



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DETERMINACIÓN DE LA DINÁMICA ESTOMÁTICA
DE *ECHEVERIA LAUI* (*CRASSULACEAE*) EN
INDIVIDUOS OBTENIDOS DE PROPAGACIÓN
VEGETATIVA Y SEXUAL.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
MARIA DEL ROCIO REYERO SAAVEDRA

DIRECTOR: DR. JUAN GERARDO ORTÍZ MONTIEL



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, MÉXICO.

AGOSTO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

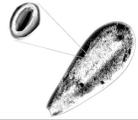
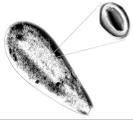


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



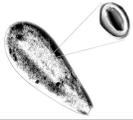
DEDICATORIA

A mis padres, por brindarme los recursos necesarios para cumplir mis metas, a ellos les dedico este logro, que es solamente el primero de muchos más que están por venir.

A mi tía Juana, por el todo el apoyo y cariño que me ha proporcionado.

A mí.





AGRADECIMIENTOS

Al profesor Gerardo Ortíz, el cual siempre ha sido una guía y un gran maestro para mí, por compartir su conocimiento y por brindarme su apoyo, muchísimas gracias, se le admira, quiere y respeta.

A los profesores Manuel, Tony, Rafael y Socorro, por sus acertadas correcciones, las cuáles contribuyeron para mejorar este trabajo.

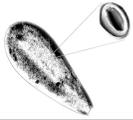
Un muy especial agradecimiento a la profesora Silvia Aguilar, por brindarnos sus sabios consejos y apoyarnos enormemente en la realización de este trabajo.

A mi compañero Miguel Angel Verastegui Vidal debido a que este trabajo surgió de un proyecto en común, el cuál hoy culmina en un gran éxito, gracias a la ardua labor de ambos.

A Jerónimo Reyes por la donación y facilitación de las plantas de *Echeveria laui*.

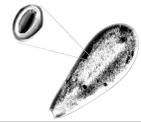
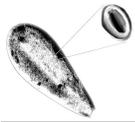
A mis padres, los cuales me han permitido continuar mi educación y me han apoyado al darme los recursos económicos, y sobre todo el amor y cariño que siempre me han tenido. Los quiero.





AVISO AL LECTOR

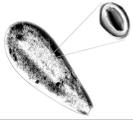
Este trabajo es la continuación del proyecto PAPCA titulado “Multiplicación vegetativa *in vitro* e *in vivo* de *Echeveria laui*, crasulácea endémica mexicana”, si se desea tener una mejor comprensión del tema, se sugiere consultar el trabajo de tesis que lleva por título “Establecimiento de Métodos de Propagación Vegetativa *in vivo* e *in vitro* de *Echeveria laui* (CRASSULACEAE)”.



INDICE.

Resumen	6
Introducción	7
Antecedentes	10
Metabolismo Ácido de las Crasuláceas	10
Tipos de MAC	12
Estomas	17
Metodologías para detectar la fotosíntesis MAC	18
La especie en estudio	19
Objetivos	21
Material y Método	22
Resultados y Discusión	30
Conclusiones	48
Anexos	49
Figuras	50
Gráficas	57
Cuadros	65
Bibliografía	73
Abreviaturas	92



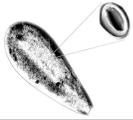


RESUMEN.

México está considerado entre los doce países megadiversos, por lo que contiene una diversidad variable de ecosistemas y especies. En la República Mexicana la zona ecológica más extensa es la árida y semiárida que abarca el 42.7% del territorio nacional, por lo que nuestro país posee una gran diversidad de especies con el Metabolismo Ácido de las Crasuláceas. Este metabolismo se caracteriza por la fijación de CO₂ atmosférico durante la noche y por mantener los estomas cerrados durante el día, este comportamiento corresponde a la fase III del MAC, este patrón inverso de los movimientos estomáticos realizados por las plantas es lo que le da su relevancia ecológica a las plantas MAC. Existen diferentes métodos para detectar la fotosíntesis MAC, como la titulación del tejido macerado, medición de asimilación de CO₂ o isótopos estables del carbono, los últimos dos presentan el inconveniente de requerir aparatos o reactivos de alto costo, y la titulación no es funcional si no se cuenta con el suficiente material vegetal.

Se evaluó la dinámica estomática de *Echeveria laui*, planta endémica de México que se distribuye en la comunidad de Quiotepec del estado de Oaxaca, la cual presenta una abundante cubierta de cera, por lo que para obtener dicha dinámica se tuvo que establecer la técnica idónea para remover la cera. Se valoró la técnica idónea para observar la dinámica estomática mediante la impresión de negativos (usando barniz de uñas transparente o RESISTOL 850[®]) o extrayendo las epidermis, (empleando distintos colorantes y medios de montaje), cada cuatro horas se realizó el muestreo de hojas de diferentes individuos de *Echeveria laui*, (adultos, brotes de propagación vegetativa y plántulas de propagación sexual) para poder observar el patrón de apertura que presentaron los estomas. Durante la realización de este proyecto se determinó que la hoja de *Echeveria laui*, es anfistomática, y el tipo de estoma anisocítico. El índice estomático para esta especie es de 9.50 en el haz, mientras que en el envés es de 5.33, presentando una densidad estomática baja (4.16 estomas por mm²). Con respecto a los negativos que se obtuvieron de las hojas de *Echeveria laui*, estos no resultaron ser una buena técnica para apreciar la apertura del estoma, siendo la extracción de epidermis teñidas con cristal violeta la mejor técnica para dicho propósito. Basándose en la dinámica estomática se encontró que *Echeveria laui* es una planta MAC facultativa y presenta variaciones de este metabolismo, las diferencias en el metabolismo fotosintético se atribuyen a la edad de los individuos y no a las condiciones ambientales.





INTRODUCCIÓN.

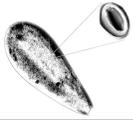
México está entre los doce países denominados megadiversos, en conjunto estos albergan entre 60 y 70% de la diversidad biológica total del planeta, en nuestro territorio se posee alrededor del 10% de la biodiversidad terrestre a nivel mundial (Mittermeier, *et al.* 1992). En México existen diferentes zonas ecológicas con una diversidad variable de especies y ecosistemas (Toledo y Ordoñez, 1998). La zona más extensa es la árida y semiárida (Challenger, 1998; Toledo y Ordoñez, 1998) que comprende un total de 84 millones de hectáreas (relativamente el 42.7% del territorio nacional), (Toledo, *et al.* 1989). Ambas se caracterizan por su baja precipitación pluvial, en las zonas áridas la precipitación pluvial es menor a 320mm al año, con una gran heterogeneidad en la distribución de la precipitación durante la época de lluvias y una temperatura media anual que varía entre 15° y 25°C, y épocas de sequía con duraciones no menores a siete meses (Arias, *et al.* 2001). Las zonas semiáridas, que presentan una precipitación pluvial que oscila entre los 350 y 600mm anuales, con 6 a 8 meses de sequía y una cubierta vegetal superior al 70% (García, 1973; Toledo y Ordoñez, 1998; Ramírez, 1999).

Debido a la extensión de las zonas áridas y semiáridas de nuestro país, no es de extrañar que México posea una gran diversidad de especies con Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (MAC) (Andrade, *et al.* 2007), hay autores que piensan que México posee quizás la mayor diversidad de plantas MAC del mundo, debido a que es el centro de diversificación de las cactáceas y las agaváceas, cuyos miembros son mayoritariamente MAC (Hernández y Godinez-Álvarez, 1994; García-Mendoza y Galván, 1995).

Este metabolismo fue encontrado por primera vez en la familia Crassulaceae, aunque no es específico pues se puede observar en las familias: Agavaceae, Aizoaceae, Asteraceae, Asclepidaceae, Bromeliaceae, Euforbiaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Mesembryanthemaceae, Geraneaceae, Portulacaceae y algunos miembros de la familia Cucurbitaceae, Vitaceae, Laminaceae y también gimnospermas y dos helechos epífitos (Osmond, 1978; Ting, 1985; Osmond y Holtum, 1981).

Los individuos con este metabolismo pueden crecer en sitios donde la disponibilidad de agua (Andrade, *et al.* 2007), o CO₂ es escasa (Taiz y Zeiger, 2002; Larcher, 2003), ya que poseen



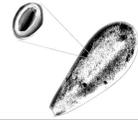
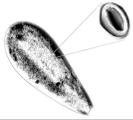


características fisiológicas y morfológicas que les permiten sobrevivir y aún crecer en condiciones de déficit hídrico (Silva, *et al.* 2001). Estas plantas conservan el agua y reducen severamente su habilidad para adquirir y asimilar el carbono (Moore, 1981). El metabolismo MAC se caracteriza por la fijación de CO₂ atmosférico durante la noche y por mantener los estomas cerrados durante el día. (Gibson y Nobel, 1986; Vázquez-Yanes, 1997; Pimienta-Barrios, *et al.* 1998; Dodd, *et al.* 2002). Otra característica que se ha encontrado en estos organismos es su baja frecuencia estomática, ya que en las plantas C₃ y C₄, se presentan 20,000 estomas por cm² aproximadamente, mientras que en MAC, solo se presentan 2,500 estomas por cm², lo cual reduce severamente la pérdida de agua, estas características capacitan a las plantas MAC para sobrevivir en ambientes áridos con un sistema fotosintético funcional. (Osmond y Holtum, 1981).

La contribución del MAC en la fijación total del carbono es altamente variable y depende de factores genotípicos y ontogénicos que afectan la expresión de los atributos de la planta, tanto bioquímicos y fisiológicos (Cushman, 2001; Dood, *et al.* 2002; Keeley y Rundel, 2003); así mismo, depende de las condiciones ambientales (Winter y Smith, 1996; Lüttge, 2002), tales como la temperatura y la intensidad de luz (Nobel y Hartsock, 1983) y el estado de agua de la planta (Dodd, *et al.* 2002). La vía fotosintética MAC, es generalmente asociada a especies suculentas que retiene el agua y muestran un crecimiento limitado (Silva, *et al.* 2001). Las plantas MAC poseen características anatómicas y fisiológicas que les permiten una mejor utilización del agua en relación a las plantas C₃ y C₄ (Nobel, 1988; Silva y Acevedo, 1995) debido a su comportamiento estomático particular y a la fijación del CO₂ durante la noche (Black, 1973; Silva y Acevedo, 1995).

La capacidad MAC puede ser distinguida como obligada (o constitutiva) en plantas que pueden ser dotadas de este metabolismo todo el tiempo y como facultativa (o inducible), que son las plantas en las cuales, la maquinaria metabólica de MAC es sintetizada en respuesta a algunas señales ambientales como, fotoperiodo o “stress” hídrico. De tal manera que las magnitudes de la actividad MAC responde a las condiciones del medio externo e interno. (Osmond, 1978.)



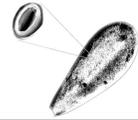
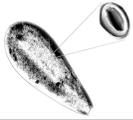


Muchas plantas MAC han sido caracterizadas como facultativas o intermedias C_3 -MAC, pues tienen la habilidad de expresar fotosíntesis C_3 en respuesta a la disponibilidad de agua, a cambios en la humedad relativa, la temperatura del aire, en la cantidad y calidad de la luz, así como en el fotoperiodo (Lee y Griffiths, 1987; Borland y Griffiths, 1992). Las especies C_3 -MAC se encuentran distribuidas en las Aizoaceae, Crassulaceae, Portulacaceae, Vitaceae, Bromeliaceae y Clusiaceae (Smith y Winter, 1996).

Dentro de la familia Crassulaceae, se encuentra *Echeveria laui*, la cual es endémica de la región de Cuicatlán, una zona con clima semiárido (Reyes, *et al.* 2004). Dicha región es un área natural protegida, con el carácter de Reserva de la Biosfera denominada “Valle de Tehuacán-Cuicatlán” (Arias, *et al.* 2001), de la cual se ha estimado que posee un 22.2% de endemismos (aproximadamente 600 de 2,703 especies) aunque datos recientes indican un menor porcentaje (Davila, *et al.* 1995 citado en Acosta, 2002).

Dicha planta presenta una forma de crecimiento arrosutada con hojas suculentas (Walther, 1972), cubiertas por una abundante cera blanquecina. Fue descubierta en 1974 por Alfred Lau y descrita por el Dr. Jorge Meyrán y Reid Morán en la revista *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* en 1976 (Pérez, 2007). Actualmente se encuentra catalogada como “en peligro de extinción” de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, debido a lo reducido de su área de distribución, su alta especificidad de hábitat y las bajas densidades de sus poblaciones (SEMARNAT, 2001), además de que debido a su belleza, ha sido sujeto de colecta y comercialización de ejemplares (Morales, *et al.* 1999).





ANTECEDENTES.

Metabolismo Ácido de las Crasuláceas.

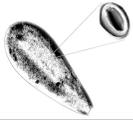
El término MAC se utilizó primariamente en las observaciones de Heyde (1813, citado por Garrido, 1998) en hojas de la especie *Bryophyllum calycinium*, miembro de la familia Crassulaceae, por lo que se le conoce como el Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (MAC).

En la actualidad aproximadamente el 7% de las plantas vasculares presentan la fotosíntesis MAC (que incluye plantas del desierto, plantas acuáticas y epifitas) (Nobel, 1991; Winter y Smith, 1996), y se encuentra ampliamente distribuido en zonas áridas y semiáridas, dada su capacidad de adaptarse a estas condiciones (Mandujano, 1988). Dado que las plantas terrestres MAC habitan lugares cálidos y secos que no promueven la formación de fósiles, por lo que se sabe poco de su radiación, sin embargo, es muy posible que hubiese ido acompañada de las familias Cactaceae (América), Didieraceae (en Madagascar) y Portulacaceae (en África) durante el Cretácico, ya que en éstas predomina la fotosíntesis MAC (Gibson y Nobel, 1986; Raven y Spicer, 1996).

Actualmente hay dos grupos contrastantes de plantas vasculares que presentan MAC en igual proporción: las xerofitas y las hidrofitas (Keeley, 1998). Ambos grupos parecen converger en el mismo tipo de metabolismo en respuesta a presiones de selección muy diferentes (Keeley y Rundel, 2003). Las xerofitas responden a la capacidad de incrementar la eficiencia del uso del agua al abrir los estomas en la noche cuando las tasas de transpiración son menores (Griffiths, 1989). Debido a que la fotosíntesis MAC es costosa e implica limitaciones en la toma del carbono, por lo general las plantas MAC ocupan ambientes desfavorables para el crecimiento de las plantas con fotosíntesis C₃ (Andrade, *et al.* 2007).

Las plantas MAC se caracterizan por un clorénquima empaquetado con gran cantidad de vacuolas donde se acumula el ácido málico, presentan una fracción de aire intercelular del 8% de aire por volumen y el tejido dominante es frecuentemente parénquima almacenador de agua. Además, el mesófilo no está diferenciado en capas de parénquima en empalizado o esponjoso (Nobel y Hartsock, 1990). La vacuola comprende aproximadamente el 95% del volumen total del





protoplasto de las células MAC (Winter, 1985), mientras que el volumen del citoplasma es menor que el 1% de la vacuola (Kluge, *et al.* 1982).

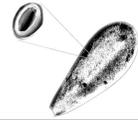
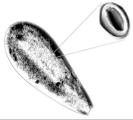
Las plantas MAC carecen de peridermis por un período largo; presentan un gran desarrollo de la cutícula para maximizar la resistencia a perder agua, presentan estomas en la superficie de los brotes pero en densidades bajas (Gibson, 1982). La superficie fotosintética en plantas MAC, se caracteriza por la disposición de grandes cantidades de cera (Silva, *et al.* 2001) que contribuyen a aumentar los valores de resistencia estomática y cuticular a la pérdida de agua (entre 600 y 1000 seg cm^{-1}) de acuerdo a Ting y Szarek (1975).

El Metabolismo Ácido de las Crasuláceas, es un tipo de fijación de CO_2 que se caracteriza por la fijación de CO_2 atmosférico durante la noche y mantener los estomas cerrados durante el día (Gibson y Nobel, 1986; Vázquez-Yanes, 1997; Pimienta-Barrios, *et al.* 1998; Dodd, *et al.* 2002). El ácido málico sintetizado se acumula en la vacuola, de donde sale al día siguiente para ser descarboxilado y el CO_2 obtenido de esta reacción se utiliza en la síntesis de carbohidratos con la energía obtenida del proceso luminoso de la fotosíntesis (Medina, 1977).

Las plantas MAC también presentan un rápido incremento en el porcentaje de absorción de agua por las raíces y espinas o tricomas refractores de los que está cubierta la planta, los cuales reducen la incidencia de radiación solar en la superficie de la planta (Gibson y Nobel, 1986; Vázquez-Yanes, 1997; Pimienta-Barrios, *et al.* 1998; Dodd, *et al.* 2002).

Ting y Rayder (1985) y Medina, *et al.* (1989), establecen para definir el metabolismo MAC el criterio de que los estomas están abiertos durante la noche y cerrados durante las horas de luz del día, este comportamiento corresponde a la fase III del MAC (período de luz), que es cuando los estomas están cerrados (Winter y Smith, 1996; White y Critchley, 1999, Kluge, *et al.* 1982) y se da la descarboxilación de los ácidos orgánicos (Barker y Adams III, 1997; De Mattos, *et al.* 1999; Lüttge, 2002). Este patrón inverso de los movimientos estomáticos realizados por las plantas es lo que le da su relevancia ecológica a las plantas MAC (Kluge, *et al.* 1981).

El almacenamiento endógeno de CO_2 permite a la planta mantener la fotosíntesis operando tras el cierre de los estomas, permitiéndolo a las plantas asimilar el carbono con una pérdida mínima de agua (Kluge, *et al.* 1982). El Metabolismo Ácido de las Crasuláceas incrementa la eficiencia del



uso del agua (Nobel, 1988) ya que al fijarse el CO_2 durante la noche (cuando la temperatura del aire es baja, la humedad relativa es alta y las diferencias de presión de agua sobre las hojas también son bajas) se reduce la pérdida de agua (Winter y Smith, 1996; Roberts, *et al.* 1997; Lüttge, 2002; Osmond, 1978; Ting, 1985), la cuál es menor si la comparamos con las C_3 y C_4 (Osmond, 1981 citado en Mandujano, 1988).

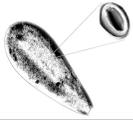
Aunque la capacidad de una planta para realizar el metabolismo MAC esta genéticamente determinada, su control también es ambiental y ontogénico. En general, el metabolismo MAC se ve favorecido por los días con niveles de irradiación elevados, noches frías y suelos secos, situaciones que predominan en los desiertos (Cervantes, *et al.* 2005), ya que estas condiciones favorecen la acumulación de carbohidratos en los cloroplastos (almidón) y en el citoplasma (sacarosa), los cuales sirven de sustrato para la reacción de carboxilación (Medina, *et al.* 1989).

Las concentraciones elevadas de sal en el suelo, que causan una sequía osmótica, también favorecen un metabolismo MAC (Garrido, 1998). Una combinación de baja humedad relativa en el aire y alta radiación induce fotoinhibición en ciertas especies MAC, donde la eficiencia cuántica máxima no se recupera durante la noche (Cervantes, *et al.* 2005). Garrido (1998), sostiene que hay una serie de factores es que necesitan un estudio más profundo para describir mejor el funcionamiento vegetal, y sostiene que aún es muy vasto lo que se debe conocer sobre el MAC.

Tipos de MAC.

Un aspecto interesante de algunas plantas MAC es que son capaces de modificar su modelo de intercambio de CO_2 (Szarek y Ting, 1975). Este es susceptible de ser modificado por factores ambientales tales como; el fotoperiodo, las temperaturas diurnas, la cantidad de agua que se encuentre disponible en el ambiente (Mandujano, 1988), y la edad de las hojas (Hartsock y Nobel, 1976; Nobel y Hartsock, 1987; Borland y Griffiths, 1990).



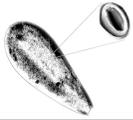


La capacidad MAC puede ser distinguida como obligada (o constitutiva) y facultativa (o inducible). Las primeras son aquellas plantas que pueden ser dotadas de este metabolismo todo el tiempo (Osmond, 1978), hay especies que presentan MAC cuando crecen en sus hábitats naturales (Ting y Rayder, 1985). Un ejemplo de MAC obligada es *Cereus validus* (Ulrich y Nobel, 1984).

Las plantas MAC facultativas son aquellas en las cuales la maquinaria metabólica MAC es sintetizada en respuesta a algunas señales ambientales como, fotoperiodo o estrés hídrico. De tal manera que las magnitudes de la actividad MAC responde a las condiciones del medio externo e interno (Osmond, 1978). Muchas plantas MAC han sido caracterizadas como facultativas o intermedias C_3 -MAC, pues tienen la habilidad de expresar fotosíntesis C_3 en respuesta a la disponibilidad de agua, a cambios de humedad relativa, la temperatura del aire, en la cantidad y calidad de luz, así como el fotoperiodo (Lee y Griffiths, 1987; Borland y Griffiths, 1992), el hábitat y la forma de vida en las condiciones ambientales, y al igual que las relaciones evolutivas (Griffiths y Smith, 1983; Kluge y Brulfert, 1996; Martin y Wallace, 2000).

Otras suculentas son C_3 cuando crecen en hábitats favorables, pero cambian a MAC o MAC-*idling* cuando se estresan. En algunos casos estos cambios son reversibles, aunque hay evidencia de que algunos cambios C_3 a MAC son el resultado del desarrollo ontológico (Ting y Rayder, 1985).

Casi siempre las plantas MAC son C_3 facultativas; cambian hacia una mayor tasa de fijación de CO_2 mediante un metabolismo fotosintético tipo C_3 , después de un torrente de luz diurna o cuando las temperaturas nocturnas son elevadas. En este caso los estomas permanecen abiertos por mayor tiempo durante las horas de luz (Anicua y Rivas, 2000). Estas plantas se caracterizan por fijar CO_2 durante el día (mediante rubisco) y durante la noche (mediante PEP-C), con modificación en la fase II y III del modelo MAC. La transición de C_3 a MAC es benéfica para las plantas cuando se encuentran bajo estrés hídrico y altas temperaturas, porque el cierre diurno de los estomas evita la pérdida de agua y protege la integridad del aparato fotosintético (Winter y Ziegler, 1992). En el caso contrario, cuando existe disponibilidad de agua, las plantas que pasa de



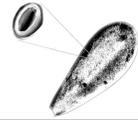
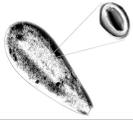
fotosíntesis MAC a fotosíntesis C₃ pueden abrir los estomas durante el día, lo que garantiza una mayor fijación de CO₂ (Andrade, *et al.* en prensa, citado en Andrade, *et al.* 2007).

Algunos casos de plantas C₃-MAC han sido reportados en trabajos como los de Altesor, *et al.* (1992) y Loza-Cornejo, *et al.* (2003) indican que algunas especies de cactus pueden usar el camino C₃ durante las primeras semanas de desarrollo y después cambiarlo a MAC, lo cual es debido a que las cactáceas mantienen un metabolismo fotosintético C₃ ancestral en sus primeros escenarios ontogénicos, interpretando esto como una respuesta adaptativa, revelaron una “memoria” ontogénica, por la presencia de un metabolismo C₃ durante el desarrollo temprano de especies típicamente MAC, esto tiene importantes implicaciones sistemáticas, ecológicas y a niveles de morfofisiológicas (Altesor, *et al.* 1992). Corroborando esto Hernández-González y Briones-Villareal (2007) sugieren que el nivel de ácidos acumulados incrementa con la edad de la plántula, como ocurre en *Stenocereus queretaroensis* que muestra que la edad de la plántula define el típico camino MAC (Loza-Cornejo, *et al.* 2003) al igual que ocurre con *Agave* (Wen, *et al.* 1997).

Pereskia aculeata, *Opuntia pilífera*, *Neobuxbaumia tetetzo* y *Ferocactus recurvus* tienen un metabolismo C₃ durante la temprana ontogenia, aún en especies típicamente MAC cuando son adultas (Altesor, *et al.* 1992). *Opuntia basilaris* (Cactaceae) después de un período de lluvias asimila CO₂ durante el día (Szarek y Ting, 1975.).

Fuera de la familia de las cactáceas, se ha encontrado que *Agave deserti* sometido a riego prolongado, anula la fijación de CO₂ durante la noche, por lo que la planta fija este gas sólo durante el día (Osmond, 1978). Pero en otras especies, como las bromeliáceas, la inducción del C₃ a MAC es más rápida y es reversible. Por ejemplo, la epífita *Tillandsia usneoides* puede fijar CO₂ por un período de 24 horas cuando crece en luz constante (Dodd, *et al.* 2002). También las epifitas *Tillandsia brachycaulos* y *T. elongata* bien irrigadas pueden expresar fotosíntesis C₃ y MAC, pero son totalmente MAC al restringirles el agua (Graham y Andrade, 2004). *Mesembryanthemum crystallinum*, (Aizoaceae) se le puede inducir a la transición de C₃ a MAC por la escasez de agua, la presencia de salinidad y una alta intensidad de luz, es un proceso gradual e irreversible (Keiller, *et al.* 1994; Miszalski, *et al.* 2001).



