



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

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**“Relevancia funcional de los nectarios extraflorales de
Cylindropuntia imbricata (Griffth) (Cactaceae)”**

Tesis que presenta

Melissa Karina Avila Argáez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

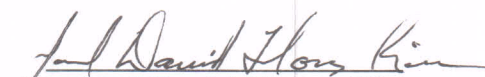
Director de la Tesis:

Dr. Joel David Flores Rivas




Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Relevancia funcional de los nectarios extraflorales de *Cylindropuntia imbricata* (Griffth) (Cactaceae)**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Melissa Karina Avila Argáez** y aprobada el **once de julio del dos mil trece** 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


Dra. Laura Yáñez Espinosa
Miembro del Comité Tutorial


Dr. Ernesto Iván Badano
Miembro del Comité Tutorial

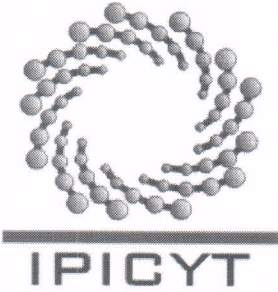


Créditos Institucionales

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, la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-264010).

Este proyecto fue financiado mediante el proyecto CB-2010-01-156205 cuyo responsable técnico es el Dr. Joel David Flores Rivas.



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 001 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 11 días del mes de julio del año 2013, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Laura Yañez Espinosa	Presidente	UASLP
Dr. Ernesto Iván Badano	Secretario	IPICYT
Dr. Joel David Flores Rivas	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Melissa Karina Avila Argáez

sobre la Tesis intitulada:

Relevancia funcional de los nectarios extraflorales de *Cylindropuntia imbricata* (Griffith) (Cactaceae)

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Joel David Flores Rivas

El Jurado, después de deliberar, determinó

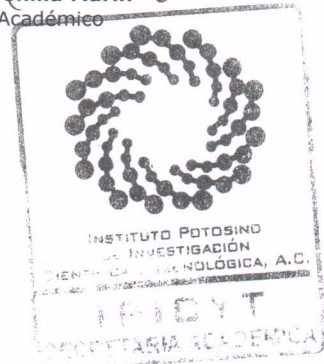
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 10:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 11 días del mes de julio de 2013.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



ACTA DE EXAMEN DE GRADO

DEDICATORIAS

Este trabajo me gustaría dedicárselo a tres grandes hombres que el año pasado concluyeron su participación en esta historia que es la vida:

Para mi abuelo: MARCOS AVILA CANTE

Y dos grandes que tuve la fortuna de conocerlos:

ING. JAVIER DEL CASTILLO GONZALEZ

DON GUILLERMO MARTINEZ RODRIGUEZ

A mis **padres** y **toda familia** ahora y siempre he contado con su apoyo incondicional, son mi fuente de inspiración.

A mi perrita Mezcal, mi inseparable compañera desde que nos encontramos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante la maestría (CONACYT-264010).

Al proyecto CB-2010-01-156205 cuyo responsable técnico es el Dr. Joel David Flores Rivas, por financiar la presente tesis.

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 Dr. Joel Flores por sus asesorías, apoyo y la paciencia brindada a mi persona para concluir el presente proyecto.

A la Dra. Laura Yáñez por enseñarme el fascinante mundo de la anatomía de mis nectarios, por todos sus consejos, regaños y sus palabras de apoyo.

Al Dr. Ernesto I. Badano gracias por aguantarme otros 2 años, por todo el apoyo que siempre me has brindado y por supuesto por la retroalimentación que le diste a la tesis.

Al técnico M. en C. Juan Pablo Rodas por todo el apoyo brindado para el trabajo en campo y laboratorio, por su amistad, sus buenas vibras y por permitirme conocer a su hermosa familia.

A la Dra. Claudia González Salvatierra, por ayudarme, aconsejarme y por su disposición a siempre escuchar mis quejas, y por supuesto porque encontré una gran amiga en ti.

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

A mis hermanitos de cubo: Jorge Carlos Ríos Hurtado, gracias por ser tan hermosa persona y ser humano, por ser mi mejor amigo por estos 2 años, por aguantarme y por quererme, gracias por haber siempre estado conmigo, te quiero mucho. Rigoberto Santoyo, por ser el grinch más adorable que conozco fuiste el último en llegar al cubículo pero sin ti las cosas no hubieran sido tan divertidas, te quiero mucho. Y por último pero no menos importante a María Guadalupe Maldonado por ser tan bruja, gracias por esas buenas pláticas y consejos y por tu humor tan peculiar, por soportarme y escucharme. Muchas gracias los quiero mucho.

A mis hermanos los ecólogos: a Maestro Carlos Renato Ramos y su hermosa familia, Maestro Manuel Reyes, Maestro Ulises Rodríguez, Maestro Omar Samour, Maestra Malu Cadena, Maestra Arizbe Ponce y a la Maestra Evelyn García, gracias por su amistad, apoyo, consejos, recomendaciones, y por todos esos buenos momentos que hicieron mi estancia en San Luís Potosí más amena.

A mis compañeros y amigos ingenieros: Areli Bejarano, Omar Daniel Centeno, Tere García Emilia Ríos por ser tan extraordinarias personas, apoyarme, regañarme o dedicarme esas palabras que en su momento necesitaba escuchar.

A Magaly García Salinas y a toda su familia: tía Lupita, a los dos Daniel, Javier, a tía Cecilia y toda su hermosa familia, gracias por compartir su casa y su vida conmigo fueron parte de mi vida y me llevo todo lo bueno y aprendizaje de esa casa y de cada uno de ustedes

A toda la familia Martínez, en especial a mi hermano Guillermo, que gracias a él engorde de comer tanta pizza en la Santísima, y por supuesto también al equipo del restaurante por compartir tantos buenos momentos.

A mis grandes amigos de antaño: Josué Sánchez Armas, Guillermo Armas, Ricardo Mendoza, Nidia López, Víctor Madrigal, Jannette Santiestiban y Carlos Zapata muchas gracias por tantos años de amistad, a pesar de que muchos ya tenemos caminos muy diferentes, siempre han compartido conmigo buena vibra, consejos, y por su puesto esas llamadas interminables semanales que obviamente enriqueció más a telcel.

A mis compañeras y amigas de vivienda: María de las Nieves Barranco, Luz Sánchez y Paty, gran aventura y muy divertido, las quiero.

A todas aquellas personas que tuvieron la paciencia y la inquietud de escuchar mis preocupaciones sobre la tesis y proporcionaron buenos consejos, o por lo menos ayudaron a disipar mi ansiedad, por estar en esta etapa de mi vida, y queda como evidencia este escrito, por el apoyo que cada uno me proporcionó para concluir esta aventura potosina.

CONTENIDO

	Pág.
Constancia de aprobación de tesis.....	II
Créditos institucionales.....	III
Acta de examen.....	IV
Dedicatorias.....	V
Agradecimientos.....	VI
Índice.....	IX
Lista de Figuras	X
Abreviaturas.....	XI
Glosario.....	XII
Resumen.....	XIV
Abstract.....	XV

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
2.1 Sitio de estudio.....	4
2.2 Descripción y distribución de la especie de estudio.....	4
2.3 Diseño experimental.....	5
2.3.1. Extracción de los NEF.....	5
2.3.2. Análisis anatómico de los NEF.....	6
2.3.3. Captura de las especies de hormigas asociadas a los NEF de <i>C. imbricata</i>	6
2.3.4. Efecto del riego y la temperatura en la abundancia de especies de hormigas asociadas a los NEF de <i>C.</i> <i>imbricata</i>	7 9
2.4 Análisis estadísticos.....	9
3.RESULTADOS.....	10
3.1 Descripción de la anatomía de los NEF.....	10
3.2 Hormigas forrajeras de los NEF de <i>C. imbricata</i>	14
3.3 Abundancia de hormigas.....	14
3.3.1 Potencial hídrico del suelo bajo las plantas de <i>C.</i> <i>imbricata</i>	16
3.3.2 Potencial hídrico del suelo en relación con la abundancia de hormigas.....	17
3.3.3 Efecto de la temperatura del tallo de <i>C. imbricata</i> en la abundancia de hormigas.....	19
3.3.4 Efecto de la temperatura ambiental en la abundancia de hormigas.....	20
4. DISCUSIÓN.....	22
5. CONCLUSIONES.....	25
6. REFERENCIAS.....	26
7. ANEXOS.....	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Cylindropuntia imbricata</i> del sitio de estudio.	5
Figura 2. Principales componentes de la anatomía de un nectario.	6
Figura 3. Aspirador bucal utilizado para atrapar hormigas.	7
Figura 4. Sistema de riego por goteo establecido en las plantas de <i>C. imbricata</i> .	8
Figura 5. Nectarios extraflorales de <i>C. imbricata</i>	11
Figura 6. Anatomía de los NEF de <i>C. imbricata</i>	12
Figura 7. Parénquima del subnectario del NEF de <i>C. imbricata</i>	13
Figura 8. Abundancia de (A) las tres especies de hormigas y (B) de <i>L. apiculatum</i> , asociadas a los NEF de <i>C. imbricata</i> en plantas con y sin riego, con respecto al tiempo (días) en que se realizaron los censos.	15
Figura 9. Potencial hídrico del suelo (ψ_s) en las plantas de <i>C. imbricata</i> con y sin riego	16
Figura 10. Relación entre (A) el potencial hídrico del suelo (ψ_s) bajo las plantas de <i>C. imbricata</i> con y sin riego y la actividad forrajera de las tres especies de hormigas en los NEF y (B) el potencial hídrico del suelo (ψ_s) y la actividad de <i>L. apiculatum</i> en los NEF.	18
Figura 11. Relación entre (A) la temperatura ambiental mínima y la actividad de las tres especies de hormigas visitantes de los NEF de <i>C. imbricata</i> y (B) la temperatura ambiental mínima y la actividad de <i>L. apiculatum</i> .	21

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
a.m.	ante merídiem
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
H	Haz vascular
hrs	Horas
IPICyT	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
<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
UASLP	Universidad Autónoma de San Luís Potosí
v	Vacuola
x	Xilema
WP4	

GLOSARIO

Anticlinal: Generalmente se refiere a la orientación de la pared celular o del plano de la división celular; perpendicular a la superficie más próxima.

