UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

FILOGENIA Y MORFOLOGÍA DE *Opuntia* ser. *Streptacanthae* (CACTACEAE)

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

CÉSAR RAMIRO MARTÍNEZ GONZÁLEZ

Bajo la supervisión de:

DIRECTOR DR. ALEJANDRO F. BARRIENTOS PRIEGO CO-DIRECTOR DR. CLEMENTE GALLEGOS VÁZQUEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
1854
COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
APROBADA

Chapingo, Estado de México, junio de 2021

Filogenia y morfología de *Opuntia* ser. *Streptacanthae* (Cactaceae)

Tesis realizada por César Ramiro Martínez González, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR: _____

Dr. Alejandro F. Barrientos Priego

CO-DIRECTOR: _____

Dr. Clemente Gallegos Vázquez

ASESOR: _____

Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

DEDICATORIA

A mi familia por su apoyo incondicional y creer siempre en mí, especialmente a César Daniel y Emilio Mateo Martínez Ramírez.

"*Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos"*

Marie Curie, premio Nobel de física y química

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Departaento de Horticultura del Instituto de Horticultura, por darme la oportunidad dentro de su programa de posgrado para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola.

Al Dr. Alejandro Barrientos, Dr. Clemente Gallegos y Dr. Oscar Mascorro por su apoyo para finalizar la presente investigación.

CONTENIDO

RESUMEN……..VI

ABSTRACT……VII

1. INTRODUCCIÓN……..……8
2. HIPÓTESIS……..……11
3. OBJETIVOS……..……11
4. LITERATURA CITADA……..……..11
5. CAPÍTULO I……15
6. CAPÍTULO II……..……...25
7. CONCLUSIONES……..60

RESUMEN GENERAL

FILOGENIA Y MORFOLOGÍA DE *Opuntia* ser. *Streptacanthae* (CACTACEAE)

Se presenta un estudio morfológico y molecular detallado de las cuatro especies de *Opuntia* pertenecientes a la serie *Streptacanthae*. Ningún estudio filogenético publicado del género *Opuntia* incluye a las cuatro especies. Nuestros datos apoyan el reconocimiento de los cuatro taxones como especies independientes pero relacionados por la característica de tener epidermis glabra, flores amarillas, frutos rojos y dulces, agrupados como un grupo monofilético dentro de *Opuntia s.str*.

PALABRAS CLAVE: Cactaceae, región ITS, *matK*, *Opuntia*, filogenia, *trnL-F.*

GENERAL ABSTRACT

PHYLOGENY AND MORPHOLOGY OF *Ophuntia ser. Streptacanthae* (CACTACEAE)

A detailed morphological and molecular study of the four *Opuntia* species belonging to the *Streptacanthae* series is exhibited. No published phylogenetic study of *Opuntia* includes the four species. Our data support the recognition of the four taxa as independent species but related by the characteristic of having glabrous epidermis, yellow flowers, red and sweet fruits, grouped as a monophyletic group within *Opuntia s.str*.

KEY WORDS: Cactaceae, ITS region, *matK*, *Opuntia*, phylogeny, *trnL-F.*

1. Introducción

Las especies de la familia Cactaceae son de las plantas más carismáticas de la tierra, y varias especies son miembros constitutivos de la vegetación de tierras áridas en el continente americano (Gibson & Nobel, 1986). Las especies de cactus más populares son los miembros altamente suculentos, que muestran algunas de las modificaciones más dramáticas observadas en el reino vegetal. Estos cambios evolutivos ocurrieron en todos los niveles fenotípicos: morfológicos, anatómicos, celulares y metabólicos (Gibson & Nobel, 1986), y juntos componen lo que conocemos como el síndrome suculento (Edwards & Ogburn, 2012). Estas adaptaciones permiten que las cactaceas suculentas sobrevivan en algunos de los ambientes más secos existentes, dependiendo del agua que almacenan en sus tejidos para evitar la desecación. Aunque las modificaciones anatómicas de los cactus se han estudiado durante varias décadas (Gibson, 1973; Mauseth, 1995, 2006; Nobel, 2002), todavía hay modificaciones con un origen evolutivo poco claro. Además, la investigación sobre las bases metabólicas y genéticas de las estrategias de los cactus para habitar ambientes secos es una vía prometedora para poder implementar especies que puedan ser utilizadas como cultivares de alimentos, forraje o biocombustibles (Inglese et al., 2017), así como para generar herramientas de bioingeniería (Yang et al., 2015).

La familia Cactaceae comprende alrededor de 1400 especies distribuidas en todo el continente americano. Sin embargo, la mayor riqueza y endemismo se puede encontrar en México, la región andina que comprende el norte de Argentina,

Bolivia y Perú; así como en el este de Brasil (Ortega-Baes & Godinez-Alvarez, 2006; Hernández & Gómez-Hinostrosa, 2011, 2015). Esta familia se encuentra en el quinto grupo en mayor peligro de extinción de cualquier grupo taxonómico importante, con el 31% de las especies amenazadas (Goettsch et al., 2015).

Aunque los miembros de la familia son plantas de crecimiento lento, con tiempos de generación largos y tamaños de población relativamente pequeños, la familia muestra algunas de las tasas de diversificación más altas observadas en el reino vegetal (Hernández-Hernández et al., 2014; Magallón et al., 2015). En las últimas décadas, un número cada vez mayor de estudios filogenéticos de cactáceas, tanto a nivel familiar, así como a nivel de subfamilias, tribus o géneros, se han publicado y han aclarado las relaciones evolutivas dentro de la familia y entre sus grupos externos. Se tiene una mejor comprensión de la ecología, estrategias reproductivas, estructura de algunas poblaciones y diversidad genética de varias especies debido a estudios de caso. Aunque la Familia Cactaceae ha sido estudiada por un gran grupo de científicos y aficionados, todavía hay mucho que aprender sobre su anatomía, biología básica, ecología, relaciones evolutivas, fisiología, así como muchas otras áreas de investigación (Hernández-Hernández et al., 2014)

Las especies pertenecientes a Opuntioideae están bien soportadas filogenéticamente (Wallace & Dickie, 2002; Edwards et al., 2005; Bárcenas et al., 2011; Hernández-Hernández et al., 2011), clado mayor en Cactaceae que se encuentra en casi todos los principales hábitats (desiertos, sabanas/pastizales, zonas templadas, bosques secos, tropicales), desde el nivel del mar hasta más de 4500 m de altitud en los Andes peruanos (Anderson, 2001). Griffith & Porter (2009) han producido la filogenia más completa del grupo hasta la fecha, aunque todavía no está claro cómo las tribus están relacionadas entre sí, como la mayoría de los análisis filogenéticos no ha sido resuelto (Wallace & Dickie, 2002; Crozier, 2005; Bárcenas et al., 2011; Hernández Hernández et al., 2011) o carecía de suficiente muestreo de taxones para probar esas relaciones (Majure et al., 2012; Ritz et al., 2012; Bárcenas, 2015).

La tribu Opuntieae (familia Cactaceae, subfamilia Opuntioideae) consiste de siete géneros actualmente reconocidos, *Brasiliopuntia* A. Berger, *Consolea* Lem., *Miqueliopuntia* Frič ex F. Ritter, *Opuntia* Mill., *Salmiopuntia* Frič*, Tacinga* Britton & Rose y *Tunilla* D.R. Hunt & Iliff, donde *Opuntia* es uno de los géneros de mayor riqueza con alrededor de 180 a 200 especies (Anderson, 2001; Nyffeler & Eggli,

2010), ya que ha sufrido una radiación rápida dando como resultado una amplia distribución y alta diversidad morfológica en las especies (Majure et al*.,* 2012), lo que se sugiere que se originó recientemente hace 5.6 (±1.9) millones de años (Arakaki et al., 2011), se distribuyen desde el altiplano canadiense hasta la Patagonia Argentina. México es el país con la mayor riqueza de *Opuntia* con un alto número de endemismo (Bravo-Hollis, 1978; Pimienta-Barrios, 1993; Guzmán et al., 2003; Hunt, 2006). *Opuntia s.str.,* se refiere estrictamente a plantas con tallos aplanados (cladodios), envoltura funicular prominente en las semillas (arilo), polen reticulado, presencia de glóquidas la cuál es una sinapomorfía (Griffith & Porter, 2009) y estambres tigmotácticos (se mueven hacia el gineceo al hacer contacto con los polinizadores) (Stuppy, 2002). No existe una filogenia integral de *Opuntia s.str.,* por lo que los límites de los principales clados son en gran medida desconocidos. Las regiones semiáridas de México muestran la mayor diversidad de especies silvestres de Opuntioideae, estas regiones son consideradas centro de diversidad del género *Opuntia* (Pimienta-Barrios, 1990; Rebman & Pinkava, 2001). La variabilidad de las especies de *Opuntia* en estas regiones se ha asociado con el mecanismo de hibridación interespecífica, con un incremento en los niveles de poliploidía y aislamientos geográficos (Pimienta-Barrios & Muñoz-Urias, 1995; Scheinvar, 1995; Majure et al., 2012). *Opuntia s.str.* no ha sido estudiado exhaustivamente con datos morfológicos y moleculares (Majure et al., 2012), por lo tanto, no se tiene una comprensión clara del número total de especies lo que ha llevado a subestimar la diversidad y riqueza de especies (Majure & Puente, 2014, Martínez-González et al., 2020), siendo importante hacer una re-evaluación de los taxones con un criterio morfológico y filogenético para poder generar hipótesis más sólidas de las relaciones entre las especies (Majure et al., 2020).

Opuntia megacantha Salm-Dyck 1834, *Opuntia lasiacantha* Pfeiffer 1837, *Opuntia streptacantha* Lemaire 1839 y *Opuntia hyptiacantha* F.A.C. Weber 1898, especies descritas en el siglo XIX, pertenecientes a *Opuntia* ser. *Streptacanthae* Britton & Rose (1919), la cual es descrita como “Especies altas, ramificadas, glabras, verdes con espinas blancas o débilmente amarillas, aciculares o

subuladas, flores grandes, amarillas o rojas y frutos carnosos", especies de las cuales no se ha generado un trabajo completo que integre su morfología, micromorfología y filogenia.

2. HIPÓTESIS

Las cuatro especies tienen características particulares morfológicas y micromorfológicas distintivas, que por lo tanto filogenéticamente son cuatro especies diferentes pero relacionadas entre sí por compartir características morfológicas.

3. OBJETIVOS

1) Ubicar filogenéticamente a las cuatro especies de *Opuntia* de la serie *Streptacanthae* Britton & Rose, con base en el análisis filogenético de dos marcadores plastídicos (*mat*K y *trn*L-F) y un marcador nuclear (*ITS*), con respecto al muestreo taxonómico empleado por Majure et al. (2012) y Martínez-González et al. (2015a, 2015b, 2019 y 2020).

2) Generar datos morfológicos y micro-morfológicos detallados de las cuatro especies.

4. LITERATURA CITADA

Anderson, E. F. (2001). *The Cactus Family*. Portland, OR: Timber Press.

Arakaki, M., Christin, P. A., Nyffeler, R., Lendel, A., Eggli, U., Ogburn, R. M., & Spriggs, E. (2011). Contemporaneous and recent radiations of the world´s major succulent plant lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 108, 8379–8384.

Barcenas, R. T. (2015). A molecular phylogenetic approach to the systematics of Cylindropuntieae (Opuntioideae, Cactaceae). *Cladistics*, 32, 351–359.

Barcenas, R. T., Yesson, C. Hawkins, J. (2011). Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics,* 27, 1–20.

Bravo-Hollis, H. (1978). *Las Cactáceas de México. (*Vol. 1). Distrito Federal: Universidad Nacional Autónoma de México.

Britton, N. L. & Rose, J. N. (1919). *The Cactaceae*. Washington, D. C.: Carnegie Institution.

Edwards, E. J., Nyffeler, R., Donoghue, M. J. (2005). Basal cactus phylogeny: implications of Pereskia (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. *American Journal of Botany,* 92, 1177–1188.

Edwards, E. J., Ogburn, R. M. (2012). Angiosperm responses to a low-CO2 world: CAM and C4 photosynthesis as parallel evolutionary trajectories. *International Journal* of *Plant Sciences,* 173, 724–733.

Gibson, A. C. & Nobel, P. S. (1986). *The cactus primer*. Harvard University Press.

Gibson, A. C. (1973). Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae). *Biotropica,* 5, 29–65.

Goettsch, B., Hilton-Taylor, C., Cruz-Pinon, G., Duffy, J. P., Frances, A., Hernandez, H. M., Inger, R., Pollock, C., Schipper, J., Superina. (2015). High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants,* 1, 142-151.

Griffith, P. & Porter, M. (2009). Phylogeny of Opuntioideae (Cactaceae). *International Journal* of *Plant Sciences*, *170*(1), 107-116.

Guzmán, U. L., Arias, S. & Dávila, P. (2003). *Catálogo de cactáceas mexicanas* (315 p.). Distrito Federal: Universidad Nacional Autónoma de México.

Hernandez, H. M. & Gomez-Hinostrosa, C. (2011). *Mapping the cacti of Mexico*. Mexico DF (Mexico): CONABIO.

Hernandez-Hernandez, T., Brown, J. W., Schlumpberger, B. O., Eguiarte, L. E., Magallon, S. (2014). Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. *New Phytologist,* 1382–1397.

Hernandez, H. M. & Gomez-Hinostrosa, C. (2015). *Mapping the cacti of Mexico, Part II, Mammillaria*. Mexico DF (Mexico): CONABIO.

Hunt, D. (2006). *The New cactus lexicon* (373 p.). Milbourne Port: International Cactaceae Systematics Group.

Inglese, P., Mondragon, C., Nefzaoui, A., Saenz, C. (2017). *Crop ecology, cultivation and uses of cactus pear*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA).

Magallon, S., Gomez-Acevedo, S., Sanchez-Reyes, L. L., Hernandez-Hernandez, T. (2015). A metacalibrated time-tree documents the early rise of flowering plant phylogenetic diversity. *New Phytologist,* 437–453.

