



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

**DISTRIBUCION ECOLÓGICA DEL SUBGÉNERO
Neodawsonia Backeb. DEL GÉNERO *Cephalocereus* Pfeiff.
(CACTACEAE), EN EL ISTMO DE TEHUANTEPEC, MÉXICO**

MARÍA LUISA BÁRCENAS ARGÜELLO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE :

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

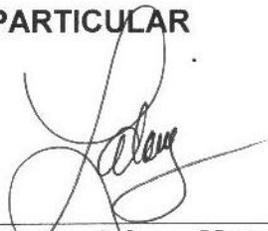
2011

La presente tesis titulada: *Distribución ecológica del subgénero Neodawsonia Backeb. del género Cephalocereus Pfeiff., Cactaceae, en el Istmo de Tehuantepec, México, realizada por la alumna: María Luisa Bárcenas Argüello* bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
BOTÁNICA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



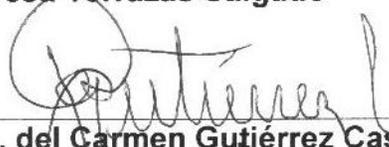
Dr. Lauro López Mata

DIRECTORA DE TESIS



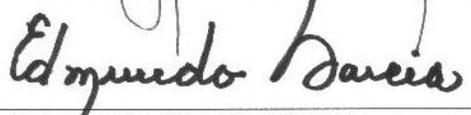
Dra. Teresa Terrazas Salgado

ASESORA



Dra. Ma. del Carmen Gutiérrez Castorena

ASESOR



Dr. Edmundo García Moya

ASESOR



Dr. Salvador Arias Montes

ASESORA



Dra. Mónica de la Cruz Vargas Mendoza

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2011

**DISTRIBUCIÓN ECOLÓGICA DEL SUBGÉNERO *Neodawsonia* Backeb. DEL
GÉNERO *Cephalocereus* Pfeiff., CACTACEAE, EN EL ISTMO DE
TEHUANTEPEC, MÉXICO.**

María Luisa Bárcenas-Argüello, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2011

Resumen

Cephalocereus es un género monofilético, cuya distribución es alopátrica y está restringida a la Barranca de Metztitlán (*C. senilis*), al Valle de Tehuacán-Cuicatlán (*C. columna-trajani*) y a la cuenca del río Tehuantepec (subgénero *Neodawsonia*, *C. apicicephalium*, *C. nizandensis*, *C. totolapensis*). Se desconoce qué factores condicionan este patrón de distribución endémico. El objetivo de este trabajo fue el proponer una hipótesis que explique el endemismo de sus especies, a partir de relaciones específicas entre la fisiología de los oxalatos de calcio y las propiedades de las rocas y de los suelos en los que habitan. En cada población se tomaron muestras del material parental (roca) del suelo, se removi6 tejido vegetal y se recolectaron semillas; estas muestras fueron analizadas con diferentes técnicas de microscopia, análisis físico-químicos y rayos X. La distribución de las especies del subgénero *Neodawsonia* está restringida por el tipo del material parental (roca) y el ambiente edáfico (suelo) con bajo contenido de calcio soluble. Las especies acumulan weddellita en dos estados de hidratación altamente polimórfica, que se sintetiza a partir de los siete días de edad. El rápido proceso de germinación (24 horas) y la acumulación temprana de cristales podrían ser respuestas de supervivencia. El análisis de parsimonia reveló que el ancestro de *Cephalocereus* habitaba a menos de 1,370 metros de altitud, con temperatura máxima de 32 °C y precipitación mínima de 17 mm. La evolución *in situ* de cada una de las especies de *Cephalocereus* se relacionó a condiciones del material parental y del suelo *sui generis* (edáficas particulares) que permiten explicar su endemismo.

Palabras clave: Endemismo, Material Parental, Oxalato de calcio, Germinación, Filogenia.

ECOLOGICAL DISTRIBUTION OF *Neodawsonia* Backeb. (*Cephalocereus* Pfeiff., CACTACEAE), IN THE ISTHMUS OF TEHUANTEPEC, MEXICO.

María Luisa Bárcenas-Argüello, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2011

Abstract

Cephalocereus is a monophyletic genus, whose distribution is allopatric and restricted to Metztitlán Canyon (*C. senilis*), Tehuacán-Cuicatlán valley (*C. columna-trajani*), and Tehuantepec River basin (subgenus *Neodawsonia*, *C. apicicephalum*, *C. nizandensis*, *C. totolapensis*). It is not known what factors determine this distribution pattern of endemism. The aim of this study was to propose a hypothesis to explain the endemism of their species, based on specific relationships between the physiology of calcium oxalate and the properties of rocks and soils in which they live. In each population parent material (rock) soil was sampled, plant tissue was removed, and seeds were collected. Those samples were analyzed with various microscopy techniques, physico-chemical analysis and X-rays. The distribution of the subgenus *Neodawsonia* is restricted by the type of parent material (rock) and the soil environment (soil) with low content of soluble calcium. The species accumulated weddellite in two highly polymorphic states of hydration, which is synthesized from seven days old. The rapid process of germination (24 hours) and the early accumulation of crystals could be both a survival response. The parsimony analysis revealed that *Cephalocereus* ancestor lived in an elevation less than 1,370 meters, 32 °C of maximum temperature, and 17 mm of low rainfall. *In situ* evolution of each species of *Cephalocereus* was related to the parental material and soil *sui generis* which allow to explaining their endemism.

Keywords: Endemism, Parent material, Calcium oxalate, Germination, Phylogeny

Ad majorem Dei gloriam

**“Mamá,
¿qué haces cuando me quedo
horas extra en la guardería?”**

Andrea Yunuén, 4 años

**Mi niña,
deseo que esta tesis sea
una respuesta satisfactoria**

María Luisa

**No es aquí nuestra casa...Un momento en la tierra...
Dejemos al menos flores, dejemos al menos cantos.**

Nezahualcoyotl

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México, por la beca para estudios de doctorado (CONACYT 47318).

Consejero de la academia y de la vida, muchas gracias Dr. Lauro López Mata por todo su tiempo y por poner los puntos sobre las íes.

La atinada dirección de la Dra. Teresa Terrazas fue fundamental para ver finalizado este trabajo, agradezco toda su paciencia y empeño, sus comentarios, las charlas y su disponibilidad para escucharme y acompañarme en algunos momentos difíciles durante los últimos años. Gracias a su apoyo no deserté.

A la Dra. Ma. del Carmen Gutiérrez Castorena por su análisis de los paradigmas. A la Dra. Mónica de la Cruz Vargas Mendoza, por colocar la hipótesis donde debe de ir. Al Dr. Edmundo García Moya por su gran calidad humana. Al Dr. Salvador Arias Montes por su otra visión.

No puedo dejar de mencionar el invaluable apoyo recibido de Carmelita Bojorges del área de Génesis de Suelos quien posee el don de escuchar y hacer agradables los días grises. Sin olvidar a Patricio Sánchez Guzmán, M.C. quien siempre tuvo respuesta a mis preguntas técnicas, por aceptarme de refugiada en su oficina, por su música y sus fotos.

A Reynita García Acosta, porque es mi última oportunidad de agradecerle.

Le he dejado a Dios el pago por toda la ayuda que he recibido de mi hermana Rosa Josefina Bárcenas Argüello. Sin tí no lo hubiera logrado.

A José Alejandro Bárcenas Argüello y María Carmelina Bárcenas Argüello por siempre estar allí.

Me encuentro en eterna deuda de gratitud con mi mamá Ofelia Judith Argüello Suárez y mi papá Claudio Francisco Bárcenas Couto por todo el apoyo que siempre he recibido.

A mi esposo Oscar Armando Hernández Cruz, por aguantar mis neurosis.

Andrea Yunuén Hernández Bárcenas, te agradezco todo el tiempo que me has concedido.

CONTENIDO

Lista de cuadros	x
Lista de figuras	xi
Introducción general	1
Justificación	2
Hipótesis	2
Objetivos	2
Objetivos particulares	3
Capítulo I. Rock-soil preferences of three <i>Cephalocereus</i> (Cactaceae) species of tropical dry forest	5
Abstract	5
Resumen	6
Introduction	7
Materials and Methods	8
Results	13
Discussion	18
Conclusions	22
Capítulo II. Polimorfismo de weddellita	23
Resumen	23
Introducción	23
Material y Métodos	25
Resultados	26
Discusión	33
Conclusiones	36
Capítulo III. Germinación de semillas	37
Resumen	37
Introducción	38
Material y Métodos	39

Resultados	41
Discusión	43
Conclusiones	47
Capítulo IV. Formación temprana de cristales en plántulas	58
Resumen	48
Introducción	48
Material y Métodos	50
Resultados	51
Discusión	54
Conclusiones	55
Capítulo V. Evolución de <i>Cephalocereus</i> en un contexto edáfico-climático	56
Resumen	56
Introducción	57
Material y Métodos	58
Resultados	63
Discusión	64
Conclusiones	70
Conclusiones generales	71
Literatura citada	73
Apéndice	90

LISTA DE CUADROS

Table 1.1 Site characteristics for the <i>Cephalocereus</i> species studied	14
Table 1.2 X-ray diffraction pattern of rocks where <i>Cephalocereus</i> species grow	15
Table 1.3 Soil (s) and organic debris (od) parameters for the sites of the <i>Cephalocereus</i> species	15
Table 1.4 Percentages of calcite and calcium oxalate in the sand fraction for the sites of the <i>Cephalocereus</i> species	16
Table 1.5 X-ray diffraction pattern of biominerals in the <i>Cephalocereus</i> species	17
Table 1.6 Elements detected by EDAX in the different crystals present in the <i>Cephalocereus</i> species	18
Cuadro 2.1 Propiedades físicas y ópticas de la weddellita encontradas en las especies de <i>Cephalocereus</i>	28
Cuadro 2.2 Sistemas cristalinos, clase, forma e índice de Miller de los cristales de las especies de <i>Cephalocereus</i> por localidad	32
Cuadro 2.3 Análisis elemental de weddellita por localidad de cada especie	32
Cuadro 2.4 Concentración elemental de los centros de los cristales de weddellita encontrados en las especies de <i>Cephalocereus</i> , comparados con la concentración elemental del cristal que crece alrededor del centro	33
Cuadro 3.1 Poblaciones de las tres especies de <i>Cephalocereus</i> donde se recolectaron semillas para su germinación	39
Cuadro 3.2 Velocidad de germinación (semillas/día) de las semillas de tres especies de <i>Cephalocereus</i> según la fecha de siembra	42
Cuadro 4.1 Cristales en células epidérmicas y corticales de tres especies de <i>Cephalocereus</i> a diferentes días después de la siembra (dds)	53
Cuadro 4.2 Análisis químico del sustrato en el cual se transplantaron las plántulas de <i>Cephalocereus</i>	53
Cuadro 5.1. Especies y poblaciones utilizadas en el análisis cladístico.	59
Cuadro 5.2. Caracteres y estados de carácter utilizados en el segundo análisis cladístico	61

LISTA DE FIGURAS

Figure 1.1. Location of the studied sites in the Tehuantepec River basin in Oaxaca State, México	11
Figure 1.2 <i>Cephalocereus</i> plant habit and soil features for the different sites where the species grow	12
Figure 1.3 Weddellite forms in <i>Cephalocereus</i>	17
Figure 1.4 Rocky islands for some sites of <i>Cephalocereus</i> species	18
Figura 2.1 Patrón de difracción de rayos X de weddellita en <i>Cephalocereus</i>	27
Figura 2.2 Células epidérmicas de la parte media de los tallos de <i>Cephalocereus</i>	27
Figura 2.3 Propiedades ópticas de los cristales de weddellita en <i>Cephalocereus</i>	28
Figura 2.4 Morfología y propiedades ópticas de los centros de weddellita	29
Figura 2.5 Varias formas de weddellita encontradas en <i>Cephalocereus</i>	30
Figura 2.6 Sistemas cristalinos	31
Figura 3.1 Germinación de semillas de <i>Cephalocereus</i> por especie	41
Figura 3.2 Germinación de semillas por población	42
Figura 3.3 Germinación de semillas de <i>Cephalocereus</i> por fecha de siembra	43
Figura 4.1 Células epidérmicas y del córtex en <i>Cephalocereus</i> 7dds	52
Figura 4.2 Células del córtex en especies de <i>Cephalocereus</i> 21 dds	52
Figura 5.1 Árbol de consenso estricto de 100 árboles igualmente parsimoniosos	63

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Cephalocerus* está circunscrito a especies endémicas a México. Fue establecido por Pfeiffer en 1838, tomando como especie tipo a *Cactus senilis* la cual había sido descrita por Haworth en 1824 (Pfeiffer, 1837; 1838). Buxbaum (1958) estableció la tribu Pachycereeae y en ella incluye al género *Cephalocereus*. Bravo-Hollis (1978) propone dividirlo a nivel infragenérico en tres subgéneros *Cephalocereus*, *Neodawsonia* y *Pilosocereus*. A lo largo de la historia del género ha habido desacuerdos concernientes al número de especies incluídas; por ejemplo Hunt (1967) menciona alrededor de cincuenta especies, mientras que Backeberg (1976) sólo reconoce una especie y Anderson (2001) incluye a cinco: *C. apicicephalium*, *C. columna-trajani*, *C. nizandensis*, *C. senilis* y *C. totolapensis*.

Con base en caracteres moleculares y estructurales (Arias et al., 2003, 2005; Bárcenas, 2006) el género *Cephalocerus* (*sensu* Anderson, 2001) es monofilético. Dos de sus especies, *C. nizandensis* y *C. senilis*, cuentan con la categoría de sujeta a protección especial y amenazada respectivamente, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 059 (Diario Oficial de la Federación, 2010). *Cephalocerus columna-trajani* se localiza en la Reserva de la Biósfera Cuicatlán-Tehuacán en los estados de Puebla y Oaxaca (Arias et al., 1997), mientras que *C. senilis* está en la Reserva de la Biósfera Barranca de Meztlán en el estado de Hidalgo (Guzmán et al., 2003). Las otras tres especies, *C. apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. totolapensis*, se distribuyen en la porción sur del estado de Oaxaca, principalmente en la región del Istmo de Tehuantepec en poblaciones monoespecíficas de entre 3 y 20 individuos. Las poblaciones de estas tres especies se localizan dentro del bosque tropical caducifolio (Rzedowski, 1988) y desde los primeros informes se menciona su distribución restringida (Dawson, 1948; Bravo-Hollis, 1956).

Los factores que determinan la distribución de las especies de *Cephalocereus* en conglomerados (parches) discontinuos no han sido estudiados (Dávila-Aranda et al., 2002). Para otros géneros, la heterogeneidad de condiciones edáficas (Parker, 1988; Valiente-Banuet et al., 1995; Contreras y Valverde, 2002;

Zavala Hurtado y Valverde, 2003; Rueda et al., 2006; López et al., 2009) parece contribuir a su rareza. Considerando que *Cephalocereus* se establece en suelos sedimentarios y calcáreos (Bravo-Hollis y MacDougall, 1958; Pérez-García et al., 2009) y que los cristales prismáticos de su epidermis e hipodermis distinguen al clado *Cephalocereus-Neobuxbaumia-Pseudomitrocereus* (Terrazas y Loza-Cornejo, 2002), surge la idea de que la presencia de cristales de oxalato de calcio en las etapas iniciales del desarrollo puede conferirles algunas ventajas adaptativas como ocurre en otras especies (Molano-Flores, 2001; Loza-Cornejo, 2004; Ayala-Cordero et al., 2006; Korth et al., 2006).

Justificación

No se conocen las propiedades del suelo ni del material parental donde se desarrollan las especies de *Cephalocereus*. No se han estudiado las características de la germinación de sus semillas, ni las características del desarrollo temprano de sus plántulas. Tampoco se conoce la posible relación del área de distribución actual con la compleja historia geológica del centro-sur de México.

Hipótesis

La distribución alopátrica y en conglomerados de *Cephalocereus* en una región con geología compleja, está relacionada con las condiciones edáficas durante el proceso de especiación.

Las especies de *Cephalocereus* evolucionaron diferencias específicas en la síntesis de oxalatos de calcio desde el desarrollo temprano de sus plántulas, probablemente como respuesta estrechamente relacionada con la supervivencia.

Objetivos

Los objetivos de este estudio fueron (1) caracterizar el material parental y el suelo donde habitan las especies de *Cephalocereus*, en particular las tres especies localizadas en la cuenca del río Tehuantepec, (2) identificar el tipo de oxalato de calcio en los tallos, (3) determinar la etapa del desarrollo en la cual se inicia su

síntesis en plántulas, (4) relacionarlos con las propiedades del material parental y suelo y (5) proponer una explicación de la endemidad de las especies.

Objetivos particulares

- Caracterizar el tipo de roca y material parental sobre el que crecen las especies.
- Determinar las condiciones edáficas en las poblaciones de muestreo.
- Identificar química y morfológicamente las inclusiones celulares.
- Conocer el proceso de germinación de las semillas.
- Establecer la etapa del desarrollo donde inicia la síntesis de cristales.
- Proponer una hipótesis del ambiente geológico-climático donde habitó el ancestro del género con base en un análisis de parsimonia.

Para responder a los objetivos generales y particulares de esta investigación, en el capítulo I se describen el tipo de roca, el material parental y las condiciones edáficas sobre las que crecen las tres especies (*C. apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. tototalapensis*) que habitan en la cuenca del río Tehuantepec; se identifican los tipos de oxalato de calcio presentes en sus tallos y en el suelo y se cuantifican y se relacionan con las propiedades de roca y suelo.

En el capítulo II se determina y cuantifica la composición elemental de los cristales de oxalato de calcio en particular para *C. apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. tototalapensis*. Además se describe la morfología de los cristales a través de diferentes técnicas de microscopía y se discute su valor en la sistemática de la familia.

En el capítulo III se realizan experimentos de germinación donde se registra el porcentaje y la velocidad de germinación de las semillas y se compara la

respuesta germinativa entre *C. apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. tototalapensis* y entre poblaciones de cada especie a diferentes días después de la recolecta.

En el capítulo IV se estudia la anatomía de las plántulas de *C. apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. tototalapensis* que se desarrollaron en cámaras de crecimiento bajo condiciones conocidas. Se registra por primera vez que las plántulas presentan cristales de oxalato de calcio en las células epidérmicas y en las células corticales desde los siete días después de la siembra y se discuten sus posibles implicaciones ecológicas.

En el capítulo V se realiza un análisis de parsimonia a nivel poblacional para cada una de las cinco especies del género *Cephalocereus* y se propone una hipótesis del ambiente edáfico y climático en el cual vivió el ancestro y donde se originaron los clados *Cephalocereus*-subgénero *Cephalocereus* (*C. columna-trajani*, *C. senilis*) y *Cephalocereus*-subgénero *Neodawsonia* (*C. apicicephalium*, *C. nizandensis*, *C. tototalapensis*) y de la actual distribución de las cinco especies.

CAPÍTULO I

ROCK-SOIL PREFERENCES OF THREE *Cephalocereus* (CACTACEAE) SPECIES OF TROPICAL DRY FOREST¹

Abstract

We examined the rock-soil–plant relationship in three endemic Cactaceae species (*Cephalocereus apicicephalium*, *C. nizandensis*, and *C. totolapensis*) from the tropical deciduous forest of the Tehuantepec River basin, Mexico. The goal was to explain the relationships between the species, rock, soil, and calcium oxalates. The X-ray diffraction patterns from the rock and soil analyses showed that the species do not share either a rock or a soil type. *C. apicicephalium* grew exclusively on outcrops of limestone with quartz on the summit to backslope of the hill and *C. nizandensis* grew in metalimestone outcrops on the summit and shoulder of the hill, while *C. totolapensis* preferred acid soils from andesites, developing also on siltstones or on mica schist on the shoulder to toeslope of the hill. Although only insignificant quantities of soluble calcium were found in the soil, weddellite is abundant in the plant tissue. This suggests that the plants take up the calcium they need and that weddellite is a genetically fixed characteristic related to deflection of excess radiation or herbivore deterrent. EDX-analysis showed that calcium oxalate crystals contain other elements (Si, Mg, Na, K, Cl, Fe) and that these impurities modify crystal shape as for bi-pyramids in *C. totolapensis*. Biominerals do not change the mineral composition of the soil. The three species are distributed as edaphic or rocky islands giving rise to their allopatric and patchy distribution across the landscape. Finally, the endemism of the three *Cephalocereus* species is promoted by the parent material and the particular soil conditions in the area in which each one grows.

Keywords: allopatric, cacti, endemism, *C. totolapensis*, biominerals, weddellite.

¹ Este capítulo fue publicado como artículo: Bárcenas-Argüello, M.L., M. del C. Gutiérrez-Castorena, T. Terrazas, L. López-Mata. 2010. Rock-soil preferences of three *Cephalocereus* (Cactaceae) species of tropical dry forest. Soil Science Society of America Journal 74: 1374-1382.

Resumen

Se estudió la relación roca-suelo-planta en tres especies endémicas de Cactaceae (*Cephalocereus apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. totolapensis*) en una selva tropical caducifolia en la cuenca del río Tehuantepec, Mexico. El objetivo fue explicar la relación entre las especies, la roca, el suelo y el oxalato de calcio. El patrón de difracción de rayos X de la roca y los análisis de suelo mostraron que las especies no comparten ni el tipo de roca ni el tipo de suelo. *C. apicicephalium* crece exclusivamente sobre afloramientos rocosos de calizas con cuarzo y *C. nizandensis* crece en afloramientos rocosos de metacalizas, mientras que *C. totolapensis* prefiere suelos ácidos derivados de andesitas, limolita o mica esquisto. Aunque se encontraron cantidades insignificantes de calcio soluble en el suelo, la weddellita es abundante en el tejido vegetal. Esto sugiere que las plantas toman el calcio que necesitan y la síntesis de weddellita es una característica fijada genéticamente y está relacionada con la reflexión del exceso de la energía solar y contra el consumo por herbívoros. Los análisis de EDX mostraron que los cristales de oxalato de calcio contienen otros elementos (Si, Mg, Na, K, Cl, Fe) y esas impurezas modifican la forma de los cristales como las bi-pirámides en *C. totolapensis*. Los biominerales no cambian la composición mineral del suelo. Las tres especies están distribuidas sobre islas edáficas o rocosas y esto da una distribución alopátrica y en parches en el área de la cuenca. Finalmente, la endemidad de las tres especies de *Cephalocereus* es promovida por el material parental y condiciones particulares de suelo.

Palabras clave: Alopátrico, cactus, endemidad, *C. totolapensis*, biominerales, weddellita.

Introduction

Plant distribution is not random, but rather tends to follow environmental patterns (McAuliffe, 1994). In the Cactaceae family, these patterns are not completely understood, particularly those related to soil (Parker, 1991). Together, the great soil heterogeneity (Ruedas et al., 2006) and specific edaphic conditions (Parker, 1988; Valiente-Banuet et al., 1995; Contreras and Valverde, 2002; Zavala-Hurtado and Valverde, 2003; López et al., 2009) appear to contribute to the high level of rarity of cacti species. While information on soil properties is not always available, edaphic factors are commonly used to draw links between environments and the endemism of taxa (Kruckeberg and Rabinowitz, 1985). Despite the *Cephalocereus* species endemism, the factors that determine their distribution in discontinuous patches have not yet been determined (Dávila-Aranda et al., 2002).

Cephalocereus Pfeiff. is a monophyletic genus of five species (Bárcenas-Argüello, 2006). Two of these are endemic to the southern part of the Chihuahuan Desert, *C. columna-trajani* (Karw. ex Pfeiff.) K. Schum. and *C. senilis* (Haw.) Pfeiff. in the arid tropical scrub, while *C. apicicephalium*, *C. nizandensis*, and *C. totolapensis* are endemic to the Tehuantepec River basin in Oaxaca State. These three species grow in xerophytic scrub or tropical deciduous forests (Pérez-García and Meave, 2004). In this region, these three species are allopatrically distributed growing on calcareous sedimentary rocks (Bravo-Hollis, 1978; Pérez-García et al., 2009); however, no detailed information about parental material, soils, or biominerals exists for these species. The Tehuantepec River basin is characterized by a range of igneous, sedimentary, and metamorphic rocks (Santana et al., 2009). Therefore, our hypothesis was that the allopatric and patchy distribution of the *Cephalocereus* species in the Tehuantepec River basin is restricted to the inclusion of calcareous rocks, where each species develops under specific edaphic conditions defined by texture, moisture or depth. Thus, we expect that, if Ca is abundant in the soils, then calcium oxalate crystals will be also abundant in the tissues of the plants.

Calcium oxalate crystals have been reported in the tissue of Cactaceae (Rivera and Smith, 1979; Hartl et al., 2007). Predominantly, druses occur in the cortical tissue (Terrazas and Mauseth, 2002; Hartl et al., 2007); however, prisms in the epidermis and hypodermis distinguish *Cephalocereus*, *Neobuxbaumia*, and *Pseudomitrocereus* (Terrazas and Loza-Cornejo, 2002). The crystals produced by species of the same genus share the same crystalline system, but their shapes may vary at the level of the crystal class due to internal factors such as ions and organic acid composition (De Yoreo and Dove, 2004). According to Garvie (2003), these crystals are released as a result of plant decay after death, incorporating the biominerals into the soil where they are subsequently solubilized and remobilized. The Ca precipitates out as caliche on the soil surface or may be redistributed by the wind (Garvie, 2003), causing restrictions to plant establishment (McAuliffe, 1994). An analysis to quantify and identify biominerals in the sandy fraction on the soil surface is missing for sites where cacti grow. This would be an important link, because it makes it possible to relate biominerals provided by the plant to those that remain in the soil environment. Our second hypothesis was that the studied columnar cacti would be able to change the mineral composition of the soil where they grow.

The objectives of this study were to determine the bedrock and soil properties in the Tehuantepec River basin where three species of *Cephalocereus* develop, to quantify and identify calcium oxalate types present in their stems and in the soil, and to relate the bedrock and soil properties with the crystals in their stems.

Materials and Methods

Study area

The study area is located in the southeastern portion of Oaxaca State, Mexico including parts of the Central Valley, Sierra Madre del Sur, and Isthmus of Tehuantepec (Fig. 1). The region is complex: there are different geological strata including metamorphic rocks from the Precambrian to the Cenozoic, intrusive and extrusive igneous rocks from the Paleozoic and Cenozoic, and sedimentary

deposits from the Paleozoic to Quaternary (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 2003; Santana et al., 2009). The climate varies from hot and dry in the Central Valley to tropical, subhumid, and highly seasonal in the Isthmus of Tehuantepec (Vidal, 2005). Vegetation is mainly tropical deciduous forest (Rzedowski, 1978). In this region, the populations of the three species are rare but distinct from the surrounding vegetation. Based on literature (Bravo-Hollis, 1978; Torres, 1989; Pérez-García et al., 2001), herbaria data (Colegio de Postgraduados, Chapingo, México [CHAPA]; Universidad Nacional Autónoma de México [MEXU]; and the Missouri Botanical Garden [MO]), and our own field observations, we selected 11 populations that represent the whole endemic area of Oaxaca. These populations varied in size and in number of individuals per species (Fig. 1.1, Table 1.1).