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.

Isodiamétrico: De forma regular, con todos los diámetros igualmente largos.

Nectario: Estructura glandular multicelular que secreta líquido que contiene sustancias orgánicas, inclusive azúcar. Aparece en flores (nectario floral) y en partes vegetativas de la planta (nectario extrafloral).

Parénquima: Tejido compuesto de células parenquimáticas.

Receptáculo: La parte del pedúnculo floral que lleva los órganos florales.

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)

Vacuola: Cavidad dentro del citoplasma llena de un fluido acuoso, el jugo celular, y limitada por una unidad de membrana, el tonoplasto. Vinculada a la incorporación de agua durante la germinación, el crecimiento y la mantención de agua en la célula. También contiene enzimas hidrolíticas y tiene función lítica.

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 estudiar la anatomía de los nectarios extraflorales (NEF) de la Cactaceae *Cylindropuntia imbricata*, así como evaluar la influencia de la disponibilidad de agua y de la temperatura en la abundancia de hormigas visitantes de sus NEF. El sitio de estudio se encuentra en la localidad San Juanico el Chico, municipio de San Luis Potosí, S.L.P. Se encontró que los NEF de *C. imbricata* son vascularizados, es decir, que presentan floema y xilema. *Liometopum apiculatum*, *Crematogaster opuntiae* y *Pseudomyrmex pallidus* fueron las especies de hormigas asociadas con los NEF de *C. imbricata*, siendo *Liometopum apiculatum* la especie más abundante. La disponibilidad del agua y la temperatura fueron variables importantes como reguladores de la interacción entre los NEF de *C. imbricata* y las hormigas. El riego aumentó la abundancia de hormigas visitantes, en particular la de *L. apiculatum*. Así mismo, la temperatura mínima ambiental afectó de manera marginal, disminuyendo la abundancia de hormigas visitantes de los NEF de *C. imbricata*.

Palabras clave: nectarios extraflorales, *Cylindropuntia imbricata*, Cactaceae.

ABSTRACT

The aim of this research is study the anatomy of the extra-floral nectaries (EFN's) of the cactus *Cylindropuntia imbricata*, as well as evaluate the influence of environmental factors such as water and the temperature of the plant in the abundance of ants visiting EFN. The study site is San Juanico el Chico, San Luis Potosí, S.L.P. It was found that the NEF's of *C. imbricata* are vascularized, which means that they have phloem and xylem. *Liometopum apiculatum*, *Crematogaster opuntiae* and *Pseudomyrmex pallidus* were the ant species associated with NEF's of *C. imbricata*, and *Liometopum apiculatum* was the most abundant species. Water availability and temperature were important variables as regulators of the interaction between the NEF's of *C. imbricata* and ants. Irrigation increased the abundance of visitor ants, particularly that of *L. apiculatum*. Likewise, the minimum environmental temperature marginally affected the abundance, decreasing the abundance of visitor ants from the NEF's of *C. imbricata*.

Keywords: extrafloral nectaries, *Cylindropuntia imbricata*, Cactaceae.

1. INTRODUCCIÓN

Los nectarios son tejidos especializados que secretan una solución acuosa de monosacáridos, aminoácidos y proteínas, entre otros compuestos, comúnmente conocida como néctar (Fahn, 1979a; Pacini *et al.*, 2003; Bernardello, 2007). Dependiendo de su ubicación en la planta, los nectarios pueden ser clasificados como florales (NF) o extraflorales (NEF). Los nectarios florales están presentes en casi todas las angiospermas y se localizan en el interior de sus flores (Caspary, 1848; Bonnier, 1879; Beardsell *et al.*, 1989; Freitas *et al.*, 2001). Los nectarios extraflorales, por otra parte, están presentes algunas gimnospermas y angiospermas y se caracterizan por estar ubicados en órganos vegetativos como pecíolos de las hojas, estípulas de tallos jóvenes y la periferia de estructuras reproductivas (Caspary, 1848; Bonnier, 1879; Rico-Gray, 1989; Díaz-Castelazo *et al.*, 2004).

La relevancia funcional tanto de los nectarios florales y extraflorales radica en ofrecer recursos alimenticios para atraer animales hacia la planta, lo cual redundaría en algún tipo de beneficio para esta última. Esta interacción mutualista ha sido frecuentemente reportada entre hormigas y plantas con NEF, habiéndose propuesto que las hormigas proporcionan una defensa agresiva contra insectos herbívoros, e incluso algunos mamíferos, mientras forrajean el néctar (Bentley, 1977; Vesprini *et al.*, 1999; Cuautle & Rico-Gray, 2003). Inclusive, en algunas especies pertenecientes a las familias Fabaceae y Cactaceae, la relación planta-hormiga puede llegar a ser tan estrecha que las hormigas generan sus colonias sobre la misma planta o debajo de ella (Schultz & McGlynn, 2000).

En términos anatómicos, los nectarios presentan una epidermis que recubre el parénquima del nectario, que es el tejido productor de néctar, debajo del cual se encuentra el parénquima del subnectario que se conecta con los haces vasculares (floema y xilema) de la planta (Nicolson *et al.*, 2010; Marazzi *et al.*, 2013). Esta asociación con haces vasculares es llamada vascularización y es muy frecuente en los nectarios florales, pero no en los extraflorales (Fahn, 1979 a,b). Los NEF vascularizados tienen la ventaja de tener flujo constante de los recursos, por lo que pueden producir néctar a pesar de que la planta enfrente periodos de sequía (Ruffner & Clark, 1986; Nerd & Neuman, 2004; Delgado *et al.*, 2011). Por el contrario, los NEF no vascularizados deshidratan sus células para producir néctar, lo que podría implicar pérdida de agua (Mauseth, 1982).

Algunas especies con NEF vascularizados producen más néctar durante la estación lluviosa, por lo que hay mayor abundancia de hormigas que en la estación de sequía (Ruffner & Clark, 1986; Petanidou & Smets, 1996, Búrquez & Corbet, 1998; Nerd & Neuman, 2004; Díaz-Castelazo *et al.*, 2004). Además, la producción y regulación de flujo del néctar disminuye al bajar las temperaturas, por lo que la abundancia de hormigas visitantes de los NEF también disminuye (Jakobsen & Kristjansson, 1994; Novoa *et al.*, 2005; Jofré *et al.*, 2012). Por lo tanto, se esperaría que los NEF asociados a xilema y floema tuviesen mayores rendimientos de néctar que ofrecer a las hormigas en condiciones ambientales óptimas tales como época de lluvias y temperaturas altas.

Son escasos los estudios anatómicos de los NEF, por ejemplo para la familia Cactaceae únicamente se conoce que *Opuntia stricta* tienen NEF vascularizados (Díaz-Castelazo & Rico-Gray, 2005) y *Ancistrocactus scheeri*

posee NEF no vascularizados (Mauseth, 1982). En la cactácea *Cylindropuntia imbricata* se ha observado la interacción entre los NEF con diversas especies de hormigas (Miller 2007), sin embargo se desconoce tanto la conformación anatómica de los NEF como los factores ambientales que influyen en el mutualismo cactus-hormigas.

El presente trabajo tiene como objetivos estudiar la anatomía de los NEF, así como la influencia de la disponibilidad de agua y de la temperatura en la abundancia de hormigas visitantes de los NEF de *Cylindropuntia imbricata*. Específicamente, se pretende: (1) Obtener información de la conformación anatómica de los NEF de *C. imbricata* con y sin riego, (2) Caracterizar la comunidad de hormigas asociadas a los NEF de *C. imbricata*, (3) Determinar si el riego, la temperatura de la planta y la temperatura ambiental influyen sobre la abundancia de las especies de hormigas visitantes de los NEF de *C. imbricata*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sitio de estudio

Este estudio se llevó a cabo en una población de *Cylindropuntia imbricata* en el estado de San Luis Potosí, ubicada en la localidad de San Juanico el Chico al noroeste del municipio de San Luis Potosí. Las coordenadas geográficas son de 100° 59' 48.3" longitud oeste, 22°14' 07.5" latitud norte y altitud de 1871 msnm. La vegetación es de tipo matorral xerófilo secundario.

