



Morfología polínica de las especies de *Ephedra* (Ephedraceae) distribuidas en México

Pollen morphology of the *Ephedra* (Ephedraceae) species distributed in Mexico

Iris Grisel Galván Escobedo^{1,5} , Lauro López Mata² , Armando Zepeda Rodríguez³ , Francisco Pasos Nájera³ ,
Irma Rosas Pérez⁴ 

Resumen:

Antecedentes y Objetivos: El género *Ephedra* incluye aproximadamente 50 especies distribuidas en zonas semiáridas del mundo. En México se encuentran ocho: *Ephedra antisiphilitica*, *E. aspera*, *E. californica*, *E. compacta*, *E. nevadensis*, *E. pedunculata*, *E. torreyana* y *E. trifurca*. La falta de información detallada de la morfología del polen de las especies mexicanas actuales de *Ephedra*, ha dificultado la asignación de la afinidad botánica del polen fósil de *Ephedripites*. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la morfología polínica de las ocho especies de *Ephedra* presentes en México y detectar las variables morfológicas distintivas de cada una.

Métodos: Se revisaron ocho variables morfológicas del polen obtenido de ejemplares herborizados. Los granos de polen fueron acetolizados y examinados mediante microscopía fotónica y electrónica de barrido. Las variables fueron analizadas con técnicas estadísticas uni y multivariadas.

Resultados clave: Las variables morfológicas distintivas fueron el número y distancia entre plicae, y forma de la plica y del pseudosulco. De estas, la distancia entre plicae comúnmente no se considera relevante en los estudios de morfología polínica de *Ephedra*. La forma del pseudosulco aporta más información referente a la variación morfológica del polen al vincularse con la presencia o ausencia de ramificaciones en el pseudosulco. Con base en las características polínicas, las especies estudiadas se agruparon en cuatro clases: I) *E. aspera*, *E. compacta* y *E. pedunculata*; II) *E. californica* y *E. trifurca*; III) *E. antisiphilitica* y *E. torreyana*; y IV) *E. nevadensis*.

Conclusiones: Los métodos estadísticos multivariados permitieron analizar de manera conjunta caracteres cualitativos y cuantitativos del polen de las especies de *Ephedra* que hay en México. La agrupación en clases con base en su morfología polínica puede servir de referencia para asignar afinidades botánicas con especies actuales que tengan polen tipo Ephedroide, el cual ha sido registrado en algunas paleocuenas de México.

Palabras clave: Ephedrales, Gnetidae, plicae, polen fósil, pseudosulco.

Abstract:

Background and Aims: The *Ephedra* genus contains nearly 50 species distributed in semi-arid regions of the world. Mexico contains eight of these species: *Ephedra antisiphilitica*, *E. aspera*, *E. californica*, *E. compacta*, *E. nevadensis*, *E. pedunculata*, *E. torreyana* and *E. trifurca*. The botanical affinities of *Ephedripites* fossil pollen are difficult to assign due to lack of detailed data on pollen morphology of extant *Ephedra* species distributed in Mexico. The objective of this work was to characterize the pollen morphology of the eight *Ephedra* species distributed in Mexico as well as to detect the distinctive morphological variables of each species.

Methods: Pollen grains were taken from herbarium specimens and processed with the acetolysis technique. Eight morphological variables were reviewed with both photonic microscopy and scanning electron microscopy. All variables were analyzed with univariate and multivariate statistical techniques.

Key results: The variables of morphological importance were number of plicae and distance among plicae, and plica form and pseudosulcus form. Of these, the distance among plicae is not a variable commonly considered relevant in studies of pollen morphology of *Ephedra*. The pseudosulcus form accounted for the most pollen variation provided it is linked to presence or absence of pseudosulcus ramifications. *Ephedra* species were grouped into four classes: I) *E. aspera*, *E. compacta* and *E. pedunculata*; II) *E. californica* and *E. trifurca*; III) *E. antisiphilitica* and *E. torreyana*; and IV) *E. nevadensis*.

Conclusions: Multivariate statistical methods allowed us to jointly analyze qualitative and quantitative characters of the pollen of the *Ephedra* species from Mexico and group them into classes based on their pollen morphology. This serves as a reference to assign botanical affinities with current species that have typical Ephedroid pollen recorded in some paleobasins of Mexico.

Key words: Ephedrales, fossil pollen, Gnetidae, plicae, pseudosulcus.

¹Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, comisiónada al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, campus Montecillo, 56264 Texcoco, Estado de México, México.

²Posgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, campus Montecillo, 56264 Texcoco, Estado de México, México.

³Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología Celular y Tisular, 04510 Alcaldía Coyoacán, Cd. Mx., México.

⁴Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático, 04510 Alcaldía Coyoacán, Cd. Mx., México.

⁵Autor para la correspondencia: sirigales@gmail.com

Recibido: 19 de agosto de 2023.

Revisado: 21 de septiembre de 2023.

Aceptado por Rosario Redonda-Martínez: 15 de noviembre de 2023.

Publicado Primero en línea: 15 de diciembre de 2023.

Publicado: Acta Botanica Mexicana 130 (2023).



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional).

Citar como: Galván Escobedo, I. G., L. López Mata, A. Zepeda Rodríguez, F. Pasos Nájera e I. Rosas Pérez. 2023. Morfología polínica de las especies de *Ephedra* (Ephedraceae) distribuidas en México. Acta Botanica Mexicana 130: e2244. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm130.2023.2244>

Introducción

Ephedra L. es el único género monofilético de la familia Ephedraceae; junto con *Gnetum* L. (Gnetaceae) y *Welwitschia* Hook. f. (Welwitschiaceae) inicialmente se clasificó como miembro del orden Gnetales perteneciente a la división Gnetophyta (Rydin et al., 2004; Judd et al., 2008; Bolinder et al., 2016). Posteriormente, estos tres géneros se ubicaron en diferentes órdenes: *Ephedra* en Ephedrales, *Gnetum* en Gnetales y *Welwitschia* en Welwitschiales (Christenhusz et al., 2011), los cuales actualmente se clasifican en la subclase Gnetidae.

Los tres géneros de Gnetidae comparten caracteres con las angiospermas como son los miembros de vaso y la doble fertilización (Cornet, 1996); similitud que históricamente llevó a considerarlas como un grupo hermano de las plantas con flor (hipótesis antofita) (Wan et al., 2018). No obstante, existen registros que indican que los elementos vasculares de Gnetidae evolucionaron a partir de traqueidas con fosas de bordes circulares, mientras que en angiospermas derivaron de traqueidas escalariformes (Mauseth, 2016). Además, se ha considerado que las plantas con flor evolucionaron a partir de ancestros sin vasos, ya que su desarrollo fue posterior al de las flores (Mauseth, 2016). De los tres géneros de Gnetidae, *Ephedra* desarrolla gametofito y embrión, que son caracteres plesiomórficos (Ickert-Bond et al., 2003); su gametofito masculino presenta células basales y es monospórico, mientras que en *Gnetum* y *Welwitschia* es tetraespórico y carece de células basales (El-Ghazaly et al., 1998; Wan et al., 2018; Coiro et al., 2022). Algunos análisis moleculares han propuesto las bases de nuevas hipótesis que explican la posición filogenética de Gnetidae como grupo hermano de Pinaceae, cupressofitas o coníferas monofiléticas (El-Ghazaly et al., 1998; Huang et al., 2005); sin embargo, el origen y evolución de este grupo aún no es claro (Coiro et al., 2022).

La presencia de fósiles de Gnetidae se conoce desde el Mesozoico (251 Ma) ya que fueron abundantes en el Cretácico inferior (145-100 Ma) (Han et al., 2016); sin embargo, los megafósiles del grupo están prácticamente ausentes y su presencia se conoce gracias al polen fósil (Rydin y Hoorn, 2016). Su existencia disminuyó en el Cenozoico (hace 66 Ma), aunque se considera que fueron plantas comunes en la vegetación durante este período, pero eran polinizadas

por insectos, por lo que tenían una baja dispersión del polen, lo que explicaría que las frecuencias polínicas del registro fósil en el Cenozoico sean bajas (García et al., 2016).

El análisis de la morfología del polen de *Ephedra* contribuye a la palinotaxonomía de especies actuales y, a su vez, ofrece información básica para asignar afinidades botánicas a los registros de polen fósil (da Luz, 2016). Es gracias a este, y en particular al polen tipo Ephedroide (que fue producido por *Ephedra* o plantas similares ahora extintas), que se conoce la historia evolutiva del género (Bolinder et al., 2016). De acuerdo con Crane y Lidgard (1989) y Wang (2004), los registros más antiguos de este tipo polínico datan del Pérmico (298-252 Ma) e incrementaron su ocurrencia en el Cretácico inferior (145 Ma), aunque esta se redujo a finales del Cretácico (72 Ma).

Con base en análisis filogenéticos, se estima que el origen y diversificación de *Ephedra* ocurrió en el Viejo Mundo y que a partir de ahí ocurrió la radiación hacia el continente americano, iniciando en Norte América (incluyendo México) y extendiéndose hacia Sudamérica (Ickert-Bond y Wojciechowski, 2004). Los estudios cladísticos de Bolinder et al. (2016), basados en la morfología polínica de *Ephedra* y en la filogenia establecida por Ickert-Bond y Wojciechowski (2004), determinaron la existencia de cuatro clados: Mediterráneo (raíz); Asiático; Sudamericano y Norteamericano.

En el clado Norteamericano se ubican las especies que se distribuyen en México (Bolinder et al., 2016). Los registros de polen Ephedroide en este país provienen de paleocuencas del sur de Puebla, ubicadas en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y en Baja California Sur, de sedimentos del Cretácico y el Paleógeno/Neógeno (Martínez-Hernández y Ramírez-Arriaga, 1999; Ramírez-Arriaga, 2005; Ramírez-Arriaga et al., 2006; 2014; Galván-Escobedo et al., 2017). El polen Ephedroide corresponde al menos a 11 tipos polínicos identificados bajo la forma-género *Ephedripites* Bolkh. ex R. Potonié (Galván-Escobedo et al., 2017). Sin embargo, se ha dificultado la asignación de la afinidad botánica del polen fósil de *Ephedripites*, por la falta de información sobre la morfología polínica de las especies actuales de *Ephedra* que se encuentran en México.

