

LA CITOLOGIA Y LA SISTEMÁTICA MOLECULAR EN LA FAMILIA CACTACEAE*.

J. Hugo Cota^{1,2}
Robert S. Wallace¹

Es bien conocido que la familia de las cactáceas exhibe una gran diversidad de especies, y los límites interespecíficos en algunos géneros son aún conflictivos, tal es el caso de *Echinocereus*, *Ferocactus* y *Opuntia*. La riqueza de especies, la complejidad taxonómica, y la relativamente amplia distribución geográfica de la familia obedece en parte a varios eventos biológicos, tales como: evolución convergente, hibridación, poliploidía, diferentes síndromes de polinización y aislamiento reproductivo, entre otros. Como consecuencia, el alto grado de variabilidad morfológica en caracteres vegetativos en algunos casos está relacionado con factores ambientales, y puede ser una manifestación de factores genéticos.

Evolución convergente en varias estructuras (Morfología del tallo y flor) en taxa filogenéticamente distantes, es considerada como una de las principales causas de desacuerdo taxonómico para establecimiento de límites de especies (Gibson y Nobel 1986). Por ejemplo, similar hábito de crecimiento puede ocurrir en dos o más diferentes líneas evolutivas: *Epiphyllum/Rhipsalis/Schlumbergera*,

Ferocactus/Mammillaria, y *Gymnocalum/Copiapoa*. Hasta cierto punto, los desacuerdos taxonómicos en los diferentes tratamientos propuestos a varios niveles reflejan, en parte, la carencia de estudios filogenéticos que proporcionen la información necesaria para clarificar la genealogía entre los principales linajes de la familia.

A pesar de las discrepancias taxonómicas entre los diferentes autores, generalmente se acepta que la familia Cactaceae se encuentra bien ubicada en el orden Caryophyllales de las Centrospermas. De hecho, evidencia con estudios moleculares indica que a la familia Cactaceae junto con otros miembros representantes del orden carecen de intrón rpl2 en el genoma del cloroplasto (Downie y Palmer, 1944). Así mismo, estudios fenéticos y cladísticos en varias familias de las Centrospermas colocan a la familia Aizoaceae como grupo hermano de las cactáceas, en tanto que la familia Portulacaceae aparece como una familia primitiva dentro del orden (Rodman et al., 1984). En lo que a la familia Cactaceae se refiere, también hay un aceptado consenso en dividir a la familia en tres subfamilias: Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae, cada una de ellas monofilética (Buxbaum, 1958). Por lo que respecta a los aspectos taxonómicos del resto de la familia (tribus, subtribus, y otras divisiones taxonómicas), la situación se vuelve problemática, y no es el objetivo de este artículo discutir tales circunscripciones.

¹ Iowa State University, Botany Department, Ames, Iowa 50011

² Univ. Autónoma del Edo. de Morelos, Lab. de Sistemática Vegetal, Cuernavaca, Mor.

* Estudio parcialmente subsidiado por la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y The Cactus and Succulent Society of America.

A través de los años las herramientas taxonómicas utilizadas en estudios biosistemáticos de plantas vasculares y no vasculares han también evolucionado. Nuevas técnicas han sido diseñadas para comprender mejor la complejidad biológica, procesos evolutivos y relaciones filogenéticas en diferentes grupos de organismos. Sin embargo, en la familia Cactaceae la gran mayoría de estudios han estado basados en aspectos morfológicos (taxonomía clásica y biogeografía). Otros pocos estudios son ejemplos en los cuales se han empleado otras herramientas taxonómicas, tales como citología y bioquímica, o una combinación de ambas con caracteres morfológicos. En la pasada década, el uso de ácidos nucleicos para clarificar aspectos filogenéticos y evolutivos en plantas vasculares ha tenido una gran trascendencia en sistemática molecular. Estudios en sistemática molecular en la familia Cactaceae, utilizando diferentes fragmentos o genes del genoma nuclear y/o del genoma del cloroplasto se han iniciado recientemente. Los resultados preliminares son bastante promisorios ya que potencialmente han generado información filogenética para clarificar algunos de los aspectos biosistemáticos en la familia. Este artículo tiene por objetivo discutir brevemente las líneas de investigación que se han seguido en la familia Cactaceae en las últimas dos décadas (con excepción de los aspectos citológicos, que datan de los años 30's). Se enfatizan los estudios citológicos, bioquímicos y moleculares, y cómo estas técnicas se han aplicado para entender algunos aspectos de la historia evolutiva y taxonómica de la familia. El hecho de que en este artículo no se incluyan muchos de los importantes trabajos de taxonomía clásica de las cactáceas no significa que éstos carezcan de importancia. Por el contrario, tales estudios han sido una base fundamental para

la continuación de estudios utilizando técnicas más complicadas, pero por cuestiones técnicas y de espacio no se mencionan en este artículo.

Estudios citotaxonómicos en la familia Cactaceae:

Los primeros estudios citológicos en la familia datan de mediados de los años 30's. En estos estudios pioneros de citología en cactáceas se analizaron muestras con material meiótico y mitótico. A la fecha, para la familia existen numerosos estudios de esta naturaleza en los cuales se reportan citotipos tanto diploides como poliploides. Entre aquellos que incluyen material meiótico se encuentran Beard, 1937; Remski, 1954; Katagiri, 1955; Pinkava et al., 1977, 1992; Ross, 1981; Mazzola et al., 1988. La mayoría de estos estudios han servido para conocer el número básico para la familia, y para determinar variaciones (formas poliploides) del número básico en los diferentes grupos de cactáceas. De la misma manera, los análisis de figuras meióticas han sido útiles para clarificar el estado híbrido de otros miembros de la familia, en especial en las especies de *Opuntia* (Baker y Pinkava, 1987; Pinkava et al., 1992). Con este tipo de estudios se han visto que algunos híbridos se encuentran reproductivamente aislados de sus progenitores, por lo que nuevos cambios nomenclaturales han sido propuestos, debido en parte al aislamiento reproductivo y a diferencias en características morfológicas (Pinkava y Parfitt, 1988). Igualmente, los análisis de figuras meióticas y comportamiento de cromosomas en las diferentes fases de profase I, han revelado rearreglos cromosómicos, tales como translocaciones en *O. leptocaulis* (Pinkava et al., 1985), e inversiones en *O. curvospina* (Pinkava et al., 1973), mismos que representan los primeros reportes de cambios cromosómicos estructurales en la familia.

A través de los años las herramientas taxonómicas utilizadas en estudios biosistemáticos de plantas vasculares y no vasculares han también evolucionado. Nuevas técnicas han sido diseñadas para comprender mejor la complejidad biológica, procesos evolutivos y relaciones filogenéticas en diferentes grupos de organismos. Sin embargo, en la familia Cactaceae la gran mayoría de estudios han estado basados en aspectos morfológicos (taxonomía clásica y biogeografía). Otros pocos estudios son ejemplos en los cuales se han empleado otras herramientas taxonómicas, tales como citología y bioquímica, o una combinación de ambas con caracteres morfológicos. En la pasada década, el uso de ácidos nucleicos para clarificar aspectos filogenéticos y evolutivos en plantas vasculares ha tenido una gran trascendencia en sistemática molecular. Estudios en sistemática molecular en la familia Cactaceae, utilizando diferentes fragmentos o genes del genoma nuclear y/o del genoma del cloroplasto se han iniciado recientemente. Los resultados preliminares son bastante promisorios ya que potencialmente han generado información filogenética para clarificar algunos de los aspectos biosistemáticos en la familia. Este artículo tiene por objetivo discutir brevemente las líneas de investigación que se han seguido en la familia Cactaceae en las últimas dos décadas (con excepción de los aspectos citológicos, que datan de los años 30's). Se enfatizan los estudios citológicos, bioquímicos y moleculares, y cómo estas técnicas se han aplicado para entender algunos aspectos de la historia evolutiva y taxonómica de la familia. El hecho de que en este artículo no se incluyan muchos de los importantes trabajos de taxonomía clásica de las cactáceas no significa que éstos carezcan de importancia. Por el contrario, tales estudios han sido una base fundamental para

la continuación de estudios utilizando técnicas más complicadas, pero por cuestiones técnicas y de espacio no se mencionan en este artículo.

Estudios citotaxonómicos en la familia Cactaceae:

Los primeros estudios citológicos en la familia datan de mediados de los años 30's. En estos estudios pioneros de citología en cactáceas se analizaron muestras con material meiótico y mitótico. A la fecha, para la familia existen numerosos estudios de esta naturaleza en los cuales se reportan citotipos tanto diploides como poliploides. Entre aquellos que incluyen material meiótico se encuentran Beard, 1937; Remski, 1954; Katagiri, 1955; Pinkava et al., 1977, 1992; Ross, 1981; Mazzola et al., 1988. La mayoría de estos estudios han servido para conocer el número básico para la familia, y para determinar variaciones (formas poliploides) del número básico en los diferentes grupos de cactáceas. De la misma manera, los análisis de figuras meióticas han sido útiles para clarificar el estado híbrido de otros miembros de la familia, en especial en las especies de *Opuntia* (Baker y Pinkava, 1987; Pinkava et al., 1992). Con este tipo de estudios se han visto que algunos híbridos se encuentran reproductivamente aislados de sus progenitores, por lo que nuevos cambios nomenclaturales han sido propuestos, debido en parte al aislamiento reproductivo y a diferencias en características morfológicas (Pinkava y Parfitt, 1988). Igualmente, los análisis de figuras meióticas y comportamiento de cromosomas en las diferentes fases de profase I, han revelado rearrreglos cromosómicos, tales como translocaciones en *O. leptocaulis* (Pinkava et al., 1985), e inversiones en *O. curvospina* (Pinkava et al., 1973), mismos que representan los primeros reportes de cambios cromosómicos estructurales en la familia.

