



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Recursos Bióticos



Filogeografía y Genética de la Conservación de *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctorado en Recursos Bióticos

Presenta:
Mónica Eugenia Figueroa Cabañas

Dirigido por:
Dr. Rolando Tenoch Bárcenas Luna

Dr. Rolando Tenoch Bárcenas Luna
Presidente

Firma

Dr. Luis G. Hernández Sandoval
Secretario

Firma

Dr. Humberto Suzán Azpiri
Vocal

Firma

Dra. Mahinda Martínez y Díaz de Salas
Suplente

Firma

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse
Suplente

Firma

Nombre y Firma
Director de la Facultad

Dra. Ma Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Fecha (Febrero 2015)

RESUMEN

Echinocactus platyacanthus se distribuye en una vasta región de la República Mexicana tanto en el Desierto Chihuahuense (Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas y San Luis Potosí), la Zona Árida Queretano-Hidalguense (Guanajuato, Querétaro e Hidalgo) y en el Valle de Tehuacán Cuicatlán. Las poblaciones están separadas por dos disyunciones. La primera ocasionada por el Cinturón Volcánico Trans-Mexicano que separa a las poblaciones de Puebla y Oaxaca del resto del país, y la segunda la produce una zona volcánica que separa a las poblaciones de Querétaro, Hidalgo y Guanajuato de las del resto del norte. En este estudio se explora el patrón de variación genética en el espacio. Se amplificaron secuencias de ADN de plástidos del espaciador intergénico *trnH-psbA* en individuos de localidades representativas de la distribución (58 individuos) así como en individuos de *E. horizonthalonius*, *E. texensis* y *E. grusonii*, que se emplearon como grupos externos en la inferencia de las relaciones filogenéticas. También se amplificaron 4 marcadores del tipo inter secuencias simples repetidas (ISSR por sus siglas en inglés) en 191 individuos representativos de la distribución para explorar la variabilidad genética en un contexto espacial. Con el marcador de plástido se identificaron dos linajes bien definidos integrados el primero por poblaciones de la zona centro y sur y el segundo por poblaciones de la zona norte. Los marcadores de ISSR recuperan también esta división pero muestran una mayor estructuración al interior de estos grupos. Las poblaciones en general muestran una baja variabilidad genética sobre todo en la zona sur de la distribución. Las poblaciones que se estudiaron en la zona sur pertenecen a una reserva ecológica por lo que no están sujetas a explotación, sin embargo, las poblaciones de la zona centro sobre todo aquellas en Querétaro son sujetas a una disminución importante de los individuo reproductivos poniendo en riesgo su viabilidad a futuro. Es importante definir zonas de conservación para la región centro y norte además de reforzar la implementación de la normativa existente que las protege.

(Palabras clave: *trnH-psbA*, ISSR, Filogeografía, Genética de Poblaciones, *Echinocactus platyacanthus*, Genética de la Conservación

SUMMARY

Echinocactus platyacanthus is distributed over a vast area of Mexico: in the Chihuahuan Desert (Coahuila, Nuevo Leon, Tamaulipas, Zacatecas and San Luis Potosí) the Queretaroan-Hidalgoan Arid Zone (Guanajuato, Queretaro and Hidalgo) and the Tehuacan-Cuicatlan Valley. Populations are separated by two disjunctions. The first caused by the Trans-Mexican Volcanic Belt that separates Puebla and Oaxaca from the rest of the populations, and the second a volcanic zone between Queretaro, Hidalgo and Guanajuato from the rest of the northern populations. In this study the pattern of genetic variation is explored in a spatial context. Plastid DNA sequences of the intergenic spacer *trnH-psbA* were amplified in individuals from representative locations of the distribution (58 individuals) and representatives of *E. horizonthalonius*, *E. texensis* and *E. grusonii*, which were used as outgroups to infer their phylogenetic relationships. Four ISSR markers were also amplified in 191 individuals representing the distribution, in order to explore their genetic variability in a spatial context. With the plastid marker two distinct lineages were identified. The first integrated by de populations of the central and southern regions and the second was integrated by the northern populations. ISSR markers also recover this division but shows more structure within these groups. The populations generally show low genetic variability especially in the southern part of the distribution. The populations that were studied in the south belong to an ecological reserve that are not subject to exploitation, but the populations of the central populations especially those in Querétaro, are subject to a significant decrease of reproductive individuals risking their future viability. It is important to define conservation areas for the central and northern region also to strengthen the implementation of existing legislation that protects them.

(Key words: *trnH-psbA*, ISSR, Phylogeography, Population Genetics, *Echinocactus platyacanthus*, Conservation Genetics

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al doctor Rolando Tenoch Bárcenas por haber guiado este trabajo y encontrar recursos para el mismo. Agradezco sobre todo la libertad de acción, el enorme entusiasmo y sorpresa que siempre mostró para desarrollar nuevos métodos y explorar nuevas ideas, así como su paciencia. El abordaje lúdico al trabajo y la incansable búsqueda de nuevas perspectivas hicieron de esta investigación un proceso de aprendizaje que rebasó los objetivos académicos. De suma importancia fueron los obstáculos que se presentaron en el transcurso del trabajo para la construcción y fortalecimiento de mi persona. Sin que fuese deliberado, seguramente, la selección que hizo el Dr. Rolando de la especie de estudio y su método de enseñanza por descubrimiento transformaron sensiblemente mi identidad.

Agradezco todos los apoyos financieros y logísticos que me proporcionaron el Programa de Doctorado y la Jefatura de Posgrado de la Facultad de Ciencias Naturales. De entre los apoyos se incluyen una beca que fue muy importante para la realización de trabajos de campo, adquisición de material y bibliografía, así como recursos para la asistencia al curso de “Morfometría Geométrica-2010” que tuvo lugar en la Universidad Autónoma Metropolitana, la participación de los Foros de Investigación del posgrado al interior de la facultad, la participación al V Congreso Mexicano de Cactáceas y Suculentas, así como también el apoyo con viáticos para la visita a herbarios y salidas a campo.

Agradezco al doctor Héctor Hernández Macías por proporcionar la ubicación de las localidades en donde se encuentra *Echinocactus platyacanthus*.

Agradezco a la doctora Mahinda Martínez y al doctor Luis Hernández por todo el apoyo moral, logístico, material y académico que me brindaron durante todo el proceso, pero sobre todo el cariño que han mostrado siempre.

Agradezco al doctor Humberto Suzán por todo su apoyo tanto académico como moral. Su participación en el proceso me ha ayudado a esclarecer las líneas de trabajo que quiero seguir en el futuro.

Ha sido muy importante la presencia y apoyo tanto moral como académico de los doctores Guadalupe Malda, Patricia Herrera, Karina Acevedo, Fausto Arellano, Teresa Terrazas, Raúl Pineda.

El trabajo no podía haberse realizado sin la valiosa colaboración de Luz Ruiz Maqueda quien me instruyó en las técnicas más importantes para este trabajo con suma paciencia y tino. También la ayuda en el proceso de colecta que me brindaron María Teresa Reynoso, Víctor Rodríguez, Laila Bárcenas, Rolando Bárcenas, Paloma Valtierra, Valente Ravel e Innes Webster, personas que hicieron no solo divertido pero seguro este proceso. También hubo mucha gente que me ayudó y que también hizo seguro este proceso que incluyen a todos los pastores que me guiaron y acompañaron a las poblaciones cuando fui sola, los señores que me condujeron de regreso a los poblados donde me hospedé, así como las señoras que generosamente me dieron de beber y comer.

Agradezco a Lucía Tovar por su ayuda con el trabajo en el microscopio electrónico. A Aurora Alvarado le agradezco su asistencia en el trabajo molecular.

Agradezco a Innes y a mi madre por haber estado apoyándome en todo, por su interminable entusiasmo y cariño.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2.1 ORGANISMO DE ESTUDIO.....	14
2.2 FILOGEOGRAFÍA Y GENÉTICA DE POBLACIONES ORIENTADA A LA CONSERVACIÓN.....	19
3. MÉTODOS	24
3.1 ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES	24
3.1.1 Muestreo	24
3.1.2 Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación	25
3.1.3 Análisis de secuencias de plástidos	27
3.1.4 Análisis de datos de ISSRs.....	28
3.2 CUANTIFICACIÓN DE LA VARIABILIDAD MORFOLÓGICA.....	30
3.2.1 Muestreo y colección de datos de espinas y de tallos.....	30
3.2.2 Análisis estadístico de datos de espinas y de tallos.....	31
3.2.3 Muestreo y colección de datos de variables estomáticas.....	35
3.2.4 Análisis estadístico de variables estomáticas.....	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE CLOROPLASTO	37
4.2 PATRONES DE VARIACIÓN DE ISSR Y ESTRUCTURA POBLACIONAL	38
4.3 ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN MORFOLÓGICA.....	47
5. CONCLUSIONES	8
6. REFERENCIAS.....	9
7. ANEXO A	16
8. ANEXO B	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3-1 Ubicación de las localidades estudiadas y tamaños de muestra.....	25
Cuadro 3-2 Cebadores de plástido.....	27
Cuadro 3-3 Cebadores de ISSR.....	27
Cuadro 3-4 Localidades y tamaño de muestra de las poblaciones estudiadas en el análisis de variación morfológica.....	33
Cuadro 3-5 Variables morfológicas.	33
Cuadro 3-6 Variables bioclimáticas	34
Cuadro 3-7 Variables de radiación solar	35
Cuadro 4-1 Resumen numérico de bandas de ISSR	39
Cuadro 4-2 Índices de diversidad genética y sus error estándar por población y por región	41
Cuadro 4-3 AMOVA	42
Cuadro 4-4 Agrupaciones sugeridas por el análisis bayesiano de conglomerados de las diferentes poblaciones	46
Cuadro 4-5 AMOVA considerando la agrupación sugerida por GENELAND.	46
Cuadro 4-6 Correlaciones entre variables morfológicas y variables bioclimáticas ..	1

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Ejemplar de <i>Echinocactus platyacanthus</i>	13
Figura 2-1 Distribución de <i>Echinocactus platyacanthus</i> mostrando al Cinturón Volcánico Trans-Mexicano	17
Figura 2-2 Mujeres otomíes cardando ixtle en tallos de <i>Echinocactus platyacanthus</i> . (Eccardi, F.).....	17
Figura 4-1 Árbol de compromiso de mayoría del 50%	38
Figura 4-2 Red haplotipos no enraizada	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4-3 Aislamiento por distancia	43
Figura 4-4 Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)	44
Figura 4-5 Fenograma de relaciones genéticas entre poblaciones.....	45
Figura 4-6 Número de grupos distintos detectados con GENELAND	47
Figura 4-7 Gráfico de medias de la longitud de las espinas con barras de error estándar en cada una de las diferentes orientaciones. (Barras con letras iguales significa que las medias son estadísticamente iguales)	48
Figura 4-8 Gráfico de medias de diámetro de tallo por orientación y barras de error estándar	48
Figura 4-9. Gráfico de medias de diámetro del disco apical por orientación con barras de error.....	48
Figura 4-10 Medias con barras de error estándar de la variable Diferencia entre espinas. (Barras con números iguales significa que las medias son estadísticamente iguales).....	50

Figura 4-11 Medias con barras de error estándar de la variable Excentricidad del tallo. (Barras con números iguales significa que las medias son estadísticamente iguales)..... 51

Figura 4-12 Medias con barras de error estándar de la variable Excentricidad del disco apical. (Barras con números iguales significa que las medias son estadísticamente iguales)..... 51

1. INTRODUCCIÓN.

Echinocactus platyacanthus pertenece a la familia Cactaceae y es una especie endémica a México. Esta especie se encuentra bajo protección especial de acuerdo a la NOM-ECOL-059-2001. Se le considera de importancia ecológica, económica y cultural. Esta cactácea se distribuye en una vasta región de la República Mexicana tanto en el Desierto Chihuahuense (Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas y San Luis Potosí), la Zona Árida Queretano-Hidalguense (Guanajuato, Querétaro e Hidalgo) y, separada por el Cinturón Volcánico Trans-Mexicano, también se le encuentra en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla y Oaxaca) (Figura 1-1), (Gómez-Hinostrosa and Hernández, 2000; Trujillo, 1984).

Actualmente y a pesar de que está protegida por la ley, las poblaciones de esta especie están siendo reducidas de manera alarmante por causas antropogénicas. Entre éstas podemos mencionar la pérdida y transformación de su hábitat a través del cambio del uso de suelo, el sobrepastoreo y la sobrecolección (Hernández-Oria et al., 2007). Destaca el uso de esta cactácea en la industria confitera para elaborar acitrón, dulce que se utiliza para la decoración de la Rosca de Reyes. Es este último uso el que ejerce mayor presión sobre la cactácea pues la demanda a nivel nacional es importante, y muchas comunidades marginadas asociadas a la producción del acitrón aprovechan este recurso para complementar su ingreso (Jiménez-Sierra et al., 2007). A pesar del uso extendido de las diferentes partes de esta cactácea desde tiempos antiguos, no existen actualmente para ella programas de conservación, manejo y uso sostenible.

La rápida pérdida de individuos en una población conduce a cuellos de botella genéticos que reducen considerablemente la variabilidad genética comprometiendo la capacidad de adaptarse a los cambios ambientales que ocurran en el futuro. Caracterizar la cantidad y distribución de la diversidad genética de especies en algún grado de riesgo es una de las acciones más importantes para el diseño de programas de conservación.

En este estudio se realizó un análisis espacio-temporal de los linajes génicos de *Echinocactus platyacanthus* a través del estudio de la variación de secuencias de ADN de plástido y marcadores ISSR en individuos de diferentes poblaciones de esta especie a lo largo de todo el intervalo de su distribución. Esto con el fin de reconstruir la historia de la colonización de los lugares que ocupa esta especie y de los eventos que dieron lugar a la distribución observada actualmente. Además esta información permitirá estimar la intensidad de flujo génico histórico y el tamaño efectivo de las poblaciones. Así mismo, este proyecto tuvo como objetivo la caracterización de la variabilidad genética y estructura poblacional de esta especie. Adicionalmente se evaluaron varios caracteres morfológicos para determinar su utilidad como caracteres para el análisis filogenético. Como parte de la evaluación de estos caracteres se exploran las relaciones de estas variables con diversos factores climáticos. Estos análisis resultaron en documentos que ahora están en prensa y que aquí se muestran como anexos (INTRODUCCIÓN.Anexo y Anexo).

En conjunto toda esta información intenta proveer una plataforma de información a partir de la cual puedan tomarse decisiones orientadas a la conservación y manejo sostenible de esta especie.



Figura 1-1 Ejemplar de *Echinocactus platyacanthus*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Organismo de estudio.

Morfología

Echinocactus platyacanthus de la familia Cactaceae, subfamilia Cactoidae, tribu Cactaceae, crece en condiciones de semidesierto junto con asociaciones de plantas xerófitas. Tiene tallos globosos inicialmente y en la medida que crece se tornan toneliformes (Figura 1-1). Son plantas simples pero se encuentran algunas cespitosas, generalmente por el resultado del crecimiento de brotes laterales causados por alguna lesión. De color verde oscuro a glauco en la madurez, estas plantas pueden llegar a medir más de dos metros de altura y presentar diámetros mayores a un metro. En ocasiones se observan en ejemplares juveniles franjas rojizas en la epidermis que se pierden en la madurez. Los individuos reproductivos presentan abundante lana en el ápice de donde emergen sus flores. Los ápices pueden ser redondos u oblongos dependiendo de la latitud. Posee costillas gruesas y duras cuyo número aumenta con la edad. En ejemplares jóvenes, se presentan tubérculos y en ejemplares de mayor edad y adultos reproductivos, estos tubérculos se fusionan formando costillas continuas. En ejemplares juveniles las areolas se encuentran separadas unas de otras mientras que en los reproductivos son continuas a lo largo de un surco en la región distal de la costilla. Las areolas del ápice presentan un disco extenso con abundante lana amarillenta, mientras que las restantes son glabras. Las espinas en la región central de la distribución son de color café oscuro mientras que en la zona norte de la distribución son de color amarillento y se tornan café a grisáceo con la edad, gruesas, estriadas y de longitud variable. El número de espinas por areola varía con la edad y se distribuyen de manera radial en torno a un grupo central. Las espinas radiales pueden sumar de 4 a 10 mientras que la central puede estar ausente a ser una sola de 2 a 12 cm de largo. Sus flores de color amarillo, emergen del ápice lanoso y llegan a medir entre 4 y 7 cm (H Bravo-Hollis and Sánchez-Mejorada, 1991). Estas flores presentan un pericarpelo de 2 cm de

longitud y 1.2 cm de ancho profusamente cubierto de escamas. Las flores presentan abundantes pelos axilares sedosos. Poseen numerosos estambres con filamentos amarillos y anteras de color amarillo más oscuro. El estilo amarillento es grueso de 3 a 5 cm de longitud es estriado longitudinalmente y tiene de 10 a 12 lóbulos en el estigma. Su fruto de 5 a 7 cm de longitud es seco, amarillento con numerosas escamas, con lana y pelos axilares cubriendo la pared del fruto, conserva los restos secos del perianto. La semilla de aproximadamente de 2.5mm de longitud, testa café oscuro, brillante con ornamentación celular; hilo basal lateral, micrópilo pequeño, próximo al hilo (H Bravo-Hollis and Sánchez-Mejorada, 1991).

Formas geográficas.

Bravo y Sánchez (1991) distinguen tres formas geográficas de ésta especie; forma ***grandis***, ***platyacanthus*** y ***visnaga***. En Tehuacán, Puebla se encuentra la forma ***grandis*** distinguiéndose, según los autores, de las otras dos formas por presentar espinas negruzcas de 4 a 5 cm de longitud. En los valles intermontanos y barrancas profundas de Querétaro e Hidalgo se distribuye la forma ***platyacanthus*** caracterizada por tener espinas centrales amarillentas ligeramente curvas de 6 a 8 centímetros de longitud. La forma ***visnaga*** se le encuentra en el altiplano en los estados de Guanajuato, San Luis Potosí, Zacatecas, Nuevo León y Tamaulipas. Esta forma se diferencia de las demás porque posee espinas rectas centrales amarillentas o con tinte rojizo y que pueden medir de 6 a 10 cm de largo.

Distribución de *E. platyacanthus*.

En el apartado anterior ya se mencionaron algunos lugares en donde se distribuye la cactácea, en la Figura 2-1 se ilustra la ubicación de las diferentes poblaciones conocidas para la especie. Como se puede apreciar tres son las regiones en donde se agregan las poblaciones de esta especie, aquí llamadas megapoblaciones: Desierto Chihuahuense (Coahuila, Zacatecas, San Luis Potosí, Tamaulipas y Nuevo León); Zona Árida Querétaro-Hidalguense (Guanajuato, Querétaro e Hidalgo) y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla y Oaxaca).

Notablemente la región del Valle de Tehuacán está separada de las otras dos por el Cinturón Volcánico Trans-Mexicano resultando en una disyunción en la distribución de esta especie como se muestra en la Figura 2-1. Esta formación volcánica representa una barrera física que limita el flujo génico entre poblaciones de esta cactácea, no solo por las dimensiones de estas formaciones, que rebasan el límite altitudinal observado para *Echinocactus platyacanthus* (2350 msnm), sino también por el carácter ígneo del sustrato que predomina y que no satisface las necesidades de la especie pues ésta se desarrolla preferentemente en sustratos calizos (Trujillo 1984).

Etnobotánica de *E. platyacanthus*.

La importancia etnobotánica de ésta biznaga se remonta a tiempos anteriores a la Conquista, cuando se empleaba como alimento y era parte de la mitología de las culturas del centro del país. Registros gráficos de estas plantas quedaron plasmados en códices como el Mendocino, el De la Cruz-Badiano y el Florentino. Entre los Náhuas las biznagas se denominaban **huitznahuac**, que literalmente significa “rodeada de espinas”, de **huitzli**, “espinas”, y **nahuac**, “alrededor”. Asimismo, llamaban a sus frutos **teocomitl**. En 2005 se encontró en el Templo Mayor (Ciudad de México) una escultura que representa una biznaga que se presume formaba parte de un **Momoxtli** (altar) utilizado como piedra de los sacrificios en festividades en honor a **Huitzilopochtli** (Megged, 2010). Actualmente, es importante en la industria confitera donde se le utiliza para fabricar el acitrón. También se le aprecia como planta de ornato. Las espinas de la planta se emplean como cardadores de lana en la región centro del país Figura 2-2. En época de secas se utiliza como forraje y la lana del ápice se emplea como relleno para almohadas (Castillo del and Trujillo, 1991).

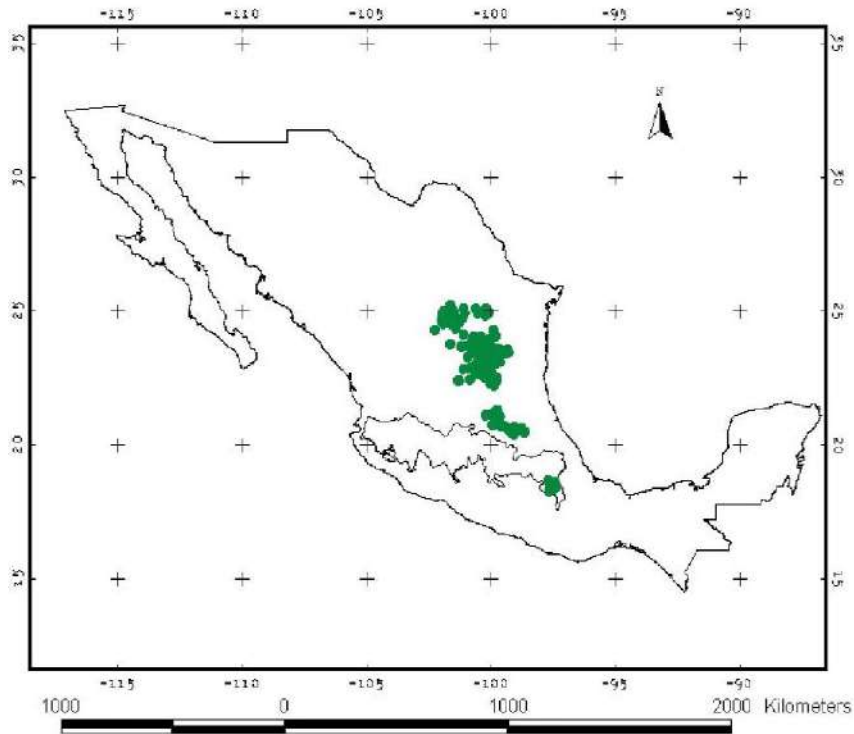


Figura 2-1 Distribución de *Echinocactus platyacanthus* mostrando al Cinturón Volcánico Trans-Mexicano



Figura 2-2 Mujeres otomíes cardando ixtle en tallos de *Echinocactus platyacanthus*. (Eccardi, F.)

Biología de la reproducción de *E. platyacanthus*.

Esta biznaga posee flores perfectas que emergen la mayor parte del año pero sobre todo en los meses cálidos y lluviosos. En estudios realizados en poblaciones ubicadas en Tehuacán, Puebla (Jimenez-Sierra, 2008), se determinó que esos individuos son xenógamos facultativos aunque la producción de semillas se incrementa en la medida en que se favorece el cruzamiento entre plantas diferentes. La planta es visitada por numerosos insectos de la familia Apidae presuntamente siendo los polinizadores. Las semillas se dispersan por gravedad y con la ayuda de pequeños roedores y aves (Jiménez-Sierra, 2008).

Genética de poblaciones.

Escasos son los estudios sobre la genética de esta especie. Existe un estudio sobre estructura genética de poblaciones ubicadas en Tehuacán, Puebla (Jiménez-Sierra, 2008). En este estudio se encontró que la variabilidad genética de las poblaciones es muy baja pues sólo el 23.55% de los loci son polimórficos, el número promedio de alelos por loci es $A = 1.35$, así también se encontró que existe una deficiencia de heterocigotos pues la heterocigocidad media resultó ser de 0.026 y el coeficiente de autogamia $F = 0.4$ (Jiménez-Sierra, 2008).

Problemática de la conservación de *E. platyacanthus*.

Aun cuando esta especie está sujeta a protección especial (NOM-ECOL-059-2001) la transformación de los hábitats de *Echinocactus platyacanthus* en áreas de cultivo, áreas de pastoreo o asentamientos humanos reduce el número de individuos en las poblaciones. Además, pese a que se le utiliza en la industria confitera tradicional no existen plantaciones de esta especie, por lo que la presión sobre las poblaciones naturales es considerable. Esto, aunado a la colección ilegal de ejemplares de este cactus con fines comerciales, está disminuyendo el número de individuos en las poblaciones. Existen escasos estudios que han determinado los cambios demográficos y el grado de deterioro o conservación de las poblaciones existentes. En el estudio realizado por Jiménez-Sierra y Eguiarte

(2010) realizado en la zona sur y centro de la distribución se encontró que las poblaciones mejor conservadas están ubicadas en el estado de Hidalgo mientras que las poblaciones en Querétaro son las más amenazadas por las actividades de origen antropogénico. Estudios sobre variabilidad genética se han realizado en poblaciones ubicadas en la zona sur de la distribución, específicamente en Puebla (Jimenez-Sierra, 2008). En estos estudios se encontró una baja variabilidad genética en las poblaciones en relación a otros estudios con otras cactáceas. Dada la escasa información sobre la demografía y genética de las poblaciones de *E. platyacanthus* no se puede predecir el comportamiento en términos evolutivos de esta especie ni el impacto que han tenido las acciones a las que se hace referencia sobre las frecuencias y flujos génicos de esta especie.

2.2 Filogeografía y genética de poblaciones orientada a la conservación.

La variación dentro y entre poblaciones naturales es crucial para la supervivencia de las especies a largo plazo. Una estimación precisa del nivel y distribución de la diversidad genética de especies amenazadas provee información crucial en el diseño de programas de conservación (Frankham et al., 2002; Hamrick and Godt, 1996).

La variación genética al interior de las especies puede ser estudiada en varios niveles. El primer nivel distingue grandes grupos asociados a espacios geográficos definidos, resultado de la secuencia de cambios a gran escala que dan lugar a barreras que separan las poblaciones que originalmente ocupaban un espacio común. Como consecuencia, el flujo genético entre estas poblaciones se interrumpe y cada una sigue un curso evolutivo distinto. Este nivel de estudio es abordado por la filogeografía que se vale del uso de marcadores genéticos con tasas de mutación muy lentas y de herencia materna como las encontradas en los genomas mitocondriales o de cloroplastos (Ennos et al., 1999; Frankham et al., 2002). El segundo nivel mide la variabilidad existente en cuanto a riqueza genética al interior y entre poblaciones (Weir, 1996). Así entonces filogeografía y la genética de poblaciones pueden ayudar a priorizar áreas de alto valor para la

conservación de especies. También han formado parte en la definición de unidades evolutivas significativas, que son unidades de conservación debajo del nivel de especie constituidas por individuos con distribución y características genéticas únicas. Estos dos enfoques utilizan marcadores moleculares para elucidar la historia de los cambios genéticos entre poblaciones y al interior de ellas asociados al tiempo y al espacio. En ocasiones se emplean también variables morfológicas para el análisis filogenético. Típicamente se emplean caracteres cualitativos o cuantitativos discretos tales como conteos. Ocasionalmente se emplean variables cuantitativas continuas si lo que miden son características intrínsecas del individuo que se transmiten de una generación a otra (Donald L. Swiderski et al., 2002).