Study species

The three studied species have a columnar habit branching from the base, with an apical pseudocephalium (Fig. 1.2). *Cephalocereus apicicephalium* reaches a height of 1 to 2 m, with a diameter <8 cm, 5 to 10 branches and 24 to 26 ribs (Fig. 1.2C). *Cephalocereus nizandensis* is 1 to 2 m high, with a diameter of 8 to 10 cm, >20 branches, and 21 to 23 ribs (Fig. 1.2G). *Cephalocereus totolapensis* grows 3 to 5 m tall and has a diameter of 12 to 15 cm with <5 branches per individual; one of the branches is always higher and has 24 to 28 ribs, and remnants of reproductive events remain on the stem as rings (Fig. 1.2J).

Collection sites and field work

In each site, the species' spatial distribution was described with respect to geomorphic position, slope and sun exposure; soil and bedrock reactions to HCl were tested as a measure of their calcareousness. We recorded the soil properties of depth, stoniness, root distribution, H₂O₂ reaction, structure, and Munsell color. The rock dissolution processes caused by roots and the organic debris characteristics in cracks and cavities were also recorded. We estimated drainage

conditions near the roots during plant establishment based on cracks size, cavity depth, slope, and soil depth.

Three bulk soil or rhizosphere soil and rock samples were collected along the geomorphic position per site (Table 1). In the cases where there was no soil, organic debris was collected. Four young branches were selected at each site. Two were placed in liquid N₂, and the other two were kept alive. All of them were used in the mineralogical analyses.

Laboratory analysis

Rocks. Rock fragments were pulverized with a porcelain mortar and pestle and sieved to obtain particles <50 μm. Rock powder mounts were examined with an x-ray diffractometer using Cu K α radiation at 35 kV and 25 mA. Mineral species were determined using ICDD software version 2002 (International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, PA).

Soils. The particle size, pH (water/soil ratio of 2:1), and organic matter procedures were according to van Reeuwijk (1995), and soluble Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, and Fe²⁺ were measured by inductively coupled plasma diffractometry, K⁺ and Na⁺ by flame emission spectroscopy and Cl⁻ by volumetric analysis. The same procedure was followed for organic debris, except particle size analysis.

Mineralogical analysis

Sandy fraction. The bulk soil or rhizosphere soil samples were passed through a 0.025 mm (300-mesh) sieve. A 1-g subsample was taken after sifting and washed with distilled water to remove the clay fraction. Hydrogen peroxide (w/w 30%) was used to eliminate organic material. Three hundred grains from the sandy fraction were counted on a grain mount by line counting methods using an Olympus (B52) petrographic microscope.

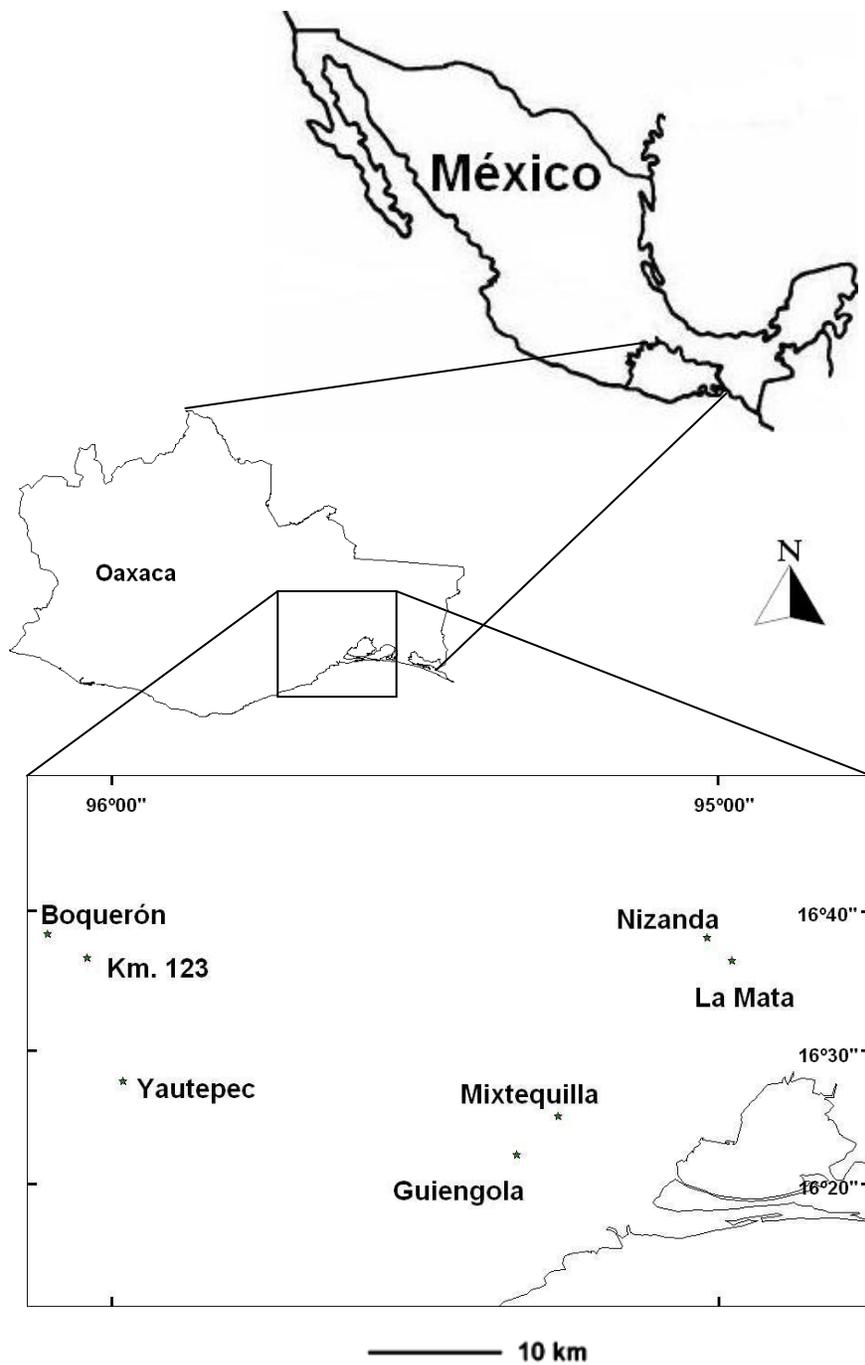


Figure 1.1. Location of the studied sites in the Tehuantepec River basin in Oaxaca state, México



Figure 1.2. *Cephalocereus* plant habit and soil features for the different sites where the species grow. **(A-C)** *C. apicicephalum*. A, B. Mixtequilla, C. Guiengola. **(D-G)** *C. nizandensis*. D, F. Nizanda, E, G. La Mata. **(H-J)** *C. totolapensis*. H. Tlacolulita, I. San Bartolo, J. Tlacolulita.

Dry plant tissue. The plant tissue was removed from the liquid N₂, freeze-dried, ground, and sieved. The fine fraction (<2 μm) was analyzed by x-ray diffraction (Cu K α radiation at 35 kV and 25 mA) using a random powder mount. The isolated crystals were fixed on a microscope slide and photographed with a Canon digital camera mounted on an Olympus (B52) petrographic microscope.

Fresh plant tissue. The spines were removed from the collected branches and the branches were cut up and ground in a manual blender. The material was passed through a sieve to separate the dense tissue. The crystals and water were collected in flasks, which were then decanted and washed with distilled water (Al-Rais et al., 1971). The crystals were mounted onto an aluminum specimen holder with double-sided tape and coated with Au. They were photographed and their morphology described through a Hitachi S-2460N scanning electron microscope. The elemental composition of these crystals was quantified using a JEOL JSM-35C element analyzer (JEOL Ltd., Tokyo), in addition to an energy dispersive x-ray (EDX) analysis (Tracor Northern).

Results

Species distribution pattern according to parent materials, rocks, and soils

Cephalocereus apicicephalium grew on limestone outcrops with quartz (Fig. 1.2A-1.2C; Tables 1.1 and 1.2) on the summit to backslope of the hill. Organic debris accumulated in rocky cracks; the color of this material was dark brown (10YR3/3) when dry and very dark grayish brown (10YR3/2) when wet, the pH was between 5.7 and 6.8, and the soluble Ca content varied from 4.6 to 10.6 cmol kg⁻¹ of organic debris (Table 1.3). The roots grew near the surface and only penetrated deeper where there were cracks in the rocks. The roots were joined to the rock and generated channels by dissolution processes. Drainage was good without water accumulation. Although there were areas with soil at the site (Table 1.1), this species did not grow in these places but only on outcrops (Fig. 1.2C).

Table 1.1. Site characteristics for the *Cephalocereus* species studied. *sampled for soils. NA means not applicable. ^a1 = summit, 2 = shoulder, 3 = backslope, 4 = toeslope in the hill.

Species / Site	Elevation (m)	Area (≈m ²)	Number of individuals	Slope (%)	Exposure	Geomorphic position ^a	Rock type in specific site	No established or adjacent soil or rock	Substrate or soil texture
<i>C. apiccephalum</i>									
Guiengola*	300	50	> 20	100	west	1,2,3	limestone outcrops cracks	soil	debris
Mixtequilla*	163	150	> 20	top	NA	1	limestone outcrops cracks	soil	debris
<i>C. nizandensis</i>									
Nizanda*	206	50	> 20	67	west	1,2	metalimestone outcrops cavities	soil	debris
La Mata*	200	150	> 20	100	west	1,2	metalimestone outcrops cavities	soil	debris
<i>C. totolapensis</i>									
Las Margaritas	1000	100	> 20	44	north	2,3	coluvial material from andesite	breccia	soil < 10 cm / sandy clay loam
Boquerón*	822	35	10-20	26	north	2,3	andesite bedrock	metaandesite	inter-rock soil / sandy loam
Km. 123*	830	25	5-10	55	north	2	coluvial material from andesite	polymictic conglomerate	soil with stones / clay loam
El Gramal	680	15	3-5	22	north	2	andesite bedrock	sandstone and polymictic conglomerate	soil < 10 cm / ND
San Bartolo*	675	400	10-20	44	north	2,3,4	siltstone folds	andesite	soil >30 cm / sandy clay loam
Tlacolulita	434	400	10-20	27	north	2,3,4	andesite bedrock	granite-granodiorite	soil <10 cm / loam
San Miguel Ecatepec	386	9	1-3	22	north	2	mica schist bedrock	granite-granodiorite	soil >30 cm / loam

The outcrops on which *C. nizandensis* grows were metalimestone (Tables 1.1 and 1.2) on the summit and shoulder of the hill. These rocks showed dissolution processes forming cavities up to 10 cm deep (Fig. 1.2D-1.2F). The bare rock cavities accumulated organic debris at different stages of decomposition (Fig. 1.2E), together with water (Fig. 1.2F), in which the plants were established and grew (Fig. 1.2G). The soluble Ca content in the substrate varied from 4.2 to 5.2 cmol kg⁻¹ of organic debris, and the pH ranged from 6.6 to 7.1 (Table 1.3). This species only grew in the cavities formed in the outcrops.

Table 1.2. X-ray diffraction pattern of rocks where *Cephalocereus* species grow.

<i>C. apiccephalum</i>		<i>C. nizandensis</i>		<i>C. totolapensis</i>			
d _{hkl} [Å] ^a	Card 5-586	d _{hkl} [Å] ^a	Card 24-27	d _{hkl} [Å] ^a	Card 20-572	d _{hkl} [Å] ^a	Card 5-586
I/I0 (%) ^b	CaCO ₃ syn	I/I0 (%) ^b	CaCO ₃	I/I0 (%) ^b	NaAlSi ₃ O ₈	I/I0 (%) ^b	α-SiO ₂
	Synthetic calcite		Calcite		Albite		Quartz low
3.04 ₁₀₀	3.04 ₁₀₀	3.03 ₁₀₀	3.03 ₁₀₀	3.21 ₁₀₀	3.21 ₁₀₀	3.36 ₁₀₀	3.34 ₁₀₀
2.29 ₃₀	2.29 ₂₀	2.09 ₂₀	2.09 ₃₀	3.18 ₁₀₀	3.18 ₉₀	4.24 ₄₀	4.26 ₄₀
2.09 ₂₀	2.10 ₂₀	3.84 ₁₀	3.85 ₃₀	4.04 ₃₀	4.03 ₈₀	1.81 ₂₀	1.82 ₂₀
1.91 ₂₀	1.91 ₂₀	1.87 ₃₀	1.87 ₃₀	3.75 ₆₀	3.75 ₆₀	--	--

^ad-spacing, ^brelative intensity.

Table 1.3. Soil (s) and organic debris (od) parameters for the sites of the *Cephalocereus* species. *NA = not applicable, ND = not detected, N = 3 per site.

Species / Site	Samples	Sand	Silt	Clay	Organic matter	pH	Ca	Fe	Mg	Mn	K	Cl	Na
<i>C. apiccephalum</i>													
Guiengola	od	NA	NA	NA	13.62	6.8	4.67	0	0.87	0.01	0.30	1.07	0.10
Mixtequilla	od	NA	NA	NA	23.35	5.7	10.67	0	0.99	0.34	0.32	8.88	0.17
<i>C. nizandensis</i>													
Nizanda	od	NA	NA	NA	100	7.1	5.22	ND	0.88	0.01	0.31	1.07	0.34
La Mata	od	NA	NA	NA	27.24	6.6	4.23	ND	1.80	0.01	0.63	1.74	0.69
<i>C. totolapensis</i>													
Las Margaritas	s	49.68	16.77	33.54	3.89	6.9	3.36	0	1.25	0.00	0.32	0.90	0.24
Boquerón	s	53.16	28.10	18.73	10.90	6.5	1.96	ND	0.98	0.01	1.01	0.90	0.57
Km 123	s	40.22	20.79	38.98	5.44	6.7	0.94	ND	0.45	0.00	0.28	0.61	0.58
San Bartolo	s	51.13	26.88	21.99	1.24	6.5	3.62	ND	0.56	0.01	0.31	0.95	0.43
Tlacolulita	s	39.43	34.23	26.33	10.12	6.0	7.87	ND	5.54	0.03	1.86	5.13	0.34

Cephalocereus totolapensis was distributed in more diverse substrates on the shoulder to toeslope but not on the summit of the hill. For example, at five sites they grew on soils formed from andesite (Table 1.1 and 1.2; Fig. 1.2H), at one site on siltstone (Fig. 1.2I), and at other on mica schist. None of these rocks reacted with HCl. The soil depth varied from 10 cm to 60 cm (Fig. 1.2I). These soils showed a dark brown color (10YR3/3) when dry and varied from very dark gray (10YR3/1) to dark yellowish brown (10YR4/4) when wet, including a site that was brown when wet (7.5YR4/4). The organic matter content of the soil was variable (1–10%); soluble

calcium was low and varied from 0.9 to 3.6 cmol kg⁻¹ of soil. Magnesium, Mn, K, and Na were present in quantities <2 cmol kg⁻¹ of soil (Table 1.3). The pH level varied from 6.5 to 6.7. Although this species grew on fine soils, it did not exhibit drainage problems because there were various combinations of texture with slopes higher than 50% or its roots grew on stony soils. Because of this, the microhabitat of *C. totolapensis* was restricted to non-calcareous rock, fine-textured soil, and steep slopes (Table 1.1) having abrupt distribution limits depending on the underlying rock.

Mineralogical analysis

The sandy fraction of the sampled soils contained a low proportion of biominerals (Table 1.4). There was a higher proportion of calcite in the substrate on which *C. nizandensis* grew, at about 1%. In addition, 1.1% of calcium oxalate was found in the same site. The proportions of these minerals were lower in the soils in which *C. apicicephalium* and *C. totolapensis* grew (<0.3% calcite and <0.2% calcium oxalate).

Table 1.4. Percentages of calcite and calcium oxalate in the sand fraction for the sites of the *Cephalocereus* species. N = 900 grains per site, s = soil, od = organic debris.

Species	Sites	Samples	Calcite (%)	Calcium oxalate (%)
<i>C. apicicephalium</i>	Guiengola	od	0.02	0.00
	Mixtequilla	od	0.30	0.12
<i>C. nizandensis</i>	Nizanda	od	0.90	1.14
	La Mata	od	0.06	0.14
<i>C. totolapensis</i>	Boquerón	s	0.15	0.01
	Km. 123	s	0.00	0.00

Polyhydrate calcium oxalate crystals were observed in the dry plant tissue samples. The weddellite found in *C. apicicephalium* and *C. nizandensis* corresponded to the 14-0704 card in the ICDD software included in the x-ray diffraction equipment, and its chemical formula was CaC₂O₄·2.5H₂O (Table 1.5). The weddellite in *C. totolapensis*, on the other hand, corresponded to the 4-0702

card, and its formula was $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Table 1.5). The EDX analysis showed a wide range of Ca concentrations, as well as other elements such as Si, Mg, Na, K, Cl, and Fe (Table 1.6). Weddellite crystals were composites of several individual crystals; however, the scanning electron microscope analysis showed that weddellite had different shapes according to the species; such as *C. apicicephalium* (conglomerated crystal sands), *C. nizandensis* (typical druses), and *C. totolapensis* (bipyramids) (Fig. 1.3).

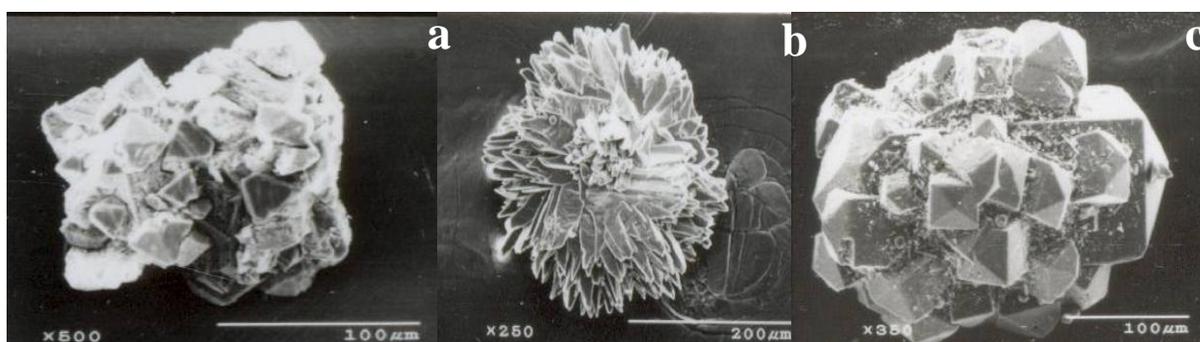


Figure 1.3. Weddellite forms in *Cephalocereus*: **(A)** conglomerated crystal sand in *C. apicicephalium*. **(B)** typical druse in *C. nizandensis*. **(C)** bipyramid druse in *C. totolapensis*.

Table 1.5. X-ray diffraction pattern of biominerals in the *Cephalocereus* species. ^ad-spacing, ^brelative intensity.

<i>C. apicicephalium</i>		<i>C. nizandensis</i>		<i>C. totolapensis</i>	
d_{hkl} [Å] ^a	I/I ₀ (%) ^b	d_{hkl} [Å] ^a	I/I ₀ (%) ^b	d_{hkl} [Å] ^a	I/I ₀ (%) ^b
6.15 ₈₆	6.17 ₁₀₀	6.17 ₅₈	6.17 ₁₀₀	6.26 ₅₄	6.23 ₉₀
2.77 ₁₀₀	2.78 ₁₀₀	2.77 ₁₀₀	2.77 ₁₀₀	2.78 ₈₈	2.78 ₁₀₀
2.24 ₅₇	2.24 ₆₀	2.24 ₃₈	2.241 ₆₀	2.24 ₁₀₀	2.24 ₆₀

Table 1.6. Elements detected by EDAX in the different crystals present in the *Cephalocereus* species. Values are the mean \pm standard deviation. *C. apicicephalium* N = 22; *C. nizandensis* N = 95; *C. totalapensis* N = 62.

Element/Species	<i>C. apicicephalium</i>	<i>C. nizandensis</i>	<i>C. totalapensis</i>
Si	2.14 \pm 1.46	1.85 \pm 1.42	1.62 \pm 1.17
Mg	2.07 \pm 2.56	0.94 \pm 0.73	0.93 \pm 76
Na	2.69 \pm 2.22	1.73 \pm 1.19	1.84 \pm 1.66
K	0.77 \pm 0.87	0.35 \pm 40	0.50 \pm 0.47
Cl	1.41 \pm 1.98	0.55 \pm 0.37	0.60 \pm 0.46
Fe	0.77 \pm 0.68	0.56 \pm 0.46	1.17 \pm 0.88

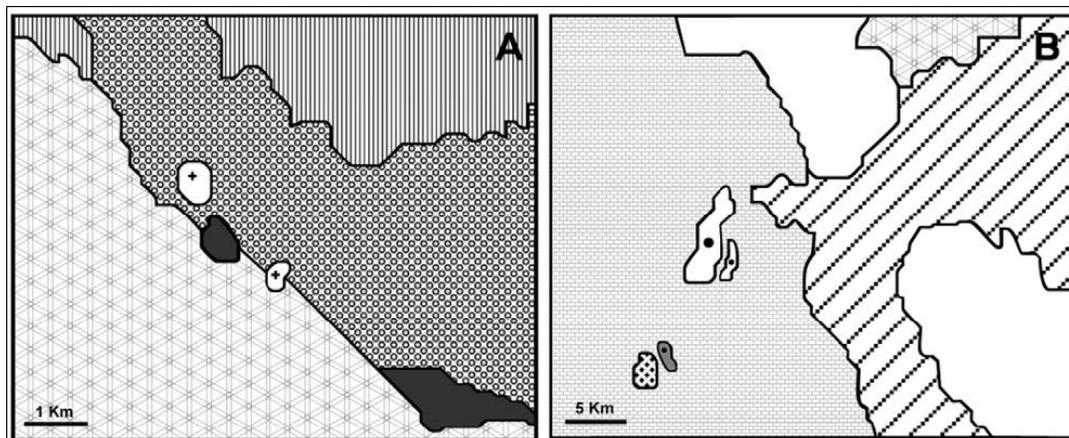


Figure 1.4. Rocky islands for some sites of *Cephalocereus* species (modified from SGM, 2000, 2007). **(A)** *C. nizandensis*. + white = dolomite-limestone La Mata and Nizanda, connected diamonds = sand-silt, black = travertine-polymictic-conglomerate, white dots = metalimestone, vertical lines = metasedimentary. **(B)** *C. totalapensis*. * white = andesite Las Margaritas and Km 123, * gray = siltstone San Bartolo, solid diamonds = granite-granodiorite, oblique lines = granodiorite, connected diamonds = sand-silt, bricks = volcano-sedimentary.

Discussion

Species distribution pattern according to parent materials, rocks, and soils

According to Meyrán (1970), members of the family Cactaceae prefer calcareous soils or limestone. Our results showed that, in addition to calcareous

soils, there was more than one parent material without soluble or precipitated Ca. In either case, the three species are distributed as edaphic and rocky islands with different geomorphic position preferences (Table 1.1). For instance, *C. totalapensis* did not show specificity for a calcareous substrate, growing instead in an acid soil (pH 5.5-6.9). Furthermore, *C. totalapensis* showed a high specificity for fine-textured soils developed only on andesites, siltstones, or mica schists (Table 1.1), even though these rocks were associated with other igneous, sedimentary, and metamorphic rocks (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, 2003). *Cephalocereus apicicephalium* and *C. nizandensis* grew only on inclusions of calcareous rocks but in different edaphic conditions. The first prefers rocky cracks where water drainage was good, and the second developed in cavities on bare rock where organic debris and water accumulated. In either case, the substrate in the root influence area had a pH between 5.7 and 7.1. The roots of these plants probably have the ability to exude low-molecular-weight organic acids that produce changes in the availability of nutrients (Bar-Yosef, 1996; Brady and Weil, 1999) as well as the ability to participate actively in CaCO₃ dissolution. Among such organic acids, oxalic acid is abundant in the rhizosphere (Ström et al., 1994, 2005; Ström, 1997), and *C. apicicephalium* and *C. nizandensis* had calcium oxalate crystals in their tissues, suggesting that oxalic acid is present. This ability to successfully grow on outcrops with high temperatures and low nutrient availability has promoted the endemism of these two species. Endemism found on rocky outcrops, either calcareous or otherwise, has been reported by several researchers (Jeffries, 1985; Collins et al., 1989; Pérez-García et al., 2001, 2009; Searcy et al., 2003; Müller, 2007; Lopez et al., 2009).

Our results showed that *C. apicicephalium* and *C. nizandensis* are examples of endemism strongly associated with inclusions of limestone with quartz or metalimestone outcrops surrounded by a complex of rocks (Table 1.1, Fig. 1.4A), and the two are separated by the available moisture. These factors may also promote other endemisms at the same sites, such as *Agave nizandensis* Cutak, *Barkeria whartoniana* (C. Schweinf.) Soto Arenas, *Brongniartia guiengolensis* O. Dorado & L. Torres-Colín, *Encyclia nizandensis* Pérez-García & Hágater,

Eupatorium guiengolense L. Torres-Colín & J.L. Villaseñor, and *Solandra nizandensis* Matuda (Torres, 1989; Pérez-García et al., 2001). On the other hand, *C. totolapensis* is the species with the widest distribution, but it requires soils with particular conditions, such as depth and a fine texture that provide sufficient moisture and that are related to specific parent materials like andesite, siltstone, or mica schist (Fig. 1.4B). Other researchers have also recorded high edaphogenic specificity related to the distribution of Cactaceae species (Bashan et al., 2002; Contreras and Valverde, 2002; Zavala-Hurtado and Valverde, 2003; Lopez et al., 2009).

Mineralogical analysis

Despite the weddellite abundance in the plant tissue of the three species studied, the amount of this mineral incorporated into the soil is not enough to promote calcification, as was reported for *Carnegiea gigantea* Britton & Rose by Garvie (2003) or other cacti (Garvie, 2006). Although the *C. nizandensis* substrate contained up to 2% biominerals (counted from 300 grains), this does not represent a considerable contribution to form surface horizons made up of caliche. Probably, the decay of the dead individuals of the *Cephalocereus* species studied is more rapid because humidity and rains are higher than in the Sonoran Desert (Vidal, 2005). Moreover, the bare rocks and persistent winds in this area (Romero-Centeno et al., 2009) prevent the accumulation of biominerals that has been observed in the Sonoran and Chihuahuan deserts (Garvie, 2006).

