



Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

**“Estudio morfofisiológico del desarrollo de la
plántula de *Turbinicarpus horripilus* (Lem.)
Vác. John & Riha (Cactaceae)”.**

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

MARIA BERENICE JARQUIN PACHECO

Director: Dr. David M. Díaz Pontones

Asesores: Dra. Paz Alejandra Quintanar Isaías

Dra. Cecilia Leonor Jiménez Sierra

México D. F.

Diciembre 2009.

**“La Maestría en Biología de la
Universidad Autónoma Metropolitana
pertenece al Padrón de Posgrados
de Excelencia de CONACYT”**

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

Biól. Maria Berenice Jarquin Pacheco.

9 de Diciembre de 2009

Sinodales:

Presidenta: Dra. Dra. Cecilia Leonor Jiménez Sierra.

Secretaria: Dra. Paz Alejandra Quintanar Isaías.

Vocal: Dra. Rocío Cruz Ortega.

Vocal: M. en C. María Eugenia Fraile Ortega.

ÍNDICE

I.- Resumen.....	1
II.- Abstract.....	2
III.- Introducción.....	3
IV.- Antecedentes.....	5
A.- Las cactáceas y su ubicación taxonómica.....	5
B.- Distribución de <i>Turbinicarpus</i>	6
C.- Adaptaciones morfofisiológicas de las cactáceas.....	11
V.- Justificación.....	17
VI.- Objetivos.....	18
VII.- Hipótesis.....	19
VIII.- Metodología.....	20
A.-Material Biológico.....	20
1.- Obtención de semillas.....	20
2.- Germinación y obtención de las plántulas.....	20
a.- Germinación.....	20
b.- Obtención de plantas en desarrollo y estrés hídrico...	22
B.- Anatomía de <i>Turbinicarpus horripilus</i>	23
1.- Estructura de la testa.....	23
2.- Anatomía durante el desarrollo de la plántula.....	24
C.- Transformación bioquímico-tisular.....	25
1.- Obtención del material para las cuantificaciones bioquímico- tisulares.....	25

2.- Cantidad de equivalentes ácidos producto de la fotosíntesis.....	26
3.- Actividad de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa.....	27
4.- Cuantificación de Ácido Málico.....	29
D.- Contenido relativo de agua (CAR).....	30
IX.- Resultados.....	31
A.- Germinación y postgerminación.....	31
1.- Semilla.....	31
2.- Estructura de la Testa.....	31
3.- Germinación.....	33
4.- Postgerminación.....	34
B.- Morfometría de la plántula.....	35
C.- Anatomía e histoquímica de la plántula.....	39
1.- Meristemo apical y la formación en espinas.....	39
2.- Tallo.....	42
a.- Epidermis.....	42
b.- Corteza primaria.....	43
c.- Sistema vascular.....	47
3.- Raíz.....	49
D.- Desarrollo y transformación hacia el metabolismo ácido de las crasuláceas.....	51
1.- Plántulas provenientes de semillas almacenadas durante seis meses.....	51
2.- Plántulas provenientes de semillas almacenadas durante once meses.....	54

a.- Estudio de la transformación metabólica con plántulas crecidas sin limitaciones de agua.....	54
b.- Estudio de la transformación metabólica con plántulas crecidas con limitaciones de agua.....	57
3.- Plántulas provenientes de semillas almacenadas durante catorce meses.....	59
a.- Efecto del almacenamiento en el tiempo de transformación del metabolismo C ₃ a CAM.....	59
b.- Contenido de agua relativa (CRA).....	60
E.- Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC).....	61
F.- Confirmación de la transformación del metabolismo de C ₃ a CAM.	62
X.- Discusión.....	64
XI.- Conclusión.....	74
XII.- Perspectivas.....	77
XIII.- Bibliografía.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Mapa de la localización de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán en el Estado de Hidalgo	7
Figura 2.- Barranca de Metztitlán.....	8
Figura 3.-Individuos adultos de <i>T. horripilus</i>	11
Figura 4.- Diagrama del Metabolismo Acido de las Crasuláceas (CAM).....	14
Figura 5.- Condiciones en que se realizó la germinación.....	21
Figura 6.- Crecimiento de la plántula.....	23
Figura 7: Diagrama representativo del procedimiento general que se lleva acabo para realizar la titulación ácida.....	27
Figura 8: Diagrama representativo del procedimiento general que se lleva acabo para realizar la cuantificación de la actividad de la PEP carboxilasa...	28
Figura. 9: Detalles de la organización interna de la semilla de <i>T. horripilus</i>	32
Figura 10: Germinación de la semilla de <i>T. horripilus</i>	33
Figura 11.- Velocidad de crecimiento de la radícula.....	35
Figura 12.- La relación L/A conforme el desarrollo de la plántula.....	36
Figura 13: Peso fresco de las plántulas.....	38
Figura 14: Detalles del meristemo apical de <i>T. horripilus</i>	41