Recientemente, Gama y Mercado-Ruaro (1993) han empleado información citológica para evaluar y correlacionar variación morfológica en diferentes poblaciones de *Pachycereus weberi*. Actualmente en Arizona State University, Donald J. Pinkava y colaboradores, entre ellos Jon Rebman continúan los estudios citológicos en la familia Cactaceae, con especial énfasis en los procesos de poliploidía e hibridación en la subfamilia Opuntioideae.

Por otra parte, información acerca de la morfología de los cromosomas y/o representación cariotípica es aún escasa de la familia. Lo anterior probablemente refleja la dificultad para preparar cromosomas de cactáceas, lo cual, aunado al pequeño tamaño de los cromosomas hace el análisis más difícil. Además, el tejido de las cactáceas generalmente presenta mucilago, mismo que complica la rutina de squash y obstruye la observación de los cromosomas.

El cariotipo es la apariencia fenotípica de los cromosomas sin considerar su actividad y/o contenido genético (Jackson, 1971). Con la construcción de cariotipos se puede observar diferencias morfológicas en los cromosomas, y estas variaciones pueden ser usadas para caracterizar grupos particulares. Los cariotipos son obtenidos a través del análisis y observación de los cromosomas en el estado de metafase de mitosis, ya que esta fase es la más apropiada para la observación de cromosomas debido a que estos exhiben el máximo grado de concentración. Algunos de los caracteres cariotípicos que son útiles como marcadores taxonómicos son: número de satélites o constricciones secundarias, radio de los brazos del cromosoma, y localización de la región nuclear organizadora.

A la fecha, se tiene referencia de tres estudios cariotípicos en la familia. Johnson (1980) publicó los primeros cariotipos para la

familia, basado en tres variedades de *Mammillaria prolifera* con diferente número cromosómico. Así mismo en las especies examinadas se observó un incremento en el tamaño de los cromosomas al incrementar el nivel de ploidía; sin embargo, la morfología general de los cromosomas son metacéntricos, algunos submetacéntricos y pocas constricciones secundarias. A su vez Palomino et al. (1988) reportan cariotipos de dos especies y una variedad de *Nyctocereus*.

Los taxa incluidos en dicho estudio resultaron ser diploides ($2n=22$), y la morfología de los cromosomas mostró patrones similares a los indicados anteriormente. Más recientemente, Cota y Wallace (en prensa) en un análisis cariotípico de 12 especies de *Echinocereus* encontraron que el género está caracterizado por cariotipos simétricos, con la mayoría de cromosomas del tipo metacéntrico, y algunos submetacéntricos, y de uno a tres satélites presentes en el brazo corto del cromosoma. Otros estudios de la morfología de cromosomas en la subfamilia Opuntioideae (*Opuntia*) y tribu Cacteeae de la subfamilia Cactoideae (*Ferocactus* y *Rhipsalis*) confirman las observaciones anteriores para los cromosomas de cactáceas: cromosomas pequeños (2-5 μm), morfológicamente uniformes y con uno o dos pares de satélites (Cota y Wallace, en prep.).

Las cactáceas en general son una familia de origen relativamente reciente (R. Thorne, com. per.) que aparenta estar caracterizada por la presencia de cromosomas pequeños y con cariotipos homogéneos (simétricos). Es posible que el origen relativamente reciente de la familia esté asociado con procesos lentos de rearreglos cromosómicos. Asimismo, la existencia de cariotipos homogéneos en miembros de la familia distintamente relacionados puede ser explicada debida a cambios Robertsonianos, en particular fusión céntrica de cromosomas,

mismas que originan cariotipos simétricos (Cota y Wallace, en prensa; Palomino et al., 1988).

Finalmente los estudios citológicos han sido también importantes para comprender otras tendencias evolutivas en la familia. Por ejemplo, Pinkava et al., (1985) han indicado que la poliploidía ha desempeñado un importante papel en la evolución de la familia. De hecho, diferentes niveles de ploidía han sido reportados: triploides, tetraploides y sexaploides en *Opuntia* (Pinkava et al., 1973), tetraploides en *Echinocereus* spp. (Cota y Philbrick, 1994; Pinkava et al., (1977). Asimismo, y aunque la distribución de poliploides en la familia permanece aún incompleta debido en parte a la carencia de muestreo citológico, Pinkava et al., (1992) han indicado que los poliploides en la subfamilia Opuntioideae son relativamente más comunes en el hemisferio sur. Por su parte, Cota y Philbrick (1994) indican que los citotipos poliploides en *Echinocereus* se encuentran distribuidos a elevaciones y latitudes mayores que los ancestros diploides.

Estudios moleculares en la familia

Cactaceae:

Como se mencionó anteriormente, en la familia Cactaceae, así como en otras familias de plantas vasculares, las clasificaciones han dependido principalmente en caracteres morfológicos. Como consecuencia, muchos de los aspectos filogenéticos permanecen sin resolver. Wallace (en prensa) hace mención de la complejidad evolutiva de las cactáceas y a los problemas asociados con el desarrollo de una clasificación con bases filogenéticas indicando que "the cacti represent an assemblage of structurally diverse plants which manifest a series of morphological and habit parallelisms, in addition to expressing extreme levels of specialization in vegetative, floral and other morphological characters. This situation presents the investigator with a

significant dilemma regarding the assessment of whether morphological character changes observed in various lineages are indeed homologous (a requirement for proper phylogenetic analysis) or whether parallel evolution is suspect". El mayor problema con caracteres morfológicos es su plasticidad debido en gran parte a factores ambientales y evolución paralela. Dado que algunos de estos caracteres vegetativos han evolucionado independientemente en diferentes linajes, los casos de convergencia evolutiva generalmente producen confusión en los tratamientos taxonómicos. Por el contrario, los caracteres o datos moleculares tienen varias ventajas sobre los morfológicos: son de origen genético y por lo tanto hereditarios, es mucho más fácil determinar la homología de caracteres (los caracteres provienen de un ancestro común), por lo que disminuyen el riesgo de tratar con caracteres análogos debido a la evolución convergente. Lo anterior tiene particular importancia en clasificación, ya que una clasificación evolutiva debe, en principio, reflejar la filogenia o cambio de carácter de estados a partir de un ancestro común. Asimismo, cabe mencionar que a pesar del problema de evolución convergente, los datos moleculares no están divorciados de la información morfológica y otros tipos de datos como por ejemplo, citológicos y-o bioquímicos. De hecho, Hillis (1987) ha indicado que los caracteres morfológicos y moleculares se encuentran relacionados, ya que en conjunto los datos provenientes de diferentes fuentes tienen el potencial de producir un mejor análisis filogenético.

En las últimas décadas, los estudios sistemáticos moleculares han evolucionado dramáticamente y actualmente representan un medio rápido y eficaz para estudiar aspectos evolutivos y filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos. Estos

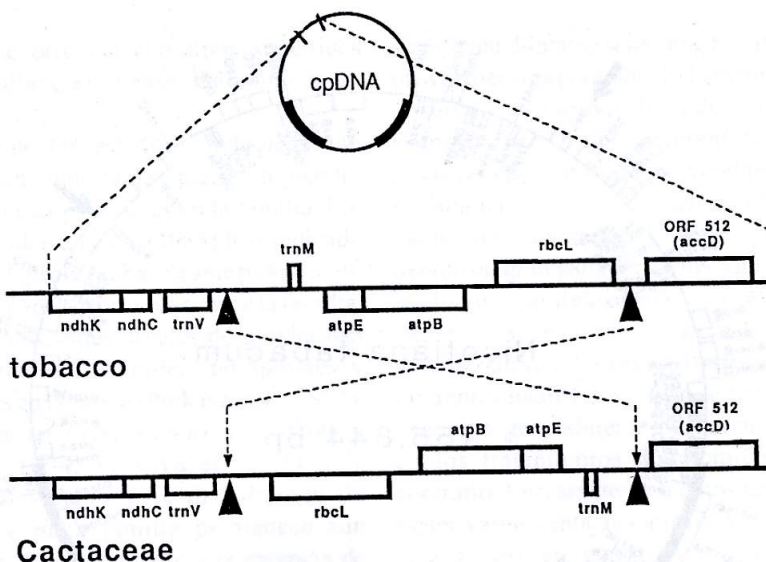


Fig. 11.- Inversión de 6kn en la región sencilla grande del ADN del cloroplasto. Esta inversión es característica de la familia Cactaceae. Otras familias vegetales muestran orden génico similar a *Nicotiana tabaco*. Los puntos terminales aproximados de la inversión se presentan en triángulos en negritas. (Figura modificada de Downie y Palmer, 1994).

comprender las relaciones taxonómicas en la familia. De hecho, los métodos bioquímicos tienen un gran potencial para resolver preguntas acerca de la evolución y filogenia de las cactáceas. Actualmente, los estudios quimiotaconómicos han declinado, y en su lugar los estudios de sistemática micromolecular tienden al uso de las técnicas de ácidos desoxirribonucleicos (ADN).

