



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACION
CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA, A.C**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Patrones temporales en la interacción entre hormigas y
Cylindropuntia imbricata: la relevancia de los nectarios
extraflorales**

Tesis que presenta

Francisco Xavier García Delgado

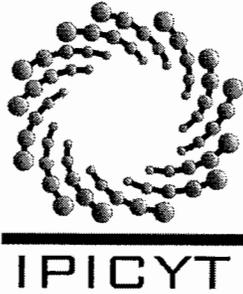
Maestría en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

Dr. Joel David Flores Rivas

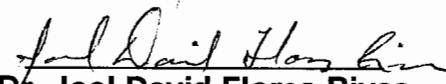
San Luis Potosí, S.L.P.

Noviembre de 2016



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Patrones temporales en la interacción entre hormigas y *Cylindropuntia imbricata*: la relevancia de los nectarios extraflorales”*** presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Francisco Xavier García Delgado** y aprobada el **veintiocho de noviembre del dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.


Dr. Joel David Flores Rivas
Director de la tesis


Dr. Felipe Barragán Torres
Miembro del Comité Tutorial



Dr. Ernesto Iván Badano
Miembro del Comité Tutorial

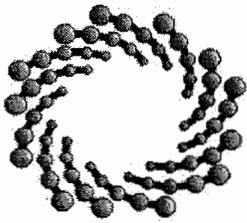

Dra. Laura Yáñez Espinosa
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en la División de Ciencias Ambientales, del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Joel David Flores Rivas.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT- 333154) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 042 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 28 días del mes de noviembre del año 2016, se reunió a las 13:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Laura Yáñez Espinosa	Presidenta	UASLP
Dr. Ernesto Iván Badano	Secretario	IPICYT
Dr. Felipe Barragán Torres	Sinodal	IPICYT
Dr. Joel David Flores Rivas	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó el C.

Francisco Xavier García Delgado

sobre la Tesis intitulada:

Patrones temporales en la interacción entre hormigas y *Cylindropuntia imbricata*: la relevancia de los nectarios extraflorales

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Joel David Flores Rivas

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 14:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 28 días del mes de noviembre de 2016.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a las personas que gracias a sus consejos y opiniones, ayudaron a decidirme por realizar una maestría en ciencias.

Prof. J. Francisco García Hernández, quien ha sido el modelo de aprendizaje que he seguido desde que tengo uso de razón; enfocándose en la perspectiva objetiva de las cosas y de las acciones a tomar.

C. Orlanda Delgado Sosa, cuyos temas inculcados fueron los de someter a evaluación cada decisión tomada y acción a realizar, para modelar un panorama siempre de bienestar y seguridad hacia mi persona.

M. en C. Marco Pineda, quien fue el biólogo que me enseñó el sendero el cual había que recorrer, para conocer, formar y crear, en el método científico.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante la maestría (CONACYT-333154).

Al Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD) de la UASL, por haberme brindado la oportunidad de realizar parte del proyecto en sus instalaciones. Al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) del IPICyT, por la oportunidad de realizar micrografías en sus instalaciones.

Al Dr. Joel Flores por sus asesorías, apoyo y paciencia brindada a mi persona para concluir el presente proyecto. He aprendido algo muy importante de él, y es que no importa el conocimiento o méritos que puedas llegar a obtener; la humildad y la imparcialidad son los atributos que te representarán como persona ante la sociedad que te rodea.

A la Dra. Laura Yáñez por mostrarme que solo se necesita pasión para llegar al objetivo deseado, perspicacia para abrirte paso en un mundo competitivo, y que es cuestión de actitud para dar a conocer tus ideas y a ti mismo.

Al Dr. Ernesto I. Badano por enseñarme que es necesario tener carácter, fuerza, orgullo y determinación, para no dudar nunca de mis decisiones, enfrentar firmemente las adversidades, y que nunca podemos detenernos por obstáculos en nuestro camino.

Al Dr. Felipe Barragán Torres por sus consejos, siendo estos hacia el trabajo y la vida misma. Gracias a él pude decidir el siguiente paso después de la maestría, y

fueron sus consejos lo que me enseñaron que no importa lo que haga, siempre será lo que realmente quiera hacer.

Al técnico M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz por todo el apoyo brindado para el trabajo en campo y laboratorio, por su gran amistad y apoyo en todas las cosas que estaban fuera de mi alcance.

A la Dra. Claudia González Salvatierra, por ayudarme, aconsejarme y por mostrarme el mundo de la investigación en el cual ella interactuaba y así, poder reconocer el mundo que me rodeaba.

A la técnica Ana Iris Pena Maldonado por ayudarme en el proceso de las micrografías, usando el microscopio Quanta 200.

A mi familia: mis padres, tíos, primos que me apoyaron en esta nueva etapa de mi vida.

CONTENIDOS

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Índice	ix
Lista de figuras	xi
Abreviaturas	xiii
Glosario	xv
Resumen	xvii
Abstract	xviii

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1 Sitio de estudio	5
2.2 Descripción y distribución de la especie de estudio	5
2.3 Diseño experimental	7
2.3.1 Identificación de las hormigas en asociación con los NEF	7
2.3.2 Evaluación del efecto del período del día (día y noche) y de las etapas del período de lluvias en la estructura de la interacción hormigas- <i>C. imbricata</i> .	8
2.3.3 Análisis morfo-anatómico de los nectarios extraflorales en diferentes etapas del período de lluvias	8
2.3.4 Mediciones de factores ambientales	10
2.4 Análisis estadísticos	10
3. RESULTADOS	11
3.1 Identificación de las hormigas en asociación con los NEF	11
3.2 Efecto del periodo (día y noche) y de las etapas del período de lluvias en la estructura de la interacción hormigas- <i>C. imbricata</i> .	11
3.3 Efecto de la humedad relativa en la frecuencia de visitas de hormigas.	13
3.4 Efecto de la temperatura ambiental promedio en la frecuencia de visitas de hormigas	15

3.5 Análisis morfo-anatómico de los nectarios extraflorales	17
4. DISCUSIÓN	23
5. CONCLUSIONES	26
6. BIBLIOGRAFIA	27
7. ANEXOS	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Cylindropuntia imbricata</i> en el sitio de estudio (a), <i>Liometopum apiculatum</i> visitando nectarios (b), acción defensiva contra herbívoros (c).	6
Figura 2. Imagen de aspirador bucal usado para la colecta de hormigas.	7
Figura 3. Abundancia relativa de hormigas forrajeras totales por nectario extrafloral de <i>C. imbricata</i> , con respecto al tiempo (semanas) en el que se realizaron los monitoreos durante la temporada de lluvias. Las barras verticales indican el error estándar y las líneas punteadas delimitan el periodo de la temporada. Letras diferentes indican diferencias entre períodos ($F=11.056$, $P < 0.0001$).	12
Figura 4. Abundancia relativa de especies de hormiga por nectario extrafloral de <i>C. imbricata</i> , con respecto al tiempo (semanas) en el que se realizaron los monitoreos durante la temporada de lluvias. Las barras verticales indican el error estándar y las líneas punteadas delimitan el periodo de la temporada. Letras diferentes dentro de cada período indican diferencias entre especies.	13 14
Figura 5. Relación entre la humedad relativa de las plantas de <i>C. imbricata</i> y la abundancia total de hormigas por nectario durante la temporada de lluvias ($P < 0.0001$). Cada punto representa el promedio semanal de hormigas.	14
Figura 6. Relación entre la humedad relativa de las plantas de <i>Cylindropuntia imbricata</i> y la abundancia de <i>L. apiculatum</i> por nectario durante la temporada de lluvias ($P < 0.0001$). Cada punto representa el promedio semanal de hormigas.	15
Figura 7. Relación entre la humedad relativa de las plantas de <i>Cylindropuntia imbricata</i> y la abundancia de <i>C. opuntiae</i> por nectario durante la temporada de lluvias ($P < 0.0001$).	15

Figura 8. Relación entre la temperatura ambiental y la abundancia total de hormigas por nectario extrafloral de <i>C. imbricata</i> ($P = 0.001$, $r^2 = 0.4906$).	16
Figura 9. Relación entre la temperatura ambiental y la abundancia total de <i>L. apiculatum</i> por nectario extrafloral de <i>C. imbricata</i> ($P = 0.001$, $r^2 = 0.4668$).	17
Figura 10. Relación entre la temperatura ambiental y la abundancia total de <i>C. opuntiae</i> por nectario extrafloral de <i>C. imbricata</i> ($P = 0.018$, $r^2 = 0.2868$).	17
Figura 11. Epidermis del nectario (Ep), Cámaras de néctar (Cn), Parénquima (Pr), Drusas (Cl) y Haces vasculares (Hv) en un corte transversal del nectario extrafloral de <i>C. imbricata</i> .	19
Figura 12. Epidermis del nectario (Ep), Cámaras de néctar (Cn), Parénquima (Pr), Colénquima (Cl) y Haces vasculares (Hv) en otro corte transversal del nectario extrafloral de <i>C. imbricata</i> .	20
Figura 13. Imagen del néctar presente en los nectarios extraflorales, conteniendo mucílago.	21
Figura 14. Micrografías del desarrollo de los nectarios extraflorales de <i>C. imbricata</i> en diferentes etapas de la temporada de lluvias.	24
Figura 15. Micrografías del corte longitudinal de las espinas modificadas de los nectarios extraflorales de <i>C. imbricata</i> al final de la temporada de lluvias.	25

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
a.m.	ante meridiem
ANOVA	Análisis de varianza
°C	Grados centígrados
<i>C. imbricata</i>	<i>Cylindropuntia imbricata</i>
<i>C. Opuntiae</i>	<i>Crematogaster opuntiae</i>
cm	Centímetros
ep	Células epidérmicas
etc.	Etcétera
f	Floema
Hv	Haz vascular
h	Horas
<i>L. apiculatum</i>	<i>Liometopum apiculatum</i>
m	Metros
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	milímetros
msnm	Metros sobre nivel del mar
NEF	Nectarios extraflorales
<i>P. pallidus</i>	<i>Pseudomyrmex pallidus</i>
pH	Potencial de hidrógeno
pn	Parénquima del nectario

seg

Segundo

spp.

Todas las especies del género

T

Temperatura media

GLOSARIO

Areola: es la característica distintiva de la familia Cactaceae y sirve para identificarla como familia separada de otras plantas suculentas semejantes. Las areolas son yemas axilares altamente especializadas, por lo que se trata de zonas meristemáticas. Son claramente visibles y generalmente aparecen como pequeñas protuberancias de colores claros u oscuros, de donde surgen los grupos de espinas.

Célula mucilaginosa: Célula que contiene mucílagos o gomas o carbohidratos similares, caracterizados por la propiedad de hincharse en agua.

Célula parenquimática: Típicamente no se trata de una célula especializada; contiene protoplasto nucleado relacionado con una o más de las diversas actividades fisiológicas y bioquímicas de las plantas. Varía en tamaño, forma y estructura de la pared.

Célula secretora: Célula viva especializada en relación con la secreción o excreción de una o más sustancias, a menudo orgánicas

Clorénquima: Tejido parenquimático que contiene cloroplastos; el mesófilo foliar y otros parénquimas verdes.

Corola: Término colectivo para los pétalos de una flor.

Drusa: Cristal compuesto globular de oxalato de calcio, con numerosos cristales proyectándose desde su superficie

Estambre: Órgano floral que produce el polen y que está compuesto generalmente por la antera y el filamento. El conjunto de estambres constituye el androceo.

Epidermis: Capa más externa de las células del cuerpo primario de la planta. Si es multiseriado (epidermis múltiple), sólo la capa más externa se diferencia como epidermis.

Floema: Principal tejido conductor del alimento de la planta vascular compuesto fundamentalmente de elementos cribosos, diversos tipos de células Parenquimáticas, fibras y esclereidas.

Haz vascular: Parte del sistema vascular parecido a un cordón compuesto de xilema y floema.

Tejido: Grupo de células organizadas como una unidad estructural y funcional. Las células que lo componen pueden ser parecidas (tejido simple) o diversas (tejido complejo)

Xilema: El principal tejido conductor de agua en las plantas vasculares el cual se caracteriza por la presencia de elementos traqueales.