Majure, L., Puente, R., Griffith, M. P., Judd, W. S., Soltis P. S. y Soltis, D. E. (2012). Phylogeny of *Opuntia* s.str. (Cactaceae): clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. *American Journal of Botany, 99*(5), 847-864.

Majure, L. & Puente, R. (2014). Phylogenetic relationships and morphological evolution in *Opuntia s. str*. and closely related members of tribe Opuntieae. *Succulent Plant Research,* 8, 9-30.

Majure, L. C., Köhler, M., & Font, F. (2020). North American Opuntias (Cactaceae) in Argentina? Remarks on the phylogenetic position of *Opuntia penicilligera* and a closer look at *O. ventanensis*, *Phytotaxa*, *428*(3), 279–289.

Martínez-González, C. R., Muñiz-Díaz de León, M. E., González-Martínez, C. A., Jiménez-Ramírez, J., Morales-Sandoval, J. & Gallegos-Vázquez, C. (2020). Phylogenetic placement and new data on macro- and micromorphology of *Opuntia joconostle* (Cactaceae). *Bradleya, 38*, 158-169.

Mauseth, J. D. (1995). Ontogenetic mechanisms and the evolution of Cactaceae. *Plant Biosystem*, 429–435.

Mauseth, J. D. (2006). Structure–function relationships in highly modified shoots of cactaceae. *Annals of Botany,* 901–926.

Nobel, P. S. (2002). *Cacti, biology and uses*. Berkeley and Los Angeles (CA): University of California Press.

Nyffeler, R. & Eggli, U. (2010). A farewell to dated ideas and concepts: molecular phyogenetics and a revised suprageneric classification of the family Cactaceae. *Schumannia, 6*, 109–149.

Ortega-Baes, P. & Godinez-Alvarez, H. (2006). Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodiversity and Conservation,* 817–827.

Pimienta-Barrios E. (1990). *El nopal tunero* (246 p.). Guadalajara: Universidad de Guadalajara.

Pimienta-Barrios, E. (1993). Vegetable cactus (*Opuntia*). In: Williams, H., (ed.). *Underutilized crops*: *pulses and vegetables* (p. 177-191). London: Chapman and Hall.

Pimienta-Barrios, E. & Muñoz-Urias, A. (1995). Domestication of *Opuntias* and cultivated varieties. In: Barbera, G, Inglese, P. & Pimienta-Barrios, E, (eds.). *Agro-ecology*, *cultivation and uses of cactus pear.* (pp. 58-61). Rome: International Technical Cooperation Network on Cactus Pear, FAO publications.

Rebman, J. P. & Pinkava, D. J. (2001). *Opuntia* cacti of North America: an overview. Florida Entomologist, *84*(4):474–483.

Ritz, C. M., Reiker, J., Charles, G., Hoxey, P., Hunt, D., Lowry, M., Stuppy, W., Taylor, N. (2012). Molecular phylogeny and character evolution in terete-stemmed Andean opuntias (Cactaceae-Opuntioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 668–681.

Scheinvar, L. (1995). Taxonomy of utilized opuntias. In: Barbera, P. Inglese & Pimienta-Barrios, E, (Eds). *Agroecology, cultivation and uses of cactus pear* (pp. 20-23). Rome: International Technical Cooperation Newtwork on Cactus Pear, FAO publications.

Stuppy, W. (2002). Seed characters and the generic classifi cation of the Opuntioideae (Cactaceae*). Succulent Plant Research*, 6, 25-58.

Wallace, R. S. & Dickie, S. L. (2002). Systematic implications of chloroplast DNA sequence variation in subfam. Opuntioideae (Cactaceae). *Succulent Plant Research,* 9–24.

Yang, X., Cushman, J. C., Borland, A. M., Edwards, E. J., Wullschleger, S. D., Tuskan, G. A., Owen, N. A., Griffiths, H., Smith, J. A. (2015). A roadmap for research on crassulacean acid metabolism (CAM) to enhance sustainable food and bioenergy production in a hotter, drier world. *New Phytologist,* 491–504.

5. CAPÍTULO I
Estructura epidérmica y estomática de *Opuntia* ser. *Streptacanthae* (Cactaceae)

César Ramiro Martínez-González[1], Alejando F. Barrientos-Priego[1], José O. Mascorro-Gallardo[1], Clemente Gallegos-Vázquez[1]

[1]*Instituto de Horticultura, Posgrado en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México, 56230, Texcoco, Estado de México, México.*

Corresponding autor: Clemente Gallegos-Vázquez

(cgallegosvazquez@gmail.com)

Resumen: Las cuatro especies de *Opuntia* pertenecientes a la serie *Streptacanthae* presentan diferencias en el tipo de estomas, número estomático y células epidérmicas.

Palabras clave: Paredes anticlinales, estomas, estructura epidérmica, *Opuntia* ser. *Streptacantha*

Introducción

Las relaciones filogenéticas dentro de *Opuntia* son controvertidas y se han propuesto diferentes series (Britton & Rose, 1919; Scheinvar, 1974; Bravo-Hollis, 1978; Majure et al., 2012). La variabilidad inter e intraespecífica del grupo es la causa principal de su complejidad taxonómica. Además, con la hibridación como un fenómeno potencial en la formación de complejos de especies, es difícil identificar las especies de *Opuntia* (Palomino et al., 2016). Los estudios citogenéticos muestran poliploidía en sus cromosomas (Segura et al., 2007; Palomino et al., 2016), confirmando complicaciones inter e intraespecíficas en el género. Diferentes caracteres morfológicos se están estudiando con mayor detalle como la epidermis foliar, caracteres que muestran una alta consistencia en los niveles intraespecíficos, pero con variabilidad en los niveles taxonómicos interespecíficos y superiores (Wang et al., 2015). Las características epidérmicas de la hoja han demostrado ser útiles para identificar y clasificar grupos

taxonómicamente difíciles en angiospermas características epidérmicas de la hoja madura, el patrón de las células epidérmicas, el tipo de estomas, la forma de los pares de células protectoras y la ornamentación de las cutículas, características epidérmicas útiles en anatomía (Ahmad et al., 2009) y también se consideran importantes en estudios filogenéticos a nivel de género en angiospermas (Álvarez et al., 2009; Baranova, 1992; Hameed et al., 2008; Yang et al., 2012). De acuerdo con Roth-Nebesick et al. (2001) se espera que sus propiedades se asocien a sus aspectos funcionales, donde la capa externa de células que conforman el tejido epidérmico que cubre a las plantas durante su crecimiento primario, está directamente expuesto al medio ambiente, protegiendo a las plantas contra la perdida de agua por transpiración, regulación del intercambio gaseoso, secreción de compuestos metabólicos, absorción de agua y proporcionando protección mecánica (Koch et al., 2009).

El uso de caracteres ultraestructurales ha aumentado significativamente con el uso del microscopio electrónico de barrido (MEB), para observaciones de la micromorfología de la superficie de materiales vegetales (Shah et al., 2018), principalmente debido a la profundidad de campo mejorada y la alta resolución. Esta herramienta junto con el microscopio óptico de campo claro permite el uso de más datos micro-morfológicos en estudios taxonómicos (micromorfología) de muchas familias de plantas (Ahmad et al., 2018; Ashfaq et al., 2018; Bahadur et al., 2018).

El presente estudio tiene como objetivo principal: a) caracterizar las células epidérmicas, densidad estomática y tipos estomas de las cuatro especies de *Opuntia* de la serie *Streptacanthae* Britton & Rose.

Materiales y métodos

Muestreo e identificación de las especies

Las muestras incluyen diez individuos de cada especie de *Opuntia megacantha*, *Opuntia lasiacantha*, *Opuntia streptacantha* y *Opuntia hyptiacantha*, descritas en

el siglo XIX, pertenecientes a *Opuntia* ser. *Streptacanthae* Britton & Rose (1919). El presente estudio se basa en ejemplares recién colectados. El área de estudio se ubica en Villa de Tezontepec, Municipio de Villa Tezontepec, Hidalgo (coordenadas geográficas: 19°52'55''-19°53'11'' N, 98°49'16'-98°48'53'' W), a una altura de 2329 metros. El área tiene un clima BS1kw (w) (i ') g, que según la clasificación de Köppen (modificada por García 1973) corresponde a un clima semiseco, templado, con lluvias de verano y el mes más caluroso del año ocurre antes de junio. El tipo de vegetación predominante en la zona es el matorral desértico (sensu Rzedowski, 1978), con suelos sedimentarios.

Micromorfología epidérmica de cladodios

Se obtuvieron réplicas de la epidermis, mediante el desprendimiento de la cutícula. Se colocó sobre un portaobjetos para su observación y obtención de las fotografías correspondientes bajo el microscopio fotónico Leica DM750 con cámara Leica ICC50 E. A partir de las fotografías las medidas se realizaron utilizando el analizador de imágenes Image Tool versión 3.0 (Wilcox et al., 2002).

Microscopia electrónica de barrido

Las muestras de epidermis se trataron previamente con solución de FAA (formol, alcohol y ácido acético) durante 48 horas. El material se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de FAA. Se deshidrataron con una serie de diluciones de alcohol etílico (ETOH) del 50 %, 70 %, 95 % y 100 %, en períodos de 1 hora para cada dilución. Posteriormente, el material se puso en cloroformo durante 72 horas para eliminar las ceras. En ese punto, el cloroformo se cambió por alcohol etílico absoluto. Después de que las estructuras estuvieron limpias, se secaron por punto crítico y se colocaron en portaobjetos para ser bañados con oro para su observación en el microscopio electrónico de barrido (Hitachi, modelo SU1510). Los valores micromorfométricos se obtuvieron utilizando el analizador de imágenes Image Tool versión 3.0 (Wilcox et al., 2002).

Análisis estadístico

Para encontrar el promedio, se analizaron diez valores consecutivos. El valor medio y la desviación estándar para cada característica se calcularon utilizando el paquete r (Maechler et al., 2013). La determinación del índice estomático (IE) se realizó con un microscopio óptico Leica DM750 en un campo de 400X. El cálculo del IE se realizó a través de la ecuación sugerida por Salisbury (Willmer & Pallas 1973), la cual relaciona la cantidad de estomas por unidad de área foliar al número de células epidérmicas por la misma unidad de área. De este modo:

$IE = (NE)/(CE + NE) \times 100$

Donde *NE* = Número de estomas por campo de observación. *CE* = Número de células epidérmicas en el mismo campo de observación.

Otros términos, como la forma de células epidérmicas y tipo de pared anticlinal, fueron tomados de Koch et al., (2009) y Barthlott et al., (2017), y para el tipo de estomas de Prabhakar (2004).

Resultados

La forma de las células epidérmicas en las superficies es variable en las cuatro especies. *Opuntia megacantha* (Fig. 1A), presenta células epidérmicas isodiamétricas, de aspecto plano; índice estomático de 31.2; las células oclusivas de una longitud promedio de 30. 66 µm y de ancho un promedio de 12.3 µm; estomas tetraciticos (Fig. 2A) ligeramente hundidos. *Opuntia lasiacantha* (Fig. 1B), presenta células epidérmicas isodiamétricas-poligonales, con un ligero relieve; índice estomático de 10.3; las células oclusivas de una longitud promedio de 40.1 µm y de ancho un promedio de 19.8 µm; estomas paracíticos (Fig. 2B) ligeramente hundidos. *Opuntia streptacantha* (Fig. 1C), presenta células epidérmicas isodiamétricas, con relieve; índice estomático de 23.5; las células oclusivas de una longitud promedio de 35.2 µm y de ancho un promedio de 15.4 µm; estomas ciclociticos (Fig. 2C) ligeramente hundidos. *Opuntia hyptiacantha* (Fig. 1D), presenta células epidérmicas isodiamétricas-poligonales, con un ligero relieve; índice estomático de 9.9; las células oclusivas de una longitud promedio

de 37.13 µm y de ancho un promedio de 16.96 µm; estomas paracíticos (Fig. 2D) ligeramente hundidos.