Un ejemplo de la aplicación de la filogeografía y la genética de poblaciones con propósitos de conservación es un estudio realizado sobre *Tetraena mongolica*, un arbusto endémico a la zona oeste de Mongolia y distribuido en una limitada porción de esta región. Este arbusto se encuentra amenazado pues siendo rico en aceites, es empleado como combustible por la gente cercana a las poblaciones donde se distribuye. Para estudiar la filogeografía de esta especie amplificaron al espaciador intergénico de cloroplasto *atpB-rbcL* en 77 individuos de 8 poblaciones (que es el total de poblaciones conocidas de esta especie) de *T. mongólica* representativas del intervalo de distribución. Encontraron que las poblaciones estaban altamente diferenciadas y que había una baja variabilidad genética al interior de cada población por lo que concluyeron que cada una de las poblaciones estudiadas deberían considerarse como unidades de conservación (Ge et al., 2011).

En estudios filogeográficos y de genética de poblaciones la selección de los instrumentos con los que se medirá la variabilidad genética junto con la estrategia de muestreo, determinan la resolución del estudio. Entre los instrumentos más empleados se encuentran los marcadores genéticos. El trabajo que aquí desarrollo

analizó la variabilidad genética en dos niveles. A nivel de megapoblaciones, en el cual es necesario un marcador que tenga una tasa de mutación tal que perciba cambios ocurridos en periodos largos de tiempo y que no recombinen. Generalmente se emplean marcadores de herencia citoplasmática tales como secuencias de ADN proveniente de mitocondrias o cloroplastos. Segundo, a nivel poblacional en el que la resolución debe ser mayor para detectar cambios de más reciente aparición. Para este propósito existen múltiples marcadores, algunos basados en el patrón generado por la digestión con enzimas del genoma o secuencias específicas o a base de la diferencia en tamaño de secuencias amplificadas a través de técnicas relacionadas con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Se propuso entonces el uso de secuencias de espaciadores intergénicos de cloroplasto para el primer nivel y para el segundo, una técnica basada en PCR que amplifica zonas del genoma con motivos genéticos repetitivos, llamada Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR-PCR) una variante de la técnica de microsatélites.

Se ha observado que la tasa de mutación en el genoma del cloroplasto es menor que en la registrada para el genoma nuclear de las plantas y no presenta recombinación, siendo poco variable sobre todo en las secuencias que codifican para un polipéptido (Hollingsworth et al., 1999). Aquellas regiones que se encuentra entre los genes, los espaciadores intergénicos, registran tasas de mutación más altas haciéndolas potencialmente útiles para la detección de variabilidad al interior de las especies (Hamilton, 1999).

Los microsatélites consisten en la detección de fragmentos del genoma que sean secuencias que se repiten una tras otra, en grupos definidos en su secuencia pero no necesariamente en su número (*tandem repeats*). Los diferentes motivos pueden ser sencillos de 1 a 6 nucleótidos tales como (AC)_n, (GT)_n, (ATG)_n, entre otras posibilidades. Generalmente el número de repeticiones puede ser de 5 a 40 pero es posible encontrar un número mayor. Se diseñan cebadores específicos para las secuencias limítrofes de las secuencias de microsatélites y se amplifican

vía PCR en los organismos de estudio. Variaciones en la dimensión de la secuencia debida a mutaciones es lo que se detecta como polimorfismo. Esta técnica provee de marcadores codominantes, es decir, puede distinguirse entre homocigotos y heterocigotos sin necesidad de hacer cruza de prueba (Selkoe & Toonen, 2006). Las regiones con estos motivos repetitivos se encuentran a partir de la información sobre las secuencias en los extremos, lo que implica una extensiva búsqueda en el genoma. Esta técnica es costosa pero muy específica y repetible.

Los ISSRs a diferencia de los microsatélites, se obtienen a partir de un conjunto de cebadores genéricos que son complementarios a regiones microsatelitales, y no requieren de información sobre secuencias del genoma del sujeto de estudio (Weising, 2005). Estos cebadores consisten en un motivo repetido de di- o trinucleótidos que son complementarios a una secuencia de microsatélite, al que puede añadirse al extremo 3' o 5' un par de nucleótidos arbitrarios que funcionan como anclas para que la amplificación se lleve a cabo siempre por el mismo extremo. Cuando se encuentran dos secuencias repetidas a una distancia factible de amplificar con una orientación invertida, el primer complementario a ellas puede inducir la amplificación del segmento de ADN intermedio. Así se obtiene un segmento de un tamaño específico considerado un locus. La variación en tamaño debida a cambios en las secuencias intermedias es lo que se registra como locus. Estos locus tiene dos alelos: ausencia de banda, que se considera como homocigoto recesivo, y presencia de banda que incluye a los homocigotos dominantes y a los heterocigotos. Debido a que esta técnica no detecta heterocigotos se le llama marcador dominante. Las limitaciones que impone un marcador dominante al análisis de genética de poblaciones son importante pues muchos de los métodos estadísticos asumen que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg o requieren que se conozca el coeficiente de endogamia o debe tratarse al fenotipo multi-locus como un haplotipo para poder estimar parámetros y particionar la varianza genética. Aunque existen métodos bayesianos que no asumen equilibrio Hardy-Weinberg, que incorporan al

modelo la incertidumbre sobre el coeficiente de endogamia (Holsinger et al., 2002). También se asume que existen solo dos alelos por locus y que una banda del mismo peso corresponde al mismo locus. A pesar de estas limitaciones los marcadores moleculares se usan de manera extensiva en estudios de genética de poblaciones porque se ha observado tanto a nivel empírico como a nivel teórico que estos marcadores pueden ofrecer estimaciones adecuadas de parámetros de genética poblacional como de estructura poblacional. De hecho se considera a los marcadores dominantes apropiados cuando los recursos para generar la información sobre genética de poblaciones son limitada pues esta técnica produce una gran cantidad de loci en relación a otras técnicas como las alozimas y microsatélites que requieren del muestreo de una gran cantidad de individuos para tener suficiente potencia en las pruebas para las estimaciones asociadas a la estructura poblacional(Guillot and Carpentier-Skandalis, 2011).

3. MÉTODOS

3.1 Análisis de marcadores moleculares

3.1.1 Muestreo

Se tomaron muestras de tejido de individuos de *Echinocactus platyacanthus*, dentro de poblaciones ubicadas a lo largo del intervalo de distribución de esta especie, durante el periodo de marzo del 2009 y febrero del 2010 con el permiso de colecta SGPA/DGVS/01408 (Cuadro 3-1). Las muestras consistieron en un medio círculo de 1.5 cm de diámetro de tejido proveniente de costillas de los cactus, obtenidos con un sacabocados previamente desinfectado con etanol al 70%. El tejido se colocó en sílica gel para deshidratarlo y conservarlo permanentemente (Chase and Hills, 1991). Las muestras se tomaron de individuos separados por lo menos 25 metros, y seleccionados al azar en un transecto de 1 kilómetro de largo por 10 metros de ancho. Para el estudio con secuencias de espaciadores intergénicos y genes de cloroplasto se tomaron de 1 a 9 individuos por localidad (Cuadro 3-1). Además se incluyeron muestras de un individuo de *Echinocactus horizonthalonius*, un individuo de *Echinocactus texensis* y dos individuos de *Echinocactus grussonii* como grupos externos para el análisis filogenético. La selección de grupos externos se basó en estudios previos sobre las relaciones filogenéticas entre éstas especies, inferidos a partir de la variación de secuencias de la región de *matK* (Bárceñas et al., 2011). En ese estudio *E. horizonthalonius* y *E. texensis* se identificaron como especies hermanas de *E. platyacanthus*. Para el ensayo con ISSRs se emplearon de 12 a 20 individuos por cada una de las poblaciones menos para la de Coahuila (Cuadro 3-1). Ejemplares herborizados de cada una de las poblaciones se depositaron en el herbario QMEX.

Cuadro 3-1 Ubicación de las localidades estudiadas y tamaños de muestra.

No..	Localidad	Id	Latitud	Longitud	Elevación	N ISSR	N cpDNA
1	Chazumba, Oaxaca.	C20	18.20°	-97.68°	1800	20	0
2	Tehuacán, Puebla	C10	18.45°	-97.31°	1530	0	7
3	Tlacotepec, Puebla.	C18	18.67°	-97.72°	2000	20	0
4	Metztitlan, Hidalgo.	C13	20.48°	-98.68°	1350	15	5
5	Zimapán Hidalgo	C8	20.68°	-99.49°	1750	0	5
6	Tolimán, Querétaro.	C12	20.91°	-99.95°	1600	12	5
7	Peñamiller, Querétaro	C6	21.00°	-99.65	1156	0	4
8	Tierra Blanca, Guanajuato	C4	21.08°	-100.19°	1775	24	5
9	Victoria, Guanajuato	C1	21.19°	-100.28°	1988	0	5
10	Guadalcazar, San Luis Potosí	C17	22.63°	-100.19°	1580	20	7
11	Tula, Tamaulipas.	C14	23.01°	-99.71°	1200	20	5
12	Matehuala, San Luis Potosí	C16	23.48°	-100.62°	1490	20	5
13	Cedros, Zacatecas.	C24	24.66°	-101.77°	1760	20	0
14	Mazapil, Zacatecas	C11	24.65°	-101.58°	2199	0	5
15	Galeana, Nuevo Leon	C15	24.78°	-99.95°	1550	0	5
16	Rayones, Nuevo León.	C23	25.05°	-100.06°	840	20	0
17	Saltillo, Coahuila	C9	24.99°	-101.07°	1981	0	6

3.1.2 Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación

Se extrajo ADN genómico a partir de 30 mg de tejido seco de cada individuo utilizando el protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987) con mínimas modificaciones.

Se amplificaron secuencias de ADN de plástido del espaciador intergénico *trnH-psbA* (Cuadro 3-2). Las reacciones de cadena de la polimerasa se realizaron en volúmenes de 25µl que contenían 2.5 µl de solución de ADN total (aproximadamente 15ng), 2.5 µl de Buffer DreamTaq™ 10X, 1.5 µl de MgCl₂ (25mM), 0.5 µl de dNTPs (10 µM), 0.75 µl de cada primer a una concentración de 10µM, 0.625U de DreamTaq™ y el resto de H₂O libre de nucleasas. Las

condiciones de los ciclos de PCR para *trnH-psbA* fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94° C por dos minutos, seguido de treinta y cinco ciclos cada de los siguientes procesos, desnaturalización a 94° C 50 por segundos, alineamiento a una temperatura de 48° C por 1 minuto y extensión a 72° C por 45 segundos, después de éstos, un ciclo de extensión final a 72° C por cinco minutos y 4° C por cinco minutos. El tamaño de los productos de PCR se determinó a través la comparación con un estándar (100 bp DNA marker Axigen 100bp-3000 bp) a los que se les sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1% con 0.1 µl/ml de SYBR® Safe. Los productos se visualizaron con un transiluminador de luz azul Safe Imager™ 2.0. Los productos de PCR se enviaron a purificar y secuenciar a Macrogen Inc. (Seoul, South Korea; <http://dna.macrogen.com>) usando los iniciadores descritos en el Cuadro 3-2. La secuencia de nucleótidos fue determinada en solo una hebra.

La amplificación de los ISSRs se llevó a cabo por duplicado en volúmenes de 10 µl que contenían 1µl de Buffer DreamTaq™ 10X, 0.2 µl de dNTPs 10 µM, 0.5 µl de cada primer a una concentración de 10µM, 0.062 U de DreamTaq™ y el resto de H₂O libre de nucleasas. La secuencia de los cebadores empleados se puede consultar en el Cuadro 3-3. Las condiciones de los ciclos de PCR para los ISSR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94° C por 1.5 minutos, después 40 ciclos de cada uno de los siguientes tres procesos, desnaturalización a 94° C por 40 segundos, alineamiento a la temperatura que indica Cuadro 3-3, por 45 segundos y extensión a 72° C por 1.5 minutos, finalizados éstos le siguió un ciclo final de elongación a 72° C por siete minutos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis a 75 V por 4 horas en geles de agarosa al 1.5% adicionado con 1% de SYBR® Safe. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz azul Safe Imager™ 2.0. Los geles se fotografiaron con una cámara Canon G10.

Cuadro 3-2 Cebadores de plástido.

Nombre de la región	Iniciador hacia adelante Secuencia de sentido	Iniciador reverso Secuencia de contrasentido	Tamaño (pb)	Referencia
trnH(GUG)-psbA	ACTGCCTTGATCCCACTTGGC	CGAAGCTCCATCTACAAATGG	350	(Hamilton, 1999)

Cuadro 3-3 Cebadores de ISSR

Nombre	Iniciador	Temperatura de alineamiento	Fuente
UBC879	(CTTCA) ₃	43°C	University of British Columbia (UBC Primer set no.9)
UBC868	(GAA) ₆	43°C	University of British Columbia (UBC Primer set no.9)
UBC840	(GA) ₈ CT	50°C	University of British Columbia (UBC Primer set no.9)
UBC814	(CT) ₈ A	50°C	University of British Columbia (UBC Primer set no.9)

3.1.3 Análisis de secuencias de plástidos

3.1.3.1 Inferencia filogenética

Se utilizó un enfoque bayesiano para la inferencia filogenética entre poblaciones de *E. platyacanthus* con secuencias de ADN de cloroplasto. Los análisis se llevaron a cabo con MRBAYES versión 3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Para detectar el modelo de evolución molecular mas adecuado (TrN) se empleó JMODELTEST (Posada, 2008) y el índice de información de Akaike (AIC). Se realizaron dos corridas cada una con 5,000,000 de generaciones muestreando cada 1000 generaciones. Los puntos de muestreo previos a la convergencia de las calificaciones de máxima verosimilitud, se desecharon (burn in 40%). Las probabilidades a posteriori se obtuvieron a partir de los árboles resultantes retenidos después del burn in a través de un árbol de compromiso de 50%. Como

grupos externos se emplearon secuencias de *Echinocactus horzonthalonius*, *Echinocactus texensis* y *Echinocactus grusonii*.

3.1.3.2 Estimación de tiempo de divergencia

La tasa de constancia de evolución de los haplotipos fue evaluada por una prueba de tasa relativa (Tajima., 1993) como se implementa en MEGA6 (Tamura et al., 2013) usando *E. horzonthalonius* como grupo externo.

3.1.3.3 Estructura genética y diferenciación poblacional

Se calcularon la diversidad haplotípica (h) y la diversidad nucleotídica (π) usando DnaSP (versión 4.0; Rozas et al., 2003).

3.1.4 Análisis de datos de ISSRs

3.1.4.1 Registro de la información

Las imágenes de los geles se analizaron en el programa Kodak ID Image Analysis Software (ID). Solo bandas presentes ambas en réplicas fueron registradas. Los perfiles de ISSRs se registraron para cada individuo como una variable binaria. La presencia de una banda se registró como 1 y la ausencia como 0. Para determinar la reproducibilidad del proceso de amplificación se determinó el porcentaje de bandas presentes en ambas réplicas.

3.1.4.2 Resumen de frecuencia de bandas

Se contabilizó el número de bandas obtenidas por marcador y se determinó cuántas de ellas eran raras (ocurren en menos del 15% de los individuos), bandas frecuentes (ocurren en más del 15% de los individuos y menos del 70% de ellos) y comunes (ocurren en más del 70% de los individuos).

Se definieron tres regiones o megapoblaciones a partir de las tres evidentes disyunciones que existen a lo largo de la distribución de *E. platyacanthus* para probar la hipótesis de que estas disyunciones aíslan genéticamente a las poblaciones dentro de cada región y que por tanto la diferenciación genética entre ellas es importante.

3.1.4.3 Variabilidad genética

Se estimaron los siguientes parámetros de diversidad genética con el software POPGENE versión 1.32 (Yeh et al., 1999) para cada una de las poblaciones y para las tres regiones definidas por las disyunciones de la distribución:

- i) el porcentaje de fragmentos polimórficos (PPF);
- ii) el Índice de Shannon (I) de la diversidad fenotípica (Lewontin, 1972);
- iii) la heterocigocidad esperada de Nei (1973) o diversidad genética (H_E)

Adicionalmente se empleó el software HICKORY versión 1.1 (Holsinger and Lewis, 2007) para calcular estimaciones bayesianas de diversidad genética intrapoblacional (H_B) bajo un modelo-libre usando los valores por defecto del programa burn in (50,000), muestras (250,000) y thinning (50) (Holsinger and Lewis, 2007).

3.1.4.4 Estructura genética

La subestructura se infirió con los coeficientes de diferenciación genética (G_{ST}) (Nei, 1973) calculados en POPGENE bajo el supuesto de equilibrio Hardy-Weinberg, así como de sus correspondientes parámetros bayesianos de F_{ST} (θ_B) y G_{ST} st (G_{ST-B}) (Holsinger, 1999) obtenidos en HICKORY bajo el “modelo libre” de muestreo de poblaciones.

Empleando ARLEQUIN, se realizó un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) con las distancias euclidianas entre los fenotipos de ISSR para deducir la significancia de divisiones genéticas entre regiones y poblaciones. Niveles significativos de estadísticos- Φ se basaron en 10000 permutaciones (Excoffier et al., 1992).

El aislamiento por distancia se probó por regresión de la matriz de distancias genéticas estándar de Nei (1972) (D), entre pares de poblaciones contra el logaritmo natural de la distancia geográfica en kilómetros entre poblaciones. La prueba de significancia se realizó con una prueba de Mantel

basada en 10000 aleatorizaciones de la matriz D. Se empleó el paquete VEGAN para R (Oksanen et al., 2013).

3.1.4.5 Exploración gráfica de las relaciones genéticas entre poblaciones

Para visualizar las relaciones entre los fenotipos de ISSR la matriz de distancias euclidianas se sometió a un análisis de coordenadas principales (PCoA) implementado con ade4 (Dray et al., 2007). Así mismo la matriz de distancias genéticas para cada par de poblaciones se sometió a un análisis agrupamiento pareado no ponderado utilizando media aritmética, (UPGMA por sus siglas en inglés) implementado en TFPGA (Miller, 1997). Los valores de bootstrap se obtuvieron por remuestreo con reemplazo de todos los loci (10,000 permutaciones).

3.1.4.6 Análisis espacial de la variación genética

Se empleó un método bayesiano de análisis de conglomerados implementado en el software GENELAND, versión 3.1.4 (Guillot et al., 2005) para analizar mas a fondo la estructura genética de las poblaciones de *E. platyacanthus*. Este programa identificó la divergencia entre poblaciones considerando su ubicación espacial. Así se infirió el número de grupos de poblaciones diferentes (K) y se asignó a cada individuo a un grupo específico. K se determinó en 10 iteraciones empleando 1,000,000 de iteraciones para las simulaciones Monte Carlo vía cadenas de Markov.

3.2 Cuantificación de la variabilidad morfológica

3.2.1 Muestreo y colección de datos de espigas y de tallos.

Se tomaron muestras y mediciones de individuos reproductivos (240), de 65 a 110 cm de altura, de 15 poblaciones de *Echinocactus platyacanthus*, localizadas a lo largo del intervalo de distribución de esta especie (Cuadro 3-1) con el permiso SGPA/DGVS/01408. La ubicación de las localidades fue provista por el Dr. Hector Hernández Macías, curador de la colección de cactáceas del herbario MEXU.

Se tomaron mediciones de entre 10 y 20 individuos por población (Cuadro 3-4) de la altura de tallo (H), diámetro norte-sur del tallo (SD_{NS}), diámetro este

oeste del tallo (SD_{NS}), en un transecto de 1 km. Así mismo se midió la longitud de las espina central superior de la sexta areola contada a partir del ápice y hacia abajo en los lados, norte, este, oeste y sur del tallo (SL_N , SL_S , SL_E , SL_W).

A partir de estas variables se calcularon nuevas variables a las que de ahora en adelante se les llamarán variables compuestas. Estas variables se calcularon de la siguiente manera: la excentricidad del tallo $ES = \sqrt{1 - \left(\frac{SD_{EW}}{SD_{NS}}\right)^2}$, la excentricidad del ápice $EA = \sqrt{1 - \left(\frac{AD_{NS}}{AD_{EW}}\right)^2}$ y la diferencia entre la suma de la longitud de las espinas norte y la sur, y la suma de longitud de las espinas este y oeste $SL_{DIF} = (SL_N + SL_S) - (SL_E + SL_W)$. Estas variables resumen la información de las originales y hace mas sencillo el análisis (Cuadro 3-5).

Se obtuvieron datos de clima a través de WorldClim (<http://www.worldclim.org>) a una resolución de 2.5 arco-minuto (~5km) para cada una de las localidades (Hijmans et al., 2005). Estos datos representan valores extremos de clima que se esperaba tuvieran un efecto importante sobre las variables morfológicas estudiadas (Cuadro 3-6). Se obtuvo la elevación solar al medio día por localidad de los solsticios de verano e invierno con el programa en línea Sun Chart que provee el Laboratorio de Monitoreo de Radiación Solar de la Universidad de Oregon, at <http://solardat.uoregon.edu/>. Los valores obtenidos se transformaron a radianes (Cuadro 3-7).

3.2.2 Análisis estadístico de datos de espinas y de tallos

Se llevaron a cabo análisis de covarianza, empleando a la altura como covariable debido a que esta variable está altamente correlacionada con el resto de las variables morfológicas, para determinar si existían diferencias entre orientaciones y localidades.

Para determinar si existían diferencias significativas en la longitud de las espinas por orientación se llevó a cabo un análisis de covarianza empleando altura como covariable. Para determinar si existían diferencias significativas en las medias de los diámetros de los tallos por orientación se llevó a cabo un análisis de

covarianza no paramétrico pues no se cumplía con el supuesto de homogeneidad de pendientes. Esto mismo ocurrió con la prueba para determinar si existían diferencias significativas entre los diámetros del disco apical.

Se determinó si había diferencias entre localidades para cada una de las variables compuestas a través de un análisis de covarianza.

Para explorar las relaciones entre variables bioclimáticas y variables morfológicas se realizó un análisis de correlación de Pearson. Aquellas variables con correlaciones significativas mayores a 0.5 y menores a -0.5 se emplearon en modelos de regresión lineal múltiple por pasos.

Para explorar las relación entre las variables compuestas, las de ubicación geográfica y las de variación genética se realizó una prueba de mantel (DINIZ-FILHO et al., 1999) empleando las distancias entre poblaciones en kilómetros, la matriz de distancias euclidianas entre individuos de calculadas con las tres variables compuestas (EA, ES y SL_{DIF}) y las distancia genética entre individuos calculadas con la matriz de ISSRs.

El estadístico de Mantel es el siguiente:

$$Z = \sum_i \sum_j (M_{ij} D_{ij})$$

donde M_{ij} es la matriz de distancias euclidianas de las variables morfológicas y D_{ij} puede ser la matriz de distancias geográficas o la matriz de distancias genéticas de Nei calculadas en POPGEN. El nivel de significancia del estadístico se calculó comparando el valor Z con un modelo nulo de distribución de Z obtenida estimando este parámetro múltiples veces (10,000) aleatorizando las matrices de distancias. Se empleó el paquete VEGAN para R (Oksanen et al., 2013). Se revisaron también las relaciones existentes entra cada variable y las variables geográficas y genéticas.

Cuadro 3-4 Localidades y tamaño de muestra de las poblaciones estudiadas en el análisis de variación morfológica.

Clave	Localidad	Longitud	Latitud	n
I	Chazumba, Oaxaca	-97.68	18.2	20
II	Zapotitlán, Puebla	-97.57	18.32	20
III	Tlacotepec, Puebla	-97.72	18.67	20
IV	Metztitlán, Hidalgo	-98.68	20.48	15
V	Tolimán, Querétaro	-99.95	20.91	10
VI	Cadereyta, Querétaro	-99.74	20.96	8
VII	Tierra Blanca, Guanajuato	-100.19	21.08	10
VIII	Guadalcázar, San Luis Potosí	-100.49	22.63	20
IX	Tula, Tamaulipas	-99.71	23.01	16
X	Matehuala, San Luis Potosí	-100.62	23.48	20
XI	Mazapil, Zacatecas	-101.58	24.65	20
XII	Galeana, Nuevo León	-100.04	24.78	20
XIII	Saltillo, Coahuila	-101.07	25	10
XIV	Rayones, Nuevo León	-100.06	25.05	10
XV	Cedros, Zacatecas	-101.77	24.66	9

Cuadro 3-5 Variables morfológicas.

Clave	Variable morfológica
H	Altura de la planta
SD _{NS}	Diámetro N-S del tallo
SD _{EW}	Diámetro E-W del tallo
AD _{NS}	Diámetro N-S del ápice
AD _{EW}	Diámetro E-W del ápice
SL _N	Longitud de la espina central N
SL _S	Longitud de la espina central S
SL _E	Longitud de la espina central E
SL _W	Longitud de la espina central O
Variables compuestas	
ES	Excentricidad del tallo
EA	Excentricidad del disco apical
SL _{DIF}	Diferencia entre espinas

Cuadro 3-6 Variables bioclimáticas

BIO₁ = Annual mean temperature

BIO₂ = Mean diurnal range (mean of monthly (maximum temperature – minimum temperature))

BIO₃ = Isothermality (BIO₂/BIO₇)*100

BIO₄ = Temperature seasonality (standard deviation * 100)

BIO₅ = Max. temperature of the warmest month

BIO₆ = Min. temperature of the coldest month

BIO₇ = Temperature annual range (BIO₅-BIO₆)

BIO₈ = Mean temperature of the wettest quarter

BIO₉ = Mean temperature of the driest quarter

BIO₁₀ = Mean temperature of the warmest quarter

BIO₁₁ = Mean temperature of the coldest quarter

BIO₁₂ = Annual precipitation

BIO₁₃ = Precipitation of the wettest month

BIO₁₄ = Precipitation of the driest month

BIO₁₅ = Precipitation seasonality (coefficient of variation)

BIO₁₆ = Precipitation of the wettest quarter

BIO₁₇ = Precipitation of the driest quarter

BIO₁₈ = Precipitation of the warmest quarter

BIO₁₉ = Precipitation of the coldest quarter

Cuadro 3-7 Variables de radiación solar

Clave	Variable radiación solar
SE _{JUN}	Elevación solar a medio día del 21 de junio
SE _{DIC}	Elevación solar al medio día del 21 de diciembre

3.2.3 Muestreo y colección de datos de variables estomáticas.

En el Anexo se enuncian las localidades en dónde se tomaron muestras y se describen los métodos de procesamiento del tejido la obtención de imágenes y su procesamiento.