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto del periodo (diurno y nocturno) y de tres etapas del periodo de lluvias (inicio, mitad y final) en la estructura de la interacción hormigas - *Cylindropuntia imbricata*, así como analizar morfológica y anatómicamente el desarrollo de los nectarios extraflorales (NEF) en las tres etapas del periodo de lluvias. El sitio de estudio se encuentra en la localidad San Juanico El Chico, municipio de San Luis Potosí, S.L.P., donde se seleccionaron diez plantas de 1.5 m y se monitorearon la abundancia de hormigas en los tres segmentos superiores de la misma, durante toda la temporada. Se encontró una dominancia por parte de la especie de hormiga *Liometopum apiculatum* como visitante de los nectarios extraflorales de *C. imbricata*, tanto en el día como en la noche, aumentando su actividad en el periodo nocturno. La abundancia total de hormigas mostró la misma tendencia, pero esta diferencia disminuyó en la etapa final del periodo de lluvias, asociándose negativamente a las bajas temperaturas y a la alta humedad relativa. Los NEF comenzaron a contraerse en sus ápices a partir de la mitad del periodo de lluvias, hasta formar pequeñas estructuras lignificadas; hacia el final del periodo de lluvias se observaron espinas modificadas en su totalidad. Los patrones temporales de los ecosistemas son tan importantes en las interacciones planta-hormiga que marcan los ritmos de acción en la actividad forrajera de las hormigas, así como en el desarrollo anatómico y morfológico de los nectarios extraflorales de *C. imbricata*.

Palabras clave: nectarios extraflorales, *Cylindropuntia imbricata*, espinas modificadas.

ABSTRACT

The aim of this research is to evaluate the effect of time (day and night) and three stages of the rainy season (beginning, middle and end) in the structure of the interaction ants - *Cylindropuntia imbricata*, as well as to analyze morphological and anatomical development of extra-floral nectaries at different stages of the rainy season. The study site is located in the town San Juanico El Chico, municipality of San Luis Potosi, S.L.P. where ten plants of 1.5 m were selected and the abundance of ants in the three upper segments of the same was monitored throughout the season. The ant *Liometopum apiculatum* was the most abundant visitor of the extra-floral nectaries from *C. imbricata*, both at day and night, increasing their activity in the night time. The total abundance of ants showed the same behaviour, but decreased at the end of the rainy season, being associated negatively to low temperatures and high relative humidity. The extra-floral nectaries (EFN) began to shrink in their apices from the half of the rainfall period until form small lignified structures; towards the end of this period the spines were entirely modified. Temporal patterns of ecosystems are so important in the ant-plant interactions that mark the rhythms of action in the foraging activity, as well as the anatomical and morphological development of the *C. imbricata*'s EFN.

Keywords: extra-floral nectaries, *Cylindropuntia imbricata*, Cactaceae, modified spines.

1. INTRODUCCIÓN

Las hormigas intervienen en una gran diversidad de interacciones ecológicas con plantas, así como en el enriquecimiento del suelo y el ciclo de nutrientes (Mauseth et al., 2016). Inclusive, se considera que el flujo de energía que estas acarrear es mayor que el de los vertebrados endotérmicos que habitan una misma área (Redolfi et al., 2003).

En las interacciones con plantas, las hormigas les brindan protección contra herbívoros a cambio de diferentes tipos de recursos, en su mayoría alimento en forma de néctar (azúcares), así como refugio y resguardo en algunas especies (Mauseth et al., 2016). Esta interacción se considera un mutualismo facultativo, habiéndose observado en diferentes especies en donde suele evaluarse la oferta de recursos y la densidad de los consumidores (Chamberlain y Holland, 2008).

Las principales familias vegetales que presentan esta interacción con hormigas son Fabaceae, Verbenaceae y Vochysiaceae, las cuales comparten una característica fundamental, la presencia de nectarios extraflorales (NEF) (Dáttilo et al., 2015). Estos nectarios son tejidos especializados que secretan una solución acuosa con gran variedad de compuestos, como glucosa, fructosa y sucrosa a varias concentraciones y están presentes en órganos vegetativos como en pecíolos de las hojas o estípulas de tallos jóvenes (Bemardello, 2007). También pueden contener maltosa, rafinosa, melobiosa, mucílago, ácidos orgánicos, iones minerales, fosfatos, vitaminas, compuestos fenólicos, oxidasas y tirosinasas (Fahn, 1979; Nicolson y Thornburg, 2007).

Se han realizado diversas investigaciones sobre los NEF en especies de las familias mencionadas anteriormente, pero las especies de la familia Cactaceae han sido de las menos estudiadas a pesar de que desde principios del siglo XX se observó que *Echinocactus pringlei* Rose (ahora *Ferocactus pilosus*) presenta glándulas que segregan pequeñas gotas de lo que parecía ser néctar; también se observaron glándulas en *Opuntia imbricata* (ahora *Cylindropuntia imbricata*), situadas en la base de las espinas de los segmentos más jóvenes (Lloyd, 1908).

Fue hasta la segunda mitad del siglo XX que se retomaron los estudios en este tema para la familia Cactaceae. En *Opuntia acantocarpa* los NEF están presentes como glándulas secretoras sobre la superficie de los tallos, siendo al parecer espinas modificadas (Pickett y Clark, 1979). En *Ferocactus gracilis*, los NEF se encuentran entre la espina primaria y dos espinas secundarias más pequeñas (Blom y Clark, 1980). En *Ancistrocactus scheeri* los NEF parecen ser espinas modificadas, ya que están formados por un meristemo en la aréola, no están vascularizados y no tienen tricomas o estomas (Mauseth, 1982), a diferencia de *Cylindropuntia imbricata*, que cuenta con NEF vascularizados (Ávila-Argáez, 2013). Esto es una muestra de la gran variedad de tipos de NEF, cuyas características son particulares de cada planta, y de la escasez de información respecto a los mismos.

En una revisión reciente, Mauseth et al. (2016) enlistan 52 especies de la familia Cactaceae con NEF y mencionan que en la mayoría de ellas no se han hecho estudios ecológicos de la interacción hormiga – cactus, ni de la localización y características morfo-anatómicas de los NEF. Los mismos autores mencionan la existencia de cuatro tipos de NEF: 1) Espinas altamente modificadas que son cortas, anchas y sin punta; 2) Nectarios que recuerdan espinas ordinarias y que no tienen

modificaciones aparentes; 3) Hojas pequeñas que se encuentran bajo una areola; 4) Regiones de la epidermis y corteza justo bajo una areola.

Una característica importante por tomar en cuenta en la interacción planta-hormiga es el periodo de actividad (diurna y nocturna) de las hormigas, la cual puede variar alcanzando diferentes abundancias en los periodos (Aréchiga, 2004; Dáttilo et al., 2015), e inclusive persistir en condiciones ambientales constantes como lluvias o sequías (Aréchiga, 2004; Dáttilo et al., 2015). Por ejemplo, en *Prosopis laevigata*, la actividad diurna de las hormigas está dominada por *Camponotus atriceps*, en cambio, en la noche es dominada por *Camponotus rubritorax* (Dáttilo et al., 2015). Para *Ferocactus latispinus*, la abundancia de hormigas en periodo diurno es dominada por *Camponotus rubrithorax* y *Pseudomyrmex major* y en periodo nocturno es dominada por *Camponotus atriceps*, *Camponotus festinatus* y *Crematogaster* sp. (Luna-De la Torre et al., 2016). Así, los patrones temporales en el ecosistema (e.g. día y noche) pueden ser importantes para la interacción planta – hormiga.

Además, estudios previos de interacciones de hormigas con diferentes familias de plantas sugieren que el forrajeo de las hormigas a los nectarios extraflorales está estrechamente ligado con la disponibilidad del néctar que pueden coleccionar, es decir, del número de nectarios disponibles (Dáttilo et al., 2015). Otra característica importante es que la calidad y cantidad del néctar producido varía en el transcurso del día, por lo tanto, esta característica podría influir en la tasa de forrajeo diario de las hormigas (Schupp et al., 1991; Heil et al., 2000; Falcão et al., 2014). Por lo tanto, la riqueza de especies de hormigas que puedan interactuar con las cactáceas se basaría en la competencia por “monopolizar” los nectarios. Así, en el caso de que

exista dominio hacia los NEF por parte de una especie de hormiga sobre otra, podría existir una diferencia en la abundancia de hormigas en diferentes lapsos del día, lo cual influiría en el grado de protección que las hormigas puedan seguir ofreciendo a la planta, así como en el crecimiento y desarrollo de la planta (Luna-De la Torre et al., 2016). Por lo tanto, se vería la importancia de los patrones temporales de los ecosistemas en las interacciones planta-hormiga.

Cylindropuntia imbricata es una cactácea que se distribuye en el desierto chihuahuense, tanto en México como en los Estados Unidos; en México sus frutos son aprovechados por la población rural gracias a sus atributos medicinales (Romero-Cerecero, 2009). Esta especie posee nectarios extraflorales en los segmentos nuevos de la planta, los cuales son visitados por las hormigas *Crematogaster opuntiae* y *Liometopum apiculatum* en la época de sequía; especies que nunca co-ocurren en la misma planta, por lo menos durante el día, lo cual es interpretado como evidencia de competencia entre hormigas por los servicios de la planta (Miller, 2007; Ávila-Argáez, 2013). Sin embargo, se desconoce si la actividad de las hormigas varía entre los períodos diurno y nocturno, así como si esta actividad varía dentro de la época de lluvias y si los NEF de *C. imbricata* son visitados por las mismas especies de hormigas que durante la sequía.

Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la interacción mutualista entre hormigas y cactáceas, se hipotetiza que existen diferencias en la actividad de las hormigas que visitan los nectarios extraflorales durante los períodos diurno y nocturno, así como en las diferentes etapas dentro de la época de lluvias. Los objetivos de esta investigación son: 1) Evaluar el efecto del horario (día y noche) y de tres etapas del período de lluvias (inicio, mitad y final) en la estructura de la

interacción hormigas - *C. imbricata*, y 2) Analizar morfológica y anatómicamente el desarrollo de los nectarios extraflorales en diferentes etapas del período de lluvias.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en una población de *Cylindropuntia imbricata*, ubicada en la localidad de San Juanico El Chico, municipio de San Luis Potosí, S.L.P. Las coordenadas geográficas son de 100° 50' 48.3" longitud oeste, 22° 14' 07.5" latitud norte, a una altitud de 1871 msnm. La vegetación del área de estudio es matorral xerófilo secundario.

2.2 Descripción y distribución de la especie de estudio

Cylindropuntia imbricata, perteneciente a la familia Cactaceae, cuenta con una amplia distribución geográfica desde el centro y noreste de México, hasta el oeste de los Estados Unidos (Anderson, 2001). Su altura es de hasta 2.5 m, con tallos de 6 a 10 cm de diámetro; ramificación abierta con segmentos largos y cilíndricos, aréolas ovadas de 5 a 7 mm de largo, espinas blanco pardusco de 2.5 cm de largo (Miller, 2007). Los nectarios extraflorales de esta especie se encuentran en estructuras vegetativas jóvenes y reproductivas (Miller, 2007).

Liometopum apiculatum, se distribuye en cuatro estados de los Estados Unidos de América (Arizona, Colorado, Texas y Nuevo México) y en 19 estados del norte y centro de México: principalmente en Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas, San Luis Potosí, Hidalgo, Estado de México, Distrito

Federal y Tlaxcala; esta especie posee cabeza proporcionalmente grande, con borde cóncavo posterior, mandíbula dentada, mesosoma convexo, formando un arco ininterrumpido (Ramos-Elorduy et al., 1988; Mackay y Mackay, 2002; Guzmán-Mendoza et al., 2014).

Crematogaster opuntiae se distribuye de norte a sur del desierto sonorense; así como en los estados de Chihuahua, Coahuila, San Luis Potosí e Hidalgo (Buren, 1974). Cuenta con una longitud de 3.5 a 4.5 mm, cabeza más ancha que larga, con lados convexos y esquinas muy redondeadas en las partes traseras, tórax aplastado por encima como es habitual en este grupo de especies, y con el declive mesonotal corto, pobremente diferenciado, o está ausente (Buren, 1974).