When the soil is rich in Ca, an element that is essential for the plant's vital functions, the root absorption area may be saturated with this element. This microenvironment could promote plants incorporating large quantities of Ca into their tissue, although it may also generate mechanisms to precipitate the Ca as oxalate (Franceschi and Horner, 1980; Webb, 1999; White and Broadley, 2003). It has also been reported that some species can concentrate an element in their tissues even when it is only available in low amounts in the solution soil or when other species are competing for the elements (Golley, 1986). Both regulatory

mechanisms operate under genetic control (Ruiz and Mansfield, 1994; Horner and Wagner, 1995). The presence of calcium oxalate crystals has been reported in *Cephalocereus* species (Gibson and Horak, 1978; Terrazas and Loza-Cornejo, 2002; Vázquez–Sánchez et al., 2005, 2007), and x-ray diffraction analysis has measured their composition. Nevertheless, it cannot be claimed that the abundance of calcium oxalate in the plant tissue is caused by Ca abundance in the soil in which the *Cephalocereus* species develop. These findings indicate that *C. totalapensis* grows in environments with low Ca content (0.94–3.62 cmol kg⁻¹) and acid pH soils. While *C. apicicephalium* and *C. nizandensis* grow on calcareous rocks, the Ca present in the substrate is only soluble in low amounts (4.23–10.67 cmol kg⁻¹). This means that species included in the genus *Cephalocereus* solubilize and take up the Ca they need and that calcium oxalate crystal formation is a genetically fixed characteristic that may be related to deflection of excess radiation (Darling, 1989) or an herbivore deterrent (Franceschi and Nakata, 2005). These traits are shared with other species of the tribe Pachycereeae Hartl et al. (2007) recorded that *C. apicicephalium*, the only *Cephalocereus* species they studied, forms whewellite. This hydration form was not found in our study; weddellite crystals were identified in the three analyzed species. The occurrence of weddellite crystals is shared with most members of the Pachycereeae tribe studied by Hartl et al. (2007). The calcium oxalate crystal morphologies in several members of Cactaceae have been documented since at least 50 yr ago (Metcalf and Chalk, 1950; Bailey, 1961), and more recently, their chemical compositions were determined (Rivera and Smith, 1979; Monje and Baran, 2002; Hartl et al., 2007). The calcium oxalate crystals show druses in the *Cephalocereus* species. According to Franceschi and Horner (1980), a *druse* is defined as a “spherical aggregate of individual crystals.” The scanning electron microscope showed that druses are composed of bipyramids or layers. This mineral shape is related to impurities in its chemical composition (De Yoreo and Dove, 2004). EDX analysis indicated an important presence of some elements like Si, Mg, Na, K, Cl, and Fe (up to 5%) in studied *Cephalocereus* species. For instance, bipyramidal druses were found in *C. totalapensis*; druses with sharp points growing around the core were observed in *C. nizandensis*; and conglomerated

crystal sands were present in *C. apicicephalium*. Thus, the crystal form could follow a close relationship between the species and the soil mineral content.

Conclusions

The discontinuous distribution of three *Cephalocereus* species is not restricted to a calcareous environment. This distribution pattern is related to rocky inclusions that are specific for each species acting as rocky and edaphic islands. All studied species accumulate biominerals in their tissue, but this does not impact the soil mineral composition. The weddellite crystalline forms present in the species do not belong to the same system, and the wide variety of forms should be studied to understand their taxonomic value. Due to the association between parent material and soil preference in the three *Cephalocereus* species studied, we claim that these factors have promoted their endemism. To entirely understand the endemism of the Cactaceae, it is essential to take into account the parent material and soil preference associations.

CAPITULO II

POLIMORFISMO DE WEDDELLITA

Resumen

Los oxalatos de calcio biogénicos frecuentemente son muy diferentes en morfología a los minerales de origen inorgánico y debido a que ocurren en diferentes formas y estados de hidratación se han utilizado como caracteres con valor taxonómico y filogenético. Con los objetivos de identificar el tipo de oxalato de calcio, registrar la morfología de los cristales, determinar la composición elemental de las diferentes morfologías y relacionarlas con la filogenia de las especies, se tomaron muestras de tejido de plantas vivas de *Cephalocereus apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. totolapensis* las cuales fueron analizadas con diferentes técnicas de microscopía y con DRX y EDX. Las tres especies sintetizan weddellita con diferente estado de hidratación. El centro de los cristales presentó un empaquetamiento denso de partículas en color blanco que refleja fuertemente la luz. Se encontraron cristales agregados y solitarios que pertenecen a más de diez clases cristalinas. Se detectaron diferentes concentraciones de Ca y cantidades significativas de otros elementos tales como Si, Mg, Na, K, Cl y Fe. De manera general, los cristales que forman agregados esféricos presentan menos calcio y más silicio. Probablemente el estado de hidratación del oxalato se conserva genéticamente y las diversas formas encontradas están relacionadas con el ambiente edáfico en que estas especies crecen. La variación entre sitios en sus cristales es menor que entre especies por ello se confirma su valor en la taxonomía.

Palabras clave: oxalato de calcio, biominerales, núcleo cristalino.

Introducción

Los organismos de los cinco reinos sintetizan al menos 31 minerales: siete de los cuales son formados en las células vegetales (Lowenstam, 1981). Los más fáciles de identificar son los oxalatos de calcio debido a su alta birrefringencia con

microscopía de luz que los distingue de otras inclusiones celulares (Metcalf, 1983) y su estructura interna que se determina por difracción de rayos X (Ward, 2005). Los minerales biogénicos frecuentemente son muy diferentes en morfología a los minerales de origen inorgánico (Lowenstam y Weiner, 1989) y pueden adoptar diferentes estructuras cristalinas cuando otros elementos entran a formar parte de las moléculas (De Yoreo y Dove, 2004; Ward, 2005). Debido a que ocurren en diferentes formas y estados de hidratación se han utilizado como caracteres con valor taxonómico y filogenético (Sterling 1964; Prychid et al., 2003; Franceschi y Nakata, 2005; Lester y Horner, 2006, 2008; Vansteenkiste et al., 2007; Horner et al., 2009). En las especies de *Cephalocereus* aquí estudiadas se esperó encontrar cristales de oxalato de calcio del mismo estado de hidratación, pero distinta morfología dependiendo de la especie.

Numerosas investigaciones refieren la presencia de cristales en el tejido dérmico de las cactáceas (Metcalf y Chalk, 1950; Bailey 1963; Conde 1975; Gibson y Horak, 1978; Terrazas y Arias, 2002; Terrazas y Loza-Cornejo, 2002; Loza-Cornejo y Terrazas, 2003), pero pocos trabajos han abordado el análisis químico (Monje y Baran, 2002; 2004) y morfológico (Rivera y Smith, 1979; Hartl et al., 2007) y menos aún se han mencionado minerales que no sean de calcio (Monje y Baran, 2000; 2005; Terrazas et al., 2005).

Bárcenas-Argüello et al. (2010) registraron que *Cephalocereus apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. totalapensis* presentan cristales de oxalato de calcio con casi el mismo grado de hidratación y que las diferencias en su morfología se deben al ambiente geológico y climático en el cual crece cada una. Sin embargo, preguntas sobre qué tan variables son las formas cristalinas y si hay un patrón de variación dentro de cada especie están aún por responderse. Los objetivos de la presente investigación son identificar el tipo de oxalato de calcio, registrar la morfología de los cristales a través de diferentes técnicas microscópicas, determinar la composición elemental de las diferentes morfologías y relacionarlas con la filogenia de las especies.

Material y Métodos

Especies

Cephalocereus apicicephalium, *C. nizandensis* y *C. totolapensis* son cactáceas de hábito columnar con ramificación basítona y pseudocefalio apical (Vázquez-Sánchez, 2005). Las tres especies habitan en la selva baja caducifolia de la Cuenca del Río Tehuantepec, en el sureste del estado de Oaxaca (Bravo-Hollis, 1978; Bárcenas-Argüello et al., 2010). En esta región, cinco poblaciones de las tres especies fueron seleccionadas para caracterizar sus inclusiones minerales.

Muestreo y trabajo de laboratorio

En cada población se seleccionaron al azar dos ramas de plantas vivas y de la parte media de cada rama se obtuvieron dos segmentos de 1 cm del tejido dérmico y fundamental, los cuales se colocaron en una solución de formaldehído-alcohol-ácido acético (FAA) y fueron preparados para ser observados a través de un microscopio Olympus BX-50, conectado a una cámara de video Hitachi KPD51 y a un analizador de imágenes mediante el programa Image Pro-Plus, versión 3.1 (Media Cybernetics, 1997) siguiendo el método descrito por Loza-Cornejo y Terrazas (1996).

Cuatro ramas jóvenes de individuos diferentes se seleccionaron al azar en cada sitio: dos fueron colocadas en nitrógeno líquido y las otras se mantuvieron vivas. Las ramas en nitrógeno líquido fueron liofilizadas, molidas y tamizadas. La fracción fina ($< 2 \mu\text{m}$) fue analizada con difracción de rayos X (Cu-K radiación α a 35 kV y 25 mA) usando una muestra aleatoria de polvo. También se aislaron cristales los cuales se montaron con resina y se fotografiaron con una cámara digital marca Canon montada sobre un microscopio petrográfico Olympus (B52). Cerca de 100 cristales por población fueron descritos usando luz polarizada plana (LPP), luz polarizada cruzada (LPC), luz incidente (LI) y compensador de yeso (OIL) (Bullock et al., 1985). Se evaluaron propiedades físicas y ópticas como hábito, color, transparencia, relieve, birrefringencia, extinción y elongación.

Se removieron las espinas de las ramas que se mantuvieron vivas. Después de lo anterior, las ramas fueron cortadas y licuadas y se separó el tejido denso con un colador. Los cristales y el agua se colocaron en frascos y por decantación se recuperaron los cristales los cuales fueron lavados con agua destilada (Al-Rais et al., 1971). Se tomaron de cada población entre 25-40 cristales, los cuales fueron montados en un portamuestras de aluminio recubierto con una cinta conductiva a base de carbón y se cubrieron con una capa de oro en una campana ionizadora de metales y se fotografiaron con un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-2460N. La morfología de los cristales se describió siguiendo la terminología de Franceschi y Horner (1980) y la clasificación mineralógica de acuerdo con Frey-Wyssling (1981) y Hartl et al. (2007). Para determinar la composición elemental se usaron de 22 a 95 cristales por especie y se utilizó un JEOL JSM-35C acoplado con un equipo de energía dispersiva de rayos X (EDX) Tracor Northern.

Resultados

Difracción de rayos X

El análisis de DRX confirmó que las tres especies sintetizan weddellita. Las fases cristalinas de este mineral difieren en la intensidad con respecto a las consignadas en las cartas dependiendo de la especie. *Cephalocereus apicicephalium* y *C. nizandensis* presentan la forma $C_2CaO_4 \cdot 2.25 H_2O$ mientras que *C. totolapensis* presenta la forma $C_2CaO_4 \cdot 2 H_2O$ (Fig. 2.1).

Microscopio óptico

Los cristales se observaron en epidermis y tejido cortical (Fig. 2.2). La epidermis es uniestratificada de células rectangulares con una media de $30.68 \mu m \pm 5$ en el largo y $17.45 \mu m \pm 3$ de ancho. La cutícula es lisa y delgada ($3.01 \mu m \pm 1.1$). Las tres especies presentan abundantes cristales prismáticos y de tamaño variable en el lumen celular de la epidermis. Ninguna especie presenta cristales en la hipodermis. Las células del tejido cortical son isodiamétricas, más grandes que las células epidérmicas e hipodérmicas y algunas presentan drusas.

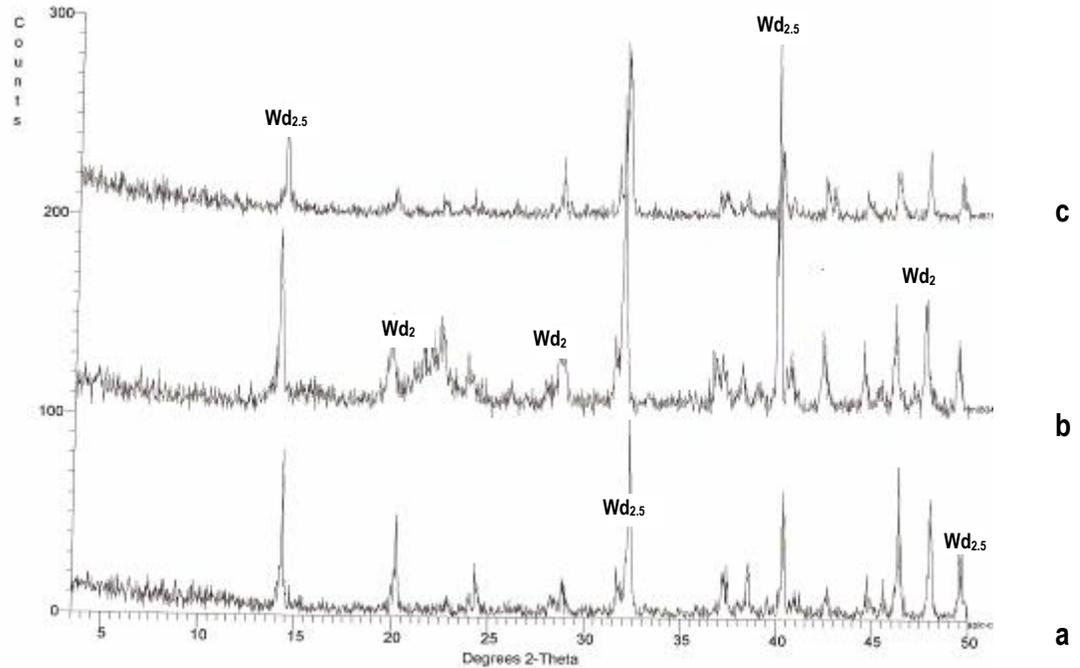


Figura 2.1. Patrón de difracción de rayos X de weddellita en especies de *Cephalocereus*: a: *C. apicicephalium*, b: *C. totolapensis*, c: *C. nizandensis*.

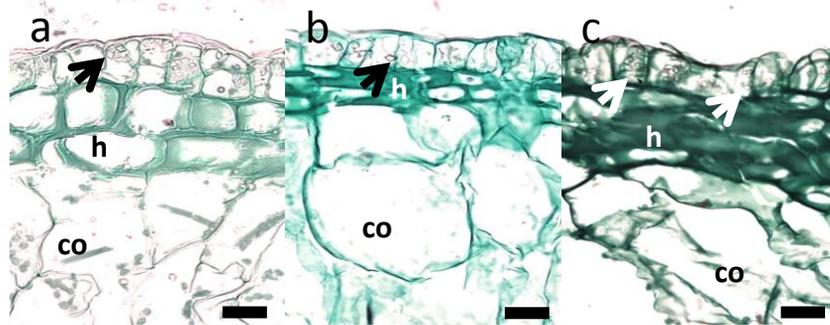


Figura 2.2. Células epidérmicas de la parte media de los tallos de las especies de *Cephalocereus*. a: *C. apicicephalium*, b: *C. nizandensis*, c: *C. totolapensis*.

Microscopio petrográfico

Las propiedades ópticas que presenta la weddellita en las especies de *Cephalocereus* se describen en el Cuadro 2.1. Algunas de ellas como el hábito, la birrefringencia y el color se presentan en la Figura 2.3a-c. Los cristales se encuentran con diferente orientación, debido a su crecimiento aleatorio por lo que no fue posible determinar su signo de elongación pues los colores amarillos y azules de primer orden aparecen intercalados.

Cuadro 2.1. Propiedades físicas y propiedades ópticas de la weddellita encontrada en las especies de *Cephalocereus*.

Propiedad	Descripción
Hábito	Solitarios: prismáticos Agregados: drusas, radiales y botroidales
Color	Blanca / Incolora
Transparencia	Transparente / Opaco
Relieve	Fuertemente positivo
Birrefringencia	Tercer orden
Angulo de extinción	No tiene
Signo de elongación	No tiene alargamiento

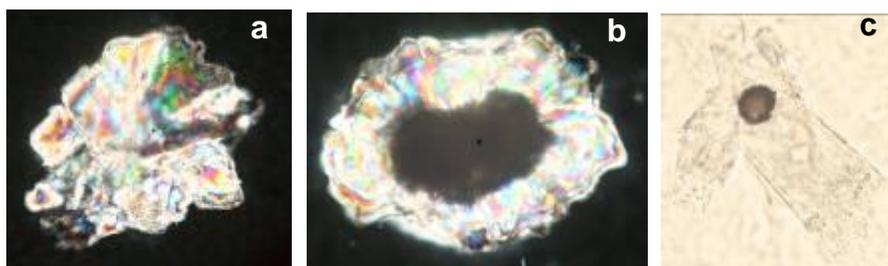


Figura 2.3. Propiedades ópticas de los cristales de weddellita en especies de *Cephalocereus*; a: hábito agregado, b: birrefringencia de tercer orden, c: incolora y transparente. a-b: LPC (luz polarizada cruzada); c: LPP (luz polarizada plana).

En los cristales se observó un centro negro e isotrópico rodeado de un halo concéntrico pardo oscuro y al exterior se observó un material transparente en LPP y birrefringencia de tercer orden en LPC. Al utilizar el compensador de yeso (OIL), el centro no adquirió el color rosa característico de los espacios vacíos.

Aparentemente el centro de los agregados está compuesto de materiales amorfos por su isotropía (Fig. 2.4a-c); sin embargo, cuando se observó con luz incidente, el núcleo presentó un empaquetamiento denso de partículas en color blanco que refleja fuertemente la luz y el exterior es de apariencia nubosa blanquecina (Fig. 2.4d). Algunos cristales no presentan un centro bien definido (Fig. 2.3a).

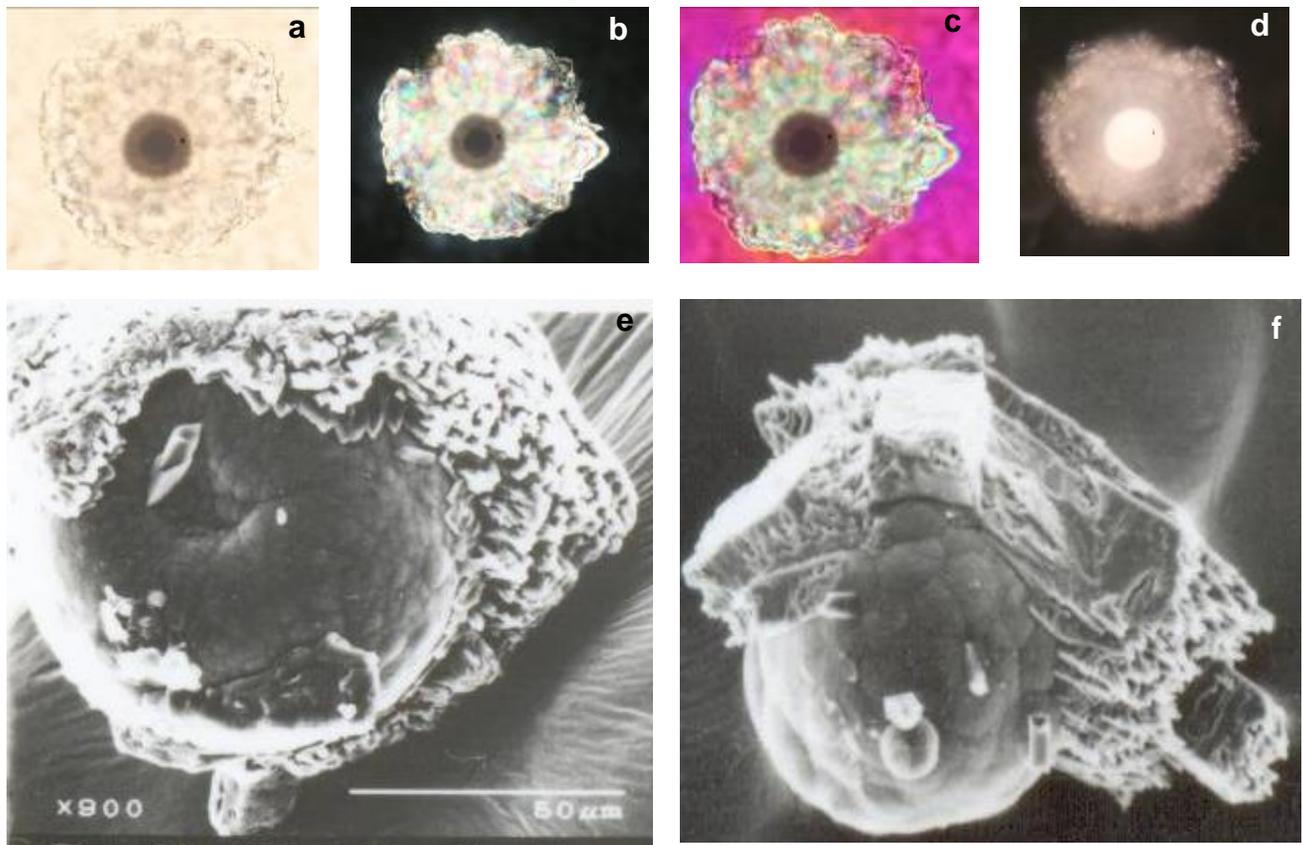


Figura 2.4. Morfología y propiedades ópticas de los centros de los cristales de weddellita; **a:** LPP (luz polarizada plana); **b:** LPC (luz polarizada cruzada); **c:** OIL (compensador de yeso); **d:** LPC más LI (luz incidente); e-f: microscopio electrónico de barrido.

Microscopio electrónico de barrido (MEB)

Mediante el MEB se observó que la weddellita es polimórfica en las tres especies de *Cephalocereus*. Se encontraron agregados esféricos con cristales individuales (drusas) creciendo perpendicularmente con respecto al núcleo; los cristales individuales pueden ser prismas (Fig. 2.5c-d) o láminas (Fig. 2.5a-b, g-h). Se observaron también otros agregados no esféricos constituidos principalmente por cristales prismáticos (Fig. 2.5e-f); agregados botroidales (Fig. 2.5k) y prismas solitarios (Fig. 2.5l). Se distinguió el centro de los cristales agregados el cual tenía hábito botroidal (Fig. 2.4e-f); en ambos casos los centros se aprecian diferentes al cristal que los rodea.

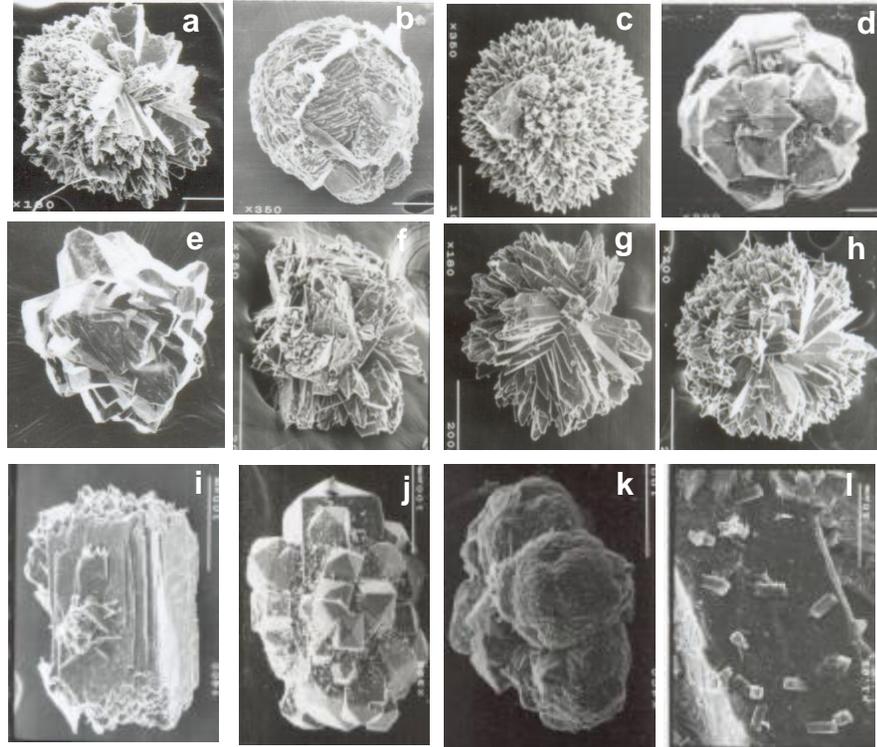


Figura 2.5. Varias formas de weddellita encontradas en especies de *Cephalocereus*. c-d: drusas de prismas; a-b, g-h: drusas de láminas, e-f, i-j: agregados no esféricos de cristales prismáticos; k: agregado botroidal y l: prismas solitarios.

Sistemas cristalinos

Cada especie presenta formas cristalinas predominantes pero otras se comparten (Cuadro 2.2, Fig. 2.6). Por ejemplo, los prismas trigonales se encuentran en las tres poblaciones de las tres especies, mientras que los pinacoides rómbicos caras (021) y (010) están en las tres especies, pero sólo en algunas poblaciones: Mixtequilla, Nizanda y Asunción Tlacolulita. Los estiloides con maclas de contacto sobre el plano b se encuentran sólo en las poblaciones de La Mata y San Bartolo. En cuanto a las formas exclusivas de una especie se encontró que sólo en *C. totolapensis*, en la población de San Bartolo hay prismas monoclinicos formando macla de penetración (Fig. 2.6t) y sólo en Nizanda hay prismas tetragonales con caras (100) (001) (101) (011) (Fig. 2.6i).

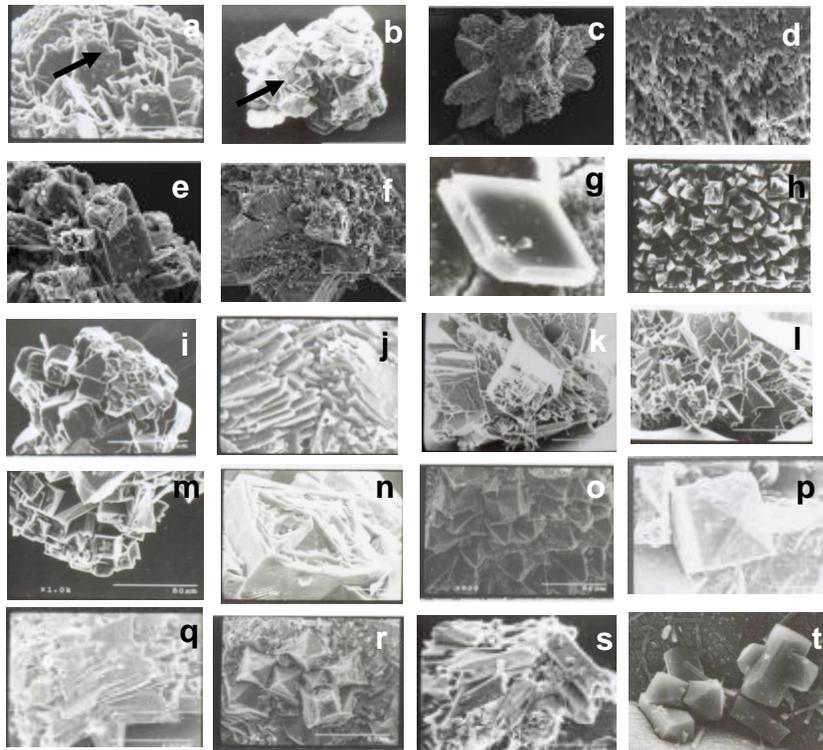


Figura 2.6. Sistemas cristalinos. a-f: *C. apicicephalum*; g-n *C. nizandensis*; o-t *C. totolapensis*.