3.2.4 Análisis estadístico de variables estomáticas.

Las variables que se midieron fueron la densidad estomática (número de estomas por milímetro cuadrado), índice estomático (proporción de poros estomáticos en relación al total de células) y longitud del estoma. Cada una de estas variables se midió en cada orientación del tallo. Se tomaron mediciones en cinco tallos por localidad. Se ajustaron modelos de efectos mixtos incluyendo aquellas variables bioclimáticas que tuvieran correlaciones altas y significativas con cada una de las variables estomáticas.

3.3 Modelado de distribución potencial.

Para determinar si existieron a lo largo del tiempo zonas que albergaran a *Echinocactus platyacanthus* y que por tanto pudieran considerarse refugios ante los dramáticos cambios climáticos que han ocurrido a lo largo de la Era Cuaternaria se realizaron modelos de distribución potencial con diferentes variables climáticas tanto de condiciones actuales como pasadas.

Se utilizó el modelo de máxima entropía implementado en el software libre MAXENT (Phillips et al., 2006) porque ha demostrado ser mas eficiente que otros modelos como BIOCLIM y GARP (Elith and Graham, 2009) sobre todo cuando solo se cuenta con datos de presencia y no de ausencia. Las capas climáticas tanto de condiciones actuales como de modelos de clima de mitad del Holoceno (hace 6000 años), último glacial máximo (hace 22,000 años) y el último período

interglacial (120,000-140,000 años antes del presente), se obtuvieron de WORLCLIM (Hijmans et al., 2005) a una resolución de 30" salvo por la del último glacial máximo cuya máxima resolución es de 2.5'. Esta capa se interpoló a 30" a través de un método de interpolación bilineal. Estas capas climáticas están disponibles en <http://www.worldclim.org/>. La selección de las variables climáticas se realizó en un proceso por pasos donde se evaluaron diferentes modelos de distribución potencial empleando la Kappa de Cohen (1960), el área bajo la curva de operación característica del receptor (Hanley and McNeil, 1982) y la contribución de cada variable al modelo. Estos modelos incluyeron en principio aquellas variables detectadas en los estudios de la relación entre variables climáticas y variables morfológicas presentados en la sección anterior y en los anexos A y B de este documento, y finalmente se agregaron otras que mostraron ser relevantes. Las capas seleccionadas fueron la BIO1, BIO3, BIO4, BIO6, BIO10, BIO11, BIO12, BIO16 Y BIO17 (Cuadro 3-6). Los datos de presencia fueron proporcionados por el Dr. Héctor Manuel Hernández Macías curador del Herbario Nacional MEXU. La base de datos de presencia que originalmente contenía 312 registros de presencia se depuró eliminando al azar al 50% de los registros en la zona con mas intensidad de muestreo (23.5°N, -100.70°W y 23.0°N, -99.7°W) para disminuir el efecto de diferencia entre esfuerzo de muestreo a lo largo de las distribución. La base de datos resultante consistió en 170 registros de presencia (Kramer-Schadt et al., 2013). Las capas climáticas se recortaron de manera que quedó incluida el área que describen las siguientes coordenadas, -106° Oeste 16° Norte y -96°Oeste y 30°Norte. Esta área es más grande que la que define los registros disponibles para asegurar que no hubiese limitaciones para las proyecciones en los modelos de condiciones climáticas pasadas.

Para el entrenamiento del modelo de distribución potencial con variables climáticas actuales se emplearon 127 registros seleccionados al azar de presencia. Para probar el modelo se emplearon 42 registros seleccionados al azar. Se realizaron 15 réplicas por re-muestreo para tener una estimación de la variabilidad de éstos modelos. Para realizar los mapas de presencia ausencia es

decir de áreas adecuadas e inadecuadas para el desarrollo de *E. platyacanthus*, se utilizaron los mapas promedio de cada periodo climático. Se empleo como umbral de decisión el valor promedio de umbrales logísticos de los décimos percentiles de presencia del modelo de entrenamiento generado con los datos de clima actual.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de secuencias de cloroplasto

Se secuenciaron 58 individuos de 13 poblaciones y cuatro individuos de diferentes especies que se emplearon como grupos externos. La longitud de la secuencia fue de 265 pares de bases. Se encontró una inversión de 25 pares de bases que se codificó como un solo evento evolutivo codificado al final del alineamiento. También se detectaron 15 sustituciones y 10 inserciones.

El árbol de compromiso de mayoría del 50% recuperó dos clados. Uno de ellos contiene a las poblaciones de las regiones sur y centro y tiene un soporte de 0.9. El segundo clado está integrado por todas las poblaciones del norte y tiene un soporte de 0.69 (Figura 1-1). El valor del estadístico de la tasa de constancia de cambio es de 95.34 (1gl, valor-P < 0.001).

Se encontraron 5 haplotipos y la diversidad nucleotídica es $\pi = 0.035(0.001)$. Se obtuvieron dos haplotipos, el primero correspondiente a la zona norte, esta compuesto los individuos de la zona norte, el segundo corresponde a la zona sur que contiene a los individuos del sur. No se obtiene mayor estructuración con las secuencias de *trnH-psbA*.

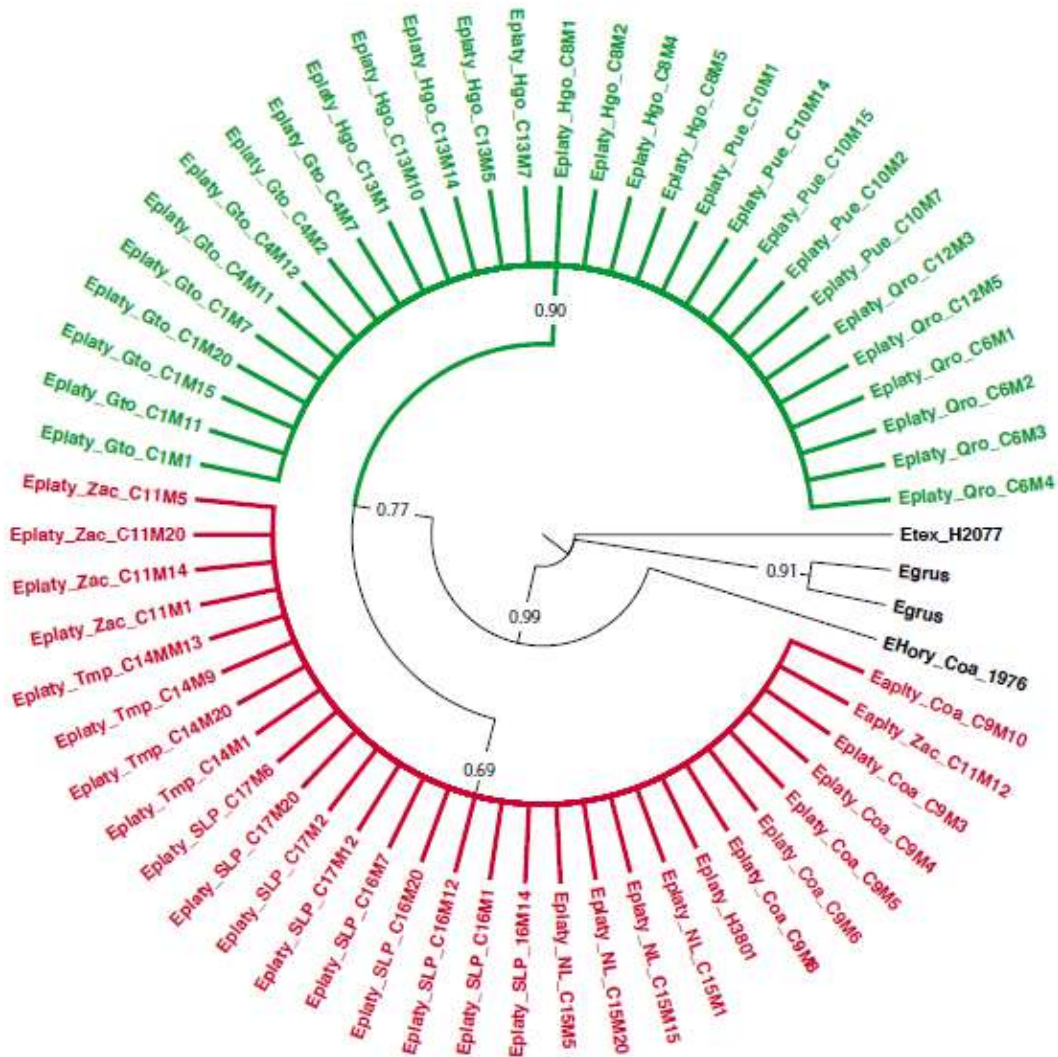


Figura 4-1 Árbol de compromiso de mayoría del 50%

4.2 Patrones de variación de ISSR y estructura poblacional

Con los 191 individuos de las 10 poblaciones estudiadas se obtuvieron para los 4 marcadores un total de 97 bandas con un promedio de 24.25 bandas por marcador. La proporción de bandas polimórficas oscila entre 77% y 92% siendo el promedio de 83%. El tamaño de los fragmentos osciló entre los 300 a 2000 pares de bases. Se observaron una gran cantidad de bandas raras (41%) entre todos los

marcadores mientras que del total de bandas el 24% eran bandas comunes o frecuentes y el 34% fueron bandas compartidas (Cuadro 4-1). Las bandas raras pueden ser empleadas para la identificación de poblaciones porque estas bandas son generalmente únicas a diferentes poblaciones. La reproducibilidad del proceso fue en promedio del 95%. El resto de los análisis se realizó solo con los loci polimórficos.

Cuadro 4-1 Resumen numérico de bandas de ISSR

ISSR	NTB	NBM	NBP	%BP	NBR	NBF	NBC
814	25	2	23	92%	14	2	9
840	31	5	26	84%	12	9	10
868	19	4	15	79%	5	6	8
879	22	5	17	77%	9	7	6

Número total de bandas (NTB)

Número de bandas monomórficas (NBM)

Número de bandas polimórficas (NBP)

Porcentaje de bandas polimórficas (%BP)

Número de bandas que amplificaron en menos del 15 % de las muestras (bandas raras) (NBR)

Número de bandas que amplificaron en más del 70% de las muestras (bandas frecuentes) (NBF)

Número de bandas que amplificaron en más del 15% pero menos del 70% de las muestras (bandas compartidas) (NBC)

En general las estimaciones de diversidad genética obtenidas son bajas. El índice de diversidad de Nei (H_E) va de 0.04 en Puebla e Hidalgo hasta 0.16 en Guanajuato (Cuadro 4-2). La baja diversidad genética observada en Puebla coincide con el estudio de Jiménez-Sierra (2008) realizado en diversas poblaciones de la región de Tehuacán. No existen estudios para otras regiones del país de manera que en general se puede decir que la diversidad genética de la mayor parte de las poblaciones es un poco más alta que la encontrada en Puebla e Hidalgo. De manera notable la región centro es la que tiene mayor diversidad genética y es debido sobre todo a Guanajuato. Las estimaciones bayesianas son semejantes a las obtenidas con las fórmulas de Nei (1973). La estimación de diferenciación genética G_{ST} (Nei, 1973), ($G_{ST} = (H_T - H_S) / F_T = (0.20 - 0.15) / 0.20 = 0.26$) obtenida a través de POPGENE, resalta la poca variabilidad presente en todas las regiones estudiadas pero también que existe una importante diferenciación entre las poblaciones como será evidente en los subsecuentes

análisis. La aproximación bayesiana a la estimación del parámetro de diferenciación genética (Holsinger, 1999) es $G_{st-B} = 0.62$ (0.02). Este valor difiere al obtenido con el método de Nei (1973) pero no contradice el hecho de que hay evidencia de una importante diferenciación genética entre las poblaciones.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) muestra que hay una considerable porción de la varianza genética total que corresponde a las diferencias entre regiones (28.22%) sin embargo el 40.06% de la varianza genética total corresponde a las poblaciones dentro de las regiones. También existe una considerable variación al interior de las poblaciones (31.72%) (Cuadro 4-3). La estructuración de las poblaciones en el espacio muy probablemente es mas compleja que la propuesta de tres regiones dado que existe importante variación entre poblaciones al interior de las regiones ($\Phi_{sc} = 0.56$).

Cuadro 4-2 Índices de diversidad genética y sus error estándar por población y por región

Población	PPF	I(±SD)	H_E(±SD)	H_B(±SD)
REGIÓN SUR				
OAX	27.5	0.14(0.25)	0.09(.18)	0.11(0.007)
PUE	13.75	0.07(0.12)	0.04(0.12)	0.06(0.007)
MEDIA	20.62	10.5	0.065	0.085
REGION	37.50	0.19(0.27)	0.12(0.18)	0.13(0.007)
REGIÓN CENTRO				
HGO	15.00	0.06(0.16)	0.04(0.1)	0.06 (0.008)
QRO	18.75	0.10(0.23)	0.07(0.16)	0.09(0.008)
GTO	47.50	0.24(0.27)	0.16(0.019)	0.15(0.012)
MEDIA	27.08	0.133	0.09	0.10
REGION	61.25	0.26(0.26)	0.17(0.18)	0.19(0.009)
REGION NORTE				
SLP1	23.75	0.11(0.21)	0.07(0.15)	0.08(0.008)
TAM	28.75	0.13(0.23)	0.08(0.16)	0.11(0.007)
SLP2	26.25	0.12(0.23)	0.08(0.15)	0.11(0.007)
ZAC	23.75	0.11(0.23)	0.08(0.16)	0.09(0.007)
NL	22.50	0.11(0.23)	0.08(0.16)	0.08(0.009)
MEDIA	25.00	0.11	0.08	0.09
REGION	58.75	0.24(0.26)	0.15(0.18)	0.19(0.008)

PPF: Porcentaje de fragmentos polimórficos

I: Índice de Shanon

H_E: Heterocigocidad esperada (Índice de diversidad genética)

H_B: Estimación bayesiana de heterocigocidad esperada

Cuadro 4-3 AMOVA

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Valor P
Entre grupos	2	536.543	3.08 Va	28.22% ($\Phi_{CT} = 0.28$)	0.0006
Entre poblaciones dentro de grupos	7	603.386	4.37 Vb	40.06% ($\Phi_{SC} = 0.56$)	<0.0001
Dentro de poblaciones	181	626.710	3.46 Vc	31.72% ($\Phi_{ST} = 0.68$)	<0.0001
Total	190	1766.639	10.91		

La prueba de Mantel muestra que la distancia genética entre poblaciones está positivamente relacionada con la distancia geográfica ($TM = 0.44$, $P < 0.01$) (Figura 4-2). Sin embargo al interior de las regiones, ésta asociación es más débil pues esta prueba no es significativa al interior de las tres regiones ($TM_{sur} = 0.08$, $P = 0.7$, $TM_{centro} = 0.77$, $P = 0.32$; $TM_{norte} = 0.09$, $P=0.6$). La variabilidad genética observada al interior de las regiones no puede explicarse por la distancia que existe entre las poblaciones.

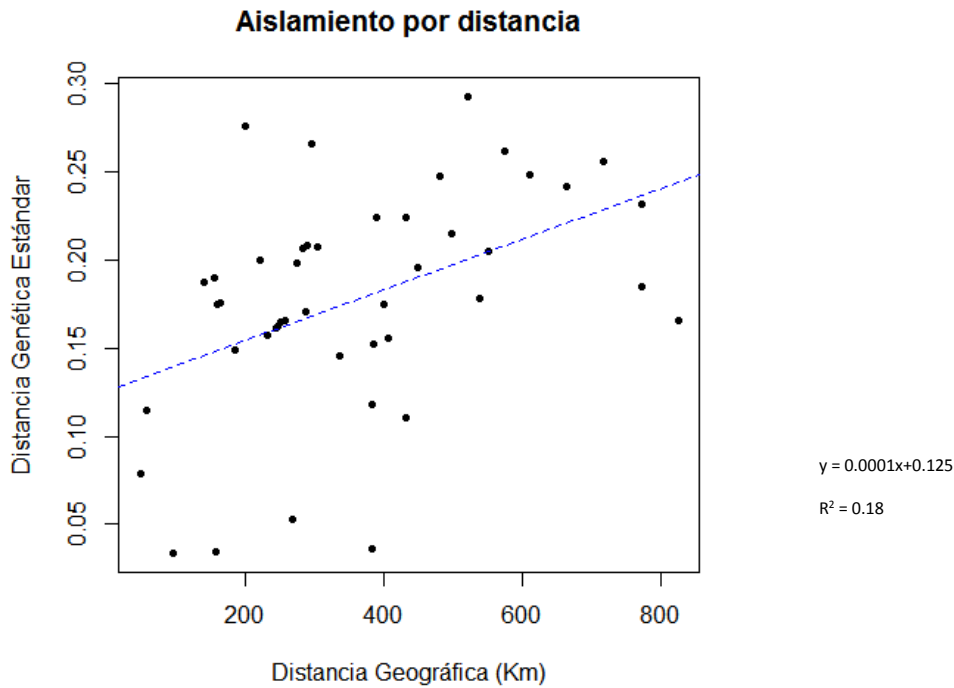


Figura 4-2 Aislamiento por distancia

Se eligieron los dos primeros ejes del análisis de coordenadas principales con las distancias euclidianas entre los ISSR de las poblaciones de *E. platyacanthus*. El primer eje explica el 24.6% de la variabilidad genética mientras que el segundo explica el 16.37% de la variabilidad observada. El primer eje separa las poblaciones del norte de las del sur y el segundo eje separa dentro de las del norte a las de San Luis Potosí del resto de las poblaciones nortteñas. Dentro del sur el segundo eje separa a las poblaciones de Guanajuato e Hidalgo de las de Querétaro, Puebla y Oaxaca. La separación sin embargo entre estos dos grupos sureños es más corta que la observada para los grupos del norte. Existen incluso miembros de la población de Guanajuato que están en ambos cúmulos (Figura 4-3).

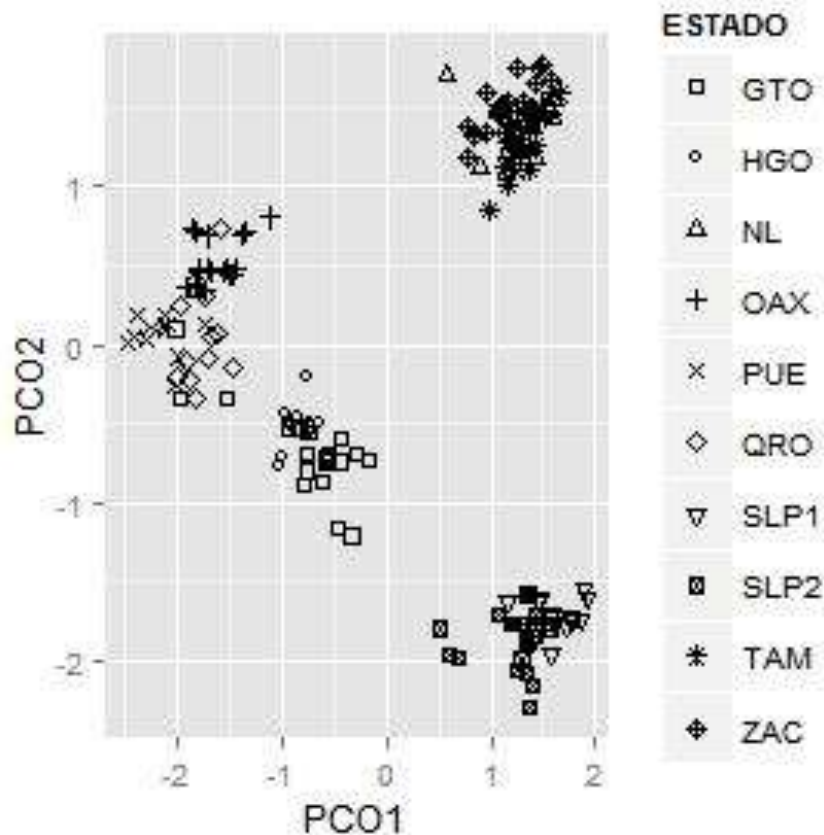


Figura 4-3 Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

El fenograma de UPGMA (Figura 4-4) divide las poblaciones en dos la primera contiene a las poblaciones de las regiones centro y sur (56%) mientras que el la segunda división contiene a todas las poblaciones de la región norte (65%). Dentro de un mismo grupo se encuentran las poblaciones de la región sur (100%) mientras que la región central esta dividida en dos la primera contiene a las poblaciones de Guanajuato y Querétaro (100%) y en la otra división se encuentra Hidalgo (56%). Las subdivisiones de la región norte se asemejan a las encontradas por el análisis de coordenadas principales. Por un lado se encuentran agrupadas las dos poblaciones de San Luis Potosí (70%) y el resto de las poblaciones del norte se encuentran en una sola rama (60%).

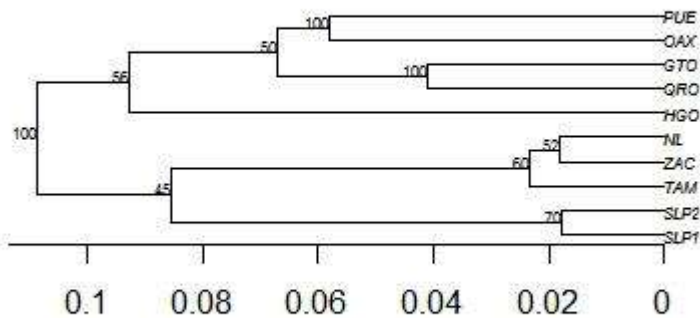


Figura 4-4 Fenograma de relaciones genéticas entre poblaciones.

De entre las diez corridas de GENELAND variando el valor de K, más del 50% resultaron en una moda de 6 poblaciones, y 30% dieron una moda de 7 poblaciones (Figura 4-5). Esto es consistente con la evidencia anteriormente expuesta de que la estructura genética de las poblaciones es más compleja que la propuesta inicialmente de tres regiones. En el Cuadro 4-4 se muestra la agrupación sugerida por GENELAND y en el Cuadro 4-5 se muestra el análisis de varianza molecular jerárquico considerando esta nueva agrupación. La diferencia entre grupos es apenas significativa y siguen siendo muy importantes las variaciones correspondientes al nivel entre poblaciones dentro de grupos y dentro de poblaciones. Es notable que las poblaciones de la región centro están asignadas a grupos distintos mientras que las poblaciones del sur quedan dentro de un solo grupo. La agrupación de las poblaciones del norte se asemeja a la agrupación obtenida por el análisis de coordenadas principales.

Cuadro 4-4 Agrupaciones sugeridas por el análisis bayesiano de conglomerados de las diferentes poblaciones

Población	PUE	OAX	HGO	QRO	GTO	SLP1	SLP2	TAM	ZAC	NL
Grupo	1	1	2	3	4	5	5	6	6	6

Cuadro 4-5 AMOVA considerando la agrupación sugerida por GENELAND.

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Valor P
Entre grupos	5	756.690	2.09 Va	20.53% ($\Phi_{CT} = 0.20$)	0.0366
Entre poblaciones dentro de grupos	4	383.239	4.63 Vb	45.44% ($\Phi_{SC} = 0.57$)	<0.0001
Dentro de poblaciones	181	626.710	3.46 Vc	33.99% ($\Phi_{ST} = 0.66$)	<0.0001
Total	190	1766.639	10.18		

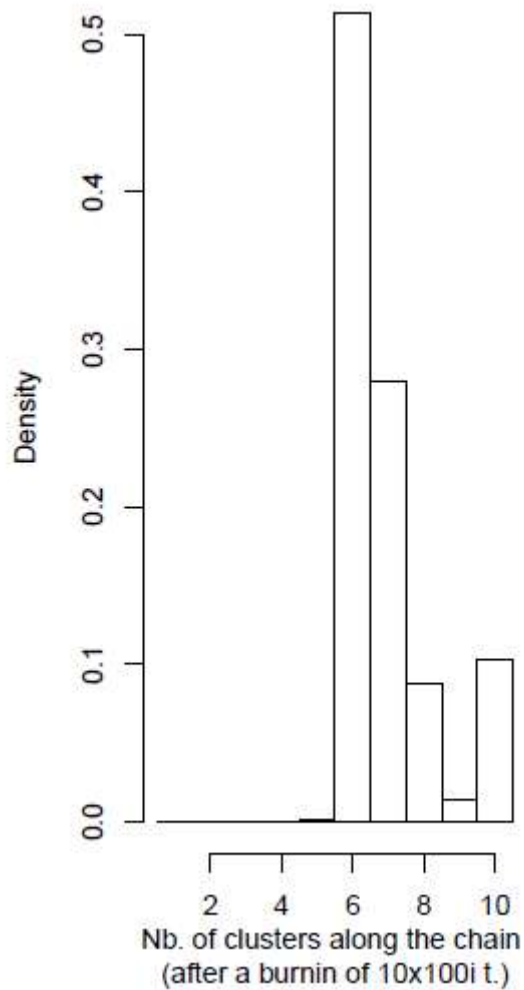


Figura 4-5 Número de grupos distintos detectados con GENELAND

4.3 Análisis de la variación morfológica

Se encontraron diferencias significativas entre las medias de la longitud de las espinas. La longitud de las espinas orientadas al norte son significativamente mas grandes que las del resto de las orientaciones, así mismo las espinas orientadas al sur son diferentes al resto de las orientaciones y mas grandes que las orientadas al este o al oeste, estas últimas no son estadísticamente diferentes (**Figura 4-6**). Las medias de los tallos por orientación se encontraron significativamente diferentes así como lo son los diámetros de los discos apicales (Figura 4-7, Figura

4-8).

