



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“EVIDENCIAS DEL METABOLISMO ÁCIDO DE LAS
CRASULÁCEAS EN *Pinguicula moranensis* VAR.
NEOVOLCÁNICA, ZAMUDIO, *Pinguicula acuminata*,
BENTH Y *Pinguicula crassifolia*, ZAMUDIO
(LENTIBULARIACEAE)”

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:

CHRISTIAN DANIEL NEGRETE CORREA



DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN GERARDO ORTIZ MONTIEL

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO
DE MÉXICO

2021



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.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por brindarme el honor de formar parte de la comunidad UNAM.

A mis padres y a Marco Antonio por todo el apoyo que me han otorgado a lo largo de los años y por la paciencia que conlleva.

A mis amigos; Rodrigo (Yoy), Cecilia, Natalie, Daniela, Lola, David, Jesús, Liz que a lo largo de la carrera me permitieron compartir momentos inolvidables.

A mi hermano Fernando Rivas que a pesar de los años no se ha apartado de mi lado, incluso en los momentos más difíciles de nuestras vidas, espero estar ahí siempre que lo necesites.

A la licenciada B. Alejandra Medina H. por permitirme compartir días espléndidos y demostrarme que todo en esta vida es temporal y hay que disfrutarla a lo máximo.

Muchas gracias a todos.

“Nos hallamos en un mundo desconcertante. Queremos darle sentido a lo que vemos a nuestro alrededor y nos preguntamos: ¿Cuál es la naturaleza del universo? ¿Cuál es nuestro lugar en él y de dónde surgimos él y nosotros”

Stephen W. Hawking,
Historia del tiempo.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
i.	PLANTAS INSECTÍVORAS.....	3
ii.	MECANISMOS DE CAPTURA DE PRESAS.....	5
a)	MECANISMOS PASIVOS.....	5
b)	MECANISMOS ACTIVOS.....	8
iii.	LENTIBULARIACEAE.....	9
a)	PINGUICULA.....	10
iv.	DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO.....	10
v.	FOTOSÍNTESIS.....	16
a)	CICLO DE CALVIN.....	16
b)	METABOLISMO ÁCIDO DE LAS CRASULÁCEAS (MAC).....	18
vi.	SITIO DE COLECTA.....	21
III.	ANTECEDENTES.....	21
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	24
V.	HIPÓTESIS.....	24
VI.	OBJETIVO GENERAL.....	24
VII.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS:.....	25
i.	Propagación de las especies de estudio.....	25
ii.	Análisis de la morfología de las hojas.....	25
iii.	Evaluación de la presencia de almidón mediante tinción con lugol.....	26
iv.	Determinación de Ácidos Orgánicos.....	26
v.	Evaluación de la concentración de CO ₂	26
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
i.	Análisis de la morfología de las hojas.....	27
ii.	Evaluación de la presencia de almidón mediante tinción con Lugol.....	27
iii.	Determinación de los ácidos orgánicos.....	30
iv.	Evaluación de la concentración de CO ₂	30
X.	CONCLUSIÓN.....	34
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

I. RESUMEN

Las plantas insectívoras son organismos que adicionan a su metabolismo, insectos que son atraídos y degradados por las secreciones que producen sus hojas. El género *Pinguicula* es un grupo de plantas insectívoras que presenta dos tipos de morfología; una roseta de verano y otra de invierno, en donde la roseta de invierno engrosa sus hojas para su supervivencia lo que podría ser indicio del metabolismo tipo MAC; sin embargo, no se han encontrado estudios sobre este aspecto. Por tal motivo se estudiaron tres especies; *Pinguicula moranensis* var. Neovolcánica, Zamudio, *Pinguicula acuminata*, Benth y *Pinguicula crassifolia*, Zamudio. Se cuantificaron los ácidos orgánicos por medio de la acidez titulable en las rosetas de invierno; tres determinaciones de las misma roseta al anochecer y tres al amanecer (20:00 h y 08:00 h respectivamente); presentando un aumento en la acidez a la mañana siguiente de la primer determinación en las tres especies; también se determinó la absorción de CO₂; mediante un analizador de gases (IRGA), cada 3 horas durante 24 horas dentro de una caja de sistema cerrado; observándose una disminución en la concentración del CO₂ en cuanto las rosetas se sometían a oscuridad. Se efectuaron cortes histológicos de hojas para observar la anatomía y la distribución de los haces vasculares; demostrando que la venación de las rosetas es reticulada. La distribución de los haces vasculares que poseen estas plantas es parecida a las plantas MAC. También se identificó la presencia de gránulos de almidón en las hojas de las rosetas de invierno; determinando que su distribución tiene mayor concentración en el área de los haces vasculares. Con base en estos resultados se presume que las rosetas de invierno de *P. crassifolia*, *P. moranensis* y *P. acuminata* presentan un comportamiento tipo MAC facultativo.

PALABRAS CLAVE: Plantas insectívoras, Metabolismo ácido de las Crasuláceas, acumulación ácidos orgánicos, CO₂, IRGA.

II. INTRODUCCIÓN

El reino Plantae está conformado por todos aquellos organismos pluricelulares sedentarios, que necesitan de un sustrato edáfico. Normalmente viven en los sistemas continentales. Son organismos autótrofos; puesto que pueden sintetizar su propio alimento, verdes debido a que poseen en su estructura celular clorofila *a* y *b* (Tejero *et al.*, 2014). En el mundo existen aproximadamente 319,555 especies pertenecientes a este reino (Llorente-Bousquets, J. y S. Ocegueda, 2008).

La biodiversidad en México no se distribuye homogéneamente en el territorio; pues los grupos estudiados hasta el momento siguen un patrón latitudinal de mayor riqueza de especies hacia el Ecuador; también destacan por su riqueza y número de endemismos en ciertas zonas de transición donde confluyen las biotas de las regiones Neártica y Neotropical, como el Eje Neovolcánico y las Sierras Madre Oriental y Occidental (Koleff *et al.*, 2008). En nuestro país pueden encontrarse casi todos los tipos de vegetación reconocidos en el mundo, que van desde las selvas cálido-húmedas, los bosques templados y los bosques mesófilos de montaña, hasta los matorrales xerófilos, los pastizales naturales y la vegetación halófila y gipsófila (Figura 1) (Challenger y Soberón, 2008).

En México existen 53 órdenes, 247 familias, 2 685 géneros y 21 841 especies de plantas Magnoliophyta; ubicando a México como el quinto país con la mayor riqueza florística del mundo después de Brasil (56 000), Colombia (35 000), China (27 100) y Sudáfrica (23 420) (Villaseñor y Ortiz, 2014). Se calcula que entre 50 y 60% de las especies de plantas vasculares que se conocen en el país son endémicas; es decir, especies que sólo se encuentran en nuestro territorio. Entre ellas, las orquídeas y cactáceas son algunas de las familias que cuentan con mayor porcentaje de especies endémicas (60 y 50%, respectivamente) (Sarukhán *et al.*, 2009).

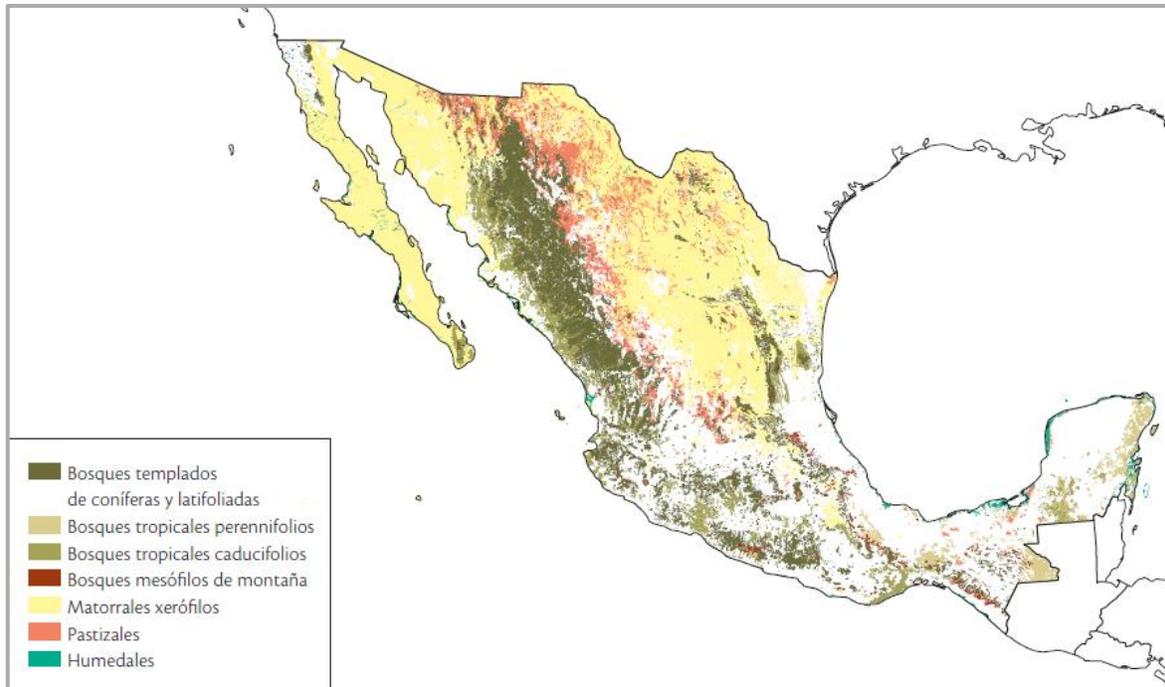


Figura 1. Distribución de la vegetación primaria en México (Tomado de Challenger y Soberón, 2008).

i. PLANTAS INSECTÍVORAS

Existen zonas inhóspitas para la mayoría de las plantas, donde el sustrato carece de nutrientes; como el nitrógeno y el fósforo. Los terrenos pantanosos, turberas, tierras ácidas y laderas de montaña son ejemplos de estas zonas (Legendre, 2000; García *et al.*, 2007). A pesar de ser zonas pobres en nutrientes; algunos organismos vegetales han desarrollado una estrategia evolutiva para poder desarrollarse en este tipo de zonas. Su estrategia consiste en absorber los nutrientes procedentes de insectos y en algunas especies; de animales pequeños, que ellas mismas cazan y asimilarlos a su dieta de CO₂ (García *et al.*, 2007). Las plantas insectívoras; como se le han llamado por su naturaleza, son organismos que utilizan mecanismos de atracción, captura y digestión de pequeños animales; principalmente insectos para complementar su dieta (Legendre, 2000).

La evolución de las plantas carnívoras les ha permitido independencia a ciertos nutrientes del suelo, particularmente del nitrógeno; sin embargo, también ha generado una demanda fotosintética muy alta (Givnish *et al.*, 1984) que está asociada a los altos costos de producción de trampas, glándulas y enzimas que son necesarias para la captura, digestión y absorción de las presas, así como con la reducción en la eficiencia fotosintética debida a la modificación y especialización que poseen las hojas (Chapin y Pastor, 1994).

Generando así que los beneficios derivados de la actividad insectívora sólo excedan a los costos en condiciones ecológicas muy particulares; es decir, en zonas donde la competencia con otras especies no insectívoras sea muy baja (ambientes con suelos deficientes en nutrientes, suelos ácidos o tóxicos), y en los cuales la principal limitante del crecimiento de las plantas sea el nitrógeno (preferentemente sitios con buena disponibilidad de agua y luz). En este sentido, la relación costo/beneficio que permitió la colonización de ambientes extremos, también haya restringido que esta evolución insectívora solo se permitió en las especies herbáceas, perennes y pequeñas, debido a que la eficiencia fotosintética del hábito insectívoro no sea suficiente para satisfacer las demandas de plantas de grandes dimensiones, leñosas o con ciclos de vida cortos (Alcalá y Domínguez, 1997).

Cabe mencionar que las plantas insectívoras obtienen la mayor parte de los nutrientes a partir del agua y de las sales minerales del suelo, junto con la actividad fotosintética; la captura de insectos solo es una actividad que complementa la dieta de este tipo de organismos (García *et al.*, 2007).

A excepción de las zonas árticas, las plantas insectívoras se distribuyen en ambientes tropicales, templados, alpinos y semidesérticos; por lo tanto, se consideran como plantas cosmopolitas (Lüttge, 1983). Existen géneros con distribución restringida; por ejemplo, los géneros *Utricularia* y *Drosera* se pueden encontrar en todos los continentes; mientras que el género *Pinguicula* se encuentra principalmente en las zonas templadas del hemisferio norte. En México se encuentran 5 géneros: *Pinguicula*, *Utricularia* y *Genlisea* de la familia Lentibulariaceae, el género *Ibicella*, que forma parte de la familia Martyniaceae; ambas familias se encuentran dentro del orden Scrophulariales (Alcalá y Domínguez, 1997) y por último el género *Drosera* presente en el estado de Quintana Roo, perteneciente a la familia Droseraceae, dentro del orden Caryophyllales (Duno de Stefano, 2016).

Las plantas insectívoras tienen una gran variedad de formas. Las más comunes son las formas arrosetadas (como los géneros *Pinguicula*, *Brocchinia*, *Catopsis*, *Cephalotus*), también existen especies que crecen como trepadoras (*Nepenthes*) y otras más como hierbas erectas (*Ibicella*). En cuanto a las formas arrosetadas, podemos encontrar plantas terrestres (*Pinguicula*), epifitas (*Brocchinia*) y acuáticas, como los géneros *Utricularia*, *Biovularia* y *Polypompholyx*, algunas otras han adquirido el hábito fitotelmático; es decir, plantas que viven dentro del agua que se acumulan en otras plantas más grandes como las bromelias (Lloyd, 1942).

ii. MECANISMOS DE CAPTURA DE PRESAS

El proceso de capturar presas también es variable y está relacionado con la morfología de cada una de las especies; aunque generalmente se habla de hojas que forman “trampas” o “dispositivos de atrape”, activos o pasivos (García *et al.*, 2007). El proceso de captura comienza con mecanismos de atracción de las presas; estos mecanismos son similares a los que se han desarrollado en las interacciones entre polinizadores y las flores; aunque en el caso de los polinizadores existe una correlación entre el mecanismo de atracción y la presencia de recompensas (Dobson, 1987; Galen, 1989; Real y Ratchke, 1991), mientras que solo algunas especies de plantas insectívoras (como *Sarracenia*, *Darlingtonia* y *Nepenthes*) utilizan el néctar como mecanismo de atracción (Slack, 1979; Lüttge, 1983).

Los mecanismos de captura se dividen en función de la presencia o ausencia de movimientos asociados con la captura de presas. Los sistemas pasivos se caracterizan porque la captura no involucra ningún tipo de respuesta directa de la planta en presencia de la presa; en este tipo de mecanismos se encuentran las trampas adhesivas. Otro tipo de mecanismo pasivo se conoce como encierro pasivo y se caracterizan por tener las hojas modificadas a manera de recipientes que podrían llegar a acumular hasta un litro de agua y se conocen como jarrones (Blondeau, 2004).

a) MECANISMOS PASIVOS

En la mayoría de las especies de plantas insectívoras no ofrecen recompensas a sus presas. Algunas plantas de los géneros como *Drosera*, *Heliophora*, *Brocchinia* y *Dionaea* presentan zonas de reflexión y de absorción de luz ultravioleta que utilizan para atraer a sus presas hacia las trampas (Glossner, 1992).