En quimiotaconomía, los productos secundarios del metabolismo son de importancia ya que representan productos intermedios y-o finales de procesos biosintéticos. La distribución de metabolitos varía entre los diferentes grupos de plantas, por lo que su presencia o ausencia en las diferentes rutas biosintéticas es útil para evaluar el grado de relación filogenética. Es evidente que estos productos pueden usarse como marcadores taxonómicos. De hecho, las betalainas representan un producto secundario y también un marcador taxonómico para el orden Caryophyllales.

Los compuestos químicos de utilidad en quimiotaconomía se clasifican de acuerdo a su tamaño molecular en macro y micromoléculas. Las macromoléculas incluyen ácidos nucleicos [ácido ribonucleico (ARN) y ADN] y proteínas, mientras que las micromoléculas incluyen compuestos de menor tamaño tales como alcaloides, flavonoides, terpenoides y pigmentos lípidos, entre otros. De estos compuestos secundarios, las proteínas y flavonoides son las moléculas que han proporcionado valiosa información en los estudios sistemáticos de las cactáceas. Wallace (1986) menciona con más detalle las principales técnicas bioquímicas que han sido empleadas para estudiar las relaciones taxonómicas y evolutivas en la familia Cactaceae.

Entre los estudios bioquímicos en la familia se encuentran los siguientes: Wallace y Fairbrothers (1986) usaron proteínas de la semilla en diferentes poblaciones de *Opuntia humifusa*, y determinaron que la variación de

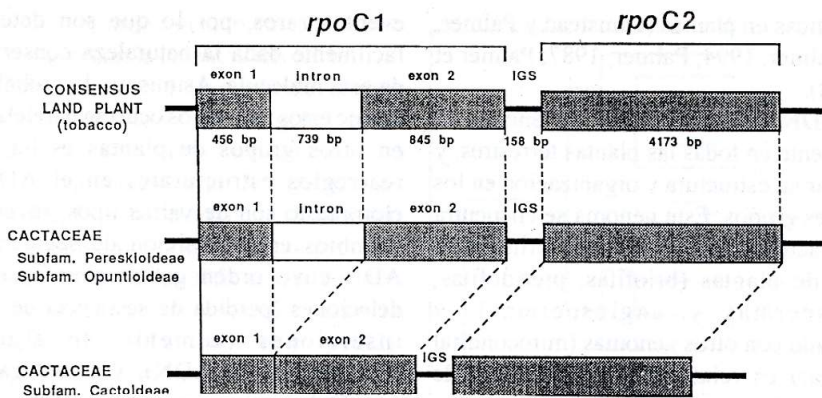


Fig. 12 - Representación esquemática de la pérdida del intrón en el gen *rpoC1*. La subfamilia Pereskioideae y la subfamilia Opuntioideae de la familia Cactaceae, al igual que la mayoría de plantas terrestres, presentan este intrón en el ADN del cloroplasto. Sin embargo, esta región está ausente en la subfamilia Cactoideae, lo cual es evidencia monofilética para esta subfamilia.

esta especie se encuentra relacionada con cambios en genotipos en poblaciones aisladas y/o fijación genética. Más recientemente Miller (1988) empleó flavonoides florales para determinar las relaciones filogenéticas en *Echinocereus*. Sus resultados indicaron que los flavonoides tienen relativamente poco uso filogenético a nivel de secciones; sin embargo, estos compuestos químicos fueron útiles para establecer relaciones interespecíficas, particularmente en especies que tienen caracteres florales similares. Finalmente, Parker y Hamrick (1992) han presentado una de las más recientes e importante contribuciones en términos de estructura genética a nivel intrapoblacional en la familia. Este estudio se ha realizado en el cacto columnar *Lophocereus schottii*, que se reproduce generalmente de manera asexual. No obstante, análisis de isoenzimas sugieren que en esta especie ambos tipos de reproducción (sexual y asexual) han sido importantes para el mantenimiento de diversidad genética.

Por otra parte, el empleo de técnicas químicas (alozimas) para determinar variación genética es de importancia en

poblaciones en peligro o vías de extinción. Una de las ventajas de los estudios de variación genética radica en la estimación de la diversidad genética y variabilidad a nivel poblacional para planear estrategias de conservación y propagación de especies amenazadas y/o en peligro de extinción. Igualmente, los coeficientes de identidad genética pueden ser empleados para determinar límites de especies en complejos taxonómicos, en particular aquellos de origen híbrido. Indudablemente, en la familia Cactaceae estas técnicas pueden ser aplicadas de inmediato, en especial en aquellas especies que son vulnerables y/o que se encuentran amenazadas de extinción. Un inventario y monitoreo de esta naturaleza en especies raras, o cuya densidad poblacional es muy reducida, es de vital importancia para el mantenimiento no sólo de la variabilidad genética sino también de la biodiversidad.

El ADN del cloroplasto y la Sistemática Molecular Vegetal:

Recientemente se han publicado varios artículos acerca de la utilidad y ventajas de los métodos moleculares, en especial el uso de ADN para determinar relaciones

filogenéticas en plantas (Olmstead y Palmer, 1994; Palmer, 1994; Palmer, 1987; Palmer et al., 1988).

El ADN del cloroplasto se encuentra básicamente en todas las plantas terrestres, y es similar en estructura y organización en los diferentes grupos. Este genoma se encuentra bien caracterizado en los cuatro principales grupos de plantas (briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas), y comparado con otros genomas (mitocondrial y nuclear) es relativamente más fácil de estudiar en laboratorio. El cloroplasto es un órgano de origen endosimbiótico y contiene la información genética responsable la producción de enzimas requeridas en fotosíntesis, transferencia de energía, y varios ribosomas y otras proteínas.

Estructuralmente, el ADN del cloroplasto es una molécula circular de aproximadamente 150 kilobases (1kb=1000 bp). Contiene cuatro regiones: una copia sencilla grande (LSC), una copia sencilla pequeña (SSC), y dos regiones invertidas (inverted repeat=IR) que contienen copias exactas de la misma secuencia, pero invertidas en una orientación opuesta (Fig. 10). El contenido y orden de genes es muy estable en plantas fotosintéticas, y se ha demostrado que la tasa de cambio evolutivo en la molécula es apropiado para estudios filogenéticos prácticamente a cualquier nivel taxonómico (Palmer, 1986; 1987; Palmer et al., 1988). Su tamaño relativamente pequeño y naturaleza conservadora lo hacen una molécula ideal, ya que es fácil de manipular y analizar con diferentes técnicas (endonucleasas restrictivas, secuencia genética). Además, este genoma se presenta en múltiples copias por endo, su aislamiento del tejido fotosintético es relativamente sencillo y requiere pocas cantidades de tejido.

Los cambios estructurales del orden genético en el genoma del cloroplasto son

eventos raros, por lo que son detectados fácilmente dada la naturaleza conservadora de esta molécula. Asimismo, la probabilidad de que estos rearrreglos ocurran paralelamente en otros grupos de plantas es baja. Los rearrreglos estructurales en el ADN del cloroplasto son de varios tipos: inversiones (cambios en la posición de segmentos de ADN cuyo orden genético es invertido), deleciones (pérdida de secuencia de ADN), inserciones (aumento de alguna(s) secuencia(s) de ADN), y translocaciones (movimiento de segmentos de ADN de una a otra parte de genoma). Todos estos tipos de cambios estructurales, aunque raros, se han reportado en diversos grupos de plantas vasculares y no vasculares, y son interpretados como caracteres de gran importancia filogenética ya que proporcionan substancial apoyo para la definición de linajes evolutivos monofiléticos.

Algunos estudios en la familia que han empleado sistemática molecular:

Inversión en el cpDNA. Inicialmente, Wallace identificó la presencia de una inversión de aproximadamente 6 kb en la región de la copia sencilla grande (LSC) en *Pereskia sacharosa*, y posteriormente confirmó su presencia en miembros de las tres subfamilias de Cactáceas, mostrando que dicha inversión es característica de la familia. Esta rara inversión (Fig. 11) representa un fuerte carácter filogenético que apoya el origen monofilético de la familia. En un estudio de los Caryophyllales, la misma inversión ha sido reportada por Downie y Palmer (1944) en *P. sacharosa* y ocurre paralelamente en *Chenopodium* (Chenopodiaceae). Por el contrario, taxa representativo de otras familias dentro de los Caryophyllales tales como Aizoaceae, Basellaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae y Portulacaceae, carecen de dicha inversión en el ADN del cloroplasto y muestran

consenso con el orden genérico de esta región del cloroplasto con las plantas terrestres.