Figura 15: Detalles de la epidermis de <i>T. horripilus</i>	45
Figura 16: Detalles de las células del clorénquima de <i>T. horripilus</i>	46
Figura 17: Detalles del sistema vascular de <i>T. horripilus</i>	48
Figura.18: Detalles de la raíz de <i>T. horripilus</i>	50
Figura 19: Titulación ácida de plántulas provenientes de semillas con seis meses de almacenamiento.....	53
Figura 20: Titulación ácida de plántulas provenientes de semillas con once meses de almacenamiento.....	56
Figura.21: Titulación ácida de plántulas provenientes de semillas con once meses de almacenamiento, sometidas a estrés hídrico.....	58
Figura 22: Titulación ácida de plántulas provenientes de semillas con catorce meses de almacenamiento.....	60
Figura 23.- Promedio de la cantidad de agua relativa (CAR) en plántulas de cuatro meses de edad.....	61
Figura 24: Determinación de ácido málico.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Parámetros medidos en los diferentes edades de la plántula.....25

Tabla 2.- Cambio en el peso fresco de las plántulas de diferentes edades (en
función al tiempo de almacenamiento y lugar de colecta).....37

ABREVIATURAS

An = ancho.

A = densidad óptica.

am= Coeficiente de extinción.

C= Concentración.

CAM = metabolismo ácido de las crasuláceas (por sus siglas en inglés; Crasulacean Acid Metabolism).

CRA= Contenido Relativo de Agua.

CITES = Convention on International Trade in Endangered Species of wild Fauna and Flora. (por sus siglas en inglés). Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de flora y fauna silvestre.

CO₂ = dióxido de carbono.

CONABIO = Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

HCO₃⁻ = ácido carbónico.

HR = humedad relativa.

IC = índice de crecimiento.

L = longitud.

l = paso de luz.

MgCl₂: cloruro de magnesio.

NAD: dinucleótido de nicotinamida y adenina.

NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina hidrogenasa.

PEP = fosfoenolpiruvato.

PEPC= enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

UICN = Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

Vu = vulnerable.

Dedicatoria

Esta tesis la dedico a mi madre: Soledad (qepd), a mi padre: Aurelio, a mis hermanos: Janet, Jaqueline y Armando.

A mi compañero inseparable: Gilberto...

A mis guías y profesores: Alejandra (AQI), David, Maru.

A mis amigos: Monse, Esperanza, Anita.

Agradecimientos

Antes que nada agradezco a mis padres: Soledad y Aurelio, que me dieron la oportunidad de seguir estudiando, doy gracias por todo el apoyo que me brindaron a lo largo de mi carrera, por todos aquellos consejos que me dieron y que me sirvieron de mucho, por todo el tiempo que invirtieron en mi formación, en mi persona y ante todo por ser mis padres...

Agradezco a mis hermanos: Janet y su hijo, por todas las pláticas, aventuras y consejos a Jacqueline por todos aquellos juegos y ocurrencias y Armando por toda la ayuda que me brindaste, la compañía, los consejos, a todos ellos gracias...

Doy las gracias también al compañero especial e inseparable, amigo y colega...Gilberto. Por todas aquellas largas charlas nocturnas, por las caminatas incansables, el trabajo incesante y ayuda en la realización del trabajo, las críticas, la compañía, por el apoyo incondicional y desmedido que me ofreciste, por el hombro que me brindaste en los momentos más difíciles, por todo el tiempo que me dedicaste, por todo ello gracias...

A una persona que admiro y respeto mucho... A esta persona que por más mal que marchen las cosas sigue adelante, que nunca se rinde y que confía en nosotros como alumnos, a ella por todo el tiempo dedicado a nuestra formación, todas las enseñanzas, consejos que me brindaste, el ánimo y la alegría que siempre muestras, a ti Alejandra Quintanar por el apoyo incondicional que me ofreciste, te doy gracias porque siempre estuviste ahí desde el inicio hasta el fin del trabajo. Por todo este tiempo que estuviste presente GRACIAS...