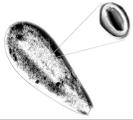


En lo que respecta a la familia de las crasuláceas, en *Kalanchoe velutiana* y *K. blossfeldiana* se ha observado una inducción al MAC cuando se somete a la planta a un tratamiento de días cortos, sin embargo las partes jóvenes de la planta son más susceptibles al estímulo por fotoperiodo que las partes maduras (Queiroz y Brulfert, 1982). Las hojas jóvenes de *Bryophyllum fedtschenkoi* emplean primariamente la fotosíntesis C_3 y desarrollan MAC conforme maduran. Las hojas jóvenes de *Kalanchoë blossfeldiana* asimilan el CO_2 por medio de la Vía C_3 cuando la planta crece en días largos, pero son inducidas a llevar a cabo MAC bajo condiciones de día corto. Sin embargo, las hojas maduras también llevan a cabo MAC bajo condiciones de días largos (Cheng y Edwards, 1991). Entre las más representativas o conocidas se encuentran: *Sedum telephium* L. que tiene una transición C_3 -MAC por la falta de agua y una alta intensidad de luz (Borland y Griffiths, 1992)

MAC “idling”.

Se encuentra la variante llamada MAC idling en especies MAC que presentan estrés hídrico, en esta los estomas tienden a cerrarse y hay una disminución del metabolismo MAC y el CO_2 respiratorio es re-fijado en la noche y reciclado a carbohidratos durante el día (Lüttge, 2006; Ting y Rayder, 1985). En MAC-idling los estomas están cerrados en el día y en la noche, resultando que casi no existe pérdida de agua mientras que se restringe la toma de CO_2 externo (Winter, *et al.* 1986) pero aún hay una fluctuación diurna de los ácidos orgánicos, aunque muy disminuida. MAC-idling es interpretado como un mecanismo conservador de carbono que permanece del resultante reciclado del CO_2 generado internamente. Tal reciclado puede mantener a las plantas en equilibrio (es decir, que sobrevivan) en un estado moderadamente activo con una rápida respuesta a condiciones favorables de agua y asimilar CO_2 atmosférico (Ting y Gibbs, 1982; Winter, *et al.* 1986). No se puede presentar un crecimiento ya que no existe una toma neta de CO_2 , pero parece que el metabolismo activo es mucho más prolongado que como se presenta normalmente (Winter, *et al.* 1986). También el MAC-idling influye en una fotosíntesis activa (si bien en un nivel bajo) la inhibición foto-oxidativa de los fotosistemas, la cual puede producir un daño irreversible (Ting y Gibbs, 1982). En las especies MAC obligadas, Ting y Rayder (1985), reportan que algunas de ellas pueden cambiar a MAC “idling” cuando entran en estrés. Este





metabolismo fue descrito en *Opuntia basilaris* por Szarek, *et al.* (1973). Esta planta, durante períodos de sequía cierra los estomas completamente y detiene la fijación nocturna de CO₂, pero continua mostrando fluctuaciones en la concentración de ácidos orgánicos como resultado de la re-asimilación de CO₂ generado por la respiración.

En *Peperomia* (Peperaceae) y *Pereskia* (Cactaceae) muestran una fotosíntesis C₃ bajo condiciones de agua adecuada. Cuando están en estrés hídrico, los estomas se cierran de día y en la noche y hay una inducción de MAC-idling. Otras especies como *Portulacaria afra* (Portulacaceae) y *Mesembryanthemum* (Aizoaceae) son C₃ cuando crecen bajo un estatus hídrico favorable, pero cambian a MAC o MAC-idling cuando están en estrés hídrico o cuando se irrigan con solución salina (Garrido, 1998).

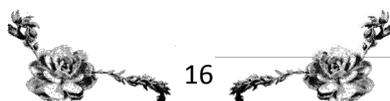
MAC “cycling”.

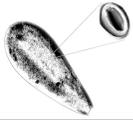
En MAC cycling durante el día ocurre la vía C₃ y en la noche, con los estomas cerrados, el CO₂ respiratorio es fijado por la PEP-C y los ácidos orgánicos producidos son descarboxilados durante el día (Guralnick y Jackson, 2001; Holtum, *et al.* 2004).

Algunas plantas suculentas pueden mostrar fluctuaciones en la concentración de ácidos orgánicos, aunque la fijación del CO₂ se lleve a cabo durante el día (Ting, 1985). El incremento nocturno de ácido ocurre como resultado de la re-asimilación del CO₂ producido por la respiración (Winter, *et al.* 1986; Patel y Ting, 1987). El MAC-cycling parece el intermedio, en términos evolutivos, entre el total metabolismo C₃ y el total MAC (Monson, 1989). MAC-cycling se caracteriza por el intercambio de gas tipo C₃ acompañado por una fluctuación diurna de ácido (Guralnick, *et al.* 1986).

Rayder y Ting (1981) encontraron que plantas adultas de *Pereskia aculeata* comportamiento C₃ cuando crece bajo la humedad adecuada pero tiende a acumular ácidos orgánicos en la noche cuando el crecimiento se da bajo condiciones de estrés por agua: Monson (1989) sugiere que estas especies son un ejemplo de MAC-cycling facultativa.

Entonces, podemos observar que existe un continuo de plantas que van desde C₃ hasta MAC estricta como lo es el caso de algunas especies del género *Clusia* (Clusiaceae) (Lüttge, 2006), donde se expresan al menos cuatro tipos fotosintéticos: fotosíntesis C₃; MAC estricta, fotosíntesis





C₃-MAC y MAC cycling (Guralnick y Jackson, 2001; Holtum, *et al.* 2004), y nos enfrentamos a la tarea de entender la importancia ecológica de esta plasticidad fisiológica intra-e-interespecifica (Holtum, 2002; Zotz, 2002).

Estomas.

La epidermis de los órganos verdes epigeos de las plantas superiores se caracterizan muchas veces por la presencia de pares de células, de ordinario reniformes, que dejan entre sí un espacio abierto (ostiole o poro). Se denominan células oclusivas o guarda (que se encargan de regula el tamaño del poro) y, junto con el ostiole respectivo, constituyen el estoma (del griego *estoma*, boca) que sirve para el intercambio de gases, así como para la eliminación del vapor de agua (transpiración). Estas últimas están rodeadas por células adjuntas o por células subsidiarias (acompañantes o auxiliares). Varios autores utilizan el término estoma, para indicar el complejo estomático, es decir, células oclusivas más células subsidiarias o adjuntas; no existe una uniformidad en la definición y uso de los términos células “adjuntas” y “subsidiarias”. En muchos casos las siguientes definiciones “clásicas” son utilizadas (Fryns-Classens y Cotthem, 1973):

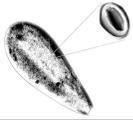
Células Adjuntas: células que rodean inmediatamente a las células guarda y no difieren en forma y estructura de las otras células epidérmicas.

Células Subsidiarias: células que rodean a las células guarda y son claramente diferentes de las otras células epidérmicas.

Existen básicamente dos tipos diferentes morfológicamente de células guarda. La forma más común es el tipo elíptico, en el cual el par de células guarda tienen forma de riñón. La otra forma es conocida como el tipo de las gramíneas puesto que está restringido a las Glumiflorae (pastos y juncos) y consiste en un par de células guarda en forma de pesas (Martin, *et al.* 1983).

Los estomas desempeñan un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis de la planta y de ahí la importancia de conocer tanto el número como la forma en que los poros se abren y se cierran como también los factores que controlan estos procesos (Sánchez y Aguirreolea, 1996)





Es importante señalar, que independientemente de la forma en la cual el CO₂ sea asimilado, la planta requiere que los estomas permanezcan abiertos, mientras se realiza el intercambio de gases; esto trae como consecuencia la pérdida de agua a través de los estomas, todo esto aunado a que el proceso fotosintético se ve disminuido por la presencia del oxígeno, especialmente en condiciones cálidas (Mandujano, 1988).

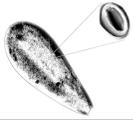
Metcalfé y Chalk (1950), mencionan que cuando los estomas han completado su desarrollo (maduros), pueden ser clasificados de acuerdo a las formas de sus células subsidiarias. Dan los términos anomocítico (sin patrón distinto de células subsidiarias), anisocítico (células guarda rodeadas por tres células, una notablemente más pequeña que las otras dos), paracítico (células guarda flanqueadas por células subsidiarias con sus ejes largos paralelos al eje largo del estoma) y diacítico (células guarda encerradas por dos células subsidiarias con su eje largo formando ángulo recto con el eje largo del estoma).

Métodos para detectar la fotosíntesis MAC.

Existen diferentes métodos para poder detectar y medir el MAC, pero estas técnicas presentan el inconveniente de necesitar una cantidad de material suficiente para llevar a cabo su realización, por ejemplo la titulación del tejido macerado, en esta el incremento en la acidez tisular es proporcional a la concentración del ácido málico en las vacuolas de las células, ya que por cada molécula de CO₂ fijada por una planta MAC, se produce una molécula de ácido málico y dos iones de hidrógeno (Nobel, 1988), de esta técnica se requieren hacer dos titulaciones, una al amanecer y otra al anochecer, para cada titulación se requiere 1 gr de tejido fresco, es decir, se requieren 2 gr de tejido fresco para llevar a cabo este método.

También se han realizado determinaciones de almidón ya que la fluctuación de estos es una forma inversa a la acidez, sin embargo esta técnica requiere de 5 gr d tejido fresco (Mandujano, 1988). Hohorst (1965), ha utilizado el método enzimático más conveniente para determinar la concentración de malato es con la malato deshidrogenasa, en esta se requiere de un gramo de tejido fresco para estas determinaciones (Osmond, *et al.* 1994.)





Otros métodos desarrollados para medir la actividad MAC requieren de aparatos o reactivos que no son de fácil acceso o muy costosos, como lo es la medición de la asimilación de CO₂ midiendo el intercambio de gases con un analizador de gases en el infrarrojo (Nobel, 1988), además la cámara que se usa en los analizadores de gases en el infrarrojo es diseñada para hojas delgadas, se requiere modificarla para poder medir las hojas suculentas o los tallos y frutos de las plantas MAC (Inglese, *et al.* 1994; Nobel y De la Barrera, 2002).

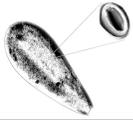
La especie en estudio.

El género *Echeveria* fue formalmente nombrado y descrito en 1828 en el *Prodomus* de A. P. De Candolle (Larson, 1992). En 1972 se publicó la monografía de Eric Walther llamada *Echeveria*, donde se describen 143 especies, de las cuales 117 están representadas en nuestro país. Las plantas del género *Echeveria* tienen una forma de crecimiento arrosada con hojas suculentas, presentan raíces poco desarrolladas y pueden formar raíces adventicias libremente del tallo (Walther, 1972). *Echeveria laui* está cubierta de cera abundante, por lo que esta planta pertenece a la serie Pruinosa (González, 2007), su población tipo es reducida en individuos (cerca de 300) (Pérez, 2007), actualmente se conocen sólo 3 poblaciones (Reyes, comunicación personal en Piña-Poujol, *et al.* 2007).

Los trabajos que se han realizado sobre *Echeveria laui*, son pocos, inclusive hay autores que la reportan como extinta (Vovides, *et al.* 1997; Vovides y Medina, 1994), los estudios encontrados en la especie son pocos referentes a su propagación, como lo es el de Piña, (2003) quien propagó la crasulácea mediante esquejes de hoja utilizando diferentes radiaciones lumínicas y nutrientes, así mismo estudió la capacidad germinativa de la semilla según su origen sometiéndola a diferentes temperaturas y sustratos, finalmente también hizo un ensayo de reintroducción de las plántulas obtenidas por semilla.

Piña-Poujol, *et al.* 2007 evaluó el micrositio (sombreado vs. abierto) y el tamaño inicial de las plántulas sobre el éxito de establecimiento en un ensayo de reintroducción. Por otra parte, Pérez





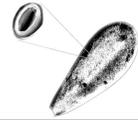
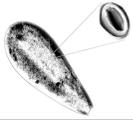
(2007) reporta que una roseta propagada vegetativamente se desarrolla y crece en la mitad de tiempo empleado por una roseta germinada.

Otro trabajo realizado sobre la crasulácea es el de Wojciechowicz, *et al.* (2001), que investigaron la posibilidad de regeneración en *Echeveria laui* a partir de fragmentos de hoja usando técnicas *in vitro*.

Los miembros de la familia Crassulaceae han estado muy lejos de ser usados en experimentos bioquímicos y fisiológicos, y en lo que respecta a trabajos sobre el metabolismo MAC, Andrade, *et al.* (2007), reportan una falta de estudios en la fisiología de plantas MAC en México a pesar de su enorme diversidad. Los estudios sobre las respuestas fisiológicas de las plantas MAC al ambiente han sido realizados principalmente en miembros adultos de sólo tres familias: Agavaceae, Bromeliaceae y Cactaceae (Nobel, 1988; Benzing, 1990; Winter y Smith, 1996; Zotz y Hietz, 2001; Andrade, *et al.* 2004; Lüttge, 2004), Andrade, *et al.* (2007), sostiene que es necesario poner mayor atención en la fisiología ambiental de muchas otras especies MAC desde la germinación, hasta la vía fotosintética de las plántulas y la supervivencia de los individuos en diferentes microambientes (Schmidt, *et al.* 2001; Zotz y Hietz, 2001; Andrade, *et al.* 2004; Ayala-Cordero, *et al.* 2006; Cervera, *et al.* 2006; Méndez, *et al.* 2006; Hernández-González y Briones-Villareal, 2007). Min-Wha, *et al.* (2005), sostiene que se sabe muy poco de los cambios anatómicos y fisiológicos durante el proceso de aclimatización en invernadero, bajo diferentes intensidades de luz de plantas MAC.

En la revisión de la literatura, no se encontró trabajo alguno dentro de la familia Crassulaceae, ni en ninguna otra donde existan individuos de metabolismo MAC en los cuales, se hubiese identificado el metabolismo MAC mediante la dinámica estomática que presenten. Por lo que en este estudio se utilizara dicho comportamiento para la identificación de este metabolismo, ya que no es factible realizar otras técnicas debido a la escasez del material.





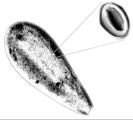
OBJETIVOS.

Objetivo general:

Identificar el tipo de metabolismo fotosintético MAC de *E. laui* en individuos adultos, plántulas obtenidas de semilla y brotes de esqueje de hoja por medio de su dinámica estomática, bajo condiciones de invernadero.

Objetivos particulares.

- 1) Cuantificación de cera en las hojas de *E. laui*.
- 2) Evaluar el método apropiado para la remoción de cera de las hojas de *E. laui*, mediante tres diferentes formas, que permita el uso de las hojas produciendo el menor daño posible a estas y a los individuos.
- 3) Valorar el método idóneo para observar la dinámica estomática, mediante impresiones (negativos) realizados con barniz de uñas transparente y RESISTOL 850[®], o la preparación, extracción, montaje y manejo de epidermis de hojas de *E. laui*.
- 4) Obtener el índice estomático y densidad estomática, en hojas de plantas adultas de *E. laui*.
- 5) Identificar la dinámica estomática a lo largo del día y la noche (por un período de 24 horas), en plantas adultas, brotes obtenidos de esqueje de hoja y plántulas obtenidas vía sexual, de tal modo que permita detectar el metabolismo MAC en individuos de *E. laui* de diferentes edades.



MATERIAL Y MÉTODO.

Obtención de individuos de *Echeveria laui*.

Se trabajó con plantas de *Echeveria laui* donadas por el Vivero “La Iberia”, perteneciente a la Fundación para la Reserva de la Biosfera, Cuicatlán, A. C., localizado en La Iberia s/n, San Juan Bautista, Cuicatlán, Oaxaca. Con registro UMA: MX/VIV-CO-218-OAX/05.

Los ejemplares fueron llevados al invernadero de la Unidad de Morfología y Función, en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, municipio de Tlalnepantla, Estado de México. En dicho invernadero las plantas de *Echeveria* comenzaron a dar flor y posteriormente semillas (Fig. 1).

Las semillas de *E. laui*, se recolectaron directamente de las plantas y se colocaron en una caja Petri con papel absorbente y agua destilada (5ml) para su germinación, se mantuvieron a 23°C en un cuarto de temperatura controlada, con fotoperiodo de 16/8 horas luz/obscuridad y una intensidad de luz de $18.56 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (se midieron con un cuantometro marca Hansatech modelo Quantum sensor/measuring unit).

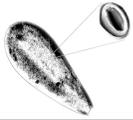
Se separaron las plántulas obtenidas en dos grupos:

A) De dos hojas, que corresponden a 3 meses después de la germinación, peso de 6.5mg (valor promedio, ± 1.6), 3.52mm de largo y 0.64mm de ancho (valores promedio, ± 0.53 y 0.39 respectivamente). Ver Fig. 2.

B) De tres hojas, correspondiente a 6.25 meses después de la germinación, peso de 10.04mg, 4.86mm de largo y 2.08mm de ancho (valores promedio, ± 2.09 mg, 0.91mm y 0.46mm, respectivamente). A diferencia de las plántulas de dos hojas, las de tres hojas poseen una acumulación de cera en la tercera hoja (Fig. 3), la cual es escasa si se compara con la cera que sintetiza un brote obtenido por propagación vegetativa (Fig. 4).

Se colocaron esquejes de hoja (hojas tomadas de la base de las plantas adultas) para obtener rosetas de propagación vegetativa. Los brotes obtenidos se agruparon en dos grupos:





A) Brote chico, que tuvieron un peso promedio de 1.14gr (± 0.31) y cuya medida promedio (en su diámetro más largo) fue de 2.10cm (± 0.27).

B) Brote mediano, cuyo peso promedio fue de 8.31gr (± 4.79) y la medida promedio (en su diámetro más largo) fue de 5.45cm (± 1.32).

Cabe mencionar que los brotes provenientes de esquejes de hojas, fueron obtenidos en conjunto durante la realización del trabajo de Verastegui (2009), en el cual se obtuvieron dichos ejemplares.

Las plantas provenientes del vivero, fueron utilizadas para la categoría de plantas adultas, quedando de tal forma 5 categorías de edad: adultas, brote mediano, brote chico, plántula de tres hojas y plántula de dos hojas.

Cuantificación de ceras.

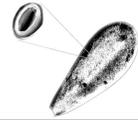
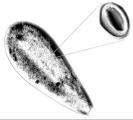
La cuantificación de ceras se realizó mediante la técnica de Ebercon, *et al.* (1977), la cual se realizó cortando 1cm² del haz y envés del tejido vegetal tomado de una hoja de *Echeveria laui*, y se tomó una hoja entera de *Echeveria* (2.67cm ancho por 4.36cm de largo) la cual se partió a la mitad y se sumergió en aproximadamente en 5ml de cloroformo (99%).

Las muestras se colocaron en tubos de ensayo y se les añadió 5ml de cloroformo (99%), después se extrajo el tejido vegetal.

Posteriormente, se colocó el tubo en un baño con agua hirviendo para evaporar el cloroformo (este proceso debe realizarse cerca de lugar perfectamente ventilado o bajo campana de extracción) y se dejó enfriar. Se adicionaron 5ml de el reactivo para ceras (se mezcló 2gr. de dicromato de potasio con 4ml. de agua destilada y se agitó vigorosamente con 100ml. de ácido sulfúrico concentrado), y junto con los tubos de la curva patrón se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 30min. La curva patrón se realizó con polietilenglicol 8,000 de 1 a 5mg.

Posteriormente se dejaron enfriar los tubos y se les añadió 6ml. de agua destilada, se leyeron en espectrofotómetro a 590nm, de esta manera se obtienen mg de cera por cm².





Remoción de cera.

Para lograr observar la apertura estomática, es necesario determinar el modo de retirar la cera de la hoja, por lo que se removió la cera de las hojas de *Echeveria laui*, ya que esta al ser sumamente impermeable, impide que se puedan tomar correctamente los negativos de la epidermis de las hojas o tratarse con una solución fijadora.

Se utilizaron tres formas diferentes:

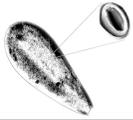
- a) Mediante la acción mecánica con un pincel, pasando este suavemente sobre la epidermis de la hoja.
- b) Sumergiendo la hoja durante 2 minutos en alcohol etílico al 96%.
- c) Utilizando 10 ml de cloroformo (99%) con una pipeta, y dejando escurrir el líquido sobre la superficie de la hoja.

Para determinar el daño ocasionado por deshidratación de los tres diferentes métodos, se tomaron cuatro hojas y su peso con cera, después de la remoción de esta utilizando cada una de las diferentes formas, excepto a una hoja, la cual sirvió de control. Se siguió pesando a cada media hora, para determinar en que proporción pierde peso la hoja (durante seis horas y media). Las hojas se colocaron bajo una intensidad de luz de $18.56 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y temperatura constante de 23°C .

Índice estomático y densidad estomática.

Se cortaron 6 hojas de *Echeveria laui* de individuos adultos, se partieron por la mitad para separar el haz y el envés con ayuda de un bisturí. Posteriormente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 15% (a partir de cloro comercial) y se mantuvieron durante 6 días. Después se extrajo el mesófilo y se utilizaron dos colorantes, para determinar cuál era el más contrastante para diferenciar los estomas.





El primero montaje fue semipermanente utilizando gelatina glicerizada fenificada (Tejero, *et al.* 1998) con colorante azul de toluidina (1%), se agrego directamente en la muestra sobre un portaobjetos, se coloco el cubreobjetos y se dejo secar durante 1 semana.

El segundo montaje se realizo tomando las epidermis y dejándolas 24 horas sumergidas en cristal violeta alcohólica al 1%, posteriormente se colocaron durante 10 minutos en alcohol etílico 70%, luego 80% 10 minutos, 90% 10 minutos y dos cambios en alcohol absoluto de 10 minutos cada uno. En seguida se sumergió durante 15 minutos en xilol (cuidando que no se evapore) y se coloco en un portaobjetos, se añadió resina sintética y se coloco encima un cubreobjetos. Se dejaron secar una semana colocando sobre las muestras pequeños pesos para asegurar la adición del cubreobjetos y la resina con la muestra.

En total se obtuvieron 6 laminillas con epidermis del haz y 6 del envés de las hojas de *Echeveria laui*, y de cada una se obtuvieron 6 campos de observación para el índice estomático y densidad estomática, dando un total de 36 conteos para haz y 36 para el envés (72 en total).

Las laminillas se colocaron en un microscopio óptico motic B series, se observaron con el objetivo de 4X, se tomaron las fotografías con la cámara moticam 2000 de 2.0Mpx utilizando el programa motic Images Plus 2.0 ML., el área que se tomo fue igual a 6.97mm² (por campo de observación).

Para el índice estomático se llevaron a cabo conteos de células epidérmicas y estomas de la epidermis adaxial y abaxial utilizando la formula de Wilkinson (1979).

$$S. I. = \frac{S}{E + S} \times 100$$

Donde:

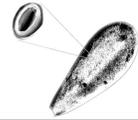
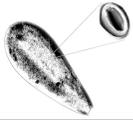
S. I. = Índice Estomático (Stomatal Index).

S = es el número de estomas por unidad de área

E = corresponde al número de células de la epidermis en la misma área.

La densidad estomática corresponde al número de estomas por unidad de superficie foliar (Croxdale, 2000).





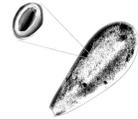
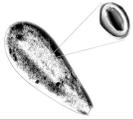
Impresiones de negativos y extracción de epidermis.

Para obtener las impresiones (negativos), se utilizaron dos sustancias, RESISTOL 850[®] (pegamento blanco) y barniz para uñas transparente (marca bisui). Las impresiones se realizaron cada 3 horas a partir de las 7:00am, dichas impresiones se revisaron en un microscopio óptico para determinar si de esta forma se puede apreciar la apertura estomática. También se llevaron las impresiones a microscopía electrónica de barrido (marca JEOL JSM-638OLV) con el fin de obtener una mejor visión en el relieve de las impresiones, se tomaron fotografías mediante el programa JEOL Scanning Electron Microscope.

Las impresiones no resultaron eficientes (ver resultados), por lo que se procedió a la extracción de las epidermis, cada 4 horas, hasta cubrir 24h (00:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00, 20:00) y se realizaron tres repeticiones de cada una de las categorías.

En todas las categorías, a excepción de plántulas de dos y tres hojas, se retiró la cera de la hoja con un pincel, se arrancó la hoja tomándola de la base, y se colocó en un frasco con solución fijadora F. A. A. (Formaldehído 37% 100ml, Alcohol etílico 96% 500ml, Acido acético glacial 50ml, Buffer de fosfatos 350 ml). Después se extrajo la epidermis partiendo la hoja a la mitad (con ayuda de un microscopio estereoscópico), para obtener la epidermis abaxial y adaxial, y se colocaron en una solución de 2ml de alcohol etílico al 96% añadiéndole 2 gotas de cristal violeta en solución acuosa al 1% y se dejó durante 15 minutos, posteriormente se enjuagaron en agua destilada durante 2 minutos. Las epidermis se colocaron en un portaobjetos y se montaron en gelatina glicerinada fenificada.

Las plántulas de dos y tres hojas solamente se colocaron en un tubo eppendorf con solución fijadora F. A. A.



Determinación de la dinámica estomática.

Los ejemplares se colocaron en un invernadero, y las categorías de edad (adulto, brote mediano, brote chico, plántula de tres hojas, plántula de dos hojas) se subdividieron en dos tratamientos más, TAPADAS y SIN TAPAR. Las primeras consistieron en que a la mitad de los individuos adultos, se les colocó una bolsa de plástico, los brotes se encontraban en domos de plástico con la tapa cerrada y las plántulas tenían un recipiente de plástico transparente encima. En las segundas (SIN TAPAR), los individuos adultos no tuvieron la bolsa, los brotes estaban en domos de plástico con la tapa abierta y a las plántulas no se les colocó el recipiente de plástico encima. (Fig. 5).

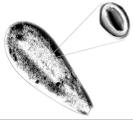
Las plantas fueron colocadas en un invernadero, y se recolectó la muestra un día a la semana, cada cuatro horas (durante 24 horas, como se mencionó anteriormente), se realizaron tres repeticiones. En total se contó con seis ejemplares adultos, diez brotes medianos, diez brotes chicos, 20 plántulas de tres hojas y 20 plántulas de dos hojas.