2.2. Descripción y distribución de la especie de estudio

Cylindropuntia imbricata var. *cardenche* (Griffith) es una especie perteneciente a la familia Cactaceae con amplia distribución geográfica en el centro y noreste de México (Bravos-Hollis, 1978), así como el oeste de los Estados Unidos (Anderson, 2001). Se caracteriza por tener un crecimiento arbustivo que va desde 1.5 a 2.5 m de altura, el tallo tiene un diámetro de 6 a 10 cm de, de color oscuro; ramificación abierta (**Figura 1a**), sus artículos son largos y cilíndricos, aréolas ovadas de 5 a 7 mm de largo, espinas blanco pardusco de 2.5 cm de largo, (**Figura 1b**). Flores de color púrpura a rojo (**Figura 1c**). Fruto de 3 a 3.5 cm de diámetro, amarillento, casi liso; permanece adherido al tallo por algún tiempo (Bravos-Hollis, 1978). De acuerdo con estudios previos esta especie tiene NEF que secretan néctar, y se encuentra en estructuras vegetativas jóvenes y reproductivas (Oliveira *et al.*, 1999, Ness *et al.* 2006).

2.3 Diseño experimental

El trabajo de campo se realizó durante 20 semanas iniciando en el mes de Agosto y finalizando en Diciembre del 2012.

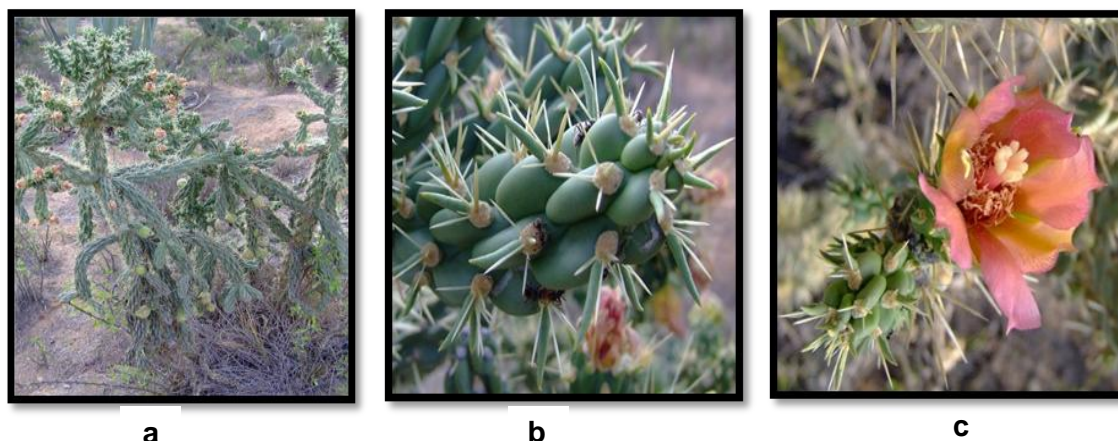


Figura 1. *Cylindropuntia imbricata* en el sitio de estudio.

2.3.1 Extracción de los NEF

La extracción de los NEF de *C. imbricata* se realizó con un micro-sacabocados, con el cual se retiró un nectario extrafloral por tallo en cinco plantas. Los NEF se depositaron en tubos Eppendorf de 2 ml con glutaraldehído al 3% y se guardaron en una hielera a 3 – 4°C) para transportarlas al laboratorio de ecología del IPICYT para su posterior tratamiento. En los sitios de extracción de los nectarios se les colocó silicón libre de formaldehído, de manera que se sellara el orificio sin causarle mayor daño a la planta.

Los NEF se procesaron de acuerdo a Ruzin (1999). En el Apéndice 1 de la sección de Anexos se describen de manera detallada los tratamientos aplicados a los NEF.

2.3.2. Análisis anatómico de los NEF

Se seleccionaron cinco plantas con riego y cinco sin riego, a las cuales se les extrajeron nectarios extraflorales después de cuatro semanas del tratamiento de riego. La extracción de los nectarios se realizó en artículos jóvenes independientes a los marcados para realizar los censos de las hormigas. Adicionalmente, en cinco artículos de cada una de las 20 plantas se tomaron las medidas de ancho y largo, se contó el número de areolas de la superficie y se eligieron tres areolas para contar el número de NEF.

Para describir la anatomía general del NEF se siguió la propuesta de Nicolson *et al.* (2010), tomando en cuenta los componentes (**Figura 2**).

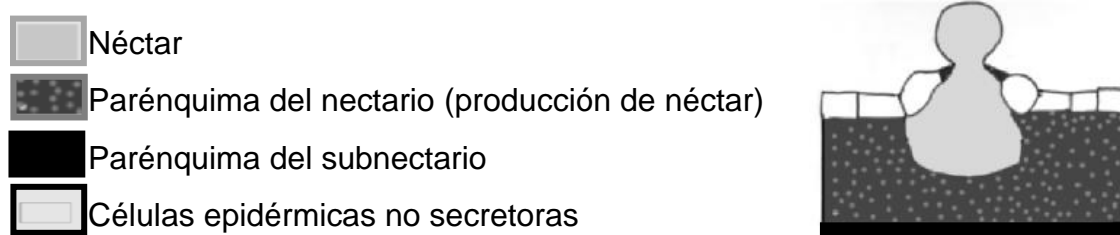


Figura 2. Principales componentes de la anatomía de un nectario (Nicolson *et al.*, 2010).

2.3.3 Captura de las especies de hormigas asociadas a los NEF de *C. imbricata*

Se realizaron capturas y censos una semana previa a la implementación del tratamiento de riego en las plantas de *C. imbricata*, con el fin de conocer las especies de hormigas asociadas a los NEF. Este trabajo se hizo cada dos semanas durante un período de 20 semanas. Para capturar las hormigas se usó un aspirador bucal (**Figura 3**), posteriormente las hormigas se colocaron

en tubos Falcon (14 ml) con etanol al 70% para su conservación e identificación.

Las capturas se hicieron en 20 plantas de 8 a.m. a 2 p.m., por un período de 30 segundos cada hora. Los ejemplares se separaron para determinar la subfamilia a las que pertenecían, utilizando las guías de Mackay & Mackay (1989), el libro de Triplehorn & Johnson (2005) y la base de datos de AntWeb (Ward *et al.*, 2002).



Figura 3. Aspirador bucal utilizado para atrapar hormigas.

2.3.4 Efecto del riego y de la temperatura en la abundancia de especies de hormigas asociadas a los NEF de *C. imbricata*

Se aplicó un tratamiento de riego mediante un sistema por goteo con 1.5 L de agua semanalmente, utilizando botellas de plástico perforadas en la parte inferior con una aguja, las cuales fueron colocadas a un costado de las plantas **(Figura 4)**. Se tuvieron 10 plantas con riego y 10 sin riego.

Se realizaron censos de las hormigas visitantes de NEF cada hora, por un período de un minuto en cinco tallos jóvenes, en cada planta en el horario de 8 a.m. a 2 p.m. Los censos fueron realizados cada dos semanas durante las 20 semanas. También se hicieron mediciones de potencial hídrico del suelo bajo todas las plantas, utilizando un medidor de potenciales hídricos WP4.

Por otra parte, en plantas con y sin riego ($n = 7$) se midió la temperatura del tallo principal de la planta, utilizando un sensor de temperatura conectado a un fluorómetro portátil MINI-PAM (Walz, Alemania) en el horario de 11:30 a.m. a 12:00 p.m. Además, se tomaron los datos de temperatura mínima, media y máxima de la base de datos climatológicos correspondientes a los meses de Septiembre a Noviembre del año 2012, de la estación meteorológica (WMO ID: 76539) ubicada en el Aeropuerto Internacional Ponciano Arriaga del estado de San Luis Potosí, con las coordenadas $22^{\circ}10'$ latitud N, $100^{\circ} 56'$ longitud O; para relacionar las variables abióticas con la abundancia de las hormigas.



Figura 4. Sistema de riego por goteo establecido en la plantas de *C. imbricata*.

2.4. Análisis estadísticos

Para evaluar el efecto del riego en la abundancia de hormigas visitantes de los NEF de *C. imbricata*, se realizó un análisis de varianza factorial de medidas repetidas, en las que el factor fue el tratamiento (dos niveles: con riego y sin riego) y la variable de respuesta fue la abundancia de hormigas en las plantas.

Para detectar diferencias en potenciales hídricos del suelo entre tratamientos se realizó un análisis de varianza de dos vías, siendo los factores el riego (con y sin) y el tiempo (5 niveles o fechas de medición). Posteriormente se realizaron comparaciones múltiples.