Energía dispersiva de rayos X (EDX)

El análisis con EDX detectó diferentes concentraciones de Ca y cantidades significativas de otros elementos tales como Si, Mg, Na, K, Cl y Fe (Cuadro 2.3). No se encontraron diferencias en los porcentajes de la composición elemental entre las especies. Los cristales de las tres especies contienen más de 90% de calcio en su composición. La cantidad de Si oscila entre 0.95 y 2.19%. El Na, Mn y Mg son otros elementos abundantes en algunas poblaciones de las especies. De manera general, los cristales que forman agregados esféricos presentan menos calcio y más silicio. El análisis de los seis centros encontrados, mostraron que su composición principal es Ca, pero tienen un alto contenido de Si y otros siete elementos en concentraciones menores al 1% (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.2. Sistemas cristalinos, clase, forma e índice de Miller de los cristales de las especies de *Cephalocereus* por localidad. (número de figura), ni = no ilustrado, - no encontrado.

Clasificación cristalográfica	<i>C. apicicephaliur</i>		<i>C. nizandensis</i>		<i>C. totolapensis</i>	
	Mixtequilla	Nizanda	La Mata	Tlacolulita	San Bartolo	
Sistema: Tetragonal. 4/m2/m2/m. Prisma {100} (100) (001) (110)	-	(2.6k)	(2.6m)	-	-	
Sistema: Tetragonal. 4/m2/m2/m. Prisma {100} (100) (110) (101)	(2.6b)	ni	(2.6n)	(2.6p)	ni	
Sistema: Tetragonal. 4/m2/m2/m. Prisma {100} (100) (001) (101) (011)	-	(2.6i)	-	-	-	
Sistema: Tetragonal. 4/m2/m2/m. Bipirámide {111}	-	-	-	(2.6r)	ni	
Sistema: Ortorombico. 2/m2/m2/m. Pinacoide {100} (100) (010) (021)	(2.6a)	(2.6g)	-	(2.6o)	-	
Macla de penetración	-	-	-	-	(2.6t)	
Estiloide maclado sobre plano b(010)	-	-	(2.6l)	-	(2.6s)	

Cuadro 2.3. Análisis elemental en cristales de weddellita por localidad de cada especie.

Especie	N	Ca	Si	Ti	Al	Fe	Mg	Mn	Na	K	Cl
<i>C. apicicephaliur</i>	22										
Mixtequilla		90.01	2.19	0.22	0.32	0.57	1.16	0.68	2.42	0.76	1.65
<i>C. nizandensis</i>	95										
La Mata		94.01	0.95	0.51	1.95	0.31	0.37	0.30	0.79	0.06	0.36
Nizanda		94.36	1.95	0.30	0.37	0.24	0.32	0.47	1.43	0.13	0.31
<i>C. totolapensis</i>	62										
Tlacolulita		93.65	1.64	0.64	0.57	0.90	0.24	0.51	0.98	0.33	0.54
San Bartolo		90.27	1.76	0.81	0.46	1.00	1.04	0.60	3.39	0.11	0.55

Cuadro 2.4. Concentración elemental de los centros de los cristales de weddellita encontrados en las especies de *Cephalocereus*, comparados con la concentración elemental del cristal que crece alrededor del centro

	Ca	Si	Ti	Al	Fe	Mg	Mn	K	Cl
Centros	90.57	4.64	0.28	0.45	0.65	0.70	0.36	0.38	0.36
Alrededor	96.83	0.76	0.00	0.46	0.00	0.03	0.53	0.00	0.32

Discusión

Composición química

La composición de los cristales en cactáceas se ha registrado en pocos estudios (Rivera y Smith, 1979; Monje y Baran 2000, 2002, 2004, 2005; Malainine et al., 2003; Hartl et al., 2007). Aunque predominan los informes sobre de oxalatos de calcio mono y dihidratados (Rivera y Smith, 1979; Malainine et al., 2003; Hartl et al., 2007), también se han registrado ópalo, calcita y oxalatos de magnesio (Monje y Baran 2000, 2002, 2004, 2005). Hartl et al. (2007) habían registrado whewellita en *C. apicicephalium*, pero nosotros encontramos que *Cephalocereus apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. totolapensis* sintetizan weddellita y conjuntamente, hay más de ocho elementos presentes en diferentes concentraciones. Nuestros resultados sugieren que no hay una asociación clara entre la concentración de calcio u otros elementos con la forma agregada del cristal, pero la diversidad morfológica debe estar relacionada con la composición elemental, ya que las estructuras cristalinas pueden modificarse cuando otros elementos entran a formar parte de las moléculas (De Yoreo y Dove, 2004). Es de notar que, la concentración de Ca en la weddellita de las tres especies fue superior a 80%, cantidad casi cuatro veces mayor a la referida en mono y dihidratados (Webmineral.com) y al 21.67% de Ca registrado en la madera de *Quercus petraea* Liebl. (Vansteenkiste et al., 2007) clasificado como trihidratado. Este hallazgo es relevante debido a que en los suelos donde crecen las especies aquí estudiadas no hay calcio soluble en cantidades significativas (Bárcenas-Argüello et al., 2010).

Morfología y polimorfismo

En los biominerales (King, 1969) se ha demostrado que la morfología de un cristal está determinada por mecanismos que operan en las vacuolas (Franceschi y Nakata, 2005). De acuerdo con Volk et al. (2002) la morfología más sencilla requiere menos gasto energético cuando se necesitan disolver bajo condiciones de deficiencia de calcio. La weddellita de los tallos de *Cephalocereus* tiene diferente hábito dependiendo del tejido en el cual se localiza: cristales prismáticos solitarios en las células epidérmicas y agregados (drusa, botroidal y radial) en las células del tejido cortical. Posiblemente el gasto energético en la formación de los cristales prismáticos se compensa al ser protectores de la fotosíntesis, mientras que las drusas evitan el colapso celular cuando se pierde la succulencia en el tejido fundamental. Si bien la presencia de cristales había sido mencionada para algunas especies del género (Gibson y Horak, 1978; Terrazas y Loza-Cornejo, 2002; Terrazas y Arias, 2002), estos resultados revelaron que este mineral presenta varias morfologías en las tres especies de *Cephalocereus*. Una sustancia que tiene la habilidad de cristalizar en más de un tipo de estructura es polimórfica y puede deberse a condiciones de presión, temperatura o ambas (Klein et al., 1999). El polimorfismo del oxalato de calcio ha sido referido previamente por Tillman-Sutela y Kaippi (1999) en las semillas de *Picea abies* (L.) Karst., que depende del hábito cristalográfico y del estado de hidratación (Hartl et al., 2007), aunque también se han encontrado cristales de la misma morfología en los dos estados de hidratación en plantas (Frey-Wyssling, 1981; Nakata, 2003). La weddellita presente en las tres especies de *Cephalocereus* tiene diversidad en clases cristalinas que no corresponden al estado de hidratación como lo menciona Sterling (1964). Por lo tanto, los resultados sugieren que en este género el estado de hidratación está determinado genéticamente (Franceschi y Horner, 1980); mientras que la morfología está influida por el ambiente edáfico en el cual crecen (Bárcenas-Argüello et al., 2010). De acuerdo a lo anterior, proponemos utilizar la terminología usada en cristalografía por ser ésta más precisa, comparable y que permitirá mejores interpretaciones en las descripciones morfológicas.

Núcleo

Las propiedades ópticas del núcleo de los agregados cristalinos de weddellita se mencionan por primera vez para Pachycereinae. Los núcleos son importantes debido a que son el primer estado en el crecimiento de un cristal, lo que significa que éste puede crecer sólo hasta que el núcleo ha sido formado (Klein, 1999). La nucleación inicia cuando hay un cambio de temperatura o de concentración (Ward, 2005) y por lo tanto es el primer producto de la precipitación. En el caso de las vacuolas, que son un ambiente rico en agua y iones en solución, la señal podría estar dada cuando ocurren diferentes factores como: disminución en la concentración de la enzima oxalato-oxidasa (Volk, 2002), aumento en la concentración de glicolato (Yu et al., 2010) o formación de una matriz de proteínas (Li et al., 2003), como sucede en otras plantas. Algunos de estos factores pueden estar contribuyendo a la precipitación rápida de weddellita en *Cephalocereus*. No obstante, es necesario que se lleven a cabo estudios a nivel bioquímico para tratar de comprender los factores o las condiciones que generan una precipitación rápida. Y aún más, el centro está compuesto de calcio en un 90% de acuerdo al análisis de EDAX y éste es el primer informe para la composición elemental del centro de los cristales agregados de weddellita. Hasta antes de estos resultados sólo se habían ilustrado los núcleos de drusas de especies de las subfamilias Cactoideae y Opuntioideae (Monje y Barán, 2002) y se había planteado que el núcleo era de naturaleza orgánica (Horner y Wagner, 1995). De acuerdo a lo anterior, sugerimos que el estudio de los núcleos aporta un elemento más a la afirmación de Franceschi y Nakata (2005) sobre que la formación de oxalatos de calcio no es un simple evento de precipitación.

Importancia en la sistemática

Las cinco especies de *Cephalocereus* (*C. columna-trajani* y *C. senilis* datos no publicados) sintetizan weddellita. De las 15 especies de Pachycereae *sensu* Arias et al. (2005) mencionadas por Hartl et al. (2007), cinco especies sintetizan whewellita y las demás weddellita, por lo que es necesario estudiar otras especies de los géneros *Echinocereus* y *Neobuxbaumia* y confirmar si los cristales de

whewellita son exclusivos de estos géneros dentro de la tribu. La descripción de la morfología de weddellita en *Cephalocereus* permitió establecer que el hábito de los cristales prismáticos solitarios es un carácter compartido por las tres especies y otros miembros del clado *Pseudomitrocereus-Neobuxbaumia-Cephalocereus* (Terrazas y Arias, 2002; Arias et al., 2003). Caso contrario ocurre con el hábito agregado, agregados radiales conspicuos en *C. nizandensis*, drusas en *C. apicicephalium* y botroidales en *C. totolapensis*. Los núcleos de los cristales y los cristales de las tres especies comparten las propiedades ópticas aquí descritas, independientemente de la especie de la cual provenían. Con base en lo anterior, es necesario hacer un análisis más detallado para describir la morfología de los cristales en más especies de Cactaceae, poder vislumbrar la evolución de este carácter y valorar su importancia filogenética.

Conclusiones

Las especies de *Cephalocereus* aquí estudiadas contienen weddellita. Los cristales de oxalato de calcio presentan hábito simple y agregado y pertenecen a más de diez clases cristalinas, asociadas con las bajas concentraciones de ocho elementos. Seguramente el estado de hidratación del oxalato se conserva genéticamente y las diversas formas encontradas están relacionadas con el ambiente geológico en que estas especies crecen. La variación entre sitios en sus cristales es menor que entre especies por ello se confirma su valor en la taxonomía.

CAPÍTULO III

GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Resumen

Las semillas de Cactaceae pueden ser fotoblásticas positivas o negativas en la germinación, el tamaño de la semilla influye en la velocidad de germinación y presentan modificaciones relacionadas con los diferentes grados de domesticación. Debido a las condiciones edáficas que restringen el crecimiento de las tres especies istmeñas de *Cephalocereus* y a sus características de fructificación se llevaron a cabo pruebas de germinación con los objetivos de conocer el porcentaje y la velocidad de germinación y la comparar la respuesta germinativa entre especies y entre poblaciones. Se recolectaron frutos de *C. apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. totolapensis*. Las semillas fueron separadas del fruto por disección, se lavaron, secaron y clasificaron en semillas viables, abortadas y germinadas. Las semillas viables se sembraron en cuatro fechas y se colocaron en una cámara de ambiente controlado. Los porcentajes de germinación se analizaron con la prueba de Tukey y las curvas de germinación fueron analizadas con el procedimiento LIFETEST. Los porcentajes y la velocidad de germinación fueron diferentes para las tres especies. También existen diferencias en el porcentaje de germinación entre poblaciones y entre fechas de siembra. El proceso de germinación en las tres especies de *Cephalocereus* inicia al primer o segundo día después de la siembra. En condiciones de campo, este comportamiento puede favorecer el establecimiento de las plántulas. Bajo las condiciones en que se llevó a cabo este trabajo, no encontramos evidencia de que las semillas pierdan su capacidad de germinar a medida que pasan los días después de la colecta. Las diferencias en germinación entre sitios de colecta de la misma especie pueden haberse adquirido debido a los factores ambientales que predominan en cada población.

Palabras clave: *Neodawsonia*, .velocidad de germinación, lifetest

Introducción

Los estudios sobre germinación de semillas en taxones de la familia Cactaceae se han incrementado en las últimas dos décadas (Benítez-Rodríguez et al., 2004; Flores et al., 2005, 2006; Sánchez-Soto et al., 2005; Cervera et al., 2006; Méndez et al., 2006; Ortega-Baes y Rojas-Aréchiga, 2007; Rodríguez-Ortega et al., 2007; Flores et al., 2008; Sánchez-Soto et al., 2010; Ortega-Baes et al., 2010), en particular especies de la tribu Pachycereeae (Loza-Cornejo et al., 2003; Ayala-Cordero et al., 2004; Ramírez-Padilla y Valverde, 2005). Se tienen registros que el tamaño de la semilla influye en la velocidad de germinación, además de que pueden ser fotoblásticas positivas o negativas en la germinación, y presentar modificaciones relacionadas con los diferentes grados de domesticación (Rojas-Aréchiga et al., 2001; Guillen et al., 2009, 2010). Aunque *Cephalocereus* es un miembro de la tribu Pachycereeae, no se cuenta con información básica sobre tiempo de germinación y primeros estados de desarrollo. Sin embargo, desconocemos si las especies, de distribución restringida en el Istmo de Tehuantepec, tienen un patrón semejante a nivel de especie y a nivel de población que aquellas que se encuentran en el Altiplano Mexicano.

Cephalocereus apicicephalium, *C. nizandensis* y *C. totalapensis* son tres especies con distribución geográfica restringida y limitada por factores geológicos (Bárcenas-Argüello et al., 2010). Los periodos de floración y fructificación de las tres especies se registran en la temporada de lluvias, por lo cual se pueden encontrar, en la misma planta, botones florales, flores en anthesis, frutos en maduración y frutos dehiscentes con semillas y sin semillas. Las semillas presentan un síndrome de dispersión anemocoro, las cuales son dispersadas por los fuertes vientos que soplan en donde crecen *C. apicicephalium* y *C. nizandensis*. Además, en *C. totalapensis* es muy notorio que no hay sincronía en la floración entre poblaciones, pues mientras en algunas hay abundancia de frutos en maduración, en otras son más frecuentes los frutos dehiscentes sin semillas (Bárcenas-Argüello, datos sin publicar). Debido a las condiciones edáficas que restringen el crecimiento de las especies y a sus características de fructificación, suponemos que la

germinación es muy rápida y favorece a las semillas recién maduras y que el establecimiento de sus plántulas en los escasos sitios seguros, ocurre durante la misma temporada de lluvias.

El objetivo de este trabajo es conocer las características que distinguen la germinación de las tres especies, mediante el registro del porcentaje y la velocidad de germinación de cada especie; se comparó la respuesta germinativa entre las tres especies y entre poblaciones de cada especie. Las dos hipótesis de trabajo son: que las semillas perderán capacidad de germinación a medida que pasen los días después de la colecta y que la velocidad de germinación es diferente entre especies pero no entre sitios de colecta de la misma especie.

Material y Métodos

Material biológico

Cephalocereus apicicephalium, *C. nizandensis* y *C. totolapensis* son tres especies endémicas del bosque tropical caducifolio en el Istmo de Tehuantepec en Oaxaca, México (Bravo-Hollis, 1978; Bárcenas-Argüello et al., 2010). El área de estudio se ubica entre 16°15' - 16°41' N y 94°56' - 96°08' O, en una amplitud altitudinal de 163 hasta 1,000 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m.).

Cuadro 3.1. Poblaciones de las tres especies de *Cephalocereus* donde se recolectaron semillas para su germinación.

Espece	Latitud	Longitud	Altitud (metros)	Pendiente (%)	Tipo de suelo	Ca soluble (ppm)
<i>C. apicicephalium</i>						
Guiengola 1	16°22.86'	95°18.55'	325	100	acumulación de restos orgánicos	93.58
Guiengola 2	16°23.06'	95°19.05'	300	100	acumulación de restos orgánicos	93.58
<i>C. nizandensis</i>						
Nizanda	16°10.12'	95°00.00'	206	67	acumulación de restos orgánicos	104.54
La Mata	16°36.50'	94°56.67'	200	100	acumulación de restos orgánicos	84.76
<i>C. totolapensis</i>						
Las Margaritas	16°41.59'	96°18.19'	1 000	44	suelo franco arcillo-arenoso	67.28
Boquerón	16°34.36'	96°08.22'	822	26	suelo franco-arenoso	39.27
San Bartolo	16°26.10'	95°51.57'	675	44	suelo franco arcillo-arenoso	72.47

De las poblaciones conocidas para las tres especies se seleccionaron dos o tres poblaciones por especie (Cuadro 3.1) y en cada una de ellas se recolectaron tres frutos de tres individuos. Las semillas fueron separadas del fruto por disección y se lavaron con agua corriente, se colocaron sobre papel absorbente y se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente (17-21 °C). De acuerdo al criterio de apariencia propuesto por Ayala-Cordero et al. (2004) se clasificaron en semillas viables, abortadas y germinadas.

Germinación

Las semillas viables se sembraron en cuatro fechas, la primera 100 días después de la colecta de los frutos (ddc), la segunda 130 ddc, la tercera 190 ddc y la cuarta 220 ddc, excepto para la población Boquerón que no hubo semillas suficientes para ser germinadas en las cuatro fechas de siembra.

Las semillas viables fueron desinfectadas superficialmente por inmersión de cinco minutos en una solución comercial de hipoclorito de sodio al 10%, se enjuagaron con agua corriente y se sembraron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con papel filtro estéril saturado con agua destilada. Se colocaron 30 semillas en cada caja y dos o tres cajas por sitio de colecta (dependiendo del número de semillas disponibles). Las cajas de Petri se colocaron en una cámara de ambiente controlado (TC-32 Warren Sherer, Kysor Industrial Corp., Division Marshall, Michigan) a una temperatura diurna de 24°C y nocturna de 20°C, un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. La germinación se registró diariamente durante 30 días (Baskin y Baskin, 2001), considerando una semilla germinada cuando emergía la radícula (Dubrovsky, 1998).

Análisis

Se utilizó el análisis de varianza seguido de un análisis de comparación de medias con la prueba de Tukey ($P < 0.05$), para evaluar diferencias en los porcentajes de germinación entre las especies y entre los sitios de colecta en cada especie.

Las curvas de germinación para las especies, los sitios y las cuatro fechas fueron analizadas con el procedimiento LIFETEST (SAS, 1989) y comparadas entre pares de curvas por el mismo método (Fox, 1993). El análisis de Lifetest compara la respuesta de las curvas de germinación. La prueba de Wilcoxon se utilizó si las curvas de germinación se cruzan y, en caso contrario, se utilizó la prueba de Log-Rank (SAS, 1989; Fox, 1993).

La velocidad de germinación se calculó con la fórmula $M = \Sigma(n_i/t)$, propuesta por Maguire (1962); donde n_i es el número de semillas germinadas el i -ésimo día y t es el tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla.

Resultados

La germinación fue diferente para las tres especies estudiadas (Fig. 3.1). De *Cephalocereus apicicephalium* germinó el 55.1%, *C. nizandensis* 43.3% y de *C. totolapensis* sólo germinó el 38.8% (Log-Rank $\chi^2 = 33.4733$; g.l.= 2; $P < 0.0001$).

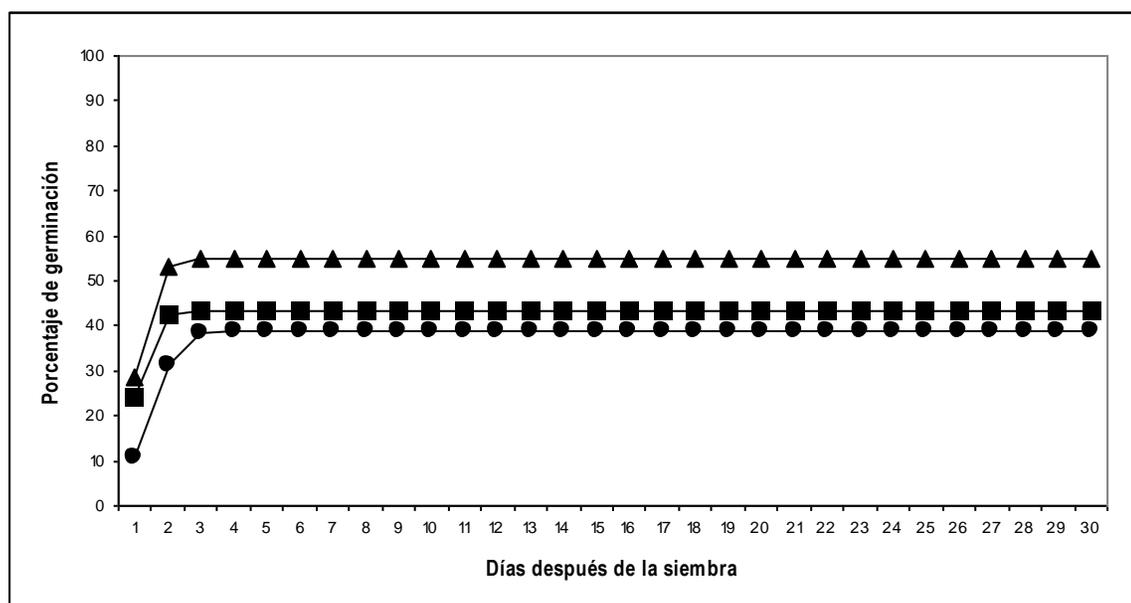


Figura 3.1. Germinación de semillas de *Cephalocereus* por especie; ▲: *C. apicicephalium*, ■: *C. nizandensis*, ●: *C. totolapensis*. Las curvas son estadísticamente diferentes ($P < 0.0001$).

Todas las semillas que germinaron lo hicieron antes de los cinco días después de la siembra (dds). El mayor número de semillas germinadas se presentó en el primero y segundo día después de la siembra. La velocidad de germinación difiere entre especies y sólo en *C. nizandensis* se observó que ésta disminuye a medida que pasan los días después de la colecta (ddc) (Cuadro 3.2). En *C. apicicephalium* y en *C. totolapensis* no fué posible determinar una tendencia entre el porcentaje de germinación y la fecha de siembra (Fig. 3.2 a-b).

Cuadro 3.2. Velocidad de germinación (semillas/día) de las semillas de tres especies de *Cephalocereus* según la fecha de siembra.

Especie	100 ddc*	130 ddc	190 ddc	220 ddc
<i>C. apicicephalium</i>	24.00	41.50	6.00	16.67
<i>C. nizandensis</i>	24.00	18.00	17.50	11.67
<i>C. totolapensis</i>	11.33	12.50	6.67	9.67

*ddc = días después de la colecta (fecha de siembra)

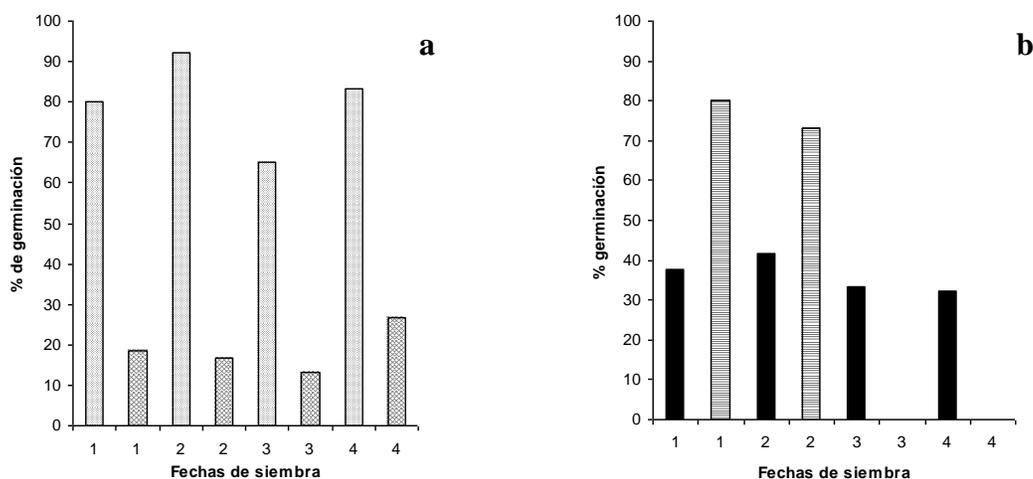


Figura 3.2. Germinación de semillas por población. a. *Cephalocereus apicicephalium*: ▨ Guiengola 1 y ▩ Guiengola 2. b. *C. totolapensis*: ■ Las Margaritas y ≡ Boquerón. Fechas de siembra 1: 100 días después de la colecta (ddc), 2: 130 ddc, 3: 190 ddc, 4: 220 ddc.

Existen diferencias en el porcentaje de germinación entre poblaciones de las tres especies. En *C. apicicephalium* la germinación en la población Guiengola 1 fue superior a la germinación en la población Guiengola 2; en *C. nizandensis* sólo germinaron las semillas de la población de La Mata y en *C. totolapensis* la población Las Margaritas tuvo porcentajes similares de germinación al margen de la fecha de siembra, mientras que la germinación de la población Boquerón fue superior a la población Las Margaritas (Fig. 3.2 a-b). Las semillas de las poblaciones de Nizanda y San Bartolo no germinaron en ninguna fecha de siembra.

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre fechas de siembra (Wilcoxon $\chi^2 = 8.0126$; g.l.= 3; $P < 0.0458$) (Fig. 3.3a-d).