A mi director de tesis Dr. David, gracias por haber dirigido esta tesis, por haberme aceptado en su laboratorio, por el apoyo y por su contribución a mi formación académica. A la Dra. Rocío y Cecilia, por la revisión de la tesis y sus comentarios para enriquecerla. Al Dr. Alejandro Zavala por el apoyo para el término de la tesis y por los comentarios sobre la misma.

A la profesora Maru, por darme la oportunidad de conocerla, por ofrecerme su amistad, por su calidez humana, por todas aquellas pláticas amenas e interesantes, los conocimientos que me brindó, por aconsejarme y por ser una linda persona, gracias, a la profesora Angélica por todos sus consejos y el apoyo que me brindó. A todos aquellos profesores que fueron parte de mi formación... a todos ellos gracias.

Doy gracias también a mis amigos y amigas: Monserrat, por las ocurrencias, las risas y pláticas interminables, por los consejos que me diste, por aquellos dulces que nunca olvidaré... para aquellos malos sabores de boca (gracias Monse-risas), a Esperanza (la famosa perita), por ayudarme a realizar todas las "diligencias" que necesitaba para la elaboración de la tesis, por sus consejos, por su paciencia y por su apoyo incondicional (gracias perilla), a Anita por las alegrías que pasamos juntas, por los comentarios que me hizo, por el tiempo juntas y por conocerla (gracias señana). Al "Dr. Avitia" por los consejos, las risas y los comentarios realizados, por la convivencia en el laboratorio, por eso gracias Álvaro. A los amigos inolvidables de la licenciatura: Evelyn, los grandiosos momentos que compartimos juntas, por las compañías cuando teníamos que ir a campo, gracias (Evelyn-acea), a Lorena, Andrea y Reyes, por todas aquellas largas pláticas, interesantes y graciosas a ellos muchas gracias. También agradezco a Sabina, Noé y Marco por su amistad.

Agradezco a todas aquellas personas que formaron parte de mi vida en estos tres años, Sra. María Luisa Díaz González (qepd), por las conversaciones memorables e inolvidables para mi, al Sr. Gilberto Alemán por haberlo conocido y por ser el padre de un hijo tan maravilloso, gracias.

Y por último, también agradezco a todas aquellas personas que de alguna manera me hicieron cambiar de rumbo y que por ellas conocí personas muy valiosas e inolvidables, a todas estas personas gracias.

I.- RESUMEN

Se estudió el momento ontogenético de *Turbinicarpus horripilus* (Lem.) Vác. John y Riha (Cactaceae), una planta microendémica de la barranca de Metztlán en el estado de Hidalgo. Durante los primeros seis meses, los cambios morfológico-anatómicos de las plántulas fueron registrados y se relacionaron con el cambio de metabolismo de C_3 a CAM. Las semillas que se emplearon fueron obtenidas de dos diferentes sitios (Jardín y San Juan) y con diferentes tiempos de almacenamiento.

Se obtuvieron plántulas de diferentes edades, a las que se les determinó la capacidad germinativa, largo y ancho, longitud de la radícula, así como su peso fresco. Se realizaron estudios anatómicos para evaluar los cambios durante el desarrollo ontogenético de las plántulas y estudios histoquímicos para identificar los compuestos de reserva. Finalmente se realizó una titulación ácida para cuantificar el punto de equivalencia ácida. Los resultados mostraron que las semillas deben ser pre-tratadas (3% NaClO), para obtener un mayor número de plántulas; la viabilidad de las semillas no disminuyó en un intervalo de catorce meses de almacenamiento. Se observó un rápido desarrollo del sistema radical el cual permite la fijación de las plántulas y un mejor aprovechamiento del agua; a los tres meses de desarrollo de las plántulas aparece la morfología característica de las plantas tipo CAM. El cambio de metabolismo de C_3 a CAM en *T. horripilus* es constitutivo, ya que las plántulas no necesitan presentar una talla específica para mostrar dicho cambio y no se observó un cambio acelerado de metabolismo al ser sometidas a estrés hídrico.

II.- ABSTRACT

The ontogenetic development in *Turbinicarpus horripilus* (Lem.) Vác. John y Riha (Cactaceae) was studied. This plant is considered as a microendemic form from the Metztitlán gully, State of Hidalgo. During the first six months of development, the anatomical and morphological changes were registered and related to changes in C₃ to CAM metabolisms. The seeds studied were collected and stored in different seasons from two locations: Jardín and San Juan.