Con el fin de evaluar el efecto de la temperatura en la abundancia de hormigas, se realizaron análisis de regresión entre la temperatura del tallo y la abundancia tanto del total de hormigas forrajeras de néctar como de la especie de hormiga más abundante (*L. apiculatum*). También se realizaron análisis de regresión entre las temperaturas ambientales mínima, promedio y máxima registradas en las fechas que se realizaron las mediciones y la abundancia tanto total de hormigas como de *L. apiculatum*.

Todos los análisis se realizaron con el programa Statistica (Statistical Analysis System 9.1).

3. RESULTADOS

3.1 Descripción anatómica de los NEF

Epidermis del nectario: Las células son de tamaño pequeño (ep), de forma isodiamétrica, con paredes delgadas y orientación anticlinal (**Figura 5 C-D**). En la zona superior el colénquima, con células de paredes engrosadas (cl), zona morada en la **Figura 5C**.

Parénquima del nectario: sus células son de mayor tamaño que las células epidérmicas, con pared celular delgada, de formas isodiamétricas en la zona central. Entre estas células se pueden observar vacuolas donde son almacenados cristales de oxalato de calcio de forma poliédrica estrellada, que de hecho se forman en el interior de la vacuola (**Figura 5F**).

También se pueden observar cámaras de acopio de néctar de forma redondeada, de gran tamaño, con pared delgada y bien definida, estas estructuras son abundantes en el nectario (**Figura 5C-E**). En la **Figura 5D** se observa una cámara repleta de néctar y en su contraparte en la **Figura 5E** la cámara está vacía de manera que se puede ver el fondo.

Se hallaron células meristemáticas con los núcleos grandes y definidos (**Figura 6B**), formando células secretoras, la división ocurre en dirección anticlinal (**Figura 6C**). La elongación de estas células forma estructuras alargadas de forma de dedo, en sus paredes se observan adelgazamientos (**Figura 6A**), dichas células podrían estar implicadas en la actividad secretora de néctar.

Parénquima del subnectario (sp): localizado por debajo del parénquima del nectario, se distingue por sus células alargadas y la presencia de los haces vasculares (floema y xilema), como se puede observar en la **Figura 7 A-D**.

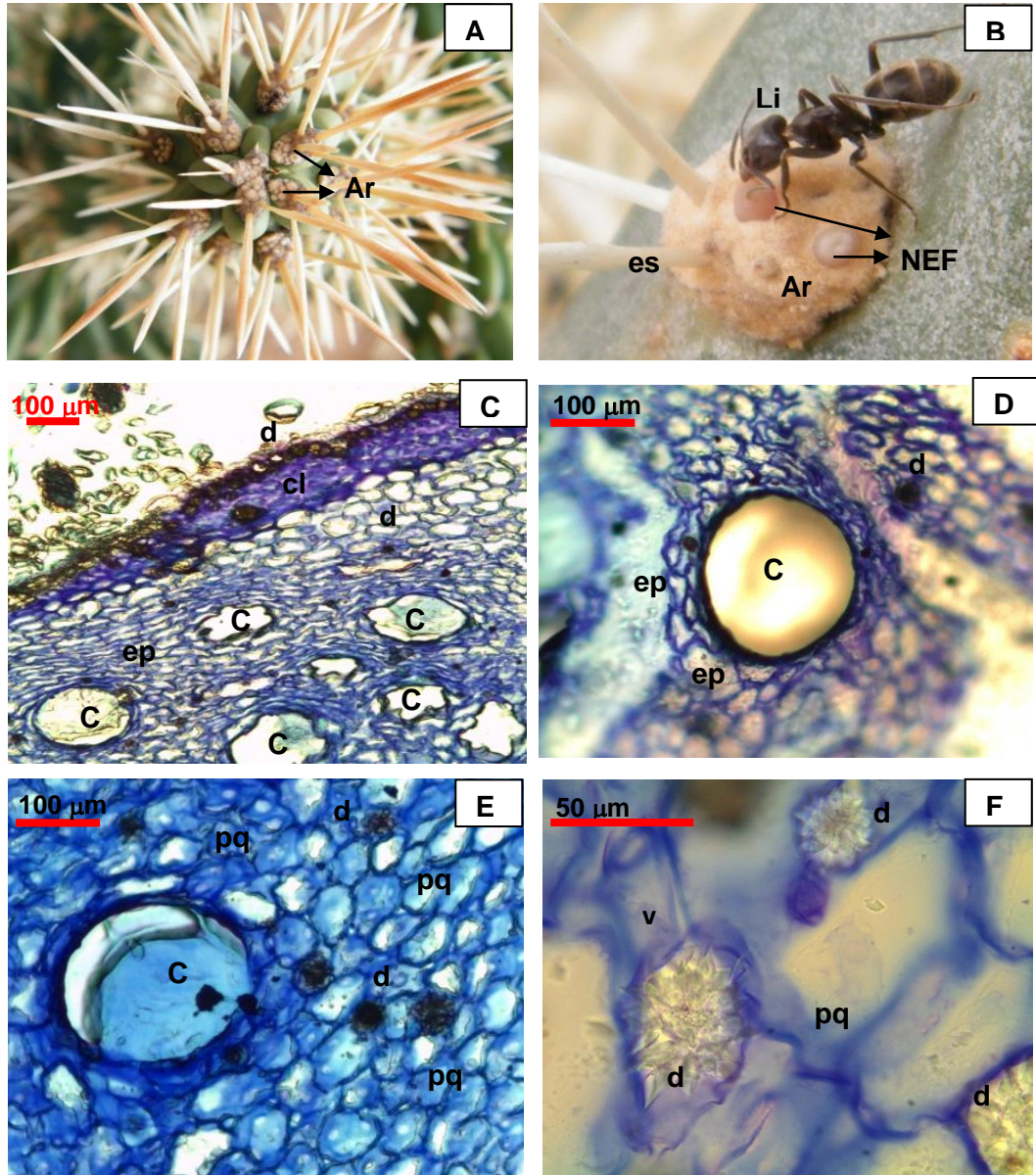


Figura 5. Nectarios extraflorales de *C. imbricata*. Distribución de aréolas en *C. imbricata* (vista superior) donde se ubican los NEF (A). Macro de la hormiga de la especie *L. apiculatum* (Li) visitando los NEF (en areola) (B). Cámara de acopio de néctar (C), células epidérmicas (ep), colénquima (cl), drusas (d), espinas (es), parénquima del nectario (pn), vacuola (v). Aumento: C= 10x, D y F=20x, F=100x. Cortes longitudinales teñidos con azul de toluidina (C-D).

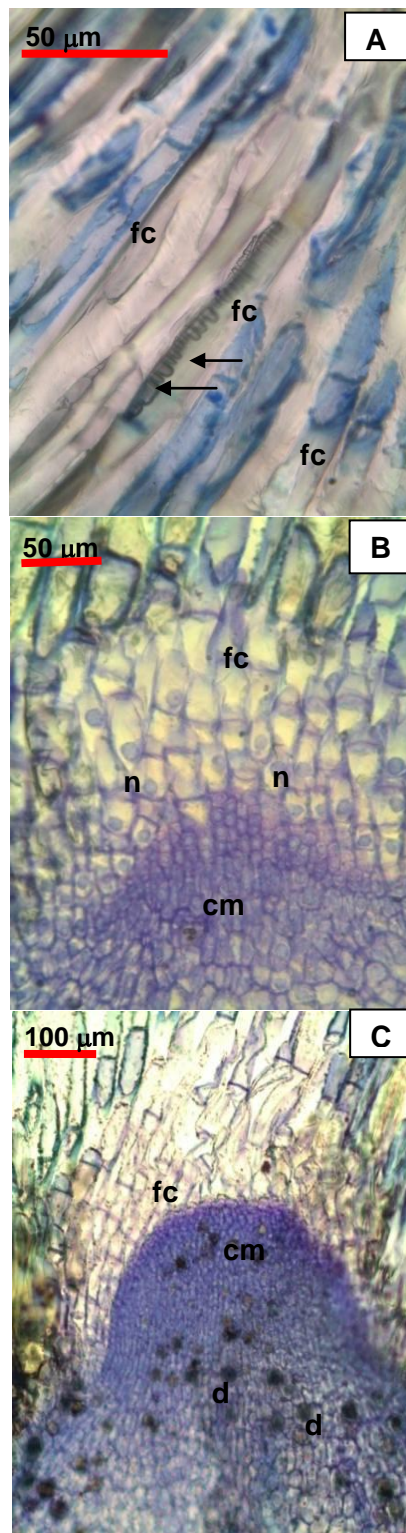


Figura 6. Anatomía de los NEF de *C. imbricata* (Cortes transversales). A-F Azul de toluidina. Células meristemáticas (cm), drusas (d), células secretoras (cs) y adelgazamientos de la pared (fecha negra), n= núcleo. Aumento: A=100x, B=40x, C=20x.