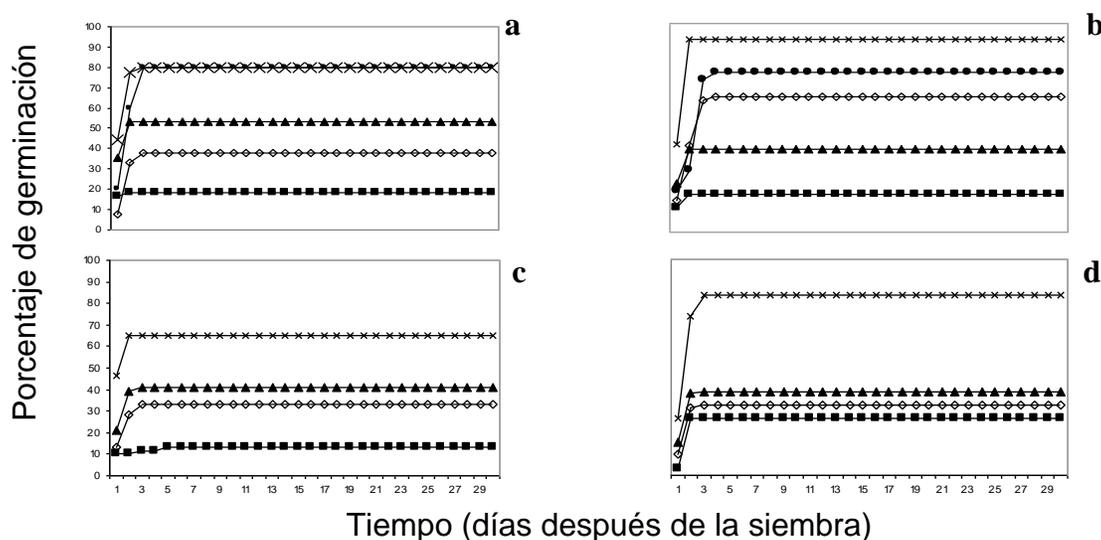


Figura 3.3. Germinación de semillas de *Cephalocereus* por fecha de siembra. a: 100 días después de la colecta (ddc), b: 130 ddc c: 190 ddc, d: 220 ddc. *C. apicicephalium*, x: Guiengola 1, ■: Guiengola 2. *C. nizandensis*, ▲: La Mata. *C. totolapensis*, ◇: Las Margaritas, ●: Boquerón.

Discusión

Las semillas de las especies de *Cephalocereus* germinaron en los primeros cinco días después de la siembra, esto difiere de otras especies de la tribu Pachycereeae como *Stenocereus beneckeii* y *S. queretaroensis* las cuales germinaron a partir del quinto y sexto día, respectivamente (Loza-Cornejo et al.,

2003; Ayala-Cordero et al., 2004), pero coincide con lo mencionado por Godínez-Alvárez y Valiente-Banuet (1998) y Rivera-Aguilar et al. (2005) para *Coryphantha pallida*, *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus flavovirens*, *F. latispinus*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Opuntia puberula* y *Pachycereus hollianus*, cuyas semillas germinaron entre el segundo y el quinto día. La mayoría de las semillas de *Cephalocereus* germinaron en el primero y segundo día. Este comportamiento no es común en Cactaceae, aunque las primeras semillas de *Astrophytum asterias* germinaron tres días después de la siembra (Strong y Williamson, 2007), al igual que las de *Mammillaria mazatlanensis* y *Stenocereus alamosensis* (Sánchez-Soto et al., 2005, 2010). El 50% de las semillas de *Stenocereus thurberi* y *S. alamosensis* sometidas a un tratamiento pregerminativo de hidratación/deshidratación germinaron al tercer día de la siembra (Sánchez, 2005). *Cephalocereus apicicephalium* alcanzó 47%, *C. nizandensis* el 35% y *C. totolapensis* el 20% de germinación al día siguiente de la siembra y sin ningún tratamiento. Otra especie del mismo género *C. columna-trajani* llegó a más del 20% (Alvarez y Montaña, 1997). Esta respuesta germinativa rápida puede ser ventajosa para las especies istmeñas de *Cephalocereus* las cuales aprovechan el régimen de lluvias intermitente (Andrade y Vázquez, 1981) y al igual que otras especies usan rocas nodriza (Sánchez-Soto et al., 2010; Peters et al., 2008), que ayudan a mantener la la humedad del suelo (García-Sánchez y Monroy-Ata, 2005). Además, en los sitios donde crecen *C.*; *apicicephalium* y *C. nizandensis*, el agua se acumula en grietas y cavidades rocosas, lo cual puede favorecer una mayor germinación y asegurar el establecimiento de las plántulas como ocurre en *Pilosocereus leucocephalus* (Munguía-Rosas y Sosa. 2008.).

En los ensayos de germinación se espera la misma respuesta tratándose de una especie en diferentes poblaciones. Sin embargo, Godínez-Alvarez et al. (2005), encontraron que semillas de *Stenocereus stellatus* de dos sitios de colecta mostraron diferencias, tanto en la velocidad como en el porcentaje final de germinación. De igual manera se encontraron discrepancias en el índice de germinación y la proporción de semillas germinadas entre tres poblaciones de *Strombocactus disciformis* y de *Turbinicarpus pseudomacrolele* (Alvarez et al.,

2004). Estos autores consideran que esas diferencias pueden estar relacionadas con variación genética producida por las condiciones ambientales de cada sitio. En *Cephalocereus* encontramos diferencias en germinación entre poblaciones para la misma especie. Por ejemplo, las semillas de *C. apicicephalium* de la población Guiengola 2 presentaron un porcentaje de germinación más bajo (13-27%) que las semillas de la población Guiengola 1 (65-92%). Las plantas de la población Guiengola 1 estaban completamente expuestas al sol mientras que las plantas de la población de Guiengola 2 crecían a la sombra de árboles, por lo cual podemos suponer una diferencia en temperatura microambiental entre ambas poblaciones. Baskin y Baskin (2001) mencionan que las temperaturas bajas durante la maduración de los frutos o la dispersión de las semillas pueden inducir latencia en algunas especies, por lo que ésta podría haberse presentado en las semillas de la población Guiengola 2. Aunque desconocemos cuál es la amplitud de temperatura óptima para la maduración de las semillas de esta especie, los resultados sugieren falta de madurez en las semillas, considerando que a los 220 días después de colectadas germinaron más semillas (27%) para la población Guiengola 2 que en las fechas anteriores (18% y 13%). En *C. nizandensis* las semillas de la población de Nizanda no germinaron quizá porque cuando se recolectaron ya estaban los frutos dehiscentes y las semillas expuestas a las condiciones ambientales, lo cual pudo activar algún mecanismo de latencia secundaria (Bewley y Black, 1994) no estudiado en este trabajo, mientras que en La Mata todavía había flores y frutos en diferentes estadios de maduración cuando se colectaron. *Cephalocereus apicicephalium* y *C. nizandensis* crecen exclusivamente sobre rocas sedimentarias-calizas y aunque el calcio disponible en el suelo es escaso (Bárcenas-Argüello et al., 2010) debe explorarse la posibilidad de que las semillas requieran cierta concentración de calcio en el agua para germinar como se registró en *Echinopsis leucantha*, que alcanza un 96.6% de germinación en una solución con 10 meq L^{-1} de Ca (Méndez y Pérez, 2008). Entre las tres poblaciones de *C. totolapensis* se encontraron diferencias significativas que podrían estar influenciadas por las particularidades ambientales de cada población. Por ejemplo, las especies arbóreas que coexisten en la población de Boquerón por lo general no sombrean los

pseudocefalios de los individuos de esta especie, por lo cual no se favorece un microclima y exactamente lo contrario es lo que ocurre en la población de San Bartolo; esto es importante debido a que en ambas poblaciones las semillas se recolectaron de frutos dehiscentes, pero las semillas de Boquerón tuvieron el porcentaje de germinación más alto (77-80%), mientras que las de San Bartolo no germinaron y pudo deberse a que las semillas entraron en latencia secundaria para no germinar sobre la planta madre. Por otro lado, la población de Las Margaritas es la que se encuentra a mayor altitud y, por lo tanto, las condiciones de temperatura y humedad ambiental son diferentes e influyen sobre la fenología de la especie, pues en este lugar se encontraron flores y frutos en diferentes estadios de maduración, aunque no hubo frutos dehiscentes y en las pruebas de germinación tuvieron porcentajes de germinación (32-65%) parecidos a especies de ambientes menos secos (Wang et al., 2009).

La longevidad de las semillas es uno de los principales factores que influyen en el porcentaje de germinación, por lo cual se recomienda que el tiempo que pasa entre la recolección y la siembra debe ser mínimo porque éstas sufren cambios durante el almacenamiento (Baskin y Baskin, 2001). Si bien, las semillas de *C. apicicephalium* (92.22% 130 ddc) y *C. totalapensis* (80% 100 ddc) tuvieron porcentajes de germinación altos y pueden interpretarse como longevas, estos resultados son similares a los referidos para semillas de 88 días de *Stenocereus beneckeii* con germinación de 84% (Ayala-Cordero et al., 2004), semillas de tres meses de *Mammillaria huitzilopochtli* con 90% de germinación (Flores–Martínez, 2008) y de *Ferocactus robustus* de dos años con 82% de germinación (Navarro y González, 2007). Debido a que las pruebas de germinación de *Cephalocereus* iniciaron a los 100 ddc, se desconoce el comportamiento de las semillas en fechas más cercanas a la fecha de colecta sobre todo de *C. nizandensis* que quizá puedan responder como las semillas de menos de un mes de *Pterocereus gaumeri* con 97.3% de germinación (Mendez et al., 2006) y de *Mammillaria magnimamma* sembradas al mes con 95% de germinación (Ruedas et al., 2000) porque de acuerdo a los resultados del presente trabajo se comportaron como las semillas de cuatro años de *Turbinicarpus lophophoroides* y de un año de *Turbinicarpus*

pseudopectinatus con valores máximos de germinación de 66% y 48% respectivamente (Flores et al., 2008). Aún falta mucho por conocer en Cactaceae sobre la respuesta germinativa de las semillas a través del tiempo.

Conclusiones

El proceso de germinación en las tres especies de *Cephalocereus* inicia al primer o segundo día después de la siembra. En condiciones de campo, este comportamiento puede favorecer el establecimiento de las plántulas. Bajo las condiciones en que se llevó a cabo este trabajo, no encontramos evidencia de que las semillas pierdan su capacidad de germinar a medida que pasan los días después de la colecta, excepto quizá para la especie *C. nizandensis* cuyos porcentajes de germinación fueron los más bajos. Como se esperaba, hay diferencias significativas en la germinación entre especies, pero la homogeneidad entre sitios de colecta de la misma especie no se cumplió. Las diferencias en germinación entre sitios de colecta de la misma especie pueden haberse adquirido debido a los factores ambientales que predominan en cada población.

CAPITULO IV

FORMACIÓN TEMPRANA DE CRISTALES EN PLÁNTULAS

Resumen

Los cristales de oxalato de calcio se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal se ha estudiado su función en el metabolismo en varias familias vegetales. Las plántulas de Cactaceae se enfrentan en su medio natural a escasez de agua, temperaturas extremas y consumo por herbívoros, lo cual las hace muy susceptibles en las primeras etapas de su desarrollo. La presencia de cristales de oxalato de calcio en esta etapa puede conferirles algunas ventajas como mantener la turgencia de las células y disuadir a los herbívoros. Se pusieron a germinar semillas de *C. apicicephalum*, *C. nizandensis* y *C. totolapensis* en una cámara de ambiente controlado y el día 31 fueron transplantadas en charolas con un sustrato de tierra para maceta, agrolita y tezontle. A los siete y 21 días después de la siembra (dds) se recolectaron tres plántulas de cada especie y posteriormente cada mes para su descripción anatómica. Las plántulas se procesaron para microtecnica convencional con inclusión en parafina. Las plántulas de estas especies presentan cristales de oxalato de calcio en las células epidérmicas y en las células corticales a partir de los siete días después de la siembra. Las acículas en la epidermis y las drusas en el córtex deben ser parte de los mecanismos de supervivencia en el medio natural en que estas especies crecen relacionadas con el consumo por herbívoros y la reducción de la carga calórica. No hay un efecto del sustrato en el cual se trasplantaron las plántulas pues no se incrementó la cantidad de cristales. El pH antes del trasplante era ácido, mientras que un año después fue básico.

Palabras clave: oxalato de calcio, biominerales.

Introducción

Debido a que los cristales de oxalato de calcio se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, se ha estudiado su función en el metabolismo, su

importancia como soporte y su relevancia como carácter taxonómico en diferentes familias vegetales (Franceschi y Horner, 1980); sin embargo, estas investigaciones se han llevado a cabo en plantas adultas, mientras que en el desarrollo temprano son pocos los informes sobre ellos.

Las plántulas de las especies de la familia Cactaceae se enfrentan en su medio natural a escasez de agua, temperaturas extremas y consumo por herbívoros, lo cual las hace muy susceptibles en las primeras etapas de su desarrollo (Rojas-Aréchiga et al., 1998). Por lo anterior, han desarrollado diferentes mecanismos que les confieren ventajas como el germinar bajo plantas nodrizas (Reyes-Olivas et al., 2002; Munguía-Rosas y Sosa, 2008) o rocas nodrizas (Peters et al., 2008; López et al., 2009), así como tolerar estrés hídrico (Ayala-Cordero et al., 2006), plasticidad en el metabolismo fotosintético (Loza-Cornejo et al., 2003) y crecimiento determinado de la raíz primaria (Dubrovsky y Gómez-Lomelí, 2003). La presencia de cristales de oxalato de calcio en esta etapa puede conferirles algunas ventajas como mantener la turgencia de las células y disuadir a los herbívoros (Molano-Flores, 2001; Korth et al., 2006).

Recientemente se registraron cristales prismáticos de oxalato de calcio en la epidermis e hipodermis de plántulas de 12 meses de edad de *Neobuxbaumia mezcalaensis* y *N. multiareolata*, aún y cuando en el mismo ensayo no se encontraron inclusiones minerales en *Myrtillocactus geometrizans*, *Escontria chiotilla*, *Pachycereus grandis* y *Stenocereus queretaroensis* (Loza-Cornejo, 2004), mientras que en plántulas de nueve meses de *Stenocereus beneckei*, después de dos meses de tratamiento de -3.0 MPa de potencial de agua en el suelo se encontraron 11.1 cristales de oxalato de calcio por milímetro cuadrado (Ayala-Cordero et al., 2006).

Cephalocereus apicicephalium, *C. nizandensis* y *C. totolapensis* son tres especies endémicas del sur de México (Bravo-Hollis, 1978), que crecen en condiciones geológicas muy particulares donde casi no hay calcio soluble (Bárcenas-Argüello et al., 2010) y sin embargo, las plantas adultas sintetizan

oxalato de calcio polimórfico. Las semillas de estas especies inician su germinación 24 ó 48 horas después de sembradas escapando así de la depredación, pero ahora son las plántulas las que se enfrentan a otros depredadores. ¿Las plántulas de estas especies han desarrollado algún mecanismo de supervivencia donde están involucrados los cristales de oxalato de calcio? y ¿en qué momento, en el desarrollo temprano inicia la acumulación de los cristales fuera de su ambiente natural?

Material y Métodos

Se recolectaron frutos de individuos en las poblaciones de cada especie. Las semillas fueron separadas del fruto por disección y se lavaron con agua corriente, se colocaron sobre papel absorbente y se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente (17-21 °C). Se clasificaron en viables, abortadas y germinadas de acuerdo al criterio de apariencia propuesto por Ayala-Cordero et al. (2004).

Las semillas viables fueron desinfectadas superficialmente por inmersión de 5 min en una solución comercial de hipoclorito de sodio al 10%, se enjuagaron bajo el chorro de agua corriente y se sembraron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con papel filtro estéril saturado con agua destilada. Se colocaron 30 semillas en cada caja y se pusieron a germinar.

Las cajas de Petri se colocaron en una cámara de ambiente controlado (Rheem-Sherer) con una temperatura diurna de 24 °C y nocturna de 20 °C y una longitud de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Durante 30 días se registraron diariamente las semillas germinadas y se mantuvo la humedad del papel agregando agua destilada con una pipeta Pasteur. El día 31, las plántulas fueron plantadas en charolas con orificios individuales los cuales contenían un sustrato a partes iguales de tierra para maceta, agrolita y arena de tezontle de un diámetro menor a 0.5 cm. Las charolas fueron regadas dos veces por semana con agua purificada para uso humano y permanecieron en las mismas condiciones en la cámara de ambiente controlado.

A los siete y 21 días después de la siembra (dds) se recolectaron tres plántulas de cada especie y posteriormente cada mes para su descripción anatómica. Las plántulas fueron fijadas en una solución de 5 ml de glutaraldehído al 50% en una solución amortiguadora 0.1 M de fosfato a pH 7.0-7.2 durante 48 horas, después se lavaron en la solución amortiguadora pura durante 24 horas. Posteriormente se hicieron cambios de 24 horas cada uno en alcoholes al 30, 40, 50, 70 y 96% y se procedió con la microtecnica convencional de inclusión en parafina (Berlyn y Miksche, 1976). Los cortes se realizaron con un micrótopo rotatorio a un grosor de 10-12 μm , se tiñeron con safranina-verde y se montaron con resina sintética. Las observaciones y toma de fotografías se llevaron a cabo con un analizador de imágenes Media-Cibernetics (1997), adaptado a un microscopio Olympus Bx-50.

Se analizó químicamente el sustrato en el cual se transplantaron las plántulas antes del trasplante y al año después del último muestreo. Se determinó pH (2:1) y materia orgánica siguiendo el procedimiento de van Reeuwijk (1995), y se determinó la concentración de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{2+} solubles con un difractorómetro de plasma acoplado. K^+ y Na^+ solubles por espectroscopía de emisión de flama y Cl^- soluble por volumetría.

Resultados

Las plántulas de las tres especies de *Cephalocereus* presentan cristales de oxalato de calcio en las células epidérmicas y en las células del córtex a partir de los siete días después de la siembra (Cuadro 4.1). Los cristales tienen diferentes formas, hay acículas solitarias y acículas agregadas formando cruces o estrellas, prismas solitarios, drusas y unos cristales muy pequeños de los cuales no es posible ver su forma individual pero sus agregados son irregulares (Figs. 4.1, 4.2). Estas formas aparecen en diferentes momentos del desarrollo de las plántulas y no en la misma fecha en las tres especies.

A los siete días después de la siembra, las plántulas de las tres especies presentan una epidermis simple con células de forma rectangular y son

frecuentemente papilosas en *C. totolapensis* (Fig. 4.1a). El tejido cortical está formado por células de parénquima de forma irregular, con pared delgada y se observaron cristales de oxalato de calcio en forma de drusa (Fig. 4.1c).



Figura 4.1. Células epidérmicas y de córtex en especies de *Cephalocereus* siete días después de la siembra, cortes transversales. **a:** epidermis papilosa, *C. totolapensis*; **b:** cristales de oxalato de calcio de forma lenticular en células epidérmicas, *C. apicicephalium*; **c:** cristal de oxalato de calcio en forma de drusa en córtex, *C. nizandensis*.



Figura 4.2. Células de córtex en especies de *Cephalocereus* 21 días después de la siembra, cortes transversales. **a:** cruces en córtex *C. totolapensis*; **b:** cristal agregado en córtex, *C. nizandensis*, **c:** drusa en córtex, *C. apicicephalium*.

No hay un efecto del sustrato en el cual se trasplantaron las plántulas a los 31 días después de la siembra, pues a 180 dds en *C. nizandensis* no se incrementó la cantidad de cristales, en *C. totolapensis* disminuyó la cantidad de cristales y en *C. apicicephalium* hubo un aumento en la cantidad de cristales, pero a los 360 dds hubo una disminución (Cuadro 4.1). Además, el análisis químico del sustrato indicó que las cantidades de materia orgánica y de todos los elementos disminuyeron excepto el Fe que aumentó ligeramente. El pH antes del transplante era ácido, mientras que un año después fue básico (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.1. Cristales en células epidérmicas y corticales de tres especies de *Cephalocereus* a diferentes días después de la siembra (dds).

	<i>C. apicicephalum</i>	<i>C. nizandensis</i>	<i>C. totolapensis</i>
7 dds	40% de las células epidérmicas presentar cristales aciculares solitarios en abundancia. Agregados irregulares en subepidermis. En córtex hay pocas drusas	60% de células epidérmicas con abundantes cristales aciculares solitarios. Aparecen agregados irregulares en subepidermis. Drusas muy pequeñas en córtex.	Epidermis papilosa con un 5% de células con cristales aciculares solitarios pequeños. En poca cantidad hay agregados irregulares y drusas en córtex.
21 dds	30% de las células epidérmicas presentar cristales aciculares en mediana abundancia. Aciculares solitarios en subepidermis. En córtex hay pocas drusas y aciculares solitarios.	5% de células epidérmicas con cristales aciculares solitarios muy escasos y pequeños. Drusas muy pequeñas en córtex.	80% de las células epidérmicas con abundantes cristales aciculares. En córtex pocas drusas y cruces de cristales aciculares grandes cercanos a las paredes.
180 dds	60% de células epidérmicas con cristales aciculares solitarios abundantes. En 5% de las células epidérmicas hay cristales prismáticos junto con aciculares. Pocos agregados irregulares. En córtex hay cristales aciculares solitarios y pocas drusas.	5% de células epidérmicas con abundantes cristales aciculares solitarios. Aparecen los agregados irregulares en epidermis y en subepidermis. Drusas muy pequeñas en córtex.	30 % de las células epidérmicas con pocos cristales aciculares solitarios. Son frecuentes los cristales agregados irregulares. Drusas en córtex.
370 dds	10% de células epidérmicas con cristales lenticulares solitarios escasos. En córtex hay agregados irregulares y aciculares grandes agregados formando estrellas, drusas escasas.	5% de las células epidérmicas con cristales pequeños aciculares solitarios. Drusas en córtex.	20% de células epidérmicas con abundantes cristales lenticulares solitarios y agregados irregulares. En córtex hay drusas y aciculares grandes agregados formando estrellas.

Cuadro 4.2. Análisis químico del sustrato en el cual se transplantaron las plántulas de *Cephalocereus*.

	M.O. g/100g	pH 2:1	K	Ca	Mg	Na cmol/kg	Cl	Fe	Mn
Antes	1.40	6.8	2.18	7.90	2.05	0.51	1.88	0.11	0.07
Después	1.09	8.0	0.22	6.10	1.75	0.19	1.13	0.13	0.03

M.O.= materia orgánica

Discusión

La presencia de cristales en plántulas de Cactaceae a los siete días después de la siembra es la primera vez que se registra. En Araceae se han observado cristales en embriones (Zona, 2004), mientras que en primordios foliares de Aizoaceae en que aún no se ha diferenciado el tejido vascular también están presentes (Opel, 2005b). Los cristales en etapas tan tempranas del desarrollo sin duda tienen una función de defensa y en las plántulas de *Cephalocereus* pueden también estar relacionados con incrementar la reflectancia y reducir la transmitancia (Darling, 1989). En el presente estudio, las semillas fueron germinadas sobre papel y regadas con agua destilada por lo que no hubo una fuente externa de calcio durante los primeros 30 días; sin embargo, en su medio natural germinan entre rocas de diferente color y composición (Bárcenas-Argüello et al., 2010). Es interesante notar que el mayor porcentaje de células epidérmicas con abundantes cristales lo presentó *C. nizandensis*, la especie que crece entre las rocas más blancas. Opel (2005a) sugieren con base en la filogenia de *Conophytum* () que los cristales en la epidermis son un estado ancestral y se relaciona en algunas especies con su crecimiento a ras del suelo. Este no es el caso en *C. nizandensis*, que junto con *C. apicicephalium* son taxones más tardíamente diversificados (Barcenás-Argüello, 2006). Es necesario continuar con el estudio anatómico de las plántulas en Cactaceae en busca de inclusiones minerales para conocer el comportamiento de este carácter y explicar su posible significado adaptativo.

Los cristales en las plántulas de *Cephalocereus* se encontraron en la epidermis pero también en las células del tejido cortical, mientras que en *Neobuxbaumia* sólo se encontraron prismas en la epidermis (Loza-Cornejo, 2004) y drusas en *Stenocereus beneckeii* y *Pachycereus grandis* sólo en el córtex (Ayala-Cordero et al., 2006; Loza-Cornejo y Terrazas, 2011). Además, en *Cephalocereus* hay acículas y prismas en la epidermis y drusas en el córtex y las plantas adultas no tienen acículas en ningún tipo celular (Terrazas y Arias, 2003). En las hojas de *Pistia stratiotes* L. la formación de acículas es nula en ausencia de Ca en el medio (Volk et al., 2002). Las semillas de *Cephalocereus*, este estudio, germinaron en

agua libre de Ca y las plántulas a los siete días presentaron acículas; este resultado parece ser contradictorio pues la función de las acículas según Volk y colaboradores es regular el exceso de Ca durante el desarrollo de las hojas. En las plántulas de *Cephalocereus*, las acículas deben estar relacionadas con la defensa contra herbívoros o contra la protección de la carga calórica de los tejidos fotosintéticos, ya que en las plantas adultas no persisten; además, Cody y Horner (1983) mencionan que la morfología de un cristal refleja el ambiente en el cual vive la planta y este podría ser el caso de las especies aquí estudiadas.

Las plántulas fueron transplantadas a un sustrato que contenía poco calcio soluble (7.90 cmol/kg), 150 días después del transplante no hubo un incremento en la cantidad de cristales en *C. nizandensis* ni en *C. totalapensis* y 340 días después del transplante hubo una disminución en la cantidad de cristales en *C. apicicephalium* y *C. totalapensis*. Lo anterior significa que la cantidad de Ca en el sustrato no tuvo un efecto en la cantidad de cristales en las especies como sucedió en *Commelina communis* L. (Ruíz y Mansfield, 1994) y en *Pistia stratiotes* L. (Volk et al., 2002), además la cantidad de Ca en el sustrato al cabo de un año fue muy similar (6.10 cmol/kg) y ambos valores, el del principio y el del final se encuentran dentro del intervalo de Ca soluble presente en el suelo o sustrato de las poblaciones naturales 0.94-10.67 cmol/kg (Bárcenas-Argüello et al., 2010). Sin embargo, en *Cephalocereus* es necesario explorar la posibilidad de que los cristales pudieran servir como fuente de Ca durante el desarrollo de las plántulas en material parental deficitario de este mineral (Dwarte y Ashford, 1982).

Conclusiones

Las plántulas de estas especies presentan cristales de oxalato de calcio en las células epidérmicas y en las células corticales a partir de los siete días después de la siembra. Las acículas en la epidermis y las drusas en el córtex deben ser parte de los mecanismos de supervivencia en el medio natural en que estas especies crecen relacionadas con el consumo por herbívoros y la reducción de la carga calórica.

