245	0.071
<i>Stenocereus</i>	24	3.68	2.39	0.86	0.32	1.03	0.47

De los clados analizados el género *Myrtillocactus* es el que presenta las tasas de diversificación más bajas tanto para el grupo corona (0.245- 0.071 sp/m.a) como para el grupo troncal (0.376-0.071 sp/m.a) y el género *Stenocereus* presenta las tasas más altas para el grupo corona (1.03-0.47 sp/m.a y para el grupo troncal (0.86 sp/m.a) con  $\epsilon=0.00$ . Las tasas de diversificación son mayores en la subtribu Pachycereinae que en Stenocereinae.

Realizamos una gráfica de los linajes a través del tiempo (Figura 13) para

entender el patrón general de diversificación de la tribu, pues tenemos un muestreo que incluye una representación de muchas de las especies del grupo. Podemos observar cómo el número de especies aumenta conforme pasa el tiempo, también se pudo observar que Pachycereae sufrió una aceleración de linajes hace aproximadamente 4 millones de años.

La gráfica de los linajes en el tiempo se construyó a partir de un árbol ultramétrico fechado de Pachycereae muestra el aumento exponencial de linajes. La línea azul es el número de linajes a lo largo del tiempo, la línea negra es la regresión lineal o línea de ajuste, que modeliza la relación entre una variable dependiente y una variable independiente. La correlación. La  $R^2$  de las rectas determinará la calidad del ajuste. Si  $R^2$  es cercano o igual a 1, el ajuste será bueno; si  $R^2$  es cercano o igual a 0, se tratará de un ajuste malo.

### Linajes a través del tiempo

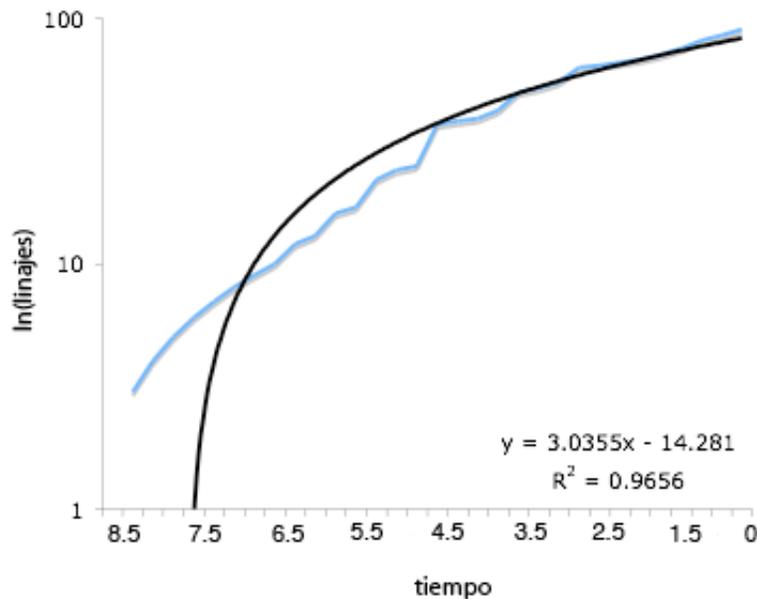


Figura 13. Incremento acumulativo en el logaritmo del número de linajes en la filogenia molecular fechada de Pachycereae. La línea azul es el número de linajes a lo largo del tiempo, la línea negra es la línea de ajuste.

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII.I Muestreo taxonómico de Pachycereeae

Es importante el muestreo en este tipo de estudios, pues se sabe que tiene un efecto tanto en la estimación filogenética, como en la fechación y en el análisis de sus tasas de diversificación (Flores, 2007). En este trabajo no se incluyeron todas las especies de Pachycereeae, debido a que no fue posible conseguirlas, extraer el DNA, amplificarlo, u obtener secuencias de calidad pero sí están representados todos lo género que conforman la tribu. Nuestro interés principal es construir una filogenia lo suficientemente robusta para permitirnos fecharla y obtener las edades de ciertos nodos y también comprobar que existe heterogeneidad de tasas de diversificación dentro de Pachycereeae. Entonces realizamos un muestreo que incluye todos los géneros que conforman la tribu según Anderson (2001). El cual es suficiente para resolver las preguntas que fueron planteadas al principio de la investigación.

### VIII.II Interpretación de la filogenia

Elegimos el intrón del gen de cloroplasto *rpL16* como marcador para la reconstrucción filogenética, debido a que ha sido reportado anteriormente como un marcador que proporciona estimados de las relaciones filogenéticas a nivel de especies en otros grupos de plantas (Downie, 2002) y en cactáceas (Arias et al., 2003; 2005) esto se debe a que como son fragmentos no codificantes, su baja presión de selección incrementa la posibilidad de que tengan una alta tasa

de substitución. También fue elegido debido a que las secuencias de la mayoría de las especies de interés se encontraban disponibles en el GenBank.

Para poder lograr los objetivos de este proyecto fue necesario realizar un estudio filogenético de secuencias del marcador de cloroplasto *rpl16* incluyendo estimaciones de fechas de origen de Pachycereeae y la tasa de diversificación del grupo y de algunos clados dentro de este. Para poder hacer estas inferencias fue necesario contar con una filogenia resuelta, por ello obtuvimos una hipótesis acerca de las relaciones filogenéticas para las secuencias mediante métodos Bayesianos. Así mismo aprovechamos nuestros datos para calibrar un reloj molecular relajado y con él proveer estimaciones nuevas de las fechas de divergencia de la tribu Pachycereeae y de algunos clados dentro de esta.

La tribu Pachycereeae de la subfamilia Cactoideae, ha tenido una amplia diversificación de plantas columnares y arbustivas que han sido objeto de estudios de morfología de la semilla (Barthlott & Hunt 2000; Arias & Terrazas 2004), anatomía sistemática (Gibson & Horak 1978), anatomía del xilema secundario (Gibson 1973; Terrazas 2000; Terrazas & Loza-Cornejo 2003) y sistemática (Gibson et al. 1986; Arreola-Nava 2000; Cornejo y Simpson, 1997; Terrazas & Loza-Cornejo 2002; Wallace 2002; Arias et al., 2003; 2005). Sin embargo, aun se carece de estudios moleculares y anatómicos comparativos de las especies de cada uno de los géneros clasificados en esta tribu en busca de caracteres que apoyen la circunscripción genérica y específica (Terrazas et al., 2002).