Se monitoreó la temperatura y la humedad relativa, cada 30 minutos durante el tiempo en el que se desarrolló el experimento, con un almacenador de datos (EXTECH ® INSTRUMENTS RHT10 Humidity/Temperature Datalogger), de los cuales se realizaron promedios para reportar las condiciones ambientales (Ver gráficas 1-6).

A las epidermis del haz y envés (un total de 216 preparaciones), montadas en portaobjetos de hojas de platanos adultos, brotes chicos y medianos (tapados y sin tapar), se les tomaron seis fotografías en diferentes campos escogidos al azar, mediante el uso del microscopio Nikon eclipse E200, en el campo de 4X, con la cámara Nikon DS-Fi1 utilizando el programa NIS-Elements BR 3.0, dando un total de 1296 imágenes. Cada imagen corresponde a un área de 3.6045mm².

En cada imagen se contó el número de estomas abiertos y cerrados, lo cual se identificó mediante el paso del haz de luz a través del ostiolo del estoma (Fig. 6) y se obtuvieron los promedios correspondientes.



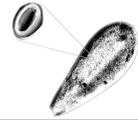
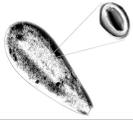


En el caso de las plántulas de dos y tres hojas (tapadas y sin tapar), no se pudieron extraer las epidermis, debido al tamaño de la hoja. Por lo tanto se tomó una hoja de las plántulas de dos hojas, y la tercer hoja de las plántulas de tres hojas, y se colocaron en el microscopio óptico, y utilizando el campo 10X, se conto directamente los estomas abiertos y cerrados (de la hoja entera) los cuales se observaron necesidad de identificar el haz de luz en el ostiolo. (Fig. 7)

Microscopia de barrido e histología.

Se tomaron fragmentos de hoja de individuos adultos y plántulas, para ser llevados a microscopia de barrido. Primero se removió la cera con el pincel (en hojas adultas), y posteriormente se fijaron en glutaraldehído al 2.5% durante dos horas. Después se enjuagaron tres veces por 10 minutos cada vez, enjuagando entre cada lavado con solución lavadora (buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.0). Posteriormente bajo campana de extracción, se fijaron con Tetraóxido de osmio al 1% durante dos horas, en seguida se enjuago tres veces (10 minutos cada vez), con solución lavadora (buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.0). Acto seguido se deshidrato el tejido pasándolo por un tren de alcohol etílico, iniciando al 10%, durante 10 minutos, luego etanol al 20% por 10 minutos y así sucesivamente hasta llegar a alcohol al 90%, en seguida de este último se paso a alcohol absoluto por 30 minutos y se realizaron dos cambios más, con la misma concentración durante el mismo tiempo. Posteriormente se recubrieron en oro (por 1 minuto, equivalente a 200 Å) y se llevaron al microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-638 OLV), se tomaron imágenes con ayuda del programa JEOL Scanning Electron Microscope.

Adicionalmente, se probó otro protocolo de deshidratación, el cual paso por las mismas especificaciones del glutaraldehído, estas muestras no pasaron por la post-fijación con Tetraóxido de osmio, pasándose directamente a la deshidratación con los diferentes alcoholes (mismas concentraciones, mismos tiempos). Después se sumerge el material al menos durante 6 horas en hexametildisilazano (HMDS), debido a que este compuesto no introduce “artefactos” adicionales o colapsa las muestras al secarse al aire, además de que preserva excelentemente los detalles de la

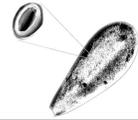
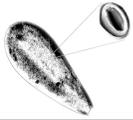


superficie (Nation, 1983). Se finaliza al recubrir el material con oro (por 1 minuto, equivalente a 200 Å).

Además, de algunas imágenes del material vegetal introducido al microscopio electrónico de barrido, se realizó un análisis de sus componentes mediante Emisión de Rayos X por Energía Dispersiva (SEMEX), con detector de rayos X INCA-sight (marca Oxford instruments) acoplado al microscopio electrónico de barrido.

También se realizaron cortes histológicos, para estos se tomaron hojas de individuos adultos, y se fijaron durante 48 horas en F. A. A. (Formaldehído 37% 100ml, Alcohol etílico 96% 500ml, Acido acético glacial 50ml, Buffer de fosfatos 350 ml), posteriormente se deshidrató con alcohol etílico al 50% durante dos horas, luego al 60% durante el mismo tiempo, y así sucesivamente hasta llegar al 90%, luego se pasó al 96% dos horas, y se prosiguió con tres cambios más en alcohol absoluto (2 horas cada uno). A continuación se colocaron en alcohol-xilol (80%-20%), durante dos horas, enseguida en alcohol-xilol 60%-40% el mismo tiempo, y así sucesivamente hasta llegar a alcohol-xilol 20%-80%, y se siguió con tres cambios en xilol de dos horas cada uno. Después se colocó en xilol-paraplast 50%-50% en recipientes de vidrio y se metieron en una estufa a 56°C, y se dejaron durante tres semanas aproximadamente. Ya evaporado el xilol, se colocó el tejido en una bandeja de plástico con paraplast para formar el bloque y cortarlo con el microtomo.

Se realizaron cortes de 10, 15, 30 y 50µm, y se colocaron en un portaobjetos y se les adiciono una solución de albumina al 35%, se dejo secar con ayuda de una parrilla para fijar el tejido al portaobjetos. Inmediatamente se colocaron los portaobjetos con la muestra en xilol (1 a 2 minutos) y se paso por un tren de etanol al 96%, 90%, 70%, se le adiciono unas gotas de safranina en solución acuosa al 1%, se enjuago con agua destilada y se monto el cubreobjetos con resina sintética.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cuantificación de ceras.

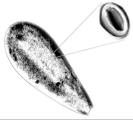
En promedio, en el haz de la hoja de *Echeveria laui* hay 2.045 mg/cm² de cera (\pm 0.162), en el envés 1.895 (\pm 0.120), lo que dió un promedio de 1.97 mg/cm² (\pm 0.145) de cera en la hoja de *Echeveria laui*, considerando el haz y el envés. En la hoja completa (cuya área es de aproximadamente 11.64cm²) hubo 6.84mg de cera.

Como se puede apreciar, la cantidad de cera que poseen las hojas de *Echeveria laui*, es bastante elevada, comparándola con la planta de *Sorghum bicolor* que utilizó Ebercon (1977), donde encontró que había de 0.0114 a 0.0199 mg/cm² de cera. Al tener esta cantidad de cera, le permite a la planta reducir la pérdida de agua no estomática, reducir el depósito de polvo, polen y contaminantes ambientales, protegerse contra la radiación ultravioleta, bacterias y hongos, y participación en una variedad de interacciones con los insectos (Kunst & Samuels, 2003). La deposición de cera es la causante del color verde claro y fresco de muchos frutos, hojas y tallos (Esau, 1976).

Además, la cera afecta a la humedad de las hojas porque impide el contacto del agua con la superficie foliar. La estructura y evolución de la cera son, por consiguiente, de considerable interés para las investigaciones sobre pulverizaciones en la agricultura (Esau, 1976).

Remoción de cera.

Se determinó que la mejor forma de retirar la cera de las hojas de *Echeveria laui*, fue mediante la acción mecánica con un pincel, ya que con este método se logró retirar una gran cantidad de cera (visiblemente) en comparación con el alcohol etílico, el cual al evaporarse dejó ver un ligero color blanquecino, el cual corresponde a restos de cera. Por otro lado el cloroformo la eliminó completamente, sin embargo en el instante en el que se retiró la cera, a los 30 minutos se perdió un 1.7% del peso de la hoja, en comparación con el pincel, el cual perdió 0.72%, lo que corresponde a un 0.7% más que lo que perdió la hoja control (0.19%). Al dejar transcurrir seis



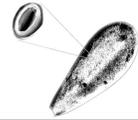
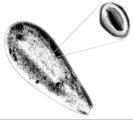
horas y media, la hoja tratada con cloroformo presentó un daño visible y se perdió un 11.57% de su peso original, en comparación al pincel el cual fue de 2.5%, esta hoja sola a perdido 0.5% más de peso, ya que la pérdida de esta hoja fue del 1.12%. La hoja sumergida en etanol ha perdido el 1.4% de peso, esto puede deberse a los restos de cera que permanecen en la hoja (Fig. 8).

Transcurridas 22 horas, después de haber removido la cera, la hoja tratada con cloroformo perdió el 30.31% de su peso original, el tratamiento con etanol el 8.64%, el pincel 9.74% y el control 8.46%. La hoja tratado con cloroformo presentó manchas negras, las cuales pueden deberse a tejido necrosado debido a la pérdida de agua tan acelerada que tuvo el tejido. Después de 53 horas de retirarse la cera, con el cloroformo la hoja se compacto, se volvió quebradiza debido a la pérdida de agua y perdió un poco más de la mitad del peso (53.55%), el etanol perdió 12.55%, el pincel el 13.76% y la hoja control 12.22% (Fig. 9, Gráfica 7). Al utilizar el pincel para eliminar la cera de la hoja de *Echeveria laui* solamente se perdió un 1.54% más de peso en comparación con la hoja control, la cual al ser separada de la planta presenta una pérdida de peso leve, en comparación al tratamiento con cloroformo, la cual retiró de manera total la cera pero daño severamente los tejidos, sobre todo la epidermis, la cual ere vital para este estudio.

Estomas de *Echeveria laui*.

La hoja de *Echeveria laui* posee estomas en ambas superficies, por lo que es una hoja anfistomática (Esau, 1976). El tipo de estoma que se presentó en la superficie abaxial como en la adaxial es de tipo anisocítico (Wilkinson, 1979), lo cual coincide con lo encontrado por Wojciechowicz, *et al.* (2001), en células epidérmicas de hojas crecidas *in vitro*, este estoma está rodeado por tres células, una de ellas usualmente más pequeña que las otras dos (Fig. 10). Este tipo de estoma se ha encontrado rara vez en la familia Crassulaceae, al igual que en las familias Araliaceae, Caryophyllaceae, Clethraceae, Connaraceae, Diapensiaceae, Dipsacaceae, Gentianaceae, Hypericaceae, Icacinaceae, Moraceae, Olacaceae, Onagraceae, Rhamnaceae, Rhizophoraceae, Scrophulariaceae, Scytopetalaceae, Staphyleaceae, Turneraceae y Violaceae (Wilkinson, 1979).





También se determinó que el tamaño promedio del estoma en el envés de la hoja (junto con las células acompañantes) era de $85.25\mu\text{m}$ de largo por $72\mu\text{m}$ de ancho (± 8.01 y $10.61\mu\text{m}$ respectivamente), mientras que el largo de la célula oclusiva era de $37.75\mu\text{m}$ (± 1.70) y el ancho de $27\mu\text{m}$ (± 3.55). En la parte del haz, el estoma (junto con las células acompañantes) midió de largo $78.25\mu\text{m}$ (± 14.52) y de ancho $55\mu\text{m}$ (± 12.80), la célula oclusiva tenía de largo $38.5\mu\text{m}$ (± 1.29) y de ancho 29.25 (± 3.5).

La longitud y anchura promedio de el estoma es prácticamente la misma en el haz y el envés de la hoja, en comparación con otras plantas MAC el estoma tuvo dimensiones menores a las que presentan otras plantas con este tipo de metabolismo, como lo es el caso de *Opuntia pumila* y *O. ficus indica*, donde la longitud promedio de estomas varía entre 59 y $95\mu\text{m}$, y 64 y $82\mu\text{m}$ respectivamente, mientras que el ancho fue de 54 y $73\mu\text{m}$, y de 52 a $78\mu\text{m}$ (Silva, *et al.* 2001).

Pimienta, *et al.* (1992, citado en Silva, *et al.* 2001), encontraron que hay una relación positiva directa entre el tamaño de los estomas y el número de cromosomas en especies de nopal tunero, también Harris y colaboradores (1993) sugieren que la longitud de estomas puede ser utilizado como un indicador de niveles de ploidía en miembros del subgénero *Opuntia*, al igual que en otras especies.

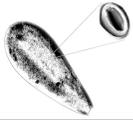
También se observó que las células epidérmicas del envés tendían a ser más “cuadradas” que las del haz, las cuales eran largas y rectangulares (Fig. 11)

Índice estomático y densidad estomática.

El valor del índice estomático obtenido para la parte del haz de la hoja de *Echeveria laui* fue de 9.50 , mientras que para el envés fue de 5.33 . Wilkinson (1979), menciona que el índice estomático es una característica diagnóstica muy utilizada en sistemática de plantas, porque generalmente se mantiene sin alteraciones.

La densidad estomática del haz fue de 29.05 (± 5.79), y del envés fue de 11.88 (± 4.68), lo que correspondería a 4.16 estomas por mm^2 en el haz y 1.70 estomas por mm^2 en el envés, este





número es inferior al hallado en *Opuntia ficus indica* la cual se ha encontrado que posee de 16 a 62 estomas por mm^2 (Silva, *et al.* 2001). Kluge y Ting (1978), obtuvieron el promedio de densidad en 15 especies MAC, e indican una frecuencia de alrededor de 27 por mm^2 . El mayor o menor número de estomas por unidad de superficie influye directamente en la resistencia al flujo gaseoso de CO_2 y H_2O , por lo que las diferencias observadas en la conductancia estomática de especies MAC, C_3 y C_4 son una consecuencia directa de la frecuencia estomática (Osmond, *et al.* 1980).

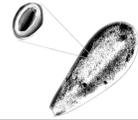
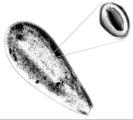
Por otra parte, se ha encontrado en ciertas familias, que existe una relación entre el tamaño de las células oclusivas y la densidad estomática, de tal manera que células oclusivas pequeñas presentan una alta densidad estomática y viceversa (Parés-Martínez, *et al.* 2004), sin embargo, este pareciera no ser el caso el caso de *Echeveria laui*, ya que presentó un baja densidad estomática, y el tamaño de las células oclusivas no es tan elevado como en otras especies.

Si tomamos en consideración que la frecuencia estomática en plantas MAC es de 2,500 estomas por cm^2 (Osmond, 1981 citado en Mandujano, 1988), y *Echeveria laui* presenta 416.86 estomas por cm^2 en el haz y 170.57 estomas por cm^2 en el envés (587.43 estomas tomando haz y envés), podemos deducir que este es un recurso utilizado por la planta, para reducir severamente la pérdida de agua, lo cual le permite sobrevivir en el ambiente árido en el cual vive. Rubino *et al.* (1989), y Takur (1990) señalaron que la disminución de la densidad estomática incrementa la resistencia estomática de la planta, la cual limita el exceso de transpiración.

Impresiones de negativos y extracción de epidermis.

Al realizarse las impresiones (negativos) de la epidermis de hojas de *Echeveria laui*, y verlas al microscopio óptico, no se pudo apreciar la apertura estomática. El RESISTOL 850[®] presentaba algunas desventajas, primero era difícil arrancar el negativo de la hoja de *Echeveria* sin que este se rompiera en varios fragmentos. Por ser un pegamento soluble en agua, no se le podía colocar una gota de esta al portaobjetos para adherir la impresión a la superficie de este, sin embargo aún sin colocarle el agua, la impresión de pegamento comenzaba a adherirse al porta o cubreobjetos,





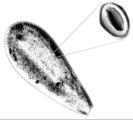
y se presentaban problemas para adquirir una imagen nítida del estoma (Fig. 12). En lo que respecta al barniz, este no presentó inconveniente a la hora de obtener la imagen en el microscopio, el problema radica en el daño que recibía la hoja, ya que el barniz no se pudo reutilizar para obtener más impresiones, ya que provocó que el tejido de la hoja se necrose, y esto puede afectar la dinámica estomática (Fig. 13).

Sin embargo, en ambos casos, los negativos no resultaron ser un buen método para poder observar la apertura estomática de las hojas de *Echeveria laui*, ya que al estar los estomas hundidos, la imagen que se obtiene no permitió discernir entre el contorno de las células oclusivas y el ostiolo, ya que todo el estoma es rellenado del barniz o RESISTOL 850[®], y no se obtuvo una clara visión del estoma abierto o cerrado (Fig. 14). Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de las impresiones en barniz y RESISTOL 850[®], tampoco permitieron diferenciar entre un estoma cerrado o abierto, debido a que la impresión se vio afectada por el hundimiento que estos presentan (Fig. 15).

Debido a que las impresiones de negativos de la epidermis no resultó una buena técnica para observar la dinámica estomática, se procedió a extraer las epidermis.

El colorante que resultó ser óptimo, fue el cristal violeta, ya que este teñía las células oclusoras del estoma de un color púrpura intenso, en comparación con el azul de toluidina, el cual también tiñó el estoma, pero no de manera tan clara como el cristal violeta (Fig. 16). Esto puede deberse a que las células oclusivas tienen muchos cloroplastos (Valla, 2007), y estos a su vez pueden almacenar carbohidratos como el almidón (Medina, *et al.* 1989), este último puede ser teñido con cristal violeta (Tejero, *et al.* 1998). El azul de toluidina pudo no ser tan eficiente, debido a que este presenta más afinidad por núcleos y citoplasma, por lo que pudo estar afectando en la apreciación del estoma (Tejero, *et al.* 1998).

El mejor medio de montaje fue la gelatina glicerinada fenificada, debido a su fácil manejo, ya que a comparación de la resina sintética, la gelatina permitió un fácil y adecuado montaje, y en caso de un mal montaje, este podía corregirse sin problemas, además su manipulación fue más sencilla y requirió pocos días de secado (aproximadamente 2 días).



Determinación de la dinámica estomática.

Se realizó el análisis de acuerdo al porcentaje de estomas abiertos de la hoja (Gráfica 21), ya que no hubo diferencias entre el haz y el envés, además, cabe mencionar que los estomas nunca se cierran o se abren en su totalidad, es decir, la planta mantuvo una cierta cantidad de estomas abiertos todo el tiempo.

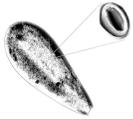
Para tener una aproximación del comportamiento de los estomas abiertos, se utilizó como base la curva de las cuatro fases de MAC típica de Osmond (1978), y esta se superpuso con la gráfica correspondiente a la intensidad de luz (Gráfica 8-10, Cuadro 1). De esta manera se obtuvo que la gráfica de estomas abiertos debe ser inversa a la de la intensidad de luz.

Adulta Tapada.

Los estomas en el haz y el envés tuvieron un comportamiento similar, en la hoja permanecieron cerrados la mayoría de los estomas (29% abiertos) cuando comenzó la incidencia de luz, sin embargo, al contrario de lo que se esperaría en un comportamiento MAC, estos fueron aumentando su porcentaje, conforme avanzaron las horas, es decir, el porcentaje de estomas abiertos empezó a incrementar, llegando a ser de casi 59% a las 16:00 horas. Después de esta hora los estomas se cerraron y el valor cayó hasta un 39% cuando hay muy poca luz, pero el valor ya no disminuyó y aumentó ligeramente conforme se acercaba a las 04:00 horas, volviendo a decaer al acercarse el período de luz (Gráfica 11, Cuadro 2).

Este comportamiento nos pudo indicar que *Echeveria laui*, no es una planta MAC obligada o constitutiva, sino una MAC facultativa o intermedia, ya que gran parte de sus estomas permanecieron abiertos mientras hay luz, por lo que se podría inferir que durante el día tiene la capacidad de estar absorbiendo CO₂, mientras que en la noche esta se ve limitada debido que el porcentaje de estomas abiertos se reduce.

El pico que presenta el porcentaje de estomas a las 16:00 horas podría corresponder al de la fase II, cuando ocurre el cierre estomático, pero en algunas plantas se presenta un aumento en la conductancia estomática y en la asimilación de CO₂, y se presume que están involucradas la PEP-



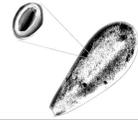
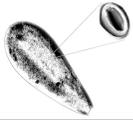
C y la rubisco. Cuando los ácidos orgánicos se agotan, los estomas se abren nuevamente y ocurre la fase IV (Lambers, *et al.* 1998), la cual encaja en el horario de las 20:00 horas en adelante, que es cuando el CO₂ endógeno y exógeno es fijado por la rubisco y por la PEP-C (*op. cit.*). La fotosíntesis MAC estricta (Holtum, *et al.* 2004) presenta asimilación de CO₂ nocturna y algo de asimilación diurna y las típicas cuatro fases señaladas en el modelo de Osmond (1978).

Esto es reforzado, debido a que la Humedad Relativa que se presentó en este tratamiento, fue más alta que la que se presentó en los tratamientos que no están tapados, muchas plantas facultativas o intermedias C₃-MAC, tienen la habilidad de expresar fotosíntesis C₃ en respuesta a la disponibilidad de agua, a cambios de humedad relativa, la temperatura del aire, en la cantidad y calidad de luz, así como el fotoperíodo (Lee y Griffiths, 1987; Borland y Griffiths, 1992). Cuando existe disponibilidad de agua, las plantas que pasan de fotosíntesis MAC a fotosíntesis C₃ pueden abrir los estomas durante el día, lo que garantiza una mayor fijación de CO₂ (Andrade, *et al.* en prensa, citado en Andrade, *et al.* 2007).

Otras especies C₃-MAC dentro de la familia que tienen una transición de este tipo es *Sedum telephium* L. (Borland y Griffiths, 1992) y en otras familias se encuentran distribuidas en las Aizoaceae, Portulacaceae, Vitaceae, Bromeliaceae y Clusiaceae, (Smith y Winter, 1996).

Además hay que considerar, que debido a la gran cantidad de cera que presentó *Echeveria laui*, la cual da la permeabilidad hidráulica a la cutícula, (Upadhayaya y Furness, 1994). Se ha demostrado que la transpiración cuticular, disminuye con el aumento de las ceras (O'toole, *et al.* 1979). La superficie fotosintética en plantas MAC, se caracteriza por la disposición de grandes cantidades de cera (Silva, *et al.* 2001) que contribuyen a aumentar los valores de resistencia estomática y cuticular a la pérdida de agua (entre 600 y 1000 seg cm⁻¹) de acuerdo a Ting y Szarek (1975), por lo que no es de extrañarse que *Echeveria laui* pueda realizar asimilación diurna de CO₂.

Otro factor importante a considerar es la baja densidad estomática que presentaron las hojas de *Echeveria laui*, ya que la combinación del metabolismo fotosintético MAC y la densidad baja de estomas, forma parte de la estrategia de estas plantas para generar un balance positivo en la economía hídrica, como ocurre con las platiopuntias (Silva y Acevedo, 1995), las cuales presentan una alta eficiencia en el uso del agua y elevada producción de biomasa aún en



condiciones de déficit hídrico (Acevedo, *et al.* 1983; García de Cortázar y Nobel, 1986; Silva y Acevedo, 1995).

Adulta Sin Tapar.

A comparación de la Adulta Tapada, esta también presentó un bajo porcentaje de estomas abiertos cuando inició la luz (28%), el cuál disminuyó muy ligeramente al mediodía, para abrir la mitad de sus estomas en un período con alta incidencia de luz (53%), sin embargo a diferencia de la planta anterior, esta bruscamente cerro sus estomas después de las 16:00 horas (13%), y los aumentó ligeramente al llegar la medianoche (17%), después de esta hora, los estomas comenzaron a abrirse casi hasta un 50% (Gráfica 12, Cuadro 3).

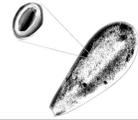
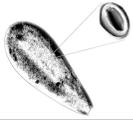
En comparación al comportamiento de la planta Adulta Tapada, esta presentó una mayor actividad nocturna, ya que después de la medianoche el comportamiento estomático cambio abruptamente, donde la mayor actividad de asimilación de CO₂ se dio después de las 00:00 horas y hasta 04:00, dejando 4 horas de gran actividad para los estomas, ya que después estos comenzaron a cerrarse. Sin embargo, también mostró el comportamiento de MAC facultativa del tratamiento anterior.

Aunque hay una diferencia importante en las temperaturas correspondientes a las 09:00 horas de ambos tratamientos, esta no parece tener un efecto sobre el tratamiento anterior (Adulta Tapada), ya que presentó porcentajes de abertura similares.

Brote Mediano Tapado.

En este tratamiento se observó que la mitad de los estomas estaban abiertos al iniciar el día y en cuanto aumentó la cantidad de luz, estos se cerraron al 26% cuando la intensidad de luz llegó a su punto más alto y siguió manteniendo ese valor hasta que comenzó a oscurecer (no se presentó el incremento de las 16:00 horas que se manifestó en las adultas), mientras la luz va disminuyendo, los estomas comenzaron a abrirse mas, el mayor incremento se dio a las 20:00 horas (39%) y





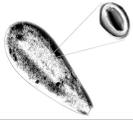
continuó aumentando ligeramente hasta un 45% pasada la medianoche y mantuvo esa tendencia hasta que comenzó a amanecer (Gráfica 13, Cuadro 4). A pesar de que no todos los estomas se cerraron en su totalidad, el comportamiento que manifestaron puede sugerir un metabolismo MAC obligado, sin que se hubiese presentado el pico sugerido por Osmond (1978) de la fase II, sin embargo, esto probó que dependiendo de la edad que tenga la planta de *Echeveria laui*, puede expresar cambios en su metabolismo.

Brote Mediano Sin Tapar.

Al inicio del día la cantidad de estomas que estaban abiertos fue del 41%, al ir aumentando la luz este porcentaje disminuyó casi a la mitad del valor anterior(21%), pero en esta planta si se presentó el mismo pico que se manifestó en las adultas, a las 16:00 horas, alcanzando un valor de 34%, y este siguió aumentando hasta que llegó a un 40% (lo que no había sucedido en los tratamientos anteriores) cuando aún hay luz, y sin embargo, los valores decrecieron cuando la intensidad de luz disminuyó, llegando a la medianoche el valor se encontró en 29%, y aumentó ligeramente durante el transcurso de la misma (de un 30 a 41% en el rango de las 04:00 a las 08:00 horas) (Gráfica 14, Cuadro 5).