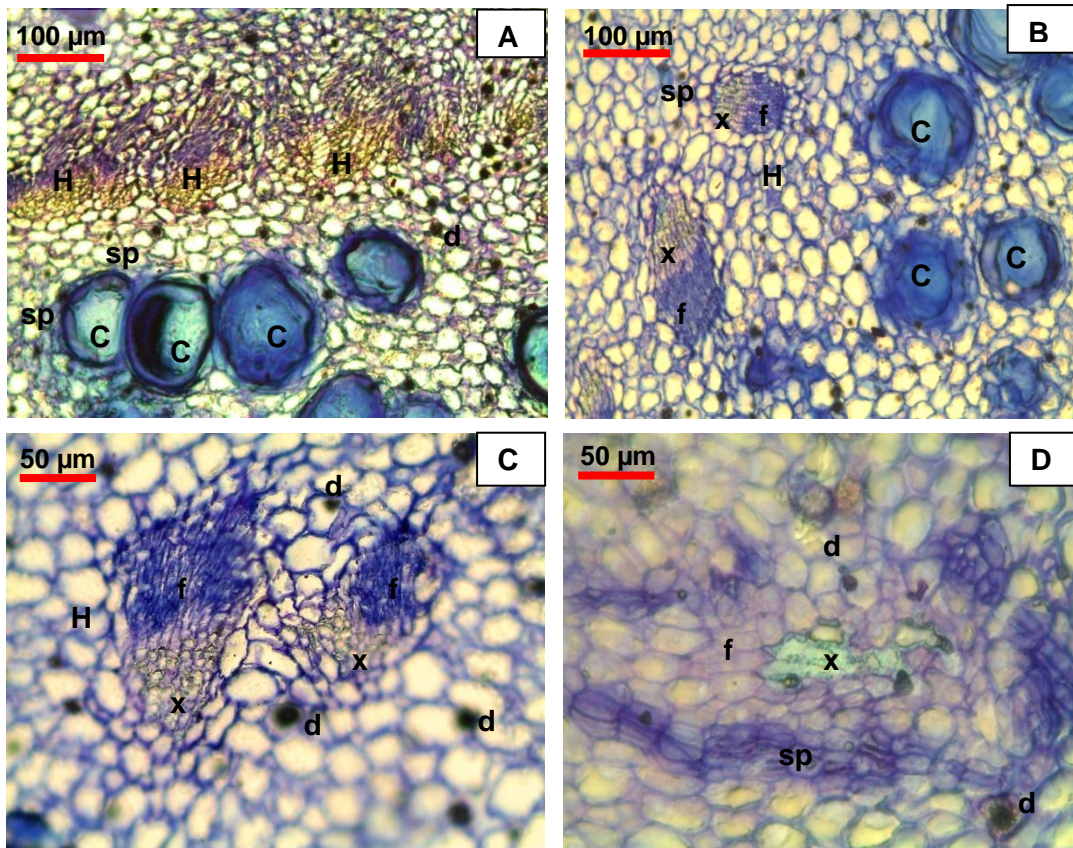


Figura 7. Parénquima del subnectario del NEF de *C. imbricata*. d= drusas, cámaras de néctar (c), floema (f), haz vascular (h), parénquima del subnectario (sp) y xilema (x). A-C cortes longitudinales y D= corte transversal. Aumento: A-B= 20x y C-D=40x

3.2 Hormigas forrajeras de los NEF de *C. imbricata*

Se encontraron tres especies de hormigas asociadas con los nectarios extraflorales de *C. imbricata*. Tales especies pertenecen a tres subfamilias: Dolichoderinae (*Liometopum apiculatum*), Myrmicinae (*Crematogaster opuntiae*) y Pseudomyrmecinae (*Pseudomyrmex pallidus*). No se observó ocurrencia de *L. apiculatum* y *C. opuntiae* en las mismas plantas, por otra parte *L. apiculatum* y *P. pallidus* si coincidieron en la misma planta pero nunca existió una interacción entre estas dos especies.

3.3. Abundancia de hormigas

La abundancia de estas tres fue mayor en las plantas con riego que sin riego ($F = 4.7945$, $P < 0.0001$; **Figura 8A**). Un resultado similar se encontró para *Liometopum apiculatum*, que fue la especie más abundante de las tres ($F = 3.0112$, $P = 0.0023$; **Figura 8B**), esto puede deberse porque 60% de las plantas estaban ocupadas por esta especie (sus nidos se encontraban debajo de las plantas); el 40% restante de las plantas estaban ocupadas por *C. opuntiae*.

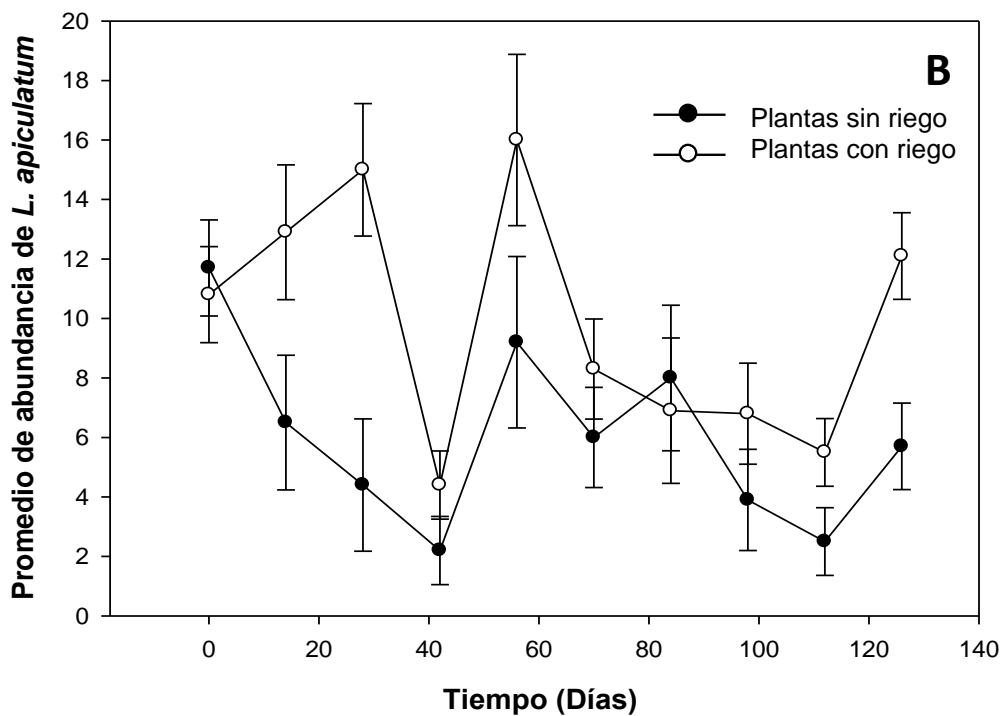
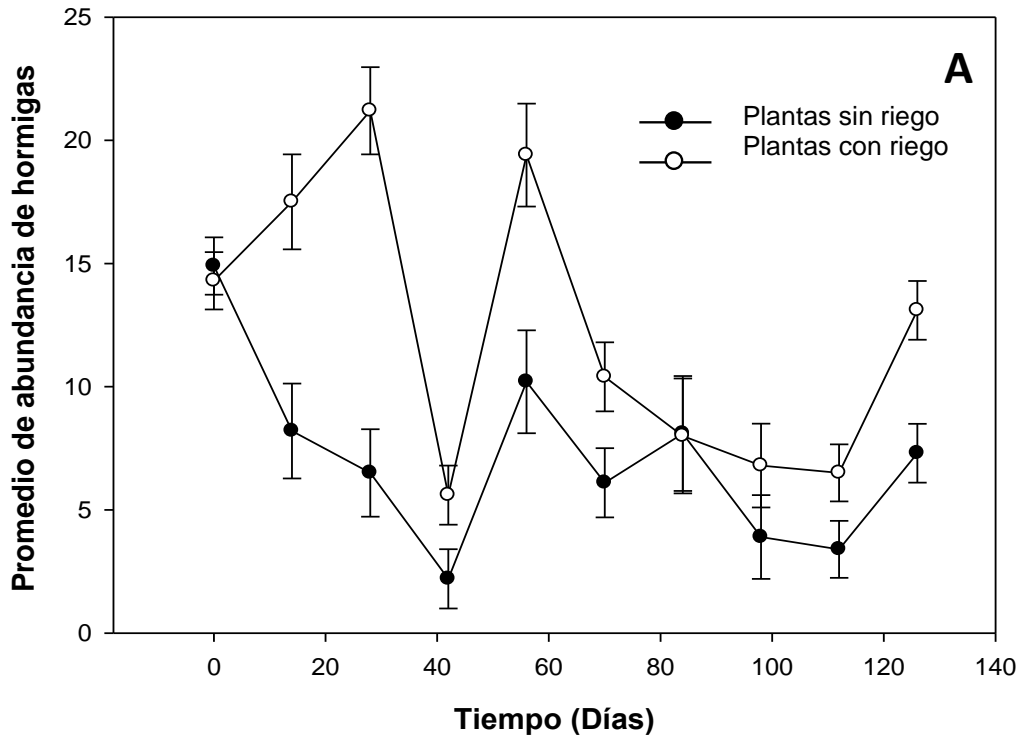


Figura 8. Abundancia de (A) las tres especies de hormigas y (B) de *L. apiculatum*, asociadas a los NEF de *C. imbricata* en plantas con y sin riego, con respecto al tiempo (días) en que se realizaron los censos. (A): $F = 4.7945$, $P < 0.0001$; (B): $F = 3.0112$, $P = 0.0023$. Las barras verticales indican el error estándar.