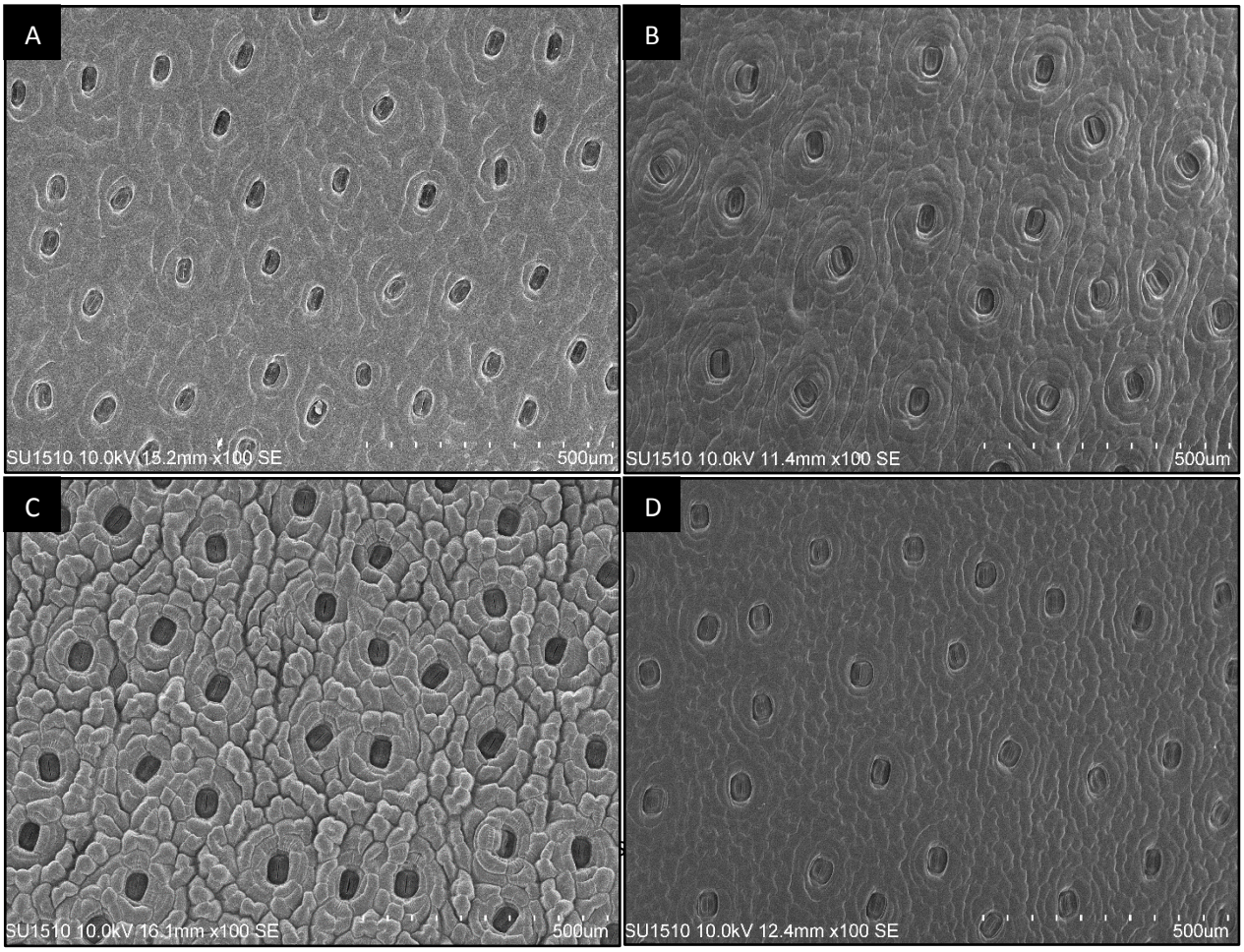


Figura 1. Epidermis de las cuato especies. A) *Opuntia megacantha*. B) *Opuntia lasiacantha.* C) *Opuntia streptacantha.* D) *Opuntia hyptiacantha.*

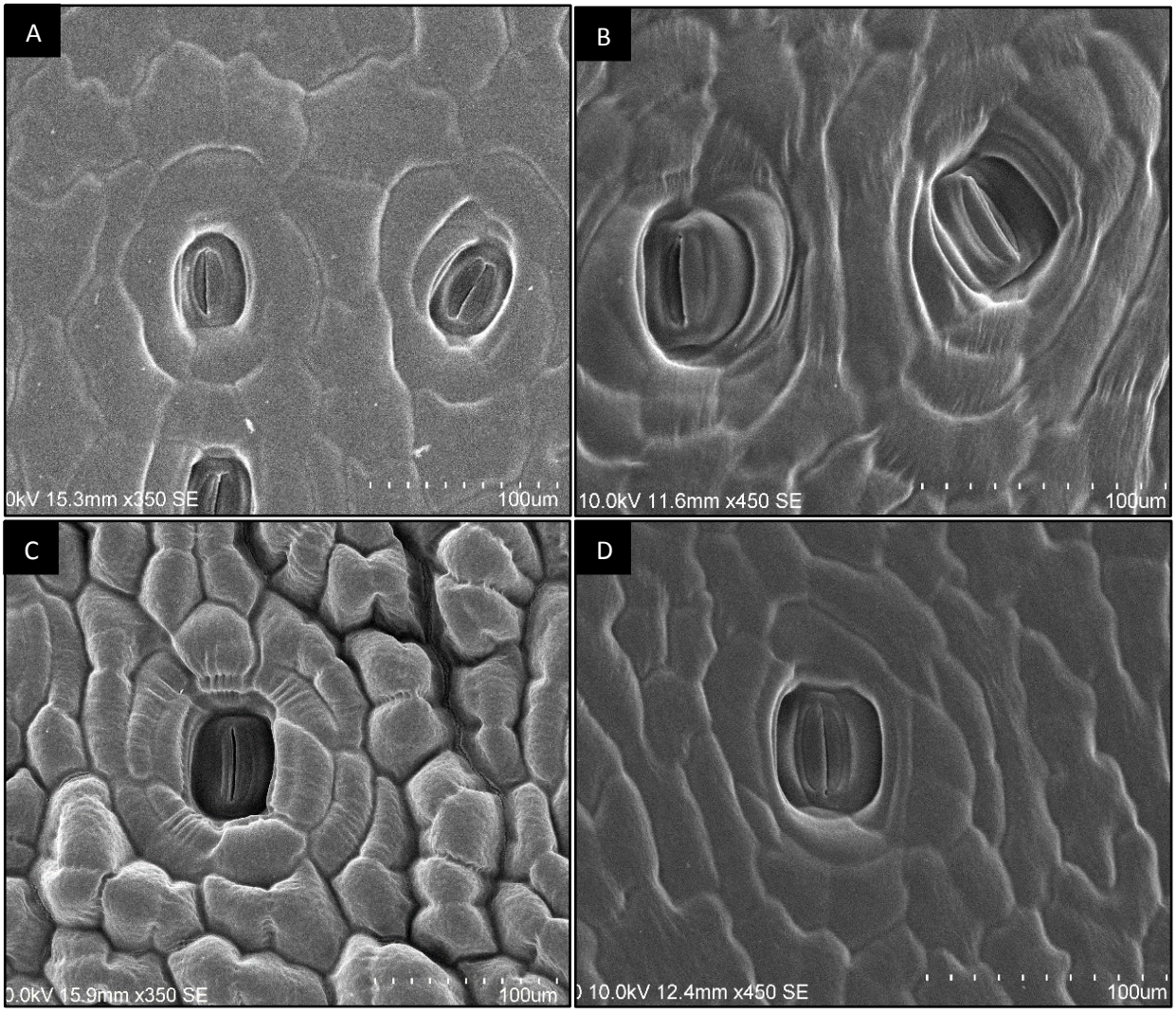


Figura 2. Tipos de estomas de las cuatro especies. A) *Opuntia megacantha,* estomas tetraciticos ligeramente hundidos. B) *Opuntia lasiacantha,* estomas paracíticos ligeramente hundidos*.* C) *Opuntia streptacantha,* estomas ciclociticos ligeramente hundidos*.* D) *Opuntia hyptiacantha,* estomas paracíticos ligeramente hundidos*.*

Discusión

Hunt (2006) y Koch et al. (2009) describieron dos formas básicas para las células epidérmicas para algunas especies de *Opuntia*: poligonales y tetragonales, pero no incluyen a las especies mencionadas en este trabajo. Estas células son morfológicamente no especializadas, proporcionando resistencia mecánica sin dejar de ser lo suficientemente flexible para permitir crecimiento (Ramsay y Glover 2005). Cada forma puede ser isodiamétrica, alargada o poligonal. En las cuatro especies de la Serie *Streptacantha*, se observaron las tres combinaciones, pero la forma isodiamétricas-poligonales fueron las más comunes ya que se encontraron en dos especies. A pesar de que esta forma era el más común, el largo de las células fue variable tanto en *Opuntia lasiacantha* como en *Opuntia hyptiacantha*. El relieve de las células epidérmicas la más diferente fue de *Opuntia streptacnatha*, ese tipo de relieve se ha observado en otros géneros de la familia Cactaceae (*Ariocarpus, Echinocereus, Mammillaria, Coryphantha* y *Turbinicarpus*) (Gasson 1981, Eggli 1984, Anderson 1987, Loza- Cornejo y Terrazas 2003). En el género *Opuntia* se ha observado que los tipos de estomas más comunes son del tipo paracíticos (Scheinvar et al., 2010), este fue el caso de *Opuntia lasiacantha* y *Opuntia hyptiacantha*, el estoma más grande tanto de longitud y ancho fue de *Opuntia lasiacantha*, en tanto que el más pequeño de longitud y ancho fue de *Opuntia megacantha.* Los rasgos epidérmicos proporcionan caracteres diagnósticos importantes a diferentes niveles taxonómicos, incluso para ayudar a distinguir entre géneros y especies estrechamente relacionados (Terrazas y Mauseth 2002; Terrazas y Arias 2003). El complejo estomático es un carácter con valor taxonómico ya que muestra gran constancia a nivel de género (Stebbins & Khush 1961).

Conclusiones

El presente estudio usando el microscopio electrónico de barrido se caracterizó a detalle las células epidérmicas de los cladodios de las cuatro especies pertenecientes a la serie *Streptacantha*, proporcionando información que podrían usarse para respaldar los caracteres morfológicos externos utilizados para

clasificar dentro del género. El resultado del estudio reveló que las características epidérmicas y estomáticas, se pueden utilizar como herramienta para estudios taxonómicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Berenit Mendoza (LaNaBio, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México) por tomar las fotografías bajo el microscopio electrónico de barrido.

Literatura Citada

Ahmad, K., M.A. Khan, M. Ahmad, M. Zafar, M. Arshad and F. Ahmad. 2009. Taxonomic diversity of stomata in dicot flora of a district Tank (N.W.F.P) in Pakistan. African Journal of Biotechnology, 8:1052-1055.

Ahmad, M., Zafar, M., Sultana, S., Ahmad, M., Abbas, Q., Ayoub, M. & Ullah, F. (2018). Identification of green energy ranunculaceous flora of district Chitral, Northern Pakistan using pollen features through scanning electron microscopy. Microscopy Research and Technique, 0, 1–13.

Alvarez, S.G., C.M. Juaristi, J.S. Gutierrez and I. Garcia- Amorena. 2009. Taxonomic differences between Pinus sylvestris and P. uncinata revealed in the stomata and cuticle characters for use in the study of fossil material. Review of Palaeobotany and Palynology, 155: 61-68.

Anderson, F. E. (1987). A revision of the genus Thelocactus B. & R. (Cactaceae). Bradleya 5: 49–76.

Ashfaq, S., Zafar, M., Ahmad, M., Sultana, S., Bahadur, S., Khan, A., & Shah, A. (2018). Microscopic investigations of palynological features of convolvulaceous species from arid zone of Pakistan. Microscopy Research and Technique, 81(2), 228–239.

Bahadur, S., Ahmad, M., Mir, S., Zafar, M., Sultana, S., Ashfaq, S., & Arfan, M. (2018). Identification of monocot flora using pollen features through scanning electron microscopy. Microscopy Research and Techniques, 81, 599–613

Baranova MA (1992) Principles of comparative stomatographic studies of flowering plants. The Botanical Review, 58: 49–99.

Barthlott, W., Mail, M., Bhushan, B. & Koch, K. (2017). Plant Surfaces: Structures and Functions for Biomimetic Innovations. Nano-Micro Letters, 23, 1-40.

Britton, N.L. & Rose, J.N. (1919) *The Cactaceae*: Description and illustrations of plants of the Cactus Family vol. 1. Carnegie Institution, Washington, 236 pp.

Bravo-Hollis, H. (1978) *Las Cactáceas de México* vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México, México City, 351 pp.

Eggli, U. (1984). Stomatal types of Cactaceae. Plant Systematics and Evolution, 146: 197–214.

García, E. (1973) Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 4th Edition. Printed by the Author, Mexico City, 217 pp

Gasson, P. (1981). Epidermal anatomy of some North American globular cacti. Cactus and Succulent Journal of Great Britain, 43: 101–108.

Hameed, I., F. Hussain and G. Dastagir. 2008. Stomatal studies of some selected medicinal plants of Polygonaceae. Pakistan Journal of Botany, 40: 2273-2280.

Hunt, D. (2006). The New Cactus Lexicon. DH Books, Milborne Port, England

Koch, K., Bhushan, B. & Barthlott, W. (2009). Multifunctional surface structures of plants: an inspiration for biomimetics. Progress in Materials Science, 54: 137–178.

Loza-Cornejo, S. & Terrazas, T. (2003). Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). Journal of Plant Research, 116: 27–35.

Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., Hornik, K. (2013). cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 1.14.4.

Majure, L., Puente, R., Griffith, M.P., Judd, W.S., Soltis, P.S. & Soltis, D.E. (2012) Phylogeny of *Opuntia* s.s. (Cactaceae): clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. *American Journal of Botany,* 99: 847−864.

Palomino, G., Martínez, J., Méndez, I., Muñoz-Urías, A., Cepeda-Cornejo, V. & Pimienta-Barrios E. (2016). Nuclear genome size, ploidy level and endopolyploidy pattern in six species of *Opuntia* (Cactaceae), Caryologia, 69:1, 82-89.

Prabhakar, M. (2004). Structute, delimitation, nomenclature and classification of stomata. Acta Botanica Sinica, 46(2), 242-252.

Ramsay, N. A. & Glover, B. J. (2005). MYBbHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. Trends in Plant Science, 10: 63–70.

Rzedowski, J. (1978) Vegetación de México. Limusa, Mexico City, 432 pp.

Roth-Nebelsick, A., D. Uhl, V. Mosbrugger and H. Kerp. 2001. Evolution and function of leaf venation architecture: A review. Annals of Botany, 87: 553-566.

Scheinvar, L. (1974) *Opuntia heliabravoana*, una especie nueva de Cactaceae. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 45: 75−86.

Segura, S., Scheinvar, L., Olalde, G., Leblanc, O., Filardo, S., Muratalla, A., Gallegos, C. & Flores, C. (2007). Genome sizes and ploidy levels in mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. Series *Streptacanthae* Britton et Rose, *Leucotrichae* DC., *Heliabravoanae* Scheinvar and *Robustae* Britton et Rose. Genetic Resources and Crop Evolution, 54 (5), 1033-1041.

Shah, S.N., Celik, A., & Ahmad, M. (2018). Leaf epidermal micromorphology and its implications in systematics of certain taxa of the fern family Pteridaceae from Northern Pakistan. Microscopy Research and Technique, 82, 317–332.

Stebbins, G. L. & Khush, G. S. (1961). Variation in the organization of the stomatal complex in the leaf epidermis of monocotyledons and its bearing on their phylogeny. *American Journal of Botany* 48: 51-59.