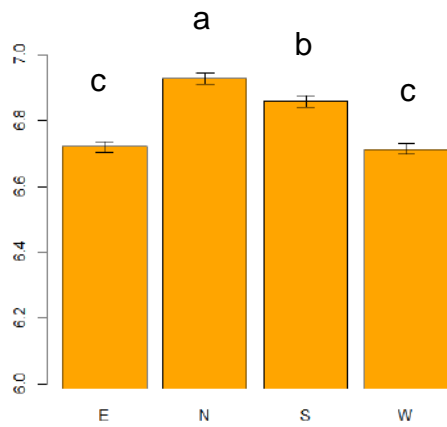


Figura 4-6 Gráfico de medias de la longitud de las espinas con barras de error estándar en cada una de las diferentes orientaciones. (Barras con letras iguales significa que las medias son estadísticamente iguales)

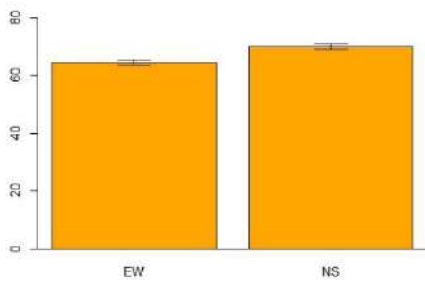


Figura 4-7 Gráfico de medias de diámetro de tallo por orientación y barras de error estándar

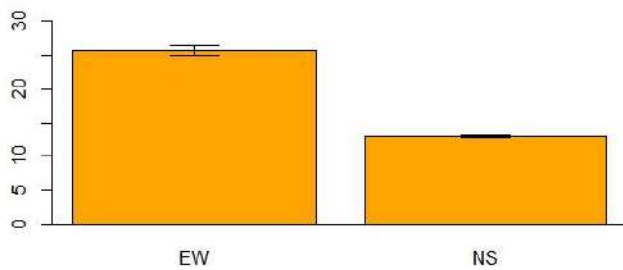


Figura 4-8. Gráfico de medias de diámetro del disco apical por orientación con barras de error.

El análisis de covarianza entre la variable de diferencia entre espinas por municipio detectó diferencias significativas entre las medias (Figura 4-9). Estas diferencias están asociadas de manera general con el gradiente latitudinal. La mayor parte de las poblaciones del sur y centro son muy semejantes entre ellas y forman un grupo etiquetados en la Figura 4-9 con el número "1". Estas poblaciones exhiben las menores diferencias entre las espinas norte-sur y este-oeste, es decir que las espinas en todas las orientaciones son más o menos de la misma longitud. Destaca en el grupo uno la población de Galeana pues ésta se encuentra en la región norte de la distribución y se encuentra agrupada dentro de las del sur y las del centro. Galeana es un municipio de Nuevo León que a pesar de encontrarse en la zona norte de la distribución tiene un clima menos extremo y más húmedo que los encontrados en otros municipios norteños (Cuadro 4-6). Se observa que las correlaciones más importantes entre la variable de diferencia entre espinas y variables bioclimáticas se encuentran las variables de variación estacional de temperatura (bio4), temperatura mínima del mes más frío (bio6), rango de temperatura anual (bio7) y temperatura mínima del cuatrimestre más frío (Cuadro 4-7). La longitud de las espinas parece estar asociada con las variaciones de temperatura a lo largo del año y con las temperaturas más bajas. Aún cuando la respuesta de esta variable obedece a la interacción de varios de factores pues otras variables bioclimáticas y de radiación solar tiene correlaciones altas y significativas, la temperatura influye considerablemente (Anexo). Probablemente las diferencias observadas estén relacionadas con el control de temperatura y en general con el manejo del presupuesto energético del tallo como se ha observado en otros cactus toneliformes (Lewis and Nobel, 1977; NOBEL, 1978). En lugares fríos, con radiación solar global limitada y variaciones de temperatura grandes quizás los tallos de *E. platyacanthus* tengan la necesidad de proteger con espinas más largas la zona norte del tallo para que no se escape calor mientras que las orientaciones este y oeste se mantiene con espinas más pequeñas permitiendo la captación de luz. Dado que Galeana no muestra variaciones tan drásticas de temperatura a lo largo del año como las observadas en Saltillo o Cedros, las

diferencias entre espinas no son tan grandes como los municipios del norte mencionados. De manera semejante podría explicarse la presencia de Tula en el grupo dos. Los grupos cuatro y cinco contienen a la mayor parte de los municipios norteros.

La respuesta de la diferencia entre la longitud de las espinas está altamente influenciada por variables ambientales. El análisis de regresión por pasos resultó en un modelo ($F_{6,8} = 11.15$, $p\text{-value} = 0.001$, $R^2_{ajustada} = 0.81$) que incluye a las variables altura de la planta, bio3, bio6, bio7, bio11 y bio19.

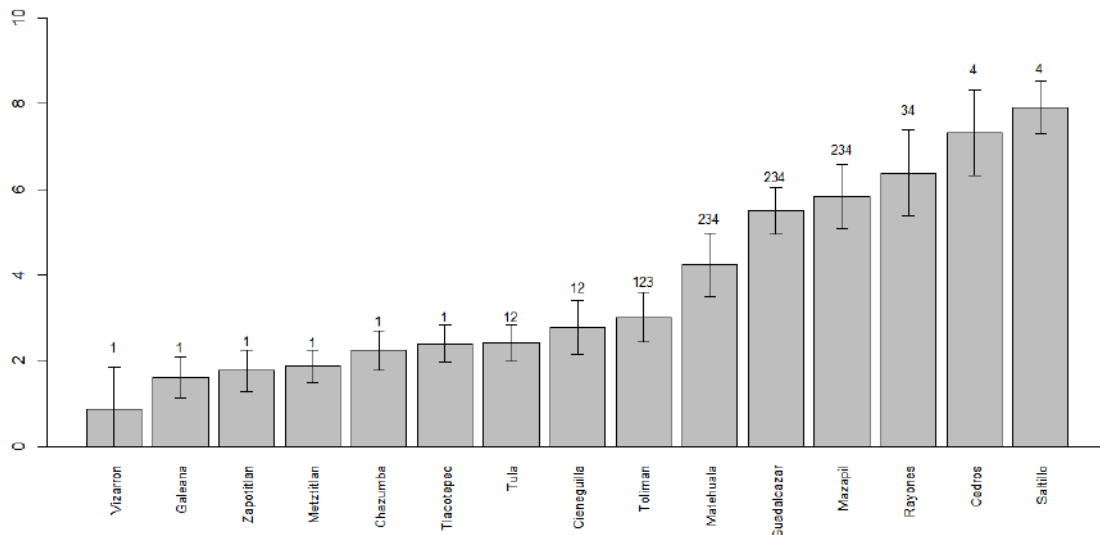


Figura 4-9 Medias con barras de error estándar de la variable Diferencia entre espinas. (Barras con números iguales significa que las medias son estadísticamente iguales)

Las medias de excentricidad de los tallos por municipio muestran diferencias significativas entre ellas Figura 4-10. Los tallos más excéntricos se encuentran en la zona norte de la distribución sobre todo en los poblados de Mazapil, Cedros y Saltillo. La excentricidad del tallo muestra una asociación débil con la latitud ($r = 0.47$, $p\text{-value} = 0.07$). Sin embargo, la asociación con las variables bioclimáticas bio4, bio6, bio7 y bio11 es importante (Cuadro 4-7)

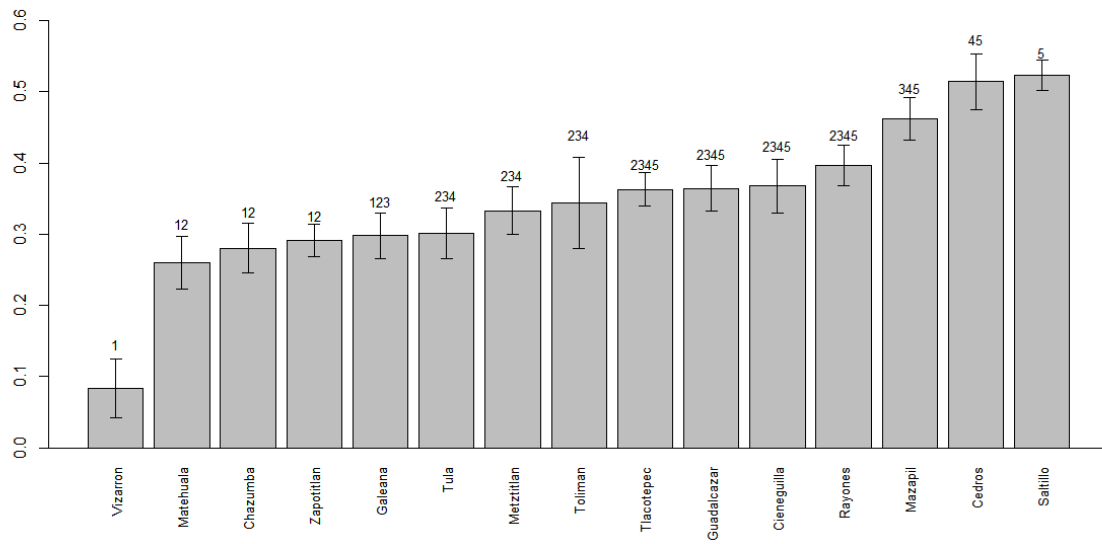


Figura 4-10 Medias con barras de error estándar de la variable Excentricidad del tallo. (Barras con números iguales significa que las medias son estadísticamente iguales)

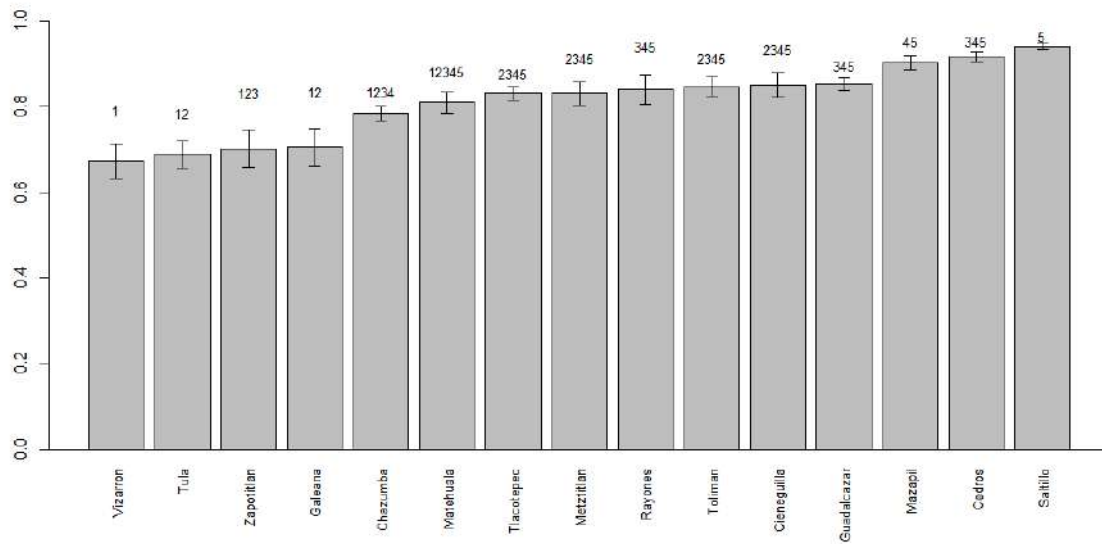


Figura 4-11 Medias con barras de error estándar de la variable Excentricidad del disco apical. (Barras con números iguales significa que las medias son estadísticamente iguales)

Cuadro 4-6 Medias de variables bioclimáticas por localidad.

	BIO2	BIO3	BIO4	BIO5	BIO6	BIO7	BIO8	BIO9	BIO10	BIO11	BIO12	BIO13	BIO14	BIO15	BIO16	BIO17	BIO18	BIO19	SE_DIC	SE_JUN
CEDROS	18.1	62.8	418	33.7	4.8	28.9	24.1	17.8	24.1	14	384	95	4	95.2	225	18	225	35	43	88.5
CHAZUMBA	16.6	69.7	199	30	6.2	23.8	20.6	16.1	20.9	16	608	158	3	100.7	318	16	257	22	48.5	85
CIENEGUILLA	16.2	66.1	244	30.1	5.5	24.6	19.9	14.8	20.6	14.8	482	92	7	83	252	27	153	32	45.5	88
GALEANA	15.5	66.2	264	29.2	5.8	23.4	20.6	15.5	21.1	14.8	483	74	14	56.6	196	46	181	54	42	88.5
GUADALCAZAR	16.3	64.3	298	30.9	5.6	25.3	20.7	18.1	21.6	14.5	558	99	11	75.7	277	47	165	56	44	89.5
MATEHUALA	16.4	62.4	367	32.1	5.9	26.2	22.9	16.4	23.5	14.9	415	67	7	60.6	176	39	159	49	43	90
MAZAPIL	19	68.7	346	30.7	3	27.7	20.3	15.4	20.8	12.5	471	75	17	48.9	193	61	186	68	42	88
METZTITLAN	15.1	65	247	28.2	5	23.2	18.8	13.9	19.7	13.9	513	118	7	82.9	252	29	159	29	46	87
RAYONES	14.6	63.5	299	28.8	5.8	23	20.8	14.9	21.3	14.1	669	140	15	72	307	55	263	59	42.5	88
SALTILLO	17.5	56.2	538	34.9	3.7	31.2	24.2	13.4	25.1	12.1	428	71	10	61.5	190	42	179	48	42.5	88
TLACOTEPEC	16.5	70.7	193	29.2	5.9	23.3	19.7	15.3	20	15.3	558	121	4	90.5	270	17	233	22	48	85
TOLIMAN	17.6	67.2	274	32.5	6.3	26.2	22.2	16.3	22.8	16.3	401	72	4	79.9	199	22	138	22	45.5	87.7
TULA	14.7	58.7	358	31.9	6.8	25.1	23.2	17	24.1	15.7	473	83	10	77.9	237	36	199	36	44.8	90
VIZARRON	17	66	284	33	7.3	25.7	23.1	16.9	23.6	16.9	467	88	6	81.9	223	24	158	24	45.5	87.5
ZAPOTITLAN	15.9	69.3	198	29.8	6.8	23	20.7	16.2	21	16.1	484	121	3	102.2	248	13	203	15	48	85

Cuadro 4-7 Correlaciones entre variables morfológicas y variables bioclimáticas

	ES	EA	SL_DIF
ES	1.00	0.85***	0.81***
EA	0.85***	1.00	0.81***
SL_DIF	0.81***	0.81***	1.00
BIO2	0.37	0.53*	0.41
BIO3	-0.30	-0.21	-0.52*
BIO4	0.53*	0.49	0.76***
BIO5	0.18	0.25	0.45
BIO6	-0.80***	-0.81***	-0.70**
BIO7	0.53	0.59*	0.70**
BIO8	0.08	0.05	0.41
BIO9	-0.27	-0.28	-0.05
BIO10	0.09	0.07	0.42
BIO11	-0.80***	-0.75**	-0.77***
BIO12	-0.12	-0.12	-0.10
BIO13	-0.09	-0.10	-0.18
BIO14	0.28	0.15	0.38
BIO15	-0.20	-0.22	-0.35
BIO16	-0.08	-0.09	-0.13
BIO17	0.29	0.25	0.48
BIO18	0.22	0.02	0.20
BIO19	0.41	0.37	0.61*
SEDIC	-0.42	-0.36	-0.64**
EJUN	0.11	0.11	0.38

El número de asteriscos (*) corresponde al nivel de significancia de la prueba de t para la correlación de Pearson:

* p < 0.05; ** p<0.01; ***p<0.001

La influencia de la temperatura sobre todo la de los meses más fríos y la variación de la misma son los factores que explican el comportamiento de esta variable. El modelo de regresión por pasos solo incluye a la altura de la planta y la variable climática bio4 ($F_{2,12} = 24.49$, $p\text{-value} < 0.0001$, $R^2_{\text{ajustada}} = 0.77$). Las tres variables morfológicas analizadas aquí están significativamente asociadas (Cuadro 4-7) y responden a las mismas variables ambientales. La excentricidad del tallo bien pudiera estar asociada al manejo del presupuesto energético pues el hecho de que los tallos en las zonas más extremas y con menor radiación solar global sobre todo en los meses invernales, tenga la cara este y oeste más ancha que las caras sur y norte le permiten capturar mayor radiación solar. Son precisamente las caras norte y sur las que poseen las espinas más largas en los tallos de las poblaciones más norteñas lo que probablemente actúa como un aislante al disminuir la pérdida de calor.

La excentricidad del disco apical muestra diferencias significativas entre poblaciones (Figura 4-11). Esta variable está asociada significativamente con las variables bioclimáticas bio2, bio6, bio7 y bio11 (Cuadro 4-7). El modelo de regresión por pasos ($F_{3,11} = 10.68$, $p\text{-value} = 0.001$, $R^2_{\text{ajustada}} = 0.67$) incluye a las variables de altura, bio7 y bio11. Como en las variables anteriores las tres localidades con discos apicales más excéntricos son Cedros, Mazapil y Saltillo. La excentricidad puede estar asociada a la forma del tallo pues un tallo muy excéntrico reduce el área que puede ocupar el disco apical haciendo que se extienda hacia los lados este-oeste para poder producir la suficiente cantidad de flores.

La prueba de mantel entre las distancias geográficas y las distancias de variables morfológicas no fue significativa ($r = 0.15$, $p\text{-value} = 0.14$), así mismo esta prueba con las matrices de distancias genéticas y morfológicas no fue significativa ($r = 0.04$, $p\text{-value} = 0.35$).

Las variables de excentricidad del tallo y del disco apical así como de la diferencia entre espinas responden a variables de variación de temperatura más

que a otros factores. No existe relación con la latitud ni con los marcadores moleculares empleados. Los gráficos de medias muestran que algunas poblaciones identificadas por los marcadores moleculares como poblaciones del norte se encuentran entre el grupo de las del sur y centro poniendo de manifiesto la naturaleza plástica de estas variables. Debido a que la respuesta de estos caracteres está determinada en gran medida por la variación ambiental no son de utilidad para incorporarlos en el análisis filogenético pues más reflejan el contexto ambiental en el que se encuentran que la historia genética de sus ancestros.

De manera análoga todas las variables estomáticas analizadas muestran una asociación muy importante con las variables bioclimáticas (Anexo) limitando su uso para el análisis filogenético.

4.4 Análisis de distribución potencial

El análisis de distribución potencial de *E. platyacanthus* realizado con MAXENT con datos climáticos actuales (Figura 4-12) tiene un promedio de la prueba de área bajo la curva de 0.974 y una desviación estándar de 0.007 (Figura 4-13). La Kappa de Cohen es de 0.86. Ambos valores muestran un buen desempeño del modelo. El valor del umbral seleccionado para generar los mapas de presencia-ausencia, correspondiente al promedio de los décimos percentiles de los modelos logísticos de entrenamiento (“10 percentile training presence logistic threshold”) es de 0.19.

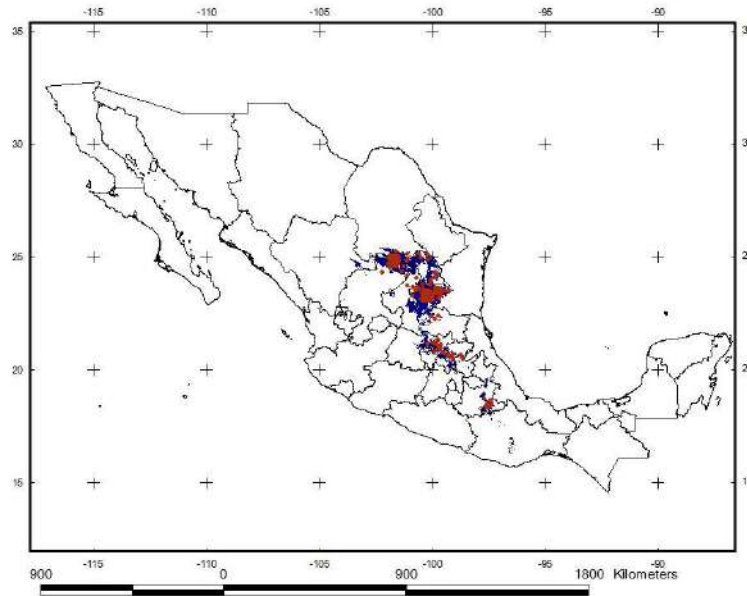


Figura 4-12 Modelo de distribución potencial de máxima entropía para datos climáticos actuales. Los puntos en rojo corresponden a los datos de presencia observada.

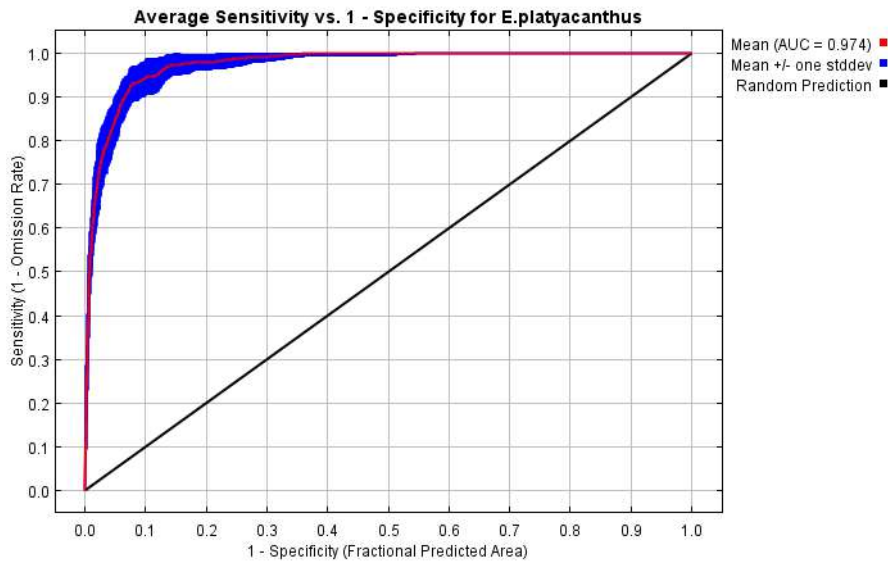


Figura 4-13 Curva de operación característica del receptor.

El modelo de distribución potencial con datos climáticos de hace 6000 años es muy semejante a la distribución actual (Figura 4-14), sin embargo la distribución potencial de *E. platyacanthus* durante el periodo del último máximo glacial (hace 21,000 años) debió ser muy diferente a la que ahora conocemos pues las zonas donde ahora se encuentran tenían condiciones climáticas desfavorables. Las zonas que podrían haber albergado a esta especie se muestran en la Figura 4-15. En la proyección al Periodo Interglacial Sangamoniense (Figura 4-16) se muestra que solo en región muy limitada correspondiente a una porción de lo que el día de hoy es Tehuacán Cuicatlán, era susceptible de albergar a *E. platyacanthus*. La distribución actual de *E. platyacanthus* debe ser el resultado de la influencia de los dramáticos cambios climáticos ocurridos en el Pleistoceno. La importante reducción en las áreas de distribución durante el Periodo Interglacial Sangamoniense debe haber disminuido la variabilidad genética, sin embargo aquellas poblaciones sobrevivientes capturaron la importante división registrada en el análisis de secuencias de cloroplasto. Este análisis reveló que existió una división entre las zonas del sur (Oaxaca, Puebla, Hidalgo, Querétaro y Guanajuato) y la zona norte (San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo Leon, Coahuila y Zacatecas). Basados en el árbol calibrado que se muestra en la Figura 4-17 este evento podría haber ocurrido hace aproximadamente 4.21 millones de años.

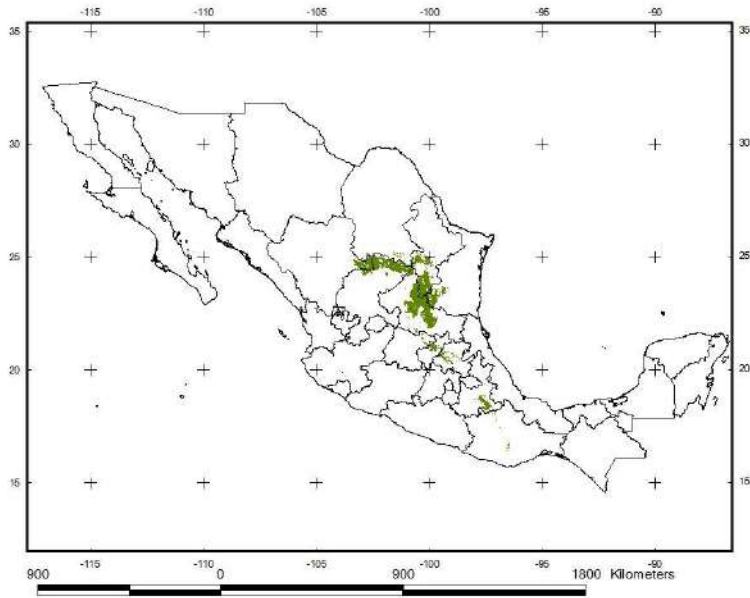


Figura 4-14 Modelo de distribución potencial de máxima entropía con datos de clima de mitad del Holoceno.

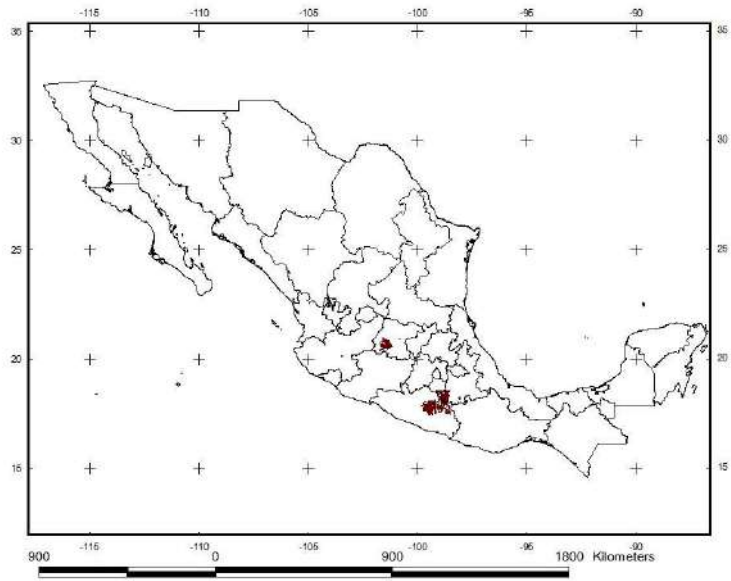


Figura 4-15 Modelo de distribución potencial de máxima entropía con datos de clima del último glacial máximo

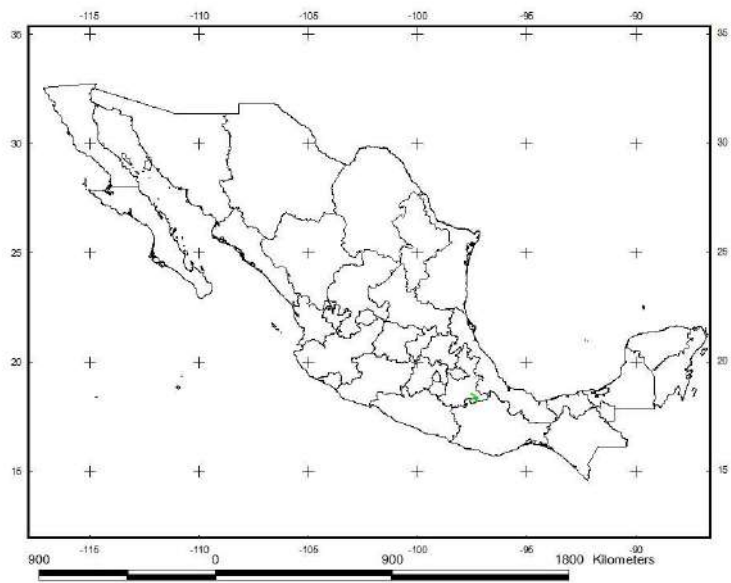


Figura 4-16 Modelo de distribución potencial de máxima entropía con datos de clima del periodo interglaciario Sangamoniense.