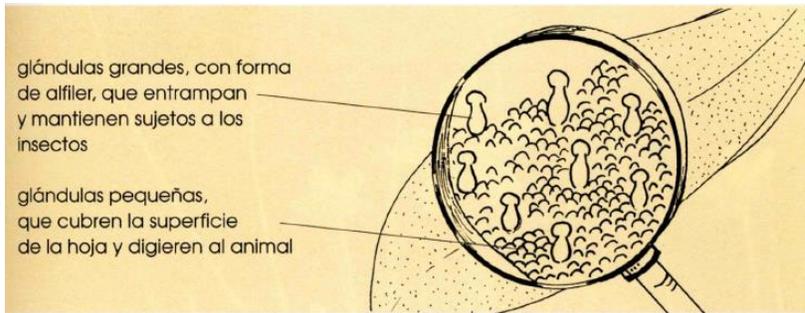


Figura 2. Glándulas viscosas (grandes) y glándulas digestivas (pequeñas) que se encuentran en las hojas de las especies que pertenecen al género *Pinguicula* (Tomado de Blondeau, 2004).

Otras especies producen pequeñas gotas de agua con azúcar que atraen a sus presas; por ejemplo, el género *Pinguicula* posee glándulas en la superficie foliar que producen gotas de mucílago pegajoso. Una

vez que la presa es atraída hacia la trampa, las mismas gotas sirven para retenerla hasta que es digerida (Heslop-Harrison, 1978; Lüttge, 1983). En las hojas de este tipo de plantas podemos encontrar dos tipos de glándulas; las glándulas viscosas, parecidos a un alfiler, en donde se quedan adheridos los insectos y; las glándulas digestivas, que cubren la superficie de la hoja; muy pequeñas y son las responsables de degradar a las presas que quedan atrapadas en las glándulas viscosas (Figura 2) (Blondeau, 2004).

Otro tipo de plantas insectívoras son las plantas con ascidios cónicos (*Sarracenia* y *Heliamphora*) que utilizan la venación rojiza en las trampas que conduce a los insectos hacia su interior (Fish y Hall, 1978; Schnell, 1976; Slack, 1979). Este tipo de trampas están formadas por hojas modeladas en forma de estrechos conos, generalmente erectos y pueden llegar a medir 90 cm de altura. La abertura suele ser coloreada y en algunas partes de la hoja segregan néctar para atraer a

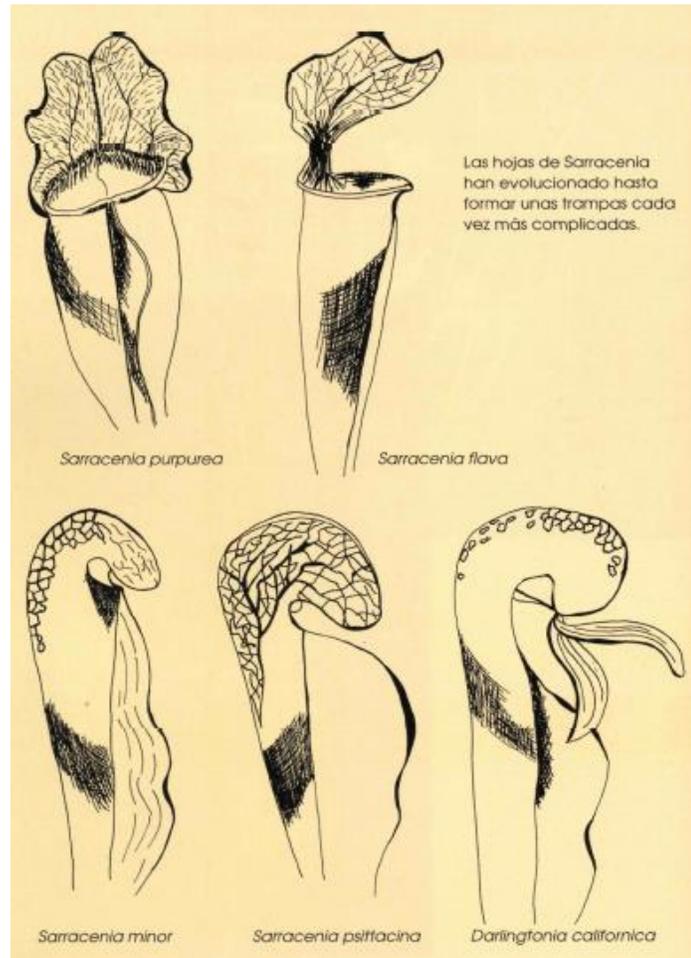


Figura 3. Diversos tipos de tapas en las hojas trampa de algunas de las especies de *Sarracenia* y *Darlingtonia* (Tomado de Blondeau, 2004).

los insectos (Vogel, 1983); una vez han caído los insectos, no consiguen salir, principalmente por las paredes lisas y los tentáculos rígidos que les impiden moverse (Blondeau, 2004); finalmente se ahogan y por último son digeridos (García *et al.*, 2007). La tapa fija que se encuentra en la abertura de la trampa no se cierra sobre la presa; sino que impide que el agua de lluvia diluya los jugos digestivos. Esta tapa tiene diversas formas y así es como se logran identificar cada una de las especies (Figura 3) (Blondeau, 2004).

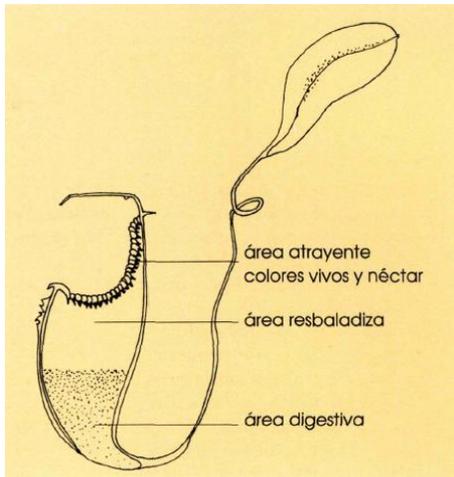


Figura 4. Zonas características de las hojas trampa pertenecientes al género *Nepenthes* (Tomado de Blondeau, 2004)

En el caso de las especies pertenecientes a los géneros *Nepenthes* y *Cephalotus*, las hojas trampa, tienen forma de urna, en la que caen los insectos. Los bordes suelen ser de colores llamativos y poseen glándulas nectaríferas que atraen a los insectos. En la mayoría de estas plantas, se distinguen tres zonas en las hojas trampa: una zona de atracción, que posee secreciones dulces y colores vivos, que atraen a los insectos; una zona resbaladiza (en ocasiones cubierta con pelos rígidos dirigidos hacia abajo) que facilita la caída y una zona digestiva, llena de líquido (Figura 4), en la que los insectos son digeridos por la planta a través de los fermentos, las bacterias y las glándulas digestivas (Blondeau, 2004).

Algunas plantas insectívoras como *Drosophyllum lusitanicum* (Figura 5) y la *Byblis liniflora* tienen tricomas viscosos con los que atraen a los insectos con el intenso olor a miel que emite; sin embargo, estos tricomas no poseen movimiento como los ejemplares del género *Drosera* (Figura 6).



Figura 5. Tentáculos viscosos de una hoja de un ejemplar de *Drosophyllum lusitanicum* con insectos adheridos (Tomado de León, 2019).

Existe un mecanismo semiactivo, propio del género *Drosera*, que combina gotas

pegajosas que se iluminan con la luz en el extremo de los tentáculos presentes en la punta de todas las hojas que los insectos, atraídos por el brillo, quedan atrapados. Cuando el insecto queda adherido, los pequeños tentáculos se pliegan lentamente hacia la hoja, y es ahí cuando empieza la digestión (Figura 6), donde la planta asimila poco a poco las

sustancias contenidas en el insecto. Sin embargo, la planta no puede eliminar el cuerpo reseco del insecto cuando acaba la digestión, el cual se despega por acción del viento o del agua, al poco tiempo la hoja se marchita y es sustituida por otra (Blondeau, 2004).



Figura 6. *Drosera capensis*. Cuando un insecto queda adherido a los tentáculos pegajosos, el limbo de la hoja se pliega lentamente (encerrado en círculo) y comienza la digestión (Tomado de Ziaratnia *et al.*, 2009).

b) MECANISMOS ACTIVOS

Los mecanismos que presentan movimientos en las trampas se dividen en encierros activos y captura por succión (Alcalá y Domínguez, 1997). El encierro activo se presenta en las plantas pertenecientes a los géneros *Dionaea*; cuyos mecanismos les permiten cerrar sus trampas en una trigésima de segundo al ser estimuladas por el contacto de las presas (Williams; 1980; Blondeau, 2004). Las hojas trampa del género *Dionaea* se activan con el estímulo en seis pequeños pelos ubicados en el centro de la hoja (Figura 7).

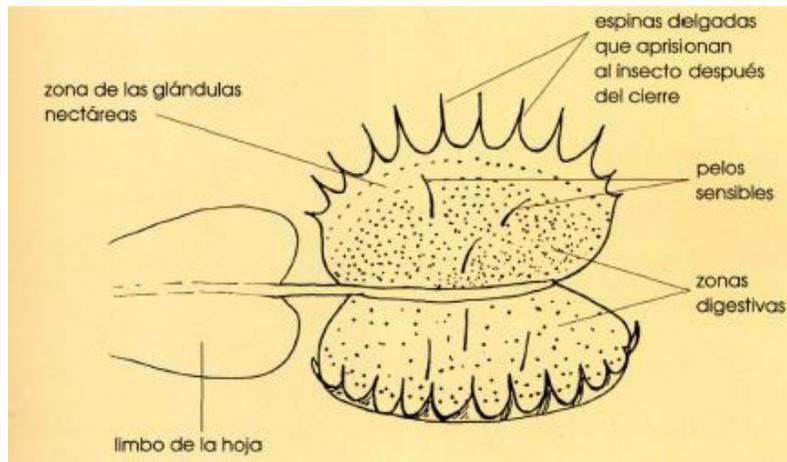


Figura 7. Partes de una hoja trampa del género *Dionaea* (Tomado de Blondeau, 2004).

Cabe mencionar que en

Dionaea muscipula ha evolucionado de tal manera que puede discriminar entre los estímulos provocados de una posible presa y los que se deben a otro tipo de agentes; pues,

incluso las gotas de lluvia pueden activar las trampas. Es decir, cuando se produce una estimulación química inducida por proteínas animales, se observa un cierre definitivo para una digestión completa (de entre dos y tres semanas) y comienza la producción de enzimas digestivas. En cambio, si el cierre es debido a un objeto no comestible, la trampa se abre al cabo de dos o tres días (Blondeau, 2004).

Finalmente, las especies de los géneros *Utricularia* (Figura 8), *Biovularia* y *Polypompholyx*, presentan trampas por succión como mecanismo activo. Estas trampas están formadas por una pequeña cavidad (también llamado utrículo), cerrada por un opérculo. Este mecanismo funciona con base en la diferencia de presiones entre el interior y el exterior de las trampas (Sydenham y Findlay, 1973). La trampa se activa cada vez que una posible presa estimula los pelos sensitivos ubicados cerca del opérculo; éste se abre, succionando a la presa (pues el interior de la cavidad posee menor presión que el exterior de este). Este proceso se realiza en un tiempo promedio de 30 milisegundos (Alcalá y Domínguez, 1997; Blondeau, 2004).

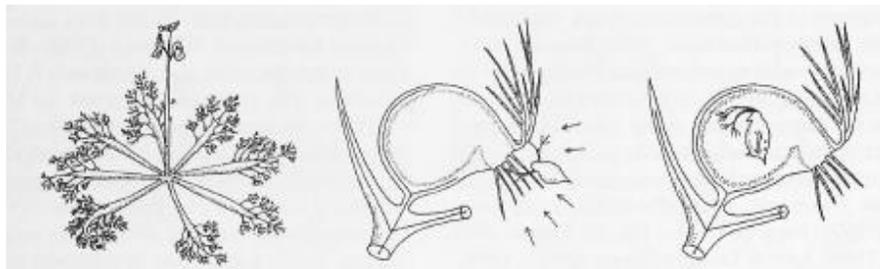


Figura 8. El género *Utricularia* utiliza la captura por succión; que se presenta exclusivamente en plantas acuáticas, sus trampas se mantienen sumergidas; que al ser estimuladas mediante el roce de pelos táctiles situados alrededor de la zona de apertura (opérculo), se abre rápidamente, succionando a sus presas (Modificado de Heslop-Harrison, 1978).

iii. LENTIBULARIACEAE

Esta familia está integrada por hierbas anuales y perennes insectívoras (Robles y Becerra, 2007). Son plantas cosmopolitas y se distribuyen en las regiones templadas-tropicales. Existen tres géneros dentro de esta familia; el género *Pinguicula*, uno de los géneros que tienen mayor importancia pues cuenta con más de 80 especies en el mundo; de las cuales, 44 especies se encuentran en México y el 90% se consideran endémicas del país (Zamudio, 2001; Castañón, 2015); el género *Genlisea* con solo una especie (*G. filiformis*) reportada

en el estado de Chiapas (Zamudio, 2005b); por último el género *Utricularia* con 18 especies en México; de las cuales tres se consideran endémicas (Olvera, 1996).

a) PINGUICULA

El género *Pinguicula* se distribuye principalmente en las regiones templadas del hemisferio norte y posee algunos representantes en las Antillas y en los Andes sudamericanos. Son plantas herbáceas terrestres o rara vez epífitas, anuales y perennes. Muchas de ellas son plantas dimórficas en el desarrollo de sus hojas a manera de roseta, diferenciándose en roseta de invierno y de verano (Zamudio, 2005a). Las especies de este género son muy diversas en cuanto al tamaño de sus hojas, midiendo desde un par de centímetros de diámetro como en *P. crenatiloba*, o hasta los 30cm de diámetro como en *P. gigantea* (Zamudio, 2005a). Estas plantas han sido empleadas con fines ornamentales en las últimas décadas (Castañón, 2015).