Actualmente *Ephedra* incluye aproximadamente 50 especies cuya diversidad genética y morfológica es mínima (Bolinder et al., 2016). Ocho de ellas se encuentran



en México, lo que constituye 12% de la diversidad total (Villanueva-Almanza y Fonseca, 2011). Siete se comparten con Estados Unidos de América (*Ephedra antisiphilitica* S. Watson, *E. aspera* Engelm. ex S. Watson, *E. californica* S. Watson, *E. nevadensis* S. Watson, *E. pedunculata* Engelm. ex S. Watson, *E. torreyana* S. Watson y *E. trifurca* Torr.), y una es endémica (*E. compacta* Rose) (Villanueva-Almanza y Fonseca, 2011). El área de distribución de estas especies coincide esencialmente con la de la región xerofítica mexicana y están presentes en 16 estados: Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (Villanueva-Almanza y Fonseca, 2011).

El análisis de la morfología del polen de las especies actuales de *Ephedra* tiene aplicación en el campo de la paleopolinología, específicamente en la asignación de afinidades botánicas de las formas-géneros fósiles *Ephedripites*. Asimismo, permite contribuir al reconocimiento de caracteres polínicos que pueden tener importancia taxonómica en este género. Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar la morfología polínica de las ocho especies de *Ephedra* que se distribuyen en México y detectar las variables morfológicas que distinguen a cada una de ellas.

Materiales y Métodos

Muestreo y procesamiento de polen

El polen de *Ephedra antisiphilitica*, *E. aspera*, *E. californica*, *E. compacta*, *E. nevadensis*, *E. pedunculata*, *E. torreyana* y *E. trifurca* se obtuvo de ejemplares herborizados y depositados en el Herbario Nacional de México (MEXU) del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, y del Herbario-Hortorio (CHAPA) del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo (acrónimos citados de acuerdo con Thiers, 2022). La corroboración de la identificación de los ejemplares se realizó con base en Eckenwalder y Thieret (1993), Medina y Dávila (1997), Alanis-Flores et al. (2011), Villarreal y Estrada (2011) y Carranza (2015).

Se seleccionaron de uno a cinco ejemplares de cada especie (Apéndice), de los cuales se tomaron únicamente los conos masculinos. Para observar la morfología del polen, este fue acetolizado de acuerdo con la técnica de Erdtman (1960) y se montó en gelatina glicerizada para elabo-

rar laminillas permanentes. Posteriormente, se observó en un microscopio fotónico (MF) Zeiss, Axiscop 2 (Carl Zeiss AG, Jena, Alemania) en campo claro, a un aumento de 100× y se fotografió con una cámara digital (AmScope, California, EUA) empleando el software AmScope v. 3.7 (AmScope, 2022). El análisis del polen en el microscopio electrónico de barrido (MEB) Zeiss, DSM-950 (Carl Zeiss AG, Jena, Alemania) se hizo a partir de muestras tomadas directamente de los microesporangios sin tratamiento previo. Antes de observarlo, el polen se colocó sobre cinta de carbón en un porta especímenes de aluminio; posteriormente, se cubrió con oro en un equipo ionizador Polaron E5000 (Quorum Technologies, Sussex, UK).

Variables morfológicas

En el microscopio fotónico se seleccionaron al azar 30 granos de polen por cada especie de *Ephedra*. En cada grano se observaron y midieron cinco variables morfológicas cuantitativas (eje polar, eje ecuatorial, forma, número y distancia entre plicae) y tres cualitativas (forma del pseudosulco, la plica y presencia o ausencia de fisuras en la exina). A éstas últimas se les asignó un valor entre 1 y 4, dependiendo de su morfología (Cuadro 1). Se usó la terminología propuesta por Punt et al. (2007) para describir el polen, excepto para nombrar la depresión que se forma entre las plicae del grano del polen. En este caso, se retomó el término pseudosulco empleado por Bolinder et al. (2015, 2016).

Análisis estadístico

Todas las variables se examinaron con una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965). Las variables cuantitativas que no tuvieron distribución normal se transformaron con el \log_{10} (Hammer, 2017), mientras que para las cualitativas se utilizó la raíz cuadrada o el arcoseno de la raíz cuadrada (($\arcsen(\sqrt{x_i})$) (McDonald, 2014). En cada una de las variables se calcularon el valor promedio, mínimo, máximo y desviación estándar por especie; los resultados se presentaron en diagramas de caja (Fig. 1). Las medias de todas las variables se compararon entre especies con un Análisis de Varianza (ANOVA) para detectar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), seguido de un análisis de comparaciones múltiples entre pares de medias con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Las diferencias entre la



Cuadro 1: Variables cualitativas observadas en los granos de polen de ocho especies de *Ephedra* L. presentes en México.

Variables cualitativas	Morfología	Valor asignado
Forma del pseudosulco	Recto sin ramificaciones	1
	Recto con ramificaciones	2
	Curvo sin ramificaciones	3
	Curvo con ramificaciones	4
Forma de la plica	Sin cresta	1
	Con cresta recta	2
	Con cresta ligeramente curvada	3
	Con cresta conspicuamente curvada	4
Fisuras en la exina	Ausentes	1
	Presentes	2

morfología polínica de las especies, utilizando tanto las variables cuantitativas como las cualitativas, se examinaron mediante un Análisis Multivariado de Varianza (MANOVA), uno de Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés) y un Análisis Discriminante (DA).

En el MANOVA, el estadístico de prueba utilizado fue la razón de probabilidades de Wilks (Johnson, 2000; Hammer, 2017). Las diferencias significativas entre pares de especies se decidieron con el valor de p con corrección de Bonferroni (Hammer, 2017). Para conocer los variables morfológicas con la mayor proporción de la variabilidad contenida en el conjunto de datos entre las especies, se ejecutó un PCA con base en la matriz de varianza-covarianza (Johnson, 2000; Hammer, 2017). Posteriormente, se efectuó un segundo PCA, pero por especie y utilizando solamente las variables morfológicas definidas en el primero. Esto permitió detectar las variables morfológicas más importantes; es decir, aquellas que explican el porcentaje más alto de variación morfológica registrada en cada especie. Enseguida, el análisis discriminante corroboró los caracteres morfológicos que diferenciaron (discriminaron) a dos o más grupos de especies y definió una función discriminante capaz de distinguir, con la mayor precisión posible, los miembros de uno u otro grupo (Johnson, 2000). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software PAST v. 3.15 (Hammer, 2017).

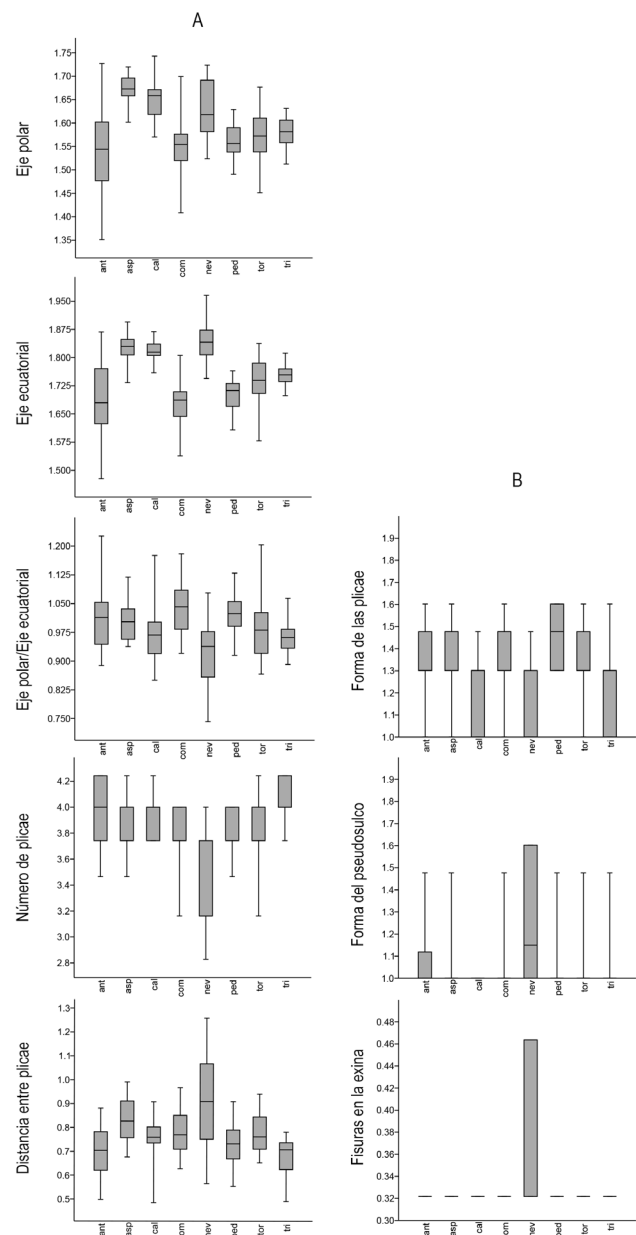


Figura 1: Diagramas de caja de las variables explicativas de la variación en la morfología polínica de ocho especies de *Ephedra* L. presentes en México. A. variables cuantitativas; B. variables cualitativas. *ant*=*E. antisiphilitica* S. Watson, *asp*=*E. aspera* Engelm. ex S. Watson, *cal*=*E. californica* S. Watson, *com*=*E. compacta* Rose, *nev*=*E. nevadensis* S. Watson, *ped*=*E. pedunculata* Engelm. ex S. Watson, *tor*=*E. torreyana* S. Watson, *tri*=*E. trifurca* Torr.

En la presentación de resultados, las especies se identificaron con las tres primeras letras del epíteto específico de cada taxón: *E. antisiphilitica* (*ant*), *E. aspera* (*asp*), *E. californica* (*cal*), *E. compacta* (*com*), *E. nevadensis* (*nev*), *E. pedunculata* (*ped*), *E. torreyana* (*tor*) y *E. trifurca* (*tri*).

Resultados

Los valores del eje polar (EP) variaron de 22.5 a 55.3 μm y los promedios de 35.7 a 47.3 μm (Cuadro 2, Fig. 1). El ANOVA detectó diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las comparaciones de las medias del EP (Cuadro 3). Las especies sin diferencias fueron: *E. aspera* y *E. californica*; *E. antisyphilitica* y *E. compacta*; *E. californica* y *E. nevadensis*; además de *E. compacta* con *E. pedunculata*, *E. torreyana* y *E. trifurca* (Cuadro 3).