3.3.1. Potencial hídrico del suelo bajo las plantas de *C. imbricata*

El potencial hídrico del suelo (ψ) en plantas con riego fue significativamente menos negativo en comparación con el encontrado en las plantas sin riego ($F=8.99$; $P < 0.01$; **Figura 9**).

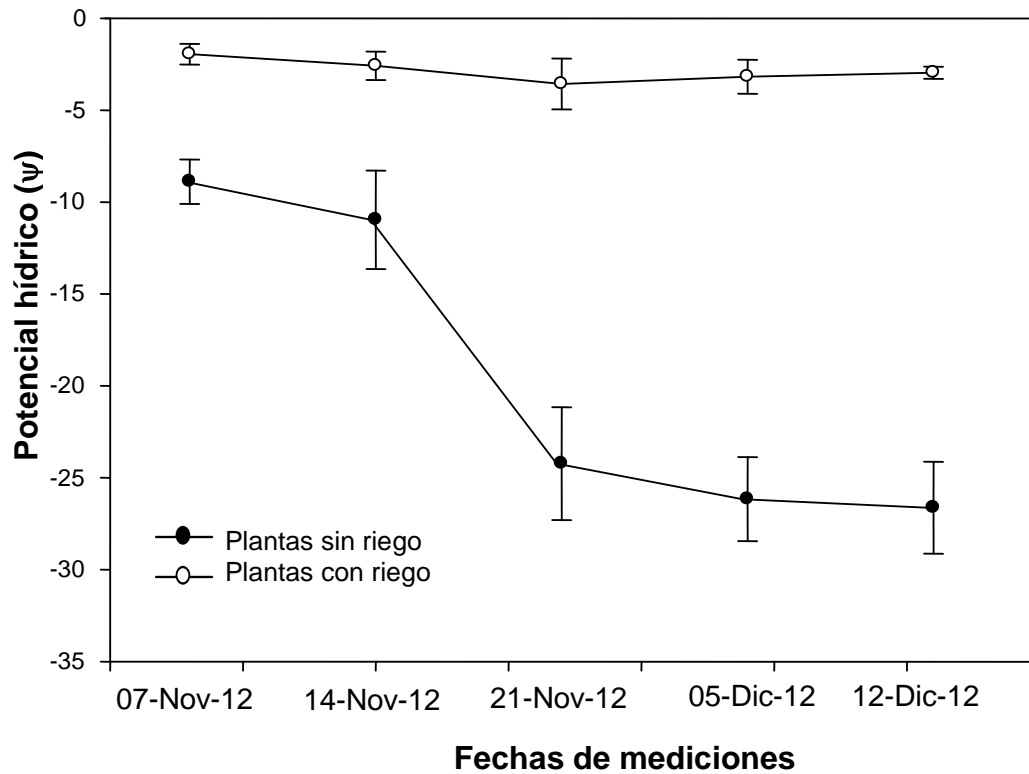


Figura 9. Potencial hídrico del suelo (ψ s) en las plantas de *C. imbricata* con y sin riego ($F= 8.99$, $P < 0.01$). Las barras verticales indican el error estándar.

3.3.2 Potencial hídrico del suelo en relación con la abundancia de hormigas

Se encontró una asociación positiva entre la abundancia de hormigas y el potencial hídrico del suelo ($F=1.10$, $P=0.37$; **Figura 10A**); es decir, a mayor humedad del suelo mayor abundancia de hormigas aunque la proporción de variación explicada por la regresión es baja ($r^2=0.27$). Un resultado similar se encontró entre la abundancia de *L. apiculatum* y el potencial hídrico del suelo ($F=6.57$, $P=0.03$; **Figura 10B**), pero la proporción de variación explicada por la regresión es mayor en este caso ($r^2=0.45$).

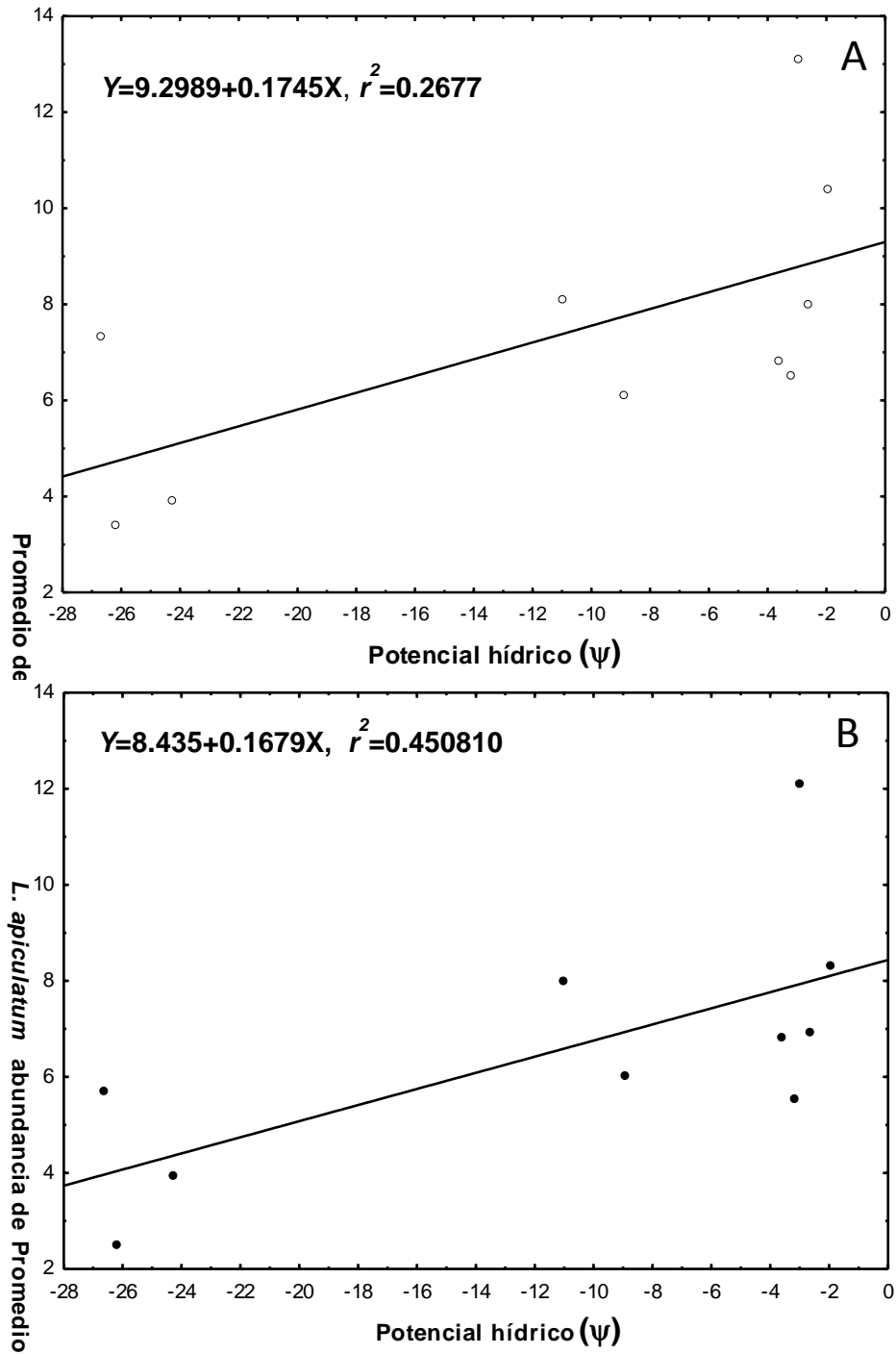


Figura 10. Relación entre (A) el potencial hídrico del suelo (ψ s) bajo las plantas de *C. imbricata* con y sin riego y la actividad forrajera de las tres especies de hormigas en los NEF y (B) el potencial hídrico del suelo (ψ s) y la actividad de *L. apiculatum* en los NEF.

3.3.3 Efecto de la temperatura del tallo de *C. imbricata* en la abundancia de hormigas

Se encontró una asociación positiva entre la temperatura de los tallos y la abundancia de las tres especies de hormigas ($F=4.12$, $P<0.001$), es decir a mayor temperatura del tallo mayor abundancia de hormigas, aunque la proporción de variación explicada por la regresión es casi nula ($r^2=0.026$). Para *L. apiculatum* no se encontró asociación significativa entre la temperatura de los tallos y su abundancia ($F= 0.23$, $P>0.05$).