En la mayoría de las especies mexicanas se presenta la roseta de invierno, que permite la supervivencia de estas plantas en los inviernos secos; estas poseen un hibernáculo fotosintético formado por hojas suculentas que son de fácil desprendimiento y con la capacidad de generar plantas nuevas. Durante esta fase, la especie no es insectívora; ya que no es capaz de atraer y digerir organismos (Castañón, 2015).

iv. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO

Pinguicula moranensis H. B. K. se localiza en las regiones montañosas de México y Centroamérica, desde Nuevo León y Tamaulipas hasta Guatemala (Zamudio, 1999). Se reconocen dos variantes muy similares: *Pinguicula moranensis* H.B.K., var. *moranensis* es la especie más común y con mayor área de distribución, se extiende ampliamente en las regiones montañosas de México y Centroamérica, desde Nuevo León y Tamaulipas hasta Guatemala. Se caracteriza por presentar "rosetas de invierno" laxas, extendidas sobre el suelo, formadas por numerosas hojas espatuladas con el ápice redondeado a obtuso. Estas plantas crecen principalmente sobre sustrato derivado de rocas calizas.

Pinguicula moranensis var. *Neovolcanica*, Zamudio (Figura 9), "se distribuye ampliamente en el Eje Volcánico Transversal y se reconoce por las "rosetas de invierno" compactas, formadas por numerosas hojas lanceoladas u oblongo-lanceoladas, con el ápice agudo. Es una herbácea perenne con hojas dimórficas, en dos rosetas subsecuentes; "roseta de invierno" compacta, en forma de bulbo, de 10 a 20 (o hasta 30) mm de diámetro, con 30 a

70(80) o más hojas carnosas, pecioladas, lanceoladas a oblongo-lanceoladas, de 10 a 30 mm de largo, por 2 a 6 mm de ancho, ápice agudo u obtuso, glabras, excepto en el ápice en donde son escasamente pubescentes y cilioladas en la cara superior (Inciso F de la figura 9); "roseta de verano" laxa, de 60 a 200(230) mm de diámetro, con (4)6 a 8(12) hojas membranosas, extendidas, reclinadas sobre el suelo, cortamente pecioladas, de color verde o a veces teñidas de rojo, de 55 a 113 mm de largo, pecíolo de (10)20 a 35 mm de largo, lámina elíptica, obovada a suborbicular, de 35 a 95 mm de largo, por 25 a 75 mm de ancho, margen ligeramente involuto, densamente cubierta en la cara superior con glándulas sésiles y glándulas estipitadas (Inciso A y E de la Figura 9). Pedúnculos 1 a 5(7) por planta, erectos, de 100 a 200(320) mm de largo, 2.5 mm de diámetro en la base, adelgazándose paulatinamente hasta 1 mm en el ápice, glandular-puberulentos en el ápice, glabros hacia la base. Flores de (25)30 a 40(60) mm de largo (incluyendo el espolón); cáliz bilabiado, glandular-puberulento o pubescente por fuera, glabro por dentro, lóbulos lanceolados o lanceolado-oblongos, de (2)3 a 4.5 mm de largo, por 1.5 a 3 mm de ancho, labio inferior bilobado casi hasta la mitad de su longitud; corola profundamente bilabiada, violáceo-purpúrea, cubierta por fuera en la parte ventral con glándulas estipitadas cortas, labio superior bilobado, los lóbulos más o menos divergentes o rara vez cubriéndose entre sí, linear-oblongos a obovados, ápice redondeado o truncado, de 7 a 18 mm de largo, por 4 a 11 mm de ancho, labio inferior profundamente tripartido, lóbulos linear-oblongos a obovados, con el ápice redondeado a truncado, en ocasiones retusos, divergentes, de 7 a 15.5 mm de largo, por (3)5 a 13 mm de ancho, el lóbulo intermedio un poco mayor, frecuentemente subcuneado, tubo de 3 a 6 mm de largo, de color blanco, pubescente en su interior con pelos multicelulares cilíndricosubulados, más densos en la entrada, ausentes en la parte media y abundantes en la base del tubo; espolón cilíndrico subulado, recto o ligeramente curvo, de 15 a 30(37) mm de largo" (Descripción tomada de Zamudio 1999, 2005b).

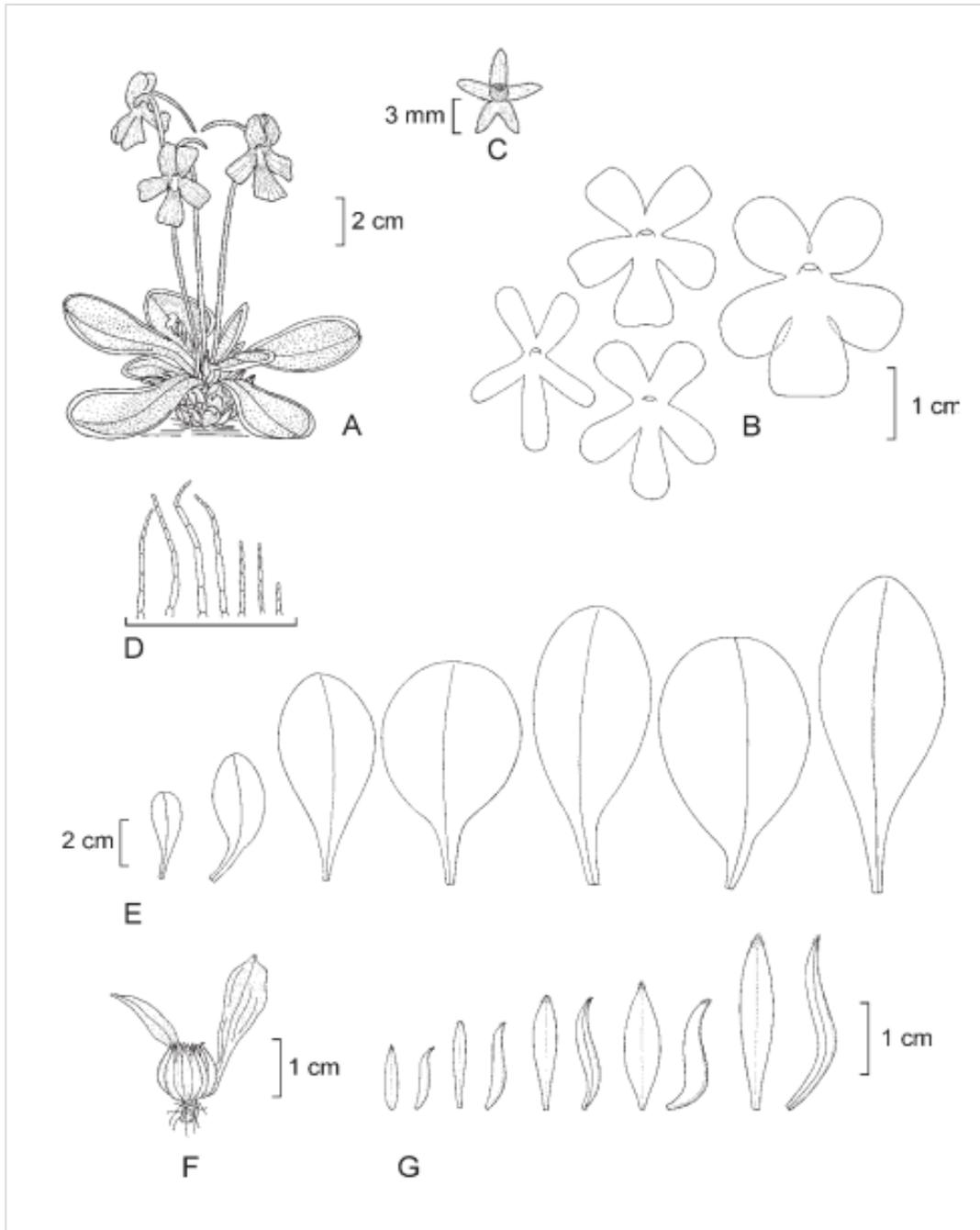


Figura 9. A. *P. moranensis* var. Neovolcanica, Zamudio. Hábito de la planta, dibujo tomado de Hooker (1846); B. Corolas vistas de frente mostrando la variación en forma y tamaño; C. Caliz; D. Pelos del interior del tubo de la corola; E. Serie de hojas de “verano”; F. Roseta de “invierno”; G. Serie de hojas de “invierno”. Dibujos de B a G de Rogelio Cárdenas (Tomado de Zamudio, 1999).

***Pinguicula acuminata*, Benth.** Habita en bosques de encino, pino-encino o de oyamel, en el sur de Querétaro y norte de Michoacán. Crece en laderas de rocas ígneas sombreadas y húmedas, asociada con musgos, helechos y plantas suculentas a una altitud de 2300-2950 msnm. Florece de febrero a mayo mientras presenta la roseta de “invierno”, la roseta

de “verano” se desarrolla de julio a octubre. Actualmente también se le ha encontrado en el estado de México y Sierra de Guadalupe en la Ciudad de México (Zamudio, 2005b).

“Es una planta herbácea perenne; heterófila, roseta “invernal” hipógea, compacta en forma de bulbo, formada por (20)30 a 40 hojas carnosas, ovado-lanceoladas u oblongo-ovadas, de (6)10 a 20(28) mm de largo, por (3)4 a 6(10) mm de ancho, ápice largamente acuminado; roseta de “verano” laxa, con 2 a 4(5) hojas membranáceas, largamente pecioladas, pecíolo de 12 a 57(80) mm de largo, cóncavo y piloso en la parte superior, lámina ampliamente ovada a sub orbicular, de 22 a 92 mm de largo, por 16 a 83 mm de ancho, ápice obtuso, base redondeada o cordada, margen involuto; pedúnculos de (45)70 a 150(220) mm de largo, glandular-pubescentes cerca del ápice.

Las flores son de 10 a 22 mm de largo (incluyendo el espolón); cáliz bilabiado, lóbulos lanceolados a oblongo-lanceolados, de 1.5 a 3 mm de largo, por 0.7 a 1.5 mm de ancho; corola sub isoloba, el labio inferior un poco mayor que el superior, variando en color blanco a diversos tonos de violeta, lóbulos obovados a oblongo-sub cuneados, de (4)5 a 12 mm de largo, por 2.5 a 10 mm de ancho, ápice redondeado a truncado, tubo sub cilíndrico, de 6 a 8 mm de largo, fuertemente geniculado en la parte ventral, doblado en ángulo de 95 a 105° cerca de la mitad, con largos tricomas claviformes en la garganta y tres líneas de pelos claviformes por dentro, espolón cilíndrico, engrosándose hacia el ápice, recto o ligeramente curvo, de 2.5 a 5 mm de largo; cápsula globosa, de 3 a 4(5) mm de diámetro; semillas elipsoidales, de 0.9 a 1.1 mm de largo, por 0.2 a 0.3 mm de ancho, superficie reticulada (Descripción tomada de Zamudio, 2005b).

Pinguicula crassifolia, Zamudio; se encuentran en el Cerro de las Ventanas y sus alrededores en el municipio de El Chico, Hidalgo, en el extremo norte del Valle de México; crece sobre musgo y materia orgánica acumulada de *Abies religiosa* a una altitud de entre 2850 y 3000 msnm. Su floración se presenta al mismo tiempo que la roseta de invierno. Su fruto madura al mismo tiempo en que comienzan a crecer las hojas de verano, cuando llegan a su talla máxima, vuelven a desarrollarse las hojas de invierno y al llegar a su desarrollo óptimo, las hojas de verano empiezan a secarse (Zamudio, 1988).

“Es una hierba perenne, de 7 a 11 cm de alto. Hojas dimórficas, en dos series: las de “verano” escasas (5 a 7), pecioladas, de 37 a 111 mm de largo, por (16)20 a 60 mm de ancho, lámina elíptica a oblongo-elíptica, ápice redondeado, base cuneada a redondeada, margen ligeramente involuto, glanduloso-viscosa en el haz, hasta 65 mm de largo, peciolo viloso, con el margen escasamente ciliado, hasta 45 mm de largo (Inciso B2 de la figura

10); hojas de "invierno" crasas, presentes durante la floración, numerosas (20 a 60), dolabriformes, elípticas a estrechamente obtruladas en contorno, ápice agudo, margen entero, ciliado hacia el ápice, glandulosas en el haz, de 1 a 3 mm de largo, por 1.5 a 6 mm de ancho (Inciso B1 de la figura 10). Pedicelos 1 a 4 por planta, erectos, glandular-hirsutos, de 47 a 85 mm de largo, por \pm 1 mm de ancho. Flores de 23 a 50 mm de largo (incluyendo el espolón), por (13)20 a 30 mm de ancho (Inciso A de la figura 10), cáliz bilabiado, viloso, el labio superior dividido de 1/2 a 7/8 de su longitud en tres lóbulos triangulares a triangular-lanceolados, de (1.5)2 a 3.5 mm de largo, por 1 a 2(3) mm de ancho, labio inferior dividido casi hasta su base en dos lóbulos lanceolados u oblongos, de 2 a 3(4) mm de largo, por 1 a 2 mm de ancho, corola bilabiada, rojo-purpúrea, el labio superior dividido en dos lóbulos obovado-cuneados, con el ápice truncado o redondeado, de (5)7 a 12 mm de largo, por 4 a 11 mm de ancho, el labio inferior un poco más grande que el superior, dividido en tres lóbulos obovado-cuneados, ápice truncado o redondeado, de 6 a 15 mm de largo, por (4)5 a 12.5 mm de ancho, el lóbulo medio es un poco más grande que los laterales; tubo infundibuliforme, ligeramente ventriculoso, de 8 a 15 mm de largo, por 3 a 6(10) mm de ancho, densamente pubescente en su interior de la región ventral, con dos tipos de pelos multicelulares, de los de la parte superior son cilíndricos, largos y delgados, algunos biseriados en el ápice, los de la parte media inferior son cortos, gruesos, algunos biseriados a multiseriados en el ápice, paladar no desarrollado, espolón cilíndrico-subulado, sin diferenciarse del tubo de la corola, recto o formando un ángulo de 160° con la corola, de 8 a 25 mm de largo, por 1 a 2 mm de ancho, estambres de 2 a 2.7 mm de largo, ovario elipsoidal, con pelos glandulares multicelulares. Cápsula subglobosa a ampliamente ovoide, de 3 a 4 mm de diámetro. Semillas fusiformes, con apéndices ensanchados en sus extremos, de \pm 1 mm de largo, por \pm 0.2 mm de ancho, superficie reticulada con celdas poligonales" (Descripción tomada de Zamudio 1988).

Su floración ocurre de fines de marzo a principios de junio, cuando presenta la roseta de “invierno” (Inciso A de la figura 10); los frutos maduros se encuentran hacia finales de mayo, al tiempo que las hojas de verano empiezan a crecer, éstas alcanzan su talla máxima en agosto; en este mes las hojas de invierno empiezan a crecer de nuevo y en septiembre ya están bien desarrolladas, al tiempo que las hojas de verano empiezan a cercarse (Zamudio, 1988).