Terrazas, T. & Mauseth, J. D. (2002) Shoot anatomy and morphology. In: Nobel PS (ed) Cacti: biology and uses. University of Californa Press, Berkeley, pp 23–40

Wang, M., Yang, K., & Le, J. (2015). Organ-specific effects of brassinosteroids on stomatal production coordinate with the action of too many mouths. *Journal of Integrative Plant Biology*, *57*(3), 247–255.

Wilcox, C.D., Dove, S., McDavis, W. & Greer, D. (2002) *UTHSCSA. Image Tool.* version 3.0. University of Texas Health Center, San Antonio, 56 pp.

Willmer CM, Pallas JE. 1973. A survey of stomatal movements and associated potassium fluxes in the plant kingdom. *Canadian Journal of Botany* 51: 37-42.

Yang Y, Zhang LY, Liu B, Werff H van der (2012) Leaf cuticular anatomy and taxonomy of Syndiclis (Lauraceae) and its allies. Systematic Botany 37 (4): 861– 878.

6. CAPÍTULO II

Opuntia ser. *Streptacanthae* (Cactaceae), Phylogenetic placement and morphology

CÉSAR RAMIRO MARTÍNEZ-GONZÁLEZ[1]*, CLEMENTE GALLEGOS-VÁZQUEZ[1], JOSÉ O. MASCORRO-GALLARDO[1] & ALEJANDRO F. BARRIENTOS-PRIEGO[1]*

[1]*Posgrado en Biotecnología Agrícola, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México, 56230, Texcoco, Estado de México, México.*
*Corresponding author: *al19132673@chapingo.mx; abarrien@correo.chapingo.mx*

Abstract: A detailed morphological and molecular study of the four *Opuntia* species belonging to the *Streptacanthae* series is exhibited. No published phylogenetic study of *Opuntia* includes the four species. Our data support the recognition of the four taxa as independent species but related by the characteristic of having glabrous epidermis, yellow flowers, red and sweet fruits, grouped as a monophyletic group within *Opuntia s.str*.

Keywords: Cactaceae, cactus pear, ITS region, *matK*, *Opuntia*, phylogeny, *trnL-F*

Introduction

The *Opuntieae* (Cactaceae family, Opuntioideae subfamily) tribe consists of six currently recognized genera, *Brasiliopuntia* A. Berger (1926: 17), *Consolea* Lem. (1862: 174), *Miqueliopuntia* Frič ex F. Ritter (1980: 869), *Opuntia* Mill. (1754: no pagination), *Tacinga* Britton & Rose (1919: 39) and Tunilla D.R. Hunt & Iliff (2000: 10) (e.g., Stuppy 2002), where *Opuntia* is one of the richest genera with about 180-200 species (see e.g., Anderson 2001, Nyffeler & Eggli 2010), are distributed from the Canadian highlands to the Argentine Patagonia. Mexico is the country with the highest richness of *Opuntia* with high endemism (see e.g., Bravo-Hollis 1978, Guzman *et al*. 2003, Hunt 2006). The semi-arid regions of Mexico show the highest diversity of Opuntioideae wildlife, these regions are considered center of diversity of the genus *Opuntia* (e.g., Rebman & Pinkava 2001). The variability of *Opuntia* species in these regions has been associated with the mechanism of interspecific hybridization, with increased levels of polyploidy and geographic isolation (e.g., Majure *et al*. 2012). Many *Opuntia* taxa have not yet been phylogenetically analyzed and do not have morphological data, therefore, there is no clear understanding of the total number of species which has led to an underestimation of species diversity and richness (e.g., Majure & Puente 2014). It is important to re-evaluate the taxa with a morphological and phylogenetic criterion to generate more solid hypotheses of the relationships between species (e.g., Majure *et al*. 2020).

As an approach to address the taxonomy within the group in this study, *Opuntia megacantha* Salm-Dyck (1834: 363), *Opuntia lasiacantha* Pfeiffer (1837: 160), *Opuntia streptacantha* Lemaire (1839: 62) and *Opuntia hyptiacantha* F.A.C. Weber (1898: 894), species described in the nineteenth century, are addressed, belonging to *Opuntia* ser, *Streptacanthae* Britton & Rose (1919), which is described as "Tall, branched, glabrous, green species with white or weakly yellow, acicular or subulate spines, large, yellow or red flowers and fleshy fruits", species of which a complete study integrating their morphology and phylogeny has not been generated.

The main objectives of this study were: a) To locate phylogenetically the four *Opuntia* species of the *Streptacanthae* series Britton & Rose, based on the phylogenetic analysis of two plastidic markers (*matK* and *trn*L-F) and a nuclear marker (*ITS*), with respect to the taxonomic sampling used by Majure *et al.* (2012); b) to describe the detailed morphology of the four species.

Material and methods

Sampling of the species

Photographs and measurements were taken of each wild taxon to generate the morphological descriptions, where ten different individuals were measured; and four individuals were collected per species for DNA extraction.

The study area is located in Villa de Tezontepec, Municipality of Villa Tezontepec, Hidalgo, Mexico. The geographic coordinates of the area are 19°52'55"-19°53'11" N, 98°49'16"-98°48'53" W, with an average elevation of 2329 meters above sea level. In this area there is a climate BS_1KW (w)(i')g, which according to the classification of Köppen modified by Garcia (1973) corresponds to a semi-dry climate, temperate, with summer rain, with a percentage of winter rain less than 5%, isothermal and with the hottest month of the year before June. The predominant vegetation is xerophytic scrub (e.g., Rzedowski 1978), with sedimentary soils.

Literature on *Opuntia* was reviewed, mainly the following studies: Britton & Rose (1919), Bravo-Hollis (1978), Parfitt & Pinkava (1988), Arias, Gama & Guzmán (1997), Pinkava (1996, 2002), Guzmán *et al*. (2003), Scheinvar (1974, 1981, 1982, 1985, 1987, 1999, 2002, 2004), Hunt (2006, 2014), Scheinvar & Olalde-Parra (2008), Scheinvar *et al.* (2010), Lodé Joël (2015), Martínez-González *et al*. (2015a, 2015b, 2019, 2020) and Porras-Flórez *et al*. (2020). Herbarium specimens deposited at the Herbaria IBUG, IEB, INEGI, MEXU, SLPM and UJAT, and (virtual herbarium databases) at F, HUH, MO, NY, REMIB, UNAM and US were examined (acronyms according to Thiers 2020 [continuously updated]).

Extraction, amplification, and sequencing of DNA

The DNA was obtained from 50–100 mg of the plant's stem. Genomic DNA was extracted using the CTAB method (e.g., Martínez-González *et al.* 2017). The DNA was quantified with a Nanodrop 2000c (Thermo, USA). We prepared dilutions from each sample at 20 ng to amplify two genes. The reaction mixture for PCR was prepared in a final volume of 13 μL containing: a buffer of the enzyme 1x Taq DNA polymerase, 0.8 mM deoxynucleoside triphosphate (0.2 mM of each one), 100 ng DNA, 20 pmol of each primer, and 2 units of GoTaq DNA (Promega, USA). The amplification of each gene was undertaken through a denaturing cycle at 94 °C for 4 min., 35 denaturing cycles of 94 °C for 45 sec, annealing for 1 min at a specific temperature of each gene (Table 1), and an extension at 72 °C for 5 min. All the PCR reactions were undertaken in a Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, Mexico). The amplifications were verified through electrophoresis in an agarose gel at 1.2% prepared with 1× TAE buffer (Tris Acetate-EDTA) and run at 87 V cm3 for 1 h. The gel was stained with GelRed (Biotium, USA) and the bands were visualized in an Infinity 3000 transilluminator (Vilber Lourmat, Germany). The amplified products were purified with the ExoSAP Purification kit (Affymetrix, USA), following the manufacturer's instructions. They were quantified and prepared for the sequence reaction using a BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystem). These products were sequenced in both directions with an Applied Biosystem model 3730XL (Applied BioSystems, USA)

Sequence assembly

The sequences of both strands of each of the genes were analyzed, edited, and assembled using the BioEdit version 7.0.5 (e.g., Hall 1999) to generate a consensus sequence. These consensus sequences were compared with those deposited in GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using the BLASTN 2.2.19 tool (e.g., Zhang *et al*. 2000).

Phylogenetic analysis

To explore the phylogenetic relationships of the *Streptacanthae* series within the *Opuntia sensu stricto* clade, an alignment was made based on the taxonomic sampling employed by Majure *et al.* (2012), including Mexican species (see e.g., Martinez Gonzalez *et al.* 2015a, 2015b, 2019, 2020). Sequences of the *ITS* and the plastid *matK* regions and *trnL-F* were generated for *Opuntia megacantha ITS* (MW475069-MW475072), *matK* (MW520856-MW520859) and *trnL-F* (MW504046-MW504049), *Opuntia lasiacantha ITS* (MW475073-MW475076), *matK* (MW545824-MW545827), *trnL-F* (MW504050-MW504053), *Opuntia streptacantha ITS* (MW475077-MW475080), *matK* (MW546909-

MW546912) and *trnL-F* (MW504054-MW504057) and *Opuntia hyptiacantha ITS* (MW475081-MW475084), *matK* (MW553200-MW553203) and *trnL-F* (MW504058-MW504061). Each region was independently aligned using the online version of MAFFT v7 (see e.g., Katoh *et al*. 2002, 2017, Katoh & Standley 2013). The alignments were reviewed in PhyDE (e.g., Müller *et al*. 2005), followed by minor manual adjustments to maximize similarity between characters. Chloroplast matrices were integrated for *matK* by 57 taxa (921 characters) and for *trnL-F* by 54 taxa (947 characters); while the *ITS* nuclear region consisted of 56 taxa (698 characters). The aligned matrices were concatenated in a single matrix (57 taxa, 2566 characters). Five partitioning schemes were established, two pointing to the *ITS* and *trnL-F* molecular regions, and three to indicate the position of the nucleotides in the codons with the option that minimizes the stop codons of the *matK* gene region using Mesquite v3.2 (e.g., Maddison & Maddison 2017). The best evolutionary model for alignment was sought using PartitionFinder (see e.g., Frandsen *et al.* 2015, Lanfear *et al.* 2014 & 2016). Phylogeny was performed with Bayesian inference using MrBayes v3.2.6 x64 (see e.g., Huelsenbeck & Ronquist 2001, Huelsenbeck *et al*. 2004). The information block for the matrix included two independent runs of the MC3 chains using 3.5 million generations (standard deviation ≤ 0.1). Chain convergence was visualized in Tracer v1 (e.g., Rambaut *et al*. 2014). The maximum credibility phylogram of the clades recovered with TreeAnotator v. 1.8 (e.g., Bouckaert *et al.* 2014) with a 25 % burn-in was chosen.

Results

Opuntia megacantha Salm-Dyck, Hort. Dyck: 363 (1834).

Type:—MEXICO. Hidalgo, Villa de Tezontepec, *C. Martínez-González* & *L. Scheinvar 7632*, on February 25, 2009 (neotype: MEXU! Designed by Scheinvar *et al*. 2010).

Description:— Arborescent **habit,** 2.00-2.20 m high (Fig. 1A). Defined **trunk** of 30 cm in diameter, grayish scaly bark (Fig. 1B). Glabrous **epidermis** (Fig. 2B). Elliptical to oval **cladodes**, 28-35 cm long x 18-28 cm wide and 2-3 cm thick, green in color, covered with a light layer of wax (Fig. 2A). Areolas arranged in 8-9 series, 2.4 cm spacing between series, 2.2 cm spacing between areolas, elliptical shape, 0.3 x 0.2 cm, short black trichomes (Fig. 2D). Very short brown **glochids** (0.1 cm). 1-7 flexible, radial and diffuse white **spines**, yellowish apex, conical rigid central spines, some twisted, erect, diffuse and radial, unequal of 0.4-2.6 cm long (Fig. 2E). **Juvenile cladodes** with prominent tubers, areolas with short brown to black trichomes, reddish bristel hairs, green erect subulate leaves, with reddish uncinate apex, white spines with reddish apex (Fig. 1C). Acute **flower buds**, green perianth segments with reddish acuminate apex, obovate to elliptical pericarp, slightly elevated tubers, areolas with short light brown trichomes, brown glochids and yellow bristle areolas (Fig. 2F and 3A). Yellow **flowers** (Fig. 3B), 6.0-7.0 cm long, turbinate pericarp, ca. 3.2 x 2.6 cm, areolas arranged in 4-5 series, 0. 6 cm spacing between each other, with crass basal scale, oblanceolated outer segments of perianth, mucroned apex, smooth, yellow edges, with medium green striation, oblanceolated inner segments, emarginated apex, yellow, slightly toothed upper edges, stamens 1/3 of the length of the perianth, white filaments with yellowish tones, yellow anthers, white cuneiform style, ca. 1.9 cm long, usually ten green papillary lobes of the stigma, ca. 0.6 cm long, with medium white striation (Fig. 3D). Elliptical to obovate (Fig. 3E), red **fruits**, 5.1-7 cm long, striated and slightly sunken floral scar, large, circular areolas (Fig. 4A), arranged in 6-7 series, 1

cm spacing from each other and 1 cm between series, long black trichomes, absent spines, brown glochids, sweet and juicy red funicles (Fig. 3F). Kidney shaped seed with irregular lateral aril, lateral yellow- micro-pillar region, micropiles and funicles included (Fig. 4B). **Vernacular names:—***Sangrita* (e.g., Reyes-Aguëro *et al*. 2009).

Ecology and distribution:—It blooms from March-April and bears fruit from June-July. Endemic to Mexico, it is known in the states of Aguascalientes, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala and Zacatecas (see e.g., Guzmán *et al*. 2003, Scheinvar *et al.* 2010, Hernández *et al*. 2014).

Opuntia lasiacantha Pfeiffer, Enum. Diagn. Cact.: 160 (1837).
Type:—MEXICO. Guanajuato: San Luis de la Paz, *J.A. Reyes-Agüero* & *F. Carlín 1857*, Mei 5, 1999 (neotype: MEXU! Designed by Scheinvar *et al*. 2010).