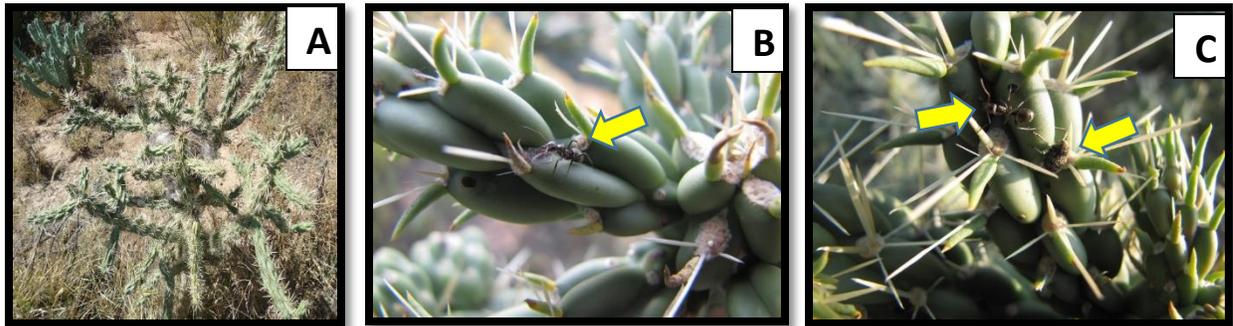


Figura 1. *Cylindropuntia imbricata* en el sitio de estudio (a), *Liometopum apiculatum* visitando nectarios (b), acción defensiva contra herbívoros (c).

2.3 Diseño experimental

Se seleccionaron diez individuos de *Cylindropuntia imbricata*, con una altura mayor de 1.5 m de altura, distribuidos uniformemente en el sitio de estudio.

2.3.1 Identificación de las hormigas en asociación con los NEF

Con el fin de corroborar las especies de hormigas asociadas a los NEF de *C. imbricata*, se realizaron capturas de hormigas una semana previa a los monitoreos. Este trabajo se realizó cada cuatro semanas durante un período de 35 semanas. Para la captura de hormigas se usó un aspirador bucal (Figura 2), posteriormente las hormigas se colocaron en tubos Falcon (14 ml) con etanol al 70%, para su conservación e identificación.

Las capturas se llevaron a cabo en 10 plantas en horarios de 9 pm a 3 am y de 6 am a 10 am, cada 2 horas respectivamente; por un período de 2 min por cada planta. Para determinar la subfamilia a las que pertenecen, se utilizó la guía de Mackay y Mackay (1989), el libro de Triplehorn y Johnson (2005) y la base de datos de AntWeb (Ward et al., 2002).

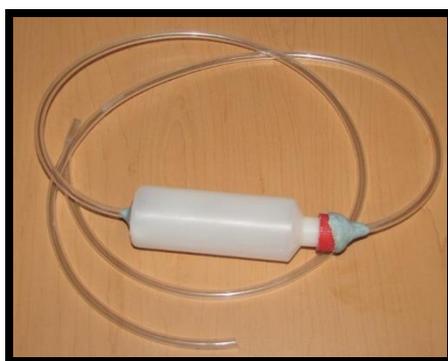


Figura 2. Imagen de aspirador bucal usado para la colecta de hormigas.

2.3.2 Evaluación del efecto del período del día (día y noche) y de las etapas del período de lluvias en la estructura de la interacción hormigas - *C. imbricata*.

Los monitoreos de visitas por parte de las hormigas a los nectarios extraflorales se realizaron en el mismo sitio, utilizando 10 plantas previamente etiquetadas. Se seleccionaron tres de los segmentos superiores, ya que es en estos en donde se encuentran los nectarios activos y las hormigas se concentran. Se dedicaron dos minutos de observación para cada segmento, en intervalos de dos horas, durante 24 horas, cubriendo los períodos diurno y nocturno.

El período de estudio abarcó desde el mes de Julio al mes de Diciembre de 2015, abarcando la temporada completa de lluvias, y se organizó en tres etapas: inicio de lluvias (17 de junio – 21 de agosto), a la mitad de las lluvias (28 de agosto – 9 de octubre) y al final de las lluvias (17 de octubre – 27 de noviembre), con la finalidad de poder observar los posibles cambios durante la temporada. Por otro lado, se realizó un conteo de los nectarios extraflorales de los tres segmentos superiores. Con base en la información anterior, se construyeron curvas de actividad de las hormigas, para ilustrar la frecuencia de visitas en el periodo de estudio.

2.3.3 Análisis morfo-anatómico de los nectarios extraflorales en diferentes etapas del período de lluvias.

Se extrajeron nectarios extraflorales de *C. imbricata* en cada etapa de la temporada de lluvias (como se señaló anteriormente), para lo cual se utilizó un microsacabocados (Trepbor) y se usó silicón sin compuestos fenólicos para cubrir el espacio dejado por el nectario retirado, con el fin de evitar contaminación por hongos y bacterias. Los nectarios obtenidos fueron depositados en tubos Eppendorf

de 2 ml con glutaraldehído al 3%, conservándose en frío (3 – 4°C) para ser transportados al Laboratorio de Anatomía del IIZD-UASLP para su posterior tratamiento.

Los NEF se procesaron con la microtecnica convencional (Ruzin, 1999) con una serie etanólica (30-100%) para deshidratar los tejidos y posteriormente una serie de glicolmetacrilato (Technovit 7200) 30-100% para infiltrarlos y posteriormente incluirlos. Se realizaron cortes longitudinales y transversales de los mismos usando un microtomo rotatorio (Leica RM 2125RT), los cuales fueron teñidos con azul de toluidina y posteriormente observados y fotografiados con un lente Leica DMC 2900, usando un microscopio compuesto. En el Apéndice 1 de la sección de Anexos se describen de manera detallada los tratamientos aplicados a los NEF.

Para el análisis de la morfología de los NEF, se colectaron tres nectarios de cada planta por cada etapa de la temporada de lluvias, los cuales se conservaron en tubos Eppendorf de 2 ml con glutaraldehído al 3%, para ser transportados al mismo laboratorio y ser sometidos a una serie etanólica (30-100%) y finalmente ser observados en el microscopio electrónico de barrido Quanta 200. Para poder medir las dimensiones de los nectarios extraflorales (diámetro menor- mayor, área, perímetro, etc.) se usó el programa ImageJ, junto con las micrografías tomadas con el Quanta 200.

Finalmente, con el fin de evaluar si el néctar presente en los nectarios extraflorales contiene mucílago, se le aplicó una tinción “brilliant cresyl blue” a una muestra de néctar dentro de un tubo eppendorf de 5 ml. Así, si la muestra es mucílago se debe teñir de color azul.

2.3.4 Mediciones de factores ambientales

Se instalaron diez sensores HOBO de temperatura ambiental y humedad relativa del aire en el sitio de estudio, uno por planta, tomando lecturas de cada hora por 24 horas. Los sensores registraron lecturas diariamente durante todo el periodo experimental.

2.4 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas en las que el factor fue el periodo de la temporada de lluvias (tres periodos: inicio, mitad y final) y la variable de respuesta fue la abundancia relativa de hormigas totales en las plantas. Además, para cada especie se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas en donde la variable de respuesta fue la abundancia relativa de hormigas. Dicha abundancia relativa se obtuvo calculando la cantidad de registros totales diarios entre el número de nectarios activos. No se tomó en cuenta el factor día/noche, ya que no se encontraron hormigas durante el período diurno. Así, la abundancia de hormigas analizada fue la encontrada en el período nocturno solamente.

También se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas para evaluar el diámetro mayor de los nectarios extraflorales de *C. imbricata*, durante la temporada de lluvias; donde el factor fue el periodo de la temporada.

Con el fin de evaluar el efecto de las variables ambientales en la abundancia de hormigas durante la temporada de lluvias, se realizaron análisis de regresión lineal entre la humedad relativa y la abundancia, tanto del total de hormigas por planta y por nectario, así como para cada una de las especies (*L. apiculatum* y *C. opuntiae*). También se realizaron análisis de regresión entre la temperatura

promedio y la abundancia, tanto del total de hormigas, como por nectario, de cada una de las especies de hormiga. Todos los análisis se realizaron con el programa XLSTAT- Base.

3. RESULTADOS

3.1 Identificación de las hormigas en asociación con los NEF.

Se confirmaron dos especies de hormigas que mantienen una asociación mutualista con *Cylindropuntia imbricata*: *Liometopum apiculatum* (Dolichoderinae) y *Crematogaster opuntiae* (Myrmicinae). Las dos especies se encontraron en las diez plantas monitoreadas, así como en diferentes periodos del día.

3.2 Efecto del período (día y noche) y de las etapas del período de lluvias en la estructura de la interacción hormigas - *C. imbricata*.

Únicamente se obtuvieron datos de abundancia relativa de hormigas totales (sumando los individuos de ambas especies) por nectario extrafloral de *C. imbricata* en el periodo nocturno, debido a que no se encontraron hormigas en el día. No se observaron diferencias entre el inicio (1.362 ± 0.11 E.E. hormigas por nectario extrafloral) y la mitad del período de lluvias (1.281 ± 0.10), pero sí entre éstos y el final de la temporada (0.252 ± 0.04) ($F = 11.056$, $p < 0.0001$; Figura 3).

Al realizar el ANOVA de medidas repetidas comparando la abundancia relativa de las dos especies, se encontró que al inicio de la estación de lluvias hubo mayor abundancia relativa para *L. apiculatum* (0.987 ± 0.11 hormigas por nectario extrafloral) que para *C. opuntiae* (0.375 ± 0.01) ($F = 24.477$, $p < 0.0001$). A la mitad de la estación de lluvias hubo un comportamiento similar, mayor abundancia relativa

para *L. apiculatum* (0.896 ± 0.10 individuos por nectario extrafloral) que para *C. opuntiae* (0.385 ± 0.01) ($F = 19.926$, $p < 0.0001$). Al final de la estación de lluvias, también se encontró mayor abundancia relativa para *L. apiculatum* (0.214 ± 0.03 individuos por nectario extrafloral) que para *C. opuntiae* (0.038 ± 0.001) ($F = 20.526$, $p < 0.0001$; Figura 4).

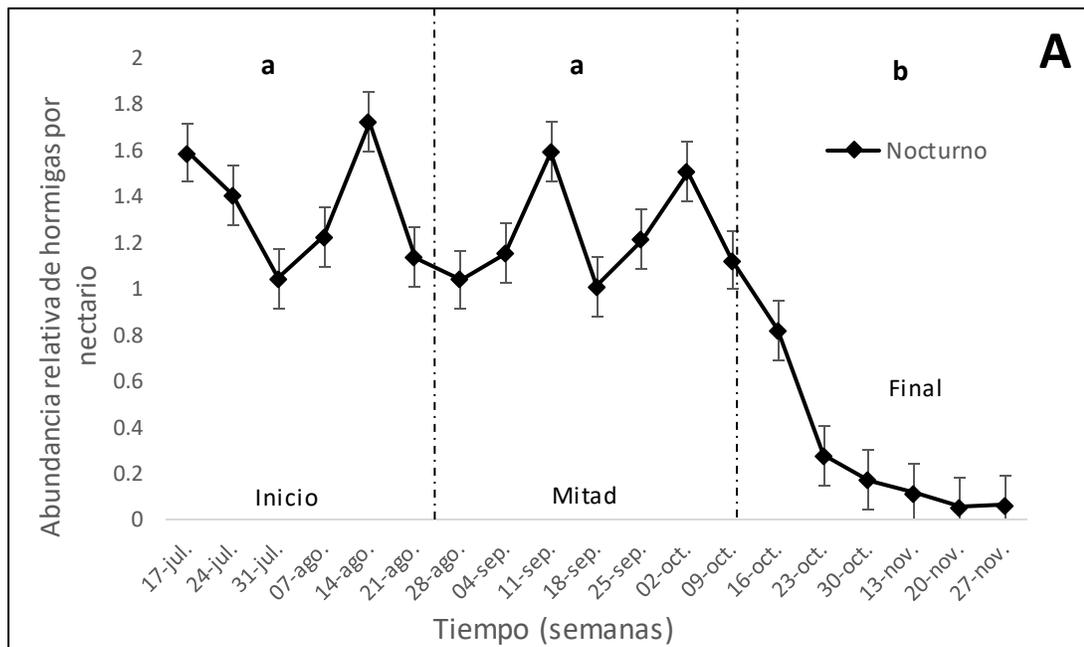


Figura 3. Abundancia relativa de hormigas forrajeras totales por nectario extrafloral de *C. imbricata*, con respecto al tiempo (semanas) en el que se realizaron los monitoreos durante la temporada de lluvias. Las barras verticales indican el error estándar y las líneas punteadas delimitan el periodo de la temporada. Letras diferentes indican diferencias entre periodos ($F = 11.056$, $P < 0.0001$).