Debido a que la mayoría de los estomas se encuentran abiertos en el día, y tienden a cerrarse en la noche, se sugiere que este comportamiento pudo corresponder a una fotosíntesis MAC cycling, ya que en esta ocurre durante el día la vía C_3 y en la noche, con los estomas cerrados, el CO_2 respiratorio es fijado por la PEP-C y los ácidos orgánicos producidos son descarboxilados durante el día (Guralnick, y Jackson, 2001). Sin embargo, es importante mencionar que sería necesaria la complementación de los resultados con la titulación del tejido para medir la acidez, debido a que MAC-cycling se caracteriza por el intercambio de gas tipo C_3 acompañado por una fluctuación diurna de ácido (Guralnick, *et al.* 1986).





Brote Chico Tapado.

A las 08:00 horas este brote presentó un 52% de estomas abiertos, lo que nos pudo indicar que venía de una acumulación de CO₂ nocturna, y el valor cayó después a un 29% cuando se presentó la mayor incidencia de luz, sin embargo, presenta el mismo fenómeno que ocurrió con el brote mediano sin tapar, ya que presentó un pico de un 35% a las 16:00 horas y esta cantidad aumentó a un 42% a las 20:00 horas, después disminuyó su porcentaje, conforme avanzó la noche, a las 00:00 horas, presentando un valor de 25%, y este sólo volvió a aumentar a las 04:00 horas (47%) ligeramente inferior del que se presentó al comenzar el día (Gráfica 15, Cuadro 6).

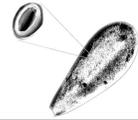
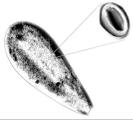
En comparación con el Brote Mediano Sin Tapar, la diferencia ambiental de humedad relativa al avanzar las horas del día y entrada la noche, no pareció ser la explicación de la tendencia a aumentar la cantidad de estomas abiertos después de las 16:00 horas, ya que este fenómeno se presentó en ambas condiciones.

Brote Chico Sin Tapar

En este tratamiento se presentó el porcentaje más alto, encontrado el 58% a las 08:00 horas, lo cual indicó que la planta mantuvo sus estomas abiertos durante la noche. al igual que las adultas presentó el aumento de apertura estomática a las 16:00 horas (43%) pero no mostró la tendencia del brote mediano sin tapar y brote chico tapado, ya que el valor se redujo al transcurrir el día (36%) alcanzando un 64% y 68% en la noche (00:00 y 04:00, respectivamente) (Gráfica 16, Cuadro 7). Este fue el valor de apertura estomática más elevado que se presentó en todos los individuos de *Echeveria laui*.

Estos brotes obtenidos por propagación vegetativa, presentaron también un metabolismo MAC facultativo, con el pico de la fase II de Osmond (1978), este tratamiento es el que más actividad nocturna presentó, y al no haber una diferencia entre los tratamientos tapados y sin tapar, podemos atribuirlo a la edad de los diferentes individuos de *Echeveria laui*.





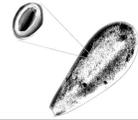
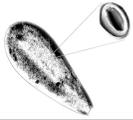
Plántula 3 Hojas Tapada.

Cuando comenzó la luz, la plántula presentó un bajo porcentaje de estomas abiertos (12%), y comenzó a aumentar el porcentaje al mismo tiempo que la intensidad de luz (39% a las 12:00), y cuando disminuyó la intensidad luminosa, también bajo la cantidad de estomas abiertos, como lo haría una planta C₃, este descenso continuó hasta entrada la medianoche (7%, Gráfica 17, Cuadro 8) mostrando el valor más bajo encontrado para esta hora, lo cual sugirió el mismo metabolismo MAC cycling que presentó el Brote Mediano Sin Tapar, pero este se presentó de forma más acentuada en estos individuos, debido a que la cantidad de estomas abiertos aumentó hasta las 04:00 horas (23%), pero cuando comenzó a amanecer el valor decreció, por lo que se puede inferir que la plántula no presentó gran apertura estomática durante la noche. Para poder discernir si la plántula de 3 hojas presenta el MAC cycling o una vía de fijación C₃ es necesario obtener la fluctuación diurna de ácido que menciona Guralnick, *et al.* (1986).

Plántula 3 Hojas Sin Tapar

Este tratamiento presentó un 31% de apertura estomática al comenzar el día, y al igual que la plántula de 3 Hojas Tapada presentó un aumento en la apertura a las 12:00 horas, pero este pico fue el mismo fenómeno que se ha presentado en las adultas y el brote chico sin tapar, pero a diferencia de estos últimos, la plántula de 3 hojas Sin Tapar no aumentó después de las 00:00 horas, al contrario decrece hasta llegar a un 17% y luego volvió a aumentar (como se muestra en el valor de las 08:00horas), lo que sugiere un metabolismo MAC cycling (Gráfica 18, Cuadro 9). Las plántulas de tres hojas podrían estar presentado este metabolismo, ya que este se considera en términos evolutivos, entre el total metabolismo C₃ y el total MAC (Monson, 1989), este comportamiento podría estar dado debido al número de hojas, debido a que hay plantas que producen nuevas hojas para ajustarse a las nuevas condiciones cuando se independizan, lo que hace posible que la fotosíntesis sea efectiva y permita el crecimiento (Prece y Sutter, 1991).



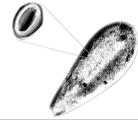
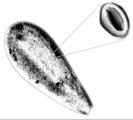


Plántula de 2 Hojas Tapada.

A las 08:00 horas el valor que se presentó en las plántulas es de 34%, y se incrementó muy ligeramente al llegar a la máxima intensidad de luz (36%), después el valor decreció a un 27% y se elevó a un 64% conforme llegaba la noche, sin embargo, al haber sido la intensidad de luz muy baja, la apertura estomática también fue baja, llegando a valores de 49% y 43% (00:00 y 04:00 horas, respectivamente) (Gráfica 19, Cuadro 10). Fue difícil en base al patrón que se presentó de apertura estomática, determinar si es un comportamiento totalmente C_3 o MAC cycling, tal vez las plántulas de *Echeveria laui*, presentaron el mismo fenómeno que sucedió con las plántulas de cactáceas, las cuales presentaron una ausencia de picos de concentración de ácido en la noche, debido a un metabolismo fotosintético C_3 ancestral en sus primeros escenarios ontogénicos, interpretando esto como una respuesta adaptativa (Altesor, *et al.* 1992). Sin embargo, Loza-Cornejo, *et al.* (2003), sugieren que las fluctuaciones irregulares pueden ser el resultado de la inmadurez del sistema fotosintético, por lo tanto, las plántulas que van envejeciendo tienen el típico comportamiento MAC definido, esto se observó en *Stenocereus beneckeii* (Ayala-Cordero, *et al.* 2006).

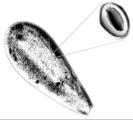
Plántula de 2 Hojas Sin Tapar.

Este tratamiento presentó más variación en cuanto a la dinámica estomática, ya que los valores de estomas abiertos variaron al pasar las horas, sin mostrar una tendencia a disminuir o incrementar su apertura en algún momento (Gráfica 20, Cuadro 11). Cabe mencionar que los valores de las plántulas de 2 hojas (Tapadas y Sin Tapar) presentaron valores más altos que los de las plántulas de 3 Hojas (Tapadas y Sin Tapar), debido a este comportamiento, podríamos pensar que el metabolismo fotosintético C_3 ancestral que propone Altesor, y colaboradores (1992), donde menciona que las plántulas tienen un metabolismo C_3 durante la temprana ontogenia, aún en especies que típicamente son CAM cuando son adultas. Además se ha documentado que en estados tempranos de plántulas de cactus, se ha dependido de la fotosíntesis C_3 más que del MAC (Hernández-González y Briones-Villareal, 2007).



El comportamiento de las plántulas de dos hojas coincidió con el encontrado por Piña (2003), que al reintroducir plántulas en distintos micrositos de trasplante, encontró que la sobrevivencia fue después de 1 mes, mayor en sitios con nodriza. Las plántulas que crecen bajo el sol directo alcanzaron un mayor tamaño que las que crecieron bajo sombra. Las plántulas que crecen bajo protección de una nodriza presentan altos porcentajes de sobrevivencia, mientras que las plántulas plantadas en sitios abiertos (sin nodriza) presentaron sobrevivencia mucho más baja. Los mayores porcentajes de sobrevivencia se presentaron en los sitios con nodrizaje, lo cual es congruente con el comportamiento de muchas especies de las zonas áridas y semiáridas que no se pueden establecer en condiciones ambientales extremas (Piña, 2003.), debido a que las nodrizas atenúan las altas temperaturas, reducen la exposición a la radiación y la pérdida de agua, dando pie a la formación de microambientes en los cuales las probabilidades de establecimiento de las plántulas son mayores que en espacios abiertos (Franco y Nobel, 1989), ya que al crear microclimas y proveer protección contra la excesiva radiación durante los estados iniciales de crecimiento, dan los requerimientos básicos considerados para la sobrevivencia de la plántula (Godínez-Alvarez y Valiente-Banuet, 1998; Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Ahora si recordamos, que esta especie ha sido estudiada últimamente para lograr su exitosa reproducción, tanto por vía sexual (Piña, 2003) como vegetativa (Verastegui, 2009), ya que la propagación es una de las estrategias fundamentales para la conservación de especies consideradas en peligro de extinción (Piña, 2003), este trabajo brinda elementos muy valiosos para este fin, debido a que podemos observar, que el metabolismo que presentan las plántulas de 2 Hojas, es al parecer un comportamiento C_3 , lo que implicaría que las semillas requieren ser puestas en condiciones artificiales para obtener ejemplares vigorosos, ya que, en campo, solo aquellas semillas que tuvieran el cobijo de una nodriza, podrían sobrevivir, porque su metabolismo no es completamente eficiente para sobrevivir sin esta, debido a que la distribución y abundancia de las especies vegetales se encuentra determinada en gran medida por los factores que actúan fuertemente en las primeras fases de desarrollo de las plántulas, especialmente en las comunidades áridas y semiáridas (Polis, 1991). Por lo que en estos ecosistemas es importante que



las plántulas puedan crecer rápidamente para lograr trascender esta fase temprana de gran vulnerabilidad (Piña-Poujol, *et al.* 2007).

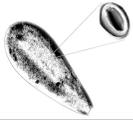
En cambio, las rosetas provenientes de esquejes de hoja, presentan toda la maquinaria metabólica MAC adecuada, para sobrevivir a las condiciones adversas que se puedan presentar en su sitio de origen, tal vez, esto explique el porqué las poblaciones de *Echeveria laui*, sean de tan pocos individuos.

Comparación entre tratamientos.

No pareció haber un efecto en el metabolismo en cuanto a la humedad relativa y la temperatura, a pesar de que el rango de temperatura que se manejo, fue un rango de temperatura “óptima” para el metabolismo ácido (debajo de los 20°C durante la noche y más de 25°C durante el día) (Martínez, 1987), no hubo una diferencia en la dinámica estomática en los tratamientos TAPADOS con respecto a los de SIN TAPAR con respecto a las variables ambientales. Lo que pudo observarse claramente, es que dependiendo de la edad de la planta de *Echeveria laui* (adulto, brote mediano, chico o plántula de 3 y 2 hojas), el metabolismo si se vio afectado, ya que las rosetas obtenidas vía vegetativa, presentaron MAC facultativas (brotes chicos) con los picos en fase II descritos por Osmond (1978), MAC facultativo cycling (brote mediano sin tapar y plántulas de 3 Hojas), y lo que podría parecer un MAC constitutivo (brote mediano tapado), ya que no presentó el pico de fase II, sin embargo como las plantas adultas presentan MAC facultativo, podemos descartar que sea obligada, y finalmente, las plántulas de 2 Hojas que probablemente presentó la vía C₃.

Es importante conocer el número de estomas que posee *Echeveria laui* y saber de qué forma se abren y cierran debido a que la transpiración y la intensidad de la respiración está en razón directa al número y abertura de los estomas y como las hojas son los principales órganos de las plantas donde se realiza la fotosíntesis, la cantidad y distribución de los estomas influyen directamente sobre la asimilación clorofílica (Ruiz, *et al.* 1962). Los estomas desempeñan un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis de la planta y de ahí la importancia de conocer



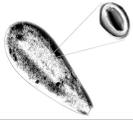


tanto el número como la forma en que los poros se abren y se cierran como también los factores que controlan estos procesos (Sánchez y Aguirreolea, 1996). Por lo que es necesario poner mayor atención en la fisiología ambiental de muchas otras especies MAC desde la germinación, hasta la vía fotosintética de las plántulas y la supervivencia de los individuos en diferentes microambientes (Schmidt, *et al.* 2001; Zotz y Hietz, 2001; Andrade, *et al.* 2004; Ayala-Cordero, *et al.* 2006; Cervera, *et al.* 2006; Méndez, *et al.* 2006; Hernández-González, y Briones-Villareal, 2007).

Echeveria laui, es un claro ejemplo de la gran plasticidad del metabolismo MAC, debido a que existe un continuo de plantas que van desde C₃ hasta MAC estricta y nos enfrentamos a la tarea de entender la importancia ecológica de esta plasticidad fisiológica intra-e-interespecifica (Holtum, 2002; Zotz, 2002), ya que los estudios sobre las respuestas fisiológicas de las plantas MAC al ambiente han sido realizados principalmente en miembros adultos de sólo tres familias: Agavaceae, Bromeliaceae y Cactaceae (Nobel, 1988; Benzing, 1990; Winter y Smith, 1996; Zotz y Hietz, 2001; Andrade, *et al.* 2004; Lüttge, 2004) y los miembros de la familia Crassulaceae han estado muy lejos de ser usados y en experimentos bioquímicos y fisiológicos (Fay y Gratton, 1992).

Microscopia de barrido e histología.

Las fotos tomadas del mesófilo de la hoja y del estoma se procesaron utilizando el protocolo de la post-fijación con Tetraóxido de osmio, se observó que esta técnica no evita el colapsamiento de los tejidos (Fig. 17), e incluso los estomas sufrieron daño (se quiebran) utilizando esta técnica (Fig. 18). En cambio, el protocolo que utiliza HMDS fue la mejor técnica para introducir fragmentos de hoja de *Echeveria laui*, ya que esta sustancia evitó que el material se colapse al secarse al aire (Nation, 1983) y no llevó a las células a contraerse (Fig. 19), tal como lo observaron Araujo, *et al.* (2003) en células anaeróbicas. Este compuesto ha sido utilizado anteriormente para tejidos vegetales por Bray, *et al.* (1993), sin embargo ellos no especifican el resultado de utilizar dicho compuesto. De esta forma, encontramos que el HMDS fue un método



idóneo para introducir fragmentos de *Echeveria laui* y probablemente de otros miembros de la familia de las crasuláceas, por lo que es necesario continuar investigando que otras especies son viables para ser analizadas en microscopia electrónica de barrido mediante la utilización del HMDS. Además el HMDS es un método menos costoso que la técnica de secado a punto crítico para microscopia electrónica de barrido (Bray, *et al.* 1993) y no se corre un gran riesgo para la salud, como al utilizar el Tetraóxido de osmio, el cual puede ocasionar diversos trastornos a la salud (tos, dolor de cabeza, alteraciones visuales, quemaduras, etc.) algunos bastante graves (edema pulmonar) e incluso la muerte (Fichas Internacionales de Seguridad Química, 2009).

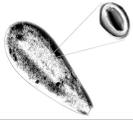
El HMDS permitió hacer varias tomas de diferentes partes de la hoja, como la epidermis (Fig. 20), acercamientos a esta para ver el tipo de estoma (Fig. 21) y al estoma (Fig. 22), en la cual se pudo apreciar que se encontraba hundido con respecto a las otras células epidérmicas, lo que explicó el hecho de que los negativos no dieran una impresión precisa de la apertura estomática.

También se midió un estoma de una imagen tomada de una muestra tratada con Tetraóxido de osmio y el tamaño que se obtuvo en microscopia electrónica de barrido coincidió con el obtenido mediante las fotografías del microscopio óptico, obteniendo $35.2\mu\text{m}$ de largo por $21.1\mu\text{m}$ de ancho (Fig. 23).

Siguiendo la metodología del HMDS se tomaron fotos de las plántulas de 2 y 3 hojas. En la de dos hojas, se tomo primero toda la hoja entera (Fig. 24) y después se hizo un acercamiento a la epidermis (Fig. 25) donde se pudo apreciar que las células epidérmicas presentaron formas “ameboides”, las cuáles sugieren que adquieren su típica forma rectangular o cuadrada, al expandirse la hoja y aumentar de volumen, estas células parecen tener la capacidad de ser muy elásticas pero a la vez dar el soporte necesario a la epidermis. Finalmente se hizo un acercamiento al estoma de la plántula, donde se observó, que desde esta etapa, se presenta el estoma anisocítico (Fig. 26).

En lo que respecta a la plántula de 3 hojas, de igual manera se tomo una foto de la plántula entera (Fig. 27), se hizo un acercamiento lateral a la epidermis de esta (Fig. 28) donde se pudo apreciar



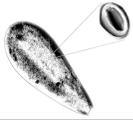


que las células de la epidermis tenían un aspecto “acolchonado”, probablemente a esto se deba su forma ameboide, y por último se hizo un acercamiento a la raíz y al tallo (Fig. 29 y 30).

Mientras se realizó las observaciones de los tejidos de la hoja de *Echeveria laui*, se tomo una foto del mesófilo de un fragmento de hoja (Fig. 31) y se pudo observar una estructura que se encontraba rodeando a las células del mesófilo (Fig. 32 y 33), y parecía estar formada de fibras. A dicha formación se le aplico la técnica de Emisión de Rayos X por Energía Dispersiva (SEMRX), y se encontró que además de poseer carbono y oxígeno, tenía sílice. A pesar de que la imagen no mostró formas cristalinas (por lo cual no parecería sílice), se ha encontrado que la forma soluble de la silicón (monómero de ácido ortosilícico) en bajas concentraciones es amorfa y cuando la cantidad se va incrementando experimenta reacciones de policondensación (Perry y Keeling-Tucker, 2003). Al estarse formando el sílice, tiene que alcanzar un tamaño crítico para formar partículas esféricas y posteriormente, se forma cadenas ramificadas de adornos estructurales (Iler, 1979; Perry y Keeling-Tucker, 2000). Algunos autores que han hallado estas formas no cristalinas del sílice son Iler (1979), quien encontró estructuras en forma de cinta y curvas en microscopía de barrido y lo mencionan como un ejemplo de sílica amorfa, también menciona formas de laminas microscópicas, cintas o flecos. Por otra parte Vrieling, *et al.* (1999) encontró en diatomeas, resultados recientes de que en la sílica de estas, no hay evidencia de formas cristalinas.

En este trabajo se maneja la hipótesis de que esta estructura pueda estar relacionada con la cera que produce la hoja de *Echeveria laui*, ya que se tomaron fotos de la cera (Fig. 34) y mediante la Emisión de Rayos X por Energía Dispersiva (SEMRX), se determino que la cera posee un 0.16% de sílice (el análisis se realizo con la figura 35, Cuadro 12), además de otros elementos (carbono y oxígeno), los cuales son comunes en los organismos. Cabe mencionar que las imágenes de la cera, con las de la sustancia encontrada no son similares, pero en composición química presentó similitudes, no se puede determinar si la apariencia tenga algo que ver con el procedimiento que se le da a la muestra para microscopía electrónica de barrido, ya que la cera entro sin ningún proceso.

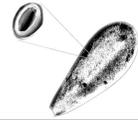
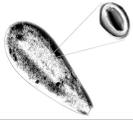




También cabe la posibilidad que la estructura encontrada sea correspondiente a algún lípido o mucosidad, ya que Wojciechowicz, *et al.* (2001), encontraron en cultivos de *Echeveria laui in vitro*, que en las células del mesófilo se encontraban cuerpos lípidos y mucosos

Al momento de extraer las epidermis de la hojas de *Echeveria laui*, para realizar la dinámica estomática, se encontraron la presencia de unos cristales, los cuales se analizaron por microscopia electrónica de barrido (sin ningún proceso previo, solo el fijador F. A. A.), y se tomaron fotografías de estos (Fig. 36 y 37), y se tomo una imagen (Fig. 38) para obtener la composición de estos mediante SEMRX. Se encontró que el cristal posee calcio (26.81%, Cuadro 13). Estos cristales de calcio se encontraron incrustados en el mesófilo de las hojas (Fig. 39) y observó que generalmente estaban cerca de la venación (Fig. 40). Es importante mencionar, que estos cristales al parecer, se generan en el mesófilo y después son excretados hacia la epidermis (Fig. 41 y 42). El calcio Ca_2^+ es acumulado por las plantas, especialmente en las hojas donde se deposita irreversiblemente, es un elemento esencial para el crecimiento de meristemos y particularmente para el crecimiento y funcionamiento apropiado de los ápices radicales. El calcio es un componente de la lámina media, donde cumple una función cementante como pectato cálcico. También impide daños a la membrana celular, evitando el escape de sustancias intracelulares, cumpliendo un papel estructural al mantener la integridad de la membrana, así mismo actúa modulando la acción de todas las hormonas vegetales, regulando la germinación, el crecimiento y senescencia, retarda la senescencia y abscisión de hojas y frutos. El ión calcio juega un papel importante en el desarrollo vegetal y regulación metabólica (Bidwell, 1983).

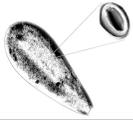
En lo que respecta a los cortes histológicos, estos no pudieron llevarse a cabo, debido a que al parecer, solo queda la pared celular, la cual al pasar por el tren para desparafinar el corte, no pudo fijarse al cubreobjetos y terminó perdiéndose. Se intentaron cortes de diferentes tamaños (hasta de $50\mu m$), pero no se consiguió un buen corte, debido a lo antes mencionado. Se recomienda utilizar un microtómo de congelación en tejido fresco congelado con gas carbónico, y su observación en el microscopio fotónico, ya que este método permite que la parafina se infiltre bien, aunque se presente gran cantidad de mucílagos (Silva, *et al.* 2001).



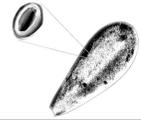
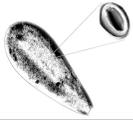
CONCLUSIONES.

- ✧ El tamaño promedio de la capa de cera que presentó las hojas de *Echeveria laui* fue de 1.97mg/cm^2 .
- ✧ La técnica más eficiente para remover la cera de las hojas de *Echeveria laui*, fue mediante la acción mecánica con un pincel.
- ✧ La hoja de *Echeveria laui* es una hoja anfistomática y presentó estomas de tipo anisocítico en ambas epidermis (abaxial y adaxial).
- ✧ El índice estomático para *Echeveria laui* fue de 9.50 en el haz y 5.33 en el envés, la densidad estomática es de 4.16 estomas por mm^2 en el haz y 1.70 estomas por mm^2 en el envés.
- ✧ La extracción de epidermis, tiñéndola con cristal violeta y montada en gelatina glicerizada fenificada fue la mejor técnica para apreciar la dinámica estomática de *Echeveria laui*.
- ✧ *Echeveria laui* es una planta MAC facultativa, y al parecer presentó variaciones de este tipo de metabolismo (MAC cycling), en individuos de diferentes edades.
- ✧ Las variaciones en el metabolismo MAC no se atribuyen a factores ambientales, sino a la edad de los individuos.
- ✧ Es posible que las plántulas de *Echeveria laui* presenten un metabolismo C_3 .





ANEXOS.



FIGURAS.



Figura 1. Individuos adultos de *Echeveria laui* en floración.

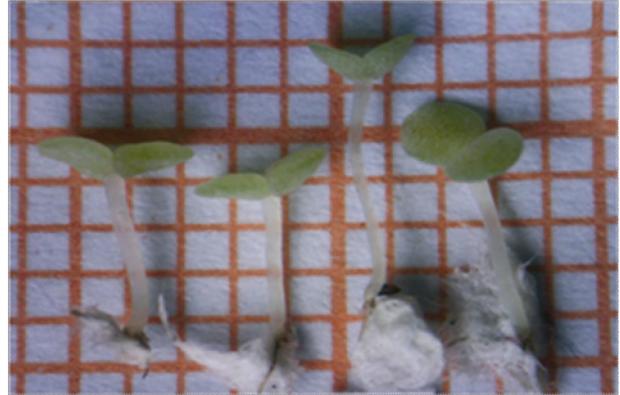


Figura 2. Plántulas de 2 hojas de *Echeveria laui*.

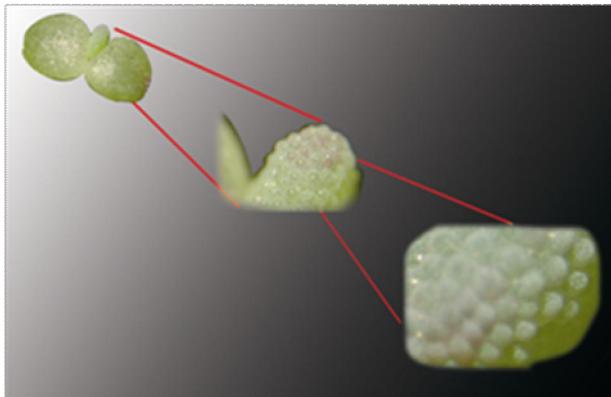


Figura 3. Presencia de cera en la tercer hoja de la plántula de 3 hojas de *Echeveria laui*.