Data of seedling capacity, length and width of radicle tips as well as fresh weight were registered from plants of different ages. Anatomical description was done to evaluate changes during plant development, as well as histochemical analysis to identify storage material. An acid titration was carried out to quantify the equivalence acid point. Results showed an increment in plant seedling when seeds were pre treated with 3 % NaClO and seed viability did not decrease during storage time. A fast development of radical tip was observed during the first days of development in order to anchor it self and use the best the available water. In three months plants an outstanding CAM morphology is evident. In *T. horripilus* the change of C₃ to CAM metabolism was considered as constituent since there was not found a relation between an specific plant size and the changes in metabolism C₃ to CAM, likewise when plants underwent water stress, any fast change to CAM metabolism was registered.

III.- INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae es un importante componente ecológico de las zonas áridas y semiáridas de América, están adaptadas a temperaturas extremas y ambientes secos. Para poder sobrevivir en estos ambientes presentan el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). Este metabolismo está presente en plantas que viven en condiciones de alta temperatura y sequía. Aproximadamente el 7% de las plantas vasculares son CAM (Cushman, 2001), ésta adaptación les permite a estas plantas sobrevivir en condiciones de déficit hídrico, reduciendo la pérdida de agua por evapotranspiración mediante el cierre de los estomas durante el día.

Este tipo de plantas presentan características anatómicas, morfológicas y fisiológicas que son adaptaciones a los ambientes áridos o semiáridos (Gibson y Nobel, 1986). La alta disponibilidad de las raíces para la absorción de agua después de un período de sequía prolongado y el metabolismo CAM son ejemplos de dichas adaptaciones fisiológicas. Se han realizado un gran número de estudios descriptivos sobre la morfología y la anatomía, que se han enfocado principalmente en la descripción de tallos suculentos, las reducción de las hojas a espinas, los tricomas que cubren la epidermis de las plantas para evitar la exposición directa de los rayos solares y así reducir la temperatura, modificaciones en el grosor de la cutícula, reducción en el número de estomas, estomas hundidos en cámaras en algunas especies, presencia de grandes vacuolas en las células parenquimáticas, clorénquima y un sistema radicular capaz de absorber agua en suelos muy secos (Loza-Cornejo, 2003;

Hernández, 2007; Rosas, 2002; Nuñez, 2004). Sin embargo, no existen estudios en los que se relacionen estas adaptaciones con el tipo de metabolismo que presentan.

El objetivo del presente estudio fue analizar la relación entre los cambios morfo-anatómicos en el desarrollo de la plántula de *Turbinicarpus horripilus* durante los primeros seis meses de desarrollo, bajo condiciones controladas de laboratorio y el tiempo en el que ocurre el cambio de metabolismo de C₃ a CAM.

Este estudio proporciona un conocimiento básico sobre aspectos morfo-fisiológicos que deben permitir sustentar programas de propagación de esta especie, para aumentar el tamaño de las poblaciones presentes en los sitios de estudio. Por otra parte, dada la cantidad de semillas que produce, la viabilidad de las mismas, la rápida germinación y el tamaño de la planta, esta especie puede servir como un modelo experimental para el estudio de procesos metabólicos y de la adquisición de los mecanismos adaptativos durante el desarrollo de la planta.

IV.- ANTECEDENTES

A.- Las cactáceas y su ubicación taxonómica.

Las cactáceas se encuentran ubicadas dentro de las angiospermas, en el grupo de las dicotiledóneas, subclase Caryophyllidae, el orden Caryophyllales, familia Cactaceae. Son originarias del continente Americano y se encuentran distribuidas desde Canadá hasta la Patagonia. México es el principal centro de diversificación y endemismo (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999). Las cactáceas son los elementos estructurales más importantes de zonas áridas y semiáridas de México, el 78% de las especies son endémicas. (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a, 1991b; Guzmán *et al.*, 2003). La familia Cactaceae se divide en tres subfamilias: Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae. La subfamilia Pereskioideae se caracteriza por tener una reproducción vegetativa primitiva y está formada por dos géneros: *Pereskia* y *Maihuenia*, la subfamilia Opuntioideae presenta hojas pequeñas, teretes (casi cilíndrico pero sin ranuras o surcos) y conspicuas, a diferencia de la subfamilia Cactoideae, que presenta tallos suculentos, hojas superiores (espinas) que salen de las areolas y tubérculos que forman costillas arregladas en series verticales, en esta subfamilia es donde se ubica el género *Turbinicarpus* (Wallace y Arthur, 2002).