A pesar de que utilizamos a Anderson (2001) como parámetro de referencia inicial para delimitar a la tribu Pachycereeeae, la filogenia que estimamos tiene un alta coincidencia con estudios moleculares anteriores que se han realizado en Pachycereeeae (Arias et al, 2003 y 2005). Nosotros vamos a comparar la filogenia estimada en este trabajo con la filogenia obtenida por Arias et al. (2005) y por Cornejo y Simpson (1997).

Aunque la filogenia estimada en este trabajo presenta valores de soporte bajos en algunos nodos, coincide con la filogenia más reciente publicada de Pachycereeeae (Arias et al., 2005) en la formación de las dos subtribus Pachycereinae y Stenocerinae. También coinciden en que el género *Neobuxbaumia* es parafilético y grupo hermano de *Cephalocereus* que forma un grupo monofilético, al igual que *Echinocereus*, estos géneros forman parte de la subtribu Stenocereinae tanto en la filogenia estimada en este trabajo, como en la filogenia de Arias et al. (2005). En ambas filogenias se muestra como *Peniocereus* forma dos grupos con valores altos de soporte cada uno, uno de estos grupos forma parte de la subtribu Pachycereinae y el otro se agrupa como grupo hermano de las dos subtribus que se forman. En la filogenia de Arias et al. (2005) *Acatocereus* y *Peniocereus* son géneros parafiléticos, y son considerados como parte de la tribu Hylocereeeae, y en nuestro trabajo son considerados como Pachycereeeae *sensu* (Anderson 2001) y formando también un grupo parafilético nombrado Grupo APP, este grupo en nuestra filogenia no presenta ninguna especie de hábito columnar.

También coinciden ambas filogenias en que *Acanthocereus* es un género parafilético. Los géneros de hábito columnar y que se distribuyen en México (*Carnegiea*, *Cephalocereus*, *Escontria*, *Myrtillocactus*, *Neobuxbaumia*, *Pchycereus* y *Stenocereus*) se agrupan en ambas filogenias dentro de las subtribus Stenocereinae y Pachycereinae.

La filogenia de Arias et al. (2005) difiere con la nuestra en que en nuestra filogenia *Polaskia chende* y *Polaskia chichipe* forman un grupo monofilético, y *Escontria chiotilla* es su grupo hermano, mientras que en la de Arias et al. (2005) *Polaskia chihipe* y *Escontria chiotilla* forman un grupo monofilético, aunque estas tres especies se forman parte de la subtribu Stenocereinae en las dos filogenias.

Según la filogenia de Arias et al. (2005) la tribu Pachycereeae no es monofilética debido a que especies del género *Peniocereus* se encuentran embebidas dentro de la tribu Hylocereeae. Al igual que algunas especies de los géneros *Acanthocereus* y *Pseudoacanthocereus* se encuentran dentro de la tribu Hylocereeae. La posición filogenética de los géneros *Peniocereus*, *Pseudoacanthocereus* y *Acanthocereus* como miembros de la tribu Hylocereeae (Bravo-Hollis, 1978), Echinocereae (Buxbaum, 1975), o Pachycereeae (Anderson 2001) ha sido muy debatido. (Nyffeler 2003) propone que las tribus *Hylocereeae*, *Pachycereeae* y *Leptocereae* junto con los géneros *Austrocactus* y *Corryocactus* forman un clado monofilético al que nombra *ACHLP*, el cual contiene 25 géneros y 250 especies con hábito predominantemente columnar y trepador y dos diferentes grupos de epífitas (*Pfeiffera* y la tribu Hylocereeae).

La filogenia que obtuvimos coincide con la filogenia morfológica obtenida por B. Cornejo y B. Simpson (1997) coinciden en que ambas recuperan las dos subtribus Pachycereinae y Stenocereinae, en que los géneros como *Cephalocereus*, *Myrtilocactus* y *Polaskia* forman grupos monofiléticos. Sin embargo *Stenocereus* forma un grupo monofilético en la filogenia de Cornejo y Simpson (1997), mientras que en la nuestra es parafilético únicamente porque *Stenocereus aragón* y *S. Eichlamii* forman parte de la subtribu Pachycereinae, esto posiblemente se deba a la falta de señal del marcador que utilizamos para realizar la filogenia o probablemente estas dos especies deben formar un género aparte. El género *Neobuxbaumia* aparece como un grupo parafilético tanto en la filogenia morfológica (Cornejo y Simpson 1997), como en la molecular obtenida en este trabajo. También coinciden ambos trabajos en que *Polaskia chichipe* y *P. Chende* forman un género monofilético, con *Escontria chiotilla* como su grupo hermano y el género *Neobuxbaumia* es parafilético en ambos estudios.

El análisis sugiere que la subtribu Pachycereneae es más tempranamente divergente que Stenocereinae y que el grupo APP es más tempranamente divergente que las dos subtribus. Las diferencias que encontramos con las demás filogenias probablemente se deben al marcador molecular que utilizamos y al método de estimación filogenética que es diferente al de Arias et al (2005), ya que el utilizó Parsimonia y esto puede ocasionar atracción de ramas largas, y también a que el muestreo es diferente por lo que las agrupaciones de las especies se pueden ver afectadas. Por otra parte, aunque los clados más importantes se recuperan en el análisis realizado algunos con valores de apoyo

significativos las relaciones entre todos los linajes dentro de Pachycereeae aún no son claras. Entender las relaciones evolutivas entre los linajes de la tribu sería de gran interés en la interpretación de la evolución de los caracteres que se asocian a la evolución de las formas florales, así como los factores que han conducido estas diferencias al interior del grupo. El muestreo taxonómico tiene un efecto importante en la estimación de las fiogenias (Felsenstein, 1978), es por eso que debe ser re-evaluado, es muy importante considerar si especies de la tribu Hylocereeae cae dentro de Pachycereeae, o considerar a otros autores como Anderson (2001) que proponen a la tribu Hylocereeae fuera de la tribu Pachycereeae y Nyffeler (2002) que propone que la tribu Hylocereeae y Leptocereeae y Pachycereeae y los géneros *Corryocactus* y *Austrocactus* forman un clado llamado *ACHLP*. Es importante también aumentar el número de marcadores para realizar análisis combinados que nos permitan resolver las relaciones de este gran clado. (Nyffeler 2002).