CAPITULO V

EVOLUCION DE *Cephalocereus* EN UN CONTEXTO EDÁFICO-CLIMÁTICO

Resumen

Es necesario conocer cuáles factores climáticos o edáficos han influido para que a partir de un antepasado común, las especies se adapten a entornos distintos. La alta complejidad geológica, orográfica, edáfica y climática de México resulta en un extenso conjunto de hábitats que se presume ha promovido una rápida especiación. El género *Cephalocereus* con cinco especies es monofilético con base en caracteres estructurales y moleculares y consideramos que la actual distribución de sus especies es posiblemente resultado de vicarianza por levantamientos orográficos, vulcanismo y especiación *in situ* para adaptarse a condiciones ecológicas diferentes. El objetivo es proponer una hipótesis del ambiente geológico, edáfico y climático en el cual vivió el ancestro y donde se originaron las especies. Se generó una matriz con 2,669 morfológicos, anatómicos, químicos y moleculares. Los terminales fueron 17 poblaciones de las cinco especies de *Cephalocereus*, como grupo hermano se utilizó a *Neobuxbaumia mezcalaensis* y como grupo externo funcional a *Pseudomitrocereus fulviceps*. Un primer análisis de parsimonia se llevó a cabo con la matriz de datos estructurales y moleculares mediante el programa TNT versión 1.1, a través de una búsqueda "Branch and Bound" de secuencia máxima. En un segundo análisis de parsimonia se agregaron a la matriz los datos de suelo, clima, edáficos y de morfología de biominerales. *Cephalocereus* se recupera como monofilético. El análisis con datos de suelo y clima no modificó la topología del árbol y reveló que el ancestro habitaba en altitudes menores a 1,370 m s.n.m. con una temperatura media anual de 20.5 °C, donde el trimestre más seco del año era también el más frío con una temperatura media de 18.5 °C y una precipitación de 16.8 mm. La amplia distribución del ancestro del género *Cephalocereus* fue fragmentada por diferentes eventos geológicos por lo que los ancestros de los clados *Cephalocereus* y *Neodawsonia* habitaron lugares disyuntos con diferentes condiciones de temperatura y precipitación. La evolución *in situ* de

cada una de las especies del género *Cephalocereus* estuvo ligada a condiciones edáficas particulares que permiten explicar su endemismo.

Palabras clave: especiación, alopatría, vicarianza.

Introducción

El área de distribución de una especie es aquella fracción del espacio geográfico en donde ésta está presente e interacciona de manera no efímera con el sistema (Zunino, 2005). Existe un grupo extenso de especies con amplia distribución geográfica y tolerancia ecológica, que se encuentran en diferentes ecosistemas en regiones geográficas extensas (Wendt, 1993). Es necesario conocer cuáles factores climáticos o edáficos han influido para que a partir de un antepasado común, las especies se adapten a entornos distintos o bien, usen diferentes recursos (Svenning, 2001), considerando que las especies se asocian a un hábitat particular (Webb et al., 2002; Peterson, 2006). La alta complejidad geológica, orográfica, edáfica y climática de México resulta en un extenso conjunto de hábitats (Graham, 1998) que se presume ha promovido una rápida especiación (Peterson et al., 1999).

En Cactaceae son pocas las especies que tienen una amplia distribución geográfica (Reyes-Agüero et al., 2005; Hernández et al., 2007) y la mayoría de los géneros también están restringidos a una porción del continente americano (McIntosh, 2002, Alvarez et al., 2004, Méndez et al., 2006). El género *Cephalocereus* (Pfeiffer) con cinco especies (*sensu* Anderson, 2001) es monofilético con base en caracteres estructurales (Bárcenas, 2006) y moleculares (Arias et al., 2003 y 2005). Las cinco especies se distribuyen en el centro y sur de México, cuatro de ellas en el estado de Oaxaca (Bravo-Hollis, 1978; Guzmán et al., 2003). Oaxaca es uno de los estados de la República Mexicana con mayor heterogeneidad geológica y la gran biodiversidad que exhibe está directamente relacionada con su fisiografía y con la composición de su sustrato [*sic*] (Centeno-García, 2004). La reciente descripción de la asociación entre *Cephalocereus* (tres especies) y el tipo de suelo y de roca en Oaxaca (Bárcenas-Arguello et al., 2010),

plantea una reevaluación del patrón biogeográfico (Sindel y Michael, 1992). Consideramos que la actual distribución de las cinco especies de *Cephalocereus* es posiblemente resultado de vicarianza por levantamientos orográficos, vulcanismo y especiación *in situ* para adaptarse a condiciones ecológicas diferentes. El objetivo es proponer una hipótesis del ambiente geológico, edáfico y climático en el cual vivió el ancestro y donde se originaron los clados *Cephalocereus*-subgénero *Cephalocereus* y *Cephalocereus*-subgénero *Neodawsonia*.

Material y Métodos

Se generó una matriz con 2,669 caracteres. Los primeros 74 caracteres son morfológicos, anatómicos y químicos (Bárceñas, 2006), mientras que los demás son secuencias de dos marcadores del cloroplasto (Apéndice 1), que incluyen la región *trnL-F* (intrón *trnL* + espaciador intergénico *trnL-trnF*) así como la región *rpl16* (exón 2 *rpl16*, intrón *rpl16* y exón 1 *rpl16*) (Arias et al., 2003, 2005). Los caracteres morfológicos 0-5 son continuos y todos los demás son discretos binarios o multiestado. Los caracteres que describen a la zona florífera (caracteres 46, 47 y 48) fueron tomados de Vázquez-Sánchez (2005).

Los terminales fueron 17 poblaciones de las cinco especies del género *Cephalocereus*, como grupo hermano se utilizó a *Neobuxbaumia mezcalaensis* y como grupo externo funcional a *Pseudomitrocereus fulviceps* (Cuadro 5.1). La elección del grupo hermano y del grupo externo se realizó con base en los resultados de los análisis filogenéticos con caracteres moleculares para miembros de la tribu Pachycereeae (Arias et al., 2003, 2005).

Cuadro 5.1. Especies y poblaciones utilizadas en el análisis cladístico.

Especies	Poblaciones	Clave
1 <i>Pseudomitrocereus fulviceps</i>	1 San Lorenzo	1 1
2 <i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i>	2 Santiago Chazumba	2 2
3 <i>Cephalocereus apicicephalium</i>	3 Guiengola 1	3 3
	4 Guiengola 2	3 4
	5 Mixtequilla	3 5
4 <i>Cephalocereus columna-trajani</i>	6 San Rafael	4 6
	7 Jocotipac	4 7
5 <i>Cephalocereus nizandensis</i>	8 Entrada La Mata	5 8
	9 La Mata	5 9
	10 Nizanda	5 10
6 <i>Cephalocereus senilis</i>	11 Tesisco	6 11
	12 Jilotla	6 12
7 <i>Cephalocereus totolapensis</i>	13 El Gramal	7 13
	14 Las Margaritas	7 14
	15 San Bartolo	7 15
	16 Asunción Tlacolulita	7 16
	17 San Miguel Ecatepec	7 17
	18 Puente Boquerón	7 18
	19 Km 123	7 19

Un primer análisis de parsimonia se llevó a cabo con la matriz de datos estructurales y moleculares mediante el programa TNT versión 1.1 (Goloboff, 2008), a través de una búsqueda “Branch and Bound” de secuencia máxima, guardando sólo los árboles más parsimoniosos. Se estimaron los valores de soporte de Bootstrap con 1,000 réplicas siguiendo el mismo tipo de búsqueda. En un segundo análisis de parsimonia algunos caracteres de la morfología vegetativa codificados como discretos se sustituyeron por caracteres continuos (1-6, valores de la media o moda) para diámetro de las ramas, altura a la primera reproducción,

número de costillas, altura de la costilla, distancia entre aréolas y largo de la aréola. Además, se agregaron a la matriz los datos de suelo (7-24), altitud (25), pendiente (26), clima (27-43), roca (44), estado de hidratación de los cristales de weddellita (45) y morfología de los cristales de weddellita (46-51) para cada una de las poblaciones (Cuadro 5.2). En el carácter 45 el 1 corresponde a weddellita con dos moléculas de agua ($C_2CaO_4 \cdot 2 H_2O$) y el 2 a weddellita con 2.25 moléculas de agua ($C_2CaO_4 \cdot 2.25 H_2O$), mientras que los caracteres 46 al 51 fueron codificados con 0 como ausencia y 1 como presencia. Los datos de suelo fueron tomados de Bárcenas-Argüello et al. (2010) para la poblaciones de *C. apicicephalum*, *C. nizandensis* y *C. tototalapensis*, mientras que para *C. columna-trajani* y *C. senilis* se determinaron siguiendo el mismo método que para las tres primeras. Los datos de clima se obtuvieron de las normales climatológicas del Servicio Meteorológico Nacional por lo menos con 28 años de registros y se codificaron 17 de los 19 parámetros derivados por Hijmans et al. (2005) y puestos disponibles en WorldClim (<http://www.worldclim.org>).

Cuadro 5.2. Caracteres y estados de carácter utilizados en el segundo análisis cladístico.

Especies	1	2	3	3	3	4	4	5	5	5	6	6	7	7	7	7	7	7		
Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Carácter	Estados																			
1	Diámetro de las ramas cm (5*)	80.00	27.50	5.30	6.02	6.37	41.00	46.50	9.33	10.02	12.08	22.05	22.75	?	?	13.65	11.47	13.35	29.3	17.92
2	Altura a la 1a. reproducción m (6)	NA	NA	0.76	0.75	0.54	3.63	3.50	0.86	0.92	0.60	4.18	4.67	?	?	1.72	1.30	1.20	1.82	1.97
3	Número de costillas (11)	12	19	24	26	24	22	28	20	22	28	35	36	?	?	36	28	28	27	25
4	Altura de la costilla cm (12)	3.25	2.15	0.56	0.57	0.60	2.05	2.01	1.18	1.28	0.88	1.39	1.38	?	?	0.92	0.82	0.75	0.96	0.97
5	Distancia entre aréolas cm (13)	1.25	1.90	0.78	0.71	0.99	1.18	1.12	1.11	1.11	1.16	1.65	1.59	?	?	1.03	1.13	1.30	1.16	1.06
6	Largo de la aréola mm (15)	9.00	5.50	3.27	3.10	4.69	5.74	5.33	3.55	3.65	5.74	5.48	5.45	?	?	3.20	4.64	4.90	4.00	3.65
7	pH	?	8.0	6.8	6.8	5.7	7.3	7.8	6.6	6.6	7.1	7.8	7.7	?	6.9	6.5	6.0	5.5	6.5	6.7
8	% Materia orgánica	?	7.90	13.62	5.76	23.35	1.87	3.89	27.24	27.24	99.00	5.45	5.45	?	3.89	1.25	10.12	3.42	10.90	5.45
9	% arena	?	44.00	NA	NA	NA	28.10	39.90	NA	NA	NA	15.50	33.20	?	49.68	51.13	39.43	32.75	53.16	40.22
10	% limo	?	30.00	NA	NA	NA	67.30	34.70	NA	NA	NA	41.60	35.30	?	16.77	26.88	34.23	44.83	28.10	20.79
11	% arcilla	?	26.00	NA	NA	NA	4.60	25.40	NA	NA	NA	42.90	31.50	?	33.54	21.99	26.33	22.41	18.73	38.97
12	Cl meq L ⁻¹	?	?	10.69	10.69	88.88	9.88	0.63	17.44	17.44	10.68	0.63	0.88	?	9.00	9.56	151.31	?	9.00	6.19
13	Ca ppm	?	?	93.58	93.58	213.81	229.46	63.13	84.76	84.76	104.54	100.20	82.16	?	67.28	72.47	?	?	39.27	18.80
14	Fe ppm	?	?	0.02	0.02	0.04	0.78	1.94	0.00	0.00	0.00	1.19	6.31	?	0.06	0.00	0.00	?	0.00	0.00
15	Mg ppm	?	?	10.91	10.91	12.36	109.37	11.54	22.53	22.53	11.06	33.42	6.68	?	15.61	7.04	69.37	?	12.20	5.69
16	Mn ppm	?	?	0.25	0.25	9.42	0.92	0.79	0.31	0.31	0.28	0.25	0.66	?	0.11	0.26	0.72	?	0.24	0.13
17	K ppm	?	?	11.76	11.76	12.57	32.17	5.69	24.73	24.73	12.16	24.25	164.33	?	12.60	12.15	72.97	?	39.73	10.95
18	Na ppm	?	?	2.38	2.38	3.96	6.30	5.29	15.85	15.85	7.92	3.91	19.86	?	5.55	9.91	7.92	?	13.07	13.47
19	Hue seco	?	?	?	?	10	10	10	?	?	?	10	10	?	?	10	10	7.5	?	?
20	Value seco	?	?	?	?	3	8	5	?	?	?	5	6	?	?	4.5	3	4	?	?
21	Chroma seco	?	?	?	?	3	2	4	?	?	?	3	3	?	?	4	3	4	?	?
22	Hue húmedo	?	?	?	?	10	10	10	?	?	?	10	10	?	?	10	10	7.5	?	?
23	Value húmedo	?	?	?	?	3	6	3	?	?	?	4	4	?	?	3.5	3	3	?	?
24	Chroma húmedo	?	?	?	?	2	2	4	?	?	?	2	3	?	?	4	2	3	?	?
25	Altitud metros	1812	1700	325	300	163	884	654	200	200	206	1370	1370	680	1000	675	434	386	822	830
26	Pendiente (°)	31.95	4.05	45.00	45.00	NA	15.75	45.00	45.00	45.00	30.15	29.25	45.00	9.90	19.80	19.80	12.15	9.90	11.70	24.75
27	Temperatura (T) media (°C) anual	18.8	19.5	28.3	28.3	28.8	23.9	25.9	27.9	27.9	24.9	20.5	20.5	24.5	24.5	24.6	26.6	26.6	24.4	24.4
28	Rango diario	16.8	12.0	4.5	4.5	4.1	14.6	15.4	5.1	5.1	6.0	15.6	15.6	5.6	5.6	6.2	5.3	5.3	5.1	5.1
29	Isotermalidad	0.672	0.645	0.196	0.196	0.171	0.498	0.663	0.232	0.232	0.287	0.655	0.655	0.176	0.176	0.201	0.556	0.556	0.152	0.152
30	T. mes más caliente	30.9	28.5	38.9	38.9	40.7	40.0	37.6	39.5	39.5	37.7	31.7	31.7	38.9	38.9	38.8	37.3	37.3	39.1	39.1
31	T. mes más frío	5.9	9.9	16.0	16.0	16.7	10.7	14.4	17.5	17.5	16.8	7.9	7.9	6.8	6.8	8.0	12.5	12.5	5.6	5.6
32	Rango anual	25.0	18.6	22.9	22.9	24.0	29.3	23.2	22.0	22.0	20.9	23.8	23.8	32.1	32.1	30.8	24.8	24.8	33.5	33.5
33	T. trimestre más húmedo	19.8	20.2	29.4	29.4	29.7	24.8	26.5	28.9	28.9	26.2	21.8	21.8	25.6	25.6	26.0	27.8	27.8	25.2	25.2
34	T. trimestre más seco	17.0	17.8	26.5	26.5	26.9	21.9	24.1	25.6	25.6	17.9	18.5	18.5	22.1	22.1	22.0	24.3	24.3	22.2	22.2
35	T. trimestre más caliente	21.3	21.6	29.2	29.2	29.9	26.8	28.7	29.2	29.2	26.6	22.8	22.8	26.1	26.1	26.3	27.9	27.9	25.9	25.9
36	T. trimestre más frío	17.0	17.8	26.5	26.5	26.9	21.9	24.1	25.6	25.6	17.9	18.5	18.5	22.1	22.1	22.0	24.3	24.3	22.2	22.2
37	Precipitación (Pp) anual (mm)	453.8	492.3	779.9	779.9	854.9	360.4	448.4	823.9	823.9	1135.5	377.8	377.8	561.4	561.4	571.2	579.5	579.5	551.6	551.6
38	Pp. mes más húmedo	102.0	115.8	224.7	224.7	232.2	82.9	98.0	201.1	201.1	257.0	88.7	88.7	123.2	123.2	130.0	143.3	143.3	116.3	116.3
39	Pp. mes más seco	1.50	5.10	0.10	0.10	0.20	1.00	1.20	1.10	1.10	11.00	2.20	2.20	1.85	1.85	0.60	0.50	0.50	3.10	3.10
40	Pp. trimestre más húmedo	224.4	228.6	508.2	508.2	561.9	198.9	266.9	484.1	484.1	599.5	194.4	194.4	305.5	305.5	320.8	360.6	360.6	290.2	290.2

Especies	1	2	3	3	3	4	4	5	5	5	6	6	7	7	7	7	7	7	7
Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Carácter	Estados																		
41 Pp. trimestre más seco	21.00	21.00	4.30	4.30	8.30	6.00	9.00	8.50	8.50	55.10	16.80	16.80	9.10	9.10	5.10	3.90	3.90	13.10	13.10
42 Pp. trimestre más caliente	184.3	187.2	55.9	55.9	52.4	118.6	142.3	56.6	56.6	95.9	114.0	114.0	102.8	102.8	92.3	46.3	46.3	113.3	113.3
43 Pp. trimestre más frío	21.00	21.00	4.30	4.30	8.30	6.00	9.00	8.50	8.50	55.10	16.80	16.80	9.10	9.10	5.10	3.90	3.90	13.10	13.10
44 Tipo de roca	0	4	1	1	1	7	8	2	2	2	5	5	4	3	5	4	6	4	3
45 Hidratación de Weddellita	NA	NA	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1
46 Sistema tetragonal 1	NA	NA	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
47 Sistema tetragonal 2	NA	NA	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48 Sistema tetragonal 3	NA	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
49 Sistema ortorómbico	NA	NA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
50 Maclas	NA	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
51 Sistema monoclinico	NA	NA	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

NA : no aplica, ND : no disponible, ? : desconocido. Para clave de especies y poblaciones ver cuadro 5.1.

Resultados

El análisis cladístico arrojó 100 árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 313 pasos. Las 17 poblaciones de *Cephalocereus* se agruparon en las cinco especies (Fig. 5.1) con valores de soporte 100/100 (bootstrap/jackknife).

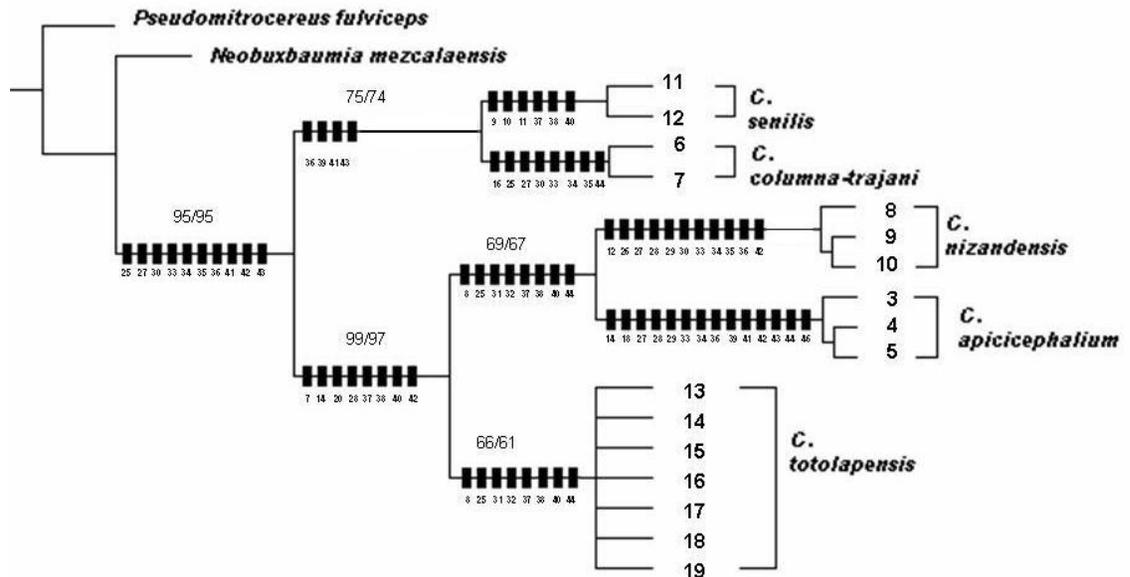


Figura 5.1. Árbol de consenso estricto de 100 árboles igualmente parsimoniosos de *Cephalocereus* basados en análisis combinado de caracteres estructurales y secuencias moleculares. Los números de cada terminal corresponden a las poblaciones; sobre las ramas se muestran los valores de bootstrap/jackknife, y las barras corresponden a la optimización de los caracteres extrínsecos (para clave ver cuadro 5.2).

El género *Cephalocereus* incluye cinco taxa terminales y se define como monofilético con 16 caracteres estructurales sinapomórficos, además de 12 sinapomorfias moleculares. El género *Cephalocereus* tiene dos clados. El primer clado (*Cephalocereus* subgénero *Neodawsonia*) comprende tres especies donde *C. apicicephalium* y *C. nizandensis* se resuelven como especies hermanas y *C. totolapensis* como el taxón hermano de ambas. Este clado está apoyado por 13 sinapomorfias, ocho de las cuales provienen de caracteres moleculares.

Cephalocereus apicicephalium y *C. nizandensis* son especies hermanas y comparten cuatro sinapomorfias, dos de ellas moleculares. *Cephalocereus columna-trajani* y *C. senilis*, se agrupan en un segundo clado (*Cephalocereus* subgénero *Cephalocereus*) definido por nueve caracteres sinapomórficos, cinco de los cuales son moleculares.

El análisis con datos de suelo y clima no modificó la topología del árbol y reveló algunas características del hábitat de los ancestros de *Cephalocereus*. El ancestro del género habitaba en altitudes menores a 1,370 m s.n.m. con una temperatura media anual de 20.5 °C, donde el trimestre más seco del año era también el más frío con una temperatura media de 18.5 °C y una precipitación de 16.8 mm. En general, eran lugares más cálidos como lo indican las temperaturas: máxima del mes más caliente (31.7 °C), del trimestre más húmedo (21.8 °C) y del trimestre más caliente (22.8 °C); pero no tan seco, pues la precipitación del trimestre más caliente llegaba a los 118.6 mm. El ancestro del clado *Neodawsonia* habitó en altitudes menores a 830 m s.n.m. donde la oscilación térmica diaria era menor a 6 °C y la precipitación anual alrededor de los 580 mm. La precipitación del mes más húmedo registraba hasta 143 mm, el cuarto más húmedo 360 mm y el cuarto más caliente 95 mm. Los suelos eran oscuros, tendiendo a ácidos (pH 6.6-7.1) y sin hierro soluble. Para el clado integrado por *C. senilis* y *C. columna-trajani* es posible inferir que el ancestro compartía más características de preferencias climáticas con las especies de *Neodawsonia*, por ejemplo: altitudes entre 654 y 884, temperatura media anual entre 24 y 25 °C y 9 mm de precipitación en el trimestre más frío y seco.

Discusión

Los resultados del análisis de parsimonia simultáneo mostraron que el género *Cephalocereus* es monofilético y coincide con el resultado de los análisis con secuencias moleculares de Arias et al. (2003 y 2005) y con el resultado del análisis con caracteres estructurales de Bárcenas (2006). En el presente estudio, el clado *Cephalocereus* se apoya por 28 sinapomorfias de las cuales 16 son caracteres estructurales y 13 ya habían sido reportados en Bárcenas (2006). En

consecuencia, los tres caracteres que se revelan como sinapomorfias en el presente estudio son número de costillas, simetría basal de las escamas del pericarpelo y microrelieve en las células de la semilla, además de 12 sinapomorfias moleculares. Este análisis también permitió reconocer la existencia de dos clados que corresponden a la propuesta de Bravo-Hollis (1978) apoyada por Bárcenas (2006) de reconocer el subgénero *Neodawsonia* que agrupa a *C. apicicephalum*, *C. nizandensis* y *C. totolapensis* y el subgénero *Cephalocereus* constituido por *C. columna-trajani* y *C. senilis*, ambos subgéneros se apoyan por 13 y nueve sinapomorfias, respectivamente. Así las especies del sugénero *Neodawsonia* comparten sólo cinco de las nueve sinapomorfias que ya habían sido reportadas (Bárcenas, 2006) y son el largo de la areóla, grosor de la cutícula en las células del tallo y grosor de la hipodermis en las células del tallo y se añadieron dos más: altura de la costilla y distancia entre areólas. Por su parte, especies del sugénero *Cephalocereus* comparten sólo cuatro de las nueve sinapomorfias previamente mencionadas por Bárcenas (2006) y son: posición de la zona florífera, tipo de zona florífera, borde de la testa de la semila y relieve en el límite anticlinal de las células de la semilla. Adicionalmente, se pudo registrar la amplitud de la variación de algunos caracteres continuos que se revelaron como autapomorfias, como por ejemplo el número de costillas, la distancia entre areólas y la altura de la costilla.

Evolución de *Cephalocereus*

Escenario geológico. De acuerdo con Peterson et al. (1999), la especiación tiene lugar en una dimensión geográfica y la diferenciación ecológica es posterior; por lo tanto, las especies endémicas pueden ser consecuencia de zonas de aislamiento y de separación histórica (Sindel y Michael, 1992). *Cephalocereus*, es un género endémico de México y cada una de sus especies es endémica también: *C. senilis* sólo crece al norte de la Faja Volcánica Transmexicana y *C. columna-trajani* al sur de la misma, mientras que *C. totolapensis* en la Sierra Madre del Sur y *C. apicicephalum* y *C. nizandensis* en el Istmo de Tehuantepec (Bravo-Hollis, 1978; Guzmán et al., 2003; Bárcenas-Arguello et al., 2010) por lo que su distribución actual puede deberse a eventos vicariantes. La edad geológica de cada una de

estas regiones es diferente siendo la más antigua la Sierra Madre del Sur cuya formación inicia en el Paleoceno (67 millones de años M.a.) y termina hasta mediados del Mioceno (14.4 M.a.). Es a mediados del Mioceno cuando la Sierra Madre Occidental cambia su orientación para iniciar la formación de la Faja Volcánica Transmexicana con al menos 8,000 centros volcánicos de diferentes edades (Cevallos-Ferriz y González-Torres, 2005). La edad para la Formación Metztitlán es de 3.8 ± 0.7 M.a. durante el Plioceno (Carrasco-Velázquez et al., 2008), mientras que si bien el Istmo de Tehuantepec fue desplazado a su posición actual en el Jurásico, no es sino hasta inicios del Cenozoico cuando el mar se retira permanentemente (67 M.a. aproximadamente) y en esta región se encuentran rocas sedimentarias del Mesozoico pero también del Cuaternario (Centeno-García, 2004). La zona de distribución de las tres especies de *Cephalocereus* que se encuentra en la región del Istmo de Tehuantepec, pertenece al Terreno Cuicateco (Pérez-Gutiérrez et al., 2009) y la parte norte del mismo sólo se separa del Terreno Zapoteco por la Falla de Oaxaca siendo uno de los límites de la orografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Dávalos-Alvarez, 2007), ahora, únicamente *C. senilis* se encuentra fuera de esta región. Sin embargo, en el pasado pudo haber existido una continuidad que fue rota en alguno de los eventos de formación del sector este de la Faja Volcánica Transmexicana (Ferrusquía-Villafranca, 1998; Ortega-Gutiérrez et al., 2008), ya que tanto en el Valle Tehuacán-Cuicatlán como en el Valle de Metztitlán se encuentran rocas que pertenecen a la Formación Tamaulipas Superior (Dávalos-Álvarez et al., 2007; Carrasco-Velázquez et al., 2008), a la luz de nuevos hallazgos será posible probar esta hipótesis de vicarianza.