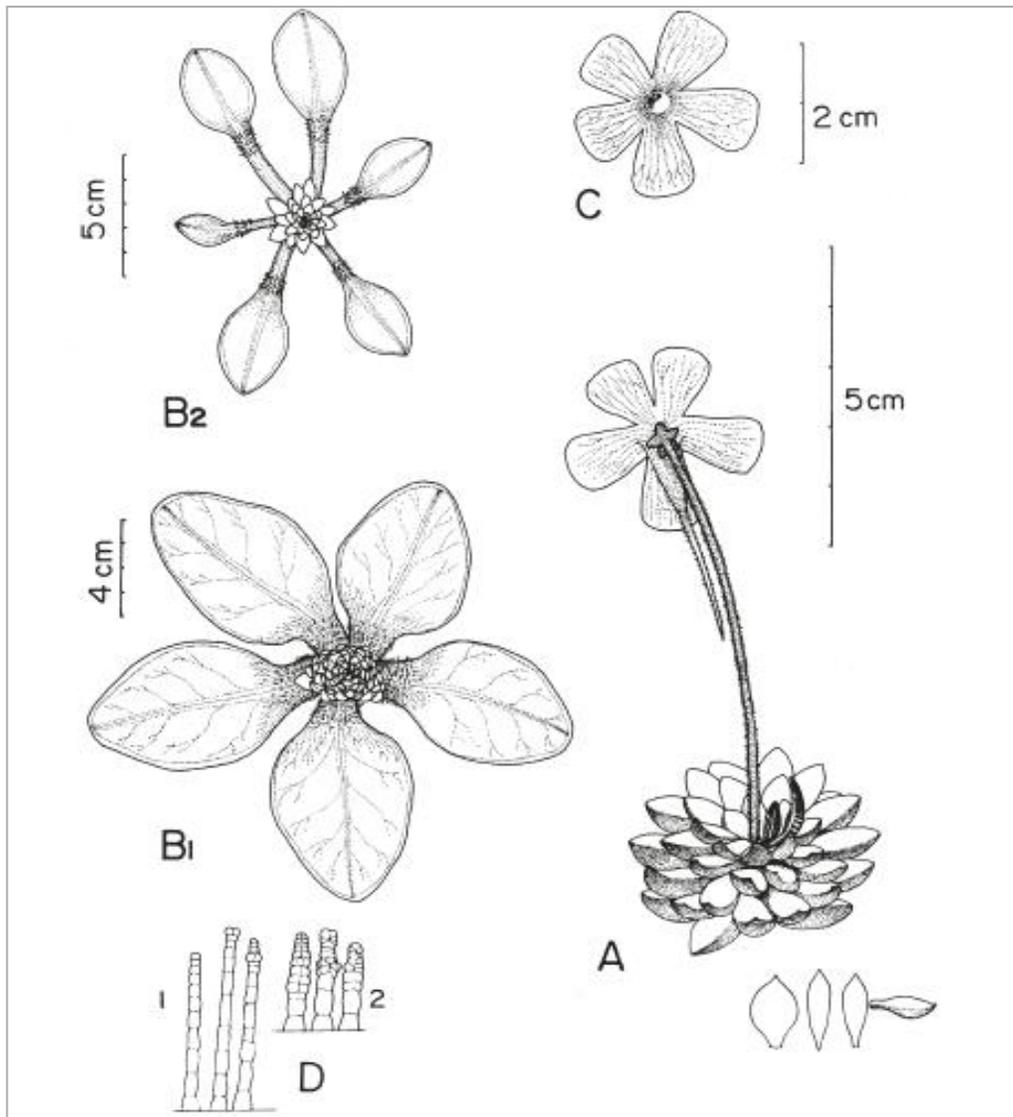


Figura 10. *Pinguicula crassifolia*, Zamudio. A. Planta en floración con roseta de “invierno”, se muestra la variación en el contorno de las hojas; B1. Roseta de “verano” con restos de la roseta de “invierno”, planta sometida a condiciones de luz directa y sol en cultivo; B2 Roseta de “verano” con restos de la roseta de “invierno”, planta sometida a condiciones de sombra constante en cultivo; C. Lóbulos de la corola; D. Pelos del interior del tubo de la corola: 1. Pelos de la parte superior, 2. Pelos de la parte inferior del tubo (Tomada de Zamudio, 1988).

v. FOTOSÍNTESIS

La fotosíntesis es un proceso que todas las plantas requieren realizar para, vivir, incluso las plantas insectívoras (García *et al.*, 2007). Es el mecanismo mediante el cual las plantas a partir de elementos inorgánicos crean los nutrientes orgánicos necesarios para poder crecer. Este se lleva a cabo dentro de los tilacoides de los cloroplastos que se encuentran en las células presentes en las hojas. Para poderlo llevar a cabo, se necesita de la luz solar, de agua y de nutrientes que se encuentran disponibles en el sustrato donde se desarrollan las plantas.

Para el desarrollo de este proceso, las plantas cuentan con complejos moleculares para llevar a cabo las dos fases de la fotosíntesis; luminosa y oscura. La primera se lleva a cabo con la interacción del Fotosistema II (PSII), el complejo Citocromo b6f, el fotosistema I (PSI) y con el complejo de manganeso (también llamado complejo productor de O₂); el cual realiza la fotólisis de 2 moléculas de agua para formar oxígeno molecular, 4 protones (H⁺) y 4 electrones (e⁻), así como la ATPasa. Cada PSII inicia el transporte electrónico a partir de la transferencia de energía captada por los pigmentos antena, mediante una serie de transportadores conformados por Feofitina, Plastoquinonas a y b, y Citocromo b6f y plastocianina, hasta llegar al PSI, reduciendo su molécula de clorofila a, la transferencia de electrones llega hasta el NADP teniendo como intermedio a la ferredoxina y la ferredoxin reductasa NADP. En este proceso también se produce la acumulación de protones en el lumen del tilacoide, mediante los cuales se produce ATP por efecto de la ATPasa. Estas moléculas serán utilizadas más tarde en la fase oscura o ciclo de Calvin (Moreno, 2012).

a) CICLO DE CALVIN

El Ciclo de Calvin se lleva a cabo en el estroma de las células vegetales y necesitan los compuestos energéticos producidos en la fase luminosa. Mediante una secuencia de reacciones, se fija CO₂ para la formación de carbohidratos. Para esto, en el estroma del cloroplasto debe haber moléculas de la pentosa fosfatada, la Ribulosa-1,5-bisfosfato, que servirá de base para la fijación del CO₂. La reacción de carboxilación de la ribulosa-1,5-bisfosfato, es catalizada por la enzima Ribulosa bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RUBISCO) para formar un intermediario inestable de 6 carbonos, el cual por medio de la misma enzima se hidroliza en dos moléculas de 3 Fosfoglicerato (una molécula de tres carbonos) (Etapa 1; figura 11). A partir de este último, una molécula de 3 Fosfoglicerato

será utilizada para formar una molécula de azúcar; mediante la reducción del carbono fijado y así comenzar con la síntesis de hexosa (Etapa 2; figura 11), mientras que la otra triosa vuelve al ciclo para ser reutilizada para la regeneración de la molécula de Ribulosa-1,5 bifosfato que se utilizará para fijar nuevamente el CO₂ (Etapa 3; figura 11) (Moreno, 2012; Tymoczko *et al.*, 2014).

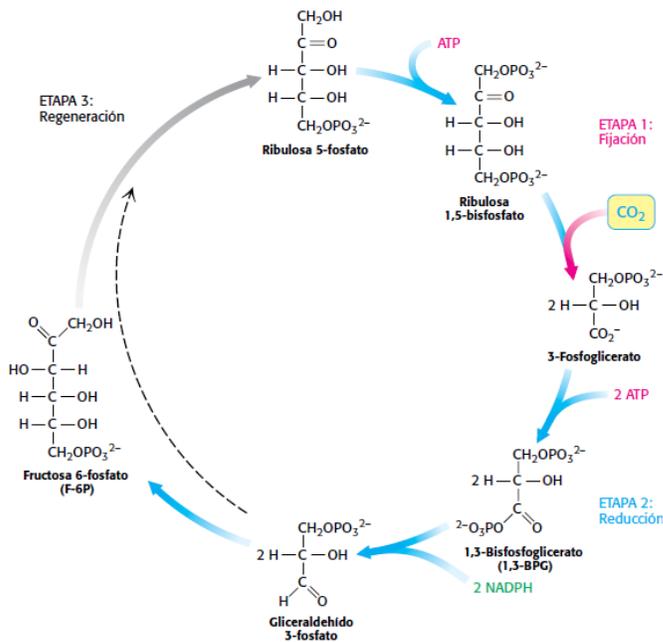


Figura 11. El ciclo de Calvin consta de tres etapas. La etapa 1 consiste en la fijación del carbono mediante la carboxilación de la ribulosa 1,5-bisfosfato. La etapa 2 consiste en la reducción del carbono fijado para comenzar la síntesis de hexosa. La etapa 3 consiste en la regeneración del compuesto de partida, la ribulosa 1,5-bisfosfato (Tomado de Tymoczko *et al.*, 2014).

Según se lleva a cabo la fijación del carbono, las plantas superiores se clasifican en C₃, C₄ (Figura 12) y plantas con metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC). La fotosíntesis C₄ utiliza coordinadamente las funciones de las células del mesófilo como fijadoras de CO₂ atmosférico y las células de la vaina vascular con las reacciones del ciclo de Calvin típico, el clorénquima foliar posee fosfoenol piruvato carboxilasa como fijadora de CO₂ y los cloroplastos con forma vesicular, dispuestos radialmente alrededor de los haces vasculares presentan

RUBISCO y utilizan el CO₂ fijado en el piruvato procedente de los cloroplastos de las células del mesófilo y en su conjunto se le designa como estructura Kranz (Figura 13) (González, 2013).

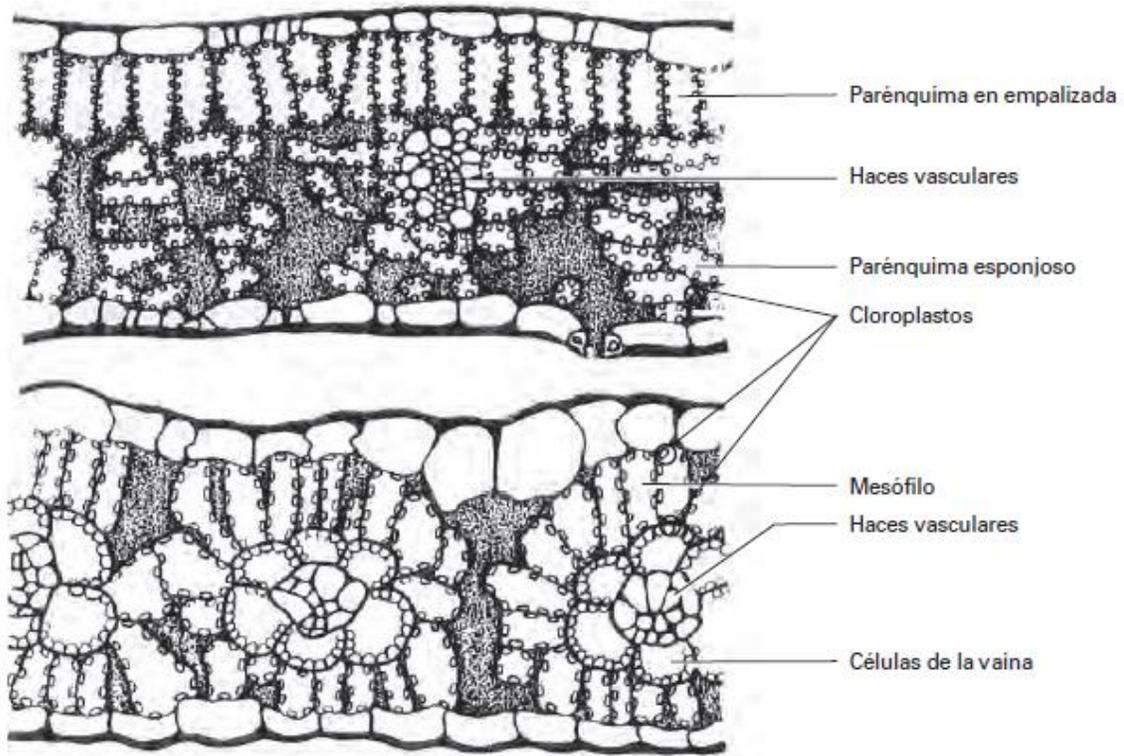


Figura 12. Comparación de la anatomía foliar en secciones transversales de hojas de plantas C3 (arriba) y C4 (abajo). Tomado de Medrano *et al.*, 2013.

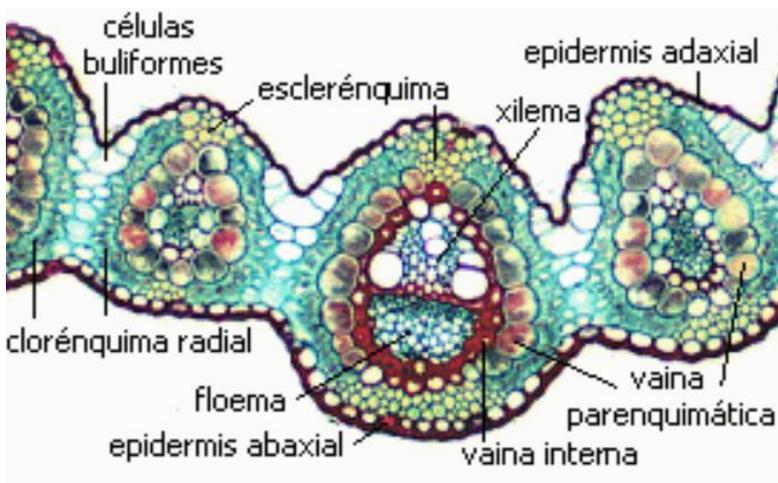


Figura 13. Corte transversal de hoja de *Bouteloua* (Gramineae-Eragrostoideae), mostrando la anatomía foliar tipo Kranz. Tomado de González, 2013.

b) METABOLISMO ÁCIDO DE LAS CRASULÁCEAS (MAC)

De forma general, el MAC es una adaptación a ambientes áridos. En estas plantas solo existe un tipo celular fotosintéticamente funcional (Figura 14), donde se lleva a cabo la fijación de CO₂,

principalmente durante la noche, con el uso de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) produciendo una molécula de 4 carbonos (generalmente ácido málico o ácido cítrico), que se almacena en las vacuolas de las células; posteriormente, durante el periodo de luz consecutivo se libera el ácido málico de la vacuola para ser descarboxilado por la

enzima RUBISCO para liberar una molécula de CO_2 y formar compuestos de 3 carbonos (piruvato o PEP), posteriormente, se asimila el CO_2 liberado en los cloroplastos mediante el ciclo C3 para la regeneración de los carbohidratos de almacén o gluconeogénesis (Iglesias *et al.*, 1987; Andrade *et al.*, 2007).

Las plantas suculentas pueden mostrar la ruta C3 normal de la asimilación del dióxido de carbono en la fotosíntesis; mientras no exista escases de agua, o la ruta C4, o MAC, siendo la MAC la más ventajosa en cuanto a la fijación de CO_2 ; debido a que no cierra sus estomas durante la noche, permitiendo el intercambio gaseoso, y la C3, la asimilación menos ventajosa en condiciones áridas. La vía de asimilación MAC se conoce no solo en las suculentas, sino también en muchas plantas no suculentas (Larcher, 1988).