Figura 4. Plántulas de dos y tres hojas, junto con una roseta de esqueje de hoja. Se aprecian las diferencias en cuanto a la cantidad de cera.



Figura 5. Tratamientos Tapados y Sin Tapar de *Echeveria laui*.

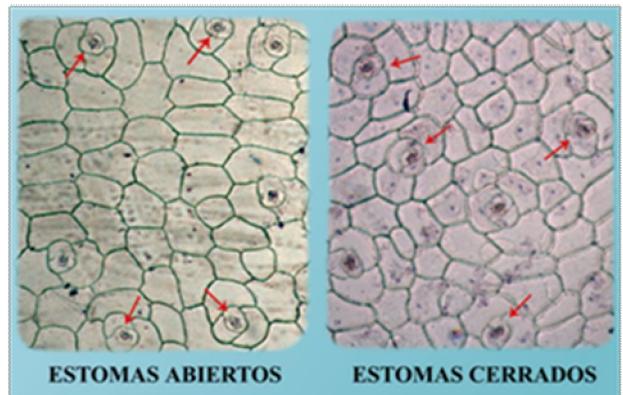


Figura 6. Estomas abiertos (izquierda) donde se aprecia el haz de luz que pasa por el ostiolo. Estomas cerrados (derecha) donde no se aprecia el haz de luz.



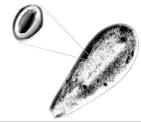


Figura 7. Estomas de plántula de dos hojas de *Echeveria laui*, se aprecia que el estoma está abierto sin necesidad del haz de luz.

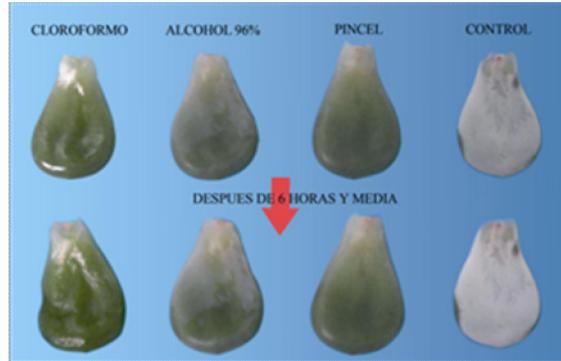


Figura 8. Estado de las hojas de *Echeveria laui* después de remover la cera con diferentes tratamientos (arriba). Estado de las hojas después de seis horas y media de remover la cera (abajo).

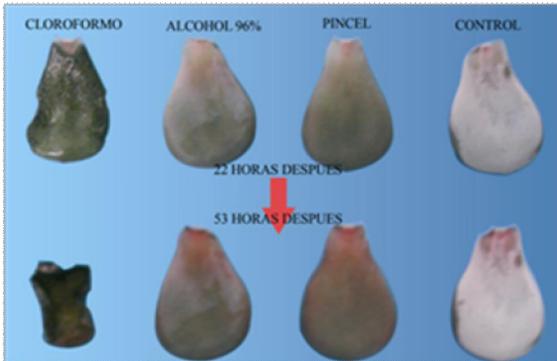


Figura 9. Estado de las hojas de *Echeveria laui* después de remover la cera transcurridas 22 horas (arriba) y a 53 horas de remover la cera (abajo).

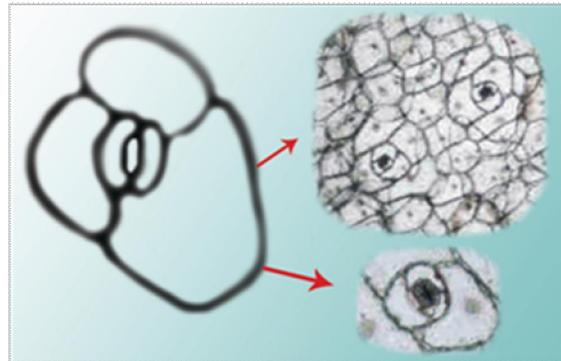


Figura 10. Esquema del tipo de estoma anisocítico (izquierda) según Wilkinson (1979). Epidermis de hojas de *Echeveria laui* a 4X (derecha arriba) y 10X (derecha abajo).

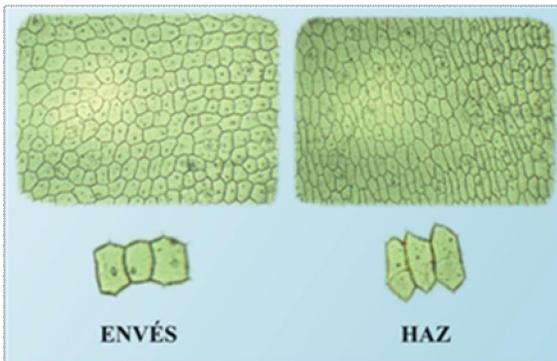


Figura 11. Diferencias entre las células epidérmicas de las hojas adultas de *Echeveria laui*. En el envés (izquierda) las células tienden a una forma cuadrada y las del ház (derecha) son más alargadas.



Figura 12. Negativo de la epidermis de la hoja de *Echeveria laui* utilizando RESISTOL 850® (pegamento blanco). No se aprecia si el estoma se encontraba abierto o cerrado.



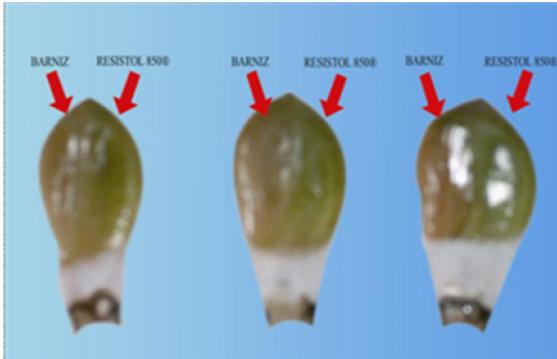
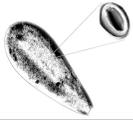


Figura 13. Hojas de *Echeveria laui* después de retirar el barniz y RESISTOL 850®, se puede apreciar que el barniz causa necrosis en el tejido.

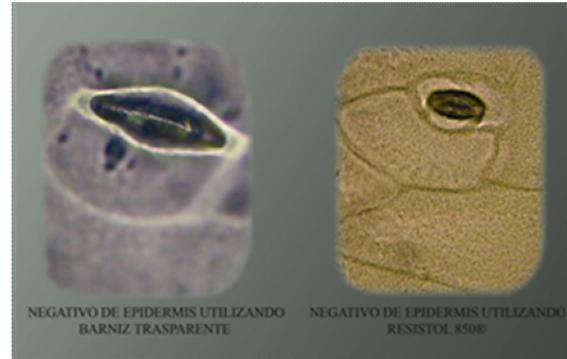


Figura 14. Negativos de la epidermis de *Echeveria laui*, utilizando barniz (izquierda) y RESISTOL 850® (derecha). Las imágenes no permiten discernir si el estoma se encontraba abierto o cerrado.

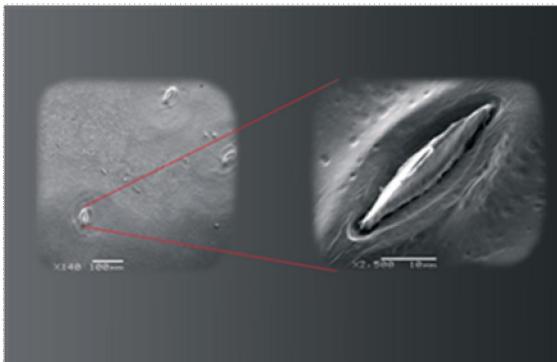


Figura 15. Negativos de hojas de *Echeveria laui* en Microscopía Electrónica de Barrido. No se puede distinguir si el estoma está cerrado o abierto, debido a que este se encuentra hundido.

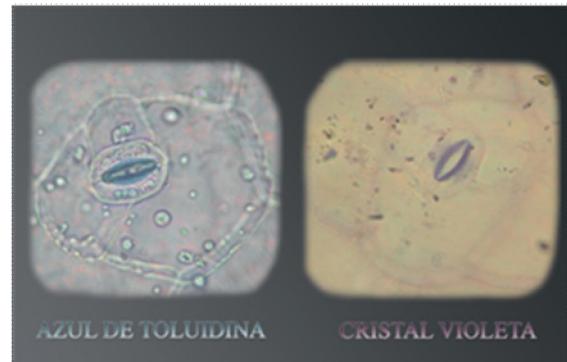


Figura 16. Estomas de hoja de *Echeveria laui*, teñidos con azul de toluidina (izquierda) y cristal violeta (derecha), se aprecian claramente las células oclusivas con el cristal violeta. Aumento 40X.

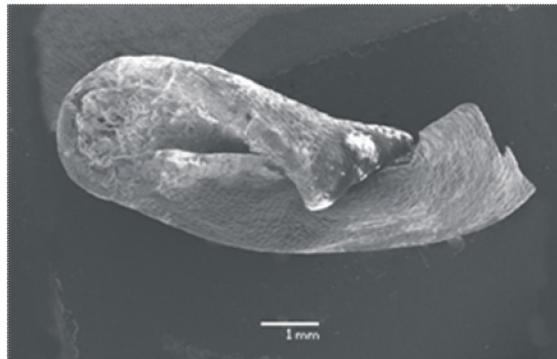


Figura 17. Fragmento de hoja de *Echeveria laui* colapsada, al realizar la post-fijación con Tetraóxido de Osmio. Microscopía Electrónica de Barrido.

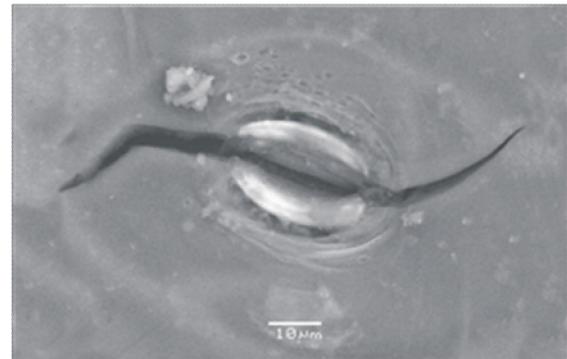


Figura 18. Estoma de *Echeveria laui* fraccionado al realizar la post-fijación con Tetraóxido de Osmio. Microscopía Electrónica de Barrido.



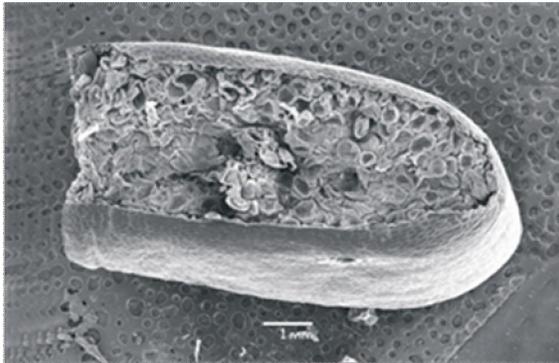
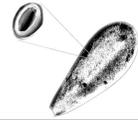
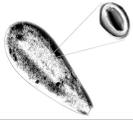


Figura 19. Fragmento de hoja de *Echeveria laui* tratada con hexametildisilazano (HMDS). La hoja no se colapsa. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.

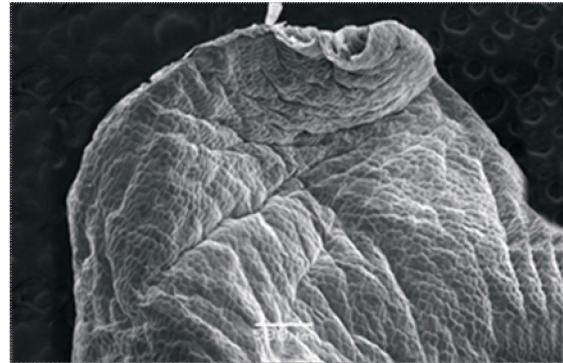


Figura 20. Epidermis de fragmento de hoja adulta de *Echeveria laui*. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.

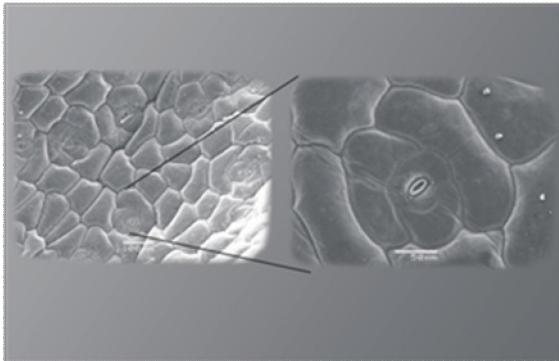


Figura 21. Acercamiento a la epidermis de una hoja adulta para ver el tipo de estoma anisocítico de *Echeveria laui*. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.

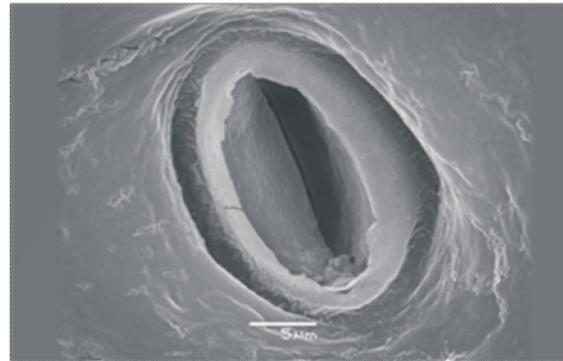


Figura 22. Acercamiento al estoma de *Echeveria laui*, se aprecia que el estoma está hundido en la epidermis. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.

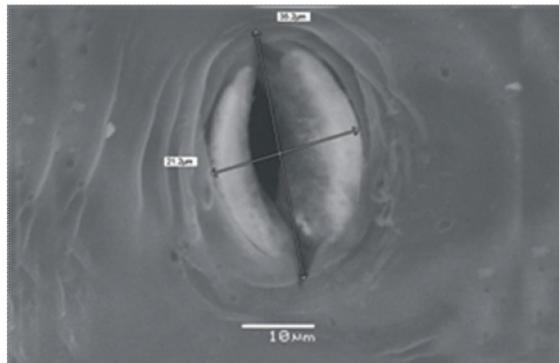


Figura 23. Tamaño de estoma de la hoja adulta de *Echeveria laui*. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.



Figura 24. Hoja entera de una plántula de 2 hojas de *Echeveria laui*. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.



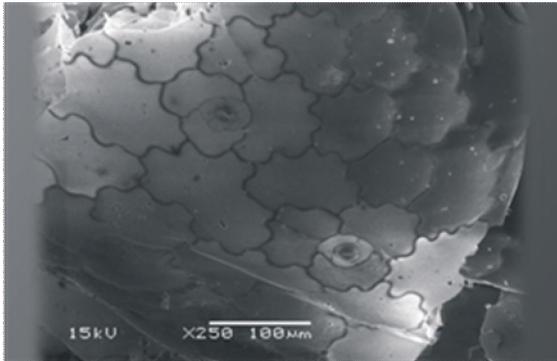
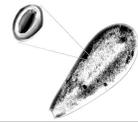
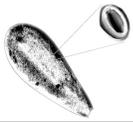


Figura 25. Acercamiento a la epidermis de una plántula de 2 hojas de *Echeveria laui*. Se aprecia la forma ameboide de las células epidérmicas. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.

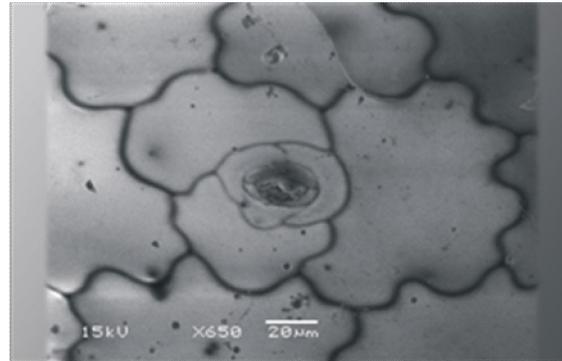


Figura 26. Tipo de estoma a anisocítico en la plántula de 2 hojas de *Echeveria laui*. El tipo de estoma no cambia al crecer la planta. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.



Figura 27. Plántula de 3 Hojas de *Echeveria laui*. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.

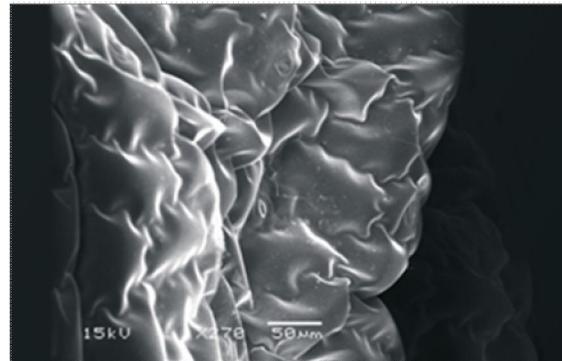


Figura 28. Acercamiento a la epidermis de una plántula de 3 Hojas de *Echeveria laui*. Se aprecia la forma acolchonada de las células epidérmicas. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.

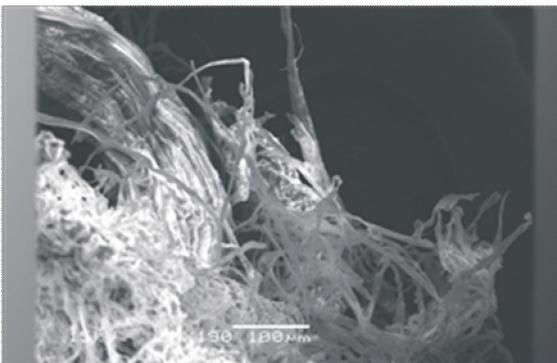


Figura 29. Raíces de una plántula de 3 Hojas de *Echeveria laui*. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.

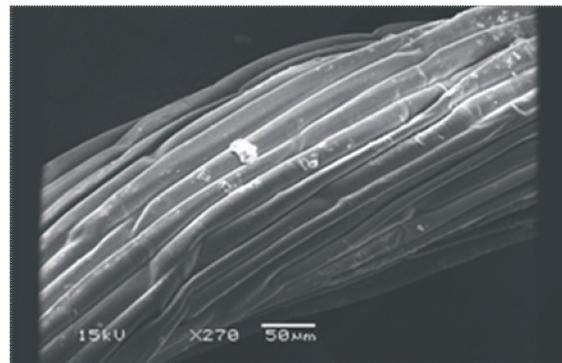


Figura 30. Tallo de una plántula de 3 Hojas de *Echeveria laui*. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.



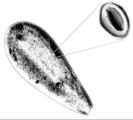


Figura 31. Mesófilo de un fragmento de hoja de *Echeveria laui*, donde se aprecia la estructura que rodea a las células del mesófilo. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.

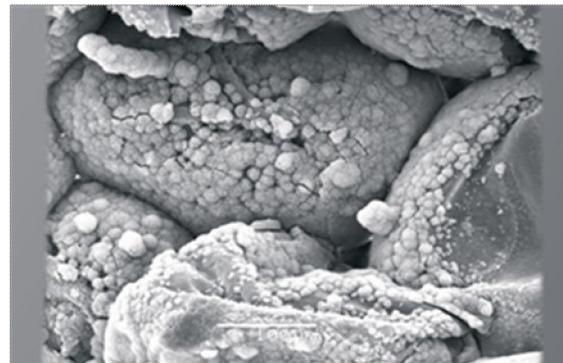


Figura 32. Acercamiento a las células del mesófilo, se puede notar que la estructura rodea las células. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.

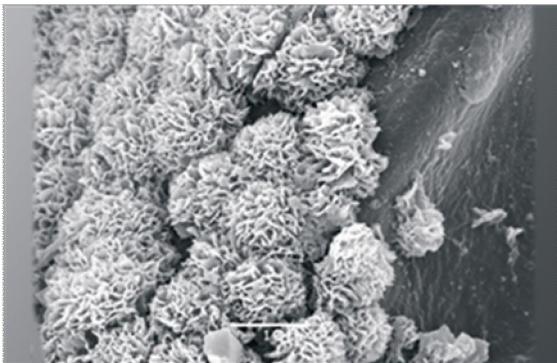


Figura 33. Acercamiento de la estructura, se aprecia que tiene forma de fibras. Microscopia Electrónica de Barrido protocolo HMDS.

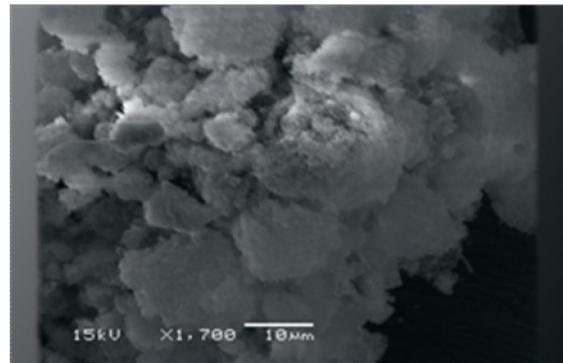


Figura 34. Cera de *Echeveria laui*, la cera se extrae de las hojas y se mete directamente a Microscopia Electrónica de Barrido.

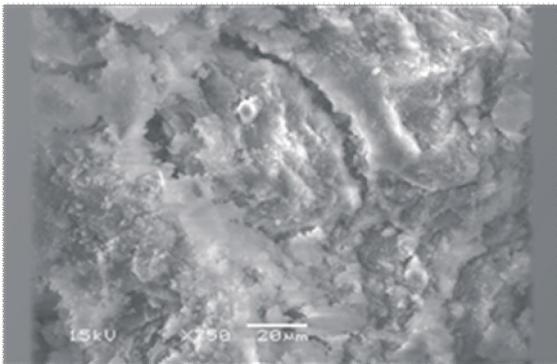


Figura 35. Imagen de cera utilizada para su análisis mediante Emisión de Rayos X por Energía Dispersiva. Microscopia Electrónica de Barrido.

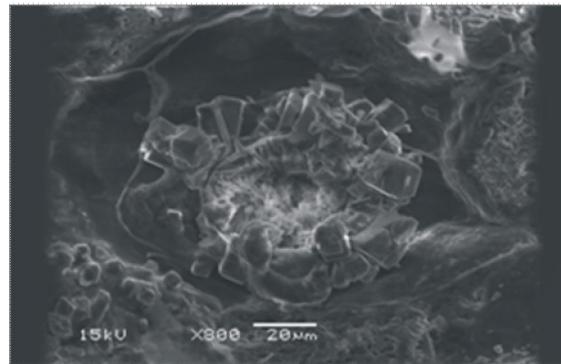


Figura 36. Cristales de calcio encontrados durante la extracción de epidermis de las hojas de *Echeveria laui*, estos cristales se metieron directamente a Microscopia Electrónica de Barrido.



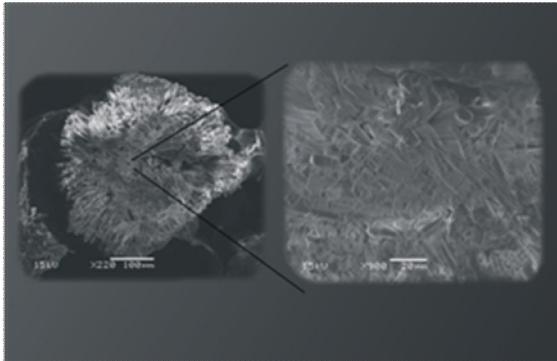
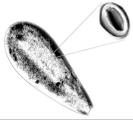


Figura 37. Acercamiento de los cristales de calcio encontrados durante la extracción de epidermis de las hojas de *Echeveria laui*. Microscopía Electrónica de Barrido.

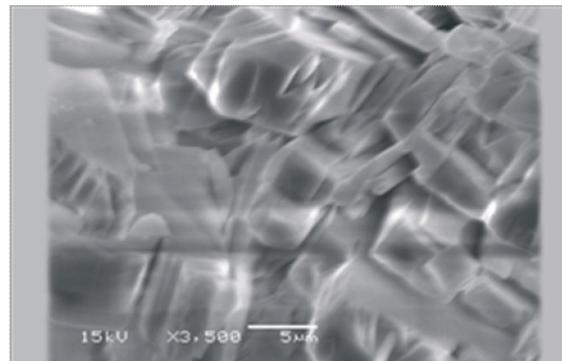


Figura 38. Imagen del cristal utilizada para su análisis mediante Emisión de Rayos X por Energía Dispersiva. Microscopía Electrónica de Barrido.

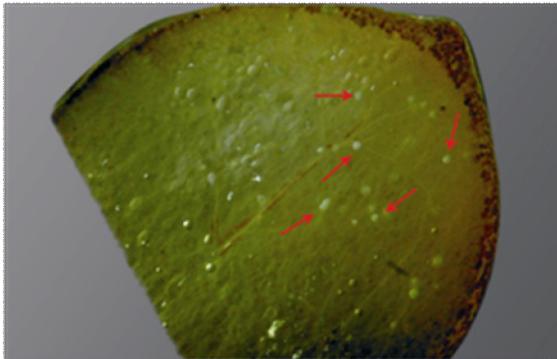


Figura 39. Cristales de calcio (flechas) encontrados en el mesófilo de las hojas de *Echeveria laui*.

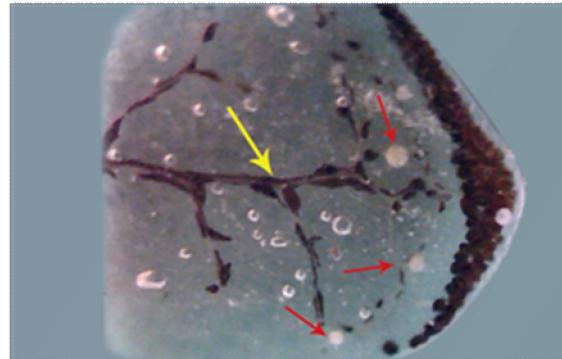


Figura 40. Cristales de calcio (flechas rojas) encontrados cerca de la venación (flecha amarilla, vena teñida) en el mesófilo de las hojas de *Echeveria laui*.