Description:— Arborescent **habit,** 2.00-3.00 m high (Fig. 5A). Defined **trunk** of 50 cm in diameter, slightly grayish scaly bark with light brown tones (Fig. 5B). Glabrous **epidermis** (Fig. 6B). Oblanceolate to obovate **cladodes**, 45-62 cm long x 24-29 cm wide, green in color, covered with a layer of wax (Fig. 6A). **Areolas** arranged in 11-12 series, 3.8 cm spacing between series, 3.1 cm spacing between elliptical areolas, 0.4 x 0.3 cm, short black trichomes (Fig. 6D). Short yellow **glochids** (0.2 cm), arranged at the top of the areola. 1-4 yellowish white, rigid, cylindrical **spines**, some twisted, erect, and diffuse, unequal 0.4-3.3 cm long (Fig. 6E) with yellow apex. **Juvenile cladodes** with very prominent tubers, areolas with short yellowish trichomes, subulate, erect, green leaves with slightly uncinate reddish apex (Fig. 5C). Acute **flower buds**, reddish perianth segments with acuminate apex, slightly cylindrical pericarp, very marked and elevated tubers, areolas with short brown to black trichomes, yellow glochids and areolas with generally yellow bristles and small brown shades (Fig. 6F and 7A). Yellow **flowers** (Fig. 7B), 9-10.5 cm long, cylindrical pericarp, ca. 6 x 2.5 cm, areolas arranged in 6-7 series, 0. 42 cm spacing between them, with crass basal scale, outer obovate segments of perianth, acuminate apex, smooth yellow edges, with medium reddish striation, reddish apex, inner obovate segments, emarginated apex, upper yellow edges generally smooth, stamens 1/3 of the length of the perianth, white filaments, white-yellowish anthers, slightly cylindrical style with white with pink tones, ca. 2 cm long, usually eleven green papillary lobes of the stigma, ca. 0.6 cm long (Fig. 7D). Pyriform to elliptical red fruits (Figure 7E), 8-9.3 cm long, slightly sunken floral striated scar, large areolas with short, black, semicircular to circular trichomes (Fig. 8A), arranged in 6-7 series, 1.2 cm spacing from each other and 1.4 cm between series, absent spines, yellow glochids, orange-red juicy and sweet funicles (Fig. 7F). Kidney shaped seed with irregular lateral aril, lateral thread-micropillar region, microphile and funiculus included (Fig. 8B).

Vernacular names:—*Nopal de tuna colorada, Nopal de espinas lacias* and *Nopal de cerro* (see e.g., Anderson 2001, Scheinvar 2004).

Ecology and distribution:—It blooms from March-April and bears fruit from June-July. Endemic to Mexico, it is known in the states of Aguascalientes, Chiapas, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Oaxaca,

Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz and Zacatecas (see e.g., Arias *et al.* 1997, Guzmán *et al.* 2003, Scheinvar 2004, Scheinvar *et al.* 2010, Arias *et al.* 2012, Hernández *et al.* 2014).

Opuntia streptacantha Lemaire, Cact. Gen. nov. sp. nov.: 62-63 (1839).
Type:—MEXICO. Hidalgo: Zempoala, east of Téllez, basis of El Cerrito, *L. Scheinvar* & *J. Ahuatzin 2024*, March 23, 1973 (neotype: MEXU! Designed by Scheinvar *et al.* 2010).

Description:—2.00-3.00 m high **tree** (Fig. 9A). Defined **trunk** of 60 cm in diameter, grayish scaly bark with black shades (Fig. 9B). Glabrous **epidermis** (Fig. 10B). Oval **cladodes,** 32-40 cm long x 23-35 cm wide and 2-3 cm thick, green in color, covered with a very light layer of wax (Fig. 10A). **Areolas** arranged in 10-11 series, 3 cm spacing between series, 2.1 cm spaing between elliptical areolas of 0.4 x 0.3 cm, short black trichomes (Fig. 10D). Very small and scarce yellow **gloquids**, arranged at the top of the areola. 0-8 white **spines** with gray and black tones, flexible, acicular, some slightly twisted, adpressed and diffuse, very few erect, unequal of 0.2-2.2 cm long, yellowish apex, in the lower part of the cladode some areolas do not have spines (Fig. 10E). **Juvenile cladodes** with prominent tubers, areolas with short brown to black trichomes, some white bristel hairs with reddish tones, subulate, erect, green leaves, with uncinate slightly reddish apex, white spines with reddish apex (Fig. 9C). Acute **flower buds**, green perianth segments with reddish acuminate apex, elliptic pericarpels, slightly raised tubers, areolas with short black trichomes, brown glochids and brown bristle areolas (Fig. 10F and 11A). Yellow **flowers** (Fig. 11B), 5.5-6.1 cm long, elliptical pericarp, ca. 3.2 x 2 cm, areolas arranged in 4-5 series, 0. 62 cm spacing between them, outer segments of perianth with spatulate shape, rounded apex, smooth yellow edges, with medium greenish striation, reddish apex, oblanceolated inner segments, emarginated apex, yellow, smooth upper edges, stamens 1/3 of the length of the perianth, yellow filaments, yellow anthers, white, cuneiform style, ca. 2.3 cm long, usually nine green papillary lobes of stigma, ca. 0.4 cm long, with medium white striation (Fig. 11D). Red elliptical to obovate **fruits** (Fig. 11E), 4-6 cm long, slightly sunken striated floral scar, circular to elliptical large areolas (Fig. 12A), arranged in 6-7 series, 1.1 cm spacing from each other and 1 cm between series, long black trichomes, some spines, yellow glochids, red juicy and sweet funicles (Fig. 11F). Discoid **seed** with irregular lateral aril, lateral thread-micropillar region, microphile and funiculus included (Fig. 12B).

Vernacular names:—*Nopal cardón, Tuna cardona* and *Nopal hartón* (see e.g., Bravo-Hollis 1978, Scheinvar 2004).

Ecology and distribution:—It blooms from March-April and bears fruit from June-July. Endemic to Mexico, it is known in the states of Aguascalientes, Chihuahua, Ciudad de México, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz and Zacatecas (see e.g., Arias *et al.* 1997, Guzmán *et al.* 2003, Scheinvar 2004, Scheinvar *et al.* 2010, Arias *et al.* 2012, Hernández *et al.* 2014).

Opuntia hyptiacantha F.A.C. Weber in Bois, Dict. Hort.: 894 (1898)
Type:—MEXICO. San Luis Potosí: 13 Km northwest of San Luis Potosí, *H. Sánchez-Mejorada 1734*, May 1st, 1973 (neotype: MEXU! Designed by Scheinvar *et al*. 2010).

Description:— 2.00-2.50 m high **tree** (Fig. 13A). Defined **trunk**, 35 cm in diameter, slightly grayish scaly bark with light brown tones (Fig. 13B). Glabrous **epidermis** (Fig. 15B). Elliptical to oval **cladodes**, 32-40 cm long x 14-24 cm wide and 2-3 cm thick, green in color, covered with a light layer of wax (Fig. 14A). **Areolas** arranged in 12-13 series, 3.6 cm spacing between series, 3.4 cm spacing between elliptical areolas, 0.4 x 0.3 cm, short black trichomes, (Fig. 14D). Very small and scarce yellow glochids, arranged at the top of the areola. 0-9 white spines, yellowish apex, rigid, generally erect and diffuse, some of which are generally adpressed at the edge, unequal in length, 0.3-2.1 cm, the lower part of the cladode has no spines (Fig. 14E). **Juvenile cladodes** with prominent tubers, areolas with short brown to black trichomes, some reddish white bristle hairs, erect subulate green leaves, with reddish apex (Fig. 13C). Acute **flower buds**, reddish perianth segments with accumulated apex, elliptical pericarpels, slightly elevated tubers, areolas with short brown trichomes, brown glochids and areolas with brown bristles (Fig. 14F and 15A). Yellow flowers (Fig. 15B), 6.0-7.0 cm long, elliptical pericarp, ca. 3.4 x 2.3 cm, areolas arranged in 5-6 series, 0. 66 cm spacing between them, with crass basal scale, outer segments of the perianth with obovate form, mucroned apex, smooth yellow edges, with medium greenish striation, reddish apex, oblanceolated inner segments, emarginated apex, yellow with reddish apical part, upper edges slightly dentate, stamens 1/3 of the length of the perianth, reddish and yellow filaments, yellow anthers, cuneiform style, ca. 1.9 cm long, light green, usually eight green papillary lobes of stigma, ca. 0.5 cm long, with medium white pink striation (Fig. 15D). Red elliptical **fruits** (Fig. 15E), 5-6.5 cm long, sunken floral striated scar, large and circular to elliptical areolas, (Fig. 16A), arranged in 4-5 series, 1 cm spacing from each other and 0.7 cm between series, long black trichomes, some spines, short yellow glochids, juicy and sweet pink red funicles (Fig. 15F). Lenticular **seed** with irregular lateral aril, lateral trhead-micropilar region, micropilum and funiculus included (Fig. 16B).

Vernacular names:—*Nopal cascarón, tuna mansa, tuna corriente* and *Tuna chaveña* (see e.g., Bravo-Hollis 1978, Anderson 2001, Scheinvar 2004).

Ecology and distribution:—It blooms from March-April and bears fruit from June-July. Endemic to Mexico, it is known in the states of Aguascalientes, Ciudad de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala and Zacatecas (see e.g., Arias *et al*. 1997, Guzmán *et al*. 2003, Scheinvar 2004, Scheinvar *et al*. 2010, Arias *et al*. 2012, Hernández *et al*. 2014).

Phylogenetic results:— Bayesian analysis, after 3.5 million generations, the standard deviation between the chains stabilized at 0.005, indicating that MC3 reached a stationary phase. To confirm that the sample size was enough, the parameter file was examined in Tracer 1.6 (e.g., Rambaut *et al*., 2014) and it was corroborated that all parameters had an estimated sample size above 1,500. The subsequent probabilities (SP) obtained were calculated in the strict consensus produced by MrBayes and indicated on the tree of

maximum credibility of clades. Bayesian inference analysis recovered the four species in the series as different species with a subsequent probability of 1 (Figure 17).

Discussion

The four species treated here were described in the 19th century and were grouped in the series *Streptacanthae* Britton & Rose (1919), a classification accepted by Ochoterena (1922) and Bravo-Hollis (1937, 1978). The four species in the *Streptacanthae* series have been in taxonomic discussion (see e.g., Benson 1969, 1982, Arias 1997, Hunt 1999, Anderson 2001, Guzman *et al*. 2003), because their identity remained unresolved for a long time as no original material had been designated (e.g., Scheinvar *et al*. 2010), a first step was made to elucidate the correct application of the names with the designation of a neotype for each of the four species (e.g., Scheinvar *et al*. 2010), however the taxonomic discussion continued, where different authors do not accept the four taxa as independent species without giving any element to support this assertion (see e.g., Hunt 2014, Lodé 2015). Benson (1969, 1982), when describing *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller (1768: 411), considers it similar to *O. megacantha*, also postulated by Griffiths (1914), that both taxa are closely related and that the first could have been originated from *O. megacantha* by cultivation. A phylogenetic study by Griffith (2004) revealed that *O. megacantha* and *O. streptacantha* are members of a group that includes the possible parental species of *O. ficus-indica*, a hypothesis supported by Martínez-González *et al*. (2020) where they are corroborated as independent species. *O. hyptiacatha* was considered synonymous with *O. matudae* Scheinvar (1981: 324) (see e.g., Anderson 2001, Guzman *et al*. 2003, Hunt 2014, Lodé 2015), however, it was recently resolved that these are different species (e.g., Martinez-Gonzalez *et al*. 2019). *O. lasiacantha* was considered synonymous (see e.g., Arias 1997, Hunt 1999, Anderson 2001, Guzmán et al. 2003, Arias *et al*. 2012, Lodé 2015) of O. *rzedowskii* Scheinvar (1976: 124), is resolved by phylogenetic and morphological analysis to be two independent species (e.g., Martínez-González & Morales-Sandoval 2021). Phylogenies that include species of the genus *Opuntia* do not incorporate all four species in the series (see e.g., Nyffeler 2002, Griffith & Porter 2009, Nyffeler & Eggli 2010, Bárcenas *et al*. 2011, Hernández-Hernández *et al*. 2011, Majure *et al*. 2012, Majure *et al*. 2013, Majure & Puente 2014, Majure *et al*. 2020). *Opuntia hyptiacantha, Opuntia lasiacantha, Opuntia megacantha* and *Opuntia streptacantha* have as common characteristics the glabrous epidermis, yellow flowers and red fruits with sweet funicles. The differences at the morphological level among the four species is the shape of the cladode, size and shape of the spines, shape of the outer and inner segments of the perianth, size of the style, flower, and fruit (Table 2). All four species have glabrous epidermis, but we found differences at the micromorphological level in shape and size of the epidermal cells, where *Opuntia streptacantha* had the greatest difference in shape and texture.

The phylogenetic analysis of Bayesian inference recovers several of the groups reported by Majure *et al.* (2012), with some modifications since Mexican species have been integrated (see e.g., Martínez-González *et al*. 2015a, b, Martínez-González *et al*. 2019, Martínez-González *et al*. 2020), the four species are recovered as independent within *Opuntia s.str*., having common morphological characteristics that define them as species belonging to *Opuntia* ser. *Streptacanthae*, the four species have a similar distribution that unfortunately is still used today when making classifications (e.g., Majure *et al*. 2020), although phylogenetic data are available from the main clades of *Opuntia s.str*. (see e.g., Majure *et al*. 2012, Majure & Puente 2014), those results are not always considered for revisions of closely related species or for nomenclatural changes (e.g., Guiggi 2015).