## VIII.IV Estimación de las edades en la filogenia

Utilizamos como punto de calibración para realizar la fechación de Pachycereae la fecha obtenida por Hernández-Henandez et al., 2009 (en prep), para obtener esta fecha utilizó dos fósiles de familias cercanas a Cactaceae, el primero es de la familia Phytolacaceae y es una infrutescencia del Campaniano tardío (72.3-71.3 m.a.) y el segundo fue una calibración de punto de edad mínima en el que utilizó un fósil de una infrutescencia de la familia Caryophyllaceae del Eoceno medio-tardío (40-43m.a.). La edad que obtuvo como fecha de origen para la familia Cactaceae fue 32.2 m.a. con esta fecha obtuvo la fecha de origen del grupo corona de Pachycereae dentro de un intervalo de 1.71-9.93 m.a. Las cactáceas tienen un registro fósil muy pobre y poco confiable, lo cual no nos permite hacer una calibración para el origen de la familia y tampoco dentro de la familia, es por eso que se utilizan puntos de calibración en grupos cercanos a la familia. Nosotros utilizamos la edad más antigua (9 m.a.) puesto que la fecha que obtuvo para la tribu más cercana a Pachycereae (Hylocereae) fue de 5.67-16.33m.a, por lo que suponemos que el origen de la tribu Pachycereae debe ser cercano a el origen de Hylocereae, también este punto de calibración por cuestiones metodológicas y debido a que las fechas que obtuvimos con 2 ma eran muy recientes dentro de la tribu y no coincidían con ningún evento Geológico de diversificación reportado en América del Norte que pudiera haber provocado una diversificación tan rápida.

El cronograma que utilizamos para la fechación en el programa BEAST se calibró utilizando como fecha de diversificación de Pachycereae una distribución normal entre 8 m.a y 10 m.a. para el grupo corona, elegimos una distribución normal pues existe la misma probabilidad de que el origen de la tribu haya ocurrido en cualquier punto de este intervalo. Según el método de fechación que utilizamos en el programa BEAST1.4 (Drummond y Rambaut, 2007), la tribu Pachycereae tiene una fecha estimada de divergencia de grupo corona de 8.52 m.a. La edad de diversificación estimada para el grupo corona de la tribu Pachycereae coincide con un incremento en las condiciones secas en el centro de México, ya que evidencias Geológicas sugieren que hubo actividad volcánica hace 30-15 m.a dando lugar a nuevas zonas secas en el centro de México y a la formación del desierto de Sonora (Good-Ávila et al. 2006), lo anterior sugiere, junto con la gran diversidad morfológica del grupo y el alto número de especies que alberga, que es resultado de una rápida diversificación.

Esto apoya nuestra hipótesis de que la diversificación de Pachycereae es reciente y ocurrió en México. También coincide con un aumento en las tasas de especiación hace aproximadamente 8-10 m.a de *Agave sensu lato* y con el origen del género *Yucca* hace aproximadamente 13-18 m.a. Varios estudios sugieren que las especies de plantas adaptadas a zonas áridas de América han sufrido radiaciones paralelas en los últimos 10 millones de años (Good-Ávila et al. 2006). La diversificación entre la subtribu Pachycerinae y Stenocerinae ocurrió hace 5.73 m.a. La mayoría de las especies de estas dos tribus se

distribuyen en México, únicamente dos especies no se encuentran en el territorio nacional (*Pachycereus lepidanthus* y *P. hirschtianus* que se distribuyen únicamente en Guatemala, *Stenocereus peruvianus*, en Puerto Rico y *S. aragonii* en Costa Rica), la mayoría de las especies que conforman estas dos subtribus son de hábito columnar o candelabriforme. El grupo APP tiene una edad troncal de 7.51 m.a y de grupo corona es de 6.09 m.a. este grupo está conformado por especies que no son de hábito columnar, son más bien plantas trepadoras o arbustivas (*Peniocereus* y *Acanthocerus*) que tienen una amplia distribución en América del Sur, Centro y Norteamérica o columnares enanas (*Echinocereus*) que se distribuyen hasta los lugares más fríos de América del Norte.

Las tasas de diversificación dependen de la riqueza de especies y de la edad del clado; dado un número de especies de un clado, si se le asigna una edad equivocada puede sobreestimar o subestimar las tasas de diversificación (Magallón y Castillo 2009). El muestreo taxonómico tiene un efecto importante en la estimación de las tasas y edades de los clados (Sanderson y Doyle 2001). En lo que se refiere a la estimación de las fechas y sus tasas de diversificación la sensibilidad a un muestreo deficiente varía mucho entre los diferentes métodos, el método Bayesiano tiene una baja sensibilidad al muestreo, pero no a la distancia al punto de calibración (Flores-Abreu 2007).

Debido a que el punto de calibración tiene una influencia directa en las tasas de diversificación es importante re-evaluar la fecha que se utilizó para calibrar el árbol debido a que se utilizó la edad más antigua, en lugar de utilizar esta edad

se debó haber utilizado la media del intervalo obtenido por Hernández-Henandez et al., 2009 (en prep). Otro punto que debe ser re-evaluado en la fechación es que la tribu Pachycereeae según Arias et al. (2005) y Nyffeller (2002) es monofilética por lo que debemos ampliar el muestreo para completar el grupo propuesto por Nyffeleer (2002) *AHPL*.

## VIII.VI Análisis de las tasas de diversificación

La tribu Pachycereeae tiene una diversidad muy alta en número de especies y presenta también mucha diversidad ecológica y morfológica. Tiene un mayor número de especies que si se le compara con otros grupos de cactáceas cercanos a la tribu como por ejemplo: Rhipsalideae, Pereskioideae (Barlhott y Hunt, 1993). También presenta una diversidad mayor en número de especies en comparación con otros cactus de hábito columnar como la tribu Brownigeneae (Barlhott y Hunt, 1993) de América del Sur. La tribu Pachycereeae tiene una alta tasa de diversificación (0.380-0.595sp/m.a.) si se compara con la tasa de diversificación promedio para las Angiospermas (0.077-0.0089sp/m.a.) (Magallón y Sanderson 2001).

Esta tasa coincide con la tasa de diversificación de promedio de *Agave sensu lato* (0.53sp/m.a.), este valor se encuentra dentro del rango observado para géneros de plantas que han sido identificados como grupos que experimentan tasas rápidas en una relativa diversificación reciente (Good-Ávila et al. 2006). La tasa de diversificación de Pachycereeae también está cerca de altas tasas en otros grupos en periodos de radiación elevada como 0.56 sp/m.a.

en Siverword alliance, 0.717-0.832 sp/m.a. en *Gaertera* (arbustos de islas oceánicas) y 0.85sp/m.a. en la radiación en América del Sur de *Gentianella* (Good-Ávila et al. 2006).