La especie en estudio ha sido ubicada en distintos géneros por diversos autores. En 1838 se describió como *Mamillaria horripila* Lem; mientras que un año después el mismo autor la reubica como *Echinocactus horripilus* (Lem.) Lem; en el siguiente

siglo se trasladó a *Neolloydia horripila* (Lem.) Britton y Rose; en los años cincuenta se le denominó como *Gymnocactus horripilus* (Lem.) Backeb; para los años setentas como *Thelocactus horripilus* (Lem.) Kladiwa y Fittkau in Krainz (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a). Halda en 1998 la denominó *Pediocactus horripilus* (Lem.) y Doweld en el mismo año, *Bravocactus horripilus* (Lem.). Posteriormente Backeberg la determinó dentro del género *Turbinicarpus* (Backeberg) Buxbaum (*et*) Backeberg (Guzmán *et al.*, 2003).

B.- Distribución de *Turbinicarpus*.

El género *Turbinicarpus* es endémico de México, se distribuye en la región nororiental de la República, encontrándose principalmente en los estados de Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas, Nuevo León, Tamaulipas y Coahuila. Este género contiene 23 especies que están incluidas en el Apéndice I de la Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (Guzmán *et al.*, 2003).

T. horripilus se distribuye en el estado de Hidalgo, exclusivamente en la Barranca de Metztitlán. La barranca pertenece a la zona principal de los cañones excavados por las afluentes del río Pánuco, que forma parte del Eje Neovolcánico transversal y la Sierra Madre Oriental (Fig. 1). Esta zona contiene una gran riqueza natural, hecho que le ha valido para ser considerada por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) como zona prioritaria para la conservación, por

lo que fue declarada el 27 de Noviembre del 2000 como Área Natural Protegida, con el nombre de “Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán” (Matías-Palafox, 2007).