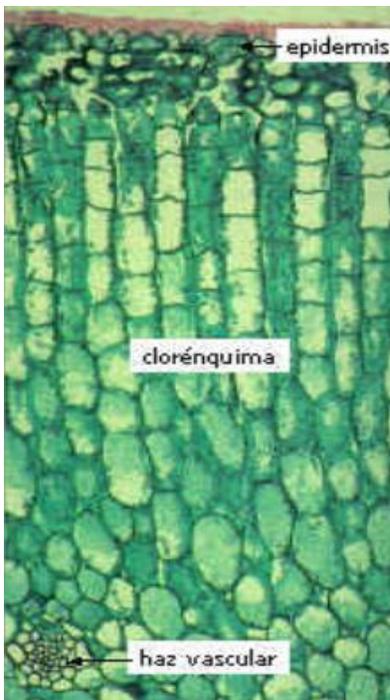


Figura 14. Corte transversal de hoja de *Echeveria*, donde se puede apreciar el haz vascular, la epidermis y el clorénquima (único tipo celular fotosintéticamente activo. Tomado de González, 2013.

El control del MAC es complejo e involucra la participación de factores externos e internos, como los niveles de agua, CO_2 atmosférico y concentraciones de O_2 , temperatura durante el día y la noche además de la intensidad de luz son factores que pueden modificar la proporción de este metabolismo en algunas plantas. La regulación de estos efectos parece ser mediado por el control estomático, la disponibilidad del CO_2 , y el proceso de regulación de la enzima PEP carboxilasa y el flujo de metabolitos (Geydan y Melgarejo, 2005; Andrade *et al.*, 2007).

En plantas MAC se puede acumular carbono fijado durante la noche como malato, citrato o isocitrato y su descarboxilación durante el día siguiente ayuda a alimentar el Ciclo de Calvin y aliviar la fotoinhibición (Franco *et al.*, 1992; Borland *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2002). Los cambios en el modo de metabolismo fotosintético se acompañan de diferencias en la regulación de la apertura estomática (Andrade, 2007).

Existen 4 fases en el metabolismo ácido de las crasuláceas: la fase I ocurre durante la noche donde los estomas se pueden mantener abiertos; así la tasa de asimilación de CO_2 junto con la concentración del ácido málico aumentan. En la fase II (entre las 9:00 y 12:00hrs) los estomas se mantienen abiertos; sin embargo no hay acumulación de ácido málico debido a que la fijación del CO_2 se da mediante la vía C3 normal. La fase III es típica

en las plantas con MAC y se da durante las horas más luminosas del día, durante esta fase, los estomas de las plantas se cierran por completo, impidiendo el intercambio gaseoso, permitiendo así la descarboxilación del ácido málico acumulado durante la noche y la RUBISCO lo utiliza para llevarlo al ciclo de Calvin. La fase IV ocurre durante el atardecer, cuando la concentración de ácido málico disminuye drásticamente, permitiendo que los estomas se abran para poder asimilar el CO₂ y así reiniciar las fases. Las fases II y IV principalmente, no siempre ocurren en las plantas con MAC debido a que estas plantas dependen principalmente de las condiciones ambientales, por ejemplo, en condiciones de estrés (estrés hídrico o por salinidad) éstas dos fases suelen desaparecer. La absorción nocturna de CO₂ en las plantas MAC presenta un gasto de energía que se sostiene con la degradación de carbohidratos almacenados por la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) (Medrano *et al.*, 2013).

La inversión de recursos en el almacenamiento transitorio de carbohidratos produce inevitablemente una restricción de otras actividades metabólicas, incluida la respiración, crecimiento y aclimatación al estrés abiótico. Se ha observado que se presenta degradación de sacarosa y almidón durante la absorción nocturna de CO₂ (Olmedilla *et al.*, 2010, Medrano *et al.*, 2013).

También se conocen transiciones desde el metabolismo C3 a MAC; llamado MAC facultativo (Iglesias *et al.*, 1987) se describió por primera vez en un informe donde presentaba que el CAM podría ser inducido por una alta salinidad en el halófito anual *Mesembryanthemum crystallinum* L. (Aizoaceae). Se describía que la planta tenía la capacidad de cambiar su ruta de asimilación de CO₂ de C3 a CAM en respuesta a la falta de agua (Winter y Willert, 1972). La expresión del CAM en *M. crystallinum* es facultativo; es decir, opcional, pues las plantas pueden revertir en su mayoría a un fenotipo tipo C3 cuando se elimina el estrés ambiental. En muchas especies CAM, su expresión no es opcional, sino que el CAM es parte de los procesos constitutivos preestablecidos en su desarrollo y su crecimiento (Kluge y Ting, 1978; Osmond, 1978, 2007; Nobel, 1988; Winter y Smith 1996a y b). A medida que los tejidos fotosintéticos maduran, el CAM siempre se desarrolla, independientemente de las condiciones ambientales. Pero incluso en estas plantas CAM constitutivas, puede detectarse un pequeño componente CAM facultativo. En tejidos jóvenes con expresión aún mínima de CAM, el estrés por sequía puede acelerar el aumento ontogenético en la fijación nocturna de CO₂ de manera reversible (Winter *et al.*, 2008, 2011), lo que demuestra que las categorías de CAM constitutiva y facultativa son, en realidad,

puntos finales del CAM que es totalmente controlado por el desarrollo embrionario (ontogenia) y CAM que está controlado por el estrés ambiental (Winter *et al.*, 2011).

vi. SITIO DE COLECTA

El Parque Nacional El Chico, Hidalgo, que se ubica entre las coordenadas de los 20°10'10" latitud Norte y los 98°41'02" longitud Oeste. Está enclavado en la porción elevada de la Sierra de Pachuca, estructura orográfica a su vez integrante del Eje Neovolcánico Transversal, el relieve actual del parque constituye un alineamiento Este-Oeste, edificado por actividad volcánica del terciario, con afloramiento de material rocoso de las formaciones Vizcaína, Cerezo y Zumate pertenecientes al grupo Pachuca. Las diferencias en altitud que presenta desde los 2320 msnm en la porción Norte hasta los 3090 msnm en la porción Sur, así como los rasgos fisiográficos muy particulares, permiten una alta cantidad de hábitat disponibles para la vida silvestre. Sus características son: templado-subhúmedo con verano fresco y largo; temperatura media anual entre 12 y 18°C; temperatura media del mes más frío entre -3 y 18°C, y la del mes más caliente superior a 26.5°C. La precipitación anual es de 1500 mm y el porcentaje de precipitación invernal respecto a la total anual es inferior a 5% (CONANP, 2005).

III. ANTECEDENTES

Para evidenciar el metabolismo ácido de las crasuláceas en plantas vasculares es necesario utilizar diversos métodos, dentro de los cuales el estudio de la anatomía foliar es de los más usados pero no es determinante ya que pueden existir algunas diferencias entre las especies (Welkie y Cadwell, 1970). La titulación del tejido macerado donde la determinación de los cambios diarios en acidez tisular ha sido una medición confiable de la actividad MAC y se ha practicado desde mucho antes de que se hicieran mediciones de fijación de CO₂ (Andrade *et al.*, 2007). El incremento en la acidez tisular es proporcional a la concentración de 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). Para medir la actividad MAC se requiere hacer dos titulaciones del tejido, una al anochecer y otra al amanecer, con una solución alcalina de KOH o NaOH en concentraciones del 0.01-0.05 N (Osmond *et al.*, 1994).

La acidificación se expresa como el incremento nocturno del ácido málico en unidades de equivalentes de acidez o concentraciones de iones hidrógeno (H⁺) por peso fresco, por

área o por volumen de agua de los tejidos (Medina *et al.*, 1989). La absorción del CO₂ durante la noche y el almacenamiento de ácido málico en las vacuolas es seguido por descarboxilación y fijación del CO₂ regenerado durante el siguiente período de luz a través del Ciclo Calvin. Esto da como resultado un ritmo diurno en el contenido de ácido málico de aproximadamente de 100-200 µeq de ácido por gramo de tejido fresco, el cual es la característica de diagnóstico de MAC (Szarek y Ting, 1975). El pH del punto final de la titulación depende del pK del ácido involucrado ($pK = -\log[K]$, donde [K] denota la concentración de una base requerida para disociar 50% del ácido; (Nelson y Cox, 2000). Como el ácido málico tiene un pK₁ de 3.4 y un pK₂ de 5.1 a 25 °C, la titulación a pH 6.5 o 7 remueve 99% del H⁺ que puede disociarse (Nobel, 1988; Osmond *et al.*, 1994). Para las especies que también acumulan ácido cítrico (Lüttge, 2006), el cual tiene tres carboxilos, se necesitaría titular hasta un pH de 8.4 para remover la mayor parte de H⁺, ya que el pK₃ del ácido cítrico es de 6.4 (Franco *et al.*, 1990; Andrade *et al.*, 2007).

Algunas otras metodologías para determinar el tipo de metabolismo de cada una de las especies de plantas son: **Análisis enzimático.** El método enzimático más conveniente para determinar la concentración de malato es con malato deshidrogenasa (Hohorst, 1965) y para determinar la concentración de citrato se usa citrato liasa (Möllering, 1985). Por lo general, sólo se requiere de un gramo del tejido fresco para estas determinaciones (Osmond *et al.*, 1994). **Presencia de almidón.** El almidón es un glucano que está conformado por moléculas de α D – glucosa unida por enlaces glucosídicos y se organiza en grandes gránulos insolubles en donde las cadenas de glucosa presentan un empaquetamiento denso y altamente ordenado que confiere una presión osmótica nula, permitiendo a las plantas almacenar grandes cantidades de glucosa sin perturbar el equilibrio hídrico de las células. El almidón es acumulado en las hojas durante el día y degradado durante la noche para producir sacarosa, se almacena en el estroma de los cloroplastos, donde se acumula para ser movilizado y exportado durante la noche (Ball y Morell; 2003). El almidón que se encuentra en las hojas puede ser detectado mediante tinción con Lugol, permitiendo una coloración azulada; lo que indica la presencia de almidón; así se puede inferir que las regiones donde se encuentra el almidón poseen cloroplastos (Reinoso *et al.*, 2013). **Medición de la asimilación de CO₂.** La mejor manera de conocer la asimilación real de CO₂ de la atmósfera por las plantas es midiendo el intercambio de gases con un analizador de gases en el infrarrojo (Nobel, 1988). Además, porque tanto el CO₂ como el vapor de agua absorben la radiación infrarroja, el analizador

de gases puede medir la tasa de asimilación de CO₂ y la tasa de transpiración de las plantas (Osmond *et al.*, 1994).

En el estudio que realizaron Olmedilla *et al.*, 2010, mediante cortes histológicos de las hojas, pudieron clasificar la fotosíntesis de las plantas que se encuentran en el Cabo de Gata en Almería, donde pudieron encontrar dos especies de *Mesembryanthemum*, las cuales poseen MAC, debido a que poseen un solo tipo de mesófilo con cloroplastos ricos en almidón y plastoglóbulos, concluyendo que el estudio de la anatomía foliar es un método que nos arroja datos interesantes para la clasificación de las especies que se presentan en un determinado lugar.

En un estudio realizado en *Portulaca oleracea*, se pudo concluir que es una planta capaz de desarrollar actividad MAC bajo condiciones de estrés hídrico, a pesar de que es una planta con metabolismo tipo C4. Se pudo demostrar; mediante la identificación del ¹⁴C; que el citrato, el aspartato y el malato fueron los compuestos que se encontraban almacenados dentro de las hojas de las plantas; siendo el malato el compuesto con mayor concentración durante la noche; mientras que, al día siguiente, a media tarde encontraron que el ¹⁴C se encontraba en la fracción insoluble; predominantemente en el almidón (Koch y Kennedy, 1982).

En el estudio que realizó Studnicka en 1991, la anatomía foliar de seis especies mexicanas de *Pinguicula* ha permitido observar las siguientes características:

- Los haces vasculares de las hojas suculentas de las rosetas de invierno de todas las especies tenían forma de corona, los haces presentaban coloración verde oscuro rodeada por células del mesófilo en forma radial de color verde pálido. Una capa prominente del clorénquima también se encuentra en la parte abaxial del mesófilo. La parte superior del mesófilo consiste en tejido de almacenamiento de agua translúcido. La epidermis adaxial superior se observó incolora.
- Se investigaron hojas de las rosetas de verano en *P. moranensis* (que crece en zonas de plantas muy exigentes de humedad) y en *P. gypsicola* (que crece en comunidades xerófilas). Las hojas de verano e invierno son de forma diferente, pero de anatomía similar y con haces vasculares idénticos, el mesófilo es más delgado en las hojas de verano.

Concluyendo que los paquetes verdes observados de las especies de *Pinguicula* indican la presencia de la ruta C4 de la asimilación de CO₂ (Welkie et Caldwell 1970, Nyananyo 1988). Sin embargo, la ocurrencia contingente de MAC en las *Pinguicula* mexicanas se mantiene

cuestionable, debido a que presentan succulencia en sus hojas, sobre todo por el hecho de que solo la anatomía puede no ser determinante.

IV. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que plantas C3 o C4 pueden presentar un metabolismo facultativo o el uso opcional de la fotosíntesis MAC; bajo condiciones de estrés; al igual que las plantas que poseen hojas succulentas; tal como en *Portulaca oleracea* (Koch & Kennedy, 1982).

En el presente trabajo se pretende dar a conocer un poco más acerca del tipo de metabolismo que presentan tres especies del género *Pinguicula*; pues son algunas de las especies que representan a las plantas carnívoras de nuestro país lo que nos permite plantear la siguiente hipótesis:

V. HIPÓTESIS

Se ha propuesto que las *Pinguiculas* mexicanas presentan metabolismo C4; sin embargo, principalmente el grosor de las hojas de roseta de invierno, la falta de glándulas de captura y el estrés por frío a las que están sujetas, nos lleva a proponer que probablemente se presenta el MAC en ellas.