Pérdida de un intrón. La pérdida del intrón (región no codificadora de un gene) en el genoma del cloroplasto representa otro ejemplo de cambio estructural (delección) en este genoma. Esta delección fue detectada con estudios que involucraron el complejo génico responsable de la codificación de dos subunidades enzimáticas "C" para la polimerasa ribosomal (*rpoC1* y *rpoC2*). Dichos experimentos incluyeron amplificación de un segmento del ADN del cloroplasto utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el termociclo. Los productos amplificados resultantes mostraron diferencias en tamaño, es decir, se observaron productos amplificados con dos tamaños diferentes. Dichos fragmentos dividieron los taxa investigados en dos grupos distintos. En el primer grupo se observaron fragmentos amplificados típicos de otras plantas terrestres; este grupo incluyó miembros de las familias Didieraceae, Portulacaceae y Phytolaccaceae, así como representantes de la subfamilia Pereskioideae (*Maihuenia* Y *Pereskia*) y Opuntioideae (*Opuntia phaeacantha*, *O. spinosior*, *O. subulata*, *Pereskiaopsis porteri*, *Quiabentia verticillata*, *Pterocactus kuntzei*, y *Tacinga funalis*). Los representantes del segundo grupo, todos circunscritos en la subfamilia Cactoideae, mostraron un fragmento amplificado de aproximadamente 740 pares de bases más corto que el observado en los representantes del primer grupo. Con el fin de confirmar cual fragmento del complejo génico se ha perdido evolutivamente en esta subfamilia se llevaron a cabo análisis de PCR y secuencia genética en representantes de esta subfamilia. Con los anterior se determinó que la región no codificadora o intrón —región que separa las subunidades 5' y 3' del exón (región codificadora)— se ha perdido en los

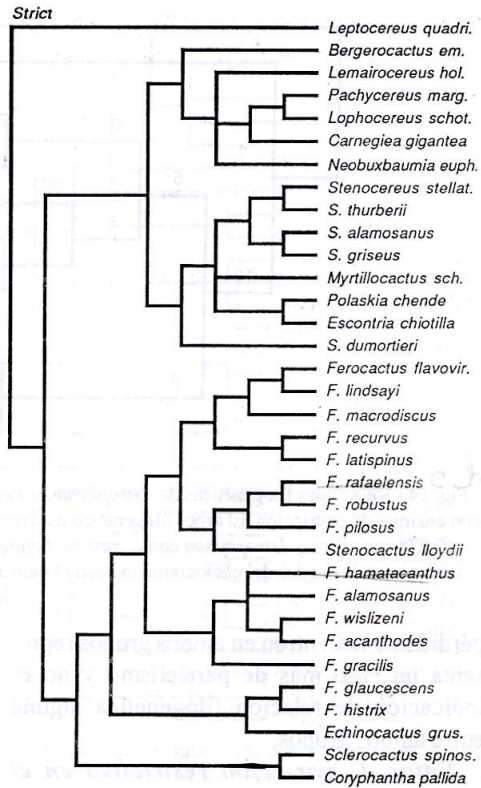


Fig. 13.- Cladograma con las relaciones filogenéticas del género *Ferocactus* y sus relaciones con miembros de las subtribus Pachycereinae, Stenocereinae y otros representantes de la tribu Cacteeae. El cladograma representa el árbol consenso de 8 árboles con longitud=316 cambios, e índice de consistencia=0.79 obtenido de 250 mutaciones observadas en el genoma del cloroplasto con enzimas de restricción.

miembros de la subfamilia Cactoideae (Wallace y Cota, en revisión). esta delección representa la sinapomorfia y evidencia de origen monofilético para esta subfamilia (Fig. 12). Similarmente, la pérdida paralela del intrón del *rpoC1* ha sido reportada en las gramíneas (Igloi et al., 1990), con la excepción de *Anomochloa* y *Streptochaeta*, géneros que se consideran los más primitivos dentro de las gramíneas. Evidentemente, la

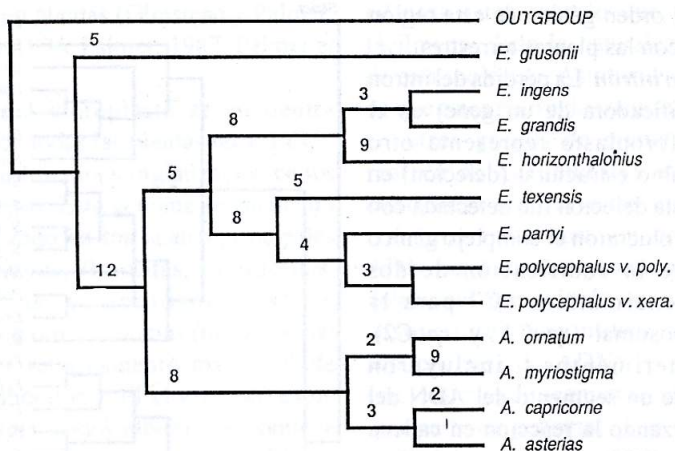


Fig. 14.- Relaciones filogenéticas de *Astrophyllum* y *Echinocactus* basado en análisis del genoma del cloroplasto con enzimas de restricción. El árbol filogenético más parsimonioso de longitud = 74 pasos, e índice de consistencia = 0.878 considera a *Astrophyllum* como parte de *Echinocactus*, en tanto que la especie basal es *E. grusonii*. Los números en los nodos del cladograma indican el número de sitios de restricción compartidos por miembros del clado.

pérdida de este intrón en ambos grupos representa un caso más de paralelismo y no es indicación de relación filogenética alguna entre ambos grupos.

Sitios de variación restrictiva en el cpDNA. Otra técnica para el estudio de variación en el ADN del cloroplasto incluye el empleo de enzimas endonucleasas. Estas enzimas están caracterizadas porque reconocen secuencias cortas de ADN, por lo que cortan la doble hélice en sitios específicos dentro o adyacente a las secuencias de reconocimiento. Estas endonucleasas son generalmente 4 a 6 a 8 pares de bases de longitud, y cortan el ADN en fragmentos más cortos, que son más sencillos de analizar. El procedimiento básico implica el análisis de la variación estructural de la molécula en las especies que se comparan, y la posterior examinación e interpretación de los fragmentos de ADN generados por tales reacciones. El resultado es que de la molécula circular se obtiene una serie de fragmentos originados por cada enzima de acuerdo al sitio restrictivo (secuencia) que reconoce. Los

cambios en la secuencia de reconocimiento se pueden presentar durante la historia evolutiva de las plantas, y pueden representar la pérdida de sitios de restricción, o la ganancia de un sitio de restricción donde anteriormente no existía ninguno, de aquí las diferencias en los tamaños de los fragmentos.

Los tamaños de los fragmentos de ADN pueden ser deducidos empleando técnicas de electroforesis, hibridación de ADN (generalmente con una sonda de tabaco), y autorradiografía. Con el fin de generar el mayor número de fragmentos de ADN así como un mayor número de cambios en sitios de restricción, es recomendable usar una serie de 15-20 o más enzimas de restricción. Con lo anterior, se puede determinar la presencia o ausencia de un sitio de restricción en particular, o sitios restrictivos en la molécula de ADN del cloroplasto investigada de un determinado linaje o grupo de plantas. Esta técnica se explica con mayor detalle en Olmstead y Palmer (1994). La presencia o ausencia de sitios de restricción pueden ser usados como marcadores taxonómicos, ya

que cuando son analizados cladísticamente, los cambios en sitios de restricción sirven para definir linajes evolutivos, cuya filogenia puede representarse en cladogramas.

A la fecha, existen una gran cantidad de estudios filogenéticos que han empleado enzimas de restricción a niveles interespecíficos y/o intergenéricos. Estos estudios han sido de considerable importancia para establecer relaciones filogenéticas en diferentes grupos de organismos a varios niveles taxonómicos como por ejemplo, familia, subfamilia, tribu. Sin embargo, a estos niveles, el problema de homología en sitios de restricción entra en consideración. En este respecto Olmstead y Palmer (1994) cuestionan la homología de fragmentos observados. A continuación, se mencionan brevemente algunos de los estudios con enzimas de restricción en la familia.

I. Relaciones filogenéticas de *Ferocactus* con cactáceas columnares y otros miembros de la Tribu Cacteae.

A pesar de los tratamientos taxonómicos conducidos en el género *Ferocactus* en los pasados 70 años, aún no existe acuerdo en el número de especies que lo componen. El número de especies propuestas ha variado entre los diferentes autores. Britton y Rose (1922) consideran 30; Lindsay (1955) incluye 25 especies y 10 variedades; Taylor (1984) reconoce también 25 especies con 15 variedades, y Bravo y Sánchez-Mejorada (1991) aceptan 29 especies.

Recientes estudios (Taylor, 1984) han

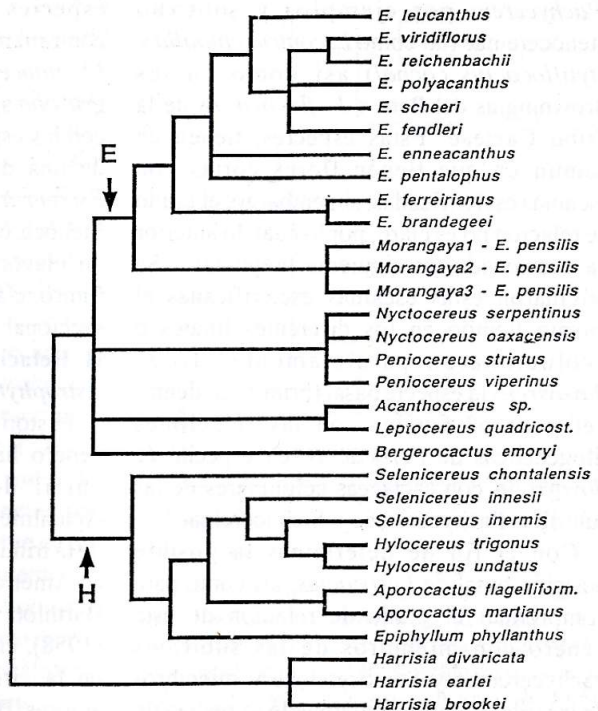


Fig. 15.- Cladograma que muestra la posición filogenética de *Echinocereus (Morangaya) pensilis*. Basado en análisis del ADN del cloroplasto con enzimas de restricción. La letra "E" representa el punto en el que se define el linaje monofilético para *Echinocereus*, y que muestra como especie basal a *E. (Morangaya) pensilis*. La letra "H" indica el linaje que contiene los taxa incluidos en Tribu Hylocereeae, y que *Harrisia* no mostró relaciones con miembros de la Tribu Echinocereae o Hylocereeae. Otros datos moleculares relacionan *Harrisia* con miembros de la Tribu Trichocereae.