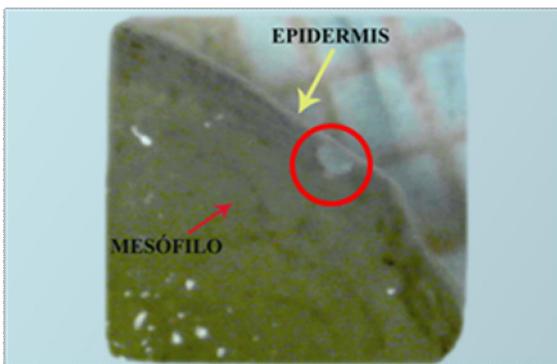


Figura 40. Cristal de calcio, que se incrusta en la epidermis en hojas de *Echeveria laui*.

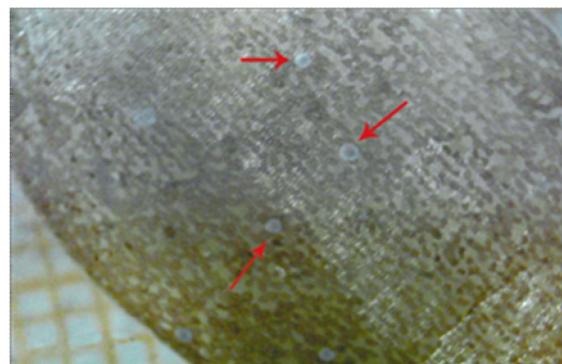
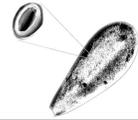
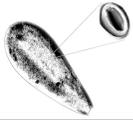
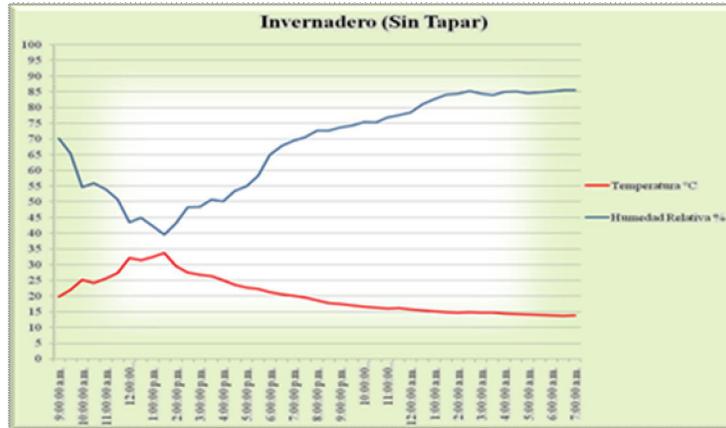


Figura 40. Cristales de calcio (flechas rojas) incrustados en la epidermis de hojas de *Echeveria laui*. Los cristales pasan del mesófilo a la epidermis (se muestra la epidermis, abajo se encuentra el mesófilo).

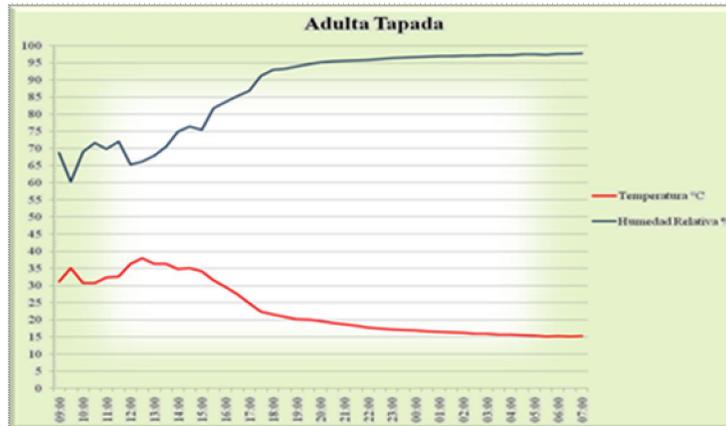




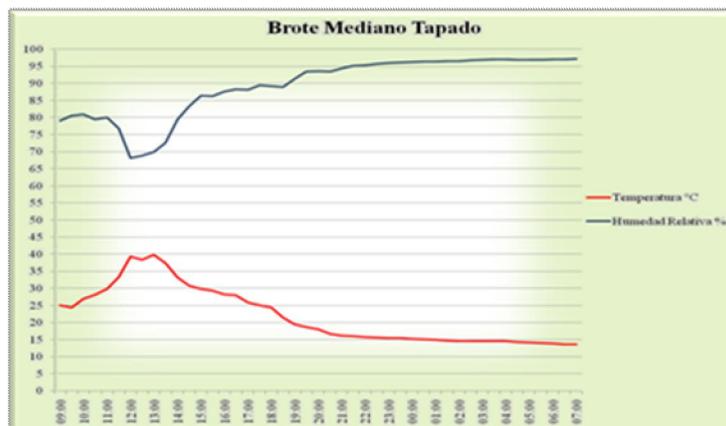
GRÁFICAS.



Gráfica 1. Temperatura y Humedad Relativa promedio de los tratamientos Sin Tapar.

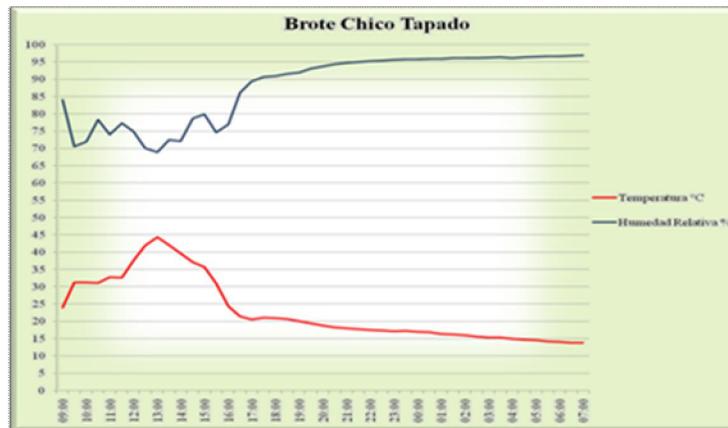
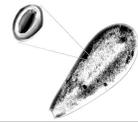
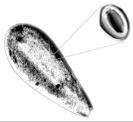


Gráfica 2. Temperatura y Humedad Relativa promedio del tratamiento Adulta Tapada.

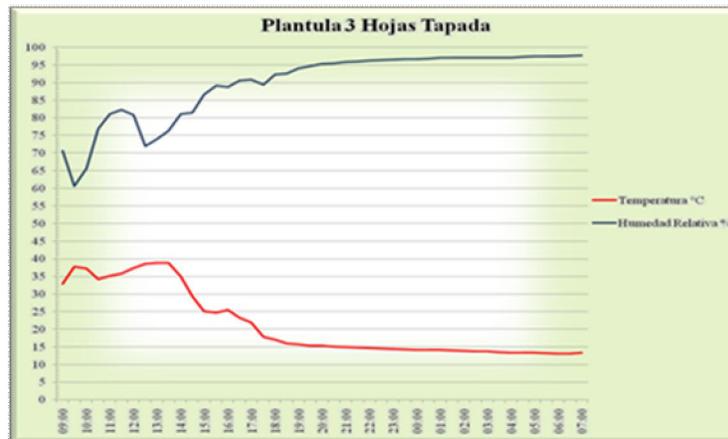


Gráfica 3. Temperatura y Humedad Relativa promedio del tratamiento Brote Mediano Tapado.

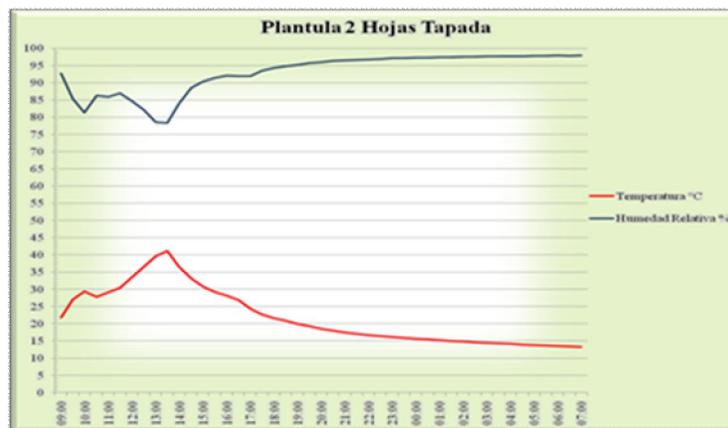




Gráfica 4. Temperatura y Humedad Relativa promedio del tratamiento Brote Chico Tapado.

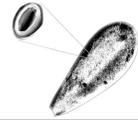
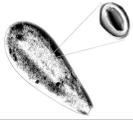


Gráfica 5. Temperatura y Humedad Relativa promedio del tratamiento Plántula de 3 Hojas Tapada.

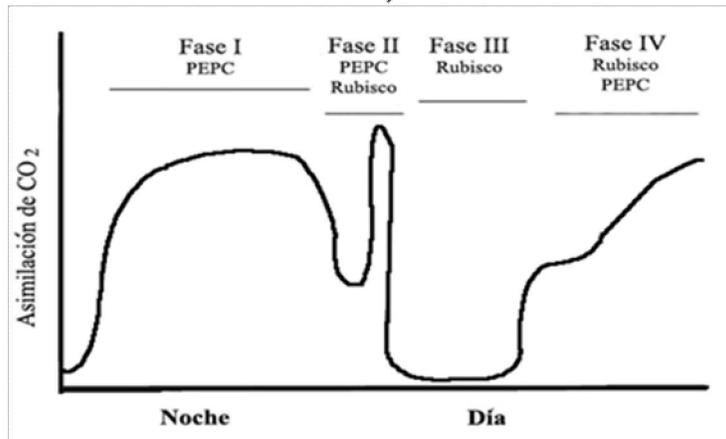


Gráfica 6. Temperatura y Humedad Relativa promedio del tratamiento Plántula de 2 Hojas Tapada.





Gráfica 7. Pérdida de peso en hojas de *Echeveria laui*, al retirar la cera con tres diferentes formas (pincel, etanol 96% y cloroformo 99%).

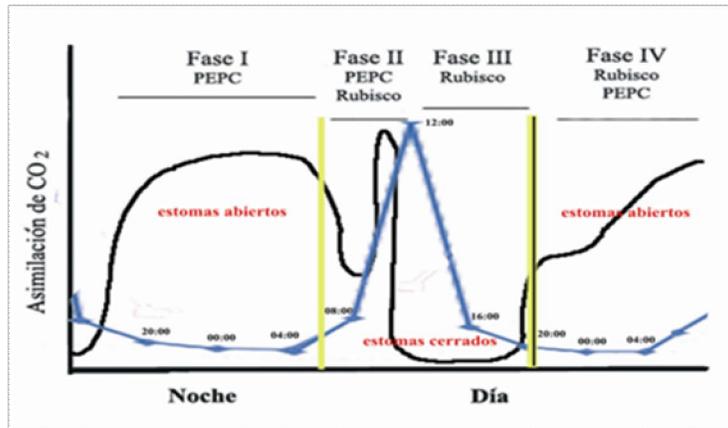
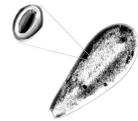
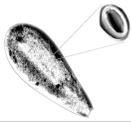


Gráfica 8. Curva de asimilación de CO₂ de una planta CAM bien irrigada. Se muestran las cuatro fases típicas de la fotosíntesis CAM con las enzimas fijadoras de CO₂ correspondientes.

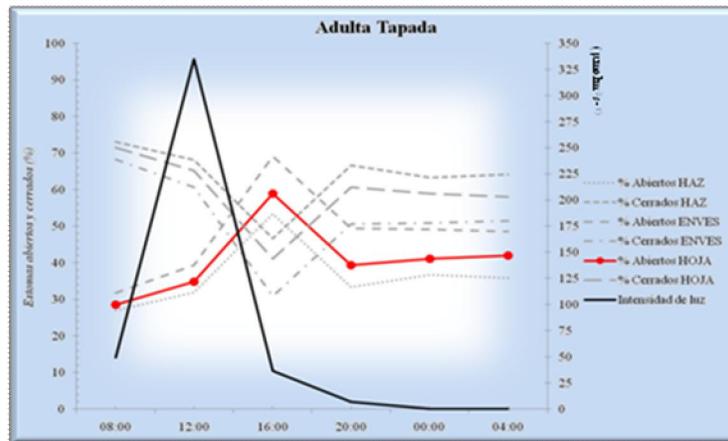


Gráfica 9. Intensidad de luz obtenida en el invernadero, durante el transcurso del experimento.

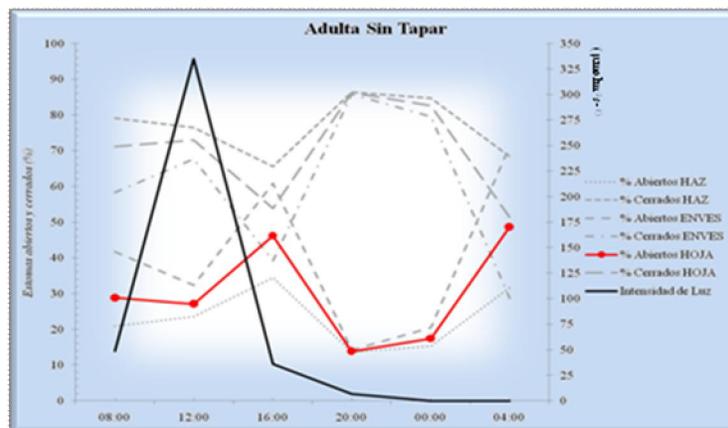




Gráfica 10. Intendencia de luz relacionada con la gráfica de Osmond (1978).

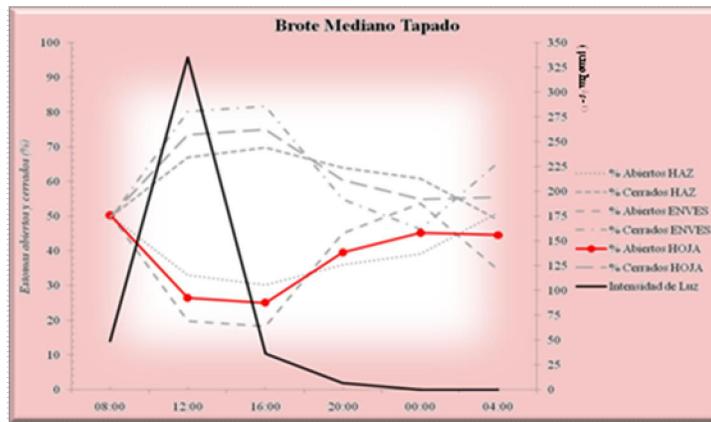
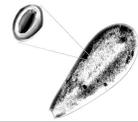
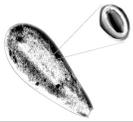


Gráfica 11. Dinámica estomática del tratamiento Adulta Tapada de *Echeveria laui*. Estomas abiertos(%) en la hoja (rojo).

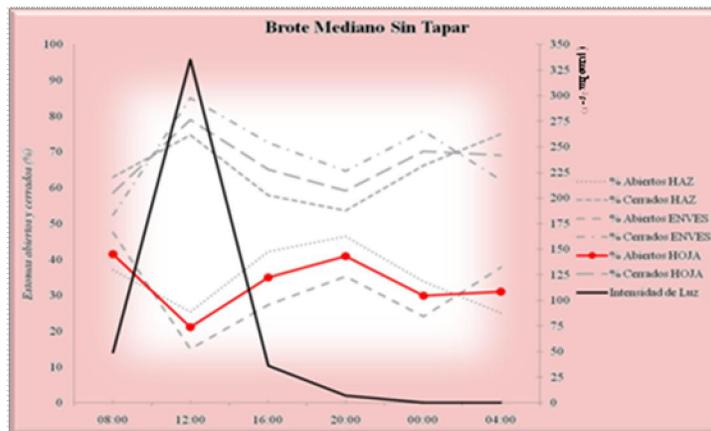


Gráfica 12. Dinámica estomática del tratamiento Adulta Sin Tapar de *Echeveria laui*. Estomas abiertos(%) en la hoja (rojo).

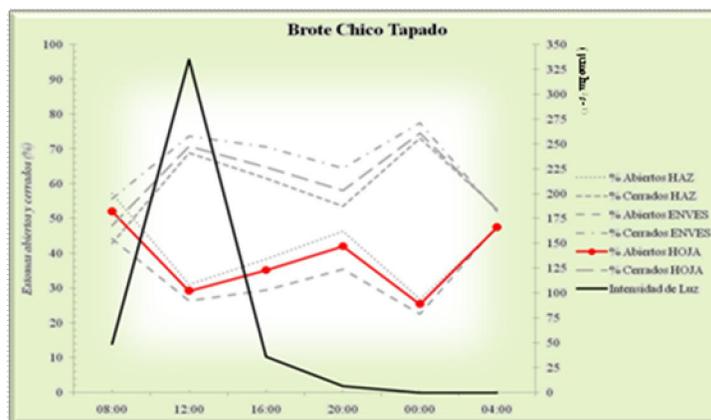




Gráfica 13. Dinámica estomática del tratamiento Brote Mediano Tapado de *Echeveria laui*. Estomas abiertos(%) en la hoja (rojo).

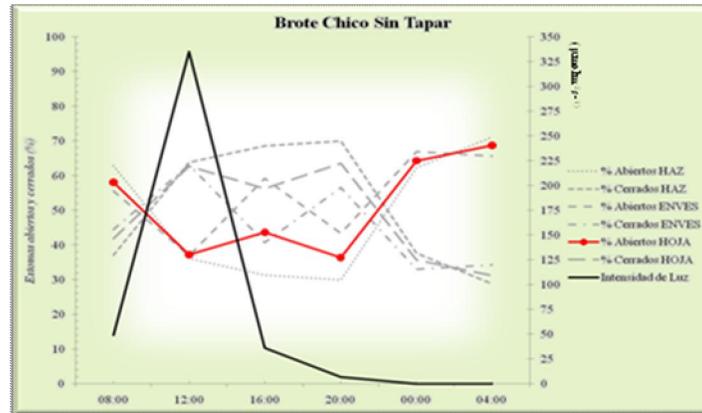
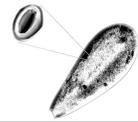
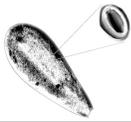


Gráfica 14. Dinámica estomática del tratamiento Brote Mediano Sin Tapar de *Echeveria laui*. Estomas abiertos(%) en la hoja (rojo).

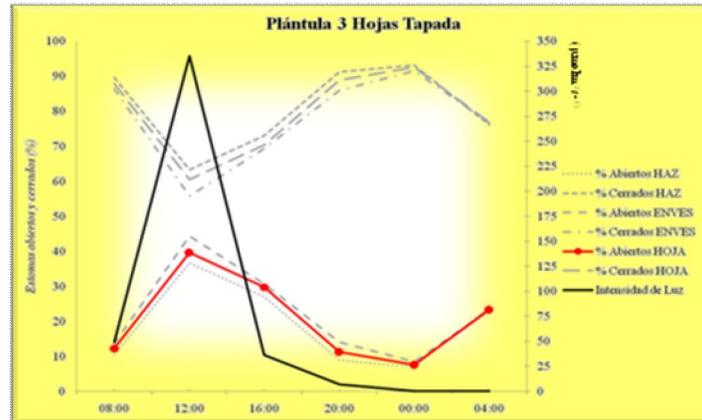


Gráfica 15. Dinámica estomática del tratamiento Brote Chico Tapado de *Echeveria laui*. Estomas abiertos(%) en la hoja (rojo).

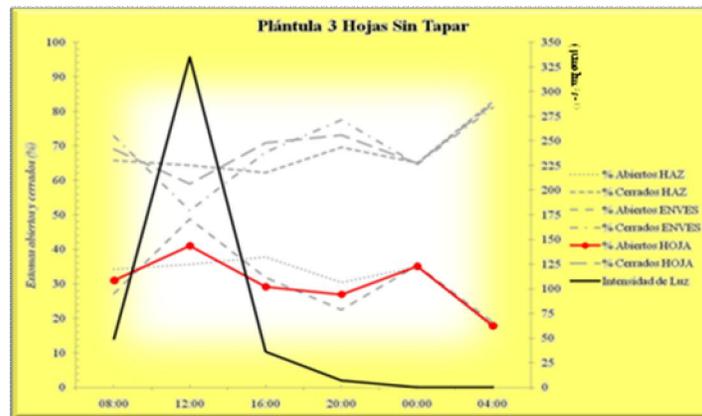




Gráfica 16. Dinámica estomática del tratamiento Brote Chico Sin Tapar de *Echeveria laui*. Estomas abiertos(%) en la hoja (rojo).

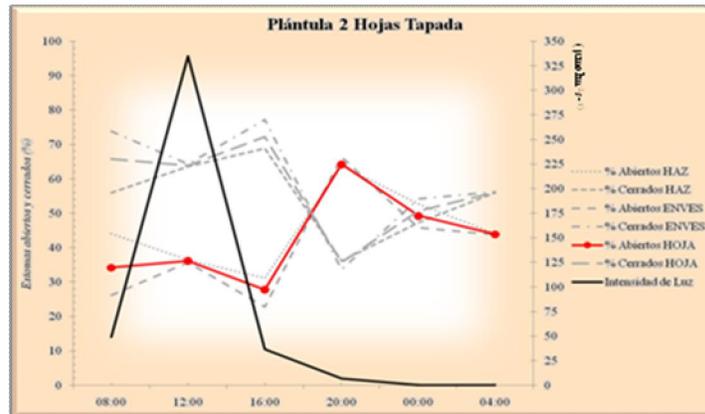
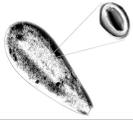


Gráfica 17. Dinámica estomática del tratamiento Plántula 3 Hojas Tapada de *Echeveria laui*. Estomas abiertos(%) en la hoja (rojo).

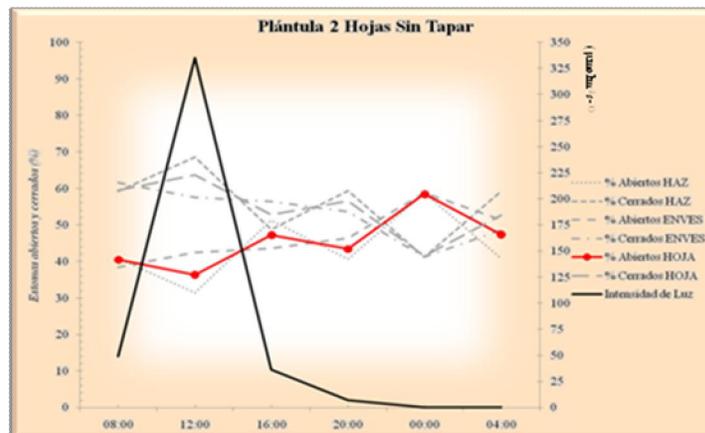


Gráfica 18. Dinámica estomática del tratamiento Plántula 3 Hojas Sin Tapar de *Echeveria laui*. Estomas abiertos(%) en la hoja (rojo).



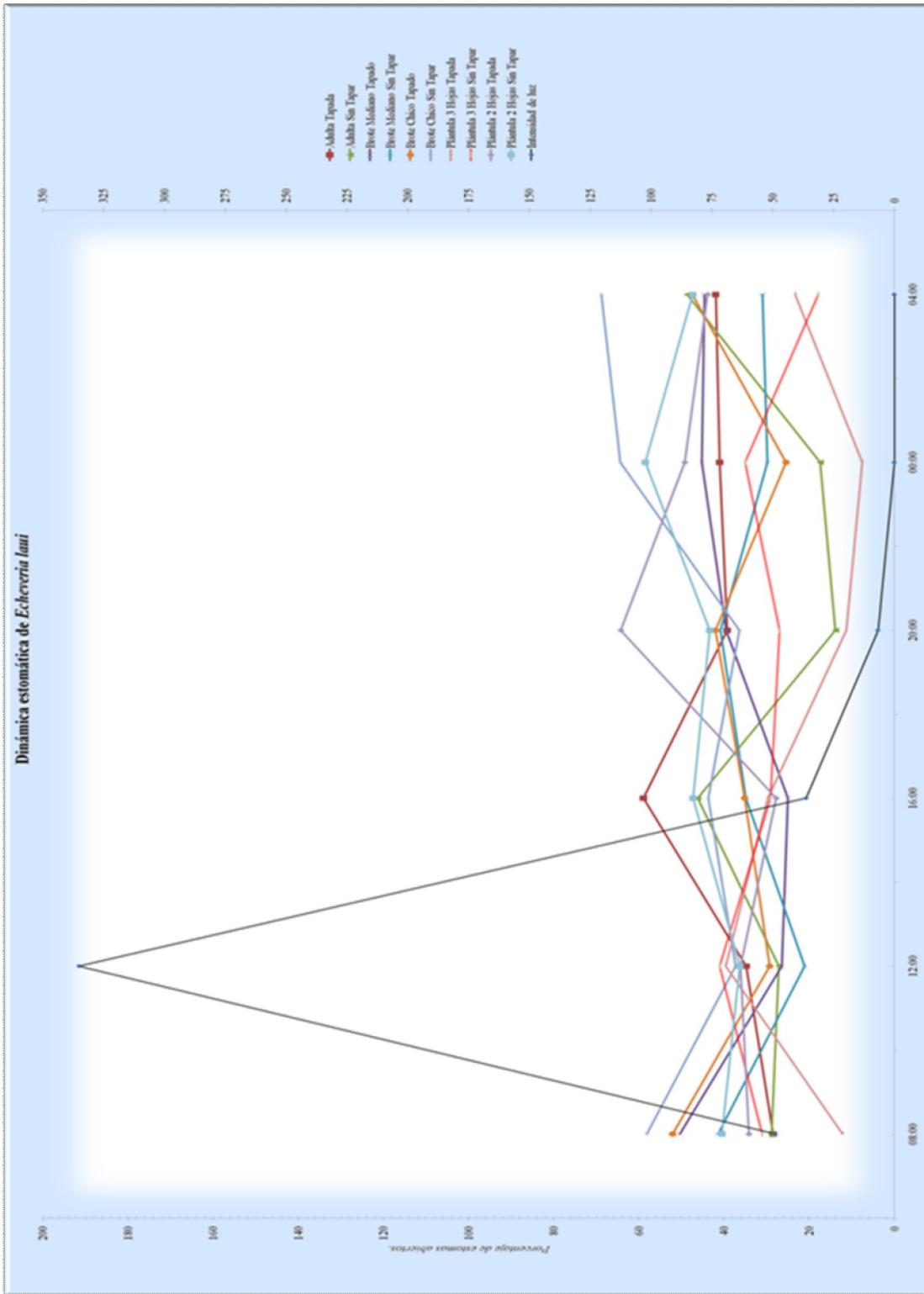
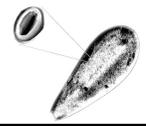


Gráfica 19. Dinámica estomática del tratamiento Plántula 2 Hojas Tapada de *Echeveria laui*. Estomas abiertos(%) en la hoja (rojo).