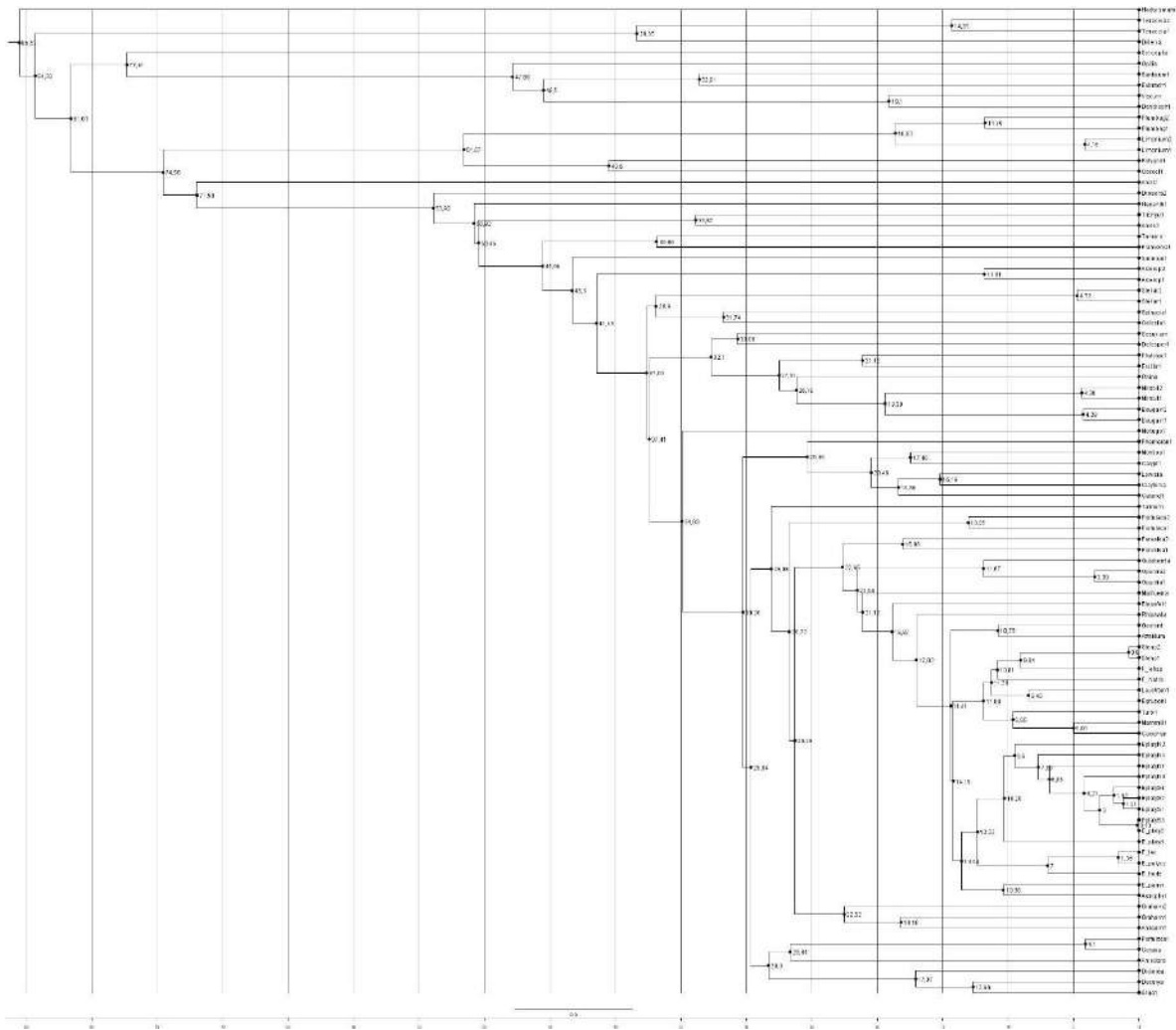


Figura 4-17 Cronograma basado en una aproximación bayesiana de una calibración de un árbol filogenético empleando datos de fósiles (Bell et al., 2010)

5. CONCLUSIONES

Con el marcador de cloroplasto se identificaron dos linajes bien definidos integrados el primero por poblaciones de la zona centro y sur y el segundo por poblaciones de la zona norte.

Los marcadores de ISSR recuperan también esta división pero muestra mayor estructuración al interior de estos grupos.

Las poblaciones en general muestran una baja variabilidad genética sobre todo en la zona sur de la distribución.

Las poblaciones que se estudiaron en la zona sur pertenecen a una reserva ecológica por lo que no están sujetas a explotación, sin embargo las poblaciones de la zona centro sobre todo aquellas en Querétaro son sujetas a una disminución importante de los individuo reproductivos poniendo en riesgo su viabilidad a futuro. Es importante definir zonas de conservación para la región centro y norte además de reforzar la implementación de la normativa existente que las protege

6. REFERENCIAS

- Alam, A., Kabir, G., UD-Deen, M., Hoque, E., 2011. Effect Of Water Stress On Stomatal Characters Of Twenty One Near Isogenic Lines Of Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Bangladesh J. Agric. Res.* 36, 173–181.
- Bárcenas, R.T., Yesson, C., Hawkins, J.A., 2011. Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics*.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2014. “lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4.
- Beerling, D.J., Chaloner, W.G., 1993. The impact of atmospheric CO₂ and temperature changes on stomatal density: observation from *Quercus robur* lammas leaves. *Ann. Bot.* 71, 231–235.
- Bell, C.D., Soltis, D.E., Soltis, P.S., 2010. The age and diversification of the angiosperms re-revisited. *Am. J. Bot.* 97, 1296.
- Bergmann, D.C., Sack, F.D., 2007. Stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* 58, 163–181.
- Bravo-Hollis, H., Sánchez-Mejorada, H., 1991. *Las Cactáceas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Bravo-Hollis, H., Sánchez-Mejorada, H., 1991. *Las Cactáceas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Casson, S.A., Hetherington, A.M., 2010. Environmental regulation of stomatal development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 90–95. doi:10.1016/j.pbi.2009.08.005
- Castillo del, R.F., Trujillo, S., 1991. Ethnobotany of *Ferocactus histrix* and *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae) in the Semiarid Central Mexico: Past, Present and Future. *Econ. Bot.* 45, 495–502.
- Chaerle, L., Saibo, N., Van Der Straeten, D., 2005. Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *TRENDS Biotechnol.* 23, 308–315.
- Chase, M.W., Hills, H.H., 1991. Silica Gel: An Ideal Material for Field Preservation of Leaf Samples for DNA Studies. *Taxon* 40, 215–220.

- Cohen, J., 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.* 20, 37–46.
- Correl, D.S., Johnson, M.C., 1970. *Manual of the Vascular Plants of Texas.*, Series of botanical studies. Texas Research Foundation, USA.
- Crawley, M., 2012. *The R Book.*, 2nd ed. Wiley.
- Croxdale, J.L., 2000. Stomatal patterning in angiosperms. *Am. J. Bot.* 87, 1069–1080.
- Delgado, D., Alonso-Blanco, C., Fenoll, C., Mena, M., 2011. Natural variation in stomatal abundance of *Arabidopsis thaliana* includes cryptic diversity for different developmental processes. *Ann. Bot.* 107, 1247–1258.
- DINIZ-FILHO, J.A.F., FUCHS, S., ARIAS, M.C., 1999. Phylogeographical autocorrelation of phenotypic evolution in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Heredity* 83, 671–680.
- Doheny-Adams, T., Hunt, L., Franks, P.J., Beerling, D.J., Gray, J.E., 2012. Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 547–555. doi:10.1098/rstb.2011.0272
- Donald L Swiderski, Miriam L Zelditch, William L Fink, 2002. Comparability, morphometrics and phylogenetic systematics, in: *Morphology, Shape and Phylogeny, Systematics Association Special Volumes.* CRC Press, pp. 67–99.
- Dray, S., Dufour, A.-B., others, 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Softw.* 22, 1–20.
- Edwards, E.J., Diaz, M., 2006. Ecological physiology of *Pereskia guamacho*, a cactus with leaves. *Plant Cell Environ.* 29, 247–256.
- Egli, U., 1984. Stomatal types of Cactaceae. *Plant Syst. Evol.* 146, 197–214.
- Elith, J., Graham, C.H., 2009. Do they? How do they? WHY do they differ? On finding reasons for differing performances of species distribution models. *Ecography* 32, 66–77.
- Engel, T., Barthlott, W., 1988. Micromorphology of epicuticular waxes in Centrosperms. *Plant Syst. Evol.* 161, 71–85.
- Ennos, R.A., Sinclair, W.T., Hu, X.S., Landon, A., 1999. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations., in: Hollingsworth, P.M., Bateman, R.M., Gornall, R.J. (Eds.), *Molecular Systematics and Plant Evolution.* Taylor & Francis, London, pp. 1–19.
- Evert, R.F., 2006. *Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development.*, 3rd ed. United States of America.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Felger, R.S., Lowe, C.H., 1967. Clinal variation in the surface-volume relationships of the columnar cactus *Lophocereus schottii*. *Ecology* 48, 530–536.

- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2002. Resolving taxonomic uncertainties and defining management units., in: *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, pp. 365–392.
- Franks, P.J., Beerling, D.J., 2009. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 10343.
- Fraser, L.H., Greenall, A., Carlyle, C., Turkington, R., Friedman, C.R., 2009. Adaptive phenotypic plasticity of *Pseudoroegneria spicata*: response of stomatal density, leaf area and biomass to changes in water supply and increased temperature. *Ann. Bot.* 103, 769–775.
- Ge, X.-J., Hwang, C.-C., Liu, Z.-H., Huang, C.-C., Huang, W.-H., Hung, K.-H., Wang, W.-K., Chiang, T.-Y., 2011. Conservation genetics and phylogeography of endangered and endemic shrub *Tetraena mongolica* (Zygophyllaceae) in Inner Mongolia, China. *BMC Genet.* 12, 1.
- Gibson, A.C., Nobel, P.S., 1986. *The Cactus Primer*, Primera edición. ed. First Harvard University Press, USA.
- Gómez-Hinostrosa, C., Hernández, H.M., 2000. Diversity, geographical distribution, and conservation of Cactaceae in the Mier y Noriega region, Mexico. *Biodivers. Conserv.* 9, 403–418.
- Guillot, G., Carpentier-Skandalis, A., 2011. On the informativeness of dominant and co-dominant genetic markers for Bayesian supervised clustering. *ArXiv Prepr. ArXiv11122868*.
- Guillot, G., Mortier, F., Estoup, A., 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes* 5, 712–715.
- Hamilton, M.B., 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol. Ecol.* 8, 521–523.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., 1996. Conservation genetics of endemic plant species., in: AVISE, J.C., Hamrick, J.L. (Eds.), *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York, USA, pp. 281–304.
- Hanley, J.A., McNeil, B.J., 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143, 29–36.
- Hanson, P., Samuelson, L., Wullschleger, S., Tabberer, T., Edwards, G., 1994. Seasonal patterns of light-saturated photosynthesis and leaf conductance for mature and seedling *Quercus rubra* L. foliage: differential sensitivity to ozone exposure. *Tree Physiol.* 14, 1351–1366.
- Haworth, M., Heath, J., McElwain, J.C., 2010. Difference in response sensitivity of stomatal index to atmospheric CO₂ among four genera of Cupressaceae conifers. *Ann. Bot.* 105, 411–418.
- Herce, M.F., Martorell, C., Alonso-Fernandez, C., Boullosa, L.F.V.V., Meave, J.A., 2014. Stem tilting in the inter-tropical cactus *Echinocactus platyacanthus*: an adaptive solution to the trade-off between radiation acquisition and temperature control. *Plant Biol.* 16, 571–577. doi:10.1111/plb.12085
- Hernández, M., Terrazas, T., Delgado, A.A., Luna, M., 2007. Los estomas de *Myrtillocactus geometrizans* (Marr. Ex. Pfeiff.) Console (Cactaceae): Variación en su área de distribución. *Rev. Fitotec. Mex.* 30, 235–240.

- Hernández-Oria, J., Chávez-Martínez, R., Sánchez-Martínez, 2007. Factores de riesgo en las cactaceae amenazadas de una región semiárida en el sur del Desierto Chihuahuense, México. *INTERCIENCIA* 32, 728–734.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A., 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25, 1965–1978. doi:10.1002/joc.1276
- Holsinger, K.E., 1999. Analysis of genetic diversity in geographically structured populations: a Bayesian perspective. *Hereditas* 130, 245–255.
- Holsinger, K.E., Lewis, P.O., 2007. Hickory: A Package for the Analysis of Population Genetic Data. Department of Ecology & Evolutionary Biology, U-3043, Storrs, CT.
- Holsinger, K.E., Lewis, P.O., Dey, D.K., 2002. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Mol. Ecol.* 11, 1157–1164.
- Jimenez-Sierra, C., 2008. Estudios sobre la Biología y Demografía de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto, en Zapotitlán de las Salinas, Puebla. (PhD). Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, D.F.
- Jiménez-Sierra, C.L., Eguiarte, L.E., 2010. Candy Barrel Cactus (Link & Otto: A Traditional Plant Resource in Mexico Subject to Uncontrolled Extraction and Browsing. *Econ. Bot.* 64, 99–108.
- Jiménez-Sierra, C.L., Eguiarte, L.E., 2010. Candy Barrel Cactus (*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto: A Traditional Plant Resource in Mexico Subject to Uncontrolled Extraction and Browsing. *Econ. Bot.* 64, 99–108.
- Jimenez-Sierra, C., Mandujano, M.C., Eguiarte, L.E., 2007. Are populations of the candy barrel cactus (*Echinocactus platyacanthus*) in the desert of Tehuacan, Mexico at risk? population projection matrix and life table response analysis. *Biol. Conserv.* 135, 278–292.
- Kramer-Schadt, S., Niedballa, J., Pilgrim, J.D., Schröder, B., Lindenborn, J., Reinfelder, V., Stillfried, M., Heckmann, I., Scharf, A.K., Augeri, D.M., Cheyne, S.M., Hearn, A.J., Ross, J., Macdonald, D.W., Mathai, J., Eaton, J., Marshall, A.J., Semiadi, G., Rustam, R., Bernard, H., Alfred, R., Samejima, H., Duckworth, J.W., Breitenmoser-Wuersten, C., Belant, J.L., Hofer, H., Wilting, A., 2013. The importance of correcting for sampling bias in MaxEnt species distribution models. *Divers. Distrib.* 19, 1366–1379. doi:10.1111/ddi.12096
- Lewis, D.A., Nobel, P.S., 1977. Thermal energy exchange model and water loss of a barrel cactus, *Ferocactus acanthodes*. *Plant Physiol.* 60, 609.
- Lewontin, R.C., 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biol.* 6, 381–398.
- Lissarre, M., Ohta, M., Sato, A., Miura, K., 2010. Cold-responsive gene regulation during cold acclimation in plants. *Plant Signal. Behav.* 5, 948.
- Loza-Cornejo, S., Terrazas, T., 2003. Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). *J. Plant Res.* 116, 27–35.
- Luomala, E., Laitinen, K., Sutinen, S., Kellomäki, S., Vapaavuori, E., 2005. Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine

- needles are affected by elevated CO₂ and temperature. *Plant Cell Environ.* 28, 733–749.
- Masterson, J., 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of Angiosperms. *Science* 264, 421–424.
- Mauseth, J.D., 2004. The Structure of Photosynthetic Succulent Stems in Plants Other Than Cacti. *Int. J. Plant Sci.* 165, 1–9.
- Mauseth, J.D., 2004. Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. *J. Plant Res.* 117, 69–76. doi:10.1007/s10265-003-0131-5
- Megged, A., 2010. *Social Memory in Ancient and Colonial Mesoamerica.* Cambridge University Press, USA.
- Miller, M.P., 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA): a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Northern Arizona University, USA.
- Mishra, M.K., 1997. Stomatal Characteristics at Different Ploidy Levels in *Coffea L.* *Ann. Bot.* 689–692.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 3321–3323.
- Nei, M., 1972. Genetic Distance between Populations. *Am. Nat.* 106, 283–292.
- NOBEL, P.S., 1978. Surface temperature of cacti - influences of environmental and morphological factors. *Ecology* 59, 986–995.
- Nobel, P.S., 1978. Surface Temperatures of Cacti—Influences of Environmental and Morphological Factors. *Ecology* 59, 986–995.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2013. *vegan: Community Ecology Package.*
- Omosun, G., Markson, A., Mbanasor, O., 2008. Growth and anatomy of *Amaranthus Hybridus* as affected by different crude oil concentrations. *Am.-Eurasian J. Sci. Res.* 3, 70–74.
- Paoletti, E., Grulke, N.E., 2005. Does living in elevated CO₂ ameliorate tree response to ozone? A review on stomatal response. *Environ. Pollut.* 483–493.
- Peleg, Z., Blumwald, E., 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 290–295. doi:10.1016/j.pbi.2011.02.001
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E., 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Model.* 190, 231–259. doi:10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026
- Pillitteri, L.J., Dong, J., 2013. Stomatal Development in *Arabidopsis*. *Arab. Book* 11, e0162. doi:10.1199/tab.0162
- Polisensky, D.H., Braam, J., 1996. Cold-shock regulation of the *Arabidopsis* TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiol.* 111, 1271–1279.
- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256. doi:10.1093/molbev/msn083

- Rasband, W.S., 1997. ImageJ. Bethesda, Maryland, USA, U. S. National Institutes of Health.
- Raven, J.A., 2002. Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytol.* 153, 371–386.
- R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- ROGIERS, S.Y., HARDIE, W.J., SMITH, J.P., 2011. Stomatal density of grapevine leaves (*Vitis vinifera* L.) responds to soil temperature and atmospheric carbon dioxide. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17, 147–152. doi:10.1111/j.1755-0238.2011.00124.x
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574. doi:10.1093/bioinformatics/btg180
- Royer, D., 2001. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 114, 1–28.
- Ruiz, L.P., Mansfield, T.A., 1994. A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytol.* 127, 473–481. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb03965.x
- Ruzin, S.E., 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press.
- Saidi, Y., Finka, A., Goloubinoff, P., 2011. Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance: Minireview. *New Phytol.* 190, 556–565. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03571.x
- Salisbury, B.B., Ross, C.W., 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont, USA.
- Schoch, P.G., Zinsou, C., Sibi, M., 1980. Dependence of the Stomatal Index on Environmental Factors during Stomatal Differentiation in Leaves of *Vigna sinensis* L. *J. Exp. Bot.* 31, 1211–1216. doi:10.1093/jxb/31.5.1211
- Sekiya, N., Yano, K., 2008. Stomatal density of cowpea correlates with carbon isotope discrimination in different phosphorus, water and CO₂ environments. *New Phytol.* 179, 799–807. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02518.x
- Tajima, F., 1993. Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. *Genetics* 135, 599–607.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Tanaka, Y., Nose, T., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., 2013. ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* 74, 448–457. doi:10.1111/tpj.12136
- Terrazas, T., Mauseth, J.D., 2002. Shoot anatomy and morphology., in: *Cacti: Biology and Uses*. University of California Press, USA, pp. 23–40.
- Trujillo, A.S., 1984. Distribución geográfica y ecológica de *Echinocactus platyacanthus* un ejemplo de distribución disyunta. *Cactáceas Suculentas Mex.* 29, 75–80.

- Valiente-Banuet, A., Solís, L., Dávila, P., del Coro, M., Silva, C., Treviño, J., Rangel-Landa, S., Casas, A., 2009. Guía de la vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán., 1st ed. UNAM, CONABIO, México.
- Xu, Z., Zhou, G., 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J. Exp. Bot.* 59, 3317–3325. doi:10.1093/jxb/ern185
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., Ye, Z.H., Mao, J.X., 1999. POPGENE: Microsoft Windows-Based User-Friendly Software for Population Genetic Analysis of Co-dominant and Dominant Markers and Quantitative Traits. Department of Renewable Resources, University of Alberta., Edmonton, Alberta.

7. Anexo A

Aplicación de métodos estadísticos en estudios sobre la variación morfológica de cactáceas

¹Rolando Tenoch Bárcenas Luna y ¹Mónica Eugenia Figueroa Cabañas

¹Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva; Unidad de Microbiología Básica y Aplicada de la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ.

1 Resumen

El uso de técnicas de estadística multivariada en el estudio de la variación clinal se explora en el contexto del análisis de variación morfológica de cactáceas en gradientes latitudinales.

2 Introducción

El Programa de Sistemática de Cactáceas del Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva se fundó originalmente para apoyar el Proyecto de Certificación de Cactáceas Mexicanas Amenazadas de zonas áridas (CCMA) gracias al patrocinio de la Iniciativa Darwin del Gobierno de la Gran Bretaña. Actualmente orienta su trabajo a cuatro líneas de investigación principales: biodiversidad y conservación de zonas áridas, sistemática molecular y tradicional, biogeografía y evolución y delimitación de especies y nomenclatura. La estadística forma parte fundamental en el análisis de la información que se genera en cada una de las líneas de investigación.

En este capítulo se ejemplificará el uso de algunas técnicas en la línea de biodiversidad y conservación. Los proyectos realizados en esta línea se han orientado a la

caracterización de la riqueza específica, variabilidad genética y morfológica de cactáceas. Esta información ha enriquecido nuestro conocimiento sobre los recursos naturales en zonas áridas del país y ha servido de apoyo al diseño de programas de conservación.

Dentro de los trabajos realizados en esta línea de investigación se encuentra la caracterización de la diversidad fenotípica de *Echinocactus platyacanthus*.

Estudio de caso: Variación morfológica de *Echinocactus platyacanthus* a través de un gradiente climático asociado con la latitud

Echinocactus platyacanthus pertenece a la familia *Cactaceae* y es una especie endémica a México. Esta especie se encuentra bajo protección especial de acuerdo a la NOM-ECOL-059-2001. Se le considera de importancia ecológica, económica y cultural. Esta cactácea se distribuye en una vasta región de la República Mexicana tanto en el Desierto Chihuahuense (Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas, San Luis Potosí), la Zona Árida Queretano-Hidalguesa (Guanajuato, Querétaro, Hidalgo) y, separada por el Cinturón Volcánico Trans-mexicano, también se le encuentra en el Valle de Tehuacán (Puebla y Oaxaca), (Gómez-Hinostrosa and Hernández, 2000; Trujillo, 1984) .

Actualmente y a pesar de que está protegida por la ley, las poblaciones de esta especie están siendo reducidas de manera alarmante por causas antropogénicas. Entre éstas podemos mencionar la pérdida y transformación de su hábitat a través del cambio del uso de suelo, el sobrepastoreo y la colecta excesiva de individuos de poblaciones naturales (Hernández-Oria et al., 2007). Destaca el uso de esta cactácea en la industria confitera para elaborar acitrón, dulce que es el que ejerce mayor presión sobre la cactácea pues la demanda a nivel nacional es importante. A pesar del uso extendido de las diferentes partes de esta cactácea desde tiempos antiguos, no existen actualmente programas de conservación, manejo y uso sostenible para esta especie.

Durante el desarrollo de *E. platyacanthus* se presentan importantes cambios en la forma del tallo, las costillas y el número de espinas. En fases juveniles presenta tallo globoso tuberculado que con el tiempo se fusionan para formar costillas con surcos intercostales profundos. Las costillas se incrementan en número con la edad resultando en

tallos columnares a teneliformes cuya altura puede ser mayor a 2 m y su diámetro cercano a 1 m. El número de espinas es variable tanto en las espinas radiales como en las centrales y en la medida en que pasa el tiempo se reducen en número incluso hasta reducirse a una sola. Bravo-Hollis y Sanchez-Mejorada (1991) reconocen tres formas geográficas separadas por el cinturón volcánico trans mexicano: **grandis** que puede ser encontrada en el valle de Tehuacan, **platyacanthus** que se distribuye en Hidalgo y Querétaro, y **visnaga** que se distribuye en Guanajuato, San Luis Potosí, Nuevo Leon, Zacatecas, Tamaulipas y Coahuila. De acuerdo a la descripción estas formas difieren principalmente en color y longitud de las espinas. Entre mas al norte las formas poseen espinas son mas largas (H Bravo-Hollis and Sánchez-Mejorada, 1991). La forma **grandis** presenta espinas negruzcas y las centrales pueden medir de 4 a 5 centímetros de longitud; la forma **platyacanthus** muestra espinas amarillentas y las centrales pueden medir de 6 a 8 cm de longitud; y la forma **visnaga** presenta espinas de amarillentas a rojizas y las centrales pueden medir de 8 a 10 cm. Hasta ahora no se han explorado las relaciones que guardan estas diferencias en longitud de espinas con la latitud y con variables climáticas. En otras especies de cactáceas se han estudiado la relación entre la cobertura de espinas y la temperatura superficial de los tallos y se ha encontrado que en *Mammillaria dioica*, *Carnegiea gigantea* y *Ferocactus acanthodes* el efecto de la cobertura de las espinas estriba en evitar que durante el día la superficie de los tallos se calienten y que por la noche no pierdan calor (Nobel, 1978). En este estudio se observó que este fenómeno tiene lugar porque las espinas reducen la interceptación solar y el índice de convección y evitan la emisión de radiación de onda larga del tallo al ambiente durante la noche. Esta acción de estabilizar la temperatura de los tallos es importante pues la mayor parte de las cactáceas se encuentra en zonas áridas y semi

áridas en donde las variaciones de temperatura en un mismo día son considerables y en estas condiciones algunos procesos metabólicos de las plantas pueden verse afectados. En este mismo estudio otros aspectos morfológicos de las mencionadas cactáceas fueron examinados como el diámetro y la altura de los tallos sobre la temperatura superficial de estas cactáceas. Decrementos en la altura de ejemplares de *Mammillaria* causaron incrementos en la temperatura nocturna de la superficie del tallo. En *Carnegiea gigantea* se observó que el decremento en el diámetro del tallo resultó en incrementos en la temperatura del ápice del tallo durante el día y un decremento en la noche. Los cambios que se observan en el diámetro de los tallos de *Carnegiea* a lo largo de su intervalo de distribución deben responder a evitar daños por frío en la zona norte. En *Lophocereus schottii* se midió la relación volumen-superficie en un rango latitudinal de cerca de 5 grados y se observó que en la medida en la medida en que se incrementaba la latitud disminuía la relación volumen-superficie. Los tallos de los ejemplares ubicados más al norte donde ocurren las temperaturas y precipitaciones más bajas incrementaron su volumen (Felger and Lowe, 1967).