Lo anterior, aunado a la edad de origen del clado, nos hace pensar que el alto número de especies de la tribu es resultado de una radiación reciente y no de la acumulación de especies en un largo periodo de tiempo. Entendiendo por radiación una rápida diversificación de especies caracterizada por el incremento en la diversidad morfológica y ecológica de un linaje (Linder, 2008)

Las tasas de diversificación no son constantes dentro de la tribu por ejemplo la tasa de diversificación para el género *Myrtillocactus* es (0.245- 0.071 sp/m.a) para el grupo corona y para el grupo troncal (0.376-0.071 sp/m.a.), mientras que para el género *Stenocereus* es para el grupo corona (0.47-1.03 sp/m.a) y para el grupo troncal (0.32-0.86 sp/ m.a).

La gráfica de linajes a través del tiempo provee aproximaciones a las tasas de diversificación y puede ser instructivo en un marco compartivo (Ricklefs, 2007). En la gráfica de linajes a través del tiempo de la tribu Pachycereeae observamos que si existe una fuerte correlación entre el tiempo y el aumento de los linajes de la tribu, ya que  $R^2$  tiene un valor muy cercano a 1 (0.9656).

También observamos cambios en las tasas de diversificación como variaciones en la pendiente de la curva en distintos tiempos, por ejemplo, se pudo observar que Pachyereae sufrió una aceleración de linajes hace aproximadamente 4.5 millones de años y que probablemente se relacione con la

aparición de el género *Stenocereus* que tiene una tasa de diversificación muy alta y un gran número de especies esto coincide con que hace aproximadamente 5.3-1.8m.a. el clima en México comenzó a ser más húmedo y tropical, seguido de una glaciación que hizo en la cual el clima se hizo más seco y frío durante este periodo, esto pudo haber favorecido haber aumentado la diversificación del grupo en esa época (Good-Ávila et al. 2006). Esto nos demuestra que no solo existe heterogeneidad de tasas de diversificación entre los clados internos de Pachycereeae, sino que también a lo largo del tiempo.

Es importante re-evaluar la fecha de origen que asignamos a la tribu Pachycereeae y la calidad del muestreo puesto que como ya he mencionado anteriormente la fecha asignada a un clado influye directamente en las tasas obtenidas

En estudio posteriores evaluaremos si durante la evolución de Pachycereeae han existido incrementos significativos en la tasa de sustitución para poder correlacionarlas con el surgimiento de algún carácter, con características ecológicas o con el surgimiento de algún grupo con el que tenga alguna interacción importante, podrían ser en este caso murciélagos polinizadores.

## IX. CONCLUSIONES

Según el método de fechación que utilizamos en el programa BEAST1.4 (Drummond y Rambaut, 2007) la tribu Pachycereeeae tiene una edad de grupo corona de 8.52 m.a., es un clado que se originó recientemente.

Lo anterior sugiere junto con la gran diversidad morfológica y el alto número de especies, que es resultado de una radiación que ocurrió en México, ya que coincide con el aumento de zonas áridas en México hace aproximadamente 10 a 30 m.a. y también debido a que los ancestros de Pachycereeeae presuntamente emigraron hacia el norte, llegando hasta México, en donde se establecieron, y por las condiciones ecológicas, climáticas, edafológicas, fisiográficas, bióticas, genéticas, etc, se diversificaron formando la diversidad actual. Gibson y Nobel (1986) postularon que la radiación de Pachycereeeae ocurrió en México y que las especies con los caracteres plesiomórficos están localizadas en el sur de México, específicamente en el Valle de Tehuacán–Cuicatlán, este postulado coincide con que en México ocurrió un proceso de desertificación que favoreció la diversificación de la tribu.

La tasa de diversificación asignada al grupo corona de la Tribu Pachycereeeae es (0.380-0.595), es una tasa muy alta si se le compara con la tasa promedio obtenida para las angiospermas y con otros grupos dentro de las angiospermas tanto de zonas áridas como de otros climas.

Los resultados de las tasas de diversificación de algunos clados de Pachycereeeae muestran que la tasa de diversificación no es constante dentro de la tribu ni en el tiempo. Para saber porque presentan diferentes tasas de

diversificación es necesario realizar estudios subsecuentes para encontrar las variables que están afectando las tasas de diversificación dentro de la tribu Pachycereae, como por ejemplo el ciclo de vida de los organismos y la magnitud de la tasa de extinción, entre otros factores.

inferidas no sean de los taxa sino de las copias. (Álvarez y Wendel, 2003).

Se requiere un mayor número de secuencias de especies de la tribu Pachycereae y también un mayor número de marcadores para obtener una filogenia más completa y con mayor resolución, para lo cual pueden ser utilizado los ejemplares depositados en el MEXU que hayan sido recolectados recientemente o en su defecto realizar colectas en el campo.

## X. REFERENCIAS

- Álvarez, I. y J. F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogeny and Evolution*. 29: 417-434
- Anderson, E. F. 2001. The cactus family. Portland Timber Press, Oregon, EUA.
- Arias, S., et al.,. 2003. Phylogenetic analysis of *Pachycereus* (Cactaceae, Pachycereeae) based on Chloroplast and Nuclear DNA Sequences. *Systematic Botany* 28 (3) pp547-557
- Arias, S., et al 2005. Phylogenetic Relationships in *Peniocereus* (Cactaceae) Inferred from Plastid DNA Sequence Data. *Journal of Plant Research* 118: 317-328
- Bailey, D., et al. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29 (2003) 435-455.
- Barbier, E. B. 1997. Ecológica economics, uncertainty and implications for policy setting priorities for diversity conservation. In Investing in Biological Diversity: The Cairns Conference. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris. Pp 115-140
- Barraclough, T. G. et al. 1996. Rate of rbcL sequence evolution and species diversification in flowering plants (angiosperms). *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 263: 589-591
- Barraclough, T. G., et al. 1998. Revealing the factors that promote speciation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B* 353: 241-240
- Barraclough, T. G. & S. Nee 2001. Phylogenetics and Speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 391-399