Los valores del eje ecuatorial (EE) fluctuaron de 30-92.4 μm y los promedios entre 48-68.9 μm (Cuadro 2, Fig. 1). El ANOVA no encontró diferencias significativas entre las medias del EE en *E. aspera* y *E. californica*; *E. antisyphilitica* y *E. compacta*; *E. compacta* y *E. pedunculata*; *E. pedunculata* y *E. torreyana*; y *E. torreyana* y *E. trifurca*; además de *E. nevadensis* con *E. aspera* y *E. californica* (Cuadro 3). Los valores estadísticos de la relación del EP/EE están desglosados en el cuadro 2 y corresponden a las formas oblada, suboblada y oblado-esferoidal (*sensu* Kremp, 1965).

El ANOVA registró que las diferencias entre medias ocurrieron en *E. compacta* y *E. californica*; *E. nevadensis* con *E. aspera*, *E. antisyphilitica* y *E. compacta*; *E. pedunculata* con relación a *E. californica* y *E. nevadensis*; *E. torreyana* con *E. compacta* y *E. nevadensis*; además de *E. trifurca* con *E. compacta* y *E. pedunculata* (Cuadro 3).

El número de plicae en las especies varió entre 10 y 18 (Cuadro 2, Fig. 1). *Ephedra nevadensis* fue estadísticamente distinta a las siete especies restantes. *Ephedra antisyphilitica*, *E. aspera* y *E. trifurca* no presentaron diferencias entre ellas, tampoco entre *E. pedunculata* y *E. torreyana*, al igual que entre *E. pedunculata* y *E. compacta*. Sin embargo, hubo diferencias significativas entre *E. antisyphilitica*, *E. aspera*, *E. californica* y *E. trifurca* con *E. compacta*, *E. pedunculata* y *E. torreyana* (Cuadro 3).

La distancia entre plicae varió entre 3-18 μm entre las especies y los valores promedio de 5-9 μm (Cuadro 2, Fig. 1). Estadísticamente *E. antisyphilitica* y *E. aspera* fueron diferentes; *E. nevadensis* difirió de varias especies, excepto

Cuadro 2: Estadística descriptiva (Promedio (valor mínimo-valor máximo) \pm Desviación estándar) de las variables morfológicas, cuantitativas y cualitativas, del polen de especies de *Ephedra* L. presentes en México. EP=Eje polar; EE=Eje ecuatorial; EP/EE=Forma; #PI=Número de plicae; DPI=Distancia entre plicae; FPs=Forma del pseudosulco; FPI=Forma de la plica; FE=Figuras en la exina. ant=*E. antisyphilitica* S. Watson, asp=*E. aspera* Engelm. ex S. Watson, cal=*E. californica* S. Watson, com=*E. compacta* Rose, nev=*E. nevadensis* S. Watson, ped=*E. pedunculata* Engelm. ex S. Watson, tor=*E. torreyana* S. Watson, tri=*E. trifurca* Torr. Las letras en superíndice que se repiten en los valores de cada variable, indican que no se encontró diferencia significativa entre ellos.

Especie	Variables cuantitativas				Variables cualitativas			
	EP (μm)	EE (μm)	EP/EE (μm)	#PI	DPI (μm)	FPs	FPI	FE
ant	35.2 ^b (22.5-53.4) \pm 7	49.7 ^b (30-73.8) \pm 10.9	0.7 ^a (0.6-0.9) \pm 0.06	15 ^a (12-18) \pm 2.2	5.1 ^a (3.1-7.6) \pm 1.1	1.1 ^a (1-3) \pm 0.5	2.8 ^a (1-4) \pm 0.8	1 ^a (1-1) \pm 0
asp	47.3 ^a (40-52.4) \pm 2.7	67 ^{a,f} (54.1-78.4) \pm 4.9	0.7 ^a (0.6-0.8) \pm 0.04	15 ^a (12-18) \pm 1.6	6.9 ^b (4.7-9.8) \pm 1.4	1.5 ^a (1-3) \pm 0.9	2.2 ^a (1-4) \pm 0.8	1 ^a (1-1) \pm 0
cal	44.6 ^{a,c} (37.2-55.3) \pm 4.4	66 ^{a,f} (57.5-74) \pm 3.8	0.7 ^a (0.6-0.8) \pm 0.06	15 ^a (14-18) \pm 1.1	5.8 ^a (3.1-8.1) \pm 1	1 ^a (1-1) \pm 0	1.7 ^b (1-3) \pm 0.5	1 ^a (1-1) \pm 0
com	35.7 ^{b,d} (25.6-50) \pm 5.2	48 ^{b,c} (34.5-64) \pm 6.2	0.7 ^a (0.6-0.8) \pm 0.06	14 ^b (10-16) \pm 1.7	6 ^a (4.2-9.3) \pm 1.2	1.1 ^a (1-3) \pm 0.5	2.8 ^a (1-4) \pm 0.8	1 ^a (1-1) \pm 0
nev	43.2 ^c (33.4-53.9) \pm 6.1	68.9 ^f (55.5-92.4) \pm 8	0.6 ^b (0.5-0.8) \pm 0.08	11 ^c (8-16) \pm 2.4	8.9 ^c (3.7-18.2) \pm 3.4	2.1 ^a (1-4) \pm 1.3	1.63 ^b (1-3) \pm 0.8	1.5 ^a (1-2) \pm 0.5
ped	36.5 ^d (30.9-42.5) \pm 2.9	50.3 ^{c,d} (40.5-58.1) \pm 4.7	0.7 ^a (0.6-0.8) \pm 0.04	14 ^{a,b} (12-16) \pm 1.1	5.6 ^a (3.6-8.1) \pm 1.2	1 ^a (1-3) \pm 0.4	2.9 ^a (2-4) \pm 0.9	1 ^a (1-1) \pm 0
tor	37.5 ^d (28.2-47.5) \pm 4.5	54.8 ^{d,e} (37.9-68.8) \pm 8.1	0.7 ^a (0.6-0.9) \pm 0.07	14 ^{a,b} (10-18) \pm 1.8	6.1 ^{a,b} (4.5-8.7) \pm 1.2	1 ^a (1-3) \pm 0.4	2.4 ^a (1-4) \pm 1	1 ^a (1-1) \pm 0
tri	38.9 ^d (32.5-42.8) \pm 2.7	57 ^e (49.9-64.8) \pm 3.7	0.7 ^a (0.6-0.8) \pm 0.03	16 ^a (14-18) \pm 1.3	4.9 ^d (3.1-6) \pm 0.8	1 ^a (1-3) \pm 0.4	1.6 ^b (1-4) \pm 0.7	1 ^a (1-1) \pm 0

Cuadro 3: Análisis de Varianza (ANOVA) y comparación de medias con la prueba de Tukey por variable entre las especies de *Ephedra* L. presentes en México (los valores resaltados en negritas son estadísticamente significativos, $p < 0.05$). ant=*E. antisiphilitica* S. Watson, asp=*E. aspera* Engelm. ex S. Watson, cal=*E. californica* S. Watson, com=*E. compacta* Rose, nev=*E. nevadensis* S. Watson, ped=*E. pedunculata* Engelm. ex S. Watson, tor=*E. torreyana* S. Watson, tri=*E. trifurca* Torr.

		Eje polar (EP)							
		ant	asp	cal	com	nev	ped	tor	tri
Eje ecuatorial	ant		3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}	9.9×10^{-1}	3.2×10^{-5}	7.1×10^{-1}	2.6×10^{-1}	4.9×10^{-1}
	asp	3.2×10^{-5}		4.8×10^{-1}	3.2×10^{-5}	3.3×10^{-2}	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}
	cal	3.2×10^{-5}	9.9×10^{-1}		3.2×10^{-5}	9.3×10^{-1}	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}	6.0×10^{-5}
	com	9.9×10^{-1}	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}		3.2×10^{-5}	9.7×10^{-1}	6.8×10^{-1}	2.4×10^{-1}
	nev	3.2×10^{-5}	9.9×10^{-1}	9.4×10^{-1}	3.2×10^{-5}		4.3×10^{-5}	4.0×10^{-4}	6.5×10^{-3}
	ped	9.7×10^{-1}	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}	7.6×10^{-1}	3.2×10^{-5}		9.9×10^{-1}	8.6×10^{-1}
	tor	1.0×10^{-2}	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}	1×10^{-3}	3.2×10^{-5}	2.3×10^{-1}		9.9×10^{-1}
	tri	5.6×10^{-5}	4.9×10^{-5}	1.5×10^{-4}	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}	2.1×10^{-3}	8.0×10^{-1}	
		Forma (EP/EE)							
		ant	asp	cal	com	nev	ped	tor	tri
Número de plicae	ant		9.9×10^{-1}	1.5×10^{-1}	5.3×10^{-1}	3.3×10^{-5}	9.9×10^{-1}	7.6×10^{-1}	5.0×10^{-2}
	asp			4.1×10^{-1}	2.2×10^{-1}	4.8×10^{-5}	8.9×10^{-1}	9.6×10^{-1}	1.8×10^{-1}
	cal	9.7×10^{-1}	1		0.000189	7.8×10^{-2}	1.5×10^{-2}	9.7×10^{-1}	9.9×10^{-1}
	com	2.6×10^{-2}	5.5×10^{-1}	3.3×10^{-1}		3.2×10^{-5}	9.5×10^{-1}	1.1×10^{-2}	5.0×10^{-5}
	nev	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}		3.2×10^{-5}	2.4×10^{-3}	2.1×10^{-1}
	ped	7.9×10^{-2}	7.8×10^{-1}	5.7×10^{-1}	1	3.2×10^{-5}		2.4×10^{-1}	0.003182
	tor	9.1×10^{-2}	8.1×10^{-1}	6.1×10^{-1}	9.9×10^{-1}	3.2×10^{-5}	1		8.3×10^{-1}
	tri	7.4×10^{-1}	6.4×10^{-2}	1.5×10^{-1}	6.3×10^{-5}	3.2×10^{-5}	2.2×10^{-2}	2.8×10^{-4}	
		Distancia entre plicae							
		ant	asp	cal	com	nev	ped	tor	tri
Forma de la plicae	ant		5.2×10^{-5}	2.5×10^{-1}	7.9×10^{-2}	3.2×10^{-5}	7.7×10^{-1}	5.9×10^{-2}	9.9×10^{-1}
	asp			1.7×10^{-1}	4.4×10^{-1}	1.1×10^{-1}	1.6×10^{-2}	5.1×10^{-1}	3.3×10^{-5}
	cal	1.3×10^{-1}	3.9×10^{-5}		9.9×10^{-1}	3.5×10^{-5}	9.9×10^{-1}	9.9×10^{-1}	7.8×10^{-2}
	com	1.5×10^{-1}	1	3.5×10^{-5}		7.4×10^{-5}	8.9×10^{-1}	1	1.7×10^{-2}
	nev	6.6×10^{-3}	3.2×10^{-5}	9.7×10^{-1}	3.2×10^{-5}		3.2×10^{-5}	1.0×10^{-4}	3.2×10^{-5}
	ped	9.3×10^{-2}	1	3.3×10^{-5}	1	3.2×10^{-5}		8.4×10^{-1}	4.4×10^{-1}
	tor	9.9×10^{-1}	5.7×10^{-1}	2.4×10^{-2}	4.8×10^{-1}	6.2×10^{-4}	3.4×10^{-1}		1.2×10^{-2}
	tri	2.2×10^{-2}	3.2×10^{-5}	9.9×10^{-1}	3.2×10^{-5}	1	3.2×10^{-5}	2.6×10^{-3}	

de *E. aspera*, la cual tuvo diferencias con *E. pedunculata* y *E. trifurca*; al igual que *E. trifurca* de *E. compacta* y *E. torreyana* (Cuadro 3).