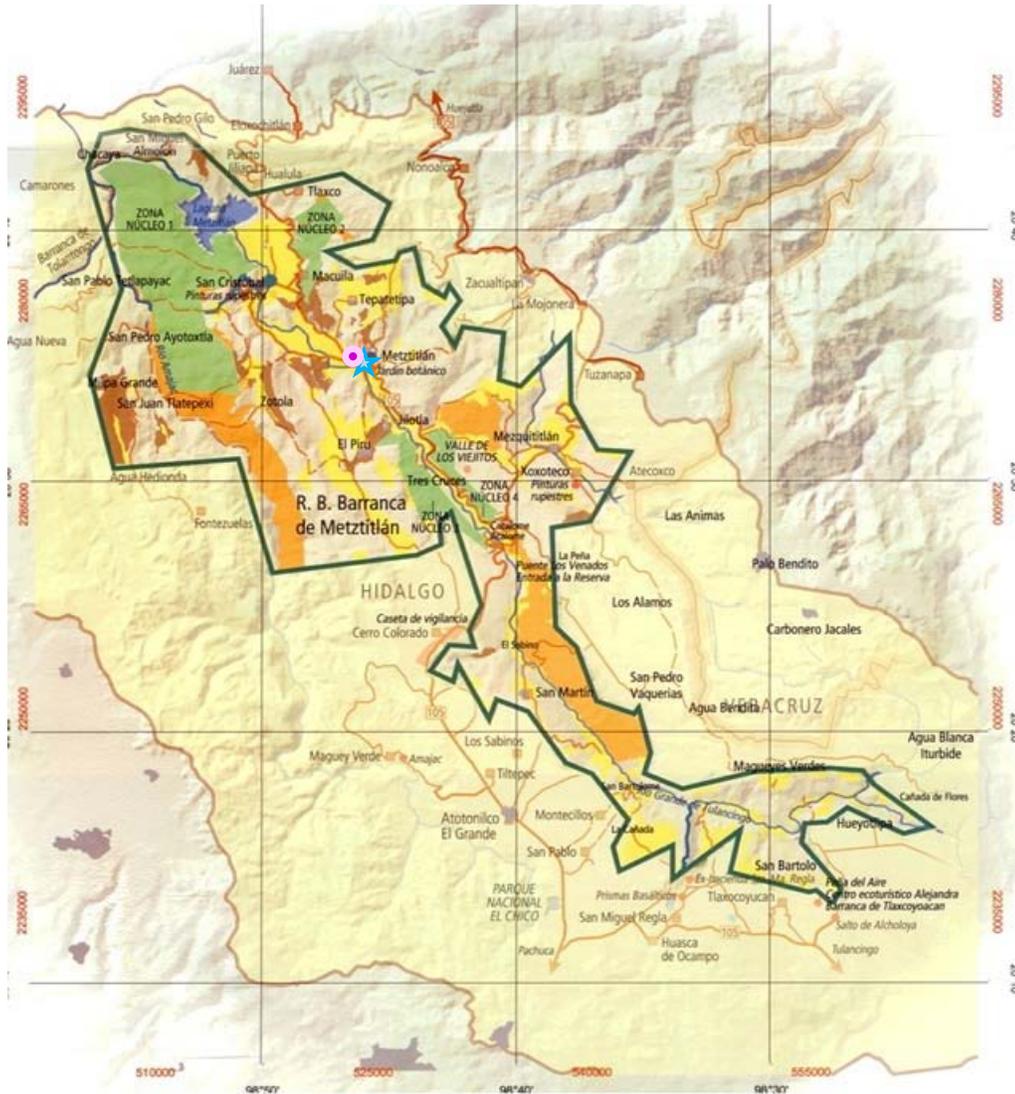


Figura 1.- Mapa de la localización de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán en el Estado de Hidalgo (Tomado de www.metztitlan.com.mx, 2009). ★ Sitio Jardín, ● sitio San Juan.

La Reserva cuenta con una extensión de 96,042.94 ha, localizadas entre los paralelos 98°23'00" y 98°57'08" longitud oeste y 20°14'15" y 20°45'26" latitud norte (Fig. 2). Su topografía es accidentada con gradientes altitudinales desde los 1000 hasta los 2000 m.s.n.m. El área incluye los municipios de Acatlán, Atotonilco el Grande, Eloxochitlán, Huasca de Ocampo, Metepec, San Juan Metztlán, San Agustín Metzquitlán y Zacualtipán de Ángeles (CONABIO, 2003; Matías-Palafox, 2007).

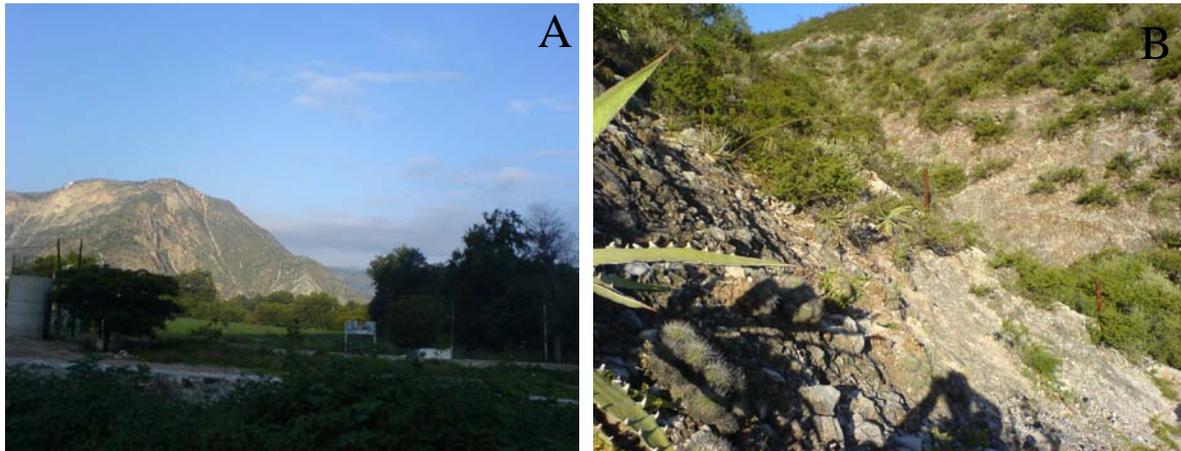


Figura 2.- Barranca de Metztlán. A) Vista panorámica. B) Hábitat donde crece una población de *T. horripilus*.

En el área de la Reserva se presentan dos tipos de climas, seco semicálido con régimen de lluvias en verano (BS0hw) en el Norte y Centro, y semiseco templado con régimen de lluvias en verano (BS1kw) en el sur. La temperatura media anual oscila

entre los 18 °C y los 22 °C y la precipitación media anual no rebasa los 500 mm (CONABIO, 2003; Matías-Palafox, 2007).

El principal rasgo hidrológico de la Reserva lo conforma un río con una extensión aproximada de 100 km, que toma el nombre de la región por donde corre el cauce. Este río corre de Sureste a Noroeste y desemboca en un lago conocido como “Laguna de Metztlán” (CONABIO, 2003; Matías-Palafox, 2007).