- Barthlott, W. & D. R. Hunt. 1993. Cactaceae. *In* K. Kubitski [ed.], The Families and genera of vascular plants, 161-197. Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania
- Beerli, P. 2006. Comparasion of Bayesian and maximum-likelihood infeence of population genetic parameters. *Bioinformatics* Vol. 22 no. 3 pp 341-345
- Blackmore, S. & E. Tootill. 1984. The Penguin Dictionary of Botany. Penguin Books LTD. Harmondsworth, Middlesex, Inglaterra
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las Cactáceas de México. Volumen I. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Bravo-Hollis, H., et al. 1999. El Interesante Mundo de las Cactáceas. Fondo de Cultura Económica. México.
- Britton, N. L. & J. N. Rose 1963 The Cactaceae. Vol 1 y 2. Dover Publications Inc. EUA
- Buckler, E. S. y T. P. Holtsford. 1996. *Zea* systematics: Ribosomal *ITS* evidence.23 *Molecular Biology*. 13: 612-622
- Bustamante, E. & A. Búrquez. 2005. Fenologia y biologia reproductiva de cactáceas columnares. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 50(3): 68-88
- Chan, K. M.A. & B. R. Moore. 2005. SymmeTREE: whole-tree análisis of differential diversification rates. *Bioinformatics*. Vol. 21 no.8 pp 1709-1710
- Cornejo, D. O. & B. B. Simpson 1997. Análisis of Form and Function in North American Columnar Cacti (tribe Pachycereeae). *American Journal of Botany* 84(11): 1482-1501
- Cota, J. H. 1997. Chloroplast DNA Evidence for Divergence in Ferocactus and its Relationships to North American Columnar Cacti (Cactaceae: Cactoideae). *Systematic Botany* 22(3): pp 529-542.

- Creepet, W. L. y k. Niklas. 2009. Darwin's second "abominable mystery": Why are there so many angiosperms species? *American Journal of Botany*. 96(1): 366-381
- Crick, F. 1979. Split genes and RNA splicing. *Science*. Vol 204:264-271
- Downie, S. R., et al. 2000. A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA rpl16 and rpoC1 intron sequences: towards a supergeneric classification of subfamily Apioideae. *American Journal of Botany* 87(2): 373-292.
- Doyle, J. J. & B. S. Gaut. 2000. *Plant Molecular Evolution*. Kluwer Academic Publishers. EUA.
- Drummond, A.J. y A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*.7:214.
- Drummond, A.J., Ho S. Phillips M, Rambaut A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 2006, 4:e88
- Drummond, A.J. et al.; 2007. A rough guide to BEAST1.4. Department of computer science. The University Auckland, New Zealand.
- Durante, G., et al. 2007. Sequencing of the ribosomal protein gene rpl16 from 'Candidatus Phytoplasma ulmi' infecting a historic *Ulmus minor*. *Bulletin of Insectology*. 60 (2) 361-362
- Edgar, R. C. 2004, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97.
- Egan, A. N. y K. A. Crandall. 2008. Divergence and diversification in North American Psoraleeae (Fabaceae) due to climate change. *BMC Biology*. 6:55 doi:10.1186/1741-7007-6-55.

- Endress, P. K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical Flowers. Press Syndicate of the University of Cambridge. Cambridge, Reino Unido.
- Erika J. Edwards et al., 2005 Basal Cactus Phylogeny: implications of Pereskia (Cactaceae) Paraphyly For The Transition For The Cactus Life Form. *American Journal of Botany* 92(7): 1177-1188.
- Faegr, K. y L. van der Pijl. 1979. The principles of pollination ecology. 3ª ed. Pergamon, Oxford.
- Felstenstein J. 1978. Cases in wich parsimony or compatibility methods will be posively misleading. *Systematic Zoology* 27:401-410
- Fleming, T. H. y A. Valiente-Banuet. 2002. Columnar Cati and Their Mutualists Evolution, Ecology and Conservation. The University of Arizona Press. EUA.
- Fleming T. H. et al. 2001. Sonoran Desert Columnar Cacti and the Evolution of Generalized Pollination Systems. *Ecological Monographs*. 71(4) pp. 511-530
- Flores-Abreu I. N. 2007. Coevolución entre *Agave sensu lato* y sus murcielagos polinizadores (Phyllostomidae). Tesis de Maestría. UNAM. D.F. México.
- Futuyma D. J. 1998. Evolutionary Biology. 3ª ed. Sinauer. EUA
- Gibson A. C. 1982. Phylogenetic Relationships of Pachycereae. In *Ecological Genetics and Evolution*. Sydney Academic Press EUA.
- Gibson A. C. y K. E. Horak. 1978. Systematic Anatomy and Phylogeny of Mexican Columnar Cacti. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65: 999-1057.
- Gibson A. C. y P. S. Nobel. 1986. The Cactus Primer. Harvard University Press. EUA.
- Godínez-Álvarez, H. et al. 2002. The role of seed dispersers in the population dynamics of the columnar cactus *Neobuxbaumia tetetzo*. *Ecology*, 83(9), pp 2617-1629.

- Good-Avila S. V., V. Sousa, B. Gaut y L. Eguiarte. 2006. Timing and rate of speciation in Agave (*Agavaceae*). *PNAS* vol. 103 no. 24
- Harpke D. y A. Peterson. 2006. Non-concerted evolution in *Mammillaria* (Cactaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41(2006)579-593.
- Hernández H. T. 2005. Evolución molecular de genes MADS-Box tipo B y su papel en origen y la evolución del desarrollo floral. Tesis de Maestría. UNAM.D.F. México.
- Hershkovitz, M.A. y Zimmer, E.A. (1997) "On the evolutionary origins of the cacti" *Taxon*, 46, 217-232.
- Higgs P. G. y T. K. Attwood. 2005. Bioinformatics and Molecular Evolution. Blackwell Publishing. EUA
- Holder M. y P. O. Lewis. 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews*. (4) 275-284.
- Huelsenbeck, J. P y F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of filogenetic trees. *Bioinformatics*. 17: 745-755.º
- Hunt, D. R. 1999. CITES. Cactaceae checklist. 2º ed. Milborne Port: Royal Botanical Gardens and International Organization for Succulent Plant Study. Reino Unido.
- Hunt, D., et al. 2006 The New Cactus Lexicon. D. H Books. Inglaterra.
- Kendall, D. G. 1948. On the generalized "birth-death" proces. *Annals of Mathematical Statistics*. 19: 1-15.
- Kimura M. 1969. The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 63, No. 4, pp. 1181-1188