El ANOVA indicó que las variables cualitativas de la forma del pseudosulco y la presencia de fisuras en la exina no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 2, Fig. 1), aunque *E. nevadensis* tuvo

fisuras en la exina. La única variable cualitativa en la que se detectaron diferencias estadísticamente significativas fue en la forma de las plicae. *Ephedra trifurca* y *E. nevadensis* carecieron de diferencia estadísticamente significativa en la forma de su plica, pero ambas especies se distinguieron de la mayoría (*E. antisiphilitica*, *E. aspera*, *E. compacta*, *E. pedunculata*, *E. torreyana*). También hubo

diferencia entre *E. californica* con *E. aspera*, *E. compacta*, *E. pedunculata* y *E. torreyana* (Cuadro 3).

El MANOVA detectó diferencias estadísticamente significativas entre las ocho especies (λ Wilks=0.087; $df_1=56$; $df_2=1217$; $F=12.5$; $p=3.5 \times 10^{-85}$). La comparación entre pares de especies resultó altamente significativa ($p < 0.001$) entre la mayoría de ellas, con excepción de *E. compacta* y *E. pedunculata* ($p < 0.30$), al igual que *E. pedunculata* y *E. torreyana* ($p < 0.06$) (Cuadro 4).

El PCA encontró que los primeros tres componentes principales explicaron aproximadamente 87% del total de la varianza registrada en los datos. El primer componente interpretó 56% de la varianza; el segundo, 19% de la varianza residual y el tercero, el 11% (Cuadro 5). Los factores de carga más importantes de cada componente definieron que cuatro variables contribuyeron con el mayor porcentaje de la varianza acumulada: número de plicae, distancia entre plicae, forma del pseudosulco y forma de las plicae. El PCA por especie y con las cuatro variables seleccionadas, encontró que dos componentes principales explican entre 76 y 90% de la varianza por especie, respectivamente (Cuadro 6). Los factores de carga de los dos componentes principales en cada especie definieron las variables más importantes por taxón (Cuadro 6). En *E. antisiphilitica* y *E. nevadensis*, estas fueron número de plicae y forma del pseudosulco; en *E. aspera*, *E. compacta*, *E. pedunculata* y *E. torreyana* la variación estuvo definida por el número y forma de las plicae; mientras que en *E. californica* y *E. trifurca*, fue debida a la forma de la plicae y el número de ellas (Cuadro 6).

El DA determinó que las variables morfológicas polínicas seleccionadas mediante el PCA explicaron 90% de la varianza en el polen de las ocho especies (Cuadro 7). Los factores de carga de los ejes de las funciones discriminantes indicaron que dichas variables se clasificaron correctamente y todas contribuyeron a explicar la varianza en la morfología polínica (Cuadro 8).

El DA asignó a un grupo (especie) cada una de las observaciones registradas en las variables. El cuadro 8 muestra el número de puntos asignados a una especie diferente. El resultado fue una matriz de confusión diagonal, en la cual 41% de las observaciones se adjudicaron a alguna de las ocho especies. La figura 2 muestra la representación gráfica de la dispersión de observaciones y su asignación a cada taxón. Si bien todas las especies presentaron caracteres morfológicos semejantes, estas se discriminaron en cuatro clases de acuerdo con la morfología del polen que comparten. En la clase I se ubicaron *E. aspera*, *E. compacta* y *E. pedunculata*. En la clase II, *E. californica* y *E. trifurca*; en la clase III, *E. antisiphilitica* y *E. torreyana*; y en la IV, *E. nevadensis*. A continuación, se presentan las descripciones de la morfología del polen de acuerdo con la clase en la que se discriminaron.

Clase I. *Ephedra aspera*, *E. compacta*, *E. pedunculata* (Cuadro 2, Fig. 3). Mónadas; isopolares; obladas; exina psilada sin fisuras; pseudosulcos predominantemente rectos, a veces curvo, en ambos casos sin ramificaciones. Plicae son con o sin cresta, rectas, ligera o conspicuamente curvadas.

Cuadro 4: Comparación de pares de especies de *Ephedra* L. presentes en México con MANOVA (los valores resaltados en negritas son estadísticamente significativos, $p < 0.05$). ant=*E. antisiphilitica* S. Watson, asp=*E. aspera* Engelm. ex S. Watson, cal=*E. californica* S. Watson, com=*E. compacta* Rose, nev=*E. nevadensis* S. Watson, ped=*E. pedunculata* Engelm. ex S. Watson, tor=*E. torreyana* S. Watson, tri=*E. trifurca* Torr.

	ant	asp	cal	com	nev	ped	tor
ant							
asp	5.8×10^{-14}						
cal	1.6×10^{-10}	2.3×10^{-5}					
com	5.3×10^{-5}	1.0×10^{-10}	4.3×10^{-11}				
nev	2.5×10^{-18}	1.0×10^{-13}	2.0×10^{-13}	4.3×10^{-17}			
ped	2.8×10^{-5}	9.4×10^{-9}	4.1×10^{-9}	3.1×10^{-1}	6.7×10^{-16}		
tor	8.3×10^{-5}	1.7×10^{-7}	2.0×10^{-9}	1.1×10^{-2}	2.3×10^{-14}	6.0×10^{-2}	
tri	2.5×10^{-4}	2.0×10^{-13}	1.8×10^{-6}	1.6×10^{-10}	1.0×10^{-17}	3.7×10^{-9}	2.5×10^{-6}

Cuadro 5: Análisis de componentes principales (PCA) entre las especies de *Ephedra* L. presentes en México. CP=Componente principal. Los factores de carga con valores más grandes en cada componente se resaltan en negritas.

Eje	1	2	3
Valor dominante	0.10	0.03	0.02
Varianza (%)	55.98	19.37	11.28
Varianza acumulada (%)	55.98	75.35	86.63
Variables	Factores de carga		
	CP1	CP2	CP3
Eje polar (EP)	0.001	-0.148	0.077
Eje ecuatorial (EE)	-0.035	-0.186	0.127
Forma (EP/EE)	0.051	0.066	-0.085
Número de plicae	0.929	-0.184	0.257
Distancia entre plicae	-0.217	-0.065	0.097
Forma del pseudosulco	-0.209	0.138	0.942
Forma de las plicae	0.184	0.937	-0.034
Fisura en los valles	-0.078	-0.043	0.069

Clase II. *Ephedra californica*, *E. trifurca* (Cuadro 2, Fig. 3). Mónadas; isopolares; obladas; exina psilada sin fisuras; pseudosulcos rectos, sin ramificaciones. Plicae predominantemente con cresta recta, a veces ausente.

Clase III. *Ephedra antisiphilitica*, *E. torreyana* (Cuadro 2, Fig. 4). Mónadas; isopolares; obladas; exina psilada sin fisuras; pseudosulcos rectos o curvos, sin ramificaciones. Plicae con cresta ausente, ligera o conspicuamente curvada.

Clase IV. *Ephedra nevadensis* (Cuadro 2, Fig. 4). Mónadas; isopolares; obladas; exina psilada, con o sin fisuras; pseudosulcos rectos o curvos, con o sin ramificaciones, en ambos casos. Plicae con o sin cresta, recta a ligeramente curvada.

Discusión

Se han realizado varios esfuerzos para revisar la morfología polínica de diferentes especies de *Ephedra* con el ob-

Cuadro 6: Análisis de componentes principales (PCA) por cada especie de *Ephedra* L. presente en México. CP=Componente principal. Los valores con mayor carga en cada componente se resaltan en negritas. ant=*E. antisiphilitica* S. Watson, asp=*E. aspera* Engelm. ex S. Watson, cal=*E. californica* S. Watson, com=*E. compacta* Rose, nev=*E. nevadensis* S. Watson, ped=*E. pedunculata* Engelm. ex S. Watson, tor=*E. torreyana* S. Watson, tri=*E. trifurca* Torr.

Especie	ant		asp		cal		com		nev		ped		tor		tri	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Eje																
Valor dominante	0.090	0.040	0.057	0.015	0.028	0.016	0.060	0.020	0.179	0.053	0.027	0.015	0.071	0.031	0.030	0.027
Varianza (%)	57.52	25.35	63.83	17.50	58.18	32.23	61.72	20.93	65.72	19.53	49.66	27.02	62.57	27.72	45.77	40.00
Varianza acumulada (%)	57.52	82.87	63.83	81.33	58.18	90.41	61.72	82.65	65.72	85.25	49.66	76.68	62.57	90.29	45.77	85.77
Variables	Factores de carga															
	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2
Número de plicae	0.86	0.47	0.81	-0.52	0.62	0.69	0.96	-0.21	0.79	0.35	0.82	-0.44	0.94	-0.28	0.06	0.97
Distancia entre plicae	-0.02	0.09	-0.22	0.06	0.26	0.24	-0.12	-0.01	-0.30	-0.04	-0.28	0.15	-0.06	0.22	-0.08	-0.16
Forma del pseudosulco	-0.36	0.80	0.22	0.36	-2.48× 10 ⁻¹⁷	4.74× 10 ⁻¹⁷	0.09	0.63	-0.35	0.93	0.02	0.35	-0.06	0.23	0.29	0.10
Forma de plicae	-0.34	0.32	0.47	0.76	-0.73	0.67	0.19	0.74	0.39	0.07	0.49	0.81	0.32	0.90	0.94	-0.11

Cuadro 7: Funciones discriminantes y porcentaje de varianza explicado por cada una de ellas. Valores de las cargas de los ejes de las funciones discriminantes para cada una de las variables morfológicas polínicas de *Ephedra* L. presente en México