El primer registro fósil para Cactaceae, encontrado en Puebla, tiene una antigüedad por lo menos del Oligoceno (Cevallos-Ferriz y Ramírez, 2004) y coincide con la edad sugerida por el reloj molecular de 30 M.a. (Nyffeler, 2002). De acuerdo a lo anterior y dada la historia geológica del centro-sur de México (Centeno-García, 2004), es probable que el ancestro del clado *Pseudomitrocereus-Neobuxbaumia-Cephalocereus* (Arias et al., 2003, 2005) tuviera, al inicio del Mioceno, un área de distribución muy extensa tanto hacia el norte como hacia el sur de Tehuacán-Cuicatlán, considerando que las especies con los caracteres plesiomórficos (por

ejemplo, zona florífera no diferenciada) se encuentran en esta zona (Gibson y Nobel, 1986) y que su incremento en la diversificación pudo llevarse a cabo durante el Mioceno Tardío (7 M.a.) (Moore y Jansen, 2006; Barba-Montoya, 2009) y fue entonces cuando empezó la estrecha relación planta-suelo que hoy día se observa en las especies del clado *Neodawsonia* (Bárcenas-Argüello et al., 2010).

Escenario climático. La evolución geológica generó condiciones climáticas diversas (Cevallos-Ferriz y González-Torres, 2005) que pueden inferirse al emplear paleofloras en la reconstrucción paleoclimática (Arroyo-Cabrales et al., 2008; Velasco de León et al., 2010), bajo la premisa de que pudo existir cierta continuidad florística entre las zonas geográficas involucradas (Wilf et al., 1998; Cevallos-Ferriz y Ramírez, 2004). De esta manera, se proporciona un contexto climático a los fósiles para una mejor comprensión de su ecología y del ambiente en el que evolucionaron (Lozano-García, 1989; Wolfe, 1993; Beraldi-Campesi et al., 2006).

Los fósiles en Cactaceae son escasos debido a la morfología de la familia (Gibson y Nobel, 1986), pero los granos de polen encontrados pueden ser referidos a un estrato geológico (Martínez-Hernández y Ramírez-Arriaga, 1999; Dávalos-Alvarez et al., 2007; Carrasco-Velázquez et al., 2008). De acuerdo con Beraldi-Campesi et al. (2006), las zonas áridas y semiáridas de México pudieron haber aparecido desde el Cenozoico en la región de Puebla-Oaxaca y los matorrales xerófilos ya contaban con cactáceas (Cevallos-Ferriz y Ramírez, 2004).

La oscilación diurna y estacional de la temperatura así como las bajas temperaturas son muy importantes, porque determinan la distribución y la frontera de la vegetación, en algunos lugares la variación entre los promedios de máximas y mínimas puede llegar a ser de hasta 24 °C, lo que se convierte en un factor de estrés para las plantas (Trejo, 2004; Rzedowski, 2006; Cavazos, 2008). De acuerdo a los resultados del presente trabajo, tanto la especie hermana *Neobuxbaumia mezcalaensis* como el grupo externo *Pseudomitrocereus fulviceps*, no compartían el hábitat con el ancestro de las especies de *Cephalocereus*, pues éste habitaba en condiciones climáticas donde las temperaturas fueron determinantes, prefería una temperatura media anual de 20.5 °C, donde el trimestre más seco del año era

también el más frío con una temperatura media de 18.5 °C, la temperatura máxima del mes más caliente de 31.7 °C, del trimestre más húmedo de 21.8°C y del trimestre más caliente de 22.8°C, por lo que la oscilación térmica era de 10 °C. Mientras que para el ancestro del clado *Neodawsonia* la oscilación térmica diaria era menor a 6 °C.

La transición de las selvas secas a los matorrales espinosos y de éstos a los xerófilos se determina por la cantidad cada vez menor de precipitación, la escorrentía mayor y los suelos más rápidamente drenados (Búrquez y Martínez-Yrizar, 2010). En este sentido, el ancestro de las especies de *Cephalocereus* habitaba en lugares con una precipitación de 16.8 mm en el trimestre más seco del año, la precipitación del trimestre más caliente llegaba a los 118.6 mm, mientras que condiciones edáficas de mayor escorrentía y drenaje rápido por habitar entre rocas fueron las condiciones posiblemente existentes en el lugar ocupado por el ancestro de las especies de *Neodawsonia* aun y cuando la precipitación anual era mayor durante la temporada de lluvias de (580 mm), la precipitación del mes más húmedo de 143 mm, del trimestre más húmedo 360 mm y del trimestre más caliente 95 mm, era menor en la parte seca del año.

Aunque las especies de *Cephalocereus* habitan en la “Zona de Transición Mexicana” (Morrone, 2006) y la intrincada orografía le confiere al área características particulares, no son suficientes para explicar la especiación como ocurre en *Coleonyx*, pues la distribución disyunta de sus especies obedece a la historia geológica de México y Centro América (Dial y Grismer, 1992). Aparentemente la distribución de las especies de *Cephalocereus* está más relacionada con condiciones climáticas que son diferentes a las que prevalecen en el área que ocupan actualmente *Neobuxbaumia* o *Pseudomitrocereus*. La influencia del clima en la distribución de las especies ya había sido mencionada para líquenes italianos y su presencia usada como indicador bioclimático (Giordani y Incerti, 2008).

Relaciones biológicas. Las condiciones climáticas variables tuvieron influencia sobre la selección, radiación y evolución biológica (Metcalf et al., 2000;

Cevallos-Ferriz y González-Torres, 2005) y se puede inferir que las especies participaron activamente en la elección de su nicho (Donohue, 2009). La fidelidad ecológica de la flora de los desiertos (Toledo, 1982; Moore y Jansen, 2006; Luna-Vega, 2008) que ha sufrido radiaciones paralelas en los últimos diez millones de años (Good-Avila et al., 2006), se extendió también hacia las interacciones con otros grupos de organismos como los polinizadores. El síndrome de polinización por murciélagos tropicales (*Leptonycteris*) presentado por *Agave* y *Cephalocereus* (Pachycereeae) sugiere una radiación similar en la colonización de nichos ecológicos (Rocha et al., 2006; Trejo-Salazar, 2007).

Cuando los ancestros de cada una de las especies de *Cephalocereus* se vieron expuestos a las características ambientales de cada sitio, pudieron evolucionar en respuesta a éste haciendo uso de su componente genético (Donohue, 2009). Algunas de las adaptaciones morfológicas y anatómicas pueden haber surgido como respuesta a temperaturas bajas y sequía extrema, con el fin de proteger los meristemas tanto vegetativos como floríferos. Por ejemplo, las areólas vegetativas presentan tricomas de origen secundario con inclusiones de oxalato de calcio (Bárcenas, 2006). Además, las cinco especies estudiadas presentan modificaciones en las aréolas del tallo dando origen a una zona florífera diferenciada, que en este estudio se reveló como una sinapomorfia única para el género. Con base en los resultados de esta investigación el cambio se dio de una zona florífera no diferenciada hacia una zona florífera apical diferenciada como pseudocefalio, esta característica evolucionó hacia un cefalio lateral y la producción de parches de fibras en el xilema es una autapomorfia para *C. columna-trajani*. En este mismo sentido, la altura (< 2.5 m) a la que inicia la reproducción es una sinapomorfia para el subgénero *Neodawsonia* presentando una tendencia a la reducción. Por lo tanto el ancestro del género *Cephalocereus* presentaba un pseudocefalio apical y la altura a la que empezaba a florecer era mayor a 2.5 m.

Conclusiones

La amplia distribución del ancestro del género *Cephalocereus* fue fragmentada por diferentes eventos geológicos por lo que los ancestros de los clados *Cephalocereus* y *Neodawsonia* habitaron lugares disyuntos con diferentes condiciones de temperatura y precipitación. La evolución *in situ* de cada una de las especies del género *Cephalocereus* estuvo ligada a condiciones edáficas particulares que permiten explicar su endemismo.

CONCLUSIONES GENERALES

La distribución discontinua de las especies de *Neodawsonia* (*Cephalocereus*, Cactaceae) no está restringida a ambientes calcáreos. El patrón de distribución está relacionado con inclusiones rocosas que son específicas para cada especie y actúan como islas edáficas. Debido a la asociación entre el material parental y las características edáficas en las que crecen *Cephalocereus apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. totolapensis* se considera que estos factores han promovido su endemidad.

Todas las especies estudiadas acumulan weddellita en sus tejidos pero ésta no contribuye en la composición mineral del suelo. Los cristales de weddellita que se presentan como simples y agregados, pertenecen a más de diez clases cristalinas y están asociados con bajas concentraciones de ocho elementos. Es posible que el estado de hidratación del oxalato sea una característica fijada genéticamente y que las diversas formas encontradas se relacionan con el ambiente edáfico en que estas especies crecen. La variación de cristales entre sitios de una especie es menor que entre especies, por ello se confirma su valor en la taxonomía. Se describen por primera vez las características ópticas del centro de los cristales de weddellita; además, se registra su morfología mediante el microscopio electrónico de barrido y a través de energía dispersiva de rayos X se determina su composición en más del 90% de Ca.

El proceso de germinación en las tres especies de *Neodawsonia* (*C. apicicephalium*, *C. nizandensis* y *C. totolapensis*) inicia al primer o segundo día después de la siembra. En condiciones de campo, este comportamiento puede favorecer el establecimiento de las plántulas. Bajo las condiciones en que se llevó a cabo este trabajo, no encontramos evidencia de que las semillas pierdan su capacidad de germinar a medida que pasan los días después de la colecta, excepto quizá para *C. nizandensis* cuyos porcentajes de germinación fueron los más bajos. Como se esperaba, hay diferencias significativas en la germinación entre especies, pero la homogeneidad entre sitios de colecta de la misma especie no se cumplió.

Se reporta, por primera vez, que las plántulas de estas especies presentan cristales de oxalato de calcio en las células epidérmicas y corticales desde los siete días después de la siembra. Las acículas en la epidermis y las drusas en el córtex deben ser parte de las estrategias de supervivencia que estas especies presentan en el medio natural, relacionadas con la herbivoría y la reducción de la radiación solar.

Con base en el análisis de parsimonia se tiene la hipótesis de que el ancestro del género *Cephalocereus* pudo haber tenido una amplia distribución geográfica, la cual fue fragmentada por diferentes eventos geológicos. Por lo que los ancestros de los clados *Cephalocereus* y *Neodawsonia* habitaron lugares disyuntos con diferentes condiciones de temperatura y precipitación. La evolución *in situ* de cada una de las especies del género *Cephalocereus* estuvo relacionada a condiciones edáficas particulares que permiten explicar su endemismo.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, F.J. y P. Velasco de León. 2002. El clima durante el Plioceno en la región de Santa María Amajac, Hidalgo, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 71: 71-81.
- Al-Rais, A.H., A. Myers, y L. Watson. 1971. The isolation and properties of oxalate crystals from plants. *Annals of Botany* 35: 1213-1218.
- Álvarez A., M.G. y C. Montaña. 1997. Germinación y supervivencia de cinco especies de cactáceas del Valle de Tehuacán: implicaciones para su conservación. *Acta Botánica Mexicana* 40: 43-58.
- Alvarez, R., H. Godínez-Alvarez, U. Guzmán y P. Dávila. 2004. Aspectos ecológicos de dos cactáceas mexicanas amenazadas: implicaciones para su conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 7-16.
- Anderson, E.F. 2001. *The cactus family*. Timber Press. Portland, Oregon. 776 pp.
- Andrade H., G. y M. Vázquez B. 1981. Algunos aspectos etnoclimáticos en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arias, S., S. Gama y U. Guzmán. 1997. Cactaceae A.L. Juss. *In*: P. Dávila, J.L. Villaseñor, R. Medina y O. Téllez (eds). *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Fascículo 14. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 146 pp.
- Arias, S., T. Terrazas y K. Cameron. 2003. Phylogenetic analysis of *Pachycereus* (Cactaceae, Pachycereeae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences. *Systematic Botany* 28: 547-557.
- Arias, S., T. Terrazas, H.J. Arreola-Nava, M. Vázquez-Sánchez y K.M. Cameron. 2005. Phylogenetic relationships in *Peniocereus* (Cactaceae) inferred from plastid DNA sequence data. *Journal of Plant Research* 118: 317-328.
- Arias, S. y T. Terrazas. 2006. Análisis cladístico del género *Pachycereus* (Cactaceae) con caracteres morfológicos. *Brittonia* 58: 197-216.
- Arroyo-Cabrales, J., A.L. Carreño, S. Lozano-García y M. Montellano-Ballesteros. 2008. La diversidad en el pasado. *In*: *Capital natural de México, vol I: conocimiento actual de la biodiversidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. Pp. 227-262.
- Ayala-Cordero, G., T. Terrazas, L. López-Mata y C. Trejo. 2004. Variación en el tamaño y peso de la semilla y su relación con la germinación en una población de *Stenocereus beneckeii*. *Interciencia* 29: 692-697.

- Ayala-Cordero, G., T. Terrazas, L. López-Mata y C. Trejo. 2006. Morpho-anatomical changes and photosynthetic metabolism of *Stenocereus beneckeii* seedlings under soil water deficit. *Journal of Experimental Botany* 57: 3165-3174.
- Bailey, I. W. 1961. Comparative anatomy of the leaf-bearing Cactaceae, III: form and distribution of crystals in *Pereskia*, *Pereskiopsis* and *Quiabentia*. *Journal of Arnold Arboretum* 42: 334-346.
- Barba-Montoya, J.A. 2009. Origen y diversificación de la tribu Pachycereeae (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Bárceñas A., M.L. 2006. Filogenia del género *Cephalocereus* Pfeiff. (Cactaceae) *sensu* Anderson con base en caracteres estructurales. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Bárceñas-Argüello, M.L., M. del C. Gutiérrez-Castorena, T. Terrazas y L. López-Mata. 2010. Rock-soil preferences of three *Cephalocereus* (Cactaceae) species of tropical dry forest. *Soil Science Society of America Journal* 74: 1374-1382.
- Bar-Yosef, B. 1996. Root excretions and their environmental effects: influence on availability of phosphorus. *In*: Y. Waisel, A. Eshel y U.Kafkafi (eds). *Plant roots: The hidden half..* Marcel Dekker. New York, New York. Pp. 581-605.
- Bashan, Y., C.Y. Li, V.K. Lebsky y L.E. de-Bashan. 2002. Primary colonization of volcanic rocks by plants in arid Baja California, México. *Plant Biology* 4: 392-402.
- Baskin, C.C. y J.M. Baskin. 2001. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination.* Academic Press. San Diego, California. 666 pp.
- Benítez-Rodríguez, J.L., A. Orozco-Segovia y M. Rojas-Aréchiga. 2004. Light effect on seed germination of four *Mammillaria* species from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, central Mexico. *The Southwestern Naturalist* 49:11-17.
- Beraldi-Campesi, H., S.R.S. Cevallos-Ferriz, E. Centeno-García, C. Arenas-Abad y L.P. Fernández. 2006. Sedimentology and paleoecology of an Eocene–Oligocene alluvial–lacustrine arid system, Southern Mexico. *Sedimentary Geology* 191: 227–254.
- Berlyn, G.P. y J.P. Miksche. 1976. *Botanical microtechnique and cytochemistry.* Iowa State University Press. Ames, Iowa.
- Bewley, J.D. y M. Black. 1994. *Seeds: physiology of development and germination.* Plenum Press, New York, New York. 448 pp.

- Brady, N.C. y R.R. Weil. 1999. *The Nature and Properties of Soils*. 12th. ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 680 pp.
- Bravo-Hollis, H. 1937. *Las cactáceas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 755 pp.
- Bravo-Hollis, H. 1956. El género *Neodawsonia*. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México* 27: 7-17.
- Bravo-Hollis, H. 1978. *Las Cactáceas de México*. Segunda ed. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 743 pp.
- Bullock, P., N. Fedoroff, A. Jongerius, G. Stoops y T. Tursina. 1985. *Handbook for soil thin section description*. Waine Research Publications. England. 152 pp.
- Búrquez A. y A. Martínez-Yrizar. 2010. Límites geográficos entre selvas secas y matorrales espinosos y xerófilos: ¿qué conservar? *In: G.Ceballos, L. Martínez, A. García, E. Espinoza, J. Bezaury Creel y R. Dirzo (eds). Diversidad, amenazas y áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del Pacífico de México*. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. Pp. 53-62.
- Carrasco-Velázquez, B.E., E. Martínez-Hernández, E. Ramírez-Arriaga y J.S. Viñas. 2008. Estratigrafía de la formación Metztlán del Plioceno (estado de Hidalgo, centro-este de México). *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 60: 83-99.
- Cavazos, T. 2008. Clima. *In: A.E. Gámez y A.E. Zarco Arista (eds). Bahía de los Ángeles: recursos naturales y comunidad. Línea base 2007*. Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. Pp. 67-90.
- Centeno-García, E. 2004. Configuración geológica del estado. *In: A.J. García-Mendoza, M.J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds). Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fundation. México, D.F. Pp. 29-42.
- Cervera, J.C, J.L. Andrade, J.L. Simá y E.A. Graham 2006. Microhabitats, germination, and establishment for *Mammillaria gaumeri* Cactaceae, a rare species from Yucatán. *International Journal of Plant Sciences* 167: 311-319.
- Cevallos-Ferriz, S.R.S. y E.A. González-Torres 2006. Geological setting and phytodiversity in Mexico. *In: F.J. Vega, T.G Nyborg, M.d.C.Perrilliat, M. Montellano-Ballesteros, S.R.S. Cevallos-Ferriz y S.A. Quiroz-Barroso (eds). Studies on Mexican paleontology*. Springer Verlag, Dordrecht. Pp. 1-18.
- Cevallos-Ferriz, S.R.S. y J.L. Ramírez. 2004. Bosquejo de la evolución florística. *In: A.J. García-Mendoza, M.J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds).*

Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Foundation. México, D.F. Pp. 87-104.

Cody, A.M. y H.T. Horner. 1983. Twin raphides in the Vitaceae and Araceae and a model for their growth. *Botanical Gazette* 144: 318-330.

Collins, S.L., G.S. Mitchell, y S.C. Klahr. 1989. Vegetation-environment relationships in a rock outcrop community in southern Oklahoma. *American Midland Naturalist* 122: 339-348.

Contreras, C. y T. Valverde. 2002. Evaluation of the conservation status of a rare cactus (*Mammillaria crucigera*) through the analysis of its population dynamics. *Journal of Arid Environments* 51: 89-102.

Darling, M.S. 1989. Epidermis and hypodermis of the saguaro cactus (*Cereus giganteus*): anatomy and spectral properties. *American Journal of Botany* 76: 1698-1706.

Dávalos-Álvarez, O.G., A.F. Nieto-Samaniego, S.A. Alaniz-Álvarez, E. Martínez-Hernández y E. Ramírez-Arriaga. 2007. Estratigrafía cenozoica de la región de Tehuacán y su relación con el sector norte de la falla de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 24: 197-215.

Dávila-Aranda, P., S. Arias-Montes, R. Lira-Saade, J.L. Villaseñor y A. Valiente-Banuet. 2002. Phytogeography of the columnar cacti (tribe Pachycereeae) in Mexico: A cladistic approach. *In*: T.H. Fleming y A. Valiente-Banuet (eds). *Evolution, ecology and conservation of the columnar cacti and their mutualists*. Arizona University Press, Tucson, Arizona. Pp. 25-41.

Dawson, E.Y. 1948. New cacti of southern Mexico. *Allan Hancock Foundation Publications Occasional Papers* 1: 1-69.

De Yoreo, J.J. y P.M. Dove. 2004. Shaping crystals with biomolecules. *Science* 306: 1301-1302.

Dial, B.E. y L.L. Grismer, 1992. A phylogenetic analysis of physiological-ecological character evolution in the lizard genus *Coleonyx* and its implications for historical biogeographic reconstruction. *Systematic Biology* 41: 178-195.

Diario Oficial de la Federación del 6 de diciembre de 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Pp. 55.

- Donohue, K. 2009. Some evolutionary consequences of niche construction with genotype-environment interaction. In: J.H.J. van der Werf, H.-U. Graser, R. Frankham y C. Gondro (eds). *Adaptation and fitness in animal populations*. Springer Science plus Business Media. New York, New York. Pp. 131-149.
- Duarte D. y A.E. Ashford. 1982. The chemistry and microstructure of protein bodies in celery endosperm. *Botanical Gazette* 143: 164-175.
- Dubrovsky, J.G. 1998. Discontinuous hydration as a facultative requirement for seed germination in two cactus species of the Sonoran Desert. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 125: 33-39.
- Dubrovsky, J.G. y L.F. Gómez-Lomelí. 2003. Water deficit accelerates determinate developmental program of the primary root and does not affect lateral root initiation in a Sonoran Desert cactus (*Pachycereus pringlei*, Cactaceae). *American Journal of Botany* 90: 823-831.
- Ferrusquía-Villafranca, I. 1998. Geología de México: una sinopsis. In: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds). *Biodiversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. Pp. 3-108.
- Flores, J., A. Arredondo y E. Jurado. 2005. Comparative seed germination in species of *Turbinicarpus*: an endangered cacti genus. *Natural Areas Journal* 25: 183-187.
- Flores, J., E. Jurado y A. Arredondo. 2006. Effect of light on germination of seeds of Cactaceae from the Chihuahuan Desert, Mexico. *Seed Science Research* 16: 149-155.
- Flores, J., E. Jurado y J.F. Jiménez-Bremont. 2008. Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Species Biology* 23: 43-46.
- Flores-Martínez, A., G.I. Manzanero M., M. Rojas-Aréchiga, M.C. Mandujano y J. Golubov. 2008. Seed age germination responses and seedling survival of an endangered cactus that inhabits cliffs. *Natural Areas Journal* 28: 51-57.
- Flores-Ortiz, C.M., P. Dávila y L.B.H. Portilla. 2003. Alkaloids from *Neobuxbaumia* species (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 581-585.
- Fox, G.A. 1993. Failure-time analysis: emergence, flowering, survivorship, and other waiting times. In: S.M Scheiner y J. Gurevitch (eds). *Design and analysis of ecological experiments*. Chapman and Hall, New York, New York. Pp. 253-289.

- Franceschi, V.R. y H.T. Horner. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *The Botanical Review* 46: 361-427.
- Franceschi, V.R. y P.A. Nakata. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology* 56: 41-71.
- Frey-Wyssling, A. 1981. Crystallography of the two hydrates of crystalline calcium oxalate in plants. *American Journal of Botany* 68: 130-141.
- García-Sánchez, R. y A. Monroy-Ata. 2005. Micrositios del pasto navajita (*Bouteloua gracilis*) en comunidades de pastizal y de matorral del Altiplano Mexicano. *TIPTIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 8:61-70.
- Garvie, L.A.J. 2003. Decay-induced biomineralization of the saguaro cactus (*Carnegiea gigantea*). *American Mineralogist* 88:1879-1888.
- Garvie, L.A.J. 2006. Decay of cacti and carbon cycling. *Naturwissenschaften* 93: 114-118.
- 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.
- Giordani, P. y G. Incerti, 2008. The influence of climate on the distribution of lichens: a case study in a borderline area (Liguria, NW Italy). *Plant Ecology* 195: 257-272.
- Godínez-Álvarez, H. y A. Valiente-Banuet. 1998. Germination and early seedling growth of Tehuacan Valley cacti species: the role of soils and seed ingestion by dispersers on seedling growth. *Journal of Arid Environments* 39: 21-31.
- Godínez-Álvarez, H., L. Rios-Casanova y F. Pérez. 2005. Characteristics of seedling establishment of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley, Mexico. *The Southwestern Naturalist* 50: 375-407.
- Godínez-Álvarez, H., T. Valverde y P. Ortega-Baez. 2003. Demographic trends in the Cactaceae. *The Botanical Review* 69: 174-203.
- Golley, F.B. 1986. Chemical plant-soil relationships in tropical forests. *Journal of Tropical Ecology* 2: 219-229.
- Goloboff, P., J. Farris y K. Nixon. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.
- Good-Ávila, S.V., V. Souza, B.S. Gaut y L.E. Eguiarte. 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103: 9124-9129.

- Graham, A. 1998. Factores históricos de la diversidad biológica de México. *In*: T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds). *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. Pp. 109-127.
- Guillén, R.S., J. Benitez, M. Martínez- Ramos y A. Casas. 2009. Seed germination of wild, *in situ*-managed, and cultivated populations of columnar cacti in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Journal of Arid Environments* 73: 407-413.
- Guillén, S., T. Terrazas, E. De la Barrera y A. Casas. 2011. Germination differentiation patterns of wild and domesticated columnar cacti in a gradient of artificial selection intensity. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 409-423.
- Guzmán, U., S. Arias y P. Dávila. 2003. *Catálogo de cactáceas mexicanas*. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F.
- Hartl, W.P., H. Klapper, B. Barbier, H. Jurgen Ensikat, R. Dronskowski, P. Muller, G. Ostendorp, A. Tye, R. Bauer y W. Barthlott. 2007. Diversity of calcium oxalate crystals in Cactaceae. *Canadian Journal of Botany* 85: 501-517.
- Hernández, H.M., C. Gómez-Hinostrosa y G. Hoffmann. 2010. Is geographical rarity frequent among the cacti of the Chihuahuan Desert. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 163-175.
- Hernández, M., T. Terrazas, A. Delgado-Alvarado y M. Luna-Cavazos. 2007. Los estomas de *Myrtillocactus geometrizans* (Mart ex. Pfeiff.) Console (Cactaceae): variación en su área de distribución. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30: 235-240.
- Hernández-González, O. y O. Briones-Villarreal. 2007. Crassulacean acid metabolism photosynthesis in columnar cactus seedlings during ontogeny: the effect of light on nocturnal acidity accumulation and chlorophyll fluorescence. *American Journal of Botany* 94: 1344-1351.
- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones y A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965-1978.
- Horner, H.T. y B.L. Wagner. 1995. Calcium oxalate formation in higher plants. *In*: S.R. Khan (ed). *Calcium oxalate in biological systems*. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp. 53-72.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2003. *Síntesis de Información Geográfica del Estado de Oaxaca*. INEGI. Aguascalientes, México.