sugerido que *Ferocactus flavovirens* es la especie ancestral, a partir de la cual se "originaron y radiaron" las otras especies del género y que a su vez probablemente representa el "punto de unión" entre cactáceas columnares de la tribu Pachycereeae y cactáceas cilíndricas de la Tribu Cacteae. A este respecto Gibson (1988, 1992), ha indicado que similitudes tales como la esclerificación en las puntas de las brácteas o escamas del pericarpelo y tubos florales sucede tanto en cactáceas columnares de la Tribu Pachycereeae, subtribu Pachycerinae

(*Pachycereus* por ejemplo) y subtribu Stenocereinae (tal como *Escontria chiotilla* y *Mytillocactus cochal*) así como en las Browningias del Perú y *F. flavovirens* de la Tribu Cacteeae. Estas especies, tienen en común en que tienen flores cortas con escamas esclerificadas, sin embargo, el grado de relación no es claro, por lo cual, lo anterior ha ocasionado las siguiente preguntas: ¿Se originaron estas escamas esclerificadas al mismo tiempo en los diferentes linajes o evolucionaron paralelamente? ¿Es *F. flavovirens* la especie basal (primitiva) dentro del género? ¿Cuáles son las relaciones filogenéticas de *Ferocactus*, en especial *F. flavovirens* con cactáceas columnares de las subtribus Pachycereinae y Stenocereinae?

Con el fin de determinar la posible posición basal de *Ferocactus*, así como para comprender el grado de relación de este género con miembros de las subtribus Pachycereinae y Stenocereinae y miembros de las tribu Cacteeae actualmente se realiza un estudio con enzimas de restricción. En dicho análisis se incluyeron taxa representativos de las mencionadas categorías taxonómicas, además de los grupos externos para fines de polarización de caracteres. Aunque preliminares, los resultados han dado respuesta a algunas de nuestras preguntas. Con las 250 mutaciones (cambios de sitios de restricción) observadas en el genoma del cloroplasto, con ayuda del programa de Análisis Filogenético Usando PAUP (Phylogenetic Analysis Using PAUP) se obtuvo un cladograma (hipótesis evolutiva) que muestra la reconstrucción filogenética preliminar entre los taxa incluidos en el estudio. El árbol filogenético (Fig. 13) es explícito y sugiere lo siguiente: 1) *Ferocactus* parece ser parafilético, es decir, *Echinocactus grusonii* y *Stenocactus lloydii* se encuentran incluidos en el clado *Ferocactus*; 2) aparentemente *F. flavovirens* es una de las

especies más avanzadas del género, y contrariamente a lo sugerido por otros autores, *F. glaucescens* y *F. histrix* junto con *E. grusonii* aparecen como especies basales; y 3) con las especies analizadas no hay evidencia de una directa relación filogenética entre *Escontria* (u otro miembro de la subtribu Stenocereinae) y *Ferocactus*. La inclusión de un mayor número de especies puede en el futuro, clarificar la relación interespecifica y seccional en el género.

II. Relaciones intergenéricas entre *Astrophytum* y *Echinocactus*.

Históricamente, *Echinocactus*, como género ha incluido cactáceas en forma de barril de América del Norte y Sur. Actualmente, el género es circunscrito dentro de la tribu Cacteeae con 6 especies distribuidas en América del Norte (Gibson y Nobel, 1986; Barthlott y Hunt, 1993). A su vez, Buxbaum (1958), circunscribió el género *Astrophytum* en la tribu Notocacteeae; asimismo, otros autores (Benson, 1982; Weniger, 1984) lo han considerado como parte del género *Echinocactus*. Actualmente, ambos géneros son reconocidos, y recientes clasificaciones (Gibson and Nobel, 1986; Hunt and Taylor, 1986; Barthlott and Hunt, 1993) los ubican en la tribu Cacteeae.

Con el objeto de examinar las relaciones evolutivas entre estos dos géneros, así como para proporcionar posible evidencia de alguna relación filogenética entre *Astrophytum* y miembros de la tribu Notocacteeae, Wallace (en prensa) realizó un estudio con 18 enzimas de restricción siguiendo los protocolos mencionados en la sección anterior. En dicho análisis se identificaron 95 mutaciones, de las cuales 65 fueron fitogenéticamente informativas. El cladograma resultante del análisis filogenético (Fig. 14) sugiere lo siguiente: 1) *Astrophytum* y *Echinocactus* se encuentran incluidos en un mismo grupo monofilético en

el que *E. grussoni* aparece como la especie basal (primitiva); 2) no hay relación aparente entre *Astrophytum* y los miembros de la Tribu Notocacteeae; y 3) si ignoramos a *E. grussonii* momentáneamente, *Astrophytum* y *Echinocactus* resultan ser monofiléticos: Con estos resultados, Wallace (en prensa) cuestiona el uso de *Astrophytum* como género. En este caso al aceptar taxa monofiléticos, entonces *Astrophytum* quedaría incluido dentro de *Echinocactus* y como consecuencia *Echinocactus* debería incluir 11 especies. Por el contrario, reconociendo *Astrophytum* (como hemos hecho desde que se describió el género), creamos una clasificación parafilética de *Echinocactus* (no todos los descendientes del ancestro se encuentran incluidos), lo cual no es recomendable en una clasificación derivada filogenéticamente. Sin embargo, el hecho de aceptar *Astrophytum* dentro de *Echinocactus* puede ser otro motivo de controversia, ya que tradicionalmente hemos reconocido *Astrophytum*. Por cuestiones prácticas resulta más sencillo continuar tratando ambos géneros por separado, pero es conveniente tener en mente el grado de relación filogenética que estos dos géneros guardan entre sí, así como el concepto de clasificaciones basadas en grupos monofiléticos.

III. Posición taxonómica de *Echinocereus (Morangaya) pensilis*: La posición filogenética de este controvertido género ha sido materia de discusión por muchos años. Sus características morfológicas han servido para relacionarlo con varios miembros de la Tribu Hylocereeae (Gibson y Nobel, 1986; Moran, 1977) así como con el género *Echinocereus* (Taylor, 1985). No obstante, Rowley (1974) propuso el género *Morangaya* debido a algunas de las características únicas que presenta.

Desde el punto de vista citológico, *E. pensilis* es diploide, con fórmula cariotípica

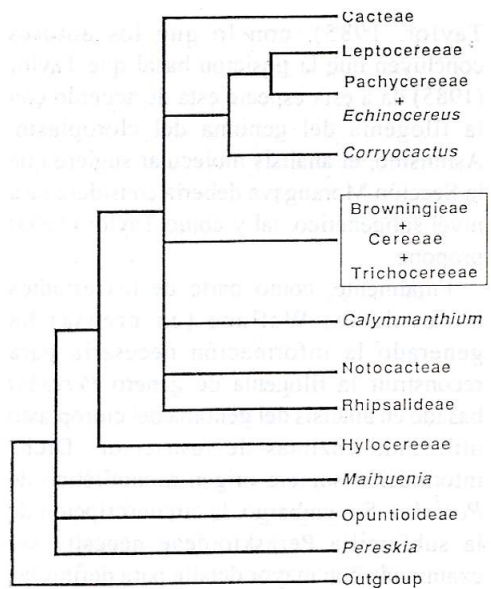


Fig. 16.- Filogenia general de la familia Cactaceae (por tribus o subfamilias) basado en análisis comparativo de la secuencia del gene *rbcL* en 46 taxa. El cladograma de la figura representa el árbol estricto del consenso de 1,338 árboles igualmente parsimoniosos, cada uno con longitud = 763 pasos, e índice de consistencia = 0.779.

En el cladograma se observan cuatro linajes monofiléticos basales para la familia: Cactoideae, Opuntioideae, *Maihueia* y *Pereskia*, así como varias tribus monofiléticas en la subfamilia Cactoideae. Fig. modificada de Wallace (en prensa).

(8 m + 3 sm) y tres satélites localizados en los cromosomas 5, 8, y 10 (Cota, 1991). La misma fórmula cariotípica, número y posición de satélites se observo en *Nyctocereus serpentinus* (Palomino et al., 1988). Sin embargo, y a pesar de las características a nivel cromosómico entre las dos especies, el dilema taxonómico quedó aún sin resolver. Más recientemente, Wallace y Forquer (1995) en un estudio molecular usando enzimas de restricción encontraron que *E. pensilis* no muestra afinidad alguna con miembros de la Tribu Hylocereeae, incluyendo *Aporocactus* (Fig. 15). Por el contrario se determinó que *E. pensilis* tiene una posición basal en *Echinocereus* (sensu

Taylor, 1985), con lo que los autores concluyen que la posición basal que Taylor (1985) da a esta especie está de acuerdo con la filogenia del genoma del cloroplasto. Asimismo, el análisis molecular sugiere que la Sección Morangaya debería considerarse a nivel subgenérico, tal y como Taylor (1993) propone.