- Kita, Y y M. Ito. 2000. Nuclear ribosomal ITS sequences and phylogeny in East Asian *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae), with special reference to extensive polymorphisms in individual plants. *Plant Systematics and Evolution*. 225:1-3.
- Lewis O. P. 1998. Maximum Likelihood as an alternative to Parsimony for inferring phylogeny using nucleotide sequence data. In Soltis P. Soltis D and Doyle J. eds. *Molecular Systematics in Plants*. Pp. 132-163. Kluwer Academic, Boston, EUA.
- Linder, H. P. 2008. Plant species radiations: where, when, why? *Philosophical Transactions of the Royal Society* 363, 3097-3105
- Magallón, S. y M. J. Sanderson. 2001. Absolute Diversification Rates in Angiosperm Clades. *Evolution*. 55(9) pp1762-1780.
- Magallón, S. 2004. Dating Lineages: Molecular and Paleontological Approaches to the Temporal Framework of Clades. *International Journal of Plant Science*. 165(4 Suppl.):S7-21.
- Magallón, S. y A. Castillo. 2009. Angiosperms diversification through time. *American Journal of Botany*. 96(1): 1-17.
- Mandujano, M. C. et al. 2001. Integration of demographic annual variability in a clonal desert cactus. *Ecology*. 82(2), 2001 pp 344-359.
- Mauseth J. D. 1993. Medullary bundles and the evolution of cacti. *American Journal of Botany* 80(8) 928-932.
- Mauseth J. D. 1995. Collapse water-strong cells in cacti. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 122(2)145-151.

- Nee, S. et al. 1992. Tempo and mode of evolution revealed from molecular phylogenies  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of  
America, 89(17):8322–8326.
- Nee, S., Mooers, A. Ø., and P. H. Harvey. 1992. Tempo and mode of evolution revealed  
from molecular phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences  
of the United States of America*, 89(17):8322–8326.
- Nee, S. et al. 1994. Extinction rates can be estimated from molecular phylogenies.  
Philosophical transactions of the Royal Society of London. B 344, 77-82
- Nee, S. 2006. Birth-Death Models in Macroevolution. *The Annual Review of Ecology,  
Evolution and Systematics*. 37:1-17
- Nicolson, S. W., et al. 2007. Nectaries and Nectar.  
Springer. Holanda.
- Nobel, P. S. 2002. *Cacti Biology and Uses*. University of California Press, Berkeley,  
California, EUA.
- Nyffleler, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on  
evidence from *TRNK/ MATK* and *TRNL-TRNF* sequences. *American Journal of  
Botany* 89(2): 312-326.
- Posada, D y K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution.  
*Bionformatics*. 14(9): 817-818.
- Posada, D y K. A. Crandall. 2001. Selecting the Best-Fit Model of Nucleotide  
Substitution. *Systematic Biology*. 50(4):580-601

- Posada, D y T. R. Burckley. 2004. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Test. *Systematic Biology*. 55(5):793-808.
- Rojas-Piña, V. 2008. Reconstrucción filogenética del clado Beaucarnea-Calibanus (RUSCACEAE) basada en secuencias ITS del rDNA y un estudio M.E.B. sobre adaptaciones foliares asociadas a la pérdida de agua. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Rambaut, A. 2002. *Se-AI* sequence alignment editor, v2.0a11. Department of Zoology, University of Oxford, Oxford.
- Rambaut, A . <http://tree.bio.ed.ac.uk/>
- Rambaut, A y A. J. Drummond. 2002-2008. TreeAnnotator v1.4.8. MCMC output análisis. Institute of Evolutionary Biology. Edimburg. Scotland.
- Rambaut, A y A. J. Drummond. 2003. Tracer (computer program) <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software/2003>
- Ricklefs R. E., et al. 2007. Evolutionary diversification of clades of squamate reptiles. *J. EVOL. BIOL.* 20 1751-1762.
- Sanderson, J. M. 2003. r8s: Inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of molecular clock. *Bioinformatics*. 19(2) 301-302
- Sanderson, J. M. 2004. r8s, version 1.70. Section of Evolution and Ecology, University of California, Davis, USA.

- Sanderson, J. M. y J. J. Doyle. 1992. Reconstruction of organismal evolution, homoplasy, and confidence. *Systematic Biology*. In press.
- Sanderson, J. M. y J. J. Doyle. 2001. Sources of error and confidence intervals in estimating the age of angiosperms from rbcL and 18S rDNA data. *American Journal of Botany* 88:1499-1516.
- Schnabel, A. y J. F. Wendel. 1998. Cladistic biogeography of *Gleditsia* (Leguminosae) based on ndhF and rpl16 chloroplast gene sequences. *American Journal of Botany* 85(12): 1753-1765
- Schluter, D. (2000). *The Ecology of Adaptive Radiation*. Oxford University Press.
- Schumann, K. 1902. *Gesamtbeschreibung der Kakteen*. J. Neumann, Neudamm.
- Singh, G. 2004. *Plant Systematics An integrated Approach*. Science Publishers, Inc. EUA.
- Sikes, D. S. y P. O. Lewis. 2001. Software manual of PAUPRat: A tool to implement Parsimony Ratchet searches using PAUP. Department of Ecology and Evolutionary Biology. University of Connecticut. EUA.
- Swofford, D. 2002. PAUP\*. *Phylogenetic analysis using Parsimony (\*and other methods*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, EUA.
- Soltis, D. & P. Soltis. 2003. The Role of Phylogenetics in Comparative Genetics. *Plant Physiology*. Vol. 132, pp. 1790- 1800
- Stevens, P. F. (2001) *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 9, June 2008.  
[www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/).
- Tcherkez G. 2004. *Flowers: evolution of the floral architecture of angiosperms*. Enfield, NH. Science. EUA.

- Terrazas, T. y S. Loza-Cornejo. 2002. Phylogenetic relationships of Pachycereeae: a cladistic analysis based on anatomical-morphological data. In: Evolution, ecology and conservation of the columnar cacti and their mutualists (Fleming, T.H. & A. Valiente-Banuet, eds.), pp. 66-86. Arizona Univ. Press, Arizona.
- Terrazas, T., Loza-Cornejo, S. y Arreola-Nava, H. J. 2005. Anatomía caulinar de las especies del género *Stenocereus* (Cactaceae). *Acta Bot. Venez.*, vol.28, no.2, p.321-336.
- The Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141 399-436
- Van Devender, T.R., et al. 1990. Late Quaternary vegetation and climate of the Sonoran Desert, United States and México in Packrat middens. The last 40000 years of Biotic changes. University of Arizona Press. EUA,
- Valiente-Banuet A., et al. 1996. Ecological Relationships Between Columnar Cacti and Nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 12:103-119
- Valiente-Banuet A. 1997 Pollination Biology of the Columnar Cacti (*Neobuxbaumia mezcalensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, Central México. *American Journal of Botany* 84(4): 452-455.
- Van der Pijil.1936. Fledermaus and Blumen Flora 11:1-40
- Villaseñor, J.L. (2003) Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *INTERCIENCIA*, 28(3):160-166.