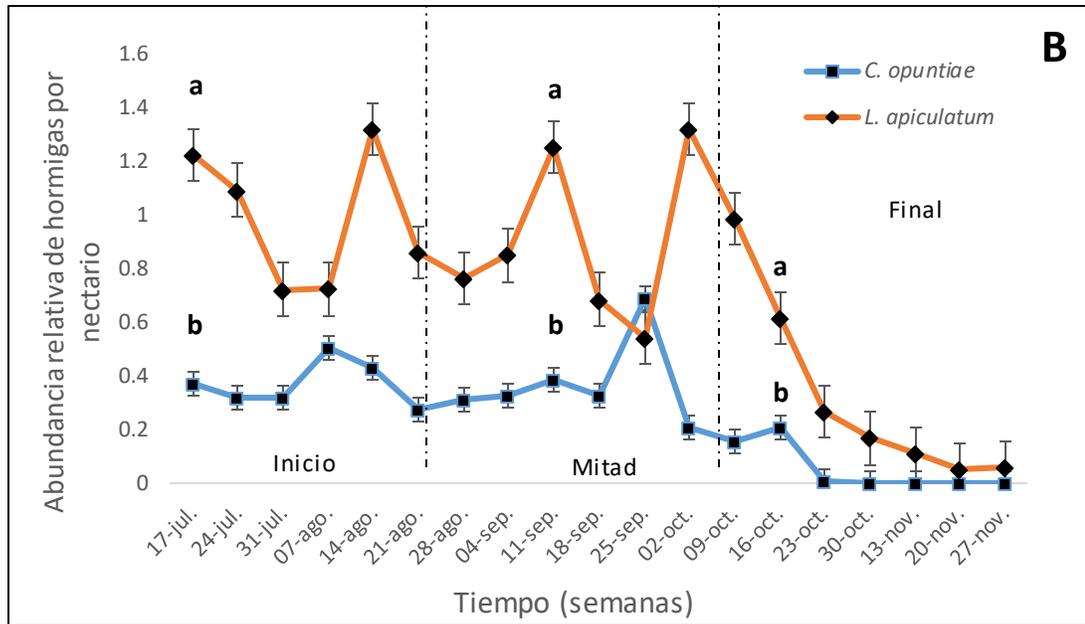


Figura 4. Abundancia relativa de especies de hormiga por nectario extrafloral de *C. imbricata*, con respecto al tiempo (semanas) en el que se realizaron los monitoreos durante la temporada de lluvias. Las barras verticales indican el error estándar y las líneas punteadas delimitan el periodo de la temporada. Letras diferentes dentro de cada período indican diferencias entre especies.

3.3 Efecto de la humedad relativa en la frecuencia de visitas de hormigas.

Se encontró una asociación negativa entre la humedad relativa y la abundancia total de hormigas por nectario durante la temporada de lluvias ($P < 0.0001$, Figura 5). Aunque la humedad sigue sin bajar del 60%, a mayor humedad en el ambiente, la abundancia de visitas de hormigas por nectario fue menor; la proporción explicada por la regresión es similarmente alta ($r^2 = 0.7168$). A nivel de especie, *L. apiculatum* presentó una asociación negativa durante la temporada de lluvias ($P < 0.0001$, $r^2 =$

0.6654, Figura 6), al igual que *C. opuntiae*, aunque con una menor proporción explicada de la regresión ($P < 0.0001$, $r^2 = 0.4488$, Figura 7).

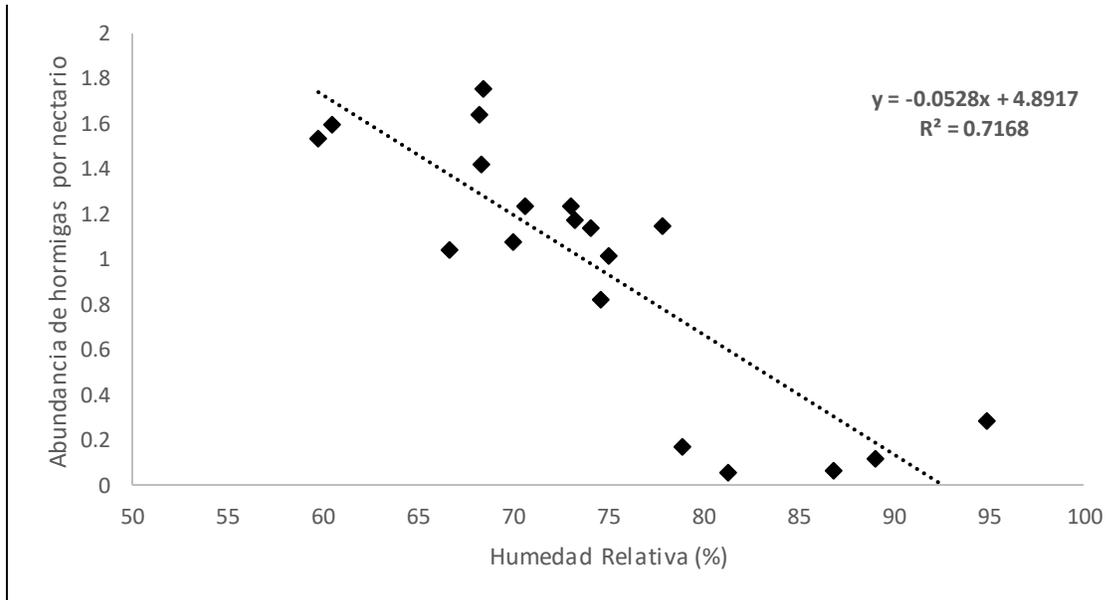


Figura 5. Relación entre la humedad relativa de las plantas de *C. imbricata* y la abundancia total de hormigas por nectario durante la temporada de lluvias ($P < 0.0001$). Cada punto representa el promedio semanal de hormigas.

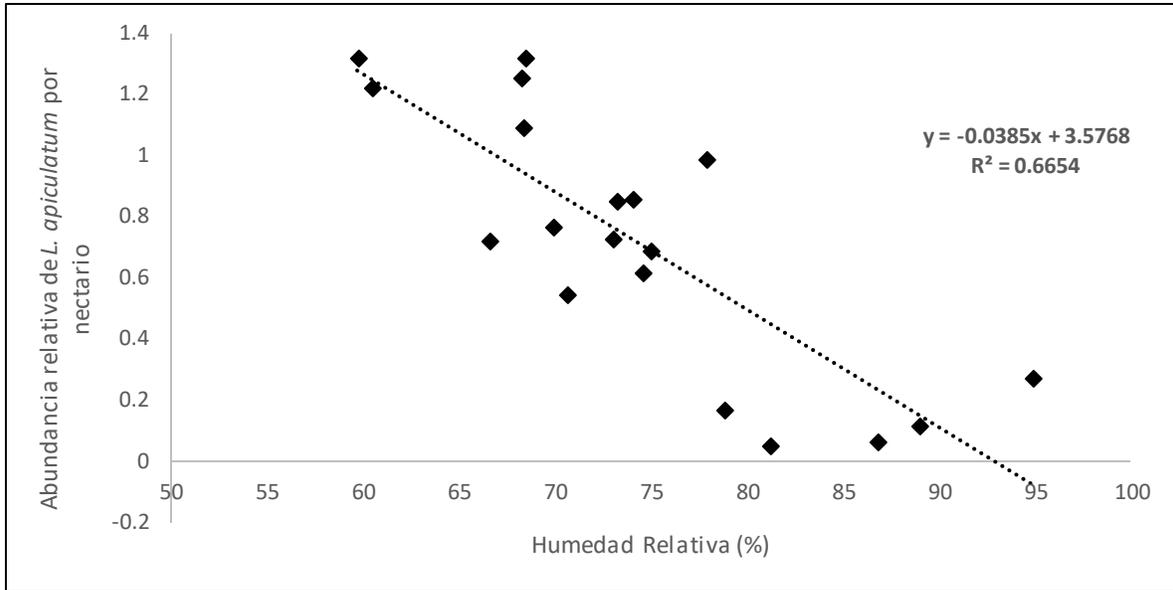


Figura 6. Relación entre la humedad relativa de las plantas de *Cylindropuntia imbricata* y la abundancia de *L. apiculatum* por nectario durante la temporada de lluvias ($P < 0.0001$). Cada punto representa el promedio semanal de hormigas.

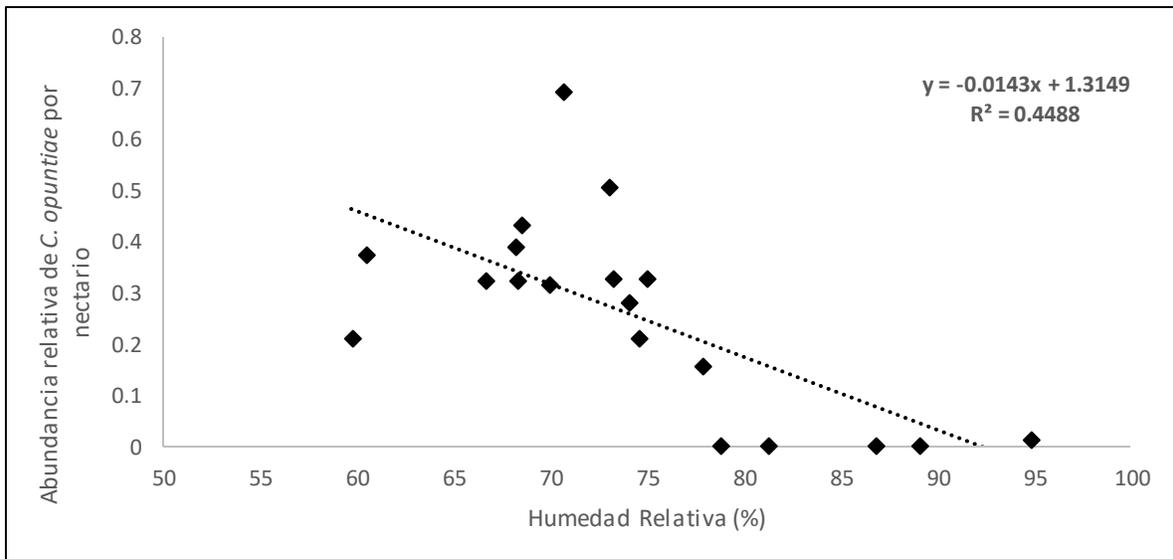


Figura 7. Relación entre la humedad relativa de las plantas de *Cylindropuntia imbricata* y la abundancia de *C. opuntiae* por nectario durante la temporada de lluvias ($P < 0.0001$).

3.4 Efecto de la temperatura ambiente promedio en la abundancia de hormigas

Se encontró una asociación positiva de la abundancia total de hormigas por nectario con la temperatura ($P = 0.001$, $r^2 = 0.4906$), es decir que al aumentar la temperatura aumenta la frecuencia de visitas de hormigas por nectario (Figura 8). Se encontraron resultados similares para cada especie: *L. apiculatum* ($P = 0.001$, $r^2 = 0.4668$, Figura 9) y *C. opuntiae* ($P = 0.018$, $r^2 = 0.2868$, Figura 10).