Finalmente, como parte de los estudios moleculares, Wallace (en prensa) ha generado la información necesaria para reconstruir la filogenia de género *Pereskia* basado en análisis del genoma del cloroplasto utilizando enzimas de restricción. Dicha información sugiere origen monofilético de *Pereskia*. Sin embargo, la circunscripción de la subfamilia Pereskioideae necesita ser examinada con mayor detalle para definir las relaciones filogenéticas entre *Pereskia* y *Maihuenia*. Para mayor detalle sobre la filogenia de *Pereskia* se recomienda al lector consultar Wallace (en prensa).

Análisis Comparativos de Secuencia

Génica:

El estudio de los ácidos nucleicos, en especial la secuencia génica, es una de las técnicas más efectivas en sistemática molecular. Estudios comparativos de la secuencia génica se han aplicado exitosamente en diversos grupos vegetales para explicar algunos de los modelos evolutivos y relaciones filogenéticas (ver Downie y Palmer, 1994 para referencias bibliográficas adicionales). Los métodos de secuenciamiento son relativamente sencillos y actualmente se aplican en diferentes genes de los diferentes genomas (nuclear, cloroplasto y mitocondrial). En genética molecular, los análisis de secuenciamiento proveen información acerca de los mecanismos de deleciones, transposiciones de genes y otros eventos. Asimismo, estos análisis son fuente de una enorme cantidad de datos que proveen un amplio espectro de

marcadores moleculares hereditarios útiles para inferir historias evolutivas y relaciones filogenéticas a diferentes niveles.

Entre las ventajas de los datos generados a través de métodos de secuenciamiento es que son relativamente fáciles de obtener y analizar. En general, los métodos de secuencia génica involucran varios pasos (Hillis et al., 1990): 1) Identificación de la secuencia o gene de interés; 2) aislamiento y purificación de la secuencia/gene de interés; 3) secuencia de ácidos nucleicos, 4) alineamiento de secuencias homólogas, generalmente en genes ortólogos (genes originados a través de eventos de especiación y no a través de eventos de duplicación); y 5) análisis cladístico e interpretación de resultados.

Varios genes informativos o fragmentos de ADN han sido de importancia para entender procesos evolutivos y genéticos en plantas. Actualmente genes nucleares y del cloroplasto están siendo estudiados en términos de la tasa de sustitución de nucleótidos. Entre los genes nucleares se encuentran los espacios internos transcritos (ITS1 y ITS2) del 18S-26S ADN ribosomal nuclear, además del 5S y los mismos 18S y 26S. A su vez, a nivel de cloroplasto, entre los genes que más han contribuido a los estudios filogenéticos se encuentran la unidad larga de la 3,5 ribulosa-carboxilosa (*rbcL*), y la unidad F del gene de la nitrogenasa-dehidrogenasa (*ndhF*), un gene de la cadena fotorrespiratoria involucrado en parte en el transporte de electrones.

1. Secuencia comparativa del gene *rbcL*:

El gene *rbcL* se encuentra en la región de la copia sencilla pequeña (Fig. 10), y tiene aproximadamente 1,400 pares de bases de longitud. Wallace (en prep.) presentó los resultados filogenéticos obtenidos en los principales grupos de cactáceas basado en análisis comparativo de secuencia del gene

rbcL. En dicho estudio el autor reconstruye la filogenia de la familia investigando aproximadamente 50 taxa pertenecientes a las diferentes subfamilias y tribus (Fig. 16). El análisis cladístico proporciona suficiente apoyo de monofilia para las subfamilias Opuntioideae y Cactoideae. Sin embargo, *Maihuenia* aparece distante de *Pereskia* por lo que la subfamilia Pereskioideae aparece como parafilética; tal parece que las circunscripciones en esta subfamilia necesitan ser reevaluadas. Para la subfamilia Cactoideae, cada uno de los clados para las tribus Cacteae, Hylocereeae, Notocacteae y Rhipsalidae están en general bien caracterizados por sustituciones nucleotídicas únicas. En el cladograma se observa menos resolución en las cactáceas columnares de las tribus Browninigiaceae, Cereaceae, Leptocereaceae, Pachycereaceae y Trichocereaceae.

II. Estudios comparativos en el gene *ndhF*:

A la fecha se ha iniciado la secuencia del gene *ndhF* en el género *Ferocactus* y varias especies de las subfamilias Pereskioideae y Cactoideae además de otras cactáceas columnares de la Tribu Pachycereaceae (Cota y Wallace, en prep.) Este gene, tiene una longitud aproximada de 2200 pares de bases, y la tasa de sustitución es tres veces más alta que la del gene *rbcL* (Kim y Jansen, en prensa), y es más útil a niveles taxonómicos inferiores debido al mayor número de sitios filogenéticamente informativos. En el gene estructural *ndhF* también ocurren mutaciones puntuales y de longitud, sin embargo, cambios estructurales tales como inversiones y deleciones se presentan principalmente en la región terminal 3' del gene, misma que muestra una tasa de sustitución más alta que la región 5'.

Los resultados preliminares de la secuencia del gene *ndhF* se muestran en el cladograma de la Figura 17, tomando

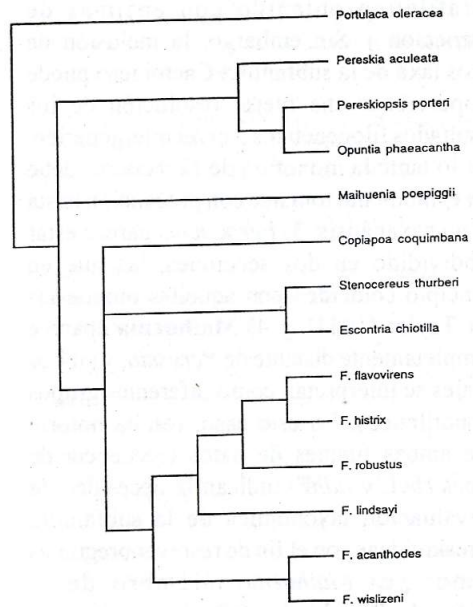


Fig. 17.- Resultados preliminares de las relaciones filogenéticas entre cactáceas columnares de la Tribu Pachycereaceae (subtribus Pachycereinae y Stenocereinae) y el género *Ferocactus* basada en estudios comparativos de secuencia del gene del cloroplasto *ndhF*, y usando como grupo externo a *Portulaca oleracea*. En el cladograma se observa lo siguiente: 1) en *Ferocactus*, la especie *F. flavovirens* aparece como una de las especies más avanzadas; 2) las cactáceas columnares de la Tribu Pachycereaceae no muestran relación directa con *Ferocactus*; 3) *Maihuenia* aparece fuera del clado de la subfamilia Pereskioideae por lo que su relación con esta subfamilia es cuestionable. Estos resultados coinciden con los estudios con enzimas de restricción.

Portulaca oleracea como grupo externo. La interpretación tentativa es la siguiente, sin embargo, la topología general del árbol puede cambiar a medida que otras especies se incluyan en el estudio: 1) no hay relación entre *Ferocactus* y cactáceas columnares de la Tribu Pachycereaceae, por lo que cualquier apariencia en similitud de caracteres puede ser dada por evolución convergente; 2) *Ferocactus* aparece como un linaje monofilético (a diferencia del resultado

parafilético obtenido con enzimas de restricción). Sin embargo, la inclusión de otros taxa de la subfamilia Cactoideae puede proporcionar una mejor resolución de los resultados filogenéticos a nivel intergenérico, por lo tanto la monofilia de *Ferocactus* debe por el momento tomarse con precaución hasta un nuevo análisis; 3) *Ferocactus* parece estar subdividido en dos secciones, las que en principio coinciden con aquellas propuestas por Taylor (1984); y 4) *Maihuenia* aparece completamente distante de *Pereskia*, y ambos linajes se interpretan como diferentes grupos monofiléticos. En este caso, resulta notorio que ambas fuentes de datos (secuencia de genes *rbcL* y *ndhF*) indican la necesidad de reevaluación taxonómica de la subfamilia Pereskioideae con el fin de resolver preguntas como: ¿Es *Maihuenia* miembro de la subfamilia Pereskioideae? De no ser así, ¿sería necesario considerar un cambio taxonómico para *Maihuenia*?

Otros proyectos que actualmente se realizan en el laboratorio de biología molecular del segundo autor son: 1) relaciones filogenéticas interespecíficas en *Opuntia* y otros taxa cercanos de la subfamilia Opuntioideae, tales como *Peresklopsis*, *Pterocactus*, *Quiabentia*, y *Tacinga*; 2) estudios filogenéticos en la Tribu Rhipsalidae con el fin de determinar el linaje terrestre que dio origen a esta tribu epífita así como para establecer las relaciones entre *Hattoria*, *Lepismium*, *Rhipsalis*, *Rhipsalidopsis*, y *Schlumbergera*. Igualmente, el diseño de varios otros proyectos involucrando complejos taxonómicos de Sudamérica se encuentran en proceso. Estos estudios también combinan aspectos de morfometría, biogeografía, y biología reproductiva entre otros.

El proyecto filogenético de la familia es bastante ambicioso y llevará mucho tiempo para resolver todas las preguntas filogenéticas que nos hemos planteado. Sin embargo, consideramos que en un futuro próximo podremos presentar en forma más clara algunos de los aspectos filogenéticos en los principales grupos de la familia. Los resultados que se incluyen en este artículo representan de una manera muy abreviada

aquellos obtenidos en los últimos tres años de investigación.