Eje	1	2
Valor dominante	0.99	0.59
Varianza (%)	56.26	33.50
Varianza acumulada (%)	56.26	89.76

Variables	Factores de carga	
Número de plicae	0.208	-0.035
Distancia entre plicae	-0.062	-0.003
Forma del pseudo	-0.056	0.049
Forma de plicae	0.004	-0.137

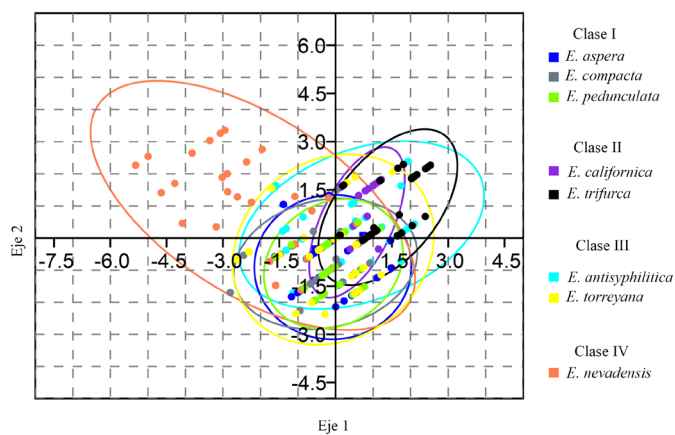


Figura 2: Gráfica de dispersión de puntos del análisis discriminante (DA) en el que se observa la máxima separación entre las especies de *Ephedra* L. presentes en México.

jetivo de caracterizar y diferenciar el polen de cada una de ellas (Steeves y Barghoon, 1959; Kedves, 1987; El-Ghazaly y Rowley, 1997; Ickert-Bond et al., 2003). Los trabajos de Steeves y Barghoon (1959) y Kedves (1987) definieron los tipos polínicos de *Ephedra* basándose en observaciones del número y estructura de las plicae y en la ornamentación presente en los valles. Posteriormente, El-Ghazaly y Rowley (1997) observaron variación en la relación del EP/EE y en la forma de las plicae de polen procedente del mismo microsporangio en *E. foliata* Boiss. Por otro lado, Ickert-Bond et al. (2003) analizaron la morfología polínica de *E. trifurca* y un espécimen con morfología intermedia entre

Cuadro 8: Matriz de confusión diagonal del DA con el número de observaciones asignados a cada especie de *Ephedra* L. presente en México. ant=*E. antisiphilitica* S. Watson, asp=*E. aspera* Engelm. ex S. Watson, cal=*E. californica* S. Watson, com=*E. compacta* Rose, nev=*E. nevadensis* S. Watson, ped=*E. pedunculata* Engelm. ex S. Watson, tor=*E. torreyana* S. Watson, tri=*E. trifurca* Torr.

	ant	asp	cal	com	nev	ped	tor	tri	Total
ant	9	1	2	1	3	4	0	10	30
asp	2	17	2	2	1	3	3	0	30
cal	3	3	10	0	0	0	8	6	30
com	1	7	3	8	1	8	2	0	30
nev	4	3	0	3	18	2	0	0	30
ped	4	3	1	3	0	14	5	0	30
tor	1	6	6	2	3	4	6	2	30
tri	3	0	10	0	0	0	1	16	30
Total	27	40	34	19	26	35	25	34	240

E. torreyana y *E. funerea*. En los tres taxones detectaron dimorfismo en el polen procedente de un mismo microsporangio, es decir, que los granos polínicos tenían dos formas diferentes. En *E. trifurca*, el polen más común presentó plicae rectas con pseudosulcos bifurcados, mientras que su variante mostró plicae con un patrón en zig-zag. En el ejemplar intermedio (*E. torreyana*-*E. funerea*), el polen más común fue similar al de *E. torreyana*; su variante tuvo un patrón en zig-zag muy marcado en las plicae formando una cresta puntiaguda, que no se presentó en aquellos granos de polen con plicae rectas. En *E. torreyana* el polen mostró plicae rectas, con pseudosulcos ligeramente sinuosos, a veces ramificados y la variante exhibió un adelgazamiento de la porción central de la plicae con patrón en zig-zag. Estos trabajos permitieron entender la variación morfológica en el polen de diferentes especies de *Ephedra*; sin embargo, la falta de un análisis estadístico de las variables revisadas en cada especie dificultó el establecimiento de un criterio cuantitativo y objetivo para diferenciarlas.

Los estudios de Bolinder et al. (2015, 2016) determinaron la correlación entre la morfología polínica y los síndromes de polinización, además de establecer las tendencias evolutivas del género. Bolinder et al. (2016) revisaron cuatro variables cuantitativas (EP, EE, relación EP/EE y número de plicae) y una cualitativa (ramificación del pseudosulco) en 45 especies de *Ephedra* (incluidas las ocho especies que se distribuyen en México), para reconstruir el

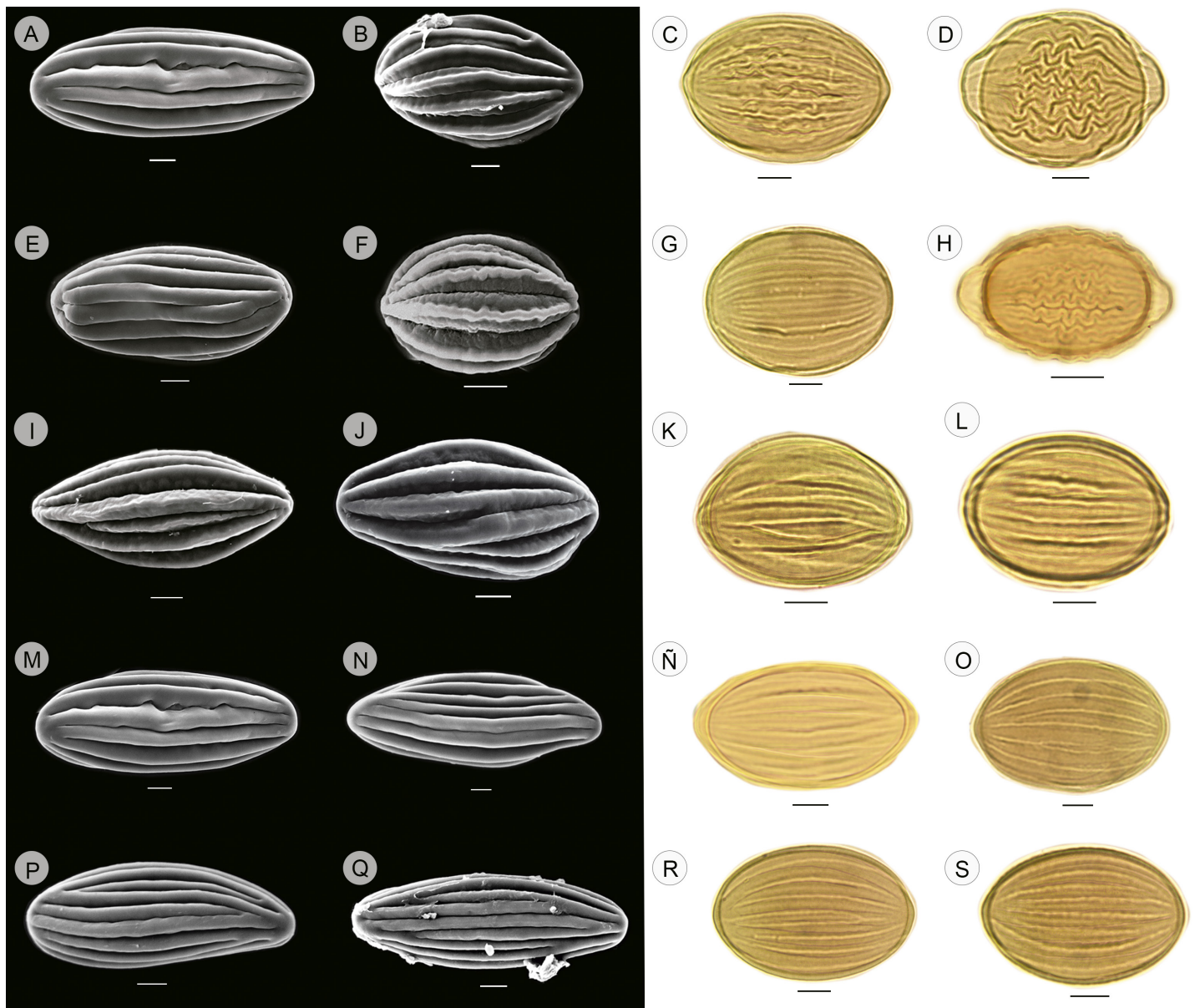


Figura 3: Imágenes del microscopio electrónico de barrido (MEB) (izquierda), barras de escala = 5 μm ; imágenes del microscopio fotónico (MF) (derecha), barras de escala = 10 μm . **A-L: Clase I.** **A-D:** *Ephedra aspera* Engelm. ex S. Watson; **E-H:** *E. compacta* Rose; **I-L:** *E. pedunculata* Engelm. ex S. Watson. **M-T: Clase II.** **M-O:** *E. californica* S. Watson; **P-S:** *E. trifurca* Torr.

estado ancestral de cada carácter. Sin embargo, no mencionaron los criterios utilizados para seleccionar las variables empleadas en su análisis.

En el presente estudio se observaron y analizaron ocho caracteres morfológicos que se han revisado en trabajos previamente publicados de morfología polínica de *Ephedra*. Los resultados de los análisis estadísticos univariados (ANOVA) indicaron que las medias del EP y del EE presentaron mayor variación entre las ocho especies estudiadas. A pesar de que el cociente de la relación EP/EE (for-

ma del polen) es un carácter vinculado con los dos anteriores, tuvo menor variación entre especies.