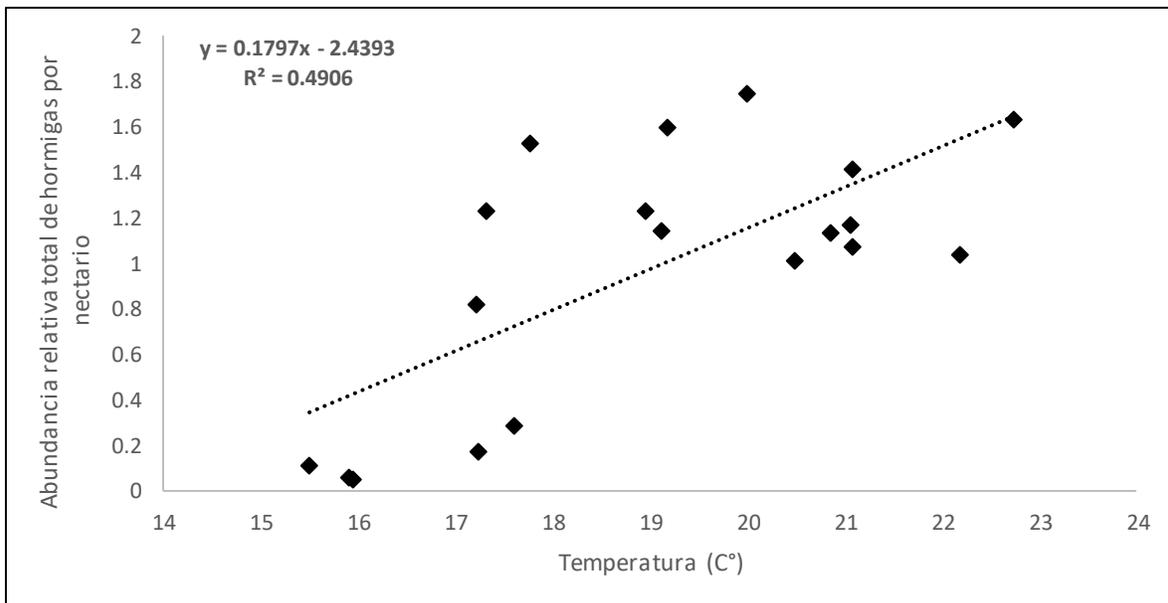


Figura 8. Relación entre la temperatura ambiente y la abundancia total de hormigas por nectario extrafloral de *C. imbricata* ($P = 0.001$, $r^2 = 0.4906$).

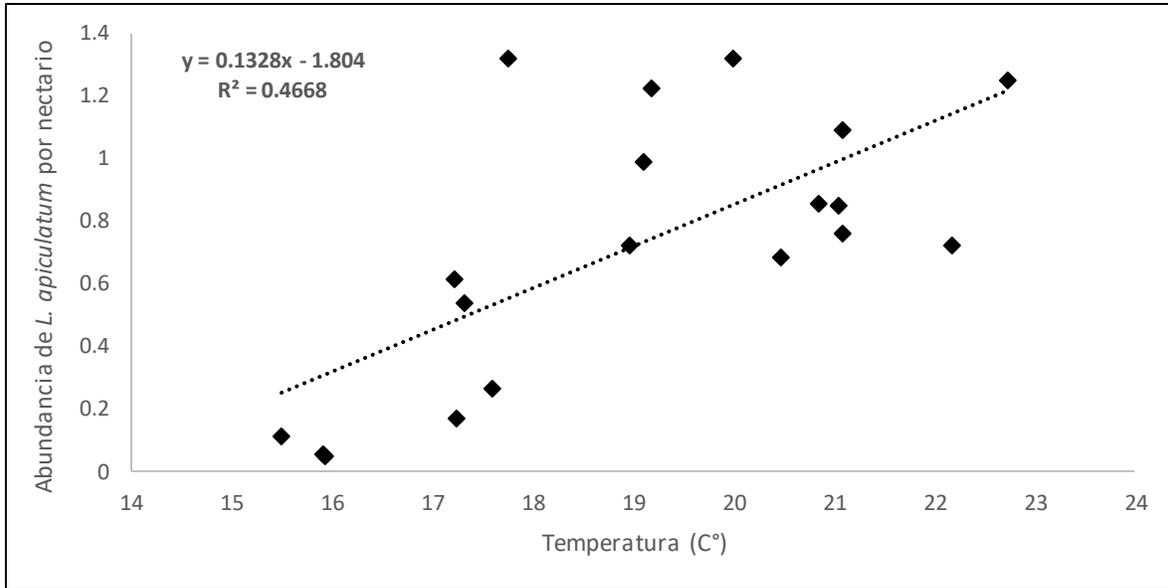


Figura 9. Relación entre la temperatura ambiental y la abundancia total de *L. apiculatum* por nectario extrafloral de *C. imbricata* ($P = 0.001$, $r^2 = 0.4668$).

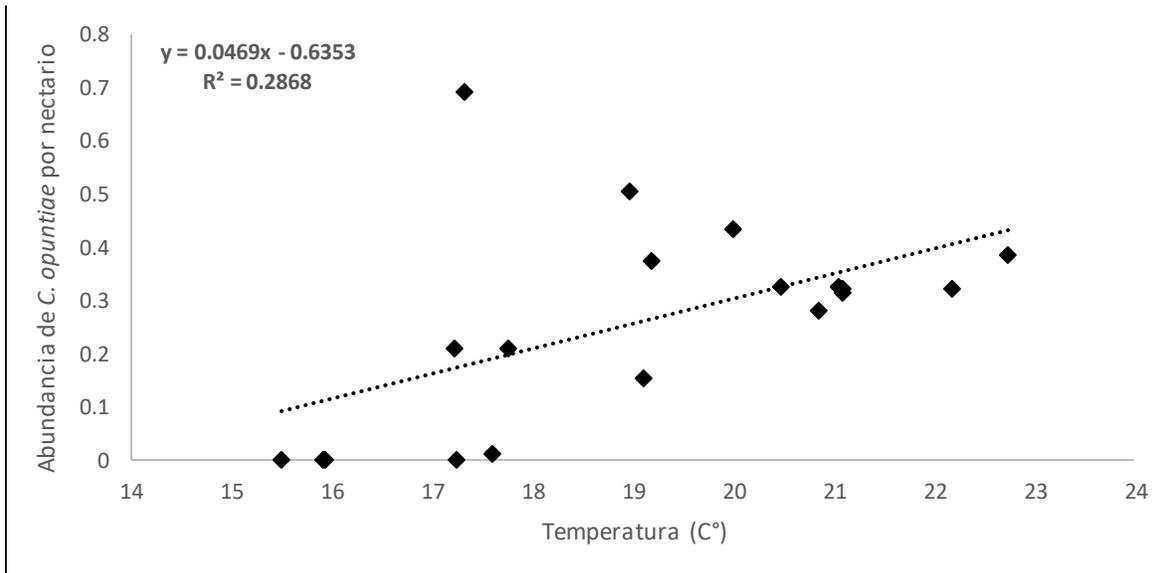


Figura 10. Relación entre la temperatura ambiental y la abundancia total de *C. opuntiae* por nectario extrafloral de *C. imbricata* ($P = 0.018$, $r^2 = 0.2868$).

3.5 Análisis morfo-anatómico de los nectarios extraflorales

Los NEF presentaron células pequeñas, isodiamétricas, con paredes delgadas y orientación anticlinal, pertenecientes a la epidermis del nectario (**Ep**). Se presentaron células en la zona superior de colénquima (**Cl**).

También se identificaron células más grandes, con pared celular delgada, que forman parte del parénquima del nectario (**Pr**). Se encontraron cámaras de néctar (**Cn**) de forma redondeada, de gran tamaño, con pared delgada y bien definida, también se presentaron sustancias ergásticas como “drusas” o cristales de oxalato de calcio (**Ds**), de forma poliédrica estrellada (**Figuras 11 y 12**). Entre las cámaras de néctar, se observaron los haces vasculares (**Hv**) distinguidos por sus células aglomeradas (floema y xilema).

Finalmente, se encontró que el néctar presente en los nectarios extraflorales contiene mucílago, debido a que al aplicársele una tinción “brilliant cresyl blue” se tiñó de color azul (**Figura 13**).

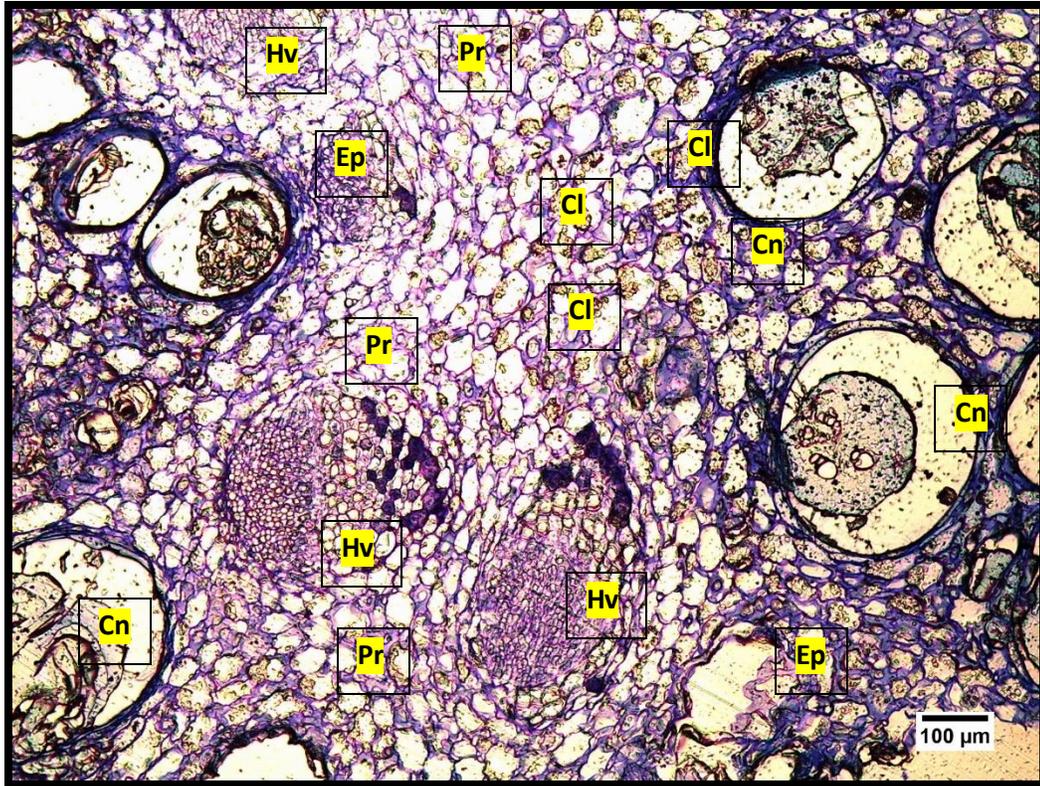


Figura 11. Epidermis del nectario (**Ep**), Cámaras de néctar (**Cn**), Parénquima (**Pr**), Drusas (**Cl**) y Haces vasculares (**Hv**) en un corte transversal del nectario extrafloral de *C. imbricata*.