La flora que se encuentra representada en la Reserva pertenece en su mayoría a la provincia florística de la Altiplanicie, constituida por elementos de afinidad geográfica meridional y boreal, además de presentar un gran número de elementos autóctonos y endémicos. Los tipos de vegetación que alberga la reserva son: bosque tropical caducifolio, bosque de coníferas, matorral xerófilo, matorral submontano, pastizal y vegetación ribereña. El matorral xerófilo es el tipo más extenso y mejor representado. Por ello el lugar es considerado como un refugio del Pleistoceno de la biota desértica mexicana, fundamentada entre las afinidades que muestran la intensa relación que existió en el pasado con los desiertos Chihuahuense y Sonorense, por lo que se cree que actualmente funciona como corredor biológico de las zonas en el altiplano central del país (CONABIO, 2003; Matías- Palafox, 2007).

Las cactáceas forman parte importante de la flora de esta altiplanicie, motivo por el cual la barranca de Metztlán es considerada como una de las zonas cactológicas más importantes de nuestro país (Sánchez-Mejorada, 1978).

Un estudio reciente de la dinámica poblacional de *T. horripilus* (Matías-Palafox, 2007), señala que la población que presenta una menor densidad (0.08 ind/m²) coincide con el sitio con menor pendiente (Almolon), mientras que la población con mayor densidad (1.22 ind/m²) corresponde al sitio con mayor pendiente (San Juan). Este muestra que el valor de la tasa finita de incremento es de $\lambda=1.23$, lo que sugiere que la población va en aumento, el valor indicaría que la población no se encuentra en peligro, pero este dato tomó en cuenta la germinación observada en laboratorio debido a la carencia de datos en el campo, por lo que es posible que al ser ajustado con las observaciones de campo el valor de λ sea menor (Matías-Palafox, 2007).

Turbinicarpus horripilus ha sido catalogada como una especie microendémica y en peligro de extinción, incluida en el Apéndice I de CITES (Wallace y Arthur, 2002) y como especie vulnerable (Vu) en la Lista Roja de la Unión para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2006). Matías-Palafox y Jiménez-Sierra (2006), han realizado la evaluación de riesgo de la especie y sugieren que ésta debe ser incluida en la categoría de Peligro de Extinción (P) en la Norma Ecológica NOM-059-ECOL-2001.

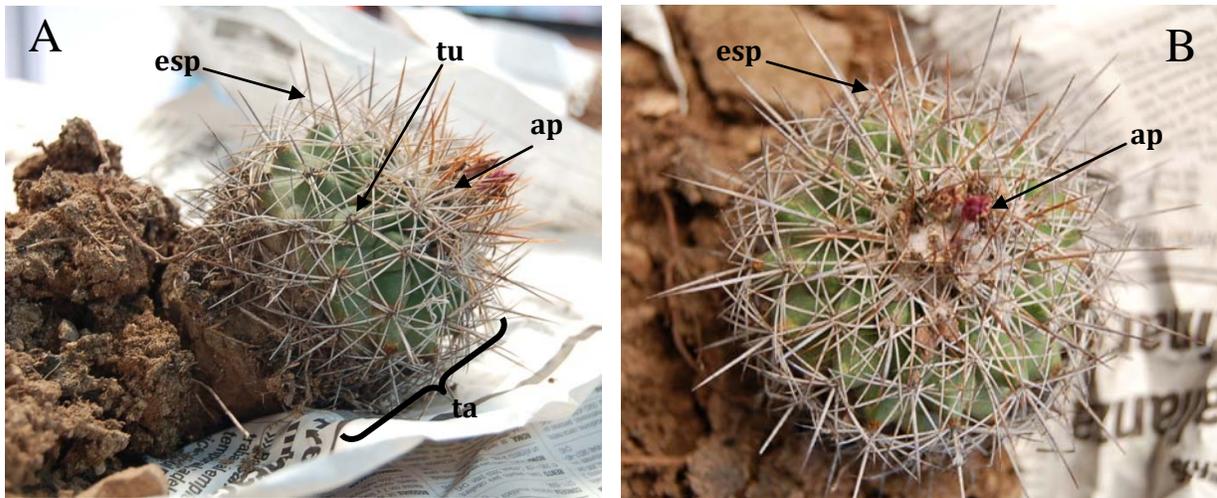


Figura 3.-Individuos adultos de *T. horripilus*. A) Vista lateral donde se observa el ápice de la planta, el arreglo de las mamilas (tubérculos) y la forma globosa del tallo, B) Vista frontal donde se aprecian las espinas no pungentes y el ápice con flores secas. Abreviaturas: **ap** (ápice), **esp** (espina), **ta** (tallo), **tu** (tubérculos).