LITERATURA CITADA

- Baker, M. A., y D. J. Pinkava. 1987. A cytological and morphometric analysis of a triploid apomictic *Opuntia* X *kevinensis* (Subgenus *Cylindropuntia*, Cactaceae). *Brittonia* 39:387-401.
- Barthlott, W., y D. R. Hunt. 1993. Cactaceae. In: The Families and Genera of Vascular Plants, Eds. K. Kubitski et al., Springer Verlag, Berlin.
- Beard, E. C. 1937. Some chromosome complements in the Cactaceae and a study of meiosis in *Echinocereus papillosus*. *Botanical Gazette* 99: 1-20.
- Benson, L. 1982. The Cacti of the United States and Canada. Stanford Univ. Press. Stanford, California.
- Bravo H., H., y H. Sánchez-Mejorada. 1991. *Ferocactus* Britton and Rose. In: Las Cactáceas de México. Vol. II. Univ. Nacional Autónoma de México, México.
- Britton, N. L., y J. N. Rose. 1922. *Ferocactus*. In: The Cactaceae. Vol. III. Dover Pub. Inc., New York.
- Buxbaum, F. 1958. The phylogenetic division of the subfamily Cereoideae, Cactaceae. *Madroño* 14:177-216.
- Cota, J. H. 1991. Karyotype evolution in the genus *Echinocereus* (Cactaceae). Master's Thesis. The Claremont Graduate School/Rancho Santa Ana Botanic Garden. Claremont, California.
- Cota, J. H., y C. T. Philbrick. 1994. Chromosome number and polyploidy in the genus *Echinocereus* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 81: 1054-1062.
- Cota, J. H., y R. S. Wallace. (En prensa). Karyotypic studies in the genus *Echinocereus* (Cactaceae) and its taxonomic significance. *Caryologia*.
- Downie, S. R., y J. D. Palmer. 1994. A chloroplast DNA phylogeny of the Caryophyllales based on structure and inverted repeat restriction site variation. *Systematic Botany* 19:236-252.
- Gama, S., y P. Mercado-Ruaro. 1993. Variación morfológica en *Pachycereus weberi* pp. 103. In: Resúmenes: XII Congreso Mexicano de Botánica. Soc. Bot. México y UNAM.
- Gibson, A. C. 1988. The systematics and evolution of the subtribe Stenocereinae. 4. *Escontria*. *Cactus and Succulent Journal* (U.S.) 60: 161-167.
- Gibson, A. C. 1992. The Peruvian Browningias of *Gymnathocereus*. *Cactus and Succulent Journal* (U.S.) 64:62-68.
- Gibson, A., y P. S. Nobel. 1986. *The Cactus Primer*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Hillis, D. M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:23-42.
- Hillis, D. M., A. Larson, S. K. Davis, y E. A. Zimmer.

1990. Nucleic Acids III: Sequencing. In: Molecular Systematics. D.M Hillis, y C.Moritz, Eds., Sinauer Assoc. Inc.Pub., Sunderland, Mass.
- Hunt, D., y N. P. Taylor. 1986. The genera of the Cactaceae: towards a new consensus. *Bradleya* 4: 64-78.
- Igloi, G. L., A. Meinke, Y. Döry, y H. Kössel. 1990. rpoB/C1/C2 operon: comparison between derived protein primary structures from various organisms with respect to functional domains. *Molecular and General Genetics* 221: 379-394.
- Jackson, R. C. 1971. The Karyotype in systematics, Annual review of Ecology and Systematics 2: 327-368.
- Johnson, M. A. 1980. Further cytological investigations in *Mammillaria prolifera* and other *Mammillaria* species. *Cactus and Succulent Journal* (Great Britain) 42: 43-47.
- Katagiri, S. 1955. Chromosome numbers and polyploidy in certain Cactaceae. *Cactus and Succulent Journal*(U.S.) 25: 141-143.
- Kim, K.-J., y R. K. Jansen. En prensa. ndhF sequence evolution and the major clades in the sunflower family. *Evolution*.
- Lindsay, G. 1955. The taxonomy and ecology of the genus *Ferocactus*. Tesis Doctonal. Stanford University, California.
- Mazzola, P., S Romano, y s. Fici. 1988. Contributo a la conoscenza del genero *Opuntia* Miller. I Dati cariologici e distributivi delle specie spontaneizzate e coltivate in Sicilia. *Naturalista Siciliana* 12:201-220.
- Miller, J.M 1988. Floral pigments and phylogeny in *Echinocereus* (Cactaceae). *Systematic Botany* 13:173-186.
- Moran, R. 1977. ¿Qué hacer con *Cereus pensilis*? *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 22:27-35.
- Olmstead, R. G., y J.D. Palmer. 1994. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. *American Journal of Botany* 81:1205-1224.
- Palmer, J. D 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *The American Naturalist* 130S:6-29.
- Palmer, J. D., R.K. Jansen, H. J Michaels, M. W. Chase, y J.R Manhart. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75:1180-1206.
- Palomino, H. G., S.Zuleta, y L. Scheinvar.1988. Estudios citogenéticos de dos especies y una variedad del género *Nyctocereus* (Cactaceae). *Bol. Soc.Bot.Méx* 48:75-80
- Parker, K.C, y J.L. Hamrick.1992.Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus, *Lophocereus schottii*. *American Journal of Botany* 79:86-96.
- Pinkava, D.J., M.A. Baker, B.D. Parfitt, M.W. Mohlenbrock, y R.D. Worthington. 1985. Chromosome numbers in some cacti of western North America-V. *Systematic Botany* 10:471-483.
- Pinkava, J.D., M.G. McLeod, L.A. McGill, y R.C. Brown.1973. Chromosome numbers in some cacti of western North America-II. *Brittonia* 25:2-9.
- Pinkava, J.D., L.A. McGill, T. Reeves, y M. G. McLeod. 1977. Chromosome numbers in some cacti of western North America -III *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 104: 105-110.
- Pinkava, J.D., y B.D. Parfitt. 1988. Nomenclatural changes in Chihuahuan Desert *Opuntia* (Cactaceae). *Sida* 13:125-130.
- Pinkava, D.J., B.D Parfitt, M.A Baker y R.D Worthington. 1992. Chromosome numbers in some cacti of western North America-VI, with nomenclatural changes. *Madroño* 39: 98-113
- Remski, M.F. 1954. Cytological investigations in *Mammillaria* and some related genera *Botanical Gazette* 116:163-171.
- Rodman, J.E., M.K. Oliver, R.R. Nakamura, J.U. McClammer Jr., y D.H. Bledsoe.1984. A taxonomic analysis and revised classification of Centrospermae. *Systematic Botany* 9:297-323.
- Ross, R.1981Chromosome counts, cytology, and reproduction in the Cactaceae. *American Journal of Botany* 68:463-470.
- Rowley, G.D.1974. The unhappy medium-*Morangaya*- a new genus of the Cactaceae. *Ashingtonia* 1:44-45.
- Shinozaki, K., M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Matusubayashi, N. Zaita, J. Chunwongse, J. Obokata, K. Yamaguchi-Shinozaki, C. Otho, K. Torazawa, B. Y. Meng, M. Sugita, H. Deno, T. Kamogashira, K. Yamada, J. Kusuda, F. Takaiwa, A. Kato, N. Tohdo, H. Shimida, y M. Sugiura. 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome; its gene organization and expression. *The EMBO Journal* 5:2043-2049.
- Taylor, N.P 1984 A review of *Ferocactus* Britton et Rose. *Bradleya* 2:19-38.
- Taylor, N.P 1985. The genus *Echinocereus*, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Taylor, N.P 1993. Ulteriori studi su *Echinocereus*. *Piante Grasse* (supl.) 13: 79-96
- Wallace, R.S 1986. Biochemical taxonomy and the Cactaceae: an introduction and review. *Cactus and Succulent Journal* (U.S) 58:35-38.
- Wallace, R.S 1995. Molecular Systematic study of the Cactaceae: Using chloroplast DNA variation to elucidate cactus phylogeny. *Bradleya* (En prensa).
- Wallace, R. S., y D.E. Fairbrothers. 1986 I isoelectrically focused seed proteinis of populations of *Opuntia humifusa* (Raf.) Raf. (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 14:365-369.
- Wallace, R.S., y J.H Cota en revisión. An intron loss

in the chloroplast gene *rpoC1* supports a monophyletic origin for the subfamily Cactoideae of the Cactaceae. Current Genetics.

Wallace, R.S., y E.D. Forquer. 1995. Molecular evidence for the systematic placement of *Echinocereus pensilis* (K.Brandegee) J.Purpus (Cactaceae: Cactoideae, Echinocereae). Haseltonia (En prensa)

Weniger, D. 1984. Cacti of Texas and Neighboring States. Univ. of Texas Press. Austin, Texas.

ENGLISH SUMMARY

The classification of the family Cactaceae has been traditionally based upon morphological characters which have been shown to be variable, and for a number of groups within the family, have evolved in parallel. The phylogenetic study of Cactaceae has only recently been researched, following the pioneering morphological studies of Buxbaum (1958) for the subfamily Cactoideae and for other members of the family. To date, the degree of relatedness within and among the different subfamilial, tribal and generic groups has not been adequately determined. It appears that the sole use of morphological traits does not provide sufficient data from which the phylogeny of cactus lineages may be reliably deduced. Conversely, studies on the cytology and molecular variation have improved our ability to interpret the evolution and pattern of divergence of the cacti, they have provided a morphologically-independent source of data which may be used in concert with morphological, geographic, and other data. This paper reviews the contributions of both cytological and molecular data toward establishing a phylogenetically-based classification for the Cactaceae.