En este estudio el objetivo principal es caracterizar la relación que existe entre variables morfológicas y variables climáticas en un gradiente latitudinal. Para este propósito se midieron, en individuos localizados en poblaciones representativas de todo el intervalo de distribución, la longitud de espinas centrales en las cuatro diferentes orientaciones de cada tallo, así como los diámetros del tallo norte-sur y este oeste y de manera semejante los diámetros del disco apical. Las preguntas que nos formulamos son las siguientes:

¿Existen diferencias entre la longitud de las espinas por orientación dentro de cada individuo? Si existen diferencias en longitud de espinas por orientación dentro de los tallos

¿Es semejante el comportamiento en los individuos de todas las localidades? ¿Es la dirección de la variación en la longitud de las espinas consistente a lo largo del gradiente latitudinal? ¿Existen diferencias entre los diámetros del tallo por orientación dentro del mismo ejemplar? ¿Existen diferencias entre los diámetros del disco apical por orientación dentro del mismo ejemplar? Si existen estas diferencias a nivel individuo ¿Ocurren éstas en la misma forma en todas las poblaciones? Si existen diferencias entre poblaciones ¿Están correlacionadas estas variables morfológicas con variables climáticas y de inclinación solar?

Métodos

Se tomaron muestras y mediciones de individuos reproductivos (240), de 65 a 110 cm de altura, de 15 poblaciones de *Echinocactus platyacanthus*, localizadas a lo largo del intervalo de distribución de esta especie (Tabla 1) con el permiso SGPA/DGVS/01408. La ubicación de las localidades fue provista por el Dr. Hector Hernández Macías, curador de la colección de cactáceas del herbario MEXU.

Se tomaron mediciones de entre 10 y 20 individuos por población (Tabla 1) de la altura de tallo (H), diámetro norte-sur del tallo (SD_{NS}), diámetro este oeste del tallo (SD_{NE}), en un transecto de 1 km. Así mismo se midió la longitud de la espina central superior de la sexta areola contada a partir del ápice y hacia abajo en los lados, norte, este, oeste y sur del tallo (SL_N , SL_S , SL_E , SL_W). A partir de estas variables se calcularon: la excentricidad del tallo

$$ES = \sqrt{1 - \left(\frac{SD_{EW}}{SD_{NS}}\right)^2}, \text{ la excentricidad del ápice } EA = \sqrt{1 - \left(\frac{AD_{NS}}{AD_{EW}}\right)^2} \text{ y la diferencia entre}$$

la suma de la longitud de las espinas norte y la sur, y la suma de longitud de las espinas este y oeste $SL_{DIF} = (SL_N + SL_S) - (SL_E + SL_W)$. Estas variables resumen la información de

las originales y hace mas sencillo el análisis (Tabla 2).

Se obtuvieron datos de clima a través de WorldClim (<http://www.worldclim.org>) a una resolución de 2.5 arco-minuto (~5km) para cada una de las localidades (Hijmans et al., 2005). Estos datos representan valores extremos de clima que se esperaba tuvieran un efecto importante sobre las variables morfológicas estudiadas (Tabla 3). Se obtuvo la elevación solar al medio día por localidad de los solsticios de verano e invierno con el programa en línea Sun Chart que provee el Laboratorio de Monitoreo de Radiación Solar de la Universidad de Oregon, at <http://solardat.uoregon.edu/>. Los valores obtenidos se transformaron a radianes.

Debido a que la altura de la planta está altamente correlacionada con el resto de las variables morfológicas se empleó como covariable en todos los análisis que se llevaron a cabo para contestar las preguntas formuladas arriba.

Para determinar si existían diferencias significativas en la longitud de las espinas por orientación se llevó a cabo un análisis de covarianza empleando altura como covariable.

Para determinar si existían diferencias significativas en las medias de los diámetros de los tallos por orientación se llevó a cabo un análisis de covarianza no paramétrico pues no se cumplía con el supuesto de homogeneidad de pendientes. Esto mismo ocurrió con la prueba para determinar si existían diferencias significativas entre los diámetros del disco apical.

Se caracterizó el gradiente climático asociado a la latitud a través de regresiones lineales univariadas de las medias de las variables climáticas por localidad y la latitud. Se realizaron regresiones lineales de las medias por población de cada variable morfológica con la latitud para visualizar la relación de naturaleza clinal de estas variables. También se realizó un análisis de correlación canónica para determinar la magnitud de las asociaciones entre las

variables morfológicas y las variables climáticas. Todos los análisis se realizaron con el lenguaje y entorno para el análisis estadístico R (R Core Team, 2014).

Resultados

Se encontraron diferencias significativas entre las medias de la longitud de las espinas. La longitud de las espinas orientadas al norte son significativamente diferentes al resto de las orientaciones, así mismo las espinas orientadas al sur son diferentes al resto de las orientaciones, sin embargo las espinas orientadas al este y al oeste no son estadísticamente diferentes (Figura 1).

Las medias de los tallos por orientación se encontraron significativamente diferentes así como lo son los diámetros de los discos apicales (Figura 2 y Figura 3)

Las variables climáticas resultaron en su mayoría asociadas significativamente con la latitud salvo por la temperatura media del trimestre mas caliente, la precipitación del trimestre mas húmedo y la precipitación del trimestre mas caliente (Figura 4).

La relación entre la latitud y la excentricidad del tallo, la excentricidad del disco apical y la diferencia entre espinas resultó significativa en todos los casos (Figura5)

La primera y segunda combinación lineal en el análisis de correlación canónica resultaron significativas mientras que la tercera no es significativa (Tabla 5)

Tabla 1. Ubicación de las localidades estudiadas y tamaños de muestra

Clave	Localidad	Longitud	Latitud	n
I	Chazumba, Oaxaca	-97.68	18.2	20
II	Zapotitlán, Puebla	-97.57	18.32	20
III	Tlacotepec, Puebla	-97.72	18.67	20
IV	Metztitlán, Hidalgo	-98.68	20.48	15
V	Tolimán, Querétaro	-99.95	20.91	10

VI	Cadereyta, Querétaro	-99.74	20.96	8
VII	Tierra Blanca, Guanajuato	-100.19	21.08	10
VIII	Guadalcázar, San Luis Potosí	-100.49	22.63	20
IX	Tula, Tamaulipas	-99.71	23.01	16
X	Matehuala, San Luis Potosí	-100.62	23.48	20
XI	Mazapil, Zacatecas	-101.58	24.65	20
XII	Galeana, Nuevo León	-100.04	24.78	20
XIII	Saltillo, Coahuila	-101.07	25	10
XIV	Rayones, Nuevo León	-100.06	25.05	10
XV	Cedros, Zacatecas	-101.77	24.66	9

Tabla 2. Variables morfológicas

Clave	Variable morfológica
H	Altura de la planta
SD _{NS}	Diámetro N-S del tallo
SD _{EW}	Diámetro E-W del tallo
AD _{NS}	Diámetro N-S del ápice
AD _{EW}	Diámetro E-W del ápice
SL _N	Longitud de la espina central N
SL _S	Longitud de la espina central S
SL _E	Longitud de la espina central E
SL _W	Longitud de la espina central O
ES	Excentricidad del tallo
EA	Excentricidad del disco apical
SL _{DIF}	Diferencia entre espinas

Tabla 3 Variables climáticas

Clave	Variable climática
BIO10	Temperatura media del trimestre mas caliente
BIO11	Temperatura media del trimestre mas frio
BIO16	Precipitación del trimestre mas húmedo
BIO17	Precipitación del trimestre mas seco
BIO18	Precipitación del trimestre mas caliente
BIO19	Precipitación del trimestre mas frio

Tabla 4. Variables de radiación solar

Clave	Variable radiación solar
SE _J	Elevación solar a medio día del 21 de junio

UN

SE

Elevación solar al medio día del 21 de diciembre

DIC

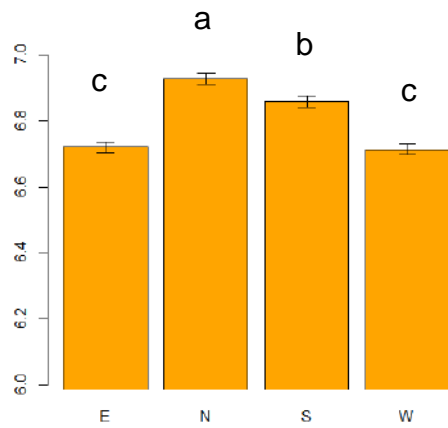


Figura 1. Gráfico de medias de la longitud de las espinas con barras de error estándar en cada una de las diferentes orientaciones. (Barras con letras iguales significa que las medias son estadísticamente iguales)

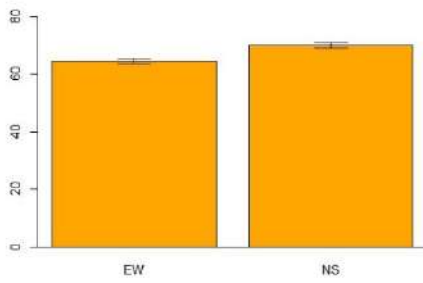


Figura 2. Gráfico de medias de diámetro del tallo por orientación y barras de error estándar.

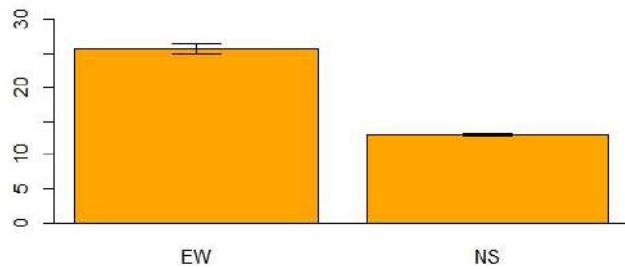


Figura 3. Gráfico de medias de diámetro del disco apical por orientación con barras de error estándar.

Figura 4. Gráficos de dispersión entre variables climáticas y latitud con línea de regresión

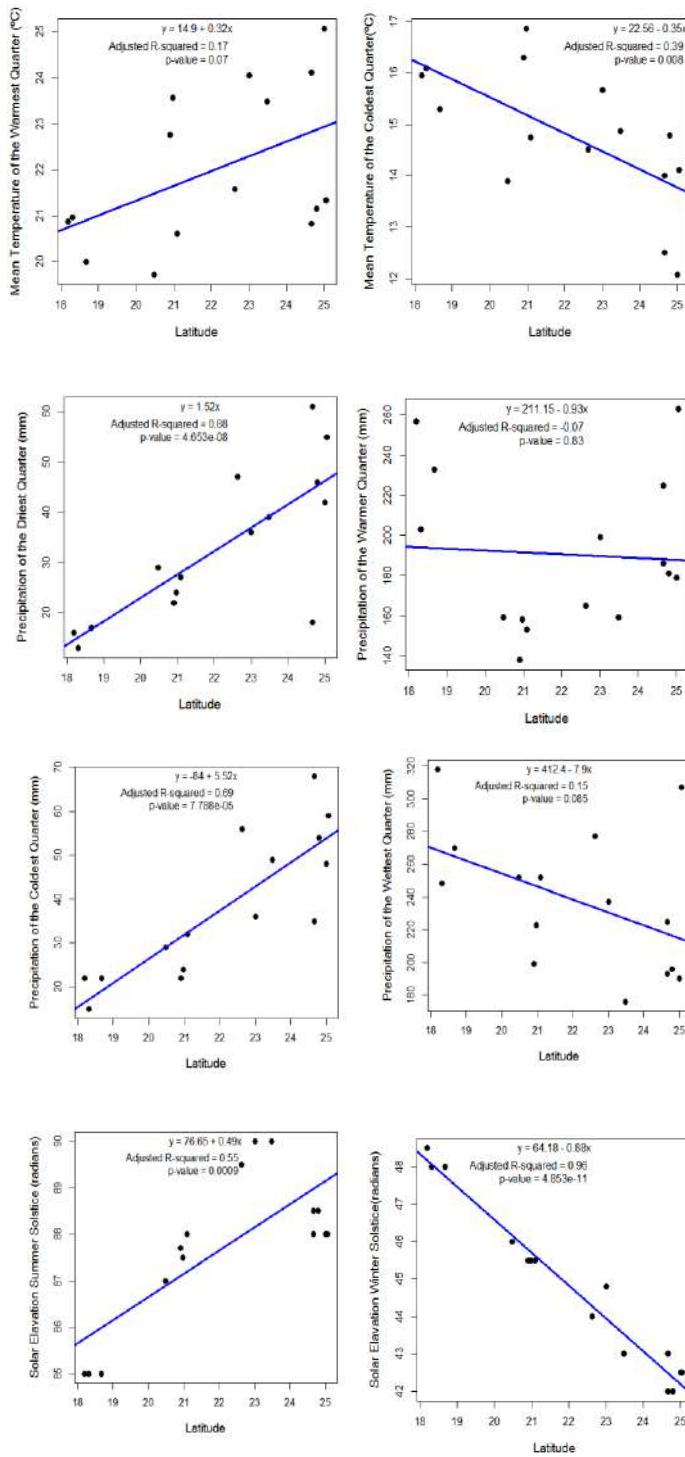


Figura 6. Gráficos de dispersión en tres dimensión con plano promedio.

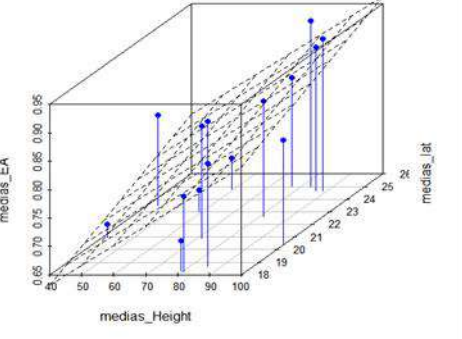
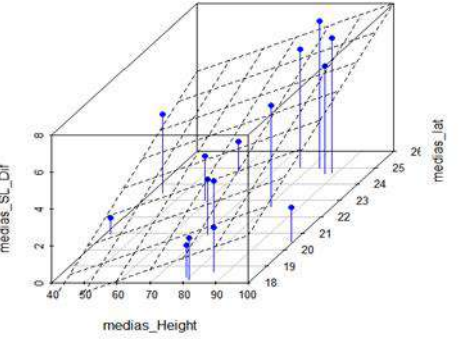
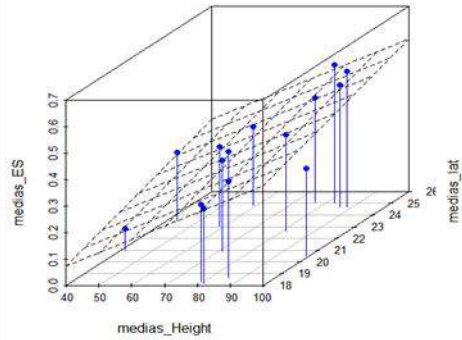


Figura 7. Gráfico de correlación canónica entre variables morfológicas y variables climáticas

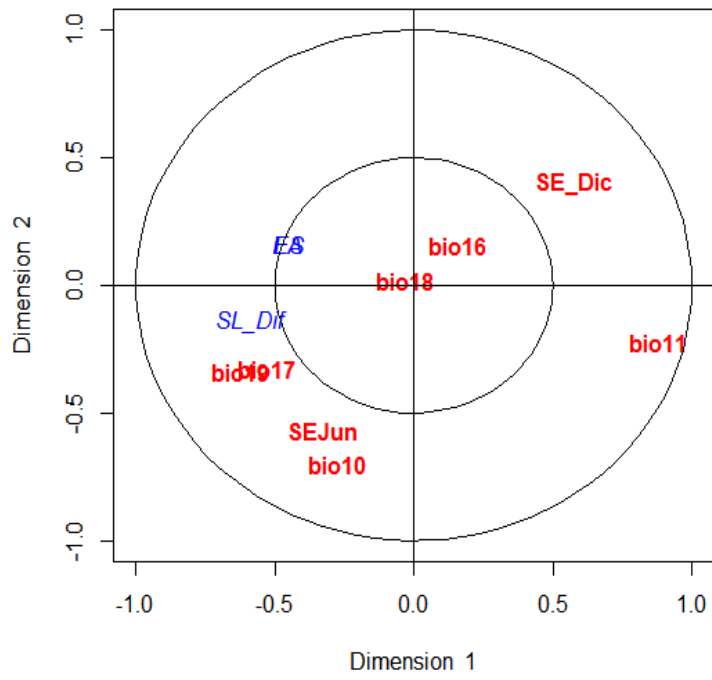


Tabla 5.

Variate	R ²	p-value	BIO10	BIO11	BIO16	BIO17	BIO18	BIO19	SE _{DIC}	SE _{JUN}
1	0.41	0.0001	-0.34	0.76	-0.01	0.07	0.005	-0.08	-0.003	0.15
2	0.12	0.0008	-0.60	-0.80	-0.006	-0.02	0.001	-0.05	0.027	0.27
3	0.04	0.2083	0.42	0.21	0.02	-0.14	-0.04	0.22	0.52	-0.48

Bibliografía

- Alam, A., Kabir, G., UD-Deen, M., Hoque, E., 2011. Effect Of Water Stress On Stomatal Characters Of Twenty One Near Isogenic Lines Of Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Bangladesh J. Agric. Res.* 36, 173–181.
- Bárceñas, R.T., Yesson, C., Hawkins, J.A., 2011. Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics*.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2014. “lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4.
- Beerling, D.J., Chaloner, W.G., 1993. The impact of atmospheric CO₂ and temperature changes on stomatal density: observation from *Quercus robur* lammas leaves. *Ann. Bot.* 71, 231–235.
- Bell, C.D., Soltis, D.E., Soltis, P.S., 2010. The age and diversification of the angiosperms re-revisited. *Am. J. Bot.* 97, 1296.
- Bergmann, D.C., Sack, F.D., 2007. Stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* 58, 163–181.
- Bravo-Hollis, H., Sánchez-Mejorada, H., 1991. *Las Cactáceas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Bravo-Hollis, H., Sánchez-Mejorada, H., 1991. *Las Cactáceas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Casson, S.A., Hetherington, A.M., 2010. Environmental regulation of stomatal development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 90–95. doi:10.1016/j.pbi.2009.08.005
- Castillo del, R.F., Trujillo, S., 1991. Ethnobotany of *Ferocactus histrix* and *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae) in the Semiarid Central Mexico: Past, Present and Future. *Econ. Bot.* 45, 495–502.
- Chaerle, L., Saibo, N., Van Der Straeten, D., 2005. Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *TRENDS Biotechnol.* 23, 308–315.
- Chase, M.W., Hills, H.H., 1991. Silica Gel: An Ideal Material for Field Preservation of Leaf Samples for DNA Studies. *Taxon* 40, 215–220.
- Cohen, J., 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.* 20, 37–46.
- Correl, D.S., Johnson, M.C., 1970. *Manual of the Vascular Plants of Texas.*, Series of botanical studies. Texas Research Foundation, USA.
- Crawley, M., 2012. *The R Book.*, 2nd ed. Wiley.
- Croxdale, J.L., 2000. Stomatal patterning in angiosperms. *Am. J. Bot.* 87, 1069–1080.

- Delgado, D., Alonso-Blanco, C., Fenoll, C., Mena, M., 2011. Natural variation in stomatal abundance of *Arabidopsis thaliana* includes cryptic diversity for different developmental processes. *Ann. Bot.* 107, 1247–1258.
- DINIZ-FILHO, J.A.F., FUCHS, S., ARIAS, M.C., 1999. Phylogeographical autocorrelation of phenotypic evolution in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Heredity* 83, 671–680.
- Doheny-Adams, T., Hunt, L., Franks, P.J., Beerling, D.J., Gray, J.E., 2012. Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 547–555. doi:10.1098/rstb.2011.0272
- Donald L Swiderski, Miriam L Zelditch, William L Fink, 2002. Comparability, morphometrics and phylogenetic systematics, in: *Morphology, Shape and Phylogeny, Systematics Association Special Volumes*. CRC Press, pp. 67–99.
- Dray, S., Dufour, A.-B., others, 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Softw.* 22, 1–20.
- Edwards, E.J., Diaz, M., 2006. Ecological physiology of *Pereskia guamacho*, a cactus with leaves. *Plant Cell Environ.* 29, 247–256.
- Eggli, U., 1984. Stomatal types of Cactaceae. *Plant Syst. Evol.* 146, 197–214.
- Elith, J., Graham, C.H., 2009. Do they? How do they? WHY do they differ? On finding reasons for differing performances of species distribution models. *Ecography* 32, 66–77.
- Engel, T., Barthlott, W., 1988. Micromorphology of epicuticular waxes in Centrosperms. *Plant Syst. Evol.* 161, 71–85.
- Ennos, R.A., Sinclair, W.T., Hu, X.S., Landon, A., 1999. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations., in: Hollingsworth, P.M., Bateman, R.M., Gornall, R.J. (Eds.), *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor & Francis, London, pp. 1–19.
- Evert, R.F., 2006. *Esau's Plant anatomy : meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and developmet.*, 3rd ed. United States of America.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Felger, R.S., Lowe, C.H., 1967. Clinal variation in the surface-volume relationships of the columnar cactus *Lophocereus schottii*. *Ecology* 48, 530–536.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2002. Resolving taxonomic uncertainties and defining management units., in: *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, pp. 365–392.
- Franks, P.J., Beerling, D.J., 2009. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 10343.
- Fraser, L.H., Greenall, A., Carlyle, C., Turkington, R., Friedman, C.R., 2009. Adaptive phenotypic plasticity of *Pseudoroegneria spicata*: response of stomatal density, leaf area and biomass to changes in water supply and increased temperature. *Ann. Bot.* 103, 769–775.
- Ge, X.-J., Hwang, C.-C., Liu, Z.-H., Huang, C.-C., Huang, W.-H., Hung, K.-H., Wang, W.-K., Chiang, T.-Y., 2011. Conservation genetics and phylogeography of endangered

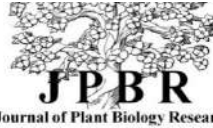
- and endemic shrub *Tetraena mongolica* (Zygophyllaceae) in Inner Mongolia, China. *BMC Genet.* 12, 1.
- Gibson, A.C., Nobel, P.S., 1986. *The Cactus Primer*, Primera edición. ed. First Harvard University Press, USA.
- Gómez-Hinostrosa, C., Hernández, H.M., 2000. Diversity, geographical distribution, and conservation of Cactaceae in the Mier y Noriega region, Mexico. *Biodivers. Conserv.* 9, 403–418.
- Guillot, G., Carpentier-Skandalis, A., 2011. On the informativeness of dominant and co-dominant genetic markers for Bayesian supervised clustering. *ArXiv Prepr. ArXiv11122868*.
- Guillot, G., Mortier, F., Estoup, A., 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes* 5, 712–715.
- Hamilton, M.B., 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol. Ecol.* 8, 521–523.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., 1996. Conservation genetics of endemic plant species., in: AVISE, J.C., Hamrick, J.L. (Eds.), *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York, USA, pp. 281–304.
- Hanley, J.A., McNeil, B.J., 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143, 29–36.
- Hanson, P., Samuelson, L., Wullschleger, S., Tabberer, T., Edwards, G., 1994. Seasonal patterns of light-saturated photosynthesis and leaf conductance for mature and seedling *Quercus rubra* L. foliage: differential sensitivity to ozone exposure. *Tree Physiol.* 14, 1351–1366.
- Haworth, M., Heath, J., McElwain, J.C., 2010. Difference in response sensitivity of stomatal index to atmospheric CO₂ among four genera of Cupressaceae conifers. *Ann. Bot.* 105, 411–418.
- Herce, M.F., Martorell, C., Alonso-Fernandez, C., Boullosa, L.F.V.V., Meave, J.A., 2014. Stem tilting in the inter-tropical cactus *Echinocactus platyacanthus*: an adaptive solution to the trade-off between radiation acquisition and temperature control. *Plant Biol.* 16, 571–577. doi:10.1111/plb.12085
- Hernández, M., Terrazas, T., Delgado, A.A., Luna, M., 2007. Los estomas de *Myrtillocactus geometrizans* (Marr. Ex. Pfeiff.) Console (Cactaceae): Variación en su área de distribución. *Rev. Fitotec. Mex.* 30, 235–240.
- Hernández-Oria, J., Chávez-Martínez, R., Sánchez-Martínez, 2007. Factores de riesgo en las cactaceae amenazadas de una región semiárida en el sur del Desierto Chihuahuense, México. *INTERCIENCIA* 32, 728–734.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A., 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25, 1965–1978. doi:10.1002/joc.1276
- Holsinger, K.E., 1999. Analysis of genetic diversity in geographically structured populations: a Bayesian perspective. *Hereditas* 130, 245–255.
- Holsinger, K.E., Lewis, P.O., 2007. *Hickory: A Package for the Analysis of Population Genetic Data*. Department of Ecology & Evolutionary Biology, U-3043, Storrs, CT.
- Holsinger, K.E., Lewis, P.O., Dey, D.K., 2002. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Mol. Ecol.* 11, 1157–1164.