El número de plicae y la distancia entre ellas son dos caracteres que también están inversamente correlacionados: a mayor número de plicae menor es su distancia y viceversa. *Ephedra nevadensis* fue la única especie cuya media del número de plicae la diferenció significativamente de las otras. Por lo tanto, la media de la distancia entre plicae también fue diferente con respecto a las demás. La forma de las plicae fue la única variable cualitativa en la que el

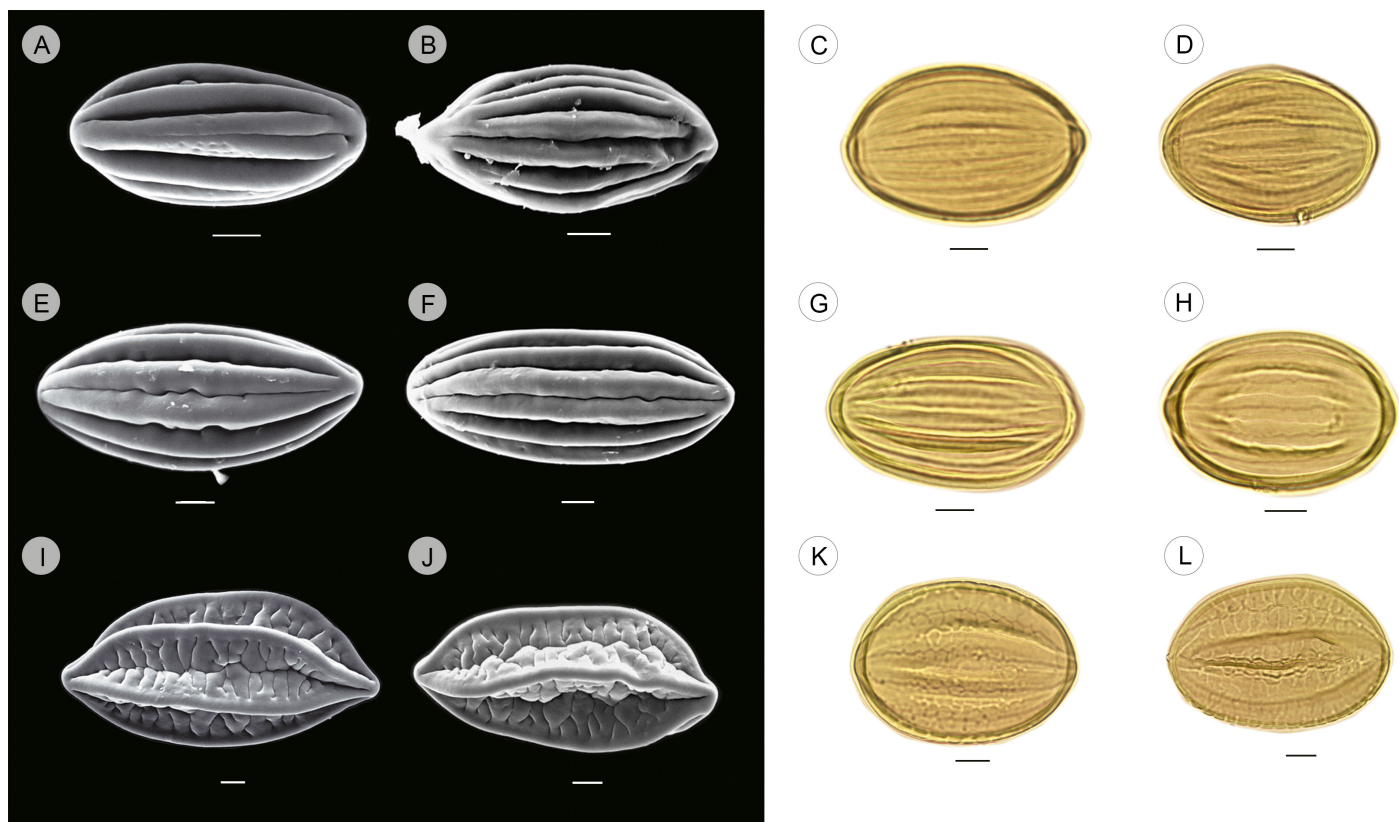


Figura 4: Imágenes del microscopio electrónico de barrido (MEB) (izquierda), barras de escala = 5 µm; imágenes del microscopio fotónico (MF) (derecha), barras de escala = 10 µm. **A-H: Clase III.** **A-D:** *Ephedra antisiphilitica* S. Watson; **E-H:** *E. torreyana* S. Watson. **I-L:** Clase IV: *E. nevadensis* S. Watson.

ANOVA detectó diferencia entre las medias registradas; en este sentido, *E. californica*, *E. trifurca* y *E. nevadensis* destacaron en el contraste de medias entre especies.

Los resultados del ANOVA indicaron que las ocho especies analizadas comparten características polínicas que las agruparon en tres conjuntos: el primero conformado por *E. antisiphilitica* y *E. compacta*; en el segundo están *E. aspera*, *E. californica* y *E. nevadensis*; mientras que el tercero está integrado por *E. pedunculata*, *E. torreyana* y *E. trifurca*. Los tres conjuntos identificados se definieron al menos por tres de las ocho variables analizadas (EP, EE y EP/EE), mientras que las restantes (número de plicae, distancia entre ellas y forma) aportaron poca información referente a la variación de los taxones. Los valores de EP, EE y EP/EE coinciden con los datos registrados por Bolinder et al. (2016), mientras que el número de plicae y la ramificación del pseudosulco (revisados también por estos autores), tampoco contribuyeron significativamente a la diferenciación de especies.

En contraste, el análisis de las características polínicas de las especies presentes en México con métodos estadísticos multivariados permitió analizar tanto caracteres cuantitativos como cualitativos para obtener resultados más robustos. El PCA mostró que las variables polínicas importantes fueron el número de plicae y la forma del pseudosulco. Además, este análisis añadió dos características que muestran variación significativa: distancia entre plicae y su forma. El PCA no seleccionó como variables significativas EP, EE, ni la relación EP/EE, a diferencia de lo resultante con el ANOVA de este estudio y en el trabajo de Bolinder et al. (2016).

A pesar de que el ANOVA mostró una variación significativa en el EE de las ocho especies analizadas, la estadística multivariada indicó que esta variable no contribuye significativamente a la distinción entre taxones, lo que sugiere que no debe considerarse como un carácter polínico distintivo. Esto también lo observaron Bolinder et al. (2016) en las especies del clado Norteamericano de *Ephedra*, y con-

cluyeron que es difícil usar el EE para identificar especies, debido a que hay coincidencias entre las medidas del eje ecuatorial del polen de los diferentes clados (Norteamericano, Asiático, Sudamericano y Mediterráneo).

No obstante que la longitud del EE del polen carece de valor para diferenciar las especies de *Ephedra*, se ha observado que cobra relevancia cuando se asocia a la presencia o ausencia de ramificaciones en el pseudosulco (forma del pseudosulco), las cuales son un carácter importante desde el punto de vista evolutivo y ecológico (Bolinder et al., 2015, 2016). El tipo polínico ancestral en *Ephedra* carece de ramificaciones en el pseudosulco, mientras que el polen derivado sí las presenta (Bolinder et al., 2015, 2016). En un estudio de la morfología polínica de seis especies de *Ephedra* (*E. distachya*, *E. foeminea*, *E. likiangensis*, *E. nevadensis*, *E. trifurca* y *E. viridis*), Bolinder et al. (2015) encontraron diferencias significativas en el EE, de manera que el polen más pequeño correspondió a especies carentes de ramificaciones en el pseudosulco (*E. foeminea* y *E. trifurca*).

En el presente estudio, *E. compacta* y *E. antisiphilitica* registraron los valores más pequeños del EE ($\bar{X} = 48$ y $50 \mu\text{m}$, respectivamente). Ambas especies carecieron de ramificaciones en el pseudosulco, lo cual indica que corresponderían a tipos polínicos ancestrales. Este dato es particularmente relevante para *E. compacta* ya que esta especie es endémica de México, al igual que los dos taxones simpátricos del altiplano central (Villanueva-Almanza y Fonseca, 2011). Por otro lado, *E. aspera* y *E. nevadensis*, que registraron longitudes mayores de EE ($\bar{X}=67$ y $69 \mu\text{m}$, respectivamente) tuvieron ramificaciones en el pseudosulco, lo que concuerda con los tipos polínicos derivados.

Se desconoce cuál es la función de las ramificaciones del pseudosulco en *Ephedra*. Una hipótesis es que propician la deshidratación y posterior rehidratación del grano de polen y junto con la ultraestructura granular de la exina facilitan la dispersión anemófila (Bolinder et al., 2015, 2016). Se ha intentado asociar la presencia de ramificaciones en el pseudosulco con los síndromes de polinización presentes en distintas especies de *Ephedra*, pero hasta el momento no se ha podido establecer una clara correlación entre ellos (Bolinder et al., 2015; Rydin y Bolinder, 2015). Las únicas especies que son polinizadas por

insectos son *E. foeminea* y *E. aphylla* (Bolinder et al., 2015; Rydin y Bolinder, 2015), mientras que *E. trifurca* presenta polinización anemófila (Niklas et al., 1986) y las tres especies tienen ramificaciones en el pseudosulco. Para el resto de las especies mexicanas, se desconocen sus síndromes de polinización y, por ello, no se puede establecer una correlación con la forma del pseudosulco.

Los análisis filogenéticos, de acuerdo con Bolinder et al. (2016), indican que el pseudosulco ramificado es un carácter que evolucionó independientemente en *Ephedra* tanto en el clado Asiático como en el Norteamericano y que se trata de una convergencia de tipos polínicos idénticos, por lo que no es posible identificar especies basándose únicamente en la morfología de la apertura. Sin embargo, a partir de los análisis estadísticos realizados en la presente investigación se observó que, si además de registrar la presencia o ausencia de ramificaciones en el pseudosulco, se toma en cuenta su forma (recta o sinuosa), es posible explicar un mayor porcentaje de la variación registrada en las especies mediante el empleo de análisis estadísticos multivariados. Así, la forma del pseudosulco resultó entre los caracteres cuya variación en las ocho especies estudiadas fue significativamente distinta.

Otro carácter que presentó variación en el presente estudio fue el número de plicae. Se estima que está correlacionado con la distancia filogenética de los diferentes clados de *Ephedra* (Bolinder et al., 2016) y como consecuencia, entre las distintas especies. Un mayor número de plicae supone un estado polínico ancestral, porque la tendencia evolutiva es hacia la reducción de su número en todos los clados (Bolinder et al., 2015, 2016). De las ocho especies estudiadas, *E. nevadensis* tuvo la menor cantidad de plicae ($\bar{X}=11$). Desde un punto de vista evolutivo, tal reducción representa la tendencia hacia un tipo polínico derivado.

El número de plicae está fuertemente relacionado con la distancia que existe entre ellas (Bolinder et al., 2016). En el presente trabajo la distancia entre plicae aportó variación significativa en la morfología polínica de *Ephedra*. En trabajos previos (Steeves y Barghoon, 1959; Kedves, 1987; El-Ghazaly y Rowley, 1997; Ickert-Bond et al., 2003; Bolinder et al., 2015, 2016), la distancia entre plicae no fue considerada en análisis estadísticos encami-



nados a identificar su aportación como fuente de variación en el polen.