C.- Adaptaciones morfofisiológicas de las cactáceas.

Las características anatómicas, morfológicas y fisiológicas de las diversas especies de cactáceas constituyen adaptaciones interesantes a los ambientes áridos o semiáridos (Gibson y Nobel, 1986). El género *Turbinicarpus* está integrado por plantas pequeñas, más o menos globosas y simples, provistas de tubérculos y en algunas ocasiones con costillas divididas en tubérculos (Bravo-Hollis y Sánchez–Mejorada, 1991b; Terrazas y Arias, 2002). Las areolas son monomorfas y las espinas son suaves no pungentes y escasas. Las flores surgen en las areolas del ápice del tallo y pueden ser de color rosa o blanco, el pericarpelo se encuentra desnudo y en ocasiones presenta una escama diminuta hacia la porción superior. Los estambres son numerosos. El fruto es una baya dehiscente que posee semillas de testa negra que miden de 1 a 1.5 mm de longitud y no presentan arilo (Bravo-Hollis y Sánchez–

Mejorada, 1991b). *Turbincarpus horripilus*, es una planta subglobosa, generalmente ramificada. Su tallo mide de 6-12 cm de diámetro y de 4-10 cm de altura, está formado por numerosos tubérculos piramidales de 1 cm dispuestos en espiral. Sus espinas radiales (9 a 12) son aciculares, rectas o ligeramente curvas, de color blanco con la punta parda, las de la parte inferior son más cortas que las de la parte superior. Las flores son acampanadas de color rosa purpúreo de 2 cm de longitud y surgen en los surcos adaxiales de las areolas jóvenes que se encuentran en el ápice del tallo. Los frutos son secos y ovoides con venación longitudinal, contienen 5-75 semillas que son ovoides, de testa negra o rojiza y tienen una longitud de 1.2–1.5 (Fig.3; Bravo-Hollis y Sánchez- Mejorada, 1991a; Matías-Palafox y Jiménez-Sierra, 2004).

La familia Cactaceae presenta una gran variedad de adaptaciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas como una consecuencia a las condiciones de vida xérica en las zonas áridas y semiáridas (Bailey, 1960; Mauseth, 1993; Valiente-Banuet *et al.*, 1997). Una de estas características es el Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (Fig. 4); estas plantas transforman el CO₂ atmosférico en ácido carbónico (HCO₃⁻) y la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) lo fija en un compuesto de tres carbonos ó fosfoenolpiruvato (PEP), originando el oxalacetato, compuesto de cuatro carbonos, posteriormente éste es transformado en malato y ácido málico durante la noche; este compuesto es almacenado en las vacuolas durante la noche. En el día se libera el CO₂ por la enzima málico deshidrogenasa y es fijado vía ciclo de Calvin (Hans-Walter, 1997).

Los estomas de las plantas que presentan este metabolismo permanecen abiertos durante la noche y cerrados durante la mayor parte del día, de esta manera la fotorrespiración está reducida y la pérdida de agua es mínima (Herppich y Peckmenn, 2000; Cordero, 2006). Por lo tanto, las plantas con este tipo de metabolismo presentan una alta tasa de eficiencia en el uso del agua (de cinco a diez veces más que las plantas C₄), lo que les proporciona una ventaja adaptativa en sitios donde el agua es un factor limitante (Fig. 4; Cushman, 2001).

Aunque los estudios de los caracteres anatómicos en las cactáceas se iniciaron desde el siglo XVI, estos son escasos y se han enfocado a la morfometría de los tallos y su metabolismo fotosintético (Terrazas y Arias, 2002). Schleiden en 1845 (tomado de Freeman, 1969), señaló que los cactus se podrían reconocer por sus estomas, ilustrando detalladamente la epidermis y la hipodermis de cuatro géneros. Este autor, fue el primero en describir las células imperforadas con engrosamientos anulares y helicoidales (elementos traqueoidales) del xilema y en utilizar las características del xilema secundario para distinguir diversas especies de cactus globosos. La presencia de estas células distintivas fue confirmada por Preston (1901) y descritas detalladamente por Mauseth y col. (1995).