- Jimenez-Sierra, C., 2008. Estudios sobre la Biología y Demografía de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto, en Zapotitlán de las Salinas, Puebla. (PhD). Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, D.F.
- Jiménez-Sierra, C.L., Eguiarte, L.E., 2010. Candy Barrel Cactus (Link & Otto: A Traditional Plant Resource in Mexico Subject to Uncontrolled Extraction and Browsing. *Econ. Bot.* 64, 99–108.
- Jiménez-Sierra, C.L., Eguiarte, L.E., 2010. Candy Barrel Cactus (*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto: A Traditional Plant Resource in Mexico Subject to Uncontrolled Extraction and Browsing. *Econ. Bot.* 64, 99–108.
- Jimenez-Sierra, C., Mandujano, M.C., Eguiarte, L.E., 2007. Are populations of the candy barrel cactus (*Echinocactus platyacanthus*) in the desert of Tehuacan, Mexico at risk? population projection matrix and life table response analysis. *Biol. Conserv.* 135, 278–292.
- Kramer-Schadt, S., Niedballa, J., Pilgrim, J.D., Schröder, B., Lindenborn, J., Reinfelder, V., Stillfried, M., Heckmann, I., Scharf, A.K., Augeri, D.M., Cheyne, S.M., Hearn, A.J., Ross, J., Macdonald, D.W., Mathai, J., Eaton, J., Marshall, A.J., Semiadi, G., Rustam, R., Bernard, H., Alfred, R., Samejima, H., Duckworth, J.W., Breitenmoser-Wuersten, C., Belant, J.L., Hofer, H., Wilting, A., 2013. The importance of correcting for sampling bias in MaxEnt species distribution models. *Divers. Distrib.* 19, 1366–1379. doi:10.1111/ddi.12096
- Lewis, D.A., Nobel, P.S., 1977. Thermal energy exchange model and water loss of a barrel cactus, *Ferocactus acanthodes*. *Plant Physiol.* 60, 609.
- Lewontin, R.C., 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biol.* 6, 381–398.
- Lissarre, M., Ohta, M., Sato, A., Miura, K., 2010. Cold-responsive gene regulation during cold acclimation in plants. *Plant Signal. Behav.* 5, 948.
- Loza-Cornejo, S., Terrazas, T., 2003. Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). *J. Plant Res.* 116, 27–35.
- Luomala, E., Laitinen, K., Sutinen, S., Kellomäki, S., Vapaavuori, E., 2005. Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO₂ and temperature. *Plant Cell Environ.* 28, 733–749.
- Masterson, J., 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of Angiosperms. *Science* 264, 421–424.
- Mauseth, J.D., 2004. The Structure of Photosynthetic Succulent Stems in Plants Other Than Cacti. *Int. J. Plant Sci.* 165, 1–9.
- Mauseth, J.D., 2004. Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. *J. Plant Res.* 117, 69–76. doi:10.1007/s10265-003-0131-5
- Megged, A., 2010. *Social Memory in Ancient and Colonial Mesoamerica*. Cambridge University Press, USA.
- Miller, M.P., 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA): a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Northern Arizona University, USA.
- Mishra, M.K., 1997. Stomatal Characteristics at Different Ploidy Levels in *Coffea* L. *Ann. Bot.* 689–692.

- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 3321–3323.
- Nei, M., 1972. Genetic Distance between Populations. *Am. Nat.* 106, 283–292.
- NOBEL, P.S., 1978. Surface temperature of cacti - influences of environmental and morphological factors. *Ecology* 59, 986–995.
- Nobel, P.S., 1978. Surface Temperatures of Cacti—Influences of Environmental and Morphological Factors. *Ecology* 59, 986–995.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2013. *vegan: Community Ecology Package*.
- Omosun, G., Markson, A., Mbanasor, O., 2008. Growth and anatomy of *Amaranthus Hybridus* as affected by different crude oil concentrations. *Am.-Eurasian J. Sci. Res.* 3, 70–74.
- Paoletti, E., Grulke, N.E., 2005. Does living in elevated CO₂ ameliorate tree response to ozone? A review on stomatal response. *Environ. Pollut.* 483–493.
- Peleg, Z., Blumwald, E., 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 290–295. doi:10.1016/j.pbi.2011.02.001
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E., 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Model.* 190, 231–259. doi:10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026
- Pillitteri, L.J., Dong, J., 2013. Stomatal Development in *Arabidopsis*. *Arab. Book* 11, e0162. doi:10.1199/tab.0162
- Polisensky, D.H., Braam, J., 1996. Cold-shock regulation of the *Arabidopsis* TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiol.* 111, 1271–1279.
- Posada, D., 2008. *jModelTest: Phylogenetic Model Averaging*. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256. doi:10.1093/molbev/msn083
- Rasband, W.S., 1997. *ImageJ*. Bethesda, Maryland, USA, U. S. National Institutes of Health.
- Raven, J.A., 2002. Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytol.* 153, 371–386.
- R Core Team, 2014. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- ROGIERS, S.Y., HARDIE, W.J., SMITH, J.P., 2011. Stomatal density of grapevine leaves (*Vitis vinifera* L.) responds to soil temperature and atmospheric carbon dioxide. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17, 147–152. doi:10.1111/j.1755-0238.2011.00124.x
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574. doi:10.1093/bioinformatics/btg180
- Royer, D., 2001. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 114, 1–28.
- Ruiz, L.P., Mansfield, T.A., 1994. A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytol.* 127, 473–481. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb03965.x
- Ruzin, S.E., 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press.

- Saidi, Y., Finka, A., Goloubinoff, P., 2011. Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance: Minireview. *New Phytol.* 190, 556–565. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03571.x
- Salisbury, B.B., Ross, C.W., 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont, USA.
- Schoch, P.G., Zinsou, C., Sibi, M., 1980. Dependence of the Stomatal Index on Environmental Factors during Stomatal Differentiation in Leaves of *Vigna sinensis* L. *J. Exp. Bot.* 31, 1211–1216. doi:10.1093/jxb/31.5.1211
- Sekiya, N., Yano, K., 2008. Stomatal density of cowpea correlates with carbon isotope discrimination in different phosphorus, water and CO₂ environments. *New Phytol.* 179, 799–807. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02518.x
- Tajima, F., 1993. Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. *Genetics* 135, 599–607.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Tanaka, Y., Nose, T., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., 2013. ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* 74, 448–457. doi:10.1111/tpj.12136
- Terrazas, T., Mauseth, J.D., 2002. Shoot anatomy and morphology., in: *Cacti: Biology and Uses*. University of California Press, USA, pp. 23–40.
- Trujillo, A.S., 1984. Distribución geográfica y ecológica de *Echinocactus platyacanthus* un ejemplo de distribución disyunta. *Cactáceas Suculentas Mex.* 29, 75–80.
- Valiente-Banuet, A., Solís, L., Dávila, P., del Coro, M., Silva, C., Treviño, J., Rangel-Landa, S., Casas, A., 2009. *Guía de la vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.*, 1st ed. UNAM, CONABIO, México.
- Xu, Z., Zhou, G., 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J. Exp. Bot.* 59, 3317–3325. doi:10.1093/jxb/ern185
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., Ye, Z.H., Mao, J.X., 1999. POPGENE: Microsoft Windows-Based User-Friendly Software for Population Genetic Analysis of Co-dominant and Dominant Markers and Quantitative Traits. Department of Renewable Resources, University of Alberta., Edmonton, Alberta.

8. Anexo B



REGULAR ARTICLE

Environmental effects on the variation of stomatal characters in *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae) along a latitudinal gradient.

Mónica Figueroa-Cabañas¹, Mahinda Martínez², Humberto Suzán-Azpiri² and Rolando T.

Bárceñas¹

¹ Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto, Anillo Vial Fray Junípero Serra, Querétaro, Qro. C.P. 76140, México.

² Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Av. de la Ciencia s/n, C.P. 76230, Querétaro, Querétaro, México.

ABSTRACT

In this study we used a mixed effects models approach to assess the relative importance that 19 environmental variables had in stomatal density, stomatal index and stomatal length for each of the four stem cardinal orientations in individuals of *Echinocactus platyacanthus* from six different populations throughout its natural distribution range. *E. platyacanthus* shows important variability in stomatal index, stomatal density and stomatal length in its natural distribution range. Stomatal index values can be explained mostly by annual precipitation and orientation of the stem. A reduction in stomatal index is observed in locations with limited precipitation. Significantly higher values of stomatal index were observed in the north face of the stems, while the rest of the orientations were statistically not different. Temperature annual range had an important effect on stomatal density while orientation does not have an effect in this variable. Stomatal density increases when temperature annual range decreases. Mean temperature of the driest year quarter explains most of the variability observed in stomatal length and

orientation does not have a significant effect for this variable. More extreme climatic conditions result in a decrement of stomatal frequency and stomatal size. Adjusting the frequency and size of stomata to different climatic conditions is a response of *E. platyacanthus* in order to optimize carbon absorption and minimize water loss through its stomata in highly different climatic regions.

Keywords: CAM species, water use efficiency, clinal variation, desert adapted, CO₂ intake, hypodermal character.



INTRODUCTION

The evolution of stomata was an important evolutionary step in plant diversification since it allows carbon dioxide absorption while limiting the loss of water from the plant (Raven, 2002). The stomatal complex is a specialized structure that functions as a valve and consists of a pore surrounded by two specialized guard cell and few to several adjacent cells that may differ (subsidiary cells) or not (neighboring cells) from other epidermal elements. These cells interact with guard

Corresponding author: Rolando T. Bárcenas

Corresponding author's email: rtenech@uag.mx

Crossing of the pore (Evert, 2006). The function of the stomatal complex depends on environmental variables such as internal and external CO₂ concentration, light, temperature, humidity and internal concentrations of different plant hormones (Evert, 2006; Salisbury and Ross, 1992). In addition, factors such as Ca⁺ ions may also be responsible for the proper function of the stomatal complex through the regulation of their concentrations in the vicinity of the subsidiary and neighboring cells (Ruiz and Mansfield, 1994). The environment also influences the process of stomata differentiation. There is evidence that mature leaves are sensible to light intensity and CO₂ concentrations and generate signals that impact the

new developing leaves. These signals maybe responsible for the variability in the density of stomas (Casson and Hetherington, 2010; Schoch et al., 1980) and partially explain the variations in stomatal density observed within a plant (Evert, 2006).

The stomatal index has been defined as the proportion of stomata in relation to the total number of epidermal cells. This index has been used instead, of or in addition, to stomatal density since density is a function of stomatal and epidermal cell (Loyer, 2001; Schoch et al., 1980). Since stomatal and epidermal cell sizes are affected by environmental conditions they obscure the information of stomatal initiation making them unreliable as a comparative measure for intra and inter-specific studies. The stomatal index is a more reliable indicator for these comparisons since it does not rely on stomatal length but in a proportion of total number of cells per unit area. Stomatal index is supported by the relation among stomata and ordinary epidermal cells and has been used to measure the effect of the environment in stomatal differentiation (Alam et al., 2011; Haworth et al., 2010; Schoch et al., 1980). Other variables that influence stomatal index and density, are temperature (Beerling and Chaloner, 1993; Luomala et al., 2005), ozone concentration (Hanson et al., 1994; Paoletti and Grulke, 2005), soil

contaminants (Omosun et al., 2008), soil phosphorous content (Sekiya and Yano, 2008), soil structure (Hernández et al., 2007) and water availability (Fraser et al., 2009; Xu and Zhou, 2008).

Length of stomata is another character influenced by the environment. Soil water content produces responses either in stomatal density and/or length. In different near isogenic lines of *Triticum aestivum* reduction of stomatal length and stomatal density were observed in low water conditions (Alam et al., 2011), while in *Arabidopsis thaliana* water stress conditions resulted in decrements in stomatal size and increments in stomatal density (Doheny-Adams et al., 2012). Ploidy levels also have an effect on stomatal size (Masterson, 1994; Mishra, 1997).

Optimal stomatal conductance in different environmental conditions must be attained by adjusting stomatal pore size and density (Chaerle et al., 2005). When water supply is restricted, stomatal function is accompanied with other plant modifications in order to make the process of carbon fixation more efficient without compromising the plant overall survival through water loss. Plants adapted to arid and semi-arid environments have developed unique and highly successful ways to respond to low levels of water, high temperatures and high irradiation levels. Along some of these successful modifications there are thick cuticles that restrict water loss and prevent harmful UV radiation to damage plant tissues but allow CO₂ to enter the plant. Thick cuticles are also related to the presence of sub-stomatic channels in order to conduct CO₂ to the chlorenchyma where photosynthesis is carried out and reducing water vapor loss. The reduction, loss, or modification of leaves are also characteristic responses in water deprived environments. The development of succulence and the presence of a CAM metabolism are among the most useful solutions that allow plants to survive and flourish in dry environments (Gibson and Nobel, 1986; J.D. Mauseth, 2004).

Number and size of stomata play a key role in the adaptation process of plants, therefore, it is expected that these traits are non random and are

determined by genetic and environmental factors (Bergmann and Sack, 2007). Variation on distribution, density, and size of stomata has been observed among (Croxdale, 2000) and within species (Delgado et al., 2011; Hernández et al., 2007).

Cacti represent a good example of arid-adapted plants since various typical plant morphological characters are lacking or have been modified. The majority of the species of cacti have lost their leaves or have been drastically reduced in form and function while the stem is the main photosynthetic organ where the stomata are located. The development of a thick cortex allows these plants to store great amounts of water and use it when needed. Nevertheless, moving water inside a voluminous stem requires other modifications such as the development of cortical bundles (Cactoideae) in order to warrant water access to external tissues such as the hypodermis and epidermis (James D. Mauseth, 2004). The epidermis of these plants varies in structure, but in general consist of a uniseriate layer of rectangular cells with thin walls covered by a hydrophobic cuticle. The thickness of the cuticle may vary from 1 to 200µm between species and might be related to water stress resistance also improved by wax deposits over the cuticle which functions as a barrier against water loss (Terrazas and Mauseth, 2002).

The stoma in the Cactaceae is similar to other angiosperms but restricted to the parallelocytic type (Eggli, 1984), either sunken and away from turbulent air, or superficially located in the epidermis (Terrazas and Mauseth, 2002). Below the epidermis there is a hypodermis consisting of a series of collenchymatous cells that confer rigidity to the structure. Stomatal frequencies are generally lower in cacti than those found in C3 and C4 species, and typically range from 20-80 stomata/mm² while in other flowering plants can be from 100-300 stomata/mm² (Gibson and Nobel, 1986).

Few studies have explored the relationship among frequency and size of stomata in Cactaceae with environmental variables. Edwards and Díaz

(Edwards and Diaz, 2006) studied *Pereskia guamacho*, a cactus with fully functional foliar leaves and found significant associations of stomatal density and stomatal length with water availability. Hernández et al. (Hernández et al., 2007) studied a geographically widespread leafless cactus and measured the variation in stomatal density and length and their relationship with soil texture, temperature, and precipitation. Soil texture correlated significantly with stomatal density but not with stomatal length and no relation was found among the stomatal variables and climatic variables although there were significant correlations with latitude. In that study only the northern face of the stem was considered and it is not known if there is significant variation among the other three sides of the stem, or if the environmental conditions are correlated to stomatal length of stomatal index.

Echinocactus platyacanthus is a slow growing barrel cactus distributed along the main body of the Chihuahuan Desert from approximately 18° N to 25° N latitude, and reaching up to three meters in height and more than one meter in diameter (H Bravo-Hollis and Sánchez-Mejorada, 1991). This specie is classified as “Near Threatened” by the UICN and is under special protection in Mexico since over collection of the tallest and widest individuals are used to supply the ornamental market and the traditional candy industry of “acitrón” which has severely depleted many of its natural populations (C.L. Jiménez-Sierra and Eguiarte, 2010).

E. platyacanthus is a good model to test associations among environmental variables and stomatal characters due to its wide geographic distribution in the arid and semi-

arid regions of Mexico and the different environmental conditions where it inhabit and has a CAM metabolism. In this study we aimed to explore the associations among stomatal index, stomatal density and stomatal length with 19 environmental variables such as temperature and precipitation and its categorizations among the four quarters of one annual cycle. This study also tested the hypothesis that stem orientation generates differences in stomatal variables since variations in stem shape have been observed in this specie due to different solar irradiation incidences along its latitudinal distribution (Herce et al., 2014).

MATERIALS & METHODS.

Study area: *Echinocactus platyacanthus* is found in the main body of the Chihuahuan Desert including its Meridional Region (the Queretaroan-Hidalgoan Arid Zone) and the Tehuacán-Cuicatlán Valley. Six populations scattered along the *E. platyacanthus* distribution range (Table 1) were sampled as representatives of the distribution range. Six populations were selected for sampling cover different vegetation types in the arid and semiarid regions of Mexico (Table 1) such as typical *Larrea tridentata* scrub (Correl and Johnson, 1970), rosetophylous scrub of *Yucca* (Correl and Johnson, 1970), (central-northern

Mexico) (Correl and Johnson, 1970), or cardonal vegetation (*Cephalocereus columna-trajani*) (Valiente-Banuet et al., 2009).

Sampling procedure: Individuals from 80 to 110 cm tall and at least 50 meters apart in order to minimize the probability of retrieving close relatives were sampled under collection permit 05870/10 from SEMARNAT in each population. Stem samples were collected with a 2.5 cm diameter core borer from 5 individuals per population. Two samples per individual were taken at mid height of the stem for the North, South, East and West directions.

Samples were directly stored in silica gel until needed. Herbarium vouchers are deposited in QMEX for each of the six populations studied (Table 1).

Epidermal sample preparation: Epidermis and hypodermis were isolated by placing samples in DI water for 24 hours, followed by 20 minutes of sonication in Aerosol-OT and then three subsequent rinses with DI water (technique developed by trial and error). The chlorenchyma and cortex were removed with a razor blade. Samples were dehydrated following Ruzin (Ruzin, 1999)

Table 1. Locations of the sampling sites for *Echinocactus platyacanthus* in Mexico.

Population	State	Locality	Longitude	Latitude	Altitude	Voucher no.
I	Puebla	San Lucas el Viejo	-97.7644°	18.7184°	2023	M. Figueroa (18)
II	Querétaro	Peña de Bernal	-99.9283°	20.7494°	2081	M. Figueroa (22)
III	Hidalgo	Cañon del infiernillo	-99.5448°	20.7188°	1761	M. Figueroa (8)
IV	San Luis Potosí	Mimbres	-100.5904°	23.7641°	1638	M. Figueroa (16)
V	Zacatecas	Concepción del Oro	-101.4633°	24.6173°	2188	M. Figueroa (11)
VI	Coahuila	Victoria	-101.0700°	24.9899°	1890	M. Figueroa (9)

and mounted in aluminum Zeiss stubs with carbon conductive double sided adhesive discs. Silica samples were directly mounted in aluminum Zeiss stubs for observation of epicuticular waxes. Photographs were taken at 10 kV in an EVO Zeiss SEM.

For optical microscopy, samples were rehydrated by immersion in DI water for 24 hours fixed in FAA and processed in standard procedures for paraffin sectioning through a series of ethanol dehydration. Sections were stained with safranin-fast green (Ruzin, 1999), observed in an Olympus BX43 and analyzed with Q-Capture Pro 7 software of Media Cybernetics, INC.

Data processing and statistical methods:

Three stomatal variables were studied (stomatal density, stomatal index and length of the stomatal guard cell) from five randomly selected microscopic field areas of 1mm² size (200X magnification) from each of the isolated epidermis. These three stomatal variables are defined as follows. Stomatal density –“SD” (number of pores per mm²), stomatal index - “SI”, calculated as the proportion of stomatal pores of the total number of epidermal cells and expressed as percentage. For the length of the stomatal guard cell - “L” (length between the junctions of the guard cells) one field of 0.25 mm² (500X magnification) was taken and five pores were measured. Also height of plant

–“H” was recorded from each individual in order to homogenize the population and discard height as another variable. The values for the analyses were the averages of the counts and measurements from each stem sample. Measures and cell counts were performed using the public domain image analysis software ImageJ 1.45 (Rasband, 1997). Nineteen bioclimatic variables (Table 2) were obtained from Worldclim v1.4 (www.worldclim.com) (Hijmans et al., 2005) with a resolution of ~1 km² to study their relationship with the stomatal variables.

Pearson product-moment correlation coefficients were calculated for all possible combinations of stomatal and environmental variables and t-tests for significance of all correlation coefficients were carried out. Variables with high correlation values were used in further analyses to explore their relationship with stomatal variables.

Mixed effects models were fit to stomatal variables using the Restricted Maximum Likelihood (REML) with lme4 package of R (Bates et al., 2014). Stomatal density was log_e transformed and stomatal index was square root transformed to improve normality and stabilize the variances. Orientation and environmental variables with the highest correlation values were treated as fixed factors and orientation within stem was treated as

random in all models. Variables in the models were selected with a top-down strategy where two models that differed by the presence of one variable were tested with a likelihood ratio test (LRT). These tests were performed with fitted models using maximum likelihood (ML). This process was repeated until only significant terms remained in the model and the lowest Akaike information criteria (AIC) was obtained. The significance of the variables that remained in the model was determined with a LRT comparing the models including and excluding the tested variable from the

model that had all the significant variables. Variance components of random effects are expressed as percentages of the total variance (Crawley, 2012). All analyses were performed in R [42].

RESULTS.

The cuticle of *Echinocactus platyacanthus* is a scurfy surface made of smooth irregular polygonal plate-like wax elements closely following the contours of underneath epidermal cells (Figure 1A). These plates are 3 μm thick (Figure 1B) and

Table 2. Mean of environmental variables per population.

Variables	Populations					
	I	II	III	IV	V	VI
BIO1 = Annual mean temperature	17.8	17.1	19.4	18.5	15	19.1
BIO2 = Mean diurnal range[1]	16.7	16.3	17	17.1	18	17.6
BIO3 = Isothermality (BIO2/BIO7)*100	71.2	66.6	67.5	64.2	69.16	56.5
BIO4 = Temperature seasonality[2]	191.1	247.8	259	358.8	311.3	530.2
BIO5 = Max. temperature of the warmest month	29.1	29.2	31.5	31	27.8	34.9
BIO6 = Min. temperature of the coldest month	5.6	4.7	6.3	4.4	1.7	3.8
BIO7 = Temperature annual range (BIO5-BIO6)	23.5	24.5	25.2	26.6	26.1	31.1

BIO8 = Mean temperature of the wettest quarter	19.5	19.5	21.6	21.6	17.7	24.2
BIO9 = Mean temperature of the driest quarter	15.2	13.9	17.2	15.1	13.4	13.6
BIO10 = Mean temperature of the warmest quarter	19.8	19.8	22.1	22.2	18.2	25.1
BIO11 = Mean temperature of the coldest quarter	15.2	13.9	15.9	13.7	10.7	12.3
BIO12 = Annual precipitation	575	529	449	442	459	434
BIO13 = Precipitation of the wettest month	125	116	85	70	69	72
BIO14 = Precipitation of the driest month	4	7	5	11	16	10
BIO15 = Precipitation seasonality[3]	89.6	87.6	80.1	66.3	43.3	61.4
BIO16 = Precipitation of the wettest quarter	279	295	222	197	186	193
BIO17 = Precipitation of the driest quarter	19	29	25	41	56	43
BIO18 = Precipitation of the warmest quarter	238	164	154	193	156	184
BIO19 = Precipitation of the coldest quarter	24	34	33	44	66	50

typical of many cacti species (Engel and Barthlott, 1988). The ordinary cells in the epidermis ranged in length from 30 μm to 50 μm and from 20 μm to 30 μm in width (Figure 2A and 2B). Four subsidiary cells surround the guard cells forming a stomatal complex of the paralellocytic type slightly sunken with respect to the rest of the ordinary cells. The epidermis of *E. platyacanthus* (Figure 3A and 3B) is made of one layer of epidermal cells with no apparent orientation and the thickness of these cells ranged from 10 to 15 μm (Figure 3A). The hypodermis is made of six to seven layers of approximately 45 μm thick chollenchymatosus cells with embedded druses from 15 to 20 μm in diameter that marked the boundary between each of

the hypodermal layers (Figure 3B). The substomatic chamber extends throughout the hypodermis until it reaches the cortex (Figure 3B).

Stomatal Index: Stomatal index correlates significantly with stomatal density but not with stomatal length. Important negative correlations with latitude and positive with longitude were observed, but not correlated with altitude. Correlations with temperature and precipitation were mostly significant. The variables that include an annual variation (temperature seasonality and temperature annual range) showed the most important negative correlations since they captured the highest amount of information. The most

significant precipitation variables were annual precipitation and precipitation of the wettest month. Although less important, precipitation seasonality is also highly significant (Table 3). The difference of the stomatal index among the most extreme values coming from Saltillo (Coahuila) and Tlacotepec (Puebla) is 1%. The north face of the stem consistently had higher values compared with the other three orientations as shown in Table 4.

A mixed effect model was fitted containing the two variables with the highest correlations (annual precipitation [BIO12] and precipitation of the wettest month [BIO13]) taking orientation as fixed effects, and orientation within stem as random effects. The minimal model that explained the

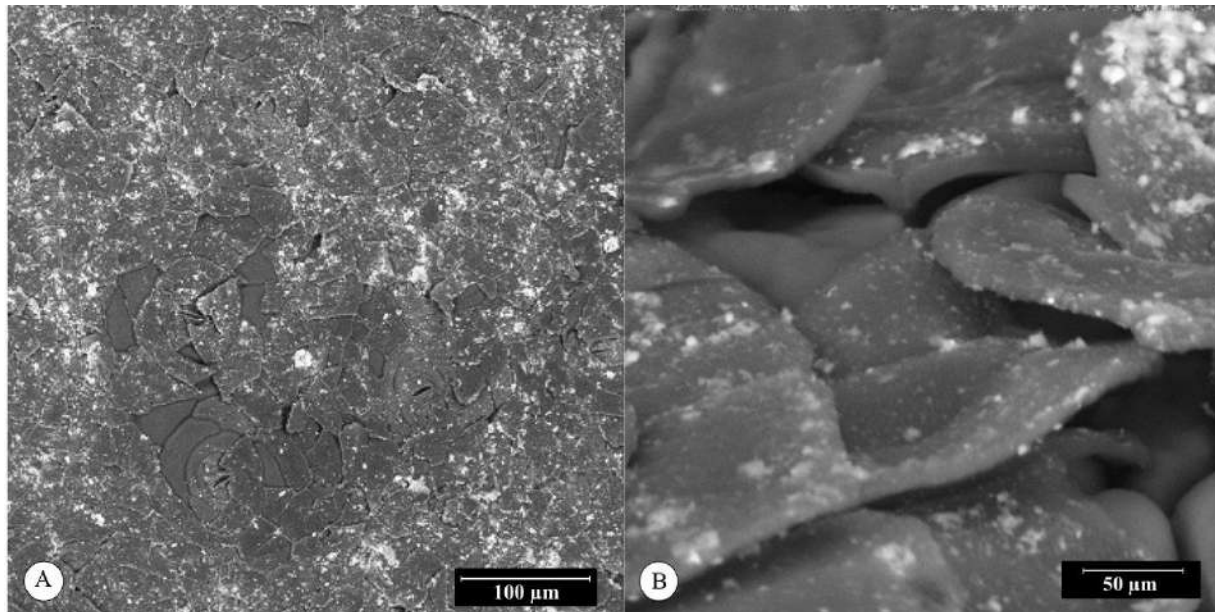


Figure 1. Epicuticular waxes of *Echinocactus platyacanthus*

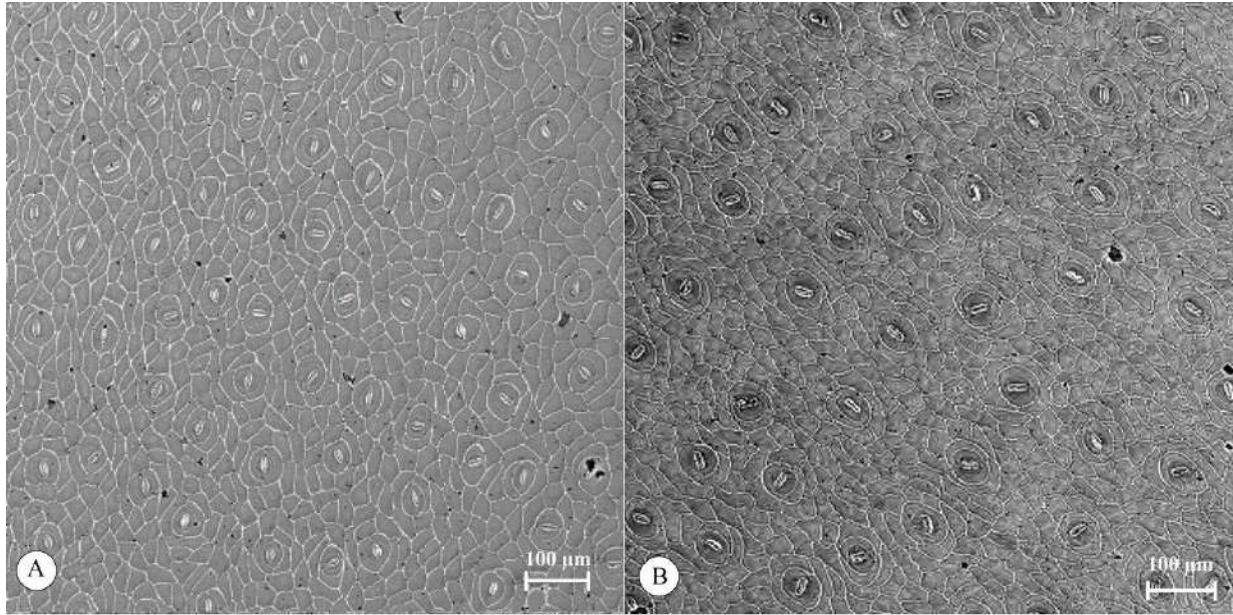


Figure 2. Epidermis of *E. platyacanthus*. (A) Epidermis of an individual from the southernmost population (Puebla) with high stomatal density; (B) epidermis of an individual from the northernmost population (Coahuila) with low stomatal density.

variation observed in stomatal index contained annual precipitation and orientation (Table 5). The north orientation was significantly different from the rest of the orientations ($t_{df\ 84} = 6.87046$, $p\text{-value} < 0.0001$) while the rest of the orientations were not significantly different from each other.