- Jeffries, D.L. 1985. Analysis of the vegetation and soils of glades on calico rock sandstone in northern Arkansas. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 112: 70-73.
- King, L.J. 1969. Biocrystallography: an interdisciplinary challenge. *BioScience* 19: 505-518.
- Korth, K.L., S.J. Doege, S-H. Park, F.L. Goggin, Q. Wang, S.K. Gomez, G. Liu, L. Jia y P.A. Nakata. 2006. *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defense against chewing insects. *Plant Physiology* 141: 188-195.
- Kruckeberg, A.R. y D. Rabinowitz. 1985. Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 447-479.
- Lersten, N.R. y H.T. Horner. 2000. Calcium oxalate crystal types and trends in their distribution patterns in leaves of *Prunus* (Rosaceae: Prunoideae). *Plant Systematics and Evolution* 224: 83-96.
- Li, X., D. Zhang, V.J. Lynch-Holm, T.W. Okita y V.R. Franceschi. 2003. Isolation of a crystal matrix protein associated with calcium oxalate precipitation in vacuoles of specialized cells. *Plant Physiology* 133: 549-559.
- López, B.R., Y. Bashan, M. Bacilio, y G. De la Cruz-Agüero. 2009. Rock-colonizing plants: abundance of the endemic cactus *Mammillaria fraileana* related to rock type in southern Sonoran desert. *Plant Ecology* 201: 575-588.
- Lowenstam, H.A. 1981. Minerals formed by organisms. *Science* 211: 1126-1131.
- Lowenstam, H.A. y S. Weiner. 1989. Minerals and macromolecules. *In*: H.A. Lowenstam (ed). *On biomineralization*. Oxford University Press. Cary, North Carolina. 264 pp,
- Loza-Cornejo, S. 2004. Características de semillas, germinación y desarrollo de plántulas de seis especies de Pachycereae (Cactaceae). Tesis doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Loza-Cornejo, S. y T. Terrazas. 2003. Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae) *Journal of Plant Research* 116: 27-35.
- Loza-Cornejo, S., T. Terrazas. 2011. Morfo-anatómica de plántulas en especies de Pachycereae: ¿hasta cuando son plántulas? *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 88: 1-13.
- Loza-Cornejo, S., T. Terrazas, L. López-Mata y C. Trejo. 2003. Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus*

- queretaroensis* (Cactaceae): su significado adaptativo. *Interciencia* 28: 83-89.
- Lozano-García, S. 1989. Palinología y paleoambientes pleistocénicos de la Cuenca de México. *Geofísica Internacional* 28: 335-362.
- Luna-Vega, I. 2008. Aplicaciones de la biogeografía histórica a la distribución de las plantas mexicanas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 217-241.
- Malainine, M.E., A. Dufresne, D. Dupeyre, M.R. Vignon y M. Mahrouz. 2003. First evidence for the presence of weddellite crystallites in *Opuntia ficus indica* parenchyma. *Zeitschrift für Naturforschung* 58c: 812-816.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2: 176-177.
- Martínez-Hernández, E. y E. Ramírez-Arriaga. 1999. Palinoestratigrafía de la región de Tepexi de Rodríguez, Puebla, México – implicaciones cronoestratigráficas. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 16: 187-207.
- McAuliffe, J.R. 1994. Landscape evolution, soil formation, and ecological patterns and processes in Sonoran desert bajadas. *Ecological Monographs* 64: 112-148.
- McIntosh, M.E. 2002. Plant size, breeding system, and limits to reproductive success in two sister species of *Ferocactus* (Cactaceae). *Plant Ecology* 162: 273-288.
- Media Cybernetics. 1997. Image Pro Plus, Reference Guide. Version 3.1 for Windows. Silver Spring, Maryland.
- Méndez, E. y S.B. Pérez G. 2008. Germinación de *Echinopsis leucantha* (Cactaceae) I. Efectos de temperatura y concentraciones de calcio. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo* 40: 91-96.
- Méndez, M., A. Dorantes, G. Dzib, J. Argáez y R. Durán. 2006. Germinación y establecimiento de plántulas de *Pterocereus gaumeri*, una cactácea columnar, rara y endémica de Yucatán, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 79: 33-41.
- Metcalf, C.R. 1983. Secreted mineral substances. *In*: C.R.Metcalf y L. Chalk (eds). *Anatomy of the dicotyledons: wood structure and conclusion of the general introduction*. Vol. II. 2a. edición, Clarendon Press. Oxford. 297 pp.
- Metcalf, C.R. y L. Chalk. 1950. *Anatomy of dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford. 1 500 pp.

- Metcalfe, S.E., S.L. O'Hara, M. Caballero y S.J. Davies. 2000. Records of Late Pleistocene-Holocene climatic change in México- a review. *Quaternary Science Reviews* 19: 699-721.
- Meyrán, J. 1970. Las cactáceas columnares de Tehuacán. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 15: 6-15.
- Molano-Flores, B. 2001. Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). *Annals of Botany* 88: 387-391.
- Monje, P.V. y E.J. Baran. 2000. First evidences of the bioaccumulation of α -quartz in Cactaceae. *Journal of Plant Physiology* 157: 457-460.
- Monje, P.V. y E.J. Baran. 2002. Characterization of calcium oxalates generated as biominerals in cacti. *Plant Physiology* 128: 707-713.
- Monje, P.V. y E.J. Baran. 2004. Complex biomineralization pattern in Cactaceae. *Journal of Plant Physiology* 161: 121-123.
- Monje, P.V. y E.J. Baran. 2005. Evidence of formation of glushinskite as a biomineral in a Cactaceae species. *Phytochemistry* 66: 611-614.
- Moore, M.J. y R.K. Jansen. 2006. Molecular evidence for the age, origin, and evolutionary history of the American desert plant genus *Tiquilia* (Boraginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 668-687.
- Morrone, J.J. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean Islands based on panbiogeographic and cladistic analysis of the entomofauna. *Annual Review of Entomology* 51: 467-494.
- Müller, J.V. 2007. Herbaceous vegetation of seasonally wet habitats on inselbergs and lateritic crusts in west and central Africa. *Folia Geobotanica* 42: 29-61.
- Munguía-Rosas, M.A. y V.J. Sosa. 2008. Nurse plants vs. nurse objects: effects of woody plants and rocky cavities on the recruitment of the *Pilosocereus leucocephalus* columnar cactus. *Annals of Botany* 101: 175-185.
- Nakata, P.A. 2002. Calcium oxalate crystal morphology. *Trends in Plant Science* 7: 324.
- Nakata, P.A. 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164: 901-909.
- Navarro, M. del C. y E.M. González. 2007. Efecto de la escarificación de semillas en la germinación y crecimiento de *Ferocactus robustus* (Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae). *Zonas Áridas* 11: 195-205.

- Nyffeler, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences. *American Journal of Botany* 89: 312-326.
- Opel, M.R. 2005a. A morphological phylogeny of the genus *Conophytum* N.E.Br. (Aizoaceae). *Haseltonia* 11: 53-77.
- Opel, M.R. 2005b. Leaf anatomy of *Conophytum* N.E.Br. (Aizoaceae). *Haseltonia* 11: 27-52.
- Ortega-Baes, P. y M. Rojas-Aréchiga. 2007. Seed germination of *Trichocereus terscheckii* (Cactaceae): light, temperature and gibberellic acid effects. *Journal of Arid Environments* 69: 169-176.
- Ortega-Baes, P., M. Aparicio-González, G. Galíndez, P. del Fueyo, S. Sühring, y M. Rojas-Aréchiga. 2010. Are cactus growth forms related to germination responses to light? A test using *Echinopsis* species. *Acta Oecologica* 36: 339-342.
- Ortega-Gutiérrez, F., M. Elías-Herrera y M.G. Dávalos-Elizondo. 2008. On the nature and role of the lower crust in the volcanic front of the Trans-Mexican Volcanic Belt and its fore-arc region, southern and central Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 25: 346-364.
- Parker, K.C. 1988. Environmental relationships and vegetation associates of columnar cacti in the northern Sonoran Desert. *Vegetatio* 78: 125-140.
- Parker, K.C. 1991. Topography, substrate, and vegetation patterns in the northern Sonoran Desert. *Journal of Biogeography* 18:151-163.
- Pérez-García, E.A. y J. Meave. 2004. Heterogeneity of xerophytic vegetation of limestone outcrops in a tropical deciduous forest region in southern México. *Plant Ecology* 175: 147-163.
- Pérez-García, E.A., J. Meave, y C. Gallardo. 2001. Vegetación y flora de la región de Nizanda, Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México. *Acta Botánica Mexicana* 56: 19-88.
- Pérez-García, E.A., A. C. Sevilla, J. Meave y A. Scariot. 2009. Floristic differentiation in limestone outcrops of southern Mexico and central Brazil: a beta diversity approach. *Boletín de la Sociedad Botánica Mexicana* 84: 45-58.
- Pérez-Gutiérrez, R., L.A. Solari, A. Gómez-Truena y V.A. Valencia. 2009. El terreno Cuicateco: ¿cuenca oceánica con influencia de subducción del Cretácico Superior en el sur de México? Nuevos datos estructurales, geoquímicos y geocronológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 26: 222-242.

- Peters, E.M., C. Martorell y E. Ezcurra. 2008. Nurse rocks are more important than nurse plants in determining the distribution and establishment of globose cacti (*Mammillaria*) in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Arid Environments* 72: 593-601.
- Peterson, A.T. 2006. Uses and requirements of ecological niche models and related distributional models. *Biodiversity Informatics* 3: 59-72.
- Peterson, A.T., J. Soberón y V. Sánchez-Cordero. 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science* 285: 1265-1267.
- Pfeiffer, L. 1837. *Hucusque cognitarum. Enumeratio Diagnostica Cactearum. Sumtibus Ludovici Oehmigke. Berlin.*
- Pfeiffer L. 1838. Ueber Lemaire's Beschreibung einiger neue Cacten. *Allgemeine Gartenzeitung* 6: 142.
- Prychid, C.J., C.A. Furness y P.J. Rudall. 2003. Systematic significance of cell inclusions in Haemodoraceae and allied families: silica bodies and tapetal raphides. *Annals of Botany* 92: 571-580.
- Ramírez-Padilla, C.A. y T. Valverde. 2005. Germination responses of three congeneric cactus species (*Neobuxbaumia*) with differing degrees of rarity *Journal of Arid Environments* 61: 333-343.
- Reyes-Agüero, J.A., J.R. Aguirre-Rivera y H.M. Hernández. 2005. Notas sistemáticas y una descripción detallada de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrociencia* 39: 395-408.
- Reyes-Olivas, A., García-Moya, E., Lopez-Mata, L., 2002. Cacti–shrub interactions in the coastal desert of northern Sinaloa, Mexico. *Journal of Arid Environments* 52: 431-445.
- Rivera, E.R. y B.R. Smith. 1979. Crystal morphology and ¹³carbon/¹²carbon composition of solid oxalate in cacti. *Plant Physiology* 64: 966-970.
- Rivera-Aguilar, V., H. Godínez-Álvarez, I. Manuell-Cacheux y S. Rodríguez-Zaragoza. 2005. Physical effects of biological soil crusts on seed germination of two desert plants under laboratory conditions. *Journal of Arid Environments* 63: 344-352.
- Rocha, M., S.V. Good-Ávila, F. Molina-Freaner, H.T. Arita, A. Castillo, A. García-Mendoza, A. Silva-Montellano, B.S. Gaut, V. Souza y L.E. Eguiarte. 2006. Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso* 22: 329-344.

- Rodríguez-Ortega, C., M. Franco y M.C. Mandujano. 2007. Serotiny and seed germination in three threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *Basic and Applied Ecology* 7: 533-544.
- Rojas-Aréchiga, M., A. Casas y C. Vázquez-Yañes. 2001. Seed germination on wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central Mexico. *Journal of Arid Environments* 49: 279-287.
- Rojas-Aréchiga M., A. Orozco-Segovia y C. Vázquez-Yanes. 1998. Seed response to temperature of Mexican cacti species from two life forms: an ecophysiological interpretation. *Plant Ecology* 135: 207-214.
- Romero-Centeno, R., J. Zavala-Hidalgo, A. Gallegos y J.J. O'Brien. 2003. Isthmus of Tehuantepec wind climatology and ENSO signal. *Journal of Climate* 16: 2628-2639.
- Ruedas, M., S. Castillo-Argüero y T. Valverde. 2000. Respuesta germinativa y crecimiento de plántulas de *Mammillaria magnimamma* (Cactaceae) bajo diferentes condiciones ambientales. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66: 25-35.
- Ruedas, M., T. Valverde y J.A. Zavala-Hurtado. 2006. Analysis of the factors that affect the distribution and abundance of three *Neobuxbaumia* species (Cactaceae) that differ in their degree of rarity. *Acta Oecologica* 29:155-164.
- Ruiz, L.P. y T.A. Mansfield. 1994. A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytologist* 127: 473-481.
- Rzedowski, J. 2006. *Vegetación de México*. 1ª edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 432 pp.
- Sánchez-Soto, B.H., E. García Moya y T. Terrazas. 2005. Efecto de la hidratación discontinua sobre la germinación de tres cactáceas del desierto costero de Topolobampo, Ahome, Sinaloa. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 50: 4-14.
- Sánchez-Soto, B., A. Reyes-Oliva, E. García-Moya y T. Terrazas. 2010. Germinación de tres cactáceas que habitan la región costera del Noroeste de México. *Interciencia* 35: 299-305.
- Santana, J.R.H., M.A.O. Pérez y M.F. Mah Eng. 2009. Análisis morfoestructural del estado de Oaxaca, México: Un enfoque de clasificación tipológica del relieve. *Investigaciones Geográficas*. *Boletín del Instituto de Geografía* 68: 7-24.
- SAS Institute. 1989. *SAS users guide statistics*. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina.

- Searcy, K.B., B.F. Wilson y J.H. Fownes. 2003. Influence of bedrock and aspect on soils and plant distribution in the Holyoke Range, Massachusetts. *Journal of the Torrey Botanical Club* 130: 158-169.
- Servicio Geológico Mexicano (SGM). 2000. Carta geológica-minera Juchitán E15-10 D15-1 Oaxaca-Chiapas. SGM, Hidalgo, México.
- Servicio Geológico Mexicano. 2003. Carta geológico-minera Metztlán F14-D16 Hidalgo. Secretaría de Economía, México.
- Servicio Geológico Mexicano. 2007. Carta geológica-minera Santo Domingo E15-C64 Oaxaca. SGM, Hidalgo, México.
- Sindel, B.M. y P.W. Michael. 1992. Spread and potential distribution of *Senecio madagascariensis* Poir. (fireweed) in Australia. *Australian Journal of Ecology* 17: 21–26.
- Strong, A.W. y P.S. Williamson. 2007. Breeding system of *Astrophytum asterias*: an endangered cactus. *The Southwestern Naturalist* 52: 341-346.
- Ström, L. 1997. Root exudation of organic acids: importance to nutrient availability and the calcifuge and calcicole behaviour of plants. *Oikos* 80: 459-466.
- Ström, L., T. Olsson y G. Tyler. 1994. Differences between calcifuge and acidifuge plants in root exudation of low-molecular organic acids. *Plant Soil* 167: 239-245.
- Ström, L., A.G. Owen, D.L. Godbold y D.L. Jones. 2005. Organic acid and behaviour in a calcareous soil implication for rhizosphere nutrient cycling. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 2046-2054.
- Svenning, J-C. 2001. On the role on microenvironmental heterogeneity in the ecology and diversification of Neotropical rain-forest palms (Arecaceae). *The Botanical Review* 67: 1-53.
- Terrazas, T. y S. Arias. 2003. Comparative stem anatomy in the subfamily Cactoideae. *The Botanical Review* 68: 444-473.
- Terrazas, T. y S. Loza-Cornejo. 2002. Phylogenetic relationships of Pachycereae: a cladistic analysis based on anatomical and morphological data. *In*: T.H. Fleming y A. Valiente-Banuet (eds). *Evolution, ecology and conservation of the columnar cacti and their mutualists*. Arizona University Press. Tucson, Arizona. Pp. 25-41.
- Terrazas T., S. Loza-Cornejo y H.J. Arreola-Nava. 2005. Anatomía caulinar de las especies del género *Stenocereus* (Cactaceae). *Acta Botánica Venezuelica* 28: 321-336.

- Terrazas, T. y J.D. Mauseth. 2002. Shoot anatomy and morphology. *In*: P.S. Nobel (ed). *Cacti: biology and uses*. University of California Press. Berkeley, California. Pp. 23-40.
- Tillman-Sutela, E. y A. Kauppi. 1999. Calcium oxalate crystals in the mature seeds of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst. *Trees* 13: 131-137.
- Toledo, V.M. 1982. Pleistocene changes of vegetation in tropical Mexico. *In*: G.T. Prance (ed). *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press. New York, New York. Pp. 93-111.
- Torres, C.M.L. 1989. Estudio florístico y descripción de la vegetación del cerro Guiengola, en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca. Tesis Licenciatura, FES-Iztacala, UNAM, Tlanepantla, Estado de México.
- Trejo, I. 2004. Clima. *In*: A.J. García-Mendoza, M.J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds). *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Foundation. México, D.F. Pp. 67-85.
- Trejo-Salazar, R.E. 2007. Dinámica de la polinización de *Agave difformis*, *A. garciae-mendozae* y *A. striata* (Agavaceae) en la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Valiente-Banuet., A., P. Dávila, R.J. Ortega, M.C. Arizmendi, J.L. León, A. Breceda y J. Cancino. 1995. Influencia de la evolución de una pendiente de piedemonte en la vegetación del cardonal *Pachycereus pringlei* en Baja California Sur, México. *Investigaciones Geográficas* 3: 101-113.
- Vansteenkiste, D., J. Van Acker, M. Stevens, D. Le Thiec y G. Nepveu. 2007. Composition, distribution and supposed origin of mineral inclusions in sessile oak wood-consequences for microdensitometrical analysis. *Annals of Forestal Science* 64: 11-19.
- van Reeuwijk, L.P. (ed.). 1995. *Procedures for soil analysis*. Fifth edition. ISRIC Technical paper 9. Wageningen. 101 pp.
- Vázquez Sánchez, M. 2005. La evolución del cefalio con énfasis en la tribu Pachycereae. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Vázquez-Sánchez, M., T. Terrazas y S. Arias. 2005. Morfología y anatomía del cefalio de *Cephalocereus senilis* (Cactaceae). *Anales Jardín Botánico Madrid* 62: 1-9.

- Vázquez-Sánchez, M., T. Terrazas y S. Arias. 2007. Morphology and anatomy of the *Cephalocereus columna-trajani* cephalium: why to tilt? *Plant Systematics and Evolution* 265: 87-99.
- Velasco de León, M.P., R.A. Spicer y D.C. Steart. 2010. Climatic reconstruction of two Pliocene floras from Mexico. *Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments* 90: 99-110.
- Vidal Z., R. 2005. Las regiones climáticas de México I.2.2. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 164 pp.
- Volk, G.M., V.J. Lynch-Holm, T.A. Kostman, L.J. Goss y V.R. Franceschi. 2002. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biology* 4: 34-45.
- Wang, J.H., C.C. Baskin, X.L. Cui y G.Z. Du. 2009. Effect of phylogeny, life history and habitat correlates on seed germination of 69 arid and semi-arid zone species from northwest China. *Evolutionary Ecology* 23: 827-846.
- Ward, M.D. 2005. Snapshots of crystal growth. *Science* 308: 1566-1567.
- Webb, M.A. 1999. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell* 11: 751-761.
- Webb, C.O., D.D. Ackerly, M.A. McPeck y M.J. Donoghue. 2002. Phylogenies and community ecology. *Annual Review Ecology and Systematics* 33: 475-505.
- Wendt, T. 1998. Composición, afinidades florísticas y orígenes de la flora arbórea del dosel de los bosques tropicales húmedos de la vertiente mexicana del Atlántico. *In*: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds). *Biodiversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. Pp. 581-664.
- White, P.J. y M.R. Broadley. 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* 92: 487-511.
- Wilf, P., S.L. Wing, D.R. Greenwood y C.L. Greenwood. 1998. Using fossil leaves as paleoprecipitation indicators: an Eocene example. *Geology* 26: 203-206.
- Wolfe, J.A. 1993. A method of obtaining climatic parameters from leaf assemblages. *U.S. Geological Survey Bulletin* 2040.
- Yu, L. J. Jiang, C. Zhang, L. Jiang, N. Ye, Y. Luu, G. Yang, E. Liu, C. Peng, Z. He y X. Peng. 2010. Glyoxylate rather than ascorbate is an efficient precursor for oxalate biosynthesis in rice. *Journal of Experimental Botany* 61: 1625-1634.

- Zavala-Hurtado, J.A. y P.L. Valverde. 2003. Habitat restriction in *Mammillaria pectinifera*, a threatened endemic Mexican cactus. *Journal of Vegetatio Science* 14: 891-898.
- Zavala-Hurtado, J.A., F. Vite, E. Ezcurra, 1998. Stem tilting and pseudocephalium orientation in *Cephalocereus columna-trajani* (Cactaceae): a functional interpretation. *Ecology* 79: 340-348.
- Zona, S. 2004. Raphides in palm embryos and their systematic distribution. *Annals of Botany* 93: 415-421.
- Zunino, M. 2005. Filogenia de áreas de distribución: algunas reflexiones teóricas. *Acta Zoológica Mexicana* 21: 115-118.

Apéndice. Caracteres y estados de carácter utilizados en el análisis cladístico.

Carácter	Estados
1 Hábito de crecimiento	0) con ramas, 1) sin ramas
2 Dirección de los ápices de las ramas	0) recto, 1) inclinado
3 Tipo de ramificación	0) acrópeta, 1) basípeta
4 Pruinosidad de las ramas	0) no pruinosas, 1) pruinosas
5 Diámetro de las ramas	0) >30 cm, 1) 20-30 cm, 2) <15 cm
6 Altura de la 1a. reproducción	0) > 2.5 m, 1) ≤ 2.5 m.
7 Zona florífera (ZF)	0) ausente, 1) presente
8 Posición de la zona florífera	0) ausente, 1) apical, 2) lateral
9 Tipo de zona florífera (ZF)	0) ausente, 1) pseudocefalio, 2) cefalio
10 Fibras en el xilema de la zona florífera	0) ausentes, 1) presentes en parches
11 Número de costillas	0) < 30, 1) ≥ 30
12 Altura de la costilla	0) ≥ 1.5 cm, 1) < 1.5 cm
13 Distancia entre aréolas	0) < 1.5 cm, 1) > 1.5 cm
14 Podarios de las aréolas.	0) ausente, 1) presente
15 Largo de la aréola.	0) ≥ 5 mm, 1) < 5 mm
16 Forma de la aréola.	0) circulares, 1) obovadas, 2) ovadas
17 Dirección de la espina central	0) 90 grados, 1) 45 grados
18 Tricomas capitados (TC)	0) ausentes, 1) presentes
19 Forma célula apical TC	0) botuliforme, 1) cónica
20 Forma cristales en célula apical TC	0) arenisca, 1) prisma
21 Forma cristales en células pie TC	0) arenisca, 1) prisma, 2) acículas
22 Grosor de la pared de la célula apical TC	0) gruesa ≥ 2.8 μm, 1) delgada < 2.8 μm

Apéndice. Continuación (2/4).

Carácter	Estados
23 Largo de la flor	0) > 5.5 cm, 1) ≤ 5.5 cm
24 Consistencia de la escamas en la flor	0) coriáceas, 1) carnosas
25 Podarios en el pericarpelo	0) ausente, 1) presente
26 Forma de la escama del pericarpelo	0) oblonga, 1) ovada, 2) deltada
27 Simetría basal de la escama del pericarpelo	0) presente, 1) ausente
28 Forma del ápice de escama del pericarpelo	0) agudo, 1) acuminado, 2) mucronado
29 Tricomas en el pericarpelo	0) largos, 1) cortos
30 Espinas en la flor	0) presentes, 1) ausentes
31 Ancho de la pared del pericarpelo	0) > 4mm, 1) 3-4 mm, 2) < 3 mm
32 Altura de la columna	0) gruesa ≥ 1.8 mm, 1) media 1.2-1.8 2) delgada ≤ 1.2 mm
33 Forma de la cámara nectarial (CN)	0) obovada, 1) oblonga
34 Proyección antes de la liberación de cada uno de los filamentos	0) ausente, 1) presente
35 Grosor del diafragma	0) grueso, 1) delgado
36 Modificación al tejido de liberación de los filamentos	0) diafragma, 1) acum de parénquima 2) tejido nectarial
37 Forma de las células de las crestas (CC) de los nectarios	0) cuadradas, 1) rectangulares
38 Unión de la pared anticlinal de las CC de los nectarios	0) sin reborde, 1) con reborde
39 Domos excéntricos en las células de los valles (CV) de los nectarios	0) ausente, 1) presente
40 Pared periclinal de las CV de los nectarios	0) estriada, 1) lisa
41 Unión de la pared anticlinal de las CV de los nectarios	0) estriada, 1) ondulada, 2) lisa

Apéndice. Continuación (3/4).

Carácter	Estados
42 Largo de los filamentos del verticilo más interno (VI)	0) > 15 mm, 1) ≤ 15 mm
43 Estrías perpendiculares al eje mayor de la pared periclinal de las células de los VI	0) ausente, 1) presente
44 Amplitud de la pared anticlinal de las células de los VI	0) angosta, 1) ancha
45 Relieve de la pared anticlinal de las células de los VI	0) lisa, 1) estriada
46 Unión entre células en la pared anticlinal de los verticilos externos (VE)	0) profunda, 1) superficial
47 Amplitud de la unión entre células en la pared anticlinal de los VE	0) angosta, 1) ancha
48 Pared periclinal de las células de los VE	0) lisa, 1) ligeramente estriada, 2) fuertemente estriada
49 Pared anticlinal de las células de los VE	0) lisa, 1) estriada, 2) con reborde
50 Superficie de la pared periclinal de las células del estilo	0) ligera/ rugosa 1) fuerte/ estriada, 2) estrias perpendicular
51 Número de lóbulos del estigma	0) > 9, 1) ≤ 9
52 Longitud de los lóbulos del estigma	0) ≥ 3mm, 1) < 3 mm
53 Superficie de las células de la cavidad estilar	0) con tricomas, 1) papilosa
54 Forma de la semilla (SEM)	0) ampliamente ovoide, 1) ovoide
55 Angulo entre RV y RHM	0) ≤ 18°, 1) > 18°
56 Tamaño de la RHM	0) pequeña, 1) mediana
57 Tamaño de la semilla	0) larga, 1) muy larga, 2) mediana
58 Quilla en la región apical	0) presente, 1) ausente

Apéndice. Continuación (4/4).

Carácter	Estados
59 Forma de la RHM	0) un solo complejo, 1) herradura
60 Borde de la testa cerca de la RHM	0) no expandido, 1) ligeramente expandido, 2) expandido
61 Intersticios en la región lateral (RL) de la semilla	0) ausentes, 1) presentes
62 Microrrelieve de la pared periclinal de las células de la RL de la semilla	0) presente, 1) ausente
63 Microrrelieve del límite de la pared anticlinal de las células de la RL de la semilla	0) acanalado, 1) ligeramente acanalado, 2) liso
64 Grosor de la cutícula de las células epidérmicas de la parte media del tallo	0) gruesa $\geq 3.5 \mu\text{m}$, 1) delgada $< 3 \mu\text{m}$
65 Grosor de la hipodermis de la parte media del tallo	0) gruesa ≥ 5 estratos, 1) delgada < 5 estratos
66 Cristales en la hipodermis	0) presente, 1) ausente
67 Alcaloides	0) ausentes, 1) presentes
68 Terpenoides	0) ausentes, 1) presentes