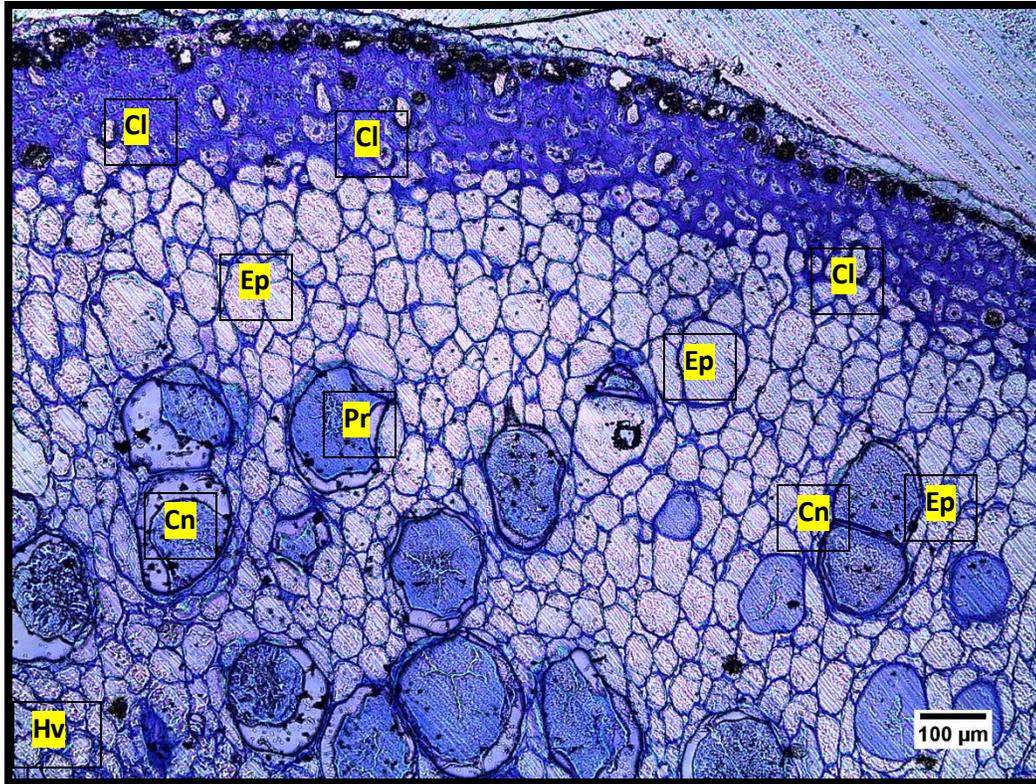


Figura 12. Epidermis del nectario (**Ep**), Cámaras de néctar (**Cn**), Parénquima (**Pr**), Colénquima (**Cl**) y Haces vasculares (**Hv**) en otro corte transversal del nectario extrafloral de *C. imbricata*.

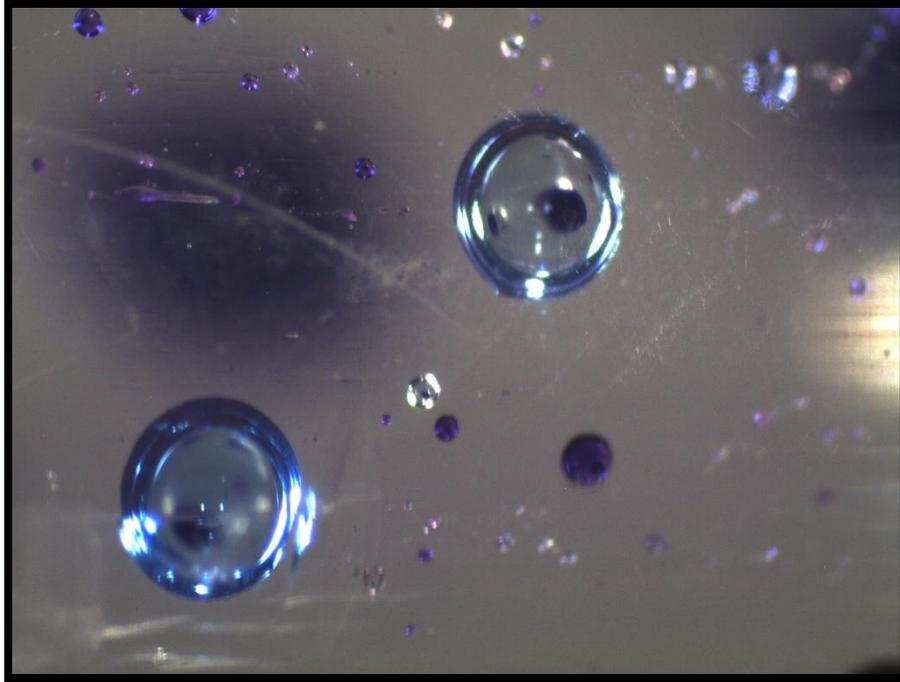


Figura 13. Imagen del néctar presente en los nectarios extraflorales, conteniendo mucílago.

Conforme a las micrografías de los nectarios extraflorales de *Cylindropuntia imbricata* (**Figura 14 A**), durante el inicio de la temporada de lluvias se observaron células epidérmicas turgentes no lignificadas, en la superficie del ápice del nectario extrafloral (**Figura 14 B**).

A mediados de la temporada de lluvias, las células epidérmicas empiezan a contraerse por el proceso de lignificación (**Figura 14 C**). Al final de la temporada de lluvias; los nectarios se mostraron con células epidérmicas contraídas en la parte superior, sin fusionar. Se observaron rastros de ceras, así como lignificación en la parte superior (**Figura 14 D**).

Al final de la temporada de lluvias, se observaron pequeñas estructuras, con forma cilíndrica, con fibras lignificadas, posiblemente espinas modificadas (**Figura**

14 E). Se observaron también cristales de oxalato de calcio (drusas) entre las fibras de las espinas modificadas (**Figura 14 F**).

Al enfocarnos a las espinas modificadas mediante un corte longitudinal se contempla otra espina con proyecciones de las células epidérmicas en forma de pequeñas placas lignificadas (**Figuras 15 A – B**), al igual que se observa claramente cómo es que esta estructura proviene del nectario extrafloral (**Figura 15 C**). De manera similar que en la estructura exterior, la interior contaba con cristales de oxalato de calcio (drusas) (**Figura 15 D**).

Al realizar el análisis estadístico, se encontró que el diámetro mayor de los nectarios extraflorales fue similar entre los periodos inicio (**271.03 $\mu\text{m} \pm 20.06$ E.E.**) y mitad (**266.13 ± 21.50**), pero fue diferente entre éstos y el final de la temporada de lluvias (**175.34 ± 18.53**) (**F = 7.781, P = 0.002**; ver **Tabla 2 en Anexo 2**).

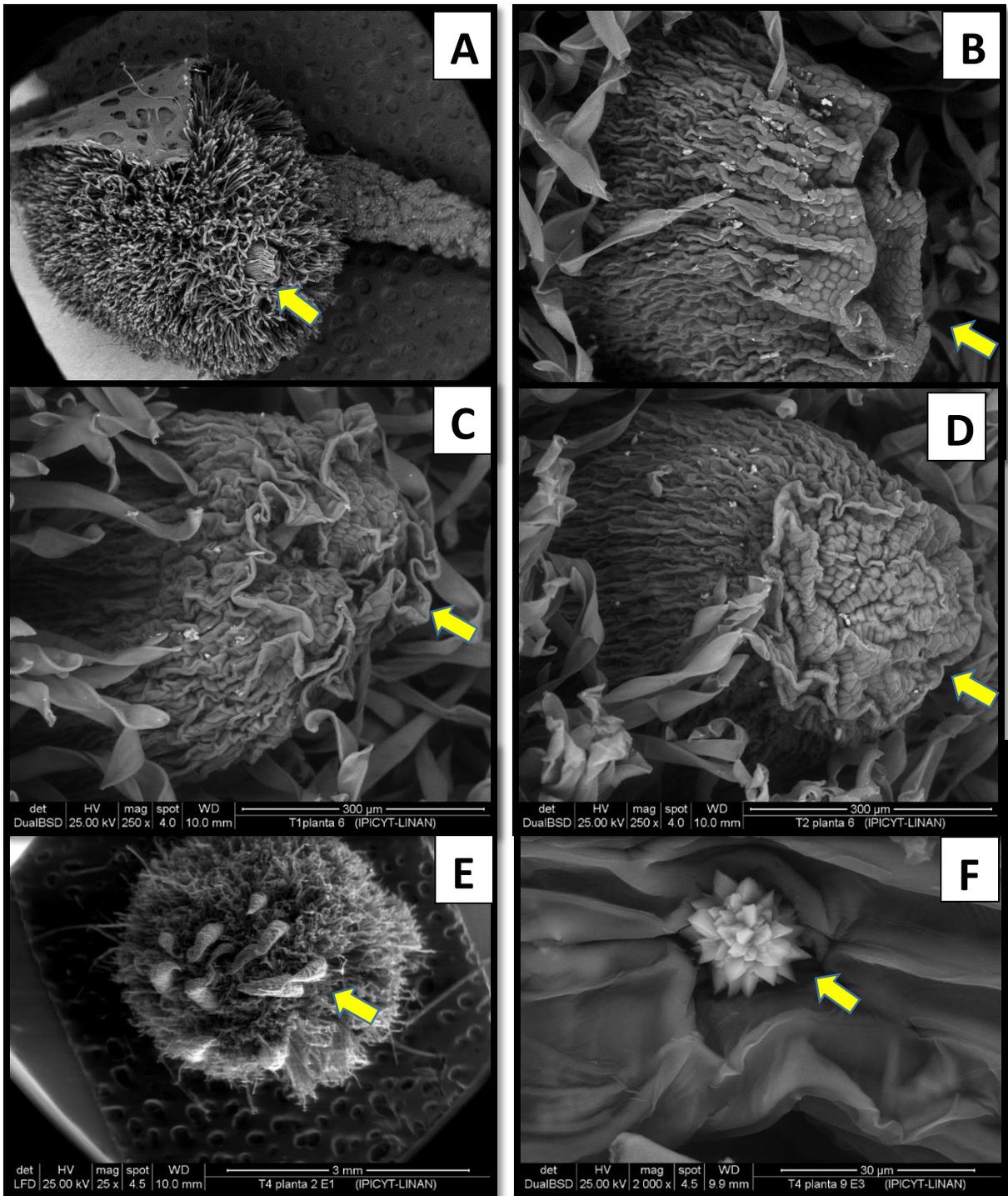


Figura 14. Micrografías del desarrollo de los nectarios extraflorales de *C.*

imbricata en diferentes etapas de la temporada de lluvias.

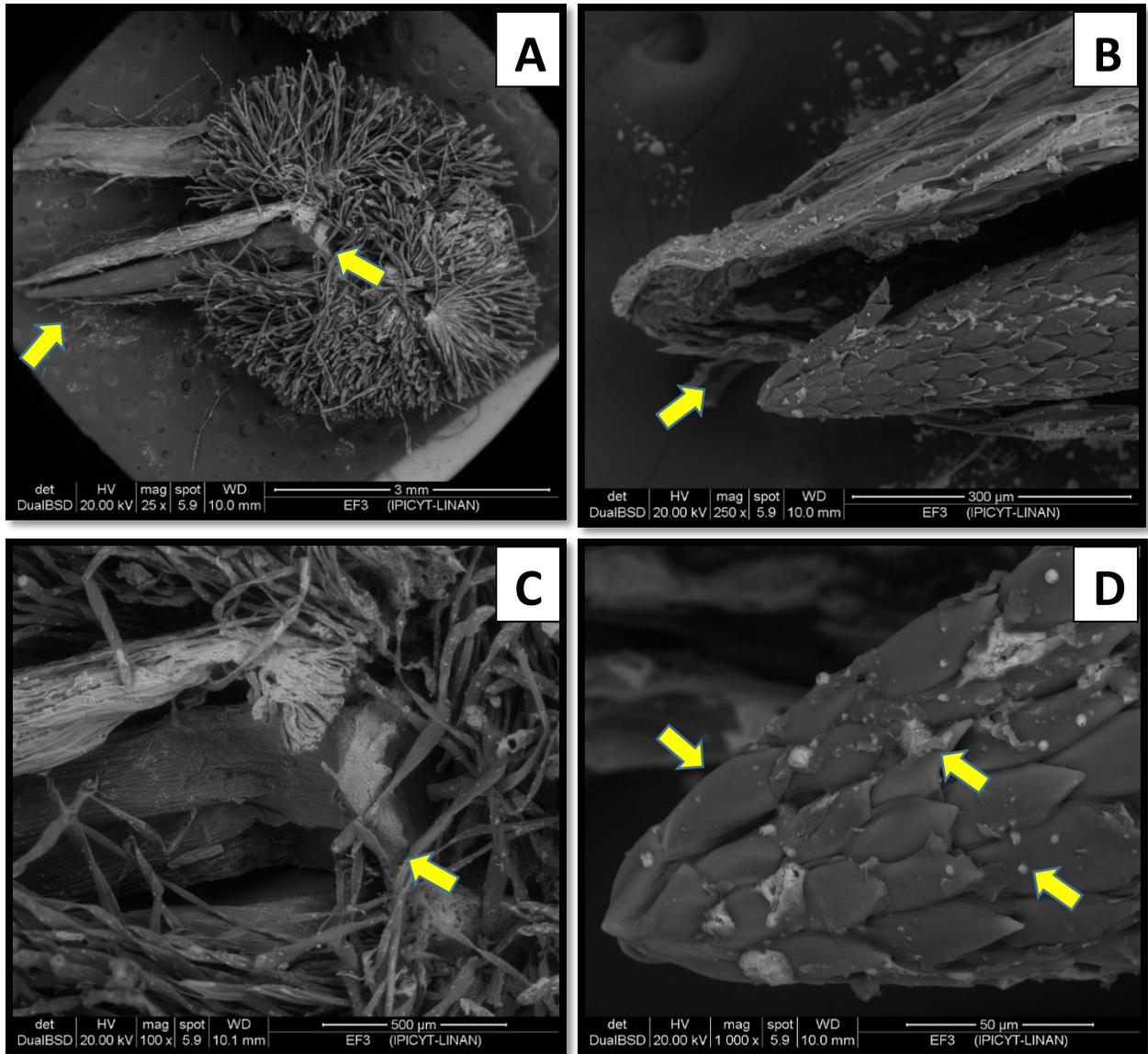


Figura 15. Micrografías del corte longitudinal de las espinas modificadas de los nectarios extraflorales de *C. imbricata* al final de la temporada de lluvias.