Stomatal Density: Correlations of stomatal density with latitude, longitude and altitude resemble those observed with stomatal index. Correlations among climatic variables and stomatal index were mostly significant. Correlations with temperature variables that capture information in variability such as temperature seasonality and temperature annual range were the highest and most significant of all, but also important was precipitation seasonality (Table 3). The differences on stomatal density among populations were important (Table 5). Saltillo, Coahuila (Table 1, population VI), showed the lowest value for stomatal density and is half of the highest value that corresponds to Zimapán, Hidalgo (Table 1, population III). Stomatal

densities from the different orientations do not seem to follow a pattern.

In order to test the effect of climatic variables and orientation a mixed effect model was fitted including temperature seasonality (BIO4), temperature annual range (BIO7) and orientation treated as fixed effects and orientation within stem treated as random effect. The minimal model only includes temperature annual range as fixed effect with the same random effects.

Stomatal Length: Variation in stomatal length among populations was high. The difference between the highest value (Ezequiel Montes, Queretaro, Table 1, population II) and the lowest (Mazapil, Zacatecas, Table 1, population V) was $4.8\mu\text{m}$. Stomatal Length did not correlate with stomatal density. Correlations with longitude, latitude and altitude were significant resembling the observed trend in stomatal index and density. However, the correlation among stomatal length and latitude showed a lower value in relation to

those obtained with stomatal index and density. Most climatic variables correlate significantly with stomatal length but mean temperature of the driest quarter (BIO9), and mean temperature of the coldest quarter (BIO11), were the highest and most significant variables that correlated with stomatal length. These two climatic variables were used in a mixed model effects and were treated as fixed effects along with orientation in order to test its effect on stomatal length treating orientation within stem as random effect. The minimal model only included mean temperature of the driest quarter.

Height of plants (H) did not play an important role on the behavior of the morphological variables studied since correlations with these variables were non-significant, therefore it was assumed as a homogeneous character (Table 3).

DISCUSSION.

The epidermis together with the hypodermis of *Echinocactus platyacanthus* measured around 350 μm and compared with other cacti species, the thickness of these layers have high values above the 75th percentile (Loza-Cornejo and Terrazas, 2003). *E. platyacanthus* is also one of the largest species in the Cactaceae with a wide geographic distribution compared with other species of the same genus. *Myrtillocactus geometrizans* which is one of the cacti species with a similar latitudinal range as *E. platyacanthus* (H. Bravo-Hollis and Sánchez-Mejorada, 1991), is a species with the thickest reported epidermis and hypodermis in the Cactaceae. It has a cuticle of 28 μm and a hypodermis composed of sixteen rows of cells of approximately 37 μm generating a hypodermal layer of about 590 μm (above the 90th percentile) (Loza-Cornejo and Terrazas, 2003). Although the morphology of these two cacti is very different and the role of the epidermis and hypodermis in the administration of the energy budgets might be different, a thicker epidermal and hypodermal layers in *M. geometrizans* may provide this specie with a more efficient isolation mechanism and perhaps this can explain the low correlations with

temperature and precipitation observed in the study of the stomata of *M. geometrizans* (Hernández et al., 2007). *E. platyacanthus* on the other hand, shows significant correlations between climatic and epidermal variables along its distribution range.

The important inverse relationship between stomatal index and precipitation in *E. platyacanthus* is consistent with the stomatal index adjustments observed in other species for water availability such as *Triticum aestivum* which reduces its stomatal index and density at low soil water content conditions (Alam et al., 2011). In *Leymus chinensis* a nonlinear response to water deficit was observed: moderate water deficit increases stomatal density and stomatal index while severe deficit resulted in a reduction of both variables (Xu and Zhou, 2008). The role of humidity in stomatal development has not yet been elucidated completely at the molecular level but it has been suggested that abscisic acid (ABA), a plant hormone that is closely related with the opening and closing of stomata in response to changes in humidity (Peleg and Blumwald, 2011), negatively regulates stomatal development and promotes pavement cell enlargement in *Arabidopsis thaliana* (Tanaka et al., 2013).

The significant reduction in stomatal density in the northernmost populations where temperature is more extreme and variable while precipitation is scarcer (Table 2), is consistent with reductions observed in other species exposed to high temperatures (Beerling and Chaloner, 1993; Luomala et al., 2005; ROGIERS et al., 2011) and low water availability (Fraser et al., 2009). Interestingly stomatal density variation observed in this study is better explained by temperature annual range and not by mean temperature. How temperature affects stomatal differentiation is still unclear although some

temperature sensing mechanism such as changes in Ca^{2+} concentrations in cells, which is involved in sensing low (Polisensky and Braam, 1996) and high temperatures (Saidi et al., 2011) in plants, might be coupled with several mitogen-activated protein-kinases (MAPKs) known to be involved in pavement cell differentiation and stomatal initiation (Lissarre et al., 2010; Pillitteri and Dong, 2013).

Temperature also affected stomatal length in *E. platyacanthus*, colder temperatures in the coldest and driest months resulted in a significant reduction in size. Similar findings were obtained in *Eriophorum vaginatum* [53]. This decrement of stomatal length together with the decrement in stomatal density at higher latitudes might imply a decline in stomatal conductance [54] consequently limiting photosynthetic gains in order to maximize water use efficiency. Effects on growth rate might take place and it could be said that Northern populations grow much slower than southern populations taking in consideration the limited absorption of CO_2 with lower stomatal lengths.

The effect of orientation is only evident in stomatal index although stomatal index and stomatal density are highly correlated. The northern face of the stem in all populations has significant higher values than the other three orientations. The Northern face of the stem is less exposed to solar radiation and as a consequence temperature is lower and relative humidity higher. These less stressful conditions might trigger stomatal differentiation and therefore an increase in stomatal frequency.

The high correlation among stomatal index and stomatal density in *E. platyacanthus* is to be expected since stomatal index is a function of stomatal density. There is not a significant correlation among stomatal length and stomatal density and index. That lack of a relationship was

also observed in the *M. geometrizans* [16] study. Although an inverse relationship was observed in *P. guamacho* [30] which is a common pattern among other angiosperms. This negative relationship may take place because of spatial constraints. Increasing stomatal density will necessarily imply a reduction in size of stomata to accommodate them in the space. In cacti where stomatal densities are much lower than in other angiosperms [28] these limitations might be less pressing.

CONCLUSIONS.

Important variation on stomatal index, stomatal density and stomatal length were observed along the distribution range of *E. platyacanthus*. Correlations with temperature and precipitation variables were mostly significant in all stomatal variables. Substantial reductions in stomatal density and stomatal index were related to the variability of temperature and precipitation. Stomatal differentiation might be influenced by water availability. Also within a plant, orientation might play an important roll on differentiation of stomata. Stomatal length is affected by temperature. Higher temperatures result in larger stomata. Extreme temperature and low precipitation conditions resulted in stems with low stomatal frequency and small pores that might result in low stomatal conductance.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Héctor M. Hernández for providing geographic distribution data for *Echinocactus platyacanthus*; to Paloma Valtierra and María Teresa Reinoso Pérez for their assistance in the field; to Lucia Tovar for assistance with the SEM.

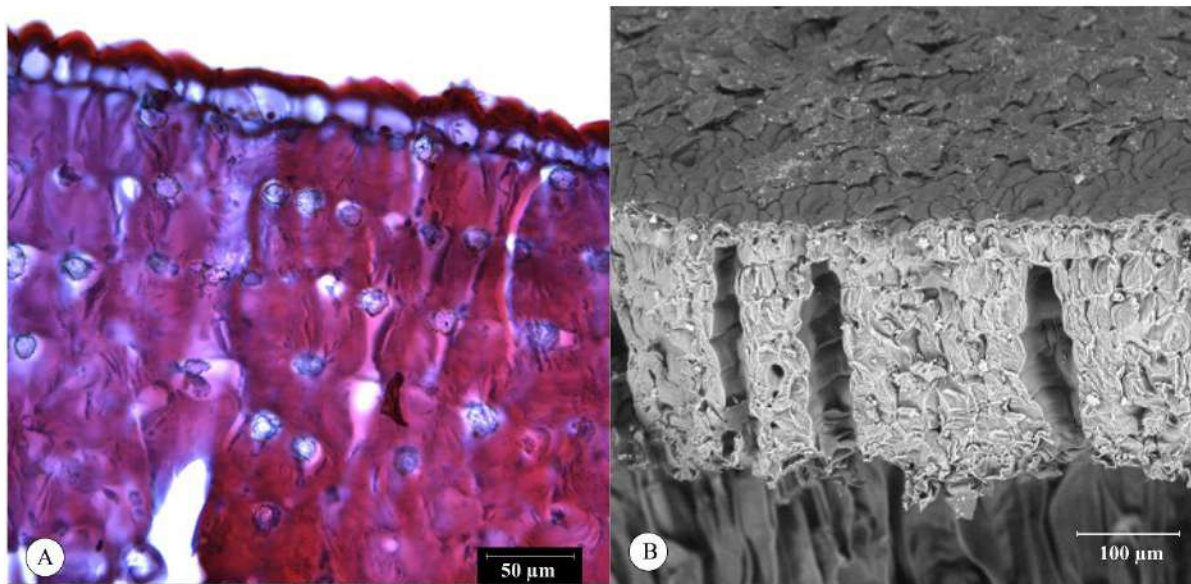


Figure 3. Cuticle, epidermis, and hypodermis of *E. platyacanthus*. (A) Longitudinal section of epidermis and hypodermis; (B) scanning electron photomicrograph of epidermis and hypodermis.

Table 3. Pearson correlations coefficients among environmental and stomatal variables.

	H	SI	L	SD
H	1	-0.15	-0.01	-0.15
SI	-0.15	1	0.04	0.71***
L	-0.01	0.04	1	0.18
SD	-0.15	0.71***	0.18	1
Longitude	-0.21	0.63***	0.56**	0.5**
Latitude	0.17	-0.65***	-0.47*	-0.63***

Altitude	-0.11	0.06	-0.37*	-0.1
BIO ₁	0.04	-0.13	0.47*	-0.07
BIO ₂	0.07	-0.53**	-0.08	-0.53**
BIO ₃	-0.06	0.49**	0.27	0.62***
BIO ₄	0.07	-0.59***	-0.29	-0.72***
BIO ₅	0.04	-0.41*	0.14	-0.5**
BIO ₆	-0.04	0.34	0.62***	0.44*
BIO ₇	0.06	-0.59***	-0.23	-0.73***
BIO ₈	0.05	-0.38*	0.19	-0.43*
BIO ₉	0.1	0.09	0.81***	0.45*
BIO ₁₀	0.06	-0.4*	0.14	-0.46*
BIO ₁₁	-0.03	0.39*	0.65***	0.53**
BIO ₁₂	-0.27	0.73***	0.08	0.46*
BIO ₁₃	-0.25	0.71***	0.15	0.49**
BIO ₁₄	0.14	-0.48**	-0.55**	-0.42*
BIO ₁₅	-0.14	0.59***	0.33	0.54**
BIO ₁₆	-0.19	0.67***	0.03	0.51**
BIO ₁₇	0.15	-0.54**	-0.53**	-0.5**
BIO ₁₈	-0.25	0.41*	0.26	0.06
BIO ₁₉	0.14	-0.54**	-0.46*	-0.49**

Stars mean levels of significance: $0 < p \leq 0.001$ (***), $0.001 < p \leq 0.01$ (**), $0.01 < p \leq 0.05$ (*)

Table 4. Means (SE) of stomatal index, stomatal density, and stomatal length.

Stomatal Index					
Population	Overall	Orientation			
		North	East	West	South
I	5.4 (0.12)	5.8 (0.2)		5.3 (0.2)	5.4 (0.2)
	5.2 (0.3)				
II	5.1 (0.09)	4.9 (0.3)		5.0 (0.1)	5.1 (0.1)
	5.0 (0.1)				
III	4.6 (0.09)	5.1 (0.2)		4.6 (0.2)	4.6 (0.1)
	4.3 (0.1)				
IV	4.6 (0.10)	5.1 (0.1)		4.3 (0.2)	4.4 (0.2)
	4.5 (0.2)				
V	4.6 (0.11)	5.1 (0.2)		4.5 (0.2)	4.4 (0.2)
	4.4 (0.3)				
VI	4.4 (0.08)	4.7 (0.1)		4.2 (0.1)	4.4 (0.2)
	4.2 (0.2)				
Stomatal Density					
I	62.2 (2)	66.0 (3)	61.0 (3)	64.0 (3)	58.0 (3)
II	62.7 (2)	68.0 (3)	60.0 (2)	60.0 (2)	63.0 (3)
III	64.1 (3)	67.5 (2)	67.5 (7)	62.5 (2)	60.0 (3)

IV	54.9 (4)	51.5 (3)	58.0 (6)	57.5 (5)	52.5 (5)
V	50.1 (2)	54.0 (3)	49.5 (3)	48.3 (3)	48.5 (3)
VI	33.9 (2)	33.5 (2)	33.0 (3)	38.0 (2)	31.0 (3)

Stomatal Length

I	26.5 (0.2)	26.1 (0.4)	26.9 (0.4)	26.7 (0.3)	26.1 (0.4)
II	22.3 (0.2)	21.4 (0.2)	23.0 (0.4)	22.3 (0.6)	22.4 (0.4)
III	28.2 (0.3)	28.3 (0.6)	28.1 (0.7)	27.9 (0.2)	28.4 (0.8)
IV	23.9 (0.3)	24.0 (0.6)	23.7 (0.6)	24.0 (0.7)	23.7 (0.3)
V	23.4 (0.2)	22.7 (0.4)	24.1 (0.5)	23.0 (0.4)	23.6 (0.4)
VI	24.0 (0.2)	24.2 (0.5)	24.5 (0.4)	23.4 (0.6)	24.1 (0.3)

Table 5. Results of the mixed-effects linear models to test for environmental variables and orientation effect over epidermal variables. Statistical differences were determined using a likelihood ratio test. Variance components expressed as percentage of the total variance.

Stomatal Index

Fixed effects	LogL	χ^2	df	P-value
Minimal model	863.94			
BIO12	853.96	19.95	1	< 0.001
Orientation	836.79	54.30	3	< 0.001
Random effects	Variance components			

Orientation within stem	1.750e-06 (4.17%)
Stem	1.324e-05 (31.53%)
residual	2.701e-05 (64.30%)

Variables dropped from the model P-value	AIC	LogL	X ²	df
Minimal model	-1711.88	863.94		
BIO13 0.605	-1710.15	864.07	0.267	1

Stomatal Density

Fixed effects	LogL	X ²	df	P-value
Minimal model	-10.05			
BIO7	-23.13	26.16	1	<.0001
Random effects	Variance components			
Orientation within stem	0.0418 (50.77%)			
Stem	0.0308 (37.44%)			
residual	0.0097 (11.77%)			

Variables dropped from the model	AIC	LogL	X ²	df	P-value
Minimal model	30.11	-10.05			
BIO4	33.20	-7.60	4.9	4	0.2974
Orientation	31.23	-7.61	4.87	1	0.1812

Stomatal Length

Fixed effects	LogL	X ²	df	P-value
Minimal model	-435.33			
BIO9	-450.59	30.52	1	<.0001
Random effects	Variance components			
Orientation within stem	1.1585(35.04%)			
Stem	1.3117(39.68%)			
residual	0.8354(25.27%)			

Variables dropped from the model	AIC	LogL	X ²	df	P-value
Minimal model	880.66	-435.33			

BIO11	883.23	-432.615.43	4	0.2455
Orientation	881.55	-432.775.11	3	0.1637

REFERENCES.

- [1] Raven J. A. 2002. Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytol.* 2002, 153(3):371–386.
- [2] Evert R. F. 2006. *Esau's Plant anatomy : meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development.*
- [3] Salisbury B. B. and Ross C. W. 1992. *Plant Physiology.* Wadsworth Publishing Company.
- [4] Ruiz L. P. and Mansfield T. A. 1994. A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytol.* 1994, 127(3):473–481.
- [5] Schoch P. G., Zinsou C., Sibi M. 1980. Dependence of the stomatal index on environmental factors during stomatal differentiation in leaves of *Vigna sinensis* L. *J. Exp. Bot.* 31(5):1211 –1216.
- [6] Casson S. A. and Hetherington A. M. 2010. Environmental regulation of stomatal development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13(1):90–95.
- [7] Royer D. 2001. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 114(1-2):1–28.
- [8] Haworth M., Heath J., McElwain J. C. 2010. Difference in response sensitivity of stomatal index to atmospheric CO₂ among four genera of Cupressaceae conifers. *Ann. Bot.* 105:411–418.
- [9] Alam A., Kabir G., UD-Deen M., Hoque E. 2011. Effect of water stress on stomatal characters of twenty one near isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bangladesh J. Agric. Res.* 36:173–181.
- [10] Beerling D. J, Chaloner W. G. 1993. The impact of atmospheric CO₂ and temperature changes on stomatal density: observation from *Quercus robur* lammas leaves. *Ann. Bot.* 71(3):231–235.
- [11] Luomala E., Laitinen K., Sutinen S., Kellomäki S., Vapaavuori E. 2005. Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO₂ and temperature. *Plant Cell Environ.* 28(6):733–749.
- [12] Hanson P., Samuelson L., Wullschlegel S., Tabberer T., Edwards G. 1994. Seasonal patterns of light-saturated photosynthesis and leaf conductance for mature and seedling *Quercus rubra* L. foliage: differential sensitivity to ozone

- exposure. *Tree Physiol.* 14(12):1351–1366.
- [13] Paoletti E. and Grulke N. E. 2005 Does living in elevated CO₂ ameliorate tree response to ozone? A review on stomatal response. *Environ. Pollut.* 137(3): 483–493.
- [14] Omosun G., Markson A., Mbanasor O. 2008. Growth and anatomy of *Amaranthus hybridus* as affected by different crude oil concentrations. *Am.-Eurasian J. Sci. Res.* 3(1):70–74.
- [15] Sekiya N. and Yano K. 2008. Stomatal density of cowpea correlates with carbon isotope discrimination in different phosphorus, water and CO₂ environments. *New Phytol.* 179(3):799–807.
- [16] Hernández M., Terrazas T., Delgado A. A., Luna M. 2007. Los estomas de *Myrtillocactus geometrizans* (Marr. Ex. Pfeiff.) Console (Cactaceae): Variación en su área de distribución. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(3):235–240.
- [17] Xu Z. and Zhou G. 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J. Exp. Bot.* 59(12):3317–3325.
- [18] Fraser L. H., Greenall A., Carlyle C., Turkington R., Friedman C. R. 2009. Adaptive phenotypic plasticity of *Pseudoroegneria spicata*: response of stomatal density, leaf area and biomass to changes in water supply and increased temperature. *Ann. Bot.* 103(5):769–775.
- [19] Doheny-Adams T., Hunt L., Franks P. J., Beerling D. J., Gray J. E. 2012. Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367(1588):547–555.
- [20] Masterson J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of Angiosperms. *Science* 264(5167):421–424.
- [21] Mishra M. K. 1997. Stomatal characteristics at different ploidy levels in *Coffea* L. *Ann. Bot.* 80(5):689–692.
- [22] Chaerle L., Saibo N., Van Der Straeten D. 2005. Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *TRENDS Biotechnol.* 23(6):308–315.

- [23] Gibson A. C. and Nobel P. S. 1986. The Cactus Primer. First Harvard University Press; USA.
- [24] Mauseth J. D. 2004. The Structure of photosynthetic succulent stems in plants other than cacti. *Int. J. Plant Sci.* 165(1):1–9.
- [25] Bergmann D. C. and Sack F. D. 2007. Stomatal development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:163–181.
- [26] Croxdale J. L. 2000. Stomatal patterning in angiosperms. *Am. J. Bot.* 87(8):1069–1080.
- [27] Delgado D., Alonso-Blanco C., Fenoll C., Mena M. 2011. Natural variation in stomatal abundance of *Arabidopsis thaliana* includes cryptic diversity for different developmental processes. *Ann. Bot.* 107(8):1247–1258.
- [28] Mauseth J. D. 2004. Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. *J. Plant Res.* 117(1):69–76.
- [29] Terrazas T. and Mauseth J. D. 2002. Shoot anatomy and morphology. In Nobel P. S. (Eds), *Cacti: biology and uses*. University of California Press pp. 23–40.
- [30] Eggli U. 1984. Stomatal types of Cactaceae. *Plant Syst. Evol.* 146(3-4):197–214.
- [31] Edwards E. J. and Diaz M. 2006. Ecological physiology of *Pereskia guamacho*, a cactus with leaves. *Plant Cell Environ.* 29(2):247–256.
- [32] Bravo-Hollis H. and Sánchez-Mejorada H. 1991. *Las Cactáceas de México*. Vol. 2. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- [33] Jiménez-Sierra C.L. and Eguiarte L.E. 2010. Candy Barrel Cactus (*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto: A Traditional Plant Resource in Mexico Subject to Uncontrolled Extraction and Browsing. *Econ. Bot.* 2010, 64(2):99–108
- [34] Herce M. F., Martorell C., Alonso-Fernandez C., Boullosa L. F. V. V., Meave J. A. 2014. Stem tilting in the inter-tropical cactus *Echinocactus platyacanthus*: an adaptive solution to the trade-off between radiation acquisition and temperature control. *Plant Biol.* 16(3):571–577.
- [35] Correl D. S. and Johnson M. C. 1970. *Manual of the Vascular Plants of Texas*. Texas Research Foundation. USA.

- [36] Valiente-Banuet A., Solís L., Dávila P., del Coro M., Silva C., Treviño J., Rangel-Landa S., Casas A. 2009. Guía de la vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. UNAM, CONABIO. México.
- [37] Ruzin S. E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press. USA.
- [38] Rasband W. S. 1997. ImageJ. Bethesda, Maryland, USA, U. S. National Institutes of Health. 1997.
- [39] Hijmans R. J., Cameron S. E., Parra J. L., Jones P. G., Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25(15):1965–1978.
- [40] Bates D., Maechler M., Bolker B., Walker S. 2014. “lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. Maintainer: lme4-author@R-forge.wu-wien.ac.at.
- [41] Crawley M. 2012. The R Book. Wiley. USA.
- [42] R Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing; 2014.
- [43] Engel T. and Barthlott W. 1988. Micromorphology of epicuticular waxes in Centrosperms. *Plant Syst. Evol.* 161(1-2):71–85
- [44] Loza-Cornejo S. and Terrazas T. 2003. Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). *J. Plant Res.* 116(1):27–35.
- [45] Bravo-Hollis H. and Sánchez-Mejorada H. 1991. Las Cactáceas de México. Vol. 3. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- [46] Peleg Z. and Blumwald E. 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14(3):290–295.
- [47] Tanaka Y., Nose T., Jikumaru Y., Kamiya Y. 2013. ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* 74(3):448–457.
- [48] Rogiers S.Y., Hardie W.J., Smith J.P. 2011. Stomatal density of grapevine leaves (*Vitis vinifera* L.) responds to soil temperature and atmospheric carbon dioxide. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17(2):147–152.
- [49] Polisensky D. H and Braam J. 1996. Cold-shock regulation of the *Arabidopsis* TCH genes and the effects of modulating

intracellular calcium levels. *Plant Physiol.* 111(4):1271–1279.

- [50] Saidi Y., Finka A., Goloubinoff P. 2011. Heat perception and signaling in plants: a tortuous path to thermotolerance: Minireview. *New Phytol.* 190(3):556–565.
- [51] Lissarre M., Ohta M., Sato A., Miura K. 2010. Cold-responsive gene regulation during cold acclimation in plants. *Plant Signal. Behav.* 5(8):948-952.
- [52] Pillitteri L. J. and Dong J. 2013. Stomatal Development in Arabidopsis. *Arab. Book.* 11:e0162.
- [53] Peterson C.A., Fetcher N., McGraw J.B., Bennington C.C. 2012: Clinal variation in stomatal characteristics of an Arctic sedge, *Eriophorum vaginatum* (Cyperaceae). *Am. J. Bot.* 99(9):1562–1571.
- [54] Franks P. J. and Beerling D. J. 2009. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106(25):10343-10347.