VI. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de un mecanismo tipo MAC en las rosetas de verano e invierno de las especies *P. moranensis*, *P. acuminata* y *P. crassifolia*, mediante la acidez titulable, tasa de asimilación de CO₂, análisis de la anatomía foliar y la identificación de la presencia de almidón

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Colectar ejemplares de *P. moranensis*, *P. acuminata* y *P. crassifolia* en la roseta de invierno, en La presa “El Cedral”, mineral del Chico, Hidalgo.
- Propagar ejemplares de *P. moranensis*, *P. acuminata* y *P. crassifolia* *in vitro* a partir de esquejes presentes en el laboratorio.
- Determinar la actividad MAC en las rosetas de invierno colectadas en campo, mediante acidez titulable y tasa de asimilación de CO₂ con un analizador de gases IRGA
- Analizar la anatomía foliar de las rosetas de invierno en cada especie mediante cortes histológicos y tinción de los mismos con safranina-verde rápido
- Identificar la presencia de almidón mediante la tinción con Lugol en cortes histológicos, realizados en las hojas de roseta de invierno y de verano de cada especie.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS:

i. Propagación de las especies de estudio

Se realizó una colecta de 8 ejemplares de cada especie y se cuantificó *in situ* los ácidos orgánicos totales de las rosetas de invierno, de acuerdo con lo reportado por Andrade *et al.*, 2007, presentes en *P. moranensis*, *P. acuminata* y *P. crassifolia*, en la presa “El Cedral”, mineral el Chico, Hidalgo a una altitud de 2900 msnm, en el mes de octubre del 2017, cuando los individuos se encontraban en roseta de invierno.

Para los experimentos y la evaluación de la acidez titulable *in vivo* se realizaron subcultivos *in vitro* de hojas de roseta de invierno de cada especie a partir de cultivos establecidos en el laboratorio de Cultivo Tejidos Vegetales (Unidad de Morfología y Función, FES Iztacala). Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) a $\frac{1}{4}$ de su concentración original; para su desarrollo, adicionado con 100 mg L^{-1} de inositol, 0.4 mg L^{-1} de tiamina, 20 g L^{-1} de sacarosa como fuente de carbono y 8.5 g L^{-1} de agar, con un pH de 5.7 sin reguladores de crecimiento (Pérez-Sánchez *et al.*, 2017).

Los cultivos permanecieron entre los 22 y 26°C , fotoperiodo de 1678 horas (luz/obscuridad), y con una radiación fotosintéticamente activa de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, por un mínimo de tres semanas hasta que la roseta alcanzó un tamaño de 1 a 1.5 cm.

Se realizaron tres repeticiones para cada uno de los experimentos que a continuación se describen.

ii. Análisis de la morfología de las hojas

Se tomó un par de hojas de cada una de las rosetas (verano e invierno) de cada especie al medio día. Para esta determinación se utilizó una técnica histológica con fijación en FAA (Formaldehído-ácido acético-alcohol 37%, 12% y 50% respectivamente), luego las muestras se sometieron a un tren de deshidratación (50, 80, 96, 100 % de alcohol por 2 horas en cada paso), posteriormente se incluyeron en paraplast, pasando por alcohol xilol (50-50%), xilol (100%) y xilol parafina; 1 hora en cada una y 24 horas para el último paso manteniéndose a una temperatura de 70°C , en cuanto se incluyó la parafina, las hojas se introdujeron en un cubo de parafina para realizar cortes histológicos transversales de un grosor de $20 \mu\text{m}$ con un microtomo de rotación y se tiñeron con el método de Safranina-Verde Rápido de acuerdo a Sandoval (2005); permitiendo observar bajo un Microscopio Olympus K7 las paredes celulares lignificadas (paredes secundarias teñidas de color rojo) y las paredes celulocíticas (paredes primarias teñidas de color verde). Al final se fotografiaron.

iii. Evaluación de la presencia de almidón mediante tinción con lugol

Para esta tinción, se cortaron hojas de roseta de invierno de cada especie al medio día y se mantuvieron en tubos pequeños, luego se eliminó la clorofila mediante incubación con etanol 100 % a 60 °C. Cuando las hojas quedaron blancas (aproximadamente 3-5 min de incubación), se eliminó el etanol y se enjuagaron con agua. Por último, se retiró el agua y se añadió lugol. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos aproximadamente y se enjuagó un par de veces con agua para remover el exceso de colorante, finalmente se realizaron cortes transversales para observar la presencia del almidón (Ragel, 2012). Se fotografiaron a través de un microscopio olimpus K7.

iv. Determinación de Ácidos Orgánicos

Al anochecer (20:00hrs) y al amanecer (08:00hrs); se tomó 1 g de tejido fresco de cada una de las rosetas de invierno de cada especie (3 a 4 hojas con un tamaño promedio de 1.5 a 2 cm) y se maceró con 4 ml de agua destilada hervida. Luego de macerar la muestra, se colocó a baño María durante 10 minutos para la extracción de ácidos orgánicos. Posteriormente se aforó a 20 ml con agua destilada hervida. Con la muestra a temperatura ambiente se tomó la lectura del pH y se tituló a un pH de 8.3, registrando la cantidad de NaOH 0.01N gastados. Para obtener los iones H⁺ de las muestras. La acidificación se expresó como el incremento nocturno del ácido málico en unidades de equivalentes de acidez o concentraciones de iones hidrógeno (H⁺) por peso fresco. Se considera que por cada mililitro de NaOH 0.01M gastados en cada una de las muestras hay 100 μMoles de H⁺.

v. Evaluación de la concentración de CO₂

Se evaluó la tasa de asimilación de CO₂ mediante un analizador de gases (IRGA, GMA4 de PP Systems) en tres ejemplares de cada tipo de roseta de cada especie; es decir; tres evaluaciones para cada roseta de invierno y tres evaluaciones para cada roseta de verano de *P. moranensis*, *P. acuminata* y *P. crassifolia* (tres repeticiones por cada especie en su respectiva roseta), que se mantuvieron dentro de una cámara con sistema cerrado durante 15 minutos. Se midió cada tres horas durante un ciclo de 24 horas

Los datos se trataron estadísticamente mediante análisis descriptivo e inferencial con análisis de varianza de dos factores con un valor de significancia de 0.05 y en su caso con pruebas de comparación de medias, mediante el paquete Sigma Plot ver. 11.1

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

i. Análisis de la morfología de las hojas

Los cortes histológicos mostraron mesófilo clorofílico (Figura 15 A, B, C y D); en comparación con lo reportado por Olmedilla *et al.*, (2010), existe un gran parecido al mesófilo clorofílico que presentan dos especies del género *Mesembryanthemum*, que las reportan como plantas con MAC, mencionando que el análisis de la morfología podría ser una herramienta eficaz para la clasificación de las especies, lo que hace pensar que las plantas del género *Pinguicula* que se analizaron en este trabajo también podrían presentar MAC.

ii. Evaluación de la presencia de almidón mediante tinción con Lugol

En la figura 15; E y 16; A y B se muestra la distribución de los gránulos de almidón, notándose que el almidón se encuentra tanto en el haz vascular como en las células del mesófilo; de lo cual se puede presumir que estas plantas podrían tener actividad de una planta con MAC; debido a que las plantas almacenan los gránulos de almidón en los cloroplastos de las células (Medrano *et al.*, 2013). Contrario a lo reportado por Studnicka en 1991, quien menciona que estos especímenes cuentan con metabolismo C4; sin embargo, en el presente trabajo se demuestra que *P. moranensis*, *P. acuminata* y *P. crassifolia* poseen características de una planta con metabolismo ácido de las crasuláceas.

Por último, se observó bajo el microscopio la nervadura de las hojas de roseta de invierno de las especies estudiadas (Figura 16 C, D y E). Se pudo determinar que la distribución de la nervadura que presentan las rosetas de invierno es reticulada.

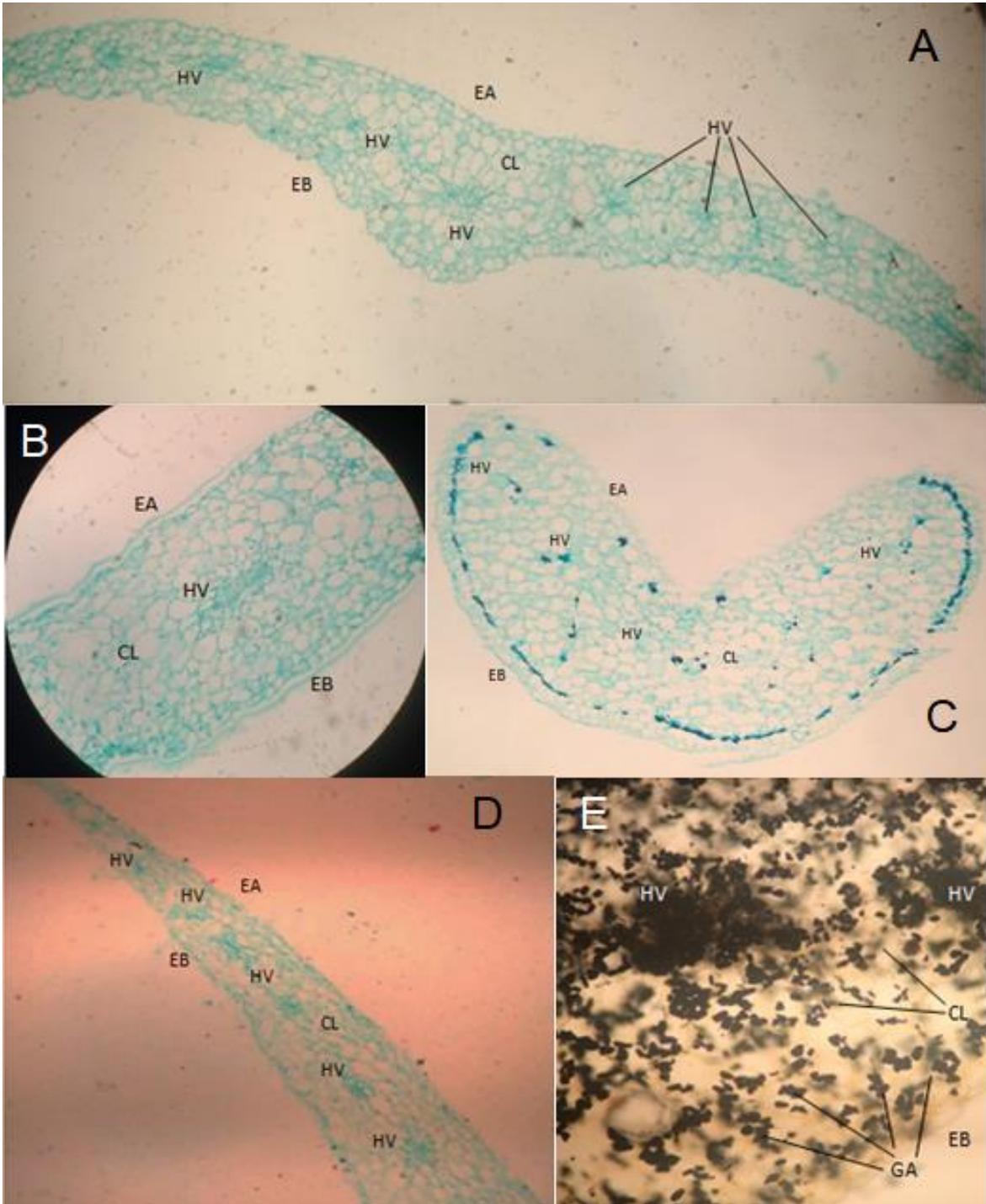


Figura 15. Cortes transversales sometidos a tinción Safranina-Verde rápido de A) una hoja de roseta de verano de *P. moranensis*; B) una hoja de roseta de invierno de *P. moranensis*; C) una hoja de roseta de invierno de *P. crassifolia*; D) una hoja de roseta de invierno de *P. acuminata* y E) un corte transversal sometido a tinción con Lugol de roseta de invierno de *P. moranensis*. En esta foto se aprecian algunos cloroplastos; CL. Se pueden apreciar los haces vasculares HV; el clorénquima CL; la epidermis adaxial EA y la epidermis abaxial EB.

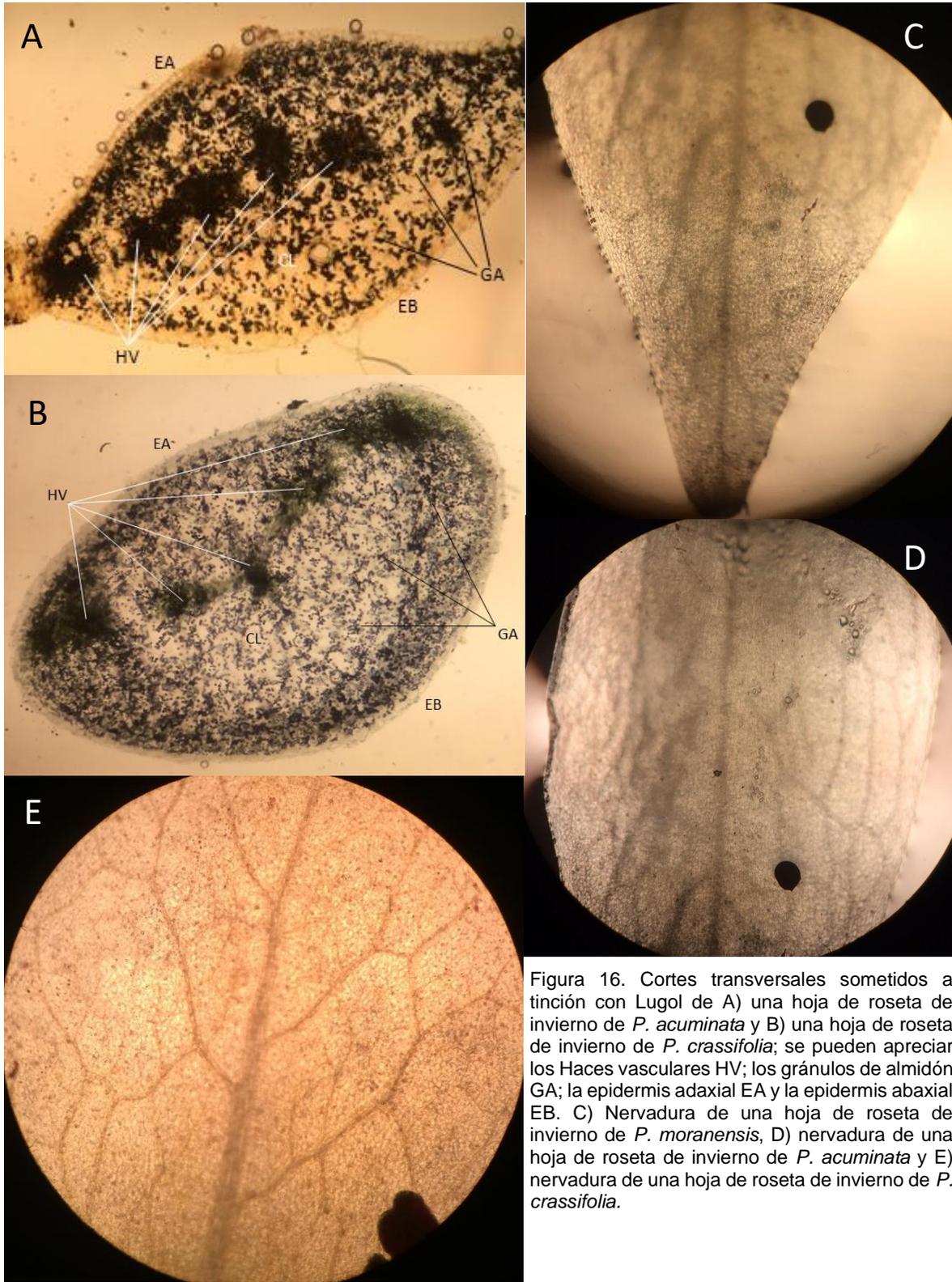


Figura 16. Cortes transversales sometidos a tinción con Lugol de A) una hoja de roseta de invierno de *P. acuminata* y B) una hoja de roseta de invierno de *P. crassifolia*; se pueden apreciar los Haces vasculares HV; los gránulos de almidón GA; la epidermis adaxial EA y la epidermis abaxial EB. C) Nervadura de una hoja de roseta de invierno de *P. moranensis*, D) nervadura de una hoja de roseta de invierno de *P. acuminata* y E) nervadura de una hoja de roseta de invierno de *P. crassifolia*.

iii. Determinación de los ácidos orgánicos

La cuantificación de ácidos orgánicos en tejido fresco de las hojas de roseta de invierno de todas las especies; muestran un incremento en la cantidad de μM de H^+ al inicio del día (08:00h) en comparación con la cantidad obtenida al final del día (20:00h) (Tabla 1). En el caso de las rosetas de invierno de *P. acuminata* se presentó un incremento de 77 μM ; en la de *P. crassifolia* presentó un incremento de 11 μM ; en la de *P. moranensis* presentó un incremento de 11 μM . Finalmente, en la roseta de verano de *P. moranensis* presentó un incremento de solo 9 μM ; sin embargo, no se pudo realizar la determinación de ácidos en las rosetas de verano de las otras dos especies debido a que los ejemplares no lograron sobrevivir a las condiciones que se presentaban en el laboratorio.