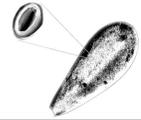
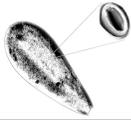


Gráfica 20. Dinámica estomática del tratamiento Plántula 2 Hojas Sin Tapar de *Echeveria laui*. Estomas abiertos(%) en la hoja (rojo).





Gráfica 21. Porcentajes de los estomas abiertos con respecto a la hoja de todos los tratamientos de *Echeverria laui*.



CUADROS.

Cuadro 1. Intensidad de luz a lo largo del experimento (valores promedio).

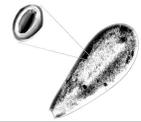
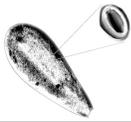
	INTENSIDAD DE LUZ
08:00	48.95
desviación estándar	26.84
12:00	335.14
desviación estándar	25.63
16:00	36.27
desviación estándar	18.73
20:00	6.74
desviación estándar	6.33
00:00	0.02
desviación estándar	0.002

Cuadro 2. Dinámica estomática de el tratamiento Adulta Tapada de *Echeveria laui*.

ADULTA TAPADA

	% ABIERTO-CERRADO HAZ		% ABIERTO-CERRADO ENVEZ		% ABIERTO-CERRADO HOJA	
08:00	26.89	73.11	31.69	68.31	28.48	71.52
Desv. Est.	17.87	17.87	14.22	14.22	11.09	11.09
12:00	31.90	68.10	39.36	60.64	34.82	65.18
Desv. Est.	17.64	17.64	30.52	30.52	22.94	22.94
16:00	53.38	46.62	69.15	30.85	58.91	41.09
Desv. Est.	8.73	8.73	3.45	3.45	4.68	4.68
20:00	33.30	66.70	49.38	50.62	39.28	60.72
Desv. Est.	7.58	7.58	23.16	23.16	13.20	13.20
00:00	36.65	63.35	49.03	50.97	41.04	58.96
Desv. Est.	19.90	19.90	30.72	30.72	23.28	23.28
04:00	35.89	64.11	48.46	51.54	41.95	58.05
Desv. Est.	21.66	21.66	13.02	13.02	14.04	14.04





Cuadro 3. Dinámica estomática de el tratamiento Adulta Sin Tapar de *Echeveria laui*.

ADULTA SIN TAPAR

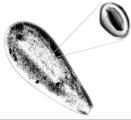
	% ABIERTO-CERRADO HAZ		% ABIERTO-CERRADO ENVEZ		% ABIERTO-CERRADO HOJA	
08:00	20.96	79.04	41.69	58.31	28.83	71.17
Desv. Est.	15.54	15.54	23.52	23.52	19.17	19.17
12:00	23.59	76.41	32.41	67.59	27.12	72.88
Desv. Est.	10.99	10.99	10.58	10.58	9.93	9.93
16:00	34.49	65.51	60.83	39.17	46.21	53.79
Desv. Est.	11.94	11.94	5.42	5.42	4.14	4.14
20:00	13.65	86.35	14.24	85.76	13.84	86.16
Desv. Est.	3.02	3.02	2.71	2.71	2.13	2.13
00:00	15.33	84.67	20.46	79.54	17.44	82.56
Desv. Est.	4.49	4.49	3.94	3.94	4.07	4.07
04:00	31.76	68.24	71.34	28.66	48.69	51.31
Desv. Est.	4.01	4.01	3.61	3.61	2.42	2.42

Cuadro 4. Dinámica estomática de el tratamiento Brote Mediano Tapado de *Echeveria laui*.

BROTE MEDIANO TAPADO

	% ABIERTO-CERRADO HAZ		% ABIERTO-CERRADO ENVEZ		% ABIERTO-CERRADO HOJA	
08:00	50.28	49.72	50.72	49.28	50.35	49.65
Desv. Est.	10.05	10.05	36.64	36.64	21.41	21.41
12:00	33.01	66.99	19.80	80.20	26.43	73.57
Desv. Est.	12.98	12.98	9.00	9.00	10.69	10.69
16:00	30.25	69.75	18.32	81.68	25.02	74.98
Desv. Est.	4.11	4.11	0.62	0.62	2.34	2.34
20:00	36.03	63.97	45.13	54.87	39.55	60.45
Desv. Est.	6.88	6.88	13.09	13.09	2.71	2.71
00:00	39.23	60.77	53.72	46.28	45.20	54.80
Desv. Est.	9.37	9.37	9.31	9.31	6.14	6.14
04:00	51.09	48.91	34.60	65.40	44.54	55.46
Desv. Est.	23.22	23.22	9.66	9.66	10.42	10.42





Cuadro 5. Dinámica estomática de el tratamiento Brote Mediano Sin Tapar de *Echeveria laui*.

BROTE MEDIANO SIN TAPAR

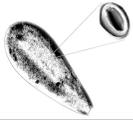
	% ABIERTO-CERRADO HAZ		% ABIERTO-CERRADO ENVEZ		% ABIERTO-CERRADO HOJA	
08:00	37.14	62.86	47.59	52.41	41.43	58.57
Desv. Est.	32.45	32.45	20.34	20.34	26.91	26.91
12:00	25.39	74.61	15.00	85.00	21.05	78.95
Desv. Est.	4.86	4.86	12.54	12.54	7.41	7.41
16:00	42.14	57.86	27.36	72.64	34.92	65.08
Desv. Est.	35.13	35.13	24.96	24.96	29.30	29.30
20:00	46.42	53.58	35.29	64.71	40.88	59.12
Desv. Est.	34.05	34.05	24.16	24.16	29.21	29.21
00:00	33.81	66.19	24.11	75.89	29.85	70.15
Desv. Est.	6.97	6.97	1.04	1.04	4.16	4.16
04:00	25.06	74.94	37.86	62.14	30.98	69.02
Desv. Est.	7.79	7.79	17.84	17.84	12.91	12.91

Cuadro 6. Dinámica estomática de el tratamiento Brote Chico Tapado de *Echeveria laui*.

BROTE CHICO TAPADO

	% ABIERTO-CERRADO HAZ		% ABIERTO-CERRADO ENVEZ		% ABIERTO-CERRADO HOJA	
08:00	57.13	42.87	44.25	55.75	52.08	47.92
Desv. Est.	11.68	11.68	8.44	8.44	9.18	9.18
12:00	31.12	68.88	26.32	73.68	29.26	70.74
Desv. Est.	17.37	17.37	11.21	11.21	14.74	14.74
16:00	38.36	61.64	29.43	70.57	35.17	64.83
Desv. Est.	24.98	24.98	18.76	18.76	18.34	18.34
20:00	46.41	53.59	35.50	64.50	42.00	58.00
Desv. Est.	7.92	7.92	16.47	16.47	10.00	10.00
00:00	26.88	73.12	22.57	77.43	25.40	74.60
Desv. Est.	9.75	9.75	14.26	14.26	7.71	7.71
04:00	47.16	52.84	47.86	52.14	47.48	52.52
Desv. Est.	7.33	7.33	2.38	2.38	3.77	3.77





Cuadro 7. Dinámica estomática de el tratamiento Brote Chico Sin Tapar de *Echeveria laui*.

BROTE CHICO SIN TAPAR

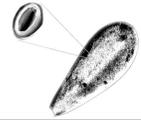
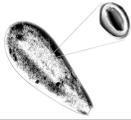
	% ABIERTO-CERRADO HAZ		% ABIERTO-CERRADO ENVEZ		% ABIERTO-CERRADO HOJA	
08:00	62.89	37.11	55.50	44.50	58.11	41.89
Desv. Est	12.86	12.86	16.63	16.63	13.85	13.85
12:00	36.18	63.82	36.89	63.11	37.28	62.72
Desv. Est	2.29	2.29	25.37	25.37	12.20	12.20
16:00	31.43	68.57	59.21	40.79	43.70	56.30
Desv. Est	19.20	19.20	11.44	11.44	15.17	15.17
20:00	29.97	70.03	43.39	56.61	36.41	63.59
Desv. Est	12.35	12.35	14.18	14.18	8.37	8.37
00:00	62.35	37.65	66.93	33.07	64.35	35.65
Desv. Est	11.07	11.07	22.79	22.79	14.81	14.81
04:00	71.13	28.87	65.65	34.35	68.77	31.23
Desv. Est	8.60	8.60	20.61	20.61	12.97	12.97

Cuadro 8. Dinámica estomática de el tratamiento Plántula 3 Hojas Tapada de *Echeveria laui*.

PLANTULA 3 HOJAS TAPADA

	% ABIERTO-CERRADO HAZ		% ABIERTO-CERRADO ENVEZ		% ABIERTO-CERRADO HOJA	
08:00	10.41	89.59	13.63	86.37	12.19	87.81
Desv. Est	1.66	1.66	10.20	10.20	5.11	5.11
12:00	36.65	63.35	44.25	55.75	39.59	60.41
Desv. Est	19.51	19.51	14.36	14.36	17.51	17.51
16:00	26.93	73.07	30.68	69.32	29.67	70.33
Desv. Est	19.98	19.98	8.19	8.19	12.68	12.68
20:00	8.84	91.16	14.05	85.95	11.25	88.75
Desv. Est	7.12	7.12	12.31	12.31	7.39	7.39
00:00	6.95	93.05	8.49	91.51	7.52	92.48
Desv. Est	0.91	0.91	12.90	12.90	5.39	5.39
04:00	23.94	76.06	23.33	76.67	23.24	76.76
Desv. Est	17.89	17.89	11.21	11.21	11.95	11.95





Cuadro 9. Dinámica estomática de el tratamiento Plántula 3 Hojas Sin Tapar de *Echeveria laui*.

PLANTULA 3 HOJAS SIN TAPAR

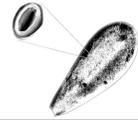
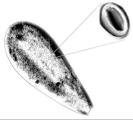
	% ABIERTO-CERRADO HAZ		% ABIERTO-CERRADO ENVEZ		% ABIERTO-CERRADO HOJA	
08:00	34.30	65.70	27.18	72.82	31.00	69.00
Desv. Est.	30.09	30.09	20.86	20.86	25.54	25.54
12:00	35.74	64.26	48.74	51.26	40.98	59.02
Desv. Est.	26.94	26.94	19.04	19.04	22.77	22.77
16:00	37.83	62.17	31.76	68.24	29.10	70.90
Desv. Est.	37.20	37.20	5.09	5.09	15.99	15.99
20:00	30.43	69.57	22.57	77.43	26.94	73.06
Desv. Est.	13.89	13.89	23.37	23.37	10.70	10.70
00:00	35.00	65.00	35.39	64.61	35.04	64.96
Desv. Est.	24.78	24.78	16.63	16.63	20.62	20.62
04:00	17.15	82.85	18.84	81.16	17.85	82.15
Desv. Est.	14.62	14.62	13.54	13.54	14.24	14.24

Cuadro 10. Dinámica estomática de el tratamiento Plántula 2 Hojas Tapada de *Echeveria laui*.

PLANTULA 2 HOJAS TAPADA

	% ABIERTO-CERRADO HAZ		% ABIERTO-CERRADO ENVEZ		% ABIERTO-CERRADO HOJA	
08:00	44.04	55.96	26.15	73.85	34.18	65.82
Desv. Est.	8.55	8.55	14.05	14.05	12.66	12.66
12:00	36.46	63.54	35.67	64.33	36.14	63.86
Desv. Est.	10.76	10.76	8.25	8.25	8.98	8.98
16:00	31.19	68.81	22.76	77.24	27.78	72.22
Desv. Est.	7.23	7.23	17.44	17.44	10.63	10.63
20:00	63.85	36.15	66.37	33.63	64.24	35.76
Desv. Est.	14.04	14.04	12.26	12.26	5.44	5.44
00:00	52.77	47.23	45.85	54.15	49.25	50.75
Desv. Est.	16.60	16.60	15.97	15.97	15.61	15.61
04:00	44.11	55.89	43.72	56.28	43.88	56.12
Desv. Est.	20.85	20.85	1.26	1.26	10.36	10.36



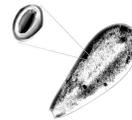


Cuadro 11. Dinámica estomática de el tratamiento Plántula 2 Hojas Sin Tapar de *Echeveria laui*.

PLANTULA 2 HOJAS SIN TAPAR

	% ABIERTO-CERRADO HAZ		% ABIERTO-CERRADO ENVEZ		% ABIERTO-CERRADO HOJA	
08:00	40.73	59.27	38.45	61.55	40.50	59.50
Desv. Est.	20.77	20.77	3.46	3.46	10.44	10.44
12:00	31.37	68.63	42.54	57.46	36.34	63.66
Desv. Est.	11.04	11.04	25.33	25.33	13.14	13.14
16:00	51.23	48.77	43.62	56.38	47.27	52.73
Desv. Est.	14.37	14.37	9.19	9.19	11.16	11.16
20:00	40.56	59.44	46.36	53.64	43.39	56.61
Desv. Est.	17.17	17.17	8.80	8.80	12.56	12.56
00:00	58.80	41.20	58.79	41.21	58.47	41.53
Desv. Est.	18.61	18.61	7.84	7.84	12.65	12.65
04:00	40.81	59.19	51.45	48.55	47.39	52.61
Desv. Est.	15.92	15.92	7.50	7.50	9.36	9.36





Cuadro 12. Análisis de la cera de hojas de *Echeveria laui* utilizando Emisión de Rayos X por Energía Dispersiva (SEM/RX).



Project: cera
 Owner: INCA Operator
 Site: Site of Interest 5

Sample: cera
 Type: Default

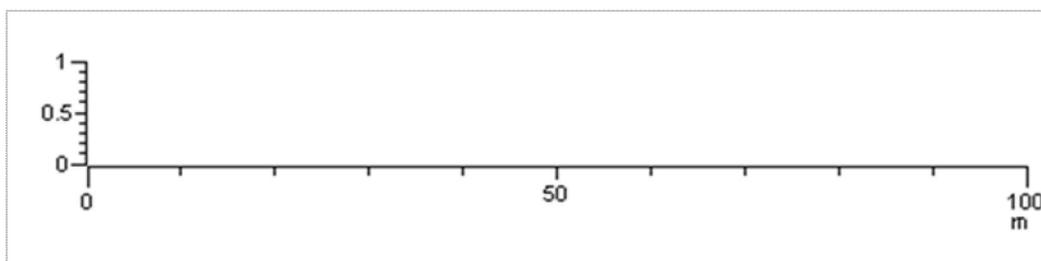
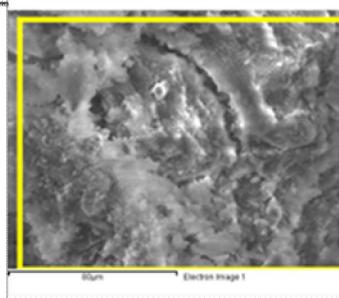
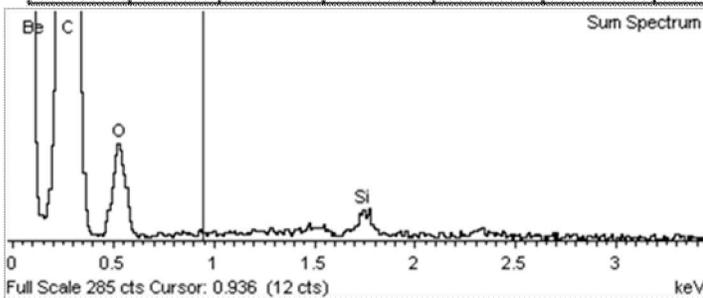
Comment:

Spectrum processing :
 Peak possibly omitted : 4.512 keV

Processing option : Oxygen by stoichiometry (Normalised)
 Number of ions calculation based on 8.00 anions per formula
 Number of iterations = 3

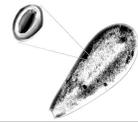
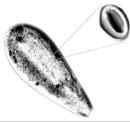
Standard :
 C CaCO3 1-Jun-1999 12:00 AM
 Si SiO2 1-Jun-1999 12:00 AM

Element	App	Intensity	Weight%	Weight%	Atomic%	Compd%	Formula	Number	
	Conc.	Conn.		Sigma				of ions	
CK	224.04	1.1666	27.20	0.32	33.25	99.66	CO2	3.99	
Si K	1.04	0.9333	0.16	0.02	0.08	0.34	SiO2	0.01	
O			72.64	0.32	66.67			8.00	
Totals			100.00						
							Cation sum	1.00	



Signature _____





Cuadro 13. Análisis de cristales de *Echeveria laui* utilizando Emisión de Rayos X por Energía Dispersiva (SEMEX).



Project: cristal
 Owner: INCA Operator
 Site: Site of Interest 4

Sample: cristal
 Type: Default
 ID: cristal

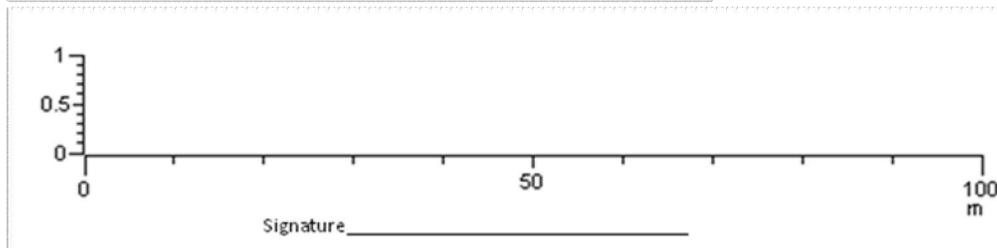
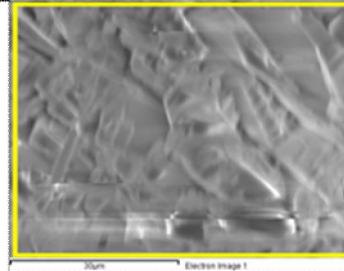
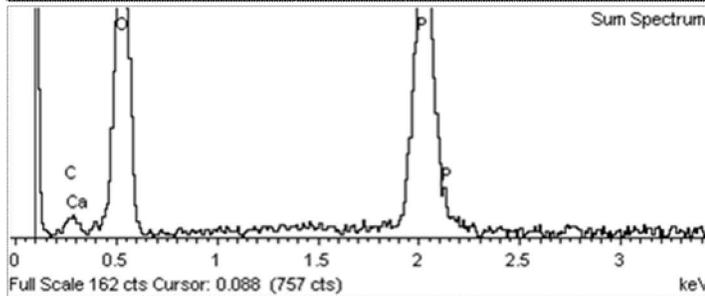
Comment:

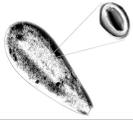
Spectrum processing :
 No peaks omitted

Processing option : Oxygen by stoichiometry (Normalised)
 Number of ions calculation based on 8.00 anions per formula
 Number of iterations = 3

Standard :
 C CaCO₃ 1-Jun-1999 12:00 AM
 P GaP 1-Jun-1999 12:00 AM
 Ca Wollastonite 1-Jun-1999 12:00 AM

Element	App	Intensity	Weight%	Weight%	Atomic%	Compd%	Formula	Number	
	Conc.	Com.		Sigma				of ions	
CK	1.89	0.4920	5.92	1.34	10.21	21.69	CO ₂	1.28	
PK	16.43	1.4219	17.81	0.78	11.91	40.81	P ₂ O ₅	1.49	
CaK	17.36	0.9981	26.81	1.02	13.85	37.51	CaO	1.73	
O			49.47	1.55	64.03			8.00	
Totals			100.00						
							Cation sum	4.49	

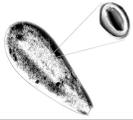




BIBLIOGRAFIA

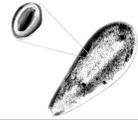
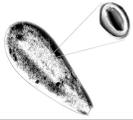
- Acevedo, E., Badilla, I., Nobel, P. S. 1983. Water relations, diurnal acidity changes, and productivity of a cultivated cactus, *Opuntia ficus indica*. *Plant Physiology*. 72: 775-780.
- Acosta, C. S. 2002. Plantas vasculares raras, amenazadas o en peligro de extinción del Estado de Oaxaca, un panorama preliminar. *Polibotanica*. pp: 47-82
- Altesor, A., Ezcurra, E., Silva, C. 1992. Changes in the photosynthetic metabolism during the early ontogeny of four cactus species. *Acta Oecologica*. 13: 777-785.
- Andrade, J. L., De la Barrera, E., Reyes-García, C., Ricalde, M. F., Vargas-Soto, G., Cervera, J. C. 2007. El Metabolismo Ácido de las Crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y Productividad. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 81: 37-51.
- Andrade, J. L., Graham, E. A., Zotz, G. 2004. Determinantes morfofisiológicos y ambientales de la distribución de epifitas en el dosel de bosques tropicales. En: Marino-Cabrera, H. Ed. *Fisiología Ecológica de Plantas, Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas*. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso, Chile. pp: 139-156.
- Anicua, F. J., Rivas, B. R. 2000. Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de cactáceas endémicas y amenazadas o en peligro de extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México.
- Araujo, J. C., Téran, F. C., Oliveira, R. A., Nour, E. A. A., Montenegro, M. A. P., Campos, J. R., Vazoller, R. F. 2003. Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge. *Journal of Electron Microscopy*. 52(4): 429-433.





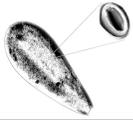
-
- Arias, A., Valverde, T., Reyes, J. 2001. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT. México, D.F.
 - Ayala-Cordero, G., Terrazas, T., López-Mata, L., Trejo, C. 2006. Morpho-anatomical changes and photosynthetic metabolism of *Stenocereus beneckeii* seedlings under soil water deficit. *Journal of Experimental Botany*. 57: 3165-3174.
 - Barker, D. H., Adams III, W. W. 1997. The xanthophyll cycle and energy dissipation in differently oriented faces of the cactus *Opuntia macrorhiza*. *Oecologia*. 109: 353-361.
 - Benzing, D. H. 1990. Vascular Epiphytes. Cambridge University Press, Cambridge.
 - Bidwell, R. G. S. 1983. Fisiología Vegetal. Ed. AGT. pp. 273-288
 - Black, C. C. 1973. Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO₂ uptake. *Annual Review of Plant Physiology*. 24: 253-286.
 - Borland, A. M., Griffiths, H. 1990. The regulation of CAM and respiratory recycling by water supply and light time in the C3-CAM intermediate *Sedum telephium*. *Function Ecol*. 4: 33-39
 - Borland, A. M., Griffiths, H. 1992. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and carbohydrate accumulation in the C3-CAM intermediate *Sedum telephium* L. grown under different light and watering regimes. *Journal of Experimental Botany*. 43: 353-361.
 - Bray, D. F., Bagu, J., Koegler, P. 1993. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical point drying methods for scanning electron microscopy or biological specimens. *Microsc. Res. Tech*. 26: 489-495.





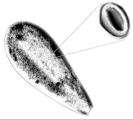
-
- Cervantes, S. E., Graham, E. A., Andrade, J. L. 2005. Light microhabitats, growth and photosynthesis of an epiphytic bromeliad in a tropical dry forest. *Plant Ecology*. 179: 107-118.
 - Cervera, J. C., Andrade, J. L., Simá, J. L., Graham, E. A. 2006. Microhabitats, germination, and establishment for *Mammillaria gaumeri* (Cactaceae), a rare species from Yucatan. *International Journal of Plant Sciences*. 167: 311-319.
 - Challenger, A. 1998. Utilización y Conservación de los Ecosistemas Terrestres de México. Pasado, Presente y Futuro. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F.
 - Cheng, H. S., Edwards, E. G. 1991. Influence of long photoperiods on plant development and expression of Crassulacean Acid Metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant, cell and environment*. 14: 271-278.
 - Croxdale, J. 2000. Stomatal patterning in angiosperms. *American Journal of Botany*. 87 (8): 1069-1080.
 - Cushman, J. C. 2001. Crassulacean acid metabolism. A Plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiology*. 127: 1439-1448.
 - De Mattos, E. A., Herzog, B., y Lüttge, U. 1999. Chlorophyll fluorescence during CAM-phases in *Clusia minor* L. under drought stress. *Journal of Experimental Botany*. 50: 253-261.
 - Dood, A. N., Borland, A. M., Haslam, R. P., Griffiths, H., Maxwell, K. 2002. Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *Journal of Experimental Botany*. 53: 569-580.