Cytology: Cytological studies of the cacti have been undertaken since the mid 1930's, and analyses of both mitotic and meiotic material have provided valuable information about the levels of ploidy in each of the three subfamilies and in some genera, such as *Opuntia* and *Echinocereus*. In the Cactaceae, cytotaxonomic studies have proved to be useful in understanding processes of hybridization and poliploidy in *Opuntia*, as well as to investigate the distribution of polyploids within specific groups of cacti. For example polyploids in subfamily Opuntioideae are more common in the Southern hemisphere (Pinkava et al., 1992), and polyploids in *Echinocereus* are distributed at higher elevations and latitudes that their diploid relatives (Cota and Wallace, in press). Finally, cytological studies have also involved the analyses of chromosome morphology in both diploid and polyploid species. While many additional taxa need to be

investigated to develop a family-wide summary of chromosome morphology, the studies that have been presented have shown that the karyotypes of the examined taxa are symmetric with small chromosomes, mostly metacentric, and/or with a few pairs of submetacentric chromosomes and satellites.

Molecular studies: Techniques in molecular biology involving the use of both macro and micromolecules are powerful tool to study plant phylogeny and evolution. Since molecular studies use chemical compounds to characterize a particular metabolic pathway, their presence or absence can be used as taxonomic markers to distinguish specific groups of plants (Wallace, 1986).

In the Cactaceae, different classes of molecules have been used for taxonomic purposes, e.g., proteins in *Opuntia humifusa* to determine levels of genetic variation (Wallace and Fairbrothers, 1986), flavonoids in *Echinocereus* (Miller, 1988) to determine phylogenetic relationships within the genus, and allozyme variation in *Lophocereus schottii* (Parker and Hamrick, 1992) to determine intrapopulation genetic variability and clonal population structure.

With the development of molecular biological techniques studies in plant phylogeny have increasingly involved the use of nucleic acids from both nuclear and chloroplast genomes. Genes and non-coding regions evolve at different rates, therefore the level of nucleotide substitution can be used at different taxonomic levels. In the Cactaceae studies in molecular systematics have primarily involved the use of the chloroplast DNA(cpDNA) using two molecular techniques: the analysis of the chloroplast genome with restriction enzymes allow us to detect structural rearrangements, e.g., insertions and deletions, and involves the complete circular molecule (Fig.10). In contrast, sequencing the identified gene is accomplished by via the polymerase chain reaction (PCR) and followed by standard sequencing reactions. A more detailed description of the studies involving the analysis of restriction site variation in the cpDNA and gene sequencing of the genes *rbcL* and *ndhF* in the Cactaceae can be obtained in the references cited herein.

Inversion in the cpDNA: A ca.6kb inversion in the large single copy regions has been identified in the chloroplast genome of *Pereskia sacharosa*, it also occurs in parallel in *Chenopodium* in the family Chenopodiaceae (Downie and Palmer, 1944). Similarly, Wallace (unpub.) confirmed the presence of this inversion in the same taxon and other representative members of all subfamilies of the Cactaceae (Fig. 11) Members of other families of the

Caryophyllales, such as Aizoaceae, Basellaceae, Didiereaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae, and Portulacaceae lack this inversion.

Loss of an intron: The loss of the intron from the chloroplast gene complex responsible of the enzymatic subunits "C" for the ribosomal polymerase (*rpoC1* and *rpoC2*) has recently been confirmed in one group of cacti (Wallace and Cota, submitted). this intron loss was detected via the polymerase chain reaction (PCR) when size polymorphism was detected in amplified products of samples from various cacti of this region of the chloroplast genome. The deletion was confirmed by sequencing through this region, showing that the intron was lost entirely. This study confirmed that the intron sequence (approximately 740 bp) which separates the 5' and 3' exons of the gene *rpoC1* (Fig. 12) is present in Opuntioideae and Pereskioideae and has been completely lost in all members of subfamily Cactoideae and represents a robust evidence of monophyly for Cactoideae.

Phylogenetic relationships of Ferocactus with columnar cacti and other members of Tribe Cacteae. Over the years there has been disagreement in terms of the number of species in the genus *Ferocactus* in the different taxonomic treatments, e.g., Taylor, 1984; Bravo and Sánchez-Mejorada, 1991. In addition, much of the phylogeny and origin of the genus and related taxa remains unclear. In order to answer questions such as: 1) is *Ferocactus* monophyletic? 2) is *F. flavovirens* a basal species within the genus?, and 3) what are the phylogenetic relationships of *Ferocactus*, in particular *F. flavovirens* with columnar cacti of subtribes Pachycereinae and Stenocereinae?, a study of cpDNA restrictions site variation has been initiated.

Cladistic analysis has provided the following preliminary results (see Fig. 13): 1) *F. flavovirens* seems to be one of the most "advanced" species within the genus, while *F. glaucescens* and *F. histrix* appear as basal members together with *Echinocactus grusonii*; 2) the genus appears to be paraphyletic, e.g., *Echinocactus grusonii* and *Stenocactus lloydii* are included in the *Ferocactus* clade; and 3) there is no direct relationship between *Escontria* or any other member of subtribe Stenocereinae with *Ferocactus* or members of Tribe Cacteae, despite their close geographic relationship.

Intergeneric relationship between *Astrophytum* and *Echinocactus* (Fig. 14) Wallace (submitted) using a cladistic analysis of cpDNA restriction site variation, found that 1) *Astrophytum* and *Echinocactus* are included in the same monophyletic group together with *E. grusonii*, as the basal species; 2) there was no relationship

detected between *Astrophytum* and members of the Tribe Notocacteae; and 3) considering both *Astrophytum* and *Echinocactus* as different genera creates a paraphyletic *Echinocactus*, which works well for practical purposes. However, it is important to bear in mind the importance of monophyletic classifications.

Taxonomic position of Echinocereus (Morangaya) pensilis. The taxonomic position and intergeneric affinities of *Echinocereus (Morangaya) pensilis* have been discussed by a variety of authors (Gibson and Nobel 1986; Moran 1977; Rowley 1974; Taylor 1985, 1993). There is still controversy about whether this species belong within *Echinocereus*, whether it should be considered a monotype, and if there is any association of this species to members of Tribe Hylocereeae. Neither morphological data nor cytological data provided conclusive evidence to resolve this issue. Molecular systematic techniques using analysis of restriction site variation have provided evidence to determine the phylogenetic placement of *E. pensilis*, as well as to suggest other relationships in tribes Echinocereae. Wallace and Forquer (1995) showed that *E. pensilis* has no relationship with members of Tribe Hylocereeae, e.g., *Aporocactus* as suggested by Moran (1977). It was found that *E. pensilis* is phylogenetically associated to the genus *Echinocereus* (Fig. 15) occupying a basal position within it, thus confirming Taylor's (1985) phylogenetic assumption about the primitiveness of this species in the genus. In addition, this datum suggests that Section Morangaya (sensu Taylor, 1985) might best considered at the subgeneric level as proposed by Taylor (1993).

Gene sequencing:

To date, most of the studies based on gene sequencing for the family have been conducted with the chloroplast genes *rbcL* and *ndhF*. Similarly, sequencing studies have been initiated in the Internal Transcriber Spacer (ITS1 and ITS2) regions of the nuclear ribosomal DNA repeat.

Comparative sequence analysis of the rbcL gene: This gene which encodes the large subunit of the protein ribulose biphosphate carboxilase is approximately 1,400 base pair long and has been proven to be of considerable importance to phylogenetic studies at the familial, tribal, and generic levels. Phylogenetic analysis (Wallace, in press) of aligned sequences of approximately 50 representative species from throughout the Cactaceae suggests the following: 1) both subfamilies, Opuntioideae and Cactoideae are monophyletic, and 2) *Maihuenia* does not form a monophyletic lineage with *Pereskia* (Fig. 16). This further suggests that the subfamily Pereskioideae as currently circumscribed is paraphyletic and the

classification of this group needs to be reevaluated. In the subfamily Cactoideae, the clades for tribes Cacteeae, Hylocereeae, Notocacteeae, and Rhipsalideae are well-defined by unique synapomorphic nucleotide substitutions, whereas the clades of columnar cacti (tribes Browningieae, Cereeae, Leptocereeae, Pachycereeae, and Trichocereeae) are less resolved. Comparisons of phylogenies generated from *rbcL* gene sequences will be evaluated.

Comparative sequence analysis of the ndhF gene. The *ndhF* gene is approximately 2,200 bp long and has a rate of nucleotide substitution several times higher than the *rbcL* gene (Kim and Jensen, in press), thus providing more phylogenetic information for studies at higher

levels. Phylogenetic studies based on sequence analysis of the gene *ndhF* for the genus *Ferocactus* and other cacti are in progress. Preliminary results of this study (Cota and Wallace, in prep.) indicate that 1) there is no relationship between *Ferocactus* and columnar cacti of Tribe Pachycereeae; 2) *Ferocactus* appears as a monophyletic lineage, although further sampling may change the topology of the tree; 3) within *Ferocactus* two groups have been shown as taxonomic sections, which in part supports Taylor's (1984) hypothesis; and 4) the phylogenetic analysis *ndhF* sequences provides corroborating evidence similar to that observed with the *rbcL* gene, i.e., *Maihuenia* was not shown to be the sister group to *Pereskia*.