De acuerdo con lo reportado por Szarek y Ting en 1975 y por Boston y Adams en 1983, los datos que se obtuvieron en esta prueba en las rosetas de invierno; se puede mencionar, que las plantas estudiadas han acumulado ácidos orgánicos, permitiendo demostrar que las plantas en cuestión poseen MAC; tal como las características de una planta con MAC que ha reportado Andrade *et al.*, 2007. Además, el hecho de que algunas plantas del género *Pinguicula* presenten succulencia en las hojas de sus rosetas de invierno nos demuestra que las plantas podrían cambiar su tipo de metabolismo debido a las condiciones ambientales tal como lo demuestra Koch y Kennedy (1982) en su trabajo con plantas C4 que presentan características del MAC bajo condiciones de estrés hídrico.

$\mu\text{moles de H}^+ / \text{g de Tejido Fresco de la titulación potenciométrica en tejidos}$

Especie	Hora del día	
	20:00	08:00
<i>P. acuminata</i> (Roseta Invierno)	46.6666 \pm 11.547	123 \pm 31.1929
<i>P. crassifolia</i> (Roseta Invierno)	4.3333 \pm 1.5275	15 \pm 8.6602
<i>P. moranensis</i> (Roseta Invierno)	2.6666 \pm 2.5166	13.3333 \pm 7.6376
<i>P. moranensis</i> (Roseta Verano)	26.6666 \pm 11.547	35 \pm 5

Tabla 1. Promedio con desviación estándar de μM de H^+ / g de tejido fresco obtenidos de la titulación potenciométrica de los ácidos orgánicos.

iv. Evaluación de la concentración de CO_2

Las plantas que se colectaron en la presa “El Cedral” se mantuvieron a una temperatura promedio de 16°C para mantener estable la temperatura ambiente en la que se colectaron los especímenes. Una vez que se realizó el análisis de la tasa de asimilación de CO_2 , éstas se cultivaron en un ambiente con temperatura promedio de 26°C.

En el caso de las rosetas de verano de *P. moranensis* que se mantuvieron a una temperatura promedio de 16°C (Figura 17) mostró liberación de CO₂ al inicio y durante el día; mientras que, en el periodo nocturno, la concentración de CO₂ en ppm disminuyó 62 ppm, comparándolo con la curva de asimilación de CO₂ clásica de Osmond (1978) (Figura 23), se puede discutir que esta roseta posee un comportamiento MAC. En la prueba con roseta de verano de esta misma especie con una temperatura de 26°C (Figura 18) mostró una disminución en la concentración en ppm de CO₂ al final del día (mientras oscurece); disminuyendo 60 ppm, indicando así que las plantas estaban fijando el CO₂, demostrando un comportamiento MAC, comparándolo con lo reportado por Osmond, 1978 (Figura 23).

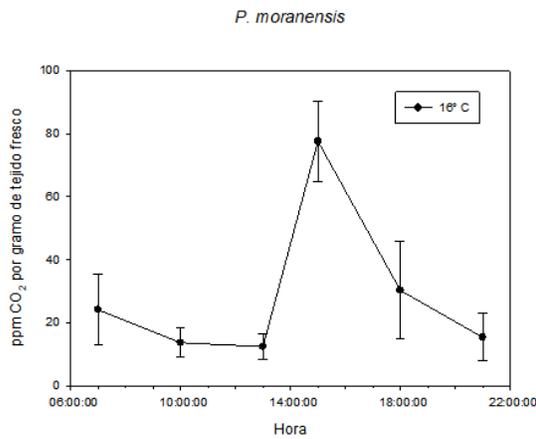


Figura 17. Asimilación de CO₂ en roseta de verano de *P. moranensis* a 16° C. Desv. Est. \pm (n=3).

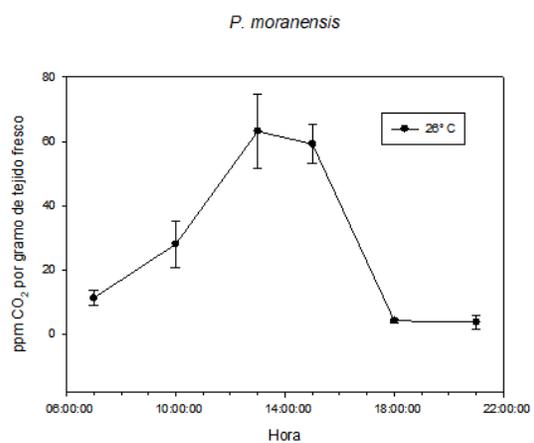


Figura 18. Asimilación de CO₂ en rosetas de verano de *P. moranensis* a 26° C. Desv. Est. \pm (n=3).

La concentración de CO₂ de *P. acuminata* en su roseta de invierno a una temperatura de 16°C (Figura 19), muestra una disminución de 5 ppm, mientras las plantas son sometidas a oscuridad (de acuerdo con lo reportado por Osmond, 1978; Figura 23), se presume que esta determinación indica que estas rosetas poseen un comportamiento tipo MAC. En el caso de las rosetas de invierno de *P. acuminata* a una temperatura de 26 °C (Figura 20), la tasa de asimilación se mantuvo estable durante todo el día; sin embargo, las determinaciones que se realizaron al final del día nos indican que las rosetas se encontraban asimilando el CO₂ pues su concentración disminuyó 0.65 ppm a partir de las

16:00h, se presume que este comportamiento es parecido a las plantas con MAC (Nobel, 1988).

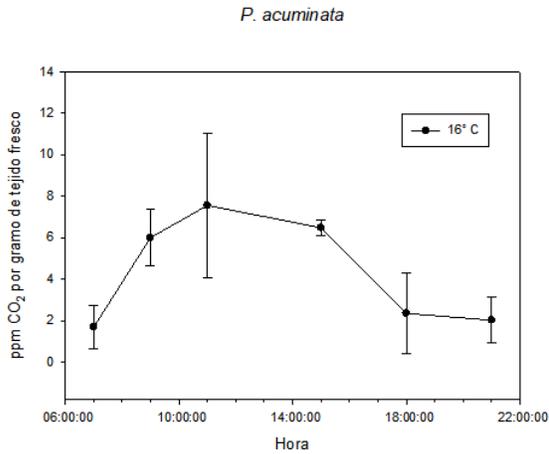


Figura 19. Asimilación de CO₂ en rosetas de invierno de *P. acuminata* a 16°C; Desv. Est. \pm (n=3).

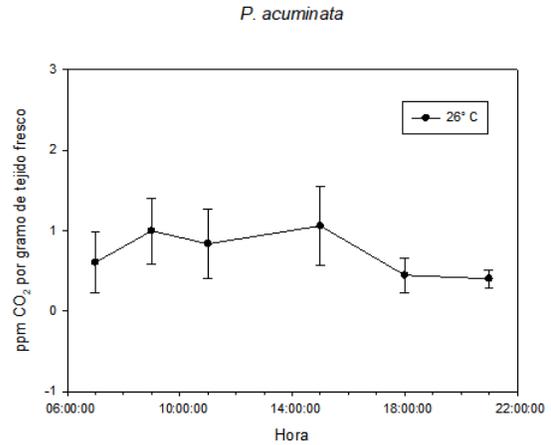


Figura 20. Asimilación de CO₂ en rosetas de invierno de *P. acuminata* a 26°C; Desv. Est. \pm (n=3).

En el caso de las rosetas de invierno de *P. moranensis* (Figura 21), se muestra un patrón similar a lo reportado por Osmond, 1978 (Figura 23). Se puede observar que a partir de las 13:00h comenzó a disminuir la concentración de CO₂ en 16 ppm hasta las 18:00h y en la siguiente determinación (21:00h) aumentó su concentración a 11 ppm de CO₂.

Por último, el patrón que se aprecia en las determinaciones de las rosetas de invierno de *P. crassifolia* a una temperatura de 16°C (Figura 22), es similar a la que reporta Osmond, 1978 (Figura 23); con especial énfasis en las últimas dos determinaciones; ya que, es al final del día cuando la concentración de CO₂ disminuye 10 ppm, presumiendo que las rosetas de invierno de esta especie poseen MAC. Sin embargo, se necesita realizar más determinaciones para disminuir la variación que presentó esta prueba.

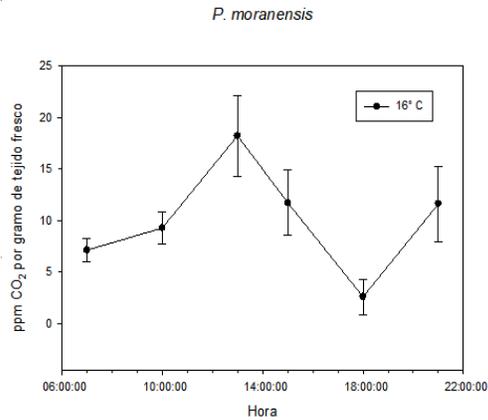


Figura 21. Asimilación de CO₂ en rosetas de invierno de *P. moranensis* a 16° C- Desv. Est. +- (n=3).

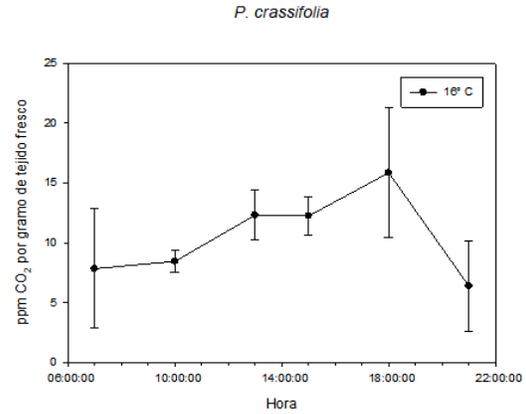


Figura 22. Asimilación de CO₂ en rosetas de invierno de *P. crassifolia* a 16° C. Desv. Est. +- (n=3).

Lo que permitiría asegurar lo que aquí se describe; se pretende realizar el análisis enzimático de la Malato deshidrogenasa y la actividad de la fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPC), además de hacer un seguimiento más extenso en la medición de la concentración del CO₂ para corroborar de manera concisa que las especies que se estudiaron poseen el Metabolismo Ácido de las Crasuláceas.

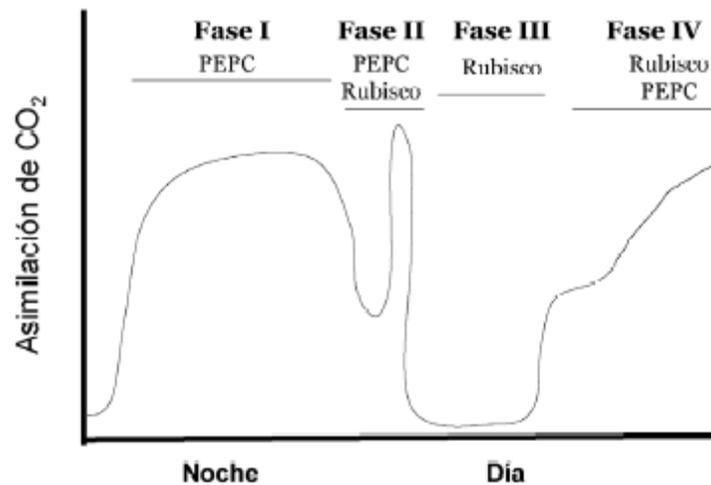


Figura 23. Curva de asimilación de CO₂ de una planta CAM bien irrigada. Se muestran las cuatro fases típicas de la fotosíntesis CAM con las enzimas fijadoras de CO₂ correspondientes (Modificado de Osmond, 1978).

X. CONCLUSIÓN

De acuerdo con las evidencias obtenidas en las mediciones de la acidez titulable, las rosetas de invierno de las especies que se estudiaron; poseen metabolismo ácido de las Crasuláceas pues presentaron un aumento en la concentración de ácidos orgánicos en la segunda determinación (a las 8:00hrs), en comparación con la primer medición que se realizó al anochecer (20:00hrs). En cuanto a la medición de la acidez titulable en la roseta de verano de *P. moranensis* se aprecia una disminución en la concentración de ácido orgánico, en comparación con las mediciones de la roseta de invierno de la misma especie; sin embargo, se sigue viendo cierta acumulación de ácido orgánico en la segunda determinación (08:00hrs).

En cuanto a la concentración de CO₂; las determinaciones de las rosetas de invierno de todas las especies sometidas a ambas temperaturas (16°C y 26°C), disminuían en cuanto las rosetas se sometían al periodo nocturno, presumiendo que las plantas, en este estado, asimilaban el CO₂; mientras que en el periodo con luz aumentaba la concentración del CO₂, deduciendo que las rosetas no lo capturaban.

La anatomía de las hojas es muy similar a la anatomía de las plantas MAC, debido a que presentan un solo tipo celular, pues no presentan diferenciaciones en los tipos celulares de los haces vasculares y las células clorocromatófilas del mesófilo. Cabe mencionar que la nervadura que presentan las hojas de las rosetas de invierno de las tres especies es reticulada.