La forma de la plica suele describirse de manera cualitativa en la mayoría de los estudios (Steeves y Barghoon, 1959; Kedves, 1987; El-Ghazaly y Rowley, 1997; Ickert-Bond et al., 2003; Bolinder et al., 2015, 2016). Esto ha dificultado su inclusión como un carácter relevante en los análisis estadísticos; además, limita la comparación de resultados. El empleo de la estadística multivariada en el presente estudio permitió asignarle un valor e identificarlo como un carácter significativo e importante del polen de *Ephedra*.

Finalmente, el DA discriminó apropiadamente las especies de *Ephedra* en cuatro clases de acuerdo con su morfología polínica. Los análisis univariados y multivariados reforzaron la agrupación de las ocho especies estudiadas. También establecieron tres clases de tipos polínicos de *Ephedra* que comparten rasgos morfológicos y una especie (*E. nevadensis*) que se ubicó sola en una clase, dado que sus características la diferenciaron claramente del resto.

Conclusiones

Los métodos estadísticos multivariados permitieron analizar de manera conjunta caracteres cualitativos y cuantitativos del polen de las especies de *Ephedra* presentes en México. De las ocho variables estudiadas únicamente dos características cuantitativas y dos cualitativas explicaron el mayor porcentaje de la varianza. Así mismo, se lograron diferenciar, con base en su morfología polínica, las especies en cuatro clases. Estas pueden servir de referencia para asignar afinidades botánicas con especies actuales que tengan polen tipo Ephedroide registrado en algunas paleocuevas de México.

La descripción detallada de la morfología del polen de las *Ephedras* de México permitió identificar una posible tendencia: la relación entre el tipo de polen y la distribución geográfica de las especies. Las especies de la Clase I se localizan principalmente en Chihuahua, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas, mientras que de las Clases II, III y IV tienen distribución en la parte septentrional del país, especialmente en Baja California, Coahuila y Sonora. Sin embargo, se requiere un análisis más profundo para establecer una relación certera.

La morfología polínica de *E. compacta* y *E. antisiphilitica* corresponde con los tipos polínicos ancestrales, de acuerdo con lo registrado en la literatura, mientras que el polen de *E. nevadensis* concuerda con los tipos polínicos derivados. En el resto de las especies no se observó claramente dicha correspondencia.

Contribución de autores

IGE concibió el estudio, desarrolló los métodos, análisis y redactó el manuscrito. LLM realizó los análisis estadísticos y participó en la redacción del manuscrito. AZR y FPN colaboraron en el procesamiento de las muestras para microscopía fotónica y microscopía electrónica de barrido, en la obtención de imágenes, revisaron y aprobaron el manuscrito. IRP contribuyó en la redacción y revisión del manuscrito. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final del trabajo.

Financiamiento

Este estudio fue apoyado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Proyecto No. 654 del Programa Investigadoras e Investigadores por México); por el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo; por el Departamento de Ciencias Ambientales-Aerobiología del Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático de la Universidad Nacional Autónoma de México; y por el Fondo para el Desarrollo de Recursos Humanos (FIDERH) del Banco de México.

Agradecimientos

Al personal del Herbario Nacional de México (MEXU) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y a Ricardo Vega Muñoz del Herbario-Hortorio CHAPA del Colegio de Postgraduados, por facilitar la toma de muestras de polen de las especies de *Ephedra*. A María Eugenia Muñiz Díaz de León por proporcionar material de *Ephedra compacta*. A Leticia Martínez Romero, Eva Salinas Cortés y Elena Amaya, del Departamento de Ciencias Ambientales-Aerobiología del Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático (UNAM), por las facilidades otorgadas durante el procesamiento de muestras de polen para este trabajo. A Margarita Reyes Salas y M. Sonia Ángeles García



de la Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) del Instituto de Geología, UNAM, y a Simón Morales Rodríguez del Colegio de Postgraduados por su asesoría en el manejo del MEB. A Luis Felipe Jiménez García y Lourdes Agredano Moreno por la lectura y comentarios a la primera versión de este manuscrito. A los revisores anónimos de Acta Botanica Mexicana que contribuyeron a mejorar el contenido, redacción y presentación de la versión final del trabajo.

Literatura citada

- Alanis-Flores, G. J., M. A. Alvarado-Vázquez, L. Ramírez-Freire, C. G. Velasco-Macías y R. Foroughbakhch-Pournavac. 2011. Flora endémica de Nuevo León, México y estados colindantes. Journal of the Botanical Research Institute of Texas 5: 275-298.
- AmScope. 2022. AmScope v. 3.7. <https://amscope.software.informer.com/3.7/> (consultado 2022).
- Bolinder, K., K. J. Niklas y C. Rydin. 2015. Aerodynamics and pollen ultrastructure in *Ephedra*. American Journal of Botany 102(3): 457-470. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.1400517>
- Bolinder, K., L. Norbäck Ivarsson, A. M. Humphreys, S. M. Ickert-Bond, F. Han, C. Hoorn, y C. Rydin. 2016. Pollen morphology of *Ephedra* (Gnetales) and its evolutionary implications. Grana 55(1): 24-51. DOI: <https://doi.org/10.1080/00173134.2015.1066424>
- Carranza, E. 2015. Ephedraceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes 188: 1-7. DOI: <https://doi.org/10.21829/fb.57.2015.188>
- Christenhusz, M. J. M., J. L. Reveal, A. Farjon, M. F. Gardner, R. R. Mill y M. W. Chase. 2011. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. Phytotaxa 19: 55-70. DOI: <http://doi.org/10.11646/phytotaxa.19.1.3>
- Coiro, M. E., A. Roberts, C.-Ch. Hofmann y L. J. Seyfullah. 2022. Cutting the long branches: Consilience as a path to unearth the evolutionary history of Gnetales. Frontiers in Ecology and Evolution 10: 1-15. DOI: <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.1082639>
- Cornet, B. 1996. A new gnetophyte from the Late Cretaceous (Late Triassic) of Texas and its bearing on the origin of the angiosperm carpel and stamen. In: Taylor, D. W. y L. J. Hickey (eds.). Flowering plant origin, evolution & phylogeny. New York, USA. Pp. 32-67. DOI: http://doi.org/10.1007/978-0-585-23095-5_3
- Crane, P. R. y S. Lidgard. 1989. Angiosperm diversification and paleolatitudinal gradients in Cretaceous floristic diversity. Science 246(4930): 675-678. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.246.4930.675>
- da Luz, C. F. P. 2016. Pollen grains of *Ephedra tweediana* C. A. Mey, recent species of the Ephedraceae in Brazil. Grana 55(1): 17-23. <https://doi.org/10.1080/00173134.2015.1057520>
- Eckenwalder, J. E. y Thieret J. W. 1993. Flora of North America. Pteridophytes and Gymnosperms 2. http://floranorthamerica.org/Volume_2 (consultado diciembre de 2018).
- El-Ghazaly, G. y J. R. Rowley. 1997. Pollen wall of *Ephedra foliata*. Palynology 21: 7-18. DOI: <https://doi.org/10.1080/01916122.1997.9989483>
- El-Ghazaly, G., J. R. Rowley y M. Hesse. 1998. Polarity, aperture condition and germination in pollen grains of *Ephedra* (Gnetales). Plant Systematics and Evolution 213: 217-231.
- Erdtman, G. 1960. The acetolysis method—a revised description. Svensk Botanisk Tidskrift 54: 561-564.
- Galván-Escobedo, I. G., E. Ramírez-Arriaga, A. Valiente-Banuet y E. Uscanga-Mortera. 2017. Registro paleopalínológico de la Formación San Gregorio (Barreno B4), Baja California Sur México. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana 69(1): 35-58. DOI: <https://doi.org/10.18268/BSGM2017v69n1a3>
- García, M. J., E. Premaor, P. E. De Oliveira, M. E. C. Bernardes-de-Oliveira, R. Dino, L. Antonioli y J. B. De Menezes. 2016. Cenozoic distribution of *Ephedripites* Bolkhovitina (1953) ex Potonié (1958) emend. Krutzsch (1961) in Brazil. Grana 55: 52-70. DOI: <https://doi.org/10.1080/00173134.2015.1119882>
- Hammer, Ø. 2017. PAST. Paleontological Statistics version 3.15. Reference Manual. <https://folk.uio.no/ohammer/past/past3manual.pdf> (consultado diciembre de 2018).
- Han, F., C. Rydin, K. Bolinder, G. Dupont, Nivet, H. A. Abels, A. Koutsodendris, K. Zhang, y C. Hoorn. 2016. Steppe development on the Northern Tibetan Plateau inferred from Paleogene ephedroid pollen. Grana 55: 71-100. DOI: <https://doi.org/10.1080/00173134.2015.1120343>