All four species are endemic to Mexico (e.g., Arias *et al.* 2012). In the last compilation of wild species of *Opuntia* by Hernández *et al*. (2014), they recognize *Opuntia hyptiacantha*, *Opuntia lasiacantha*, *Opuntia megacantha* and *Opuntia streptacantha* as independent species, without detailing their characteristics, which is corroborated in this study with morphology and phylogeny. The combination of morphological and cytological studies, together with phylogenetic studies, has the potential to generate more solid hypotheses on the relationships and limits between species (e.g., Majure *et al*. 2020)

Conclusions

A more detailed morphological description of the four *Opuntia* species belonging to the *Streptacanthae* series is provided, which contributes to their taxonomy and identification. The morphological and phylogenetic information corroborates the four taxa as different species, grouped in the same monophyletic clade within *Opuntia s.str*, sharing the characteristic of having a glabrous epidermis, yellow flowers, and red fruits with sweet funicles.

Preconceived ideas of species affinities based on geographical location and little morphological similarity should be verified by detailed systematic studies, since *Opuntia* is a complicated genus from the taxonomic and nomenclatural point of view.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Institute of Horticulture of the Universidad Autónoma Chapingo for the funding of this research. CRMG thanks Laura Marquez and Nelly López (LaNaBio, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México), for sequencing PCR products and Berenit Mendoza (LaNaBio, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México), for taking photographs using the scanning electron microscope.

References

Anderson, E.F. (2001) *The Cactus family*. Timber Press, 776 pp.

Arias, S., Gama S. & Guzmán, U. (1997) *Cactaceae*. *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* 14: 131–133.

Arias, S., Gama S., Guzmán, U & Vázquez B. (2012) Cactaceae. *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*, 95: 215–217

Bárcenas, R.T., Yesson, C.J. & Hawkins, J.A. (2011) Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics* 27: 470–489. http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-0031.2011.00350.x

Benson, L. (1969) *The Native Cacti of California*. Stanford University Press, Staford, 243 pp.

Benson, L. (1982) *The Cacti of the United States and Canada*. Stanford University Press, Staford, 1044 pp.

Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.-H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2014) BEAST 2: A software platform for Bayesian Evolutionary analysis. *PLOS Computational Biology* 10: e1003537. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537.

Bravo-Hollis H. (1937) *Las Cactáceas de México.* Universidad Nacional Autónoma de México. México City, 755 pp.

Bravo-Hollis, H. (1978) *Las Cactáceas de México* vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México, México City, 351 pp.

Britton, N.L. & Rose, J.N. (1919) *The Cactaceae*: Description and illustrations of plants of the Cactus Family vol. 1. Carnegie Institution, Washington, 236 pp.

Frandsen, P.B., Calcott, B., Mayer, C. & Lanfear, R. (2015) Automatic selection of partitioning schemes for phylogenetic analyses using iterative *k*-means clustering of site rates. *BMC Evolutionary Biology* 15: 1–17. https://doi.org/10.1186/s12862-015-0283-7

García, E. (1973) *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. 4th Edition. Printed by the Author, Mexico City, 217 pp.

Griffith, M.P. (2004) The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany* 91: 1915–1921. https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1915

Griffiths, D. (1914) New species of *Opuntia*. *Biological Society* of *Washington* 27: 23−28.

Griffith, M.P. & Porter, M. (2009) Phylogeny of Opuntioideae (Cactaceae). *International Journal of Plant Sciences* 170: 107–116. http://dx.doi.org/10.1086/593048

Guiggi, A. (2015) Genera nova et combinations novae in Cactaceis Austroamericanis ad subfamiliam Opuntioideae K. Schumann spectantibus IV. *Supplementum to Cactology V:* 1–4.

Guzmán, U.L., Arias, S. & Dávila, P. (2003) *Catálogo de cactáceas mexicanas.* Universidad Nacional Autónoma de México. México City, 315 pp.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.

Hernández, H.M., Gómez, H.C., Bárcenas, R.T., Puente, P. & Reyes, A.J. (2014) A checklist of the subfamily Opuntioideae (Cactaceae) from North and Central America. *In*: Hunt, D.R. (Ed.) *Further Studies in Opuntioideae (Cactaceae). Succulent Plant Research* 8: 185–200.

Hernández-Hernández, T., Hernández, H., De-Nova, J.A., Puente, R., Eguiarte, L.E. & Magallón, S. (2011) Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany* 98: 44–61.
http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1000129

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17 (8): 754–755.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754

Huelsenbeck, J.P., Larget, B. & Alfaro, M.E. (2004) Bayesian phylogenetic model selection using reversible jump Markov Chain Montecarlo. *Molecular Biology and Evolution* 21: 1123–1133.
https://doi.org/10.1093/molbev/msh123

Hunt, D. (1999) CITES *Cactaceae, checklist*. 2nd Edition. Royal Botanical Gardens, Kew, 315 pp.

Hunt, D. (2006) *The New cactus lexicon*. International Cactaceae Systematics Group, Milbourne Port, 373 pp.

Hunt, D. (2014) *Further Studies in Opuntioideae (Cactaceae). Succulent Plant Research* 8: 185–200.

Katoh, K. & Standley, D. M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30 (4): 772–780.
https://doi.org/10.1093/molbev/mst010

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30 (14): 3059–3066.
https://doi.org/10.1093/nar/gkf436

Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. (2017) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20 (4): 1160–1166.
https://doi.org/10.1093/bib/bbx108

Lanfear, R., Calcott, B., Kainer, D., Mayer, C., & Stamatakis, A. (2014) Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets. *BMC Evolutionary Biology* 14*:* 1 –14.
https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-82

Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2016) PartitionFinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 34 (3): 772–773.
https://doi:10.1093/molbev/msw260

Lemaire, C. (1839) *Cactearum genera nova speciesque novae et omnium in horto Monvilliano cultarum ex affinitatibus naturalibus ordinatio nova indexque methodicus*. Paris, Lutetiis.

Lodé, J. (2015) *Taxonomy of the Cactaceae (Supplement).* Alphabetical INDEX of taxa in current usage and their synonyms. Cactus Adventures International, Barcelona, 46 pp.

Maddison, W. P. & Maddison, D. R. (2017) *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 3.31. Avaible from http://mesquiteproject.org (accesed 24 Jul 2020).

Majure, L. & Puente, R. (2014) Phylogenetic relationships and morphological evolution in *Opuntia* s.str. and closely related members of tribe Opuntieae. *Succulent Plant Research* 8: 9–30.

Majure, L., Puente, R., Griffith, M.P., Judd, W.S., Soltis, P.S. & Soltis, D.E. (2012) Phylogeny of *Opuntia* s.s. (Cactaceae): clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. *American Journal of Botany* 99: 847–864. https://doi.org/10.3732/ ajb.1100375

Majure, L., Puente, R., Griffith, M.P., Soltis, D.E & Judd, W.S. (2013) *Opuntia lilae*, another *Tacinga* hidden in *Opuntia* s.l. *Systematic Botany* 38: 444–450.

Majure, L., Köhler, M. & Font, F. (2020) North American Opuntias (Cactaceae) in Argentina? Remarks on the phylogenetic position of *Opuntia penicilligera* and a closer look at *O. ventanensis*. *Phytotaxa*, 428 (3): 279–289. https://doi.org/10.11646/phytotaxa.428.3.9

Martínez-González, C.R., Gallegos-Vázquez, C., Luna-Vega, I. & García-Sandoval, R. (2015a). *Opuntia leiascheinvariana*, una nueva especie de Cactaceae del Estado de Hidalgo, México. *Botanical Sciences* 93 (3): 517–529.

Martínez-González, C.R., Luna-Vega, I., Gallegos-Vázquez, C. & García-Sandoval, R. (2015b) *Opuntia delafuentiana* (Cactaceae: Opuntioideae), a new xoconostle from central Mexico. *Phytotaxa*, 231 (3): 230–244.

Martínez-González, C.R. & Morales-Sandoval, J. (2021) Taxonomic status of two controversial species of *Opuntia* (Cactaceae) from Mexico based on morphological and molecular data. *Bradleya* 39: 23–35.

Martínez-González, C.R., Ramírez-Mendoza, R., Jiménez-Ramírez, J., Gallegos-Vázquez, C. & Luna-Vega, I. (2017) Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). *Plant Methods* 13: 1–10. https://doi.org/10.1186/s13007-017-0234-y

Martínez-González, C.R., Gallegos-Vázquez, C., Scheinvar, L., Muñiz-Díaz de León, M.E. & Jiménez-Ramírez, J. (2019). Re-evaluation of *Opuntia matudae* (Cactaceae). *Phytotaxa* 423 (3): 158–170. https://doi.org/10.11646/phytotaxa.423.3.4

Martínez-González, C.R., Muñiz-Díaz de León, M.E., González-Martínez, C.A., Jiménez-Ramírez, J., Morales-Sandoval, J. & Gallegos-Vázquez, C. (2020) Phylogenetic placement and new data on macro- and micromorphology of *Opuntia joconostle* (Cactaceae). *Bradleya* 38: 158–169. https://doi.org/10.25223/brad.n38.2020.a17

Miller, P. (1754) *The gardeners dictionary: containing the methods of cultivating and improving all sorts of trees, plants, and flowers, for the kitchen, fruit, and pleasure gardens, and also those which are used in medicine: with directions for the culture of vineyards, and making wine in England*. Printed by the author, London, no pagination. https://doi.org/10.5962/bhl.title.79061

Müller, K., Quandt, D., Müller, J. & Neinhuis, C. (2005) *PhyDE®-Phylogenetic data editor. Program distributed by the authors, versión 10.0.* Available from: https://www.phyde.de (accessed 22 Abril 2020).

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 (2): 312–326.

Nyfferles, R. & Eggli, U. (2010) A farewell to dated ideas and concepts: molecular phyogenetics and a revised suprageneric classification of the family Cactaceae. *Schumannia* 6: 109–149.

Ochoterena, I. (1922) *Las Cactáceas de México*. Editorial Cultura. México City, 189 pp.

Pfeiffer, L.G.K. (1837) *Enumeratio diagnostica Cactearum Hucusque Cognitarum*. Sumtibus Ludovici Oehmigke, Berlin, 192 pp. https://doi.org/10.5962/bhl.title.147375

Parfitt, B.D. & Pinkava, D.J. (1988) Nomenclatural systematic reassessment of *Opuntia engelmanii* and *Opuntia lindheimeri* (Cactaceae). *Madroño* 35: 342–349.

Pinkava, D.J. (1996) Nomenclatural changes in *Opuntia* (Cactaceae). *Haseltonia* 4: 103−104.

Pinkava, D.J. (2002) On the evolution of the continental North American Opuntioideae. Studies in the Opuntioideae (Cactaceae). *Succulent Plant Research* 6: 59–98.

Porras-Flórez, D., Albesiano, S. & Arrieta-Violet, L. (2020) Typification of the name *Opuntia soederstromiana* (Cactaceae), a new record for the Flora of Colombia. *Phytotaxa* 452 (2): 116–123. https://doi.org/10.11646/phytotaxa.452.2.1

Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D. & Drummond, A.J. (2014) *Tracer v1.6*. Available from: http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer (accessed 24 Sep 2020).

Rebman, J.P. & Pinkava, D.J. (2001) *Opuntia* cacti of North America: an overview. *Florida Entomologist* 84 (4): 474–483.

Reyes-Agüero, J.A., Aguirre, J.R., Carlín, F. & González A. (2009) *Catálogo de las principales variantes silvestres y cultivadas de Opuntia en la Altiplanicie Meridional de México*. UASLP., SAGARPA and CONACYT, San Luis Potosí, México, 350 pp.

Rzedowski, J. (1978) *Vegetación de México*. Limusa, Mexico City, 432 pp.

Salm-Dyck, J. (1834) *Hortus Dyckensis oder Verzeichniss der in dem botanischen Garten zu Dyck wachsenden Pflanzen*. Düsseldorf, Arnz.

Scheinvar, L. (1974) *Opuntia heliabravoana*, una especie nueva de Cactaceae. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 45: 75–86.

Scheinvar, L. (1976) *Opuntia rzedowskii* 'Nopal de pedregal', una especie nueva de Cactaceae. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, serie Botánica* 47-53: 123–136.

Scheinvar, L. (1981) Especies, variedades y combinaciones nuevas de cactáceas del Valle de México. *Phytologia* 49: 324–328.

Scheinvar, L. (1982) Redescubrimiento de la *Opuntia spinulifera* Salm-Dyck. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 47: 1–20.

Scheinvar, L. (1985) Cactaceae. *In:* Rzedowski, J. & Calderón de Rzedowski, G. (Eds.). *La flora del Valle de México,* vol. 2, Instituto de Ecología, A. C. y Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. City, pp. 93-115.

Scheinvar, L. (1987) Redescubrimiento de *Opuntia oligacantha* Forster en el Valle de México y en la Altiplanicie Mexicana. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 57: 109–122.

Scheinvar, L. (1999) *Opuntia zamudioi*, una nueva especie de Querétaro. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 44: 88–93.

Scheinvar, L. (2002) *Opuntia stricta* (Haw.) Haw. subsp. *esparzae*, una nueva subespecie de las dunas del río Concá, Arroyo Seco, Querétaro, México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 47: 94–102.

Scheinvar, L. (2004) *Flora cactológica del estado de Querétaro. Diversidad y riqueza.* Fondo de Cultura Económica. México, 390 pp.

Scheinvar, L. & Olalde, G. (2008) Tipificación de algunas cactáceas del estado de Guerrero. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 53: 36–50.

Scheinvar, L., Gallegos-Vázquez, C., Olalde-Parra, G. & Rodríguez-Fuentes, A. (2010) *Opuntia* ser, *Streptacanthae* (Cactaceae)-neo- typifications and taxonomic notes for four species. *Schumannia* 6: 277–296.

Schmitz-Linneweber, C., Maier, R., Jean-Pierre, A., Cottet, A., Herrmann, R. & Mache, R. (2001) The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *Plant Molecular Biology* 45: 307–315.