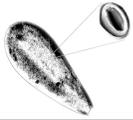
-
- Ebercon, A., Blum, A., Jordan, W. R. 1977. A rapid colorimetric method for epicuticular wax content of sorghum leaves. *Crop Science*. 17: 179-180.
 - Esau, K. 1976. *Anatomía Vegetal*. Ed. Omega. Barcelona, España. 779 pp.
 - Fay, M. F., Gratton, J. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report of micropropagation at kew. *Bradleya*. 10: 33-48.
 - Fichas Internacionales de Seguridad Química. Consultadas en 2009. En: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/501a600/nspn0528.pdf>.
 - Franco, A. C., Nobel, P. S. 1989. Effect of nurse plants on the microhabitat and growth of cacti. *Journal of Ecology*. 77: 870-886.
 - Fryns-Classens, Cotthem, W. R. J. 1973. A New Classification of the ontogenetic Types of Stomata. *Bot. Rev.* 39: 71-138.
 - García, E. 1973. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köeppen*. Segunda edición, Instituto de Geografía, UNAM. México, D.F.
 - García de Cortázar, V., Nobel, P. S. 1986. Modeling of PAR interception and productivity of a prickly pear cactus *Opuntia ficus indica* L., at various spacings. *Agronomy Journal*. 78: 80-85.
 - García-Mendoza, A., Galván, V. R. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 56: 7-24.





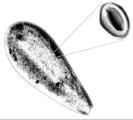
-
- Garrido, G. M. 1998. Evaluación del metabolismo ácido de las crasuláceas en tres especies de cactáceas cultivadas *in vitro* y durante su aclimatación a suelo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 124pp.
 - Gibson, A. C., Nobel, P. S. 1986. The cactus primer. Cambridge, M. A: Harvard University Press.
 - Gibson, M. 1982. The anatomy of succulence. En: Ting, P., Gibbs, M. (eds.). Crassulacean acid metabolism. Proceedings of the fifth annual symposium in Botany. Waverly Press. Baltimore.
 - Godínez-Alvarez, H., Valiente-Banuet, A. 1998. Germination and early seedling growth of Tehuacan Valley cactus species: the role of soils and seed ingestion by dispersers on seedlings growth. Journal of Arid Environments. 39:21-31.
 - González, Z. O. 2007. Las crasuláceas cubiertas de cera. Boletín SUCCUS. Boletín de difusión de la Sociedad Mexicana de Cactología, A. C. 3 (2): 7
 - Graham, E. A., Andrade, J. L. 2004. Drought tolerance associated with vertical stratification of two co-occurring epiphytic bromeliads in a tropical dry forest. American Journal of Botany. 91: 699-706.
 - Griffiths, H. 1989. Carbon dioxide concentrating mechanisms and the evolution of CAM in vascular epiphytes. En: Lüttge, U. Ed. Vascular Plants as Epiphytes: Evolution and Ecophysiology. Springer, Nueva York.
 - Griffiths, H., Smith, J. A. C. 1983. Photosynthetic pathways in the Bromeliaceae of Trinidad: relations between life-forms, habitat preference and the occurrence of CAM. Oecologia. 60: 176-184.





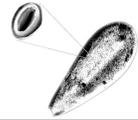
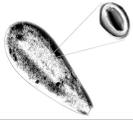
-
- Guralnick, L. J., Jackson, M. D. 2001. The occurrence and phylogenetics of crassulacean acid metabolism in the Portulacaceae. *International Journal of Plant Sciences*. 162: 257-262.
 - Guralnick, L. J., Ting, I. P., Lord, E. M. 1986. Crassulacean acid metabolism in the Gesneriaceae. *Amer. J. Bot.* 73 (3): 336-345.
 - Harris, F. S., Eloise, M., Carter, B., Martin, C. E. 1993. Relationship between ploidal level and CAM in five species of *Talinum* (Portulacaceae). *American Journal of Botany*. 80: 533-536.
 - Hartsock, T., Nobel, P. S. 1976. Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake. *Nature*. 262: 574-576.
 - Hernández, H. M., Godinez-Álvarez, H. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26: 33-52.
 - Hernández-González, O., Briones-Villareal, O. 2007. Crassulacean Acid Metabolism Photosynthesis in columnar cactus seedlings during ontogeny: the effect of light on nocturnal acidity accumulation and chlorophyll fluorescence. *American Journal of Botany*. 94 (8): 1344-1351.
 - Hohorst, H. J. 1965. L (-)-malate, determination with malate dehydrogenase and DPN. En: Bergmeyer, H. U. (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, Londres. pp: 328-334.
 - Holtum, J. A. M. 2002. Crassulacean acid metabolism: plasticity in expression, complexity of control. *Functional Plant Biology*. 29: 657-661.





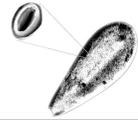
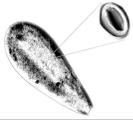
-
- Holtum, J. A. M., Aranda, J., Virgo, A., Gehring, H. H., Winter, K. 2004. $\delta^{13}\text{C}$ values and crassulacean acid metabolism in *Clusia* species from Panama. *Trees*. 18: 658-668.
 - Iler, R. K. 1979. *The chemistry of silica*. Plenum Press. New York.
 - Inglese, P., Israel, A. A., Nobel, P. S. 1994. Growth and CO_2 uptake for cladodes and fruit of the Crassulacean acid metabolism species *Opuntia ficus-indica* during fruit development. *Physiologia Plantarum*. 91: 708-714.
 - Keeley, J. E. 1998. CAM photosynthesis in submerged aquatic plants. *Botanical Review*. 64: 121-175.
 - Keeley, J. E., Rundel, P. W. 2003. Evolution of CAM and C_4 carbon-concentrating mechanisms. *International Journal of Plants Sciences*. 164: S55-S57.
 - Keiller, D. R., Scolombe, S. P., Cockburn, W. 1994. Analysis of chlorophyll a fluorescence in C_3 and CAM forms of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of Experimental Botany*. 45: 325-334.
 - Kluge, M., Bohlke, Ch., Queiroz, O. 1981. Crassulacean acid metabolism (CAM) in *Kalanchoë*: changes in intercellular CO_2 concentration during a normal CAM cycle and during cycles in continuous light or darkness. *Planta*. 152: 87-92.
 - Kluge, M., Brulfert, J. 1996. Crassulacean acid metabolism in the genus *Kalanchoë* ecological, physiological and biochemical aspects. En: Winter, K., Smith, J. A. C. (eds.), *Crassulacean acid metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp: 324-335.





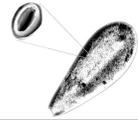
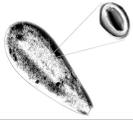
-
- Kluge, M., Fischer, A., Buchanan-Bolling, C. I. 1982. Metabolic control of CAM. En: Ting, P., Gibbs, M. (eds.). 1982. Crassulacean acid metabolism. Proceedings of the fifth annual symposium in Botany. Waverly Press. Baltimore.
 - Kluge, M., Ting, I. P. 1978. Crassulacean acid metabolism analysis of an ecological adaptation. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 209 pp.
 - Kunst, L., Samuels, A. L. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progr. Lipid Res.* 42: 51-80.
 - Lambers, H., Chapin III, F. S., Pons, T. L. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer, Nueva York.
 - Larcher, W. 2003. *Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. Springer, Berlín.
 - Larson, J. 1992. Estudio demográfico de *Echeveria gibbiflora* DC (Crasulaceae) en el Pedregal de San Angel. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F.
 - Lee, H. S. J., Griffiths, H. 1987. Induction and repression of CAM in *Sedum telephium* L. in response to photoperiod and water stress. *Journal of Experimental Botany.* 38: 834-841.
 - Loza-Cornejo, S., Terrazas, T., López-Mata, L., Trejo, C. 2003. Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae): su significado adaptativo. *Interciencia.* 28:83-89.





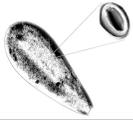
-
- Lüttge, U. 2002. CO₂-concentrating: consequences in crassulacean acid metabolism. *Journal of Experimental Botany*. 53: 2131-2142.
 - Lüttge, U. 2004. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany*. 93: 629-652.
 - Lüttge, U. 2006. Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. *New Phytologist*. 171: 7-25.
 - Mandujano, P. M. 1988. Respuesta fotosintética (Metabolismo Ácido de las Crasulaceas) en *Escontria chiotilla* (Weber) Rose en ambiente controlado. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 51 pp.
 - Martin, C. E., Wallace, R. S. 2000. Photosynthetic pathway variation in leafy members of two subfamilies of the Cactaceae. *International Journal Plant Sciences*. 161: 639-650.
 - Martin, E. S., Donkin, M. E., Stevens, R. A. 1983. Stomata. En: Arnold, E. (ed.). *Studies in Biology*. No. 155 Londres.
 - Martínez, M. D. 1987. Fluctuación fotosintética de *Escontria chiotilla* (Weber) Rose, en la localidad de Coxcatlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
 - Medina, E. 1977. Introducción a la Ecofisiología vegetal. Dpto. de Asuntos Científicos de la Sría. General de la O. E. A. Washington, D.C.
 - Medina, E., Olivares, E., Díaz, M., Van der Merwe, N. 1989. Metabolismo ácido de Crasuláceas en bosques húmedos tropicales. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Gardern*. USA. 27: 56-67.





-
- Méndez, M., Dorantes, A., Dzib, G., Argáez, J., Durán, R. 2006. Germinación y establecimiento de plántulas de *Pterocereus gaumeri*, una cactácea columnar, rara y endémica de Yucatán, México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 79: 33-41.
 - Metcalfe, C. R., Chalk, L. 1950. Anatomy of Monocotyledons II. Clarendon Press Oxford.
 - Min-Wha, J., Mohammad, B. A., Eun-Joo, H., Kee-Yoeup, P. 2005. Effects of photon flux density on the morphology, photosynthesis and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during post-micropropagation acclimatization. Plant Growth Regulation. 45: 139-147.
 - Miszalski, Z., Niewiadomska, E., Slesak, I., Lüttge, U., Kluge, M., Ratajczak, R. 2001. The effect of irradiance on carboxylation/decarboxylating enzymes and fumarase activities in *Mesembryanthemum crystallinum* L. exposed to salinity stress. Plant Biology. 3: 17-23.
 - Mittermeier, R. A., Goettsch, de M. C. 1992. La Importancia de la Diversidad Biológica en México. En: Sarukhán, J., Dirzo, R. (eds.) México Ante los Retos de la Diversidad. CONABIO. México. pp: 63-73.
 - Monson, R. 1989. On the evolutionary pathways resulting in C₄ photosynthesis and Crassulacean Acid Metabolism (CAM). Adv. Ecol. Res 19: 58-100
 - Moore, P. 1981. The varied way plantas, Taps. New Scientist 12: 394-397.
 - Morales, E., Reyes, J., López, L. 1999. Contribución al conocimiento de *Echeveria laui*, Morán y Meyrán (Crassulaceae), especie en peligro de extinción. En: Resúmenes del II

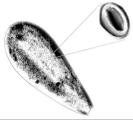




Congreso Mexicano y I Congreso Latinoamericano y del Caribe, Cactáceas y otras plantas
suculentas. Sociedad Mexicana de Cactología. Oaxaca, Oaxaca. México. pp: 100.

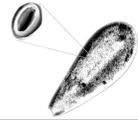
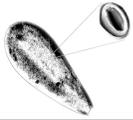
- Nation, J. L. 1983. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technol.* 58: 347-351.
- Nobel, P. S. 1988. *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Cambridge University Press, New York, New York.
- Nobel, P. S. 1991. Achievable productivities of certain CAM plants: basis for high values compared with C₃ and C₄ plants. *New Phytologist*. 119: 183-205.
- Nobel, P. S., De la Barrera, E. 2002. High temperatures and net CO₂ uptake, growth, and stem damage for the hemiepiphytic cactus *Hylocereus undatus*. *Biotropica*. 34: 225-231.
- Nobel, P. S., Hartsock, T. L. 1983. Relationships between photosynthetically active radiation, nocturnal acid accumulation, and CO₂ uptake for a crassulacean acid metabolism plant, *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiology* 71: 71-75.
- Nobel, P. S., Hartsock, T. L. 1987. Drought-induced shifts in daily CO₂ uptake patterns for leafy cacti. *Physiol. Plantarum*. 70: 114-118.
- Nobel, P. S., Hartsock, T. L. 1990. Diel patterns of CO₂ exchange for epiphytic acid differing in succulence. *Physiologia plantarum*. 78: 628-634.
- Osmond, C. B. 1978. Crassulacean Acid Metabolism: a curiosity in context. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29: 379-414.





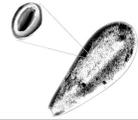
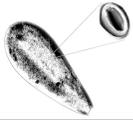
-
- Osmond, C. B., Adams III, W. W., Smith, S. D. 1994. Crassulacean acid metabolism. En: Peracy, R. W., Ehleringer, J., Mooney, H. A., Rundel, P. W. (eds.). Plant Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation, Chapman y Hall. Londres. pp: 225-280.
 - Osmond, C. B., Bjorkman, O., Anderson, D. J. 1980. Physiological processes in plant ecology. Toward a synthesis with *Atriplex*. Springer Verlag, Berlin, Germany. 468 pp.
 - Osmond, C. B., Holtum, J. A. M. 1981, Crassulacean acid metabolism. En: The Biochemistry of plant: A Comprehensive. Treactise , ed. Hatch, N. K., Boardman, N. K. London/New York: Academic 8: 283-328.
 - O'toole, J. C., Cruz, R. T., Seiber, J. B. 1979. Epicuticular wax and cuticular resistance in rice. *Physiology Plantarum*. 47: 239-244.
 - Parés-Martínez, J., Arizaleta, M., Sanabria, M. E., Brito, L. 2004. Características de los estomas, densidad e índice estomático y su variación en función a la injertación en *Annona muricata* L. y *A. montana* MADFAC. *Bioagro*. 16 (3): 213-218.
 - Patel, A., Ting, I. P. 1987. The relationship between respiration and CAM-cycling in *Peperomia campotricha*. *Plant physiol*. 84: 640-642.
 - Pérez, C. J. 2007. *Echeveria laui* a treinta años de su descubrimiento. Conservación y Cultivo. *Boletín SUCCUS*. Boletín de difusión de la Sociedad Mexicana de Cactología, A. C. 3 (2): 13
 - Perry, C. C., Keeling-Tucker, T. 2000. *J. Biol. Inorg. Chem*. 5: 537.
 - Perry, C. C., Keeling-Tucker, T. 2003. Model studies of colloidal silica precipitation using biosilica extracts from *Equisetum telmateia*. *Colloid Polym Sci*. 281: 652-663.





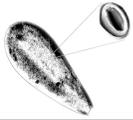
-
- Pimienta-Barrios, E., Zañudo, J., Yopez, E., Nobel, P. S. 1998. Vegetative, reproductive, and physiological adaptations to aridity of pitayo (*Stenocereus queretaroensis*, Cactaceae). *Economic Botany* 52, 401-411.
 - Piña, P. P. 2003. Propagación de *Echeveria laui* Moran & Meyrán (CRASSULACEAE) con fines de conservación y reintroducción. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 75pp.
 - Piña-Poujol, P., Valverde, T., Reyes-Santiago, J. 2007. Propagación de la especie en peligro de extinción *Echeveria laui* con fines de conservación. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 52 (1): 4-19.
 - Polis, G. A. 1991. Desert communities: An overview of patterns and process. En: Polis, G. A., (ed.). *The Ecology of Desert Communities*. The University of Arizona Press. Tucson.
 - Prece, J. E., Sutter, E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P. C., Zimmerman, R. M. (eds.). *Micropropagation. Technology and Application* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp: 71-93.
 - Queiroz, O., Brulfert, J. 1982. Photoperiod-Controlled Induction and Enhancement of seasonal adaptation to drought. En: Ting, P. I., Gibbs, M. (eds.). *Crassulacean Acid Metabolism*. Rockville. Am. Soc. Plant Physiol. pp: 208-230.
 - Ramírez, M. R. 1999. Los recursos forestales no maderables de México una revisión. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F.





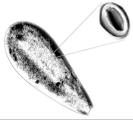
-
- Raven, J. A., Spicer, R. A. 1996. The evolution of crassulacean acid metabolism. En: Winter, K., Smith, J. A. C. (eds.) Crassulacean Acid Metabolism. Biochemistry, Ecophysiology and Evolution, Springer, Nueva York.
 - Rayder, L., Ting, I. P. 1981. Carbon metabolism in two species of *Pereskia* (Cactaceae). Plant Physiol. 68: 139-142.
 - Reyes, S. J., Brachet, I. C., Pérez, C. J., Gutiérrez de la Rosa, A. 2004. Cactáceas y Otras Plantas nativas de la cañada Cuicatlán, Oaxaca. Ed. Soc. Mex. De Cact. A. C. México. pp. 196.
 - Roberts, A., Borland, A. M., Griffiths, H. 1997. Discrimination processes and shifts in carboxylation during the phases of crassulacean acid metabolism. Plant Physiology. 113: 1283-1292.
 - Rojas-Aréchiga, M., Vázquez-Yanes, C. 2000. Cactus seed germination: a review. Journal of Arid Environments. 44: 85-104.
 - Rubino, P., Tarantino, E., Rega, F. 1989. Relationship between soil water status and Stomatal resistance of tomatoes. Irrigacion e Drenaggio. 36: 95-98.
 - Ruiz, M., Nieto, D., Larios, I. 1962. Tratado elemental de botánica. Séptima edición. Editorial E. C. L. A. México. 730pp.
 - Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México, D.F.
 - Sánchez, M., Aguirreolea, J. 1996. Relaciones hídricas. En: Azcon-Bieto, J., Talon, M. (eds.). Fisiología y Bioquímica vegetal. Edigrafos Madrid. España. pp: 49-90.





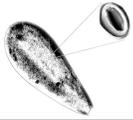
-
- Schmidt, G., Stuntz, S., Zotz, G. 2001. Plant size-an ignored parameter in epiphyte ecophysiology? *Plant Ecology*. 153: 65-72.
 - SEMARNAT. 2001. NOM-059-ECOL-2001. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. México.
 - Silva, H., Acevedo, E. 1995. Eficiencia en el uso de agua en diez taxa de *Opuntia* introducidas en la región árida mediterránea de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*. 68: 271-282.
 - Silva, H., Acevedo, E., Silva, P. 2001. Anatomía del tejido fotosintético de diez taxa de *Opuntia* establecidos en el secano árido mediterráneo de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 74 (2): 341-351.
 - Smith, J. A. C., Winter, K. 1996. Taxonomic distribution of crassulacean acid metabolism. En: Winter, K., Smith, J. A. C. (eds.) *Crassulacean Acid Metabolism. Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*. Springer, Berlín. pp: 427-436.
 - Squeo, F. A., Ehleringer, J. 2004. Isótopos estables: una herramienta común para la ecofisiología vegetal y animal. En: Cabrera, H. M. (ed.). *Fisiología Ecológica de Plantas. Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas*. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso. pp: 59-80.
 - Szarek, S. R., Ting, I. P. 1975. Physiological Response to Rainfall in *Opuntia basilaris* (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 62 (6): 602-609.
 - Szarek, S., Johnson, H., Ting, I. P. 1973. Drought adaptation in *Opuntia basilaris*. Significance of recycling carbon through crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol.* 52: 539-541.





-
- Taiz, L., Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
 - Takur, P. 1990. Different physiological response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivars to drought. Acta Physiologiae Plantarum. 12: 175-182.
 - Tejero, D. J., Aguilar, R. S., Granillo, V. M., Pozos, B. G., Rico, M. R., Abundiz, B. L. 1998. Plantae. Introducción al estudio de las plantas con embrión. Universidad Nacional Autónoma de México. Escuela Nacional de Estudios Superiores Iztacala. México. pp: 281.
 - Ting, I. P. 1985. Crassulacean Acid Metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 86: 595-622.
 - Ting, I. P., Szarek, S. R. 1975. Drought adaptation in crassulacean acid metabolism plants. En: Halley, N. (ed.). Environmental physiology of desert organisms. Springer-Verlag, Berlín, Germany. pp: 1-358
 - Ting, P. I., Gibbs, M. 1982. Crassulacean Acid Metabolism. Proceedings of the fifth annual Symposium in Botany. Waverly Press. California.
 - Ting, P. I., Rayder, L. 1985. Regulation of C₃ to CAM shifts. En: Ting, P., Gibbs, M. (eds.). Crassulacean acid metabolism. Proceedings of the fifth annual symposium in Botany. Waverly, Press. California. pp: 193-209.
 - Toledo, V. M., Carabias, J., Toledo, C., González-Pacheco, C. 1989. La producción rural de México: alternativas ecológicas. Fundación Universo XXI. México, D.F.
 - Toledo, V. M., Ordoñez, M. J. 1998. El panorama de la biodiversidad de México: una revisión de los hábitats terrestres. En: Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A., Fa, J.

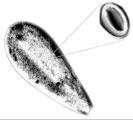




(compiladores). Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp: 751-754.

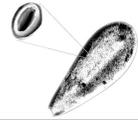
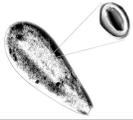
- Ulrich, L., Nobel, P. S. 1984. Day-Night variation in Malate concentration, osmotic pressure and hydrostatic pressure in *Cereus validus*. *Plant Physiol.* 75: 807-840.
- Upadhayaya, M. K., Furness, N. H. 1994. Influence of light intensity and water stress on leaf surface characteristics of *Cynoglossum officinale*, *Centaurea* spp. and *Tragopogon* spp. *Canadian Journal of Botany.* 72: 1379-1386.
- Valla, J. J. 2007. Botánica. Morfología de las plantas superiores. Buenos Aires: Hemisferio sur. pp. 352.
- Vázquez-Yanes, C. 1997. Extraordinarias administradoras de agua. En: Valles-Septién, C., Rodríguez-Pérez, L. (eds.) *Suculentas mexicanas: cactáceas*. México, DF: CONABIO-CVC Publicaciones. pp: 49-53.
- Verastegui, V. M. 2009. Establecimiento de Métodos de Propagación Vegetativa *in vivo* e *in vitro* de *Echeveria laui* (CRASSULACEAE). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México (en impresión).
- Vrieling, E. G., Beelen, T. P. M., van Santen, R. A., Gieskes, W. W. C. 1999. *Biotechnol.* 70: 39.
- Vovides, A. P., Luna, V., Medina, G. 1997. Relación de algunas plantas y hongos mexicanos raros, amenazados o en peligro de extinción y sugerencias para su conservación. *Acta Botánica Mexicana.* 39: 1-42.





-
- Vovides, A., Medina, G. 1994. Relación de plantas mexicanas amenazadas de extinción. En: Flores-Villela, O., Gerez, P. Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso del suelo. Conabio/UNAM, México.
 - Walther, E. 1972. *Echeveria*. California Academy of Sciences. San Francisco, USA.
 - Wen, H., Wagner, J., Larcher, W. 1997. Growth and nocturnal acid accumulation during early ontogeny of *Agave attenuate* grown in nutrient solution and in vitro culture. *Biologia Plantarum*. 39: 1-11.
 - White, A. J., Critchley, C. 1999. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research*. 59: 63-72.
 - Wilkinson, H. P. 1979. The Plant Surface (Mainly Leaf. En: Metcalfe, C. R., Chalk, L. (eds.). *Anatomy of the Dicotyledons*. Second Edition. Ed. Clarendon Press-Oxford, New York. pp: 97-117.
 - Winter, K. 1985. Crassulacean acid metabolism. En: Barber, J., Baker, N. R. (eds.). *Photosynthetic mechanisms and environment*. Capítulo 8. Elsevier Publishers B. V. (Biomedical Division). pp: 299-387.
 - Winter, K., Schroppe-Meier, G., Caldwell, M. M. 1986. Respiratory CO₂ as carbon source for nocturnal acid synthesis at high temperature in three species exhibiting Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Physiol*. 81: 390-394.
 - Winter, K., Smith, J. A. C. 1996. An introduction to crassulacean acid metabolism: Biochemical principles and biological diversity. En: Winter, K., Smith, J. A. C. (eds.) *Crassulacean Acid Metabolism*. Biochemistry, Ecophysiology and Evolution, Springer-Verlag, Berlín, Germany. pp: 1-13.



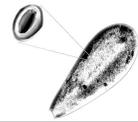


-
- Winter, K., Ziegler, H. 1992. Induction of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* increases reproductive success conditions of drought and salinity stress. *Oecologia*. 92: 475-479.

 - Wojciechowicz, M. K., Kazimierczak-Grygiel, E., Olejnik, S., Zenkteler, E. 2001. Plant regeneration from leaf explants of *Adromischus nussbaumerianus* Poelln and *Echeveria laui* Moran et Meyran. *Biological Bulletin of Poznan*. 38 (1): 71-78.

 - Zotz, G. 2002. Categories and CAM-blurring divisions, increasing understanding? *New Phytologist*. 156: 4-8.

 - Zotz, G., Hietz, P. 2001. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *Journal of Experimental Botany*. 52: 2067-2078.



ABREVIATURAS.

MAC	Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (por sus siglas en inglés).
C ₃	Tipo de fotosíntesis en donde la captación de CO ₂ produce un compuesto de tres carbonos.
C ₄	Tipo de fotosíntesis en donde la captación de CO ₂ produce un compuesto de cuatro carbonos.
CO ₂	Dióxido de carbono.
PEP-C	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (por sus siglas en inglés).
F. A. A.	Fijador (Formaldehído-Ácido acético-Alcohol).
I. E.	Índice Estomático.
D. E.	Densidad Estomática.
Å	Ångström.
HMDS	Hexametildisilazano.
SEMRX	Emisión de Rayos X por Energía Dispersiva.