- Huang, J., D. E. Giannasi y R. A. Price. 2005. Phylogenetic relationships in *Ephedra* (Ephedraceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35(1): 48-59. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.12.020>
- Ickert-Bond, S. M. y M. F. Wojciechowski. 2004. Phylogenetic relationships in *Ephedra* (Gnetales): evidence from nuclear and chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany* 29(4): 834-849. DOI: <https://doi.org/10.1600/0363644042451143>
- Ickert-Bond, S. M., J. J. Skvarla y W. F. Chissole. 2003. Pollen dimorphism in *Ephedra* L. (Ephedraceae). *Review of Palaeobotany and Palynology* 124: 325-334. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0034-6667\(03\)00002-2](http://doi.org/10.1016/S0034-6667(03)00002-2)
- Johnson, D. E. 2000. Métodos Multivariados Aplicados al Análisis de Datos. International Thomson Editores. México, D.F., México. 566 pp.
- Judd, W. S., C. S. Campbell, E. A. Kellogg, P. F. Stevens y M. J. Donoghue. 2008. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. 3a. ed. Sinauer Associates. Sunderland, UK. 611 pp.
- Kedves, M. 1987. LM and EM studies on pollen grains of recent *Welwitschia mirabilis* Hook. and *Ephedra* species. *Acta Botanica Hungarica* 33: 81-103.
- Kremp, G. 1965. *Morphologic encyclopedia of palynology*. The University of Arizona Press. Tucson, USA. 263 pp.
- Mauseth, J. 2016. *Botany: an introduction to plant biology*. Jones and Bartlett Publishers. Burlington, USA. 808 pp.
- Martínez-Hernández, E. y E. Ramírez-Arriaga. 1999. Palinoestratigrafía de la región de Tepexi de Rodríguez, Puebla, México. Implicaciones cronoestratigráficas. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 16(2): 187-207.
- McDonald, J. H. 2014. *Handbook of biological statistics* (3rd ed.). Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland, United States of America. 296 pp. <http://www.biostathandbook.com/outline.html> (consultado enero de 2019).
- Medina, R. y P. Dávila. 1997. Gymnospermae. *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* 12: 14-17.
- Niklas, K. J., S. L. Buchmann y V. Kerchner. 1986. Aerodynamics of *Ephedra trifurca*. I. Pollen grain velocity fields around stems bearing ovules. *American Journal of Botany* 83: 966-999. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1986.tb08540.x>
- Punt, W., P. P. Hoen, S. Blackmore, S. Nilsson y A. Le Thomas. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Paleobotany and Palynology* 143: 1-81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2006.06.008>
- Ramírez-Arriaga, E. 2005. Reconstrucción paleoflorística de la Formación Cuayuca con base en análisis palinoestratigráfico e implicaciones paleogeográficas. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México. 231 pp.
- Ramírez-Arriaga, E., M. Prámparo, E. Martínez-Hernández y A. Valiente. 2006. Palynology of the Paleogene Cuayuca Formations (stratotype sections), southern Mexico: Chronostratigraphical and palaeoecological implications. *Review of Paleobotany and Palynology* 141: 259-275. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2006.04.006>
- Ramírez-Arriaga, E., M. B. Prámparo, A. F. Nieto-Samaniego, E. Martínez-Hernández, A. Valiente-Banuet, C. Macías-Romo y O. Dávalos-Álvarez. 2014. Palynological evidence for Middle Miocene vegetation in the Tehuacán Formation of Puebla, Mexico. *Palynology* 38(1): 1-27. DOI: <http://doi.org/10.1080/01916122.2013.802750>
- Rydin, C. y K. Bolinder. 2015. Moonlight pollination in the gymnosperm *Ephedra* (Gnetales). *Biology Letters* 11: 20140993. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0993>
- Rydin, C. y C. Hoorn. 2016. The Gnetales: past and present. *Grana* 55(1): 1-4. DOI: <http://doi.org/10.1080/00173134.2015.1118530>
- Rydin, C., K. R. Pedersen y E. M. Friis. 2004. On the evolutionary history of *Ephedra*: Cretaceous fossils and extant molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(47): 16571-16576. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0407588101>
- Shapiro, S. S. y M. B. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611. DOI: <https://doi.org/10.2307/2333709>
- Steeves, M. W. y E. S. Barghoorn. 1959. The pollen of *Ephedra*. *Journal of the Arnold Arboretum* 40: 221-255.
- Thiers, B. 2022-updated continuously. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium <http://sweetgum.nybg.org/ih> (consultado octubre de 2023).
- Villanueva-Almanza, L. y R. M. Fonseca. 2011. Revisión taxonómica y distribución geográfica de *Ephedra* en México. *Acta Botanica Mexicana* 96: 79-116. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm96.2011.261>



- Villarreal, Q., J. Á. y E. Estrada C. 2011. Ephedraceae. Flora de Veracruz 154: 1-6. DOI: <https://doi.org/10.21829/fv.325.2011.154>
- Wan, T., Z.-M. Liu, L.-F. Li, A. R. Leitch, I. J. Leitch, R. Lohaus, Z.-J. Liu, H.-P. Xin, Y.-B. Gong, Y. Liu, W.-C. Wang, L.-Y. Chen, Y. Yang, L. J. Kelly, J. Yang, J.-L. Huang, Z. Li, P. Liu, L. Zhang, H.-M. Liu, H. Wang, S.-H. Deng, M. Liu, J. Li, L. Ma, Y. Liu, Y. Lei, W. Xu, L.-Q. Wu, F. Liu, Q. Ma, X.-R. Yu, Z. Jiang, G.-Q. Zhang, S.-H. Li, R.-Q. Li, S.-Z. Zhang, Q.-F. Wang, Y. Van de Peer, J.-B. Zhang y X.-M. Wang. 2018. A genome for gnetophytes and early evolution of seed plants. Nature Plants 4: 82-89. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0097-2>
- Wang, Z. 2004. A new Permian Gnetalean cone as fossil evidence for supporting current molecular phylogeny. Annals of Botany 94: 281-288. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/fmch138>



Apéndice: Especímenes de herbario de los cuales se tomaron las muestras de polen.

***Ephedra antisiphilitica* S. Watson**

MÉXICO. Coahuila, municipio indefinido, 2 km SW of restaurant La Muralla, 1225-1500 m, 26°20'N, 101°23'O, 18.III.1973, *M.C. Johnston et al. 10287* (MEXU). San Luis Potosí, municipio Soledad, cerca del poblado Palma de la Cruz, 19.II.1963, *A. Gómez 830* (MEXU).

***Ephedra aspera* Engelm. ex S. Watson**

MÉXICO. Baja California, municipio Santa Catarina, 240 m, 01.III.1998, *D. E. Breedlove s.n.* (MEXU); small sierra E of La Ramona on road from Guayaquil to Puerto Santa Catarina, 26.II.1991, *S. Boyd y T. Ross 5368* (MEXU). Municipio indefinido, Sierra la Asamblea, heading in from El Crucero of Hwy 1, 13.5 mi N of junt with main rd to Bahía de Los Angeles, in cyn SE side of Cerro La Gobernadora, 700-1100 m, 29°16'N, 114°6'O, 30.III.1991, *S. Boyd y T. Ross 5565* (MEXU). Coahuila, municipio de Parras, ejido Charco de la Varca 12 km al S de Parras de la Fuente, 2000 m, 10.VI.1981, *A. Rodríguez 13952* (CHAPA). San Luis Potosí, municipio Guadalcázar, en los alrededores de la localidad de El Refugio, 1240 m, 01.V.1974, *E. García Moya 1002* (CHAPA).

***Ephedra californica* S. Watson**

MÉXICO. Baja California, municipio Ensenada, bush to 2 feet tall; in broad sandy wash, at north boundary of Paipai Reservation, along road to Rancho La Cienega, 3.5 mi N of Santa Catarina, 64 mi SE of Ensenada, 23.IV.1962, *R. E. Broder 788* (MEXU). Municipio Tijuana, San Antonio del Mar, inner sand dunes just S of San Antonio del Mar, 6.8 miles WNW of Clonet on Hwy 1, 31°06.5'N, 116°18.5'O, 31.III.1985, *R. F. Thorne y D. Charlton 58799* (MEXU); Sierra de Juárez, La Rumorosa, 31.III.1989, *E. Ezcurra et al. s.n.* (MEXU). Municipio indefinido, 16 km on Mexico 3 (Ensenada to Héroes de la Independencia road) E of the Ojos Negros junction, 850 m, 31.86500°N, 116.11935°W, 19.IV.2002, *D.P. Little y H. Ochoterena 793* (MEXU); S of Valle de las Palmas, rocky W-facing slope E of junction of Hwy 3 (Tecate-Ensenada) and road into Cerro Bola, ca. 2 km S of Valle de las Palmas, 14.III.1987, *R. F. Thorne et al. 62155* (MEXU).

***Ephedra compacta* Rose**

MÉXICO. Puebla, municipio Palmar de Bravo, 6.41 km al NE del Palmar de Bravo, 2521 m, 18°52'33"N, 97°30'10.3"O, 12.VII.2011, *C. H. Ramos et al. 2924* (MEXU).

***Ephedra nevadensis* S. Watson**

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. Arizona, municipio indefinido, low bush growing on sides of canyon Cabeza Prieta National Wildlife Refuge, western portion, Buckthorn Tank, S-facing canyon in larger box canyon, 1400 m, 20.III.1987, *T.S. Elias et al. 10278* (MEXU). California, Kern County, 28 km E of Interstate Highway 5 on State Highway 138, 880 m, 20.IV.1985, *B. Bartholomew et al. 2211* (MEXU). Nevada, municipio indefinido, Kyle Canyon, 1350 m, 29.V.1937, *I.W. Clokey 7465* (MEXU).

***Ephedra pedunculata* Engelm. ex S. Watson**

MÉXICO. Coahuila, municipio indefinido, S margin of Cuatro Ciénegas Basin, along the edge of the Sierra San Marcos, about 2-4 mi E of Hwy 30, 720 m, 26°54'N, 102°06'W, 18.X.2002, *J. Henrickson y D. Riskid 23183* (MEXU). Nuevo León, municipio Aramberri, 1580 m, 1.VIII.1980, *H. et al. s.n.* (CHAPA). San Luis Potosí, municipio Matehuala, ejido Cerrito Blanco, 10 km al E de Matehuala, 1500 m, 06.X.1980, *S. Lemus 10* (CHAPA). Municipio indefinido, 1 km de la desviación que va hacia San José del Refugio, sobre la carretera S.L.P. - Matehuala a la altura del km 126, 1350 m, 07.IX.1975, *E. García M.M. s.n.* (CHAPA).

***Ephedra torreyana* S. Watson**

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. New Mexico, Lincoln Co., White Sands Missile Range, ca 2.5 mi S of Socorro Co. line on Range Rd. 9.21 air mi. W of Carrizozo, nm ¼ Sec.16, T8S, R7E, 13.V.1990, *R. Spellenberg s.n.* (MEXU).

***Ephedra trifurca* Torr.**

MÉXICO. Chihuahua, municipio Coyame del Sotol, 7 km E of ejido Cuchillo Parado and on the far side of the Río Conchos, on the road to Coyame, 950 m, 29°28'N, 104°55'W, 04.IV.1973, *M.C. Johnston et al. 10573* (MEXU). Municipio Rosales, 18.4 mi (29.6 km) SE of Chihuahua (from Edge of City) on MEX 45 towards Delicias, near km 185 of MEX 45, hill-sides SW of the road and riverine flats, 1400-1500 m, 29.III.1992, *U. Eggli et al. 2120* (MEXU). San Luis Potosí, municipio indefinido, orilla N del pueblo de Santo Domingo, *A. Gómez 746* (MEXU). Sonora, municipio indefinido, Gran desierto, high, shifting dunes ca. 8 km W of main mountain mass of Sierra del Rosario, 190 m, 32°05'N, 114°19'W, 10.III.1975, *R. Felger et al. 75-36* (MEXU).