3.3.4 Efecto de la temperatura ambiental en la abundancia de hormigas

Se encontró una asociación lineal positiva entre la temperatura ambiental mínima y el promedio de la abundancia de las tres especies de hormigas ($F=5.581$, $P=0.031$; **Figura 11A**), aunque la proporción de variación explicada por la regresión es baja ($r^2=0.26$). De la misma manera, se observó una asociación lineal positiva entre la temperatura mínima y el promedio de la abundancia de *L. apiculatum* ($F= 3.75$, $P=0.071$; **Figura 11B**), también con un valor bajo de la proporción de la variación explicada por la regresión ($r^2=0.19$).

No se encontró relación entre la temperatura media y el promedio de la abundancia de las tres especies de hormigas ($F=0.26$, $P=0.62$; $r^2= 0.016$), entre la temperatura media y la abundancia de *L. apiculatum* ($F=0.28$, $P=0.063$, $r^2=0.017$), entre la temperatura máxima y el promedio de abundancia de tres especies de hormigas visitantes de los nectarios de *C. imbricata* ($F=1.18$, $P=0.29$, $r^2=0.069$), ni entre la temperatura máxima y el promedio de abundancia de *L. apiculatum* ($F=0.73$, $P=0.41$, $r^2=0.019$).

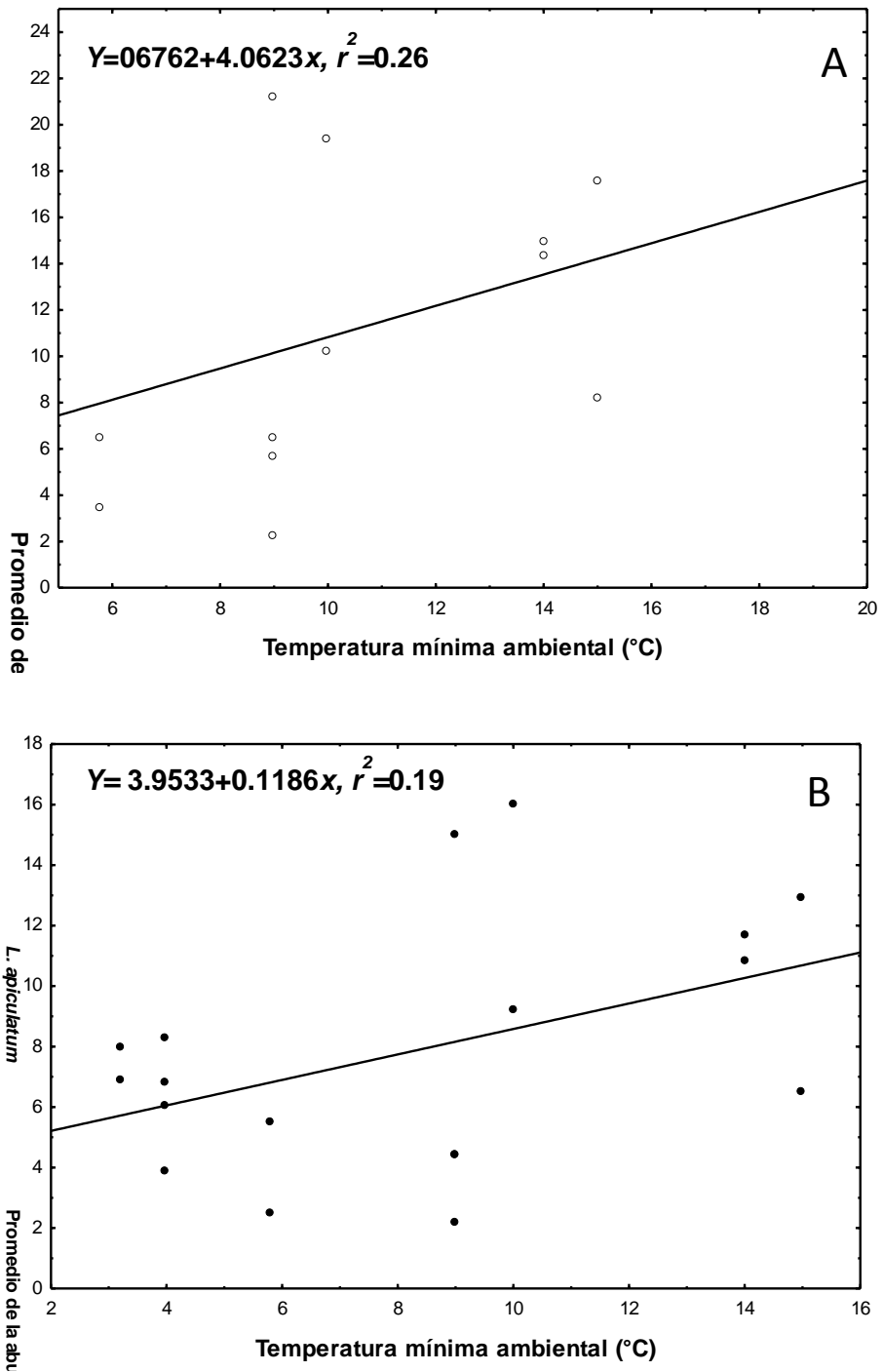


Figura 11. Relación entre (A) la temperatura ambiental mínima y la actividad de las tres especies de hormigas visitantes de los NEF de *C. imbricata* y (B) la temperatura ambiental mínima y la actividad de *L. apiculatum*

4. DISCUSIÓN

Desde finales del siglo XIX, Ganong (1895) reconoció la presencia de NEF ubicados entre las espinas de los cactus de los géneros *Cereus*, *Mamillaria*, *Opuntia* y *Rhipsalis*; sin embargo, sus características anatómicas, así como la función y utilidad que éstos desempeñaban en las plantas eran desconocidos desde ese entonces. Uno de los objetivos de esta investigación fue el comprobar la vascularización de los nectarios extraflorales de *Cylindropuntia imbricata*; es decir, que dichos nectarios están asociados a floema y xilema y, por ende dependen del agua para estar activos.

Se encontró que los NEF de *C. imbricata* presentan epidermis, parénquima del nectario y parénquima del subnectario, siendo este último el lugar en donde están ubicados los haces vasculares: xilema y floema (Nicolson *et al.*, 2010; Marazzi *et al.*, 2013). Todos los elementos encontrados son propios de la anatomía de un nectario común (Fahn, 1979 a, b; Durkee, 1982). Además de estos tejidos, se encontraron células con adelgazamientos en las paredes, con forma de dedo, que podrían estar asociadas a la secreción de néctar. También se hallaron cámaras en donde es acumulado el néctar para su posterior secreción, similar a lo reportado para *Opuntia stricta* (Díaz-Castelazo & Rico-Gray, 2005).

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. En plantas con riego se encontró mayor abundancia de hormigas visitantes de los nectarios que en plantas que carecieron del riego. Incluso también se encontró mayor abundancia de la especie más común, *L. apiculatum*, en plantas con riego. No se tienen antecedentes de experimentos

de riego en plantas con NEF, pero se han registrado casos relacionados, *i.e.* Ruffner & Clark (1986) reportaron que el agua es un recurso muy importante para las hormigas visitantes de los NEF de la cactácea *Ferocactus acanthodes*, al encontrar mayor densidad de hormigas durante la época lluviosa que durante la sequía. Además, a nivel de comunidades se encontró mayor riqueza y abundancia de hormigas visitantes de NEF durante la época de lluvias que durante la sequía en una comunidad vegetal tropical de La Mancha, en Veracruz, México (Díaz-Castelazo & Rico-Gray, 2004). Estos resultados corroboran la hipótesis de que la disponibilidad del agua es un factor importante en la regulación de la tasa de secreción de néctar para especies con NEF vascularizados (Wyatt *et al.*, 1992; O' Brien *et al.*, 1996).

Además del agua, la temperatura mínima también afectó, aunque de manera marginal, los patrones de forrajeo de las hormigas visitantes de los NEF de *C. imbricata*, probablemente debido a que la secreción de néctar disminuye a bajas temperaturas (Petanidou & Smets, 1996). Un resultado similar se ha observado para la cactácea *Opuntia stricta* en la costa de Veracruz, México (Oliveira *et al.*, 1999).

La actividad de los NEF de *C. imbricata* está restringida a los artículos jóvenes, ya que la secreción de néctar se detiene cuando los artículos son mayores (Miller, 2007), al igual que en *Opuntia* spp. (Oliveira *et al.*, 1999; Ness, 2006), pero distinto a los NEF de *Ancistrocactus scheeri*, los cuales se desarrollan a partir de una glándula primordial y están activos tanto en tubérculos jóvenes (parte interna) como en los viejos (parte más externa). Además, los NEF de *A. scheeri* no son vascularizados y, una vez finalizada la

secreción, la región glandular colapsa dejando el tejido en forma de copa en el tallo (Mauseth, 1982).

Las mismas especies de hormigas (*C. opuntiae* y *L. apiculatum*) reportadas por Miller (2007) como visitantes de los NEF de *C. imbricata* fueron encontradas en este estudio. La especie más frecuente fue *L. apiculatum*, lo cual podría explicarse por la presencia de sus hormigueros debajo de la mayoría de las plantas. Este resultado apoya a Wagner & Nicklen (2010), quienes dieron evidencia de que la provisión de recursos por los NEF estimula a las hormigas a construir sus nidos cerca de la planta madre.