4. DISCUSION

La abundancia de hormigas fue mayor durante el periodo nocturno durante toda la temporada de lluvias, por lo cual se cumple la hipótesis de que existen diferencias en la actividad de las hormigas que visitan los nectarios extraflorales durante los periodos diurno y nocturno. Estos resultados son similares a los obtenidos por Dáttilo et al. (2015) quienes encontraron la misma conducta al monitorear los NEF de *Prosopis laevigata*, así como por Luna-De la Torre et al. (2016) quienes encontraron mayor abundancia de hormigas de noche que de día en los NEF de *Ferocactus latispinus*. Una menor actividad diurna de hormigas, podría indicar una estrategia para evitar la alta radiación solar (Luna-De la Torre et al., 2016). Sin embargo, este comportamiento también podría deberse a que las temperaturas nocturnas no son tan elevadas como en el día, o bien, a que en cactáceas existe mayor presión hidrostática durante el período nocturno que en el diurno (Lüttge y Nobel, 1984), lo cual ayudaría a que los NEF produzcan más néctar de noche y ofrezcan así mayor alimento a las hormigas.

La hipótesis de que existen diferencias en la actividad de las hormigas en las diferentes etapas dentro de la época de lluvias no se cumplió, pues la especie de hormiga *L. apiculatum* siempre mostró mayor abundancia que *C. opuntiae*. Esta dominancia estuvo presente durante los tres periodos de la temporada, resultado similar al encontrado por Ávila-Argáez (2013) para la misma especie de estudio pero en época de sequía. Este resultado podría deberse a competencia interespecifica por recursos nutrimentales. En cambio, para *F. latispinus*, otra especie de la familia Cactaceae, se encontraron dos especies diurnas (*Camponotus rubrithorax* y

Pseudomyrmex major) y tres nocturnas (*Camponotus atriceps*, *C. festinatus* y *Crematogaster* sp.) visitando sus NEF (Luna-De la Torre et al., 2016).

Cabe mencionar que la actividad de los NEF de *C. imbricata* está restringida a los artículos o tallos jóvenes, ya que la secreción de néctar se suspende cuando los artículos son mayores (Miller, 2007), situación que también ocurre en *Opuntia* spp. (Oliveira et al., 1999; Ness, 2006). Así, debido a que las ramas jóvenes son producidas durante todo el año (Ávila-Argáez, 2013) y son más susceptibles a ser atacadas por herbívoros (Dáttilo et al., 2015), es probable que *C. imbricata* optimice la secreción de néctar con el fin de asignar defensas para maximizar su adecuación individual.

La presencia de floema y xilema (vascularización) en los NEF de *C. imbricata* indica que éstos dependen de la disponibilidad de agua para estar activos (Ávila-Argáez, 2013). Sin embargo, es probable que durante los días lluviosos las hormigas disminuyan su actividad, ya que en esta investigación se encontró que a mayor humedad relativa del aire menor abundancia de hormigas que visitan los NEF. En cambio, la asociación con la temperatura ambiental fue positiva, es decir que al aumentar la temperatura aumenta la frecuencia de visitas de hormigas. Este comportamiento puede deberse a que la secreción de néctar disminuye a bajas temperaturas (Petanidou y Smets, 1996), o bien, a que el frío adormece a las hormigas, ya que cuando las temperaturas disminuyen las hormigas obreras busca refugio dentro del nido y reanudan sus funciones cuando la temperatura aumenta (Novoa et al., 2005). Un resultado similar se encontró para *Opuntia stricta* en la costa de Veracruz, México (Oliveira et al., 1999). Así, los patrones temporales en el

ecosistema (e.g. descenso de las temperaturas) son de gran relevancia para la interacción planta – hormiga.

Otro resultado interesante es que *C. opuntiae* y *L. apiculatum* nunca co-ocurren en el mismo nectario aunque sí en la misma planta, lo cual se puede interpretar como evidencia de competencia entre las hormigas por los servicios que le proporciona la planta (Bruna *et al.*, 2004; Ness, 2006; Miller, 2007).

Al parecer, este es el primer estudio en el que se documenta el desarrollo morfológico de los NEF de cactus. Al inicio de la temporada de lluvias, los NEF de *Cylindropuntia imbricata* mostraron células epidérmicas hidratadas en la superficie del ápice del nectario extrafloral, pero a mediados de la temporada de lluvias las células epidérmicas empezaron a lignificarse. Al final de la temporada de lluvias, los NEF presentaron células epidérmicas lignificadas en la parte superior, deshidratadas y sin fusionar. Además, se observaron NEF de forma cilíndrica, con fibras lignificadas, las cuales se consideran espinas modificadas. Estos resultados sugieren que los NEF de *C. imbricata* pasan por un proceso de desarrollo, al finalizar la temporada de lluvias los NEF se lignifican y forman espinas. Sin embargo, aunque durante la sequía también se producen artículos nuevos (Ávila-Argáez, 2013), se desconoce si los NEF en esta época se lignifican.

Ganong (1894) observó glándulas en varias especies de opuntioides, describiéndolas como "células no lignificadas y de rico contenido", por lo que probablemente las observó en etapas iniciales de su desarrollo cuando aún no se habían lignificado. El mismo autor reportó que tales glándulas segregan miel a la superficie, refiriéndose a éstas como estructuras sólidas, siendo nombradas como "espinas nectariales". Este es el tipo de NEF que actualmente se sugiere como

“espinas altamente modificadas que son cortas, anchas y sin punta” (Mauseth et al., 2016).

A mayor diámetro y área de los NEF incrementó el número de hormigas forrajeras. Es probable que a mayor diámetro y área del NEF las hormigas tengan mayor facilidad para colectar el néctar porque al final de la temporada de lluvias el número de hormigas fue casi cero. El hecho de que las dimensiones del NEF se vieran disminuidas con el paso del tiempo, indica que estos nectarios se atrofiaron al finalizar la temporada de lluvias. Así, los patrones temporales en el ecosistema (e.g. disminución de las lluvias y descenso de las temperaturas) pueden ser importantes para la interacción planta – hormiga.

5. CONCLUSIONES

Existe una dominancia por parte de *L. apiculatum* como visitante de los nectarios extraflorales de *C. imbricata*, mostrando actividad en el periodo nocturno. Durante el día no se observaron hormigas en los NEF. La abundancia relativa de hormigas forrajeras en los NEF no cambió significativamente entre el inicio y la mitad de la temporada de lluvias, pero sí hubo disminución al final. El desarrollo de los NEF dentro de la temporada de lluvias fue gradual, lignificándose al final para dar como resultado espinas modificadas, coincidiendo este fenómeno con la disminución de abundancia relativa de hormigas.

Tal disminución también se asoció negativamente con las bajas temperaturas y la alta humedad relativa. Así, los patrones temporales de los ecosistemas son tan importantes en las interacciones planta-hormiga que marcan los ritmos de acción en la actividad forrajera, así como en el desarrollo anatómico y morfológico de los

nectarios extraflorales de *C. imbricata*. Este estudio es el primero en evaluar el desarrollo de los NEF de una especie de cactus y en el que se comprueba que los nectarios extraflorales de *C. imbricata* se convierten en espinas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alma AM, Pol RG, Pacheco LF, Vázquez DP. 2015. No defensive role of ants throughout a broad latitudinal and elevational range of a cactus. *Biotropica* 47: 347-354.
- Almeida OJ, Sartori PA, Cota-Sánchez JH. 2012. A macro- and micromorphological survey of floral and extrafloral nectaries in the epiphytic cactus *Rhipsalis teres* (*Cactoideae: Rhipsalideae*) *Flora* 207: 119– 125.
- Aréchiga RM, Rodríguez JL, Orozco-Segovia A, Rojas-Aréchiga M. 2004. Light effect on seed germination of four mammillaria species from the Tehuacán-Cuicatlán valley, central México. *The Southwestern Naturalist*, 49(1):11-17
- Ávila-Argáez MK. 2013. Relevancia funcional de los nectarios extraflorales de *Cylindropuntia imbricata* (Griffth) (*Cactaceae*). Maestría en Ciencias Ambientales, IPICYT. San Luis Potosí, SLP, México.
- Barrios D, Flores J, González-Torres LR, and Palmarola A. 2015. The role of mucilage in the germination of *Leptocereus scopulophilus* (*Cactaceae*) seeds from Pan de Matanzas, Cuba. *Botany* 93: 1–5
- Bernardello L, Rivera L, Galetto L. 2007. Nectar secretion pattern, removal effects, and breeding system of *Ligaria cuneifolia* (*Loranthaceae*) *Canadian Journal of Botany*, 1996, 74(12): 1996-2001
- Blom PE y Clark WH. 1980. Observations of ants (*Hymenoptera: Formicidae*) visiting extrafloral nectaries of the barrel cactus, *Ferocactus gracilis* Gates (*Cactaceae*), in Baja California, Mexico. *South-western Naturalist* 25: 181-195.

- Bruna EM, Lapola DM, Vasconcelos HL. 2004. Interspecific variation in the defensive responses of obligate plant-ants: experimental tests and consequences for herbivory. *Oecologia*, 138: 558-565.
- Buren WF, Allen GE, Whitcomb WH, Lennartz, FE, Williams RN. 1974. Zoogeography of the imported fire ants. *Journal of the New York Entomological Society*: 113-124.
- Chamberlain SA, Holland JN. 2008. Density-mediated, context-dependent consumer-resource interactions between ants and extrafloral nectar plants. *Ecology* 89: 1364-1374.
- Dáttilo W, Aguirre A, Flores-Flores RV, Fagundes R, Lange D, Garcia-Chavez J, Rico-Gray KV. 2015. Secretory activity of extrafloral nectaries shaping multitrophic ant-plant-herbivore interactions in an arid environment. *Journal of Arid Environments* 114: 104-109.
- Fahn, A. 1979.
- Falcão JCF, Dáttilo W. 2014. Temporal variation in extrafloral nectar secretion in different ontogenic stages of the fruits of *Alibertia verrucosa* S. Moore (*Rubiaceae*) in a neotropical savanna. *Journal of Plant Interactions*, Pages 137-142.
- Ganong WF. 1894. Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Biologie der Kakteen. *Flora* 79: 49–86.
- Guzmán-Mendoza R, Zavala-Hurtado JA, Castaño-Meneses G, y León-Cortés JL. 2014. Comparación de la mirmecofauna en un gradiente de reforestación en bosques templados del centro occidente de México. *Madera y Bosques* 20.1: 71-83.