Stuppy, W. (2002) Seed characters and generic classification of the Opuntioideae (Cataceae). *Succulent Plant Research* 6: 25–58.

Taberlet, P.G., Ludovic, P., Guy, P. & Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
https://doi.org/10.1007/BF00037152

Weber, F.A.C. (1898) *Opuntia* Tournef. *In*: D. Bois (Ed.). *Dictionnaire d´Horticulture*: 892-899. Paris, P. Klincksieck.

White, TJ., Bruns, T.D., Lee, S. & Taylor, J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. *In*: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T. (Eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 135–322.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology 7: 203–214.

TABLE 1. Primers used in the amplification and sequencing of the DNA fragments

Loci/segment	**Name**	**Sequence 5´-3´**	**Tm (°C)**	**Reference**
*mat*k	1326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	48	Schmitz-Linneweber *et al.* (2001)

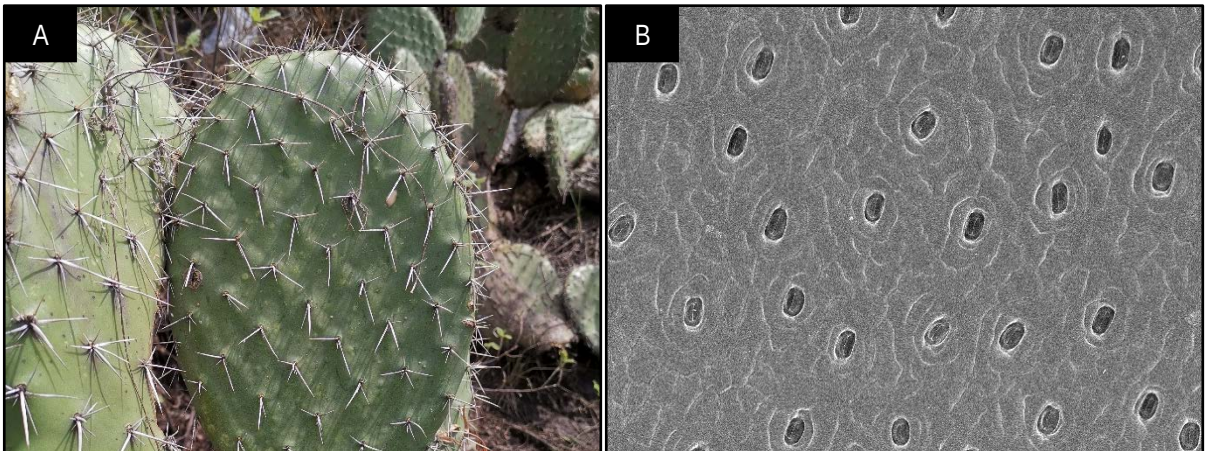
	390F	CGATCTATTCATTCAATATTTC	48	Schmitz-Linneweber *et al.* (2001)
*trn*L-*trn*F	C	CGAAATCGGTAGACGCTACG	50	Taberlet *et al.* (1991)
	D	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	50	Taberlet *et al.* (1991)
	E	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	50	Taberlet *et al.* (1991)
	F	ATTTGAACTGGTGACACGAG	50	Taberlet *et al.* (1991)
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	57	White *et al.* (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	57	White *et al.* (1990)

TABLE 2. Characteristics of the four species of *Opuntia* ser. *Streptacanthae*

	Opuntia megacantha	***Opuntia lasiacantha***	***Opuntia streptacantha***	***Opuntia hyptiacantha***
Habit	Arborescent	Arborescent	Tree	Tree
Shape of cladodes	Elliptical to oval	Oblanceolate to obovate	Oval	Elliptical to oval
Epidermis	Glabrous	Glabrous	Glabrous	Glabrous
Type of stoma	Tetracytic	Paracytic	Cyclocytic	Paracytic

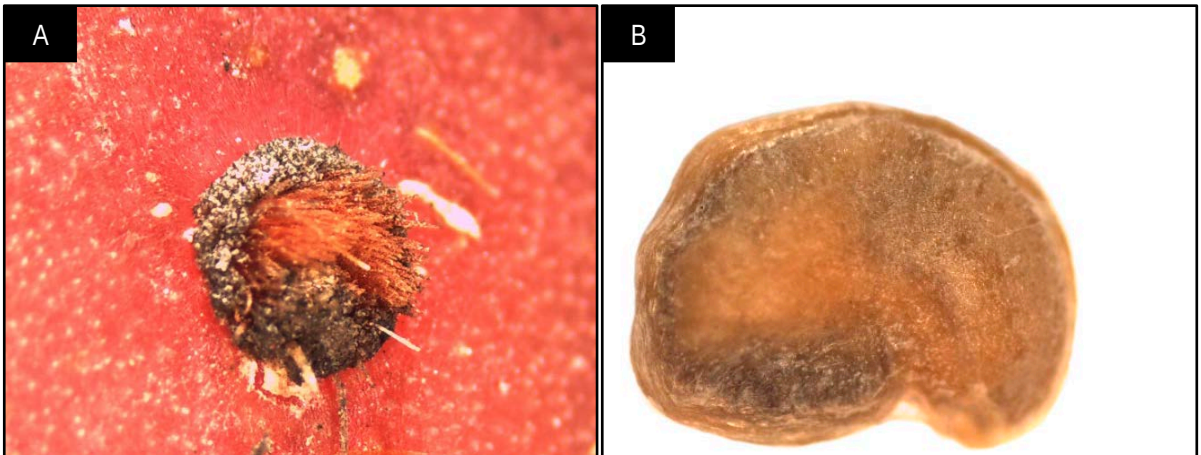
Number of areola series in the cladodes	8-9	11-12	10-11	12-13
Direction of the spines	Erect (75-100°), difuse (21-74°) and radial or adpressed (0-20°)	Erect (75-100°) and diffuse (21-74°)	Erect (75-100°), diffuse (21-74°) and radial or adpressed (0-20°)	Erect (75-100°), diffuse (21-74°) and radial or adpressed (0-20°)
Flower color	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
Number of stigma lobes	10	11	9	8
Shape of the style	Cuneiform	Slightly cylindrical	Cuneiform	Cuneiform
Fruit shape	Elliptical to oval	pyriform to elliptical	Elliptical or obovate	Elliptical
Fruit lenght	5.1-7 cm long	8-9.3 cm long	4-6 cm long	5-6.5 cm long
Type of fruit	Sweet, prickly pear,	Sweet, prickly pear	Sweet, prickly pear	Sweet, prickly pear
Penduculated fruit	No	No	Yes	Sometimes
Externa color of fuits	Red	Red	Red	Red
Interna color of fruits	Red	Orange-red	Red	Red
Color of the funiculars	Red	Orange-red	Red	Pink red
Funiculars	Succulant and sweet	Succulant and sweet	Succulant and sweet	Succulant and sweet
Seed shape	Kidney shaped	Kidney shaped	Discoidal	Lenticular