Otro resultado interesante es que *C. opuntiae* y *L. apiculatum* nunca co-ocurren 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). Además de estas dos especies de hormigas, *Pseudomyrmex pallidus* fue visitante ocasional de los NEF de la planta, esto pudo deberse a que es principalmente arborícola y poco común (Rojas & Fragoso, 2000).

5. CONCLUSIONES

Los NEF de *C. imbricata* son vascularizados, presentando floema y xilema. La disponibilidad del agua fue el factor más importantes como regulador de la interacción entre los NEF de *C. imbricata* y las hormigas. El riego aumentó la abundancia de hormigas visitantes, en particular de *L. apiculatum*. Además, la temperatura mínima ambiental afectó de manera marginal, disminuyendo la abundancia de hormigas visitantes de los NEF de *C. imbricata*. Los NEF son estructuras poco estudiadas en la familia Cactaceae, el presente trabajo es el primer reporte de la anatomía de los NEF de *C. imbricata* y el primero demostrando la relevancia funcional de los mismos.

6. REFERENCIAS

- Anderson, E. F. 2001. *The Cactus Family*. Timber Press, Portland OR.
- Beardsell, D.V., Williams, E.G., & Knox, R.B. (1989). The structure and histochemistry of the nectary and anther secretory tissue of the flowers of *Thryptomene calycina* (Lindl) Stapf (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*, 37, 65–80
- Bernardello, G. (2007). A systematic survey of floral nectaries. En M. N. In: Nicolson S. W. (Ed.), *Nectaries and nectar* (págs. 19-128). Springer, Dordrecht.
- Bentley, B.L. (1977). Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 8, 407–427
- Bonnier, G. (1879). Les nectaires: étude critique, anatomique et physiologique. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, serie 6, 8*, 5–212.
- Bravos-Hollis, H. (1978). *Las cactáceas de México*. Mexico : Universidad Nacional Autónoma de México.
- Búrquez, A., & Corbet, S.A. (1998). Dynamics of production and exploitation of nectar: les-sons from *Impatiens glandulifera* Royle. In: B. Bahadur (Ed.), *Nectary biology* (pp. 130–152). Nagpur, India: Dattsons.
- Bruna, E. M. et al. 2004. Interspecific variation in the defensive responses of obligate plant-ants: experimental tests and consequences for herbivory. *Oecologia* 138:558-565
- Caspary, R. (1848). *De nectariis. Commentationem botanicam conscripsit*. Biblioteca Británica.
- Cuautle, M. and V. Rico-Gray. 2003. The effect of wasps and ants on the reproductive success of the extrafloral nectaried plant *Turnera ulmifolia* (Turneraceae) *Functional Ecology* 17: 417-423.

- Delgado N.M., Campos da Silva L., Nair B. S., Morais C. H., Alves A. A. (2011). Distribution, structural and ecological aspects of unusual leaf nectaries of *Calosianthus* species (Gentianaceae). *Flora* 206: 676-683.
- Díaz-Castelazo, C. & Rico-Gray (2004) Extrafloral nectary-mediated ant-plant interactions in the coastal vegetation of Veracruz, Mexico: Richness, occurrence, seasonality, and ant foraging patterns. *Ecoscience*, 11, 472-481
- Díaz-Castelazo, C. & Rico-Gray, V. (2005). Morphological and Secretary Characterization of Extrafloral Nectaries in Plants of Coastal Veracruz, México. *Annals of Botany* , 1175-1189.
- Durkee, L. T. 1982. The floral and extra-floral nectaries of *Passiflora*. II. The extra-floral nectary. *American Journal of Botany*. 69: 1420-1428. (Passifloraceae)
- Fahn, A. (1979a). *Secretory tissue in vascular plants*. Nueva York: Academic Press.||
- Fahn, A. (1979b.). Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *Amer. J. Bot.* , 66: 977-985.
- Freitas, L., Bernardello, G., Galetto, L., & Paoli, A.A.S. (2001). Nectaries and reproductive biology of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 136, 267–277.
- Ganong W.F. (1895). Problems in the Anatomy, Morphology and Biology of the Cactaceae . *Botanical Gazette*, 20, 129-138 .
- Jakobsen, H.B., & Kristjansson, K. (1994). Influence of temperature and floret age on nectar secretion in *Trifolium repens* L. *Annals of Botany*, 74, 327–334.
- Jofré E.L & Medina I.A. (2012). Foraging activity patterns and nest size of *Acromyrmex lobicornis* (Hymenoptera: Formicidae) in an urban zone of San Luis, Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argen.* vol.71. no.1-2 Mendoza ene.jun.2012.
- Mackay, P. W. y Mackay, E. (1989). Emma. Clave de los generos

de hormigas en Mexico (Hymenoptera: Formicidae). Department of Biological Sciences Laboratory for Environmental Biology. The University of Texas.

Marazzi, B., Bronstein, J.L., & Koptur, S. (2013). The diversity, ecology and evolution of extrafloral nectaries: current perspectives and future challenges. *Annals of Botany*, 111, 1243-1250.

Mauseth D.:J: (1982). Development and Ultrastructure of Extrafloral Nectaries in *Ancistrocactus scheeri* (Cactaceae). *Botanical Gazette*, 143, 273-277.

Miller, T. E. X. 2007. Does having multiple partners weaken the benefits of facultative mutualism? A test with cacti and cactus-tending ants. *Oikos* 116: 500-512.

Nerd, A., & Neumann, P. M. (2004). Phloem water transport maintains stem growth in a drought-stressed crop cactus (*Hylocereus undatus*). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129, 486-490.

Ness J.H. (2006). A mutualism's indirect costs: the most aggressive plant bodyguards also deter pollinators. *Oikos*.113: 506-514.

Nicolson W.S., Nepi M. & Pacini E. (2010) Nectaries and Nectar. Springer. P. 444.

Novoa S., Redolfi I. & Ceroni (2005). Daily activity pattern of the *Campanotus* sp. ant on the flowering buttons of the *Neoraimondia arequipensis* subsp. *roseiflora* (Werderman & Backeberg) Ostolaza Cactus. *Ecología Aplicada*, 4, 77-81.

O' Brien, S.P., Loveys, B.R., & Grant, W.J.R. (1996). Ultrastructure and function of floral nectaries of *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae). *Annals of Botany*, 78, 189–196.

Oliveira P.S. Rico-Gray V., Díaz-Castelazo y 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.

- Pacini, E., Nepi, M., & Vesprini, J.L. (2003). Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution*, 238, 7–21.
- Petanidou T., & Smets, E. (1996). Does temperature stress induce nectar secretion in Mediterranean plants? *New Phytologist*, 133, 513–518.
- Rico-Gray, V., Barber, J.T., Thien, L.B., Ellgaard, E.G., & Toney, J.J. (1989). An unusual animal-plant interaction: feeding of *Schomburgia tibicinis* (Orchidaceae) by ants. *American Journal of Botany*, 76, 603–608.
- Rojas, P. & C. Fragoso. 2000. Composition, diversity, and distribution of a Chihuahuan Desert ant community (Mapimí, México). *Journal of Arid Environments*, 44: 213-227.
- Ruffner, G.A., & Clark, W.D. (1986). Extrafloral nectar of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae): composition and its importance to ants. *American Journal of Botany*, 185-189.
- Ruzin SE. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. 322 pp. Oxford, New York: Oxford University Press.
- Schultz, T. R & McGlynn T.P. (2000). *The interactions of ants with other organisms*. Londres: Smithsonian Institution Press: Agosti D., Majer J.D., Alonso, L.E. y Shultz T.R.
- Triplehorn, C.A. and Johnson, N.F. 2005. *Introduction to the Study of Insects*. 7th ed. Thomson Brooks/Cole, Belmont CA, 864 pp.
- Vesprini, J.L., Nepi, M., & Pacini, E. (1999). Nectary structure, nectar secretion patterns and nectar composition in two *Helleborus* species. *Plant Biology*, 1, 560–568.

Wagner, D., Nicklen, E. (2010). Ant nest location, soil nutrients and nutrient uptake by ant-associated plants: does extrafloral nectar attract ant nests and thereby enhance plant nutrition? *Journal of Ecology*, 98, 614–624.

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

Wyatt, R., Broyles, S.B., & Derda, G.S. (1992). Environmental influences on nectar production in milkweeds (*Asclepias syriaca* and *A. exaltata*). *American Journal of Botany*, 79, 6363–642.

7. ANEXOS

Apéndice 1. Tratamiento posterior a la extracción

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

Fijación del tejido

1. Glutaraldehído al 3%, por un período de 48 horas en refrigeración a 4°C.
2. 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:

1. 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.
2. En solución de etanol al 50% y 50% de resina epoxi (Techonovit) por 24 horas en vacío.
3. En solución de etanol al 30% y 70% de resina epoxi (Techonovit) por 24 horas en vacío.
4. En solución de 7100 Technovit al 100% por 12 horas en vacío.

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.