- Veech, J. A. 2003. Incorporating socioeconomic factors into the analysis of biodiversity hotspots. *Applied Geography* 23 73-88
- Wallace R. S. 2002. The Phylogeny and Systematics of Columnar Cacti: An Overview. In *Columnar Cacti and Their Mutualists Evolution, Ecology and Conservation*. Pp 43-62 The University of Arizona Press. E.U.A.
- Welch, J. J. & L. Bromham. 2005. Molecular Dating When Rates Vary. *Trends in Ecology and Evolution*. Vol. 20 No.6 320-327
- Wikström N. et al. 2001. Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *The Royal Society London. B* (2001) 268, 2211-2220.
- Wiley, E. O. 1981. Phylogenetics: The theory and practice of phylogenetic systematics. Wiley- Interscience publication. E.U.A.
- White, T. J., et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California. EUA.
- Wong, D. H-J. 2007 An exploration of models of diversification and the tempo of diversification using lineages through time plots. Thesis from The University of New Brunswick.
- Wright, S. I. & B. S. Gaut. 2005. Molecular Population Genetics and the Search for Adaptive Evolution in Plants. *Molecular Biology and Evolution* 22(3):506-519.
- Zhang, W. 2000. Phylogeny of the Grass Family Poaceae from rpl16 Intron Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 15(1)135-146

Zwickl, D. J., 2006. Genetic Algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation. The University of Texas at Austin.

## XI. ANEXOS

### Registro de colectas de los individuos examinados

<b>Tabla. Especies de Pachycereae colectadas en el campo.</b>		
<b>Género y especie</b>	<b>Datos de colecta</b>	<b>Ejemplares aptados al MEXU</b>
<b>Cephalocereus totolapensis</b>	Tania	
<b><i>Myrtillocactus cochal</i></b>	J.B. UNAM.	
<b><i>M. eichlamii</i></b>	Juan Carlos Gt	
<b><i>Neobuxbaumia laui</i></b>	Loc: Oax, Santiago Nuyoo, Tierra Azul sobre laderas de roca volcánica. Coord. 16° 59'08''N 97°45'08''E Elev. 1492m.s.n.m.	Ejemplar donado a la colección viva del J.B
<b><i>N. squamulosa</i></b>	Loc: Colima, Carr. libre 110 Mansanillo-Colima, entre Armería y Colima, al sur de la Yesera de Colima S.A de C.V. Coord: 19°04'33''N 103°46'24''O Elev: 478ms.n.m.	Si
<b><i>Polaskia chichipe</i></b>	J.B. UNAM.	
<b><i>S. quvedonis</i></b>	Rosalinda	Sí
<b>Grupo externo</b>		
<b><i>Rhipsalis baccifera</i></b>	Pedir DATOS D COLECTA a TANIA	Sí

<b>Tabla . Secuencias de rpl16, ITS1 e ITS2 obtenidas en el GenBank</b>				
<b>Género y especie</b>	<b>rpl16</b>	<b>ITS 1</b>	<b>ITS 2</b>	<b>Distribución</b>
<i>Acanthocereus chiapensis</i>	DQ099985			MX (Chis)
<i>A. griseus</i>	DQ099986			MX (Chis)
<i>A. horridus</i>	DQ099987			Gt
<i>A. occidentalis</i>	DQ099988			Mx (Chis)
<i>A. occidentalis</i>	DQ099989			Mx (N.L.)
<i>A. tetragonus</i>	DQ099990			Mx (Ver)
<i>A. tetragonus</i>	DQ099991			Mx (Ver)
<i>Bergerocactus emoryi</i>	DQ099994			Mx (Baja Cal.)
<i>Carnegiea gigantea</i>	AY181591	AY181566	AY181566	US(Az) MX( Son)
<i>Cephalocereus apicicephalium</i>	DQ099996			MX (Oax)
<i>C. columna-trajani</i>	AY181599	AY181565	AY181565	Mx (Oax, Pue)
<i>C. nizandensis</i>	DQ099997			MX (Oax)
<i>C. senilis</i>	AY181616	AY181585	AY181585	Mx(Hgo, Ver)
<i>Echinocereus enneacanthus</i>	DQ100000			Mx (N.L.)
<i>E. leucanthus</i>	DQ100001			Mx (Son)
<i>E. parkeri</i>	DQ100002			Mx (N.L.)
<i>E. pectinatus</i>	DQ100003			Mx (San Luis P.)
<i>E. poselgeri</i>	DQ100004			Mx (N.L.)
<i>E. schmollii</i>	DQ100005			Mx (Quér)
<i>E. triglochidiathus</i>	DQ100006			US ( New Mex.)
<i>Escontria chiotilla</i>	AY181608	AY181576	AY181576	MX(Gro, Mich, Oax, pue)
<i>Leptocereus quadricostatus</i>	DQ100011			PR (Cabo Rojo)
<i>Myrtillocactus cochal</i>				
<i>M. eichlamii</i>				
<i>M. geometrizzans</i>	DQ100012			Mx (Quér)
<i>M. schenckii</i>	AY181607	AY181574	AY181574	Mx(Pue, Oax)
<i>Neobuxbaumia euphorbioides</i>	AY181595	AY181562	AY181562	Mx(SLP, Tamps, Ver)
<i>N. laui</i>				
<i>N. macrocephala</i>	DQ100013			Mx (Pue)
<i>N. mezcalsensis</i>	AY181600	AY181567	AY181567	Mx(gro, Jal, Mich, Mor, Oax, Pue)
<i>N. multiareolata</i>	AY181594	AY181561	AY181561	MX(Gro)
<i>N. polylopha</i>	AY181597	AY181564	AY181564	Mx(Gto, Hgo, Qro, SLP)
<i>N. scoparia</i>	AY181596	AY181563	AY181563	Mx (Oax, Ver)
<i>N. squamulosa</i>				
<i>N. tetetzo</i>	AY181592	AY181559	AY181559	Mx (Oax, Pue)
<i>Pachycereus fulviceps</i>	AY181602	AY181569	AY181569	Mx (Oax, Pue)
<i>P. grandis</i>	AY181605	AY181572	AY181572	Mx(Mex, Mich, Mor, Pue, Oax)
<i>P. gaumeri</i>	AY181606	AY181573	AY181573	Mx(Chis, Ver, Yuc)
<i>P. gatesii</i>	AY181601			Mx (BCS Isla Margarita)
<i>P. hollianus</i>	AY181603	AY181570	AY181570	Mx(Oax, Pue)
<i>P. lepidanthus</i>	AY181598	AY181575	AY181575	Guatemala
<i>P. marginatus</i>	AY181618	AY181587 AF328665	AY181587 AF328665	Mx(Gro, Gto, Hgo, Jal, Mex, Mich, Mor, Oax, Pue, Qro, SLP, Zac)
<i>P. militaris</i>	AY181609	AY015308	AY015308	Mx(Gro, Mich, Jal)
<i>Backebergia miitaris</i>	AY161609			Mx (Mich)
		AY181583	AY181583	Mx(BCS, Chih, Chis, Jal,
<i>P. pecten-aboriginium</i>	AY181615	AY181583 AF328669	AY181583 AF328669	Mx(BCS, Chih, Chis, Jal, Mich, Gro, Nay, Oax, Sin, Son)