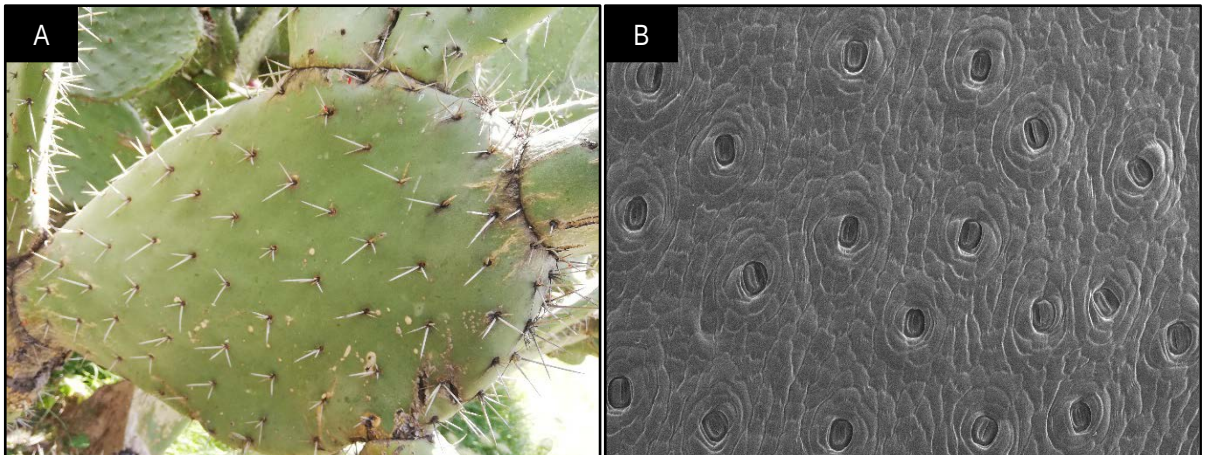

A
B

E

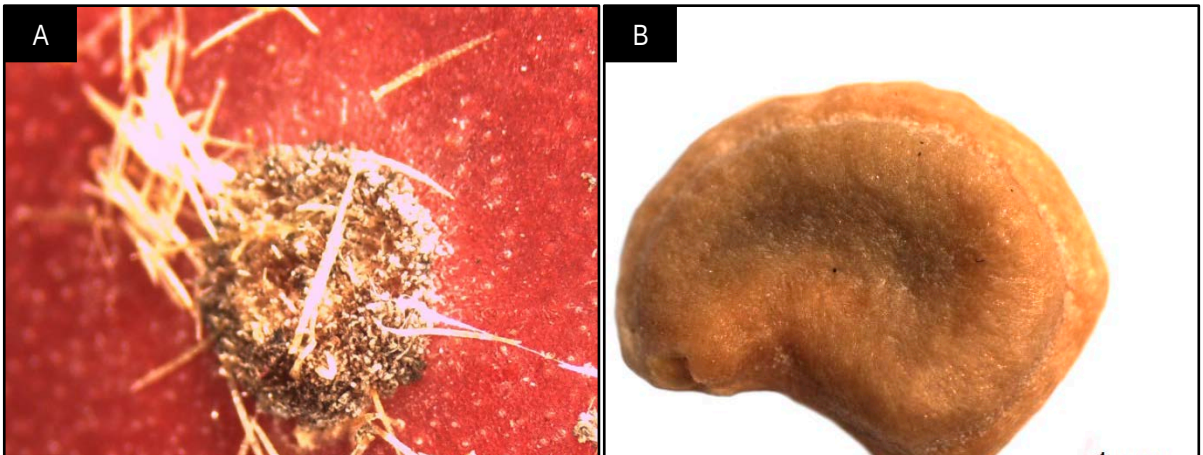



A
B

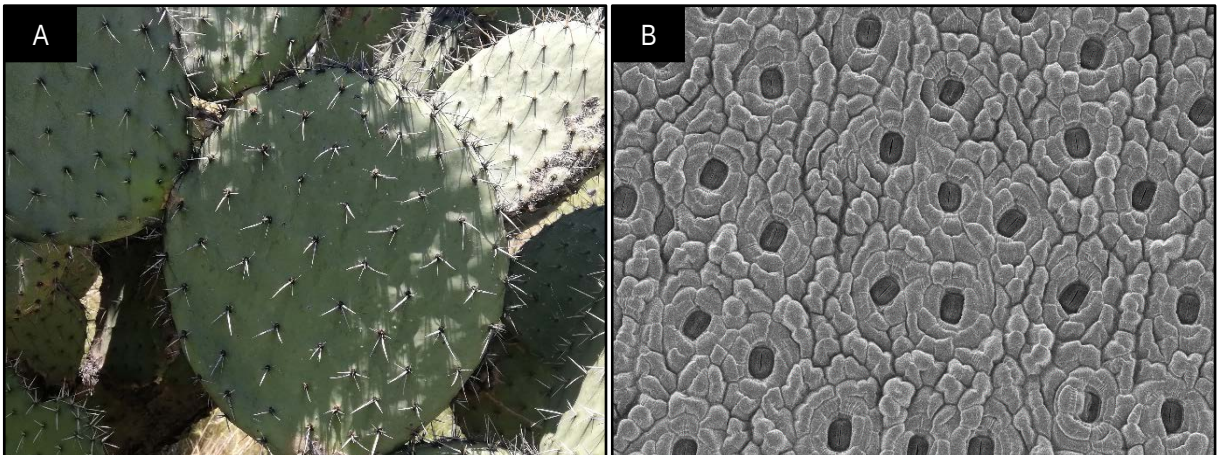

A

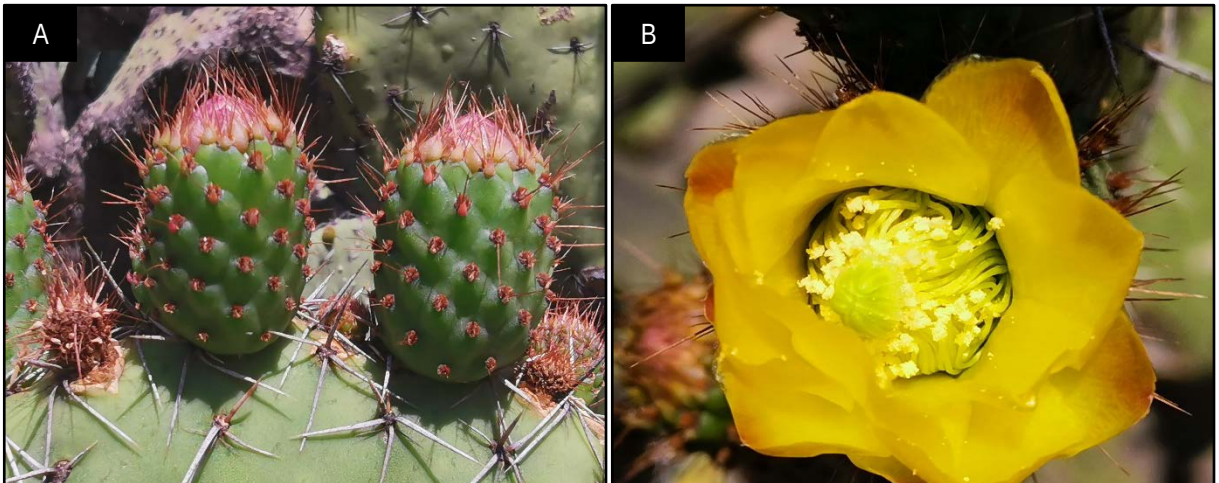

A
B

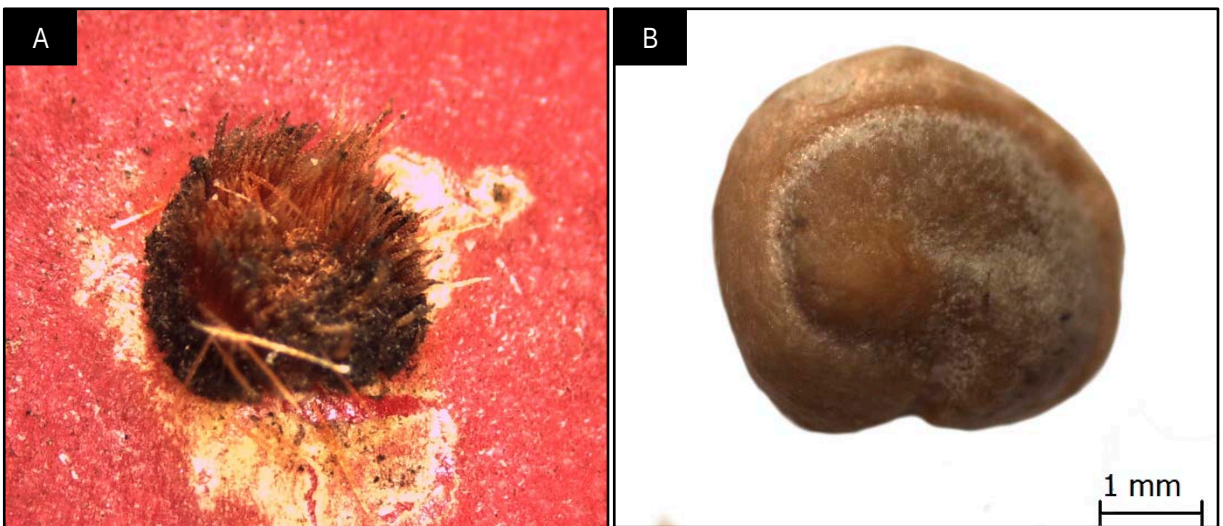

A
B


A
B

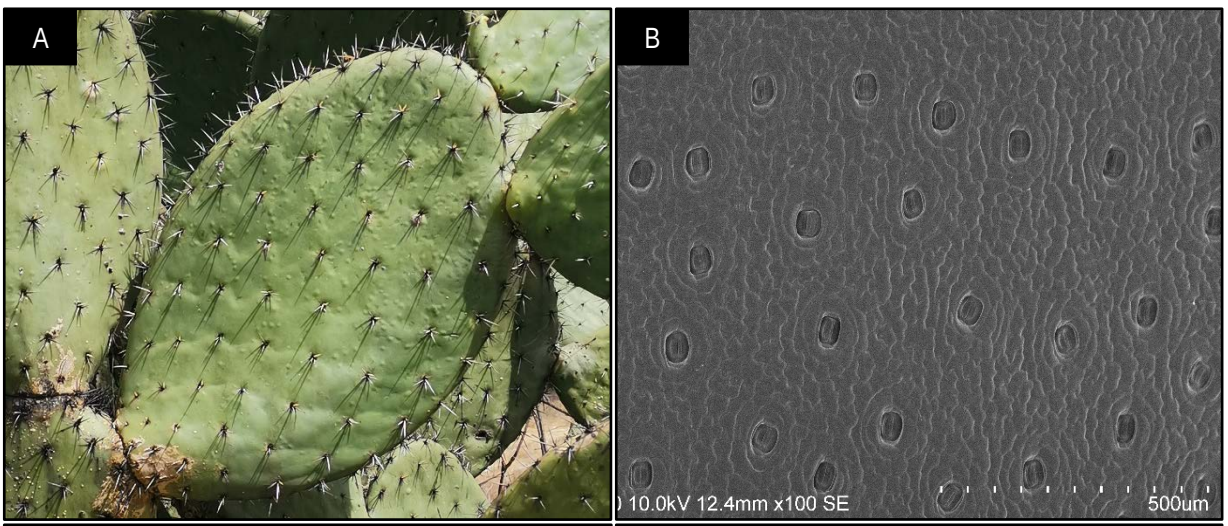

A

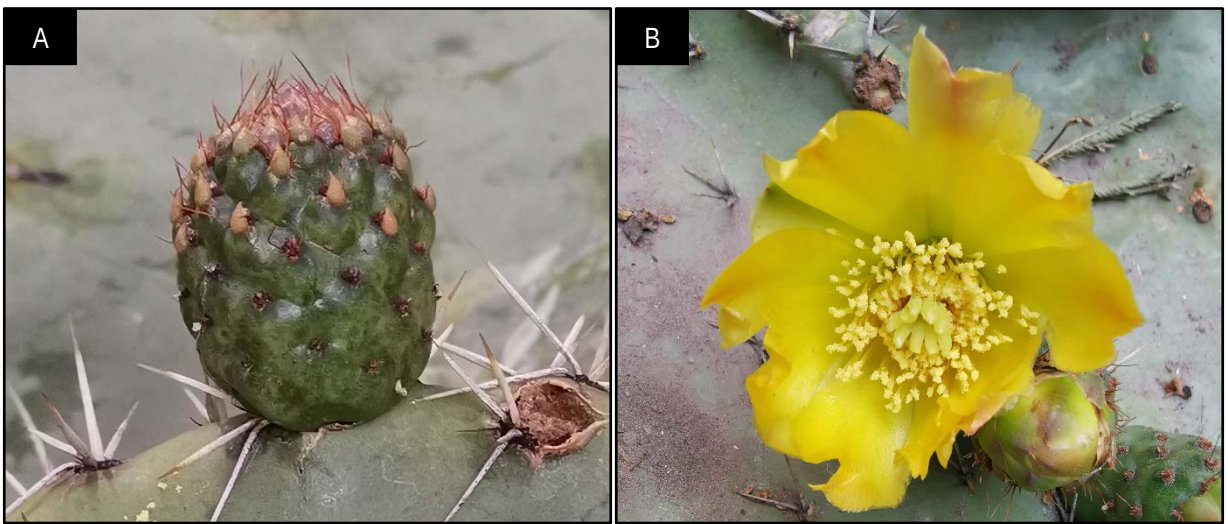

A
B


A
B


A
B
1 mm


A


A
B
10.0kV 12.4mm x100 SE
500um


A
B

0



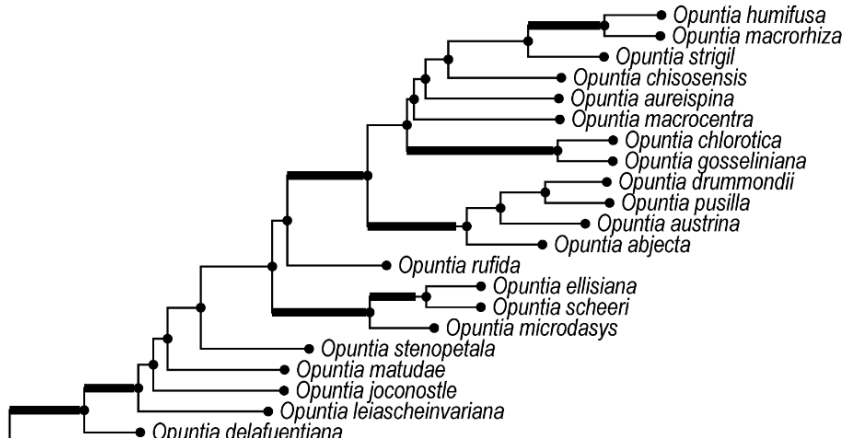

Opuntia humifusa
Opuntia macrorhiza
Opuntia strigil
Opuntia chisosensis
Opuntia aureispina
Opuntia macrocentra
Opuntia chlorotica
Opuntia gosseliniana
Opuntia drummondii
Opuntia pusilla
Opuntia austrina
Opuntia abjecta
Opuntia rufida
Opuntia ellisiana
Opuntia scheeri
Opuntia microdasys
Opuntia stenopetala
Opuntia matudae
Opuntia joconostle
Opuntia leiascheinvariana
Opuntia delafuentiana

Figure 1. ***Opuntia megacantha.*** **A.** Arborescent habit, 2.10 m high, with fruits. **B.** Defined trunk, grayish scaly bark with yellowish and black tones. **C.** Juvenile cladode with prominent tubers.

Figure 2. ***Opuntia megacantha.*** **A.** Elliptical cladode. **B.** Glabrous epidermis. **C.** Irregular epidermal cells, tetracytic stoma. **D.** Elliptical areola, short black trichomes. **E.** White,

radial, and diffuse spines with yellowish apex. **F.** Acute flower buds, green perianth segments with reddish acuminate apex, obovate pericarp.

Figure 3. ***Opuntia megacantha.*** **A.** Flower button, top view. **B.** Flower in anthesis. **C.** Flower side view. **D.** Flower longitudinal cut, white filaments with yellowish tones and yellow anthers, white cuneiform style, ten green stigma lobes. **E.** Elliptical fruit. **F.** Longitudinal cut of the fruit, red funicles.

Figure 4. ***Opuntia megacantha.*** **A.** Areola of the fruit, circular with long trichomes, brown gloquids. **B.** Kidney shaped seed with irregular lateral aril.

Figure 5. ***Opuntia lasiacantha.*** **A.** Arborescent habit, 2 m high. **B.** Defined trunk, slightly grayish scaly bark with light brown tones. **C.** Juvenile cladode with prominent tubers.

Figure 6. ***Opuntia lasiacantha*****. A.** Obovate cladode. **B.** Glabrous epidermis. **C.** Irregular epidermal cells, paracytic stoma. **D.** Elliptical areola, short black trichomes. **E.** Erect and diffuse yellowish white spines. **F.** Acute flower buds, red segments of perianth with acuminate apex.

Figure 7. ***Opuntia lasiacantha*****. A.** Flower button, side view, slightly cylindrical pericarp. **B.** Flower in anthesis. **C.** Side view of flower. **D.** Longitudinal cut of the flower, white filaments, and white-yellowish anthers, white with pink slightly cylindrical style, eleven green lobes of stigma. **E.** Elliptical fruit. **F.** Longitudinal cut of the fruit, orange red funicles.

Figure 8. ***Opuntia lasiacantha*****. A.** Circular areola of the fruit with short trichomes, yellow glochids. **B.** Kidney shaped seed with irregular lateral aril.

Figure 9. ***Opuntia streptacantha.*** **A.** 2.70 m high tree. **B.** Defined trunk, grayish scaly bark with black shades. **C.** Juvenile cladode with prominent tubers.

Figure 10. ***Opuntia streptacantha.*** **A.** Oval cladode. **B.** Glabrous epidermis. **C.** Irregular epidermal cells, cyclocytic stoma. **D.** Elliptical areola, short black trichomes. **E.** Adpressed and diffuse white spines with gray and black tones. **F.** Acute floral buttons, green segments of perianth with reddish acuminate apex.

Figure 11. ***Opuntia streptacantha.*** **A.** Flower button, side view, elliptical pericarp. **B.** Flower in anthesis. **C.** Lateral view of the flower. **D.** Longitudinal cut of the flower, yellow filaments and yellow anthers, white cuneiform style, nine green stigma. **E.** Obovate fruit. **F.** Longitudinal cut of the fruit, red funicles.

Figure 12. ***Opuntia streptacantha.*** **A.** Areola of fruit, circular with long trichomes, brown glochids. **B.** Discoid seed with irregular lateral aril.

Figure 13. ***Opuntia hyptiacantha.*** **A.** 2.15 m high tree. **B.** Defined trunk, slightly grayish scaly bark with light brown tones. **C.** Juvenile cladode with prominent tubers.

Figure 14. ***Opuntia hyptiacantha.*** **A.** Elliptical cladode. **B.** Glabrous epidermis. **C.** Irregular epidermal cells, paracytic stoma. **D.** Elliptical areola, short black trichomes. **E.** Erect and diffuse white spines with yellowish apex. **F.** Acute flower buds, reddish segments of perianth with auminate apex.

Figure 15. ***Opuntia hyptiacantha.*** **A.** Flower button, side view, elliptical pericarp. **B.** Flower in anthesis. **C.** Lateral view of the flower. **D.** Longitudinal cut of the flower, reddish and yellow filaments, yellow anthers, green cuneiform style, eight green stigma lobes. **E.** Elliptical fruit. **F.** Longitudinal cut of the fruit, pink red funicles.

Figure 16. ***Opuntia hyptiacantha.*** **A.** Areola of fruit, circular with long trichomes, yellow glochids. **B.** Lenticular seed with irregular lateral aril.

Figure 17. Maximum credibility phylogram of the clades, obtained with Bayesian inference from *Opuntia s.*s. species and related groups. The phylogenetic position of *Opuntia* ser. *Streptacanthae* Britton & Rose is shown in bold. The support of the clades is represented with a corresponding thick line with subsequent Bayesian probability PP≥ 0.95.

7. CONCLUSIONES

Se aporta una descripción morfológica con mayor detalle de las cuatro especies de *Opuntia* pertenecientes a la serie *Streptacanthae,* lo que contribuye a su taxonomía e identificación.

Con la información morfológica y filogenética se corrobora a los cuatro taxones como especies diferentes, agrupadas en un mismo clado monofilético dentro de *Opuntia s.str*, compartiendo la característica de tener epidermis glabra, flores amarillas y frutos rojos con funículos dulces.

Las ideas preconcebidas de las afinidades de las especies basadas en la ubicación geográfica y poco parecido morfológico deben verificarse mediante estudios sistemáticos detallados, ya que *Opuntia* es un género complicado desde el punto de vista taxonómico y nomenclatural.