En las pruebas para la determinación de gránulos de almidón; se pudo demostrar que las plantas tienen actividad fotosintética del tipo MAC pues los gránulos de almidón se presentaron de manera homogénea; tanto en los haces vasculares como en todo el tejido clorocromatófilo.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcalá, R. E. & Domínguez, C. A. 1997. Biología de las plantas carnívoras: aspectos ecológicos y evolutivos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60: 59 - 69.
- Andrade, J L; 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. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*.81: 37 - 50.
- Ball, S. & Morell, M. 2003. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 207 – 33.
- Blondeau, G. 2004. El gran libro de las Plantas Carnívoras. Barcelona. Editorial de Vecchi. 158 pp.
- Borland, A. M; Griffiths, H; Maxwell, C; Fordham, M. C. & Broadmeadow, M. S. J. 1996. CAM induction in *Clusia minor* L. during the transition from wet to dry season in Trinidad: the role of organic acid speciation and decarboxylation. *Plant, Cell & Environment*. 19: 655 - 664.
- Boston, H. L. & Adams, M. S. 1983. Evidence of crassulacean acid metabolism in two North American isoetids. *Aquatic Botany*. 15: 381 - 386.
- Castañón, C. A. 2015. “Germinación in vitro y micropropagación de *Pinguicula moctezumae* Zamudio & R. Z. Ortega (Lentibulariaceae)” Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Challenger, A. & Soberón, J. 2008. “Los ecosistemas terrestres” en *Conabio. Capital Natural de México, Volumen I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Pp 31 - 110.
- Chapin, C.T. & Pastor, J. 1994. Nutrient limitations in the northern pitcher plant *Sarracenia purpurea*. *Canadian journal of Botany* 73: 728 - 734.
- Chen, L-S; Lin, Q. & Nose, A. 2002. A comparative study on diurnal changes in metabolite levels in the leaves of three Crassulacean acid metabolism (CAM) species, *Ananas comosus*, *Kalanchoë daigremontiana* and *K. pinnata*. *Journal of Experimental Botany*. 53: 341 - 350.

- CONANP. 2005. "Descripción del Área Natural Protegida". *Programa de Conservación y Manejo Parque Nacional EL Chico*. Pp. 21 – 58.
- D'Andrea, R. M; Andreo, C. S. & Lara, M. V. 2014. Deciphering the mechanisms involved in *Portulaca oleracea* (C4) response to drought: metabolic changes including crassulacean acid-like metabolism induction and reversal upon re-watering. *Physiologia Plantarum* 152: 414 - 430
- Dobson, H. E. M. 1987. Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecología*. 72: 618 - 623.
- Duno de Stefano, R. 2016. Las familias de plantas carnívoras en la península de Yucatán, México. *Desde el herbario CICY*. 8: 85 - 89.
- Fish, D. & Hall, D. W. 1978. Succession and stratification of aquatic insects inhabiting the leaves of the insectivorous pitcher plant, *Sarracenia purpurea*. *The American Midland Naturalist*. 99: 172 - 183.
- Franco, A. C; Ball, E. & Lüttge, U. 1990. Patterns of gas Exchange and organic acid oscillations in tropical trees of the genus *Clusia*. *Oecologia* 85:108 - 114
- Franco, A. C; Ball, E. & Luttge, U. 1992. Differential effects of drought and light levels on accumulation of citric and malic acids during CAM in *Clusia*. *Plant, Cell & Environment*. 15: 821 – 829.
- Galen, C. 1989. Measuring pollinator-mediated selection on morphometric floral traits: bumblebees and the alpine sky pilot. *Polemonium viscosum*. *Evolution*. 43: 882-890.
- García, M. A; López, A; Mallo, D. & Martínez, O. 2007. Plantas carnívoras. *Rebigo* 2: 7-14.
- Geydan, T. D. & Melgarejo, L. M. 2005. "Metabolismo ácido de las Crasuláceas". *Acta Biológica Colombiana*. 10(2): 3 - 15.
- Givnish, T. J; Burkhardt, E. L; Happel, R. E. & Weintraub, J. W. 1984. Carnivory in the bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient-poor habitats. *American Naturalist* 124: 479 - 407.

- Glossner, F. 1992. Ultraviolet patterns in the traps and flowers of some carnivorous plants. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*. 113: 577 - 587.
- González, A. M. 2013. Anatomía foliar: Modificaciones en hojas de angiospermas relacionadas con la fotosíntesis. 21-11-2019, de Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina Sitio web: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema21/21-6modi-fotos.htm>
- Heslop-Harrison, Y. 1978. Carnivorous plants. *Scientific American*. 238(2): 104 - 115
- 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
- Hooker, J. D. 1846. *Pinguicula orchidioides*. *The Botanical Magazine* 72: tabl. 4231.
- Iglesias, A; González, D. H. & Andreo, C. S. 1987. Crassulacean acid metabolism: a pathway for synthetic CO₂ fixation in arid habitats. *Biochemical Education* 15(3): 111 - 115.
- Kluge, M. & Ting, I. P. 1978. *Crassulacean acid Metabolism*. Berlin. Heidelberg: Springer.
- Koch, K. & Kennedy, R. 1982. Crassulacean acid metabolism in the succulent C₄ dicot, *Portulaca oleracea* L. under natural environmental conditions. *Plant Physiology* 69: 757 - 761.
- Koleff, P; Soberón, J; Arita, H; Dávila, P; Flores-Villela, Ó; Golubov, J; Halffter, G; Lira-Noriega, A; Moreno, C. E; Moreno, E; Munguía, M; Murguía, M; Navarro-Sigüenza, A. G; Téllez, O; Ochoa-Ochoa, L; Townsend-Peterson, A. & Rodríguez, P. 2008. "Patrones de diversidad espacial en grupos selectos de especies" en: *Conabio. Capital Natural de México, Volumen I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Pp. 323 – 364.
- Larcher, W. 1988. *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin. 254 pp.
- Legendre, L. 2000. "The genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae): an overview. *Acta Botánica Gallica*. 147: 77 - 95.

- León, G. L. 2019. La “atrapamoscas” una de las plantas carnívoras más raras del planeta. Consultado en 2020, de El Faro Ceuta. Sitio Web: <https://elfarodeceuta.es/atrapamoscas-planta-carnivora-rara/>
- Llorente-Bousquets, J. & Ocegueda, S. 2008. Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. Pp. 283 - 322.
- Lloyd, F. E. 1942. Carnivorous Plants. Waltham, Mass. Chronica Botanica Company. 376 pp.
- López-Sandoval, J. A. 2015. Anatomía de Plantas Cultivadas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Ed. Estado de México, México. Pp. 224 - 225.
- Lüttge, U. 1983. Ecophysiology of carnivorous plants. En: *Encyclopaedia of Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin. Lange O. L., Nobel P. S., Osmond C. B. y Zeigler H. (Eds). Pp 489 - 517.
- 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.
- Medina, E; Olivares, E; Díaz, M. & Van der Merve, N. 1989. Metabolismo ácido de crasuláceas en bosques húmedos tropicales. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. 27: 56 - 67.
- Medrano, H; Galmés, J. & Flexas, J. 2013. “Fotorrespiración y mecanismos de concentración del dióxido de carbono” en *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 2ª Ed. McGraw-Hill. Pp 227 - 246.
- Möllering, H. 1985. Citrate determination with citrate lyase, MDH and LDH. En: Bergmeier H.U. Ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Pp. 2 - 12.
- Moreno S, S. F. 2012. “Fotosíntesis. Fijación autotrófica del CO₂” en *Temas selectos de bioquímica general*. Pearson Education. Sonora, México. Pp. 161 - 185.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2000. Lehninger, principles of biochemistry. 3rd Edition, Worth Publishing. New York. 1200 pp.

- Nobel, P. S. 1988. Environmental Biology of Agaves and Cacti. Cambridge University Press. Cambridge, U. K. 270 pp.
- Nyananyo, B. L. 1988. The systematic significance of seed morphology and anatomy in the *Portulacaceae* (Centrospermae). *Folia Botanica et Phytotaxonomica* 23: 275 - 279.
- Olmedilla A, A; Alché R, J. de D. & Rodríguez G, M. I. 2010. "Identificación Histológica de plantas C4 y CAM" en *C4 y CAM. Características generales y uso en programas de desarrollo de tierras áridas y semiáridas*. CSIC, Fundación Ramón Areces. Pp 107 - 114.
- Olvera G, M. 1996. El género *Utricularia* (LENTIBULARIACEAE) en México. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica*. 67 (2): 347 - 384.
- Orsenigo, M; Patrignani, G. & Rascio, N. 1997. "Ecophysiology of C3, C4 and CAM plants". En: *Handbook of Photosynthesis*. Pessarakli, M. Ed. Marcel Dekker, N. York. Pp 1 - 5.
- Osmond, C. B. 1978. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annual Review of Plant Physiology*. 29: 379 - 414.
- Osmond, C. B; Adams III, W. W. & Smith, S. D. 1994. Crassulacean acid metabolism. En: Percy R.W., Ehleringer J., Mooney H.A. y Rundel P. W. Eds. *Plant Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation*. Chapman y Hall, Londres Pp. 255-280.
- Osmond, C. B. 2007. Crassulacean Acid Metabolism: now and then. *Progress in Botany*. 68: 3 - 32.
- Pérez-Sánchez, J; Reyero-Saavedra, R; Pozos-Ruiz, Y; Verastegui-Vidal, M; & Ortiz-Montiel, J. G. 2017. Propagación *in vitro* de *Pinguicula moranensis* H. B. K., var. Neovolcánica Z." *Revista BIO Ciencias*. 4(03): 179 - 188.
- Ragel de la T, P. 2012. *Identificación y caracterización de los elementos implicados en el inicio de la síntesis de almidón en plantas*. (tesis de doctorado). Universidad de Sevilla. CSIC. España.
- Real, L. & Ratchke, B. J. 1991. Individual variation in néctar production and its effect on fitness in *Kalmia latifolia*. *Ecology*. 72: 149 – 155.

- Reinoso E, S. S; Flores, M. L. & Castellanos J, S. E. 2013. *Características citomorfológicas y microquímicas de las especies medicinales conocidas popularmente como aceituno, siete negritos, jacaranda y hierba del cáncer* (seminario de investigación). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Robles, E. & Becerra, M. 2007 “*Pinguicula lusitanica* L. (Lentibulariaceae), novedad florística para la provincia de Málaga”. *Acta Botánica Malacitana*, 32: 275 - 276.
- Sandoval, Z. E. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Volumen 38 de Cuadernos del Instituto de Biología. UNAM. 278 pp.
- Sarukhán, J; Koleff, P; Carabias, J; Soberón, J; Dirzo, R; Llorente-Bousquets, J; Halffter, G; González, R; March, I; Mohar, A; Anta, S & de la Maza, J. 2009. Capital Natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Conabio. México. 101 pp.
- Schnell, D. E. 1976. *Carnivorous Plants of the United States and Canada*. Winston-Salem, N. Carolina. John F. Blair Publisher.
- Slack, A. 1979. Carnivorous plants. MIT Press. Cambridge Mass. 224 pp.
- Studnicka, M, 1991. Interesting succulent features in the *Pinguicula* species from the Mexican Evolutionary Centre. *Folia Geobotanica et phytotaxonomica* 26: 459 - 462.
- Sydenham, P. H. & Findlay, G. P. 1973. The rapid movement of the bladder of *Utricularia* sp. *Australian Journal of Biological Sciences*. 26: 1115 – 1126.
- Szarek, S. R. & Ting, I. P. 1975. Photosynthetic efficiency of CAM plants in relation to C3 and C4 plants. In: R. Marcell (Editor), *Environmental and Biological Control of Photosynthesis*. Junk, TheHague. 408 pp.
- Tejero - Díez, J. D; Aguilar-Rodríguez, S; Granillo-Velázquez, M. del P; Pozos-Banda, G. N; Rico-Montiel, R. & Abundiz-Bonilla, L. A. M. 2014. PLANTAE Introducción al estudio de las plantas con embrión. 2ª Ed. 302 pp.
- Tymoczko, J. L; Berg, J. M. & Stryer, L. 2014. El ciclo de Calvin en: *Bioquímica; Curso básico*. Versión española traducida por: Juan Manuel González Mañas. Barcelona: Editorial Reverté. Pp 407 - 420.

- Villaseñor, J. L. & Ortiz, E. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 134 - 142.
- Vogel, S. 1983. Ecophysiology of zoophilic pollination, en: *Encyclopaedia of Plant Physiology* Vol. 12 C. (Responses to the chemical and biological environment). Springer-Verlag. Berlin. Pp. 559 - 624.
- Welkie, G. W. & Caldwell, M. 1970. Leaf anatomy of species in some dicotyledon families as related to the C3 and C4 pathways of carbon fixation. *Canadian Journal of Botany*. 48: 2135 - 2146.
- Williams, S. E. 1980. How "Venus" flytraps catch spiders and ants. *Carnivorous plant Newsletter*. 9: 65 - 79.
- Winter, K; García, M. & Holtum, J. 2008. On the nature facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoe* and *Opuntia*. *Journal of Experimental Botany*. 59: 1829 - 1840.
- Winter, K; García, M. & Holtum, J. 2011. Drought-stress-induced up-regulation of CAM on seedlings of a tropical cactus, *Opuntia elatior*, operating predominantly in the C3 mode. *Journal Experimental Botany*. 62: 4037 - 4042
- Winter, K. & Smith, J. 1996a. An introduction to crassulacean acid metabolism. Biochemical principles and ecological diversity. En: *Crassulacean Acid Metabolism*. Winter, K. & Smith, J. Eds. Berlin: Springer. Pp 1 - 13.
- Winter, K. & Smith, J. 1996b. Crassulacean Acid Metabolism: current status and perspectives. En: *Crassulacean Acid Metabolism*. Winter, K. & Smith, J. Eds. Berlin: Springer. Pp. 389 - 426.
- Winter, K. & von Willert, D. J. 1972. NaCl – induzierter Crassulaceen Säurestoffwechsel bei *Mesembryanthemum crystallinum*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 67: 166 - 170.
- Zamudio, S. 1988. Dos nuevas especies de *Pinguicula* (LENTIBULARIACEAE) del centro y norte de México. *Acta Botánica Mexicana*. 3: 21 - 28
- Zamudio, S. 1999. Notas sobre la identidad de *Pinguicula moranensis* H. B. K. con la descripción de una variedad nueva. *Acta Botánica Mexicana*. 49: 23 - 34.

- Zamudio, S. 2001. Una especie nueva notable de *Pinguicula* (Lentibulariaceae) de los estados de Querétaro y San Luis Potosí, México. *Boletín de la Sociedad Botánica Mexicana*. 68: 85 - 88.
- Zamudio, S. 2005a. "Lentibulariaceae" Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, Pátzcuaro, Michoacán.
- Zamudio, S. 2005b. "Dos especies nuevas de *Pinguicula* (Lentibulariaceae) de la Sierra Madre Oriental, México". *Acta Botánica Mexicana* 70: 69 - 83.
- Ziaratnia, S. M; Kunert, K. J. & Lall, N. 2009. Elicitation of 7-methyljuglone in *Drosera capensis*. *South African Journal of Botany*. 75: 97 - 103.