- Heil M, Fiala B, Baumann y Linsenmair KE. 2000. Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional Ecology* 14: 749–757.
- Lloyd FE. 1908. Extra-floral nectaries in the cacti. *Plant World* 11: 138–140.
- Luna-De la Torre P, Castro-Leal L, Contreras-Cerón R, Castillo-Meza AL. 2016. Actividad de formicidos en *Ferocactus latispinus* (Cactaceae) en una zona semiárida del centro de México. *Entomología Mexicana* 3: 530–536.
- Lüttge U, Nobel PS. 1984. Day-night variations in malate concentration, osmotic pressure, and hydrostatic pressure in *Cereus validus*. *Plant Physiology* 75: 804–807.
- MacKay WP, y Mackay E. 2002. The ants of New Mexico :(*Hymenoptera: Formicidae*). Lewiston, NY, USA: Edwin Mellen Press.
- Mauseth JD. 1982. Development and ultrastructure of extrafloral nectarines in *Ancistrocactus scheeri* (Cactaceae). *Botanical Gazette* 143: 273-277.
- Mauseth JD, Rebmann JP, Machado SR. 2016. Extrafloral nectaries in cacti. *Cactus and Succulent Journal* 88: 156-171.
- Miller TEX. 2007. Does having multiple partners weaken the benefits of facultative mutualism? A test with cacti and cactus-tending ants. *Oikos* 116: 500-512.
- Ness JH. 2006. A mutualism's indirect costs: the most aggressive plant bodyguards also deter pollinators. *Oikos* 113: 506-514.
- Nicolson SW, Thornburg RW. 2007. “Nectar chemistry” Nectarines and nectar. Springer Netherlands: 215-264.
- Novoa S, Redolfi I, y Ceroni A. 2005. Patrón de actividad diario de la hormiga *Camponotus* sp. en los botones florales del cactus *Neoraimondia*

- arequipensis* subsp. *roseiflora* (Werdermann & Backeberg) Ostolaza. *Ecología Aplicada* 4.1-2: 77-81.
- Oliveira PS, Rico-Gray V, Díaz-Castelazo C, Guevara-Castillo C. 1999. Interaction between ants, extrafloral nectaries and insect herbivores in neotropical coastal sand dunes: herbivore deterrence by visiting ants increases fruit set *Opuntia stricta* (Cactaceae) *Ecology* 13: 623-631.
- Petanidou T, Smets E. 1996. Does temperature stress induce nectar secretion in Mediterranean plants? *New Phytologist* 133: 513–518.
- Pickett CH, Clark WD. 1979. The function of extrafloral nectaries in *Opuntia acanthocarpa* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 66: 618-625.
- Ramos-Elorduy J, Villegas RJ y Pino MJM. 1988. The efficiency of the insect *Musca domestica* L. in recycling organic wastes as a source of protein. *Biodeterioration* 7: 805-810.
- Redolfi D, De Cindio F, Gentile O, Grew P. 2003. Community Networks: Rules of behavior and social structure special issue: ICTs and community networking. *The Information Society* 19.5: 395-406.
- Romero-Cerecero O, Reyes-Morales H, 2009. Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos, Mexico. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (5), 380 – 388.
- Ruzin, SE, 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Vol. 198. New York: Oxford University Press.

Schupp EW, Feener DH. 1991. Phylogeny, lifeform, and habitat dependence of ant-defended plants in a panamanian forest. *Ant-plant interactions* Oxford Univ. pp. 175-97.

Ward P, Davis L, Trager J. y Longino J. 2002. Antweb [<http://www.antweb.org>].

7. ANEXOS

Anexo 1. Tratamiento posterior a la extracción

Los NEF se procesaron de acuerdo a Ruzin (1999), como se describe a continuación:

Fijación del tejido

- a. Glutaraldehído al 3%, por un período de 48 horas en refrigeración a 4°C.
- b. Se realizaron 3 lavados con buffer de fosfato a pH 7.4 con intervalos de 30 minutos, para eliminar el glutaraldehído.

Deshidratación del tejido

Se realizó una serie etanólica con intervalos de 24 horas con concentraciones de 50, 70 y 90%, y finalmente en alcohol absoluto.

Nota: la muestra se puede dejar en esta solución por tiempo indefinido hasta el momento de su inclusión en resina.

Inclusión del tejido en resina

Los NEF fueron incluidas en resina epóxica (Techonovt H7100). El tejido queda incluido en un medio sólido, listo para los cortes con el microtomo. La técnica se divide en tres pasos, pre infiltración, infiltración y polimerización de las muestras, como se describe a continuación:

Pre-infiltración

Se realizó una serie graduada de etanol y resina de la siguiente manera:

- a. Solución de etanol al 70% y 30% de resina epoxi (Techonovit), se le agregó a los NEF y se dejaron en vacío por un período de 24 horas y se decantó la solución.
- b. En solución de etanol al 50% y 50% de resina epoxi (Techonovit) por 24 horas en vacío.
- c. En solución de etanol al 30% y 70% de resina epoxi (Techonovit) por 24 horas en vacío.

d. En solución de 7100 Technovit al 100% por 12 horas en vacío. 32 Infiltración

Se preparó la resina con un endurecedor en la cual se agregaron 100 mL de 7100 Technovit, que contenía el catalizador XCL y se agregó el endurecedor I, después se agregó el endurecedor II el cual acelera el endurecimiento debido a que contiene un derivado de ácido barbitúrico. Dichos compuestos fueron mezclados por un minuto. Después de la infiltración, los nectarios extraflorales fueron colocados en cápsulas transparentes y se cubrieron las muestras con la solución de infiltración.

Polimerización

Las cápsulas con los NEF infiltrados se dejaron reposar por 24 horas en vacío a temperatura ambiente, con el fin de asegurarse la infiltración de la solución y el endurecimiento de las muestras. Transcurrido el tiempo los NEF estuvieron listos para su orientación.

Orientación y corte de las muestras

Las cápsulas con los NEF incluidos ya endurecidas fueron pegadas a pequeños cubos de madera de 3 cm de largo por 1 cm de ancho, de tal manera que quedaron perpendiculares hacia la navaja de tungsteno del microtomo Leica RM 2125RT con el que se realizaron los cortes seriados. Los cortes se tiñeron con tinción azul de toluidina en solución acuosa al 0.06%. El análisis de los cortes se realizó en un microscopio óptico Leica DM 2000.

Anexo 2. Análisis estadísticos

Tabla 1. ANOVA de medidas repetidas de la abundancia relativa de hormigas forrajeras totales por nectario extrafloral de *C. imbricata* a lo largo de la temporada y por

Categoría	Medias		Grupos		
	LS				
14/08/2016	1.768	A			
11/09/2016	1.653	A			
17/07/2016	1.591	A			
02/10/2016	1.514	A			
24/07/2016	1.399	A	B		
25/09/2016	1.253	A	B	C	
07/08/2016	1.230	A	B	C	
04/09/2016	1.182	A	B	C	D
21/08/2016	1.146	A	B	C	D
09/10/2016	1.132	A	B	C	D
28/08/2016	1.092	A	B	C	D
31/07/2016	1.037	A	B	C	D
18/09/2016	0.995	A	B	C	D
16/10/2016	0.824	A	B	C	D
23/10/2016	0.285		B	C	D
30/10/2016	0.172			C	D
13/11/2016	0.116			C	D
27/11/2016	0.060				D
20/11/2016	0.052				D

Pruebas de los efectos intrasujetos:

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Repetición	18	57.629	3.202	11.056	< 0.0001
Error	162	46.911	0.290		

Repetition / Bonferroni / Analysis of the differences between the categories with a confidence interval of 95%:

Contrast	Difference	Standardized difference	Critical value	Pr > Diff	Significant
Inicio vs Final	1.110	9.180	2.417	< 0.0001	Yes
Inicio vs Mitad	0.080	0.528	2.417	0.598	No
Mitad vs Final	1.030	9.133	2.417	< 0.0001	Yes

Modified significance level:

0.017

Category	LS means	Groups
Inicio	1.362	A
Mitad	1.281	A
Final	0.252	B

Tabla 2. ANOVA de medidas repetidas de la abundancia relativa de las especies de hormigas por nectario extrafloral de *C. imbricata*.

Test for within subject effects:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Especies	1	19.526	19.526	94.932	0.0001
Error	359	73.841	0.206		

Especies / Bonferroni / Analysis of the differences between the categories with a confidence interval of 95%:

Contrast	Difference	Standardized difference	Critical value	Pr > Diff	Significant
Especies-L_apiculatum vs Especies-C_opuntiae	0.453	7.323	1.966	0.0001	Yes
Modified significance level:			0.05		
Category	LS means	Groups			
Especies-L_apiculatum	0.714	A			
Especies-C_opuntiae	0.260	B			

Tabla 3. ANOVA de medidas repetidas del diámetro mayor de los nectarios extraflorales en los diferentes periodos de la temporada de lluvias.

Test for within subject effects:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F	Adj. Pr>F G-G	Adj. Pr>F H-F
Periodo	2	52268.095	26134.047	7.781	0.002	0.003	0.002
Error	16	53739.473	3358.717				

Repetition / Bonferroni / Analysis of the differences between the categories with a confidence interval of 95%:

Contrast	Difference	Standardized difference	Critical value	Pr > Diff	Significant
Mitad vs Final	95.687	3.370	2.574	0.003	Yes
Mitad vs Inicio	4.897	0.166	2.574	0.869	No
Inicio vs Final	90.790	3.323	2.574	0.003	Yes
Modified significance level:			0.017		
Category	LS means	Groups			
Mitad	271.030	A			
Inicio	266.133	A			
Final	175.344	B			

Tabla 4. Correlaciones de las variables ambientales.

valores-p:

Variables	HR%	AR	Minor	PreciP	Hormigas	Area	Perim.	Major
HR%	0	0.082	0.160	0.000	0.000	0.023	0.005	0.001
AR	0.082	0	0.009	0.077	0.085	0.334	0.584	0.014
Minor	0.160	0.009	0	0.212	0.095	< 0.0001	0.000	0.014
PreciP	< 0.0001	0.077	0.212	0	0.001	0.033	0.018	0.001
Hormigas	< 0.0001	0.085	0.095	0.001	0	0.007	0.002	0.000
Area	0.023	0.334	< 0.0001	0.033	0.007	0	< 0.0001	< 0.0001
Perim.	0.005	0.584	0.000	0.018	0.002	< 0.0001	0	< 0.0001
Major	0.001	0.014	0.014	0.001	0.000	< 0.0001	< 0.0001	0

Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación $\alpha=0.05$

Coefficientes de determinación (R^2):

Variables	TotalHor	HorNoche	NocheL_api	L_api	C_op	NocheC_op	Temp_°C	HorDia	DiaL_api	DiaC_op	HR_%
TotalHor	1	1.000	0.926	0.925	0.632	0.621	0.491	0.396	0.333	0.097	0.717
HorNoche	1.000	1	0.924	0.923	0.634	0.625	0.488	0.376	0.329	0.088	0.720
NocheL_api	0.926	0.924	1	1.000	0.360	0.350	0.477	0.397	0.373	0.084	0.671
L_api	0.925	0.923	1.000	1	0.358	0.349	0.467	0.400	0.389	0.080	0.665
C_op	0.632	0.634	0.360	0.358	1	0.996	0.287	0.192	0.095	0.082	0.449
NocheC_op	0.621	0.625	0.350	0.349	0.996	1	0.261	0.157	0.103	0.052	0.442
Temp_°C	0.491	0.488	0.477	0.467	0.287	0.261	1	0.248	0.006	0.278	0.318
HorDia	0.396	0.376	0.397	0.400	0.192	0.157	0.248	1	0.277	0.613	0.195
DiaL_api	0.333	0.329	0.373	0.389	0.095	0.103	0.006	0.277	1	0.014	0.124
DiaC_op	0.097	0.088	0.084	0.080	0.082	0.052	0.278	0.613	0.014	1	0.067
HR_%	0.717	0.720	0.671	0.665	0.449	0.442	0.318	0.195	0.124	0.067	1