<i>P. pringlei</i>	<a href="#">AY181589</a>	<a href="#">AY181584</a>	<a href="#">AY181584</a>	Mx (BC,BCS, Son)
<i>P. shottii</i>	<a href="#">AY181613</a>			Mx (BCS)
<i>P. tepamo</i>	<a href="#">AY181593</a>	<a href="#">AY181560</a>	<a href="#">AY181560</a>	Mx (Mich)
<i>P. weberi</i>	<a href="#">AY181614</a>	<a href="#">AY181582</a> <a href="#">AF328666</a>	<a href="#">AY181582</a> <a href="#">AF328666</a>	Mx(Gro, Mor, Oax, Pue)
<i>Peniocereus castellae</i>	<a href="#">DQ100014</a>			Mx (Jal)
<i>P. cuixmalensis</i>	<a href="#">DQ100015</a>			Mx (Jal)
<i>P. fosterianus</i>	<a href="#">DQ100016</a>			Mx (Oax)
<i>P. greggii</i> subsp. <i>greggi</i>	<a href="#">DQ100017</a>			Mx (Coah)
<i>P.greggii</i>	<a href="#">DQ100018</a>			US (Arizona)
<i>P. hirschtianus</i>	<a href="#">DQ100019</a>			Gt (Progreso)
<i>P. jhonsonii</i>	<a href="#">DQ100020</a>			Mx (BCS)
<i>P. lazaro-cardenasii</i>	<a href="#">DQ100021</a>			Mx(Mich)
<i>P. macdougallii</i>	<a href="#">DQ100022</a>			Mx (Oax)
<i>P. maculatus</i>	<a href="#">DQ100023</a>			Mx (Guer)
<i>P. marianus</i>	<a href="#">DQ100024</a>			Mx(Sin)
<i>P. marnieranus</i>	<a href="#">DQ100025</a>			Cult.
<i>P. oaxacensis</i>	<a href="#">DQ100026</a>			Mx (Oax)
<i>P.rosei</i>	<a href="#">DQ100027</a>			Mx(Sin)
<i>P. serpentinus</i>	<a href="#">DQ100028</a>			Mx (Oax)
<i>P. sp</i>	<a href="#">DQ100029</a>			Mx(Chis)
<i>P. striatus</i>	<a href="#">DQ100030</a>			Mx (Son)
<i>P. tepalcatepecanus</i>	<a href="#">DQ100031</a>			Mx(Mich)
<i>P.viperinus</i>	<a href="#">DQ100032</a>			Mx (Pue)
<i>P. zopilotensis</i>	<a href="#">DQ100033</a>			Mx (Guer)
<i>Polaskia chende</i>	<a href="#">DQ100034</a>			J.B UNAM
<i>P. chichipe</i>	<a href="#">DQ100035</a>			Mx (Pue)
<i>Pseudoacanthocereus brasiliensis</i>	<a href="#">DQ100036</a>			Cult
<i>P. sicariguensis</i>	<a href="#">DQ100037</a>			Cult.
<i>Stenocereus alamosensis</i>	<a href="#">DQ100041</a>			Mx (Son)
<i>S. aragonii</i>	<a href="#">AY181611</a>	<a href="#">AY181579</a>	<a href="#">AY181579</a>	CR(Guanacaste, Puntarenas)
<i>S. beneckeii</i>	<a href="#">DQ100042</a>			Mx (Guer)
<i>S. chacalapensis</i>	<a href="#">DQ100043</a>			Mx (Oax)
<i>S. chrysocarpus</i>	<a href="#">AY181617</a>	<a href="#">AY181586</a>	<a href="#">AY181586</a>	Mx(Mich)
<i>S. eichlamii</i>	<a href="#">AY181610</a>	<a href="#">AY181578</a>	<a href="#">AY181578</a>	Mx(Chis, Yuc), GT(El Progreso), Hn(Yoro),ES(Sonsonate), NC(Esteli)
<i>S. fricci</i>	<a href="#">AY181612</a>	<a href="#">AY181580</a>	<a href="#">AY181580</a>	Mx(Col, Jal, Mich)
<i>S. griseus</i>	<a href="#">DQ100044</a>			Mx (Ver)
<i>S. gummosus</i>	<a href="#">DQ100045</a>			Mx (BCS)
<i>S. kerberi</i>	<a href="#">DQ100047</a>			Mx(Sin)
<i>S. martinezii</i>	<a href="#">AY181604</a>	<a href="#">AY181571</a>	<a href="#">AY181571</a>	Mx(Sin)
<i>S. montanus</i>	<a href="#">DQ100048</a>			Mx (Son)
<i>S. peruvianus</i>	<a href="#">DQ100046</a>			PR cult
<i>S. pruinosus</i>	<a href="#">DQ100049</a>			Mx (Quér)
<i>S. queretaroensis</i>	<a href="#">DQ100050</a>			Mx (Quér)
<i>S. standleyi</i>	<a href="#">DQ100051</a>			Mx (Jal)
<i>S. stellatus</i>	<a href="#">AY181590</a>			Mx (Pue)
<i>S. thurberi</i>	<a href="#">DQ100052</a>			Mx(BC,BCS,Sin,Son) US(Az)
<i>S. trelasei</i>	<a href="#">DQ102362</a>			Mx (Oax)
<b>Gtupo Externo</b>				
<i>Calymmanthium substerile</i>	<a href="#">DQ099995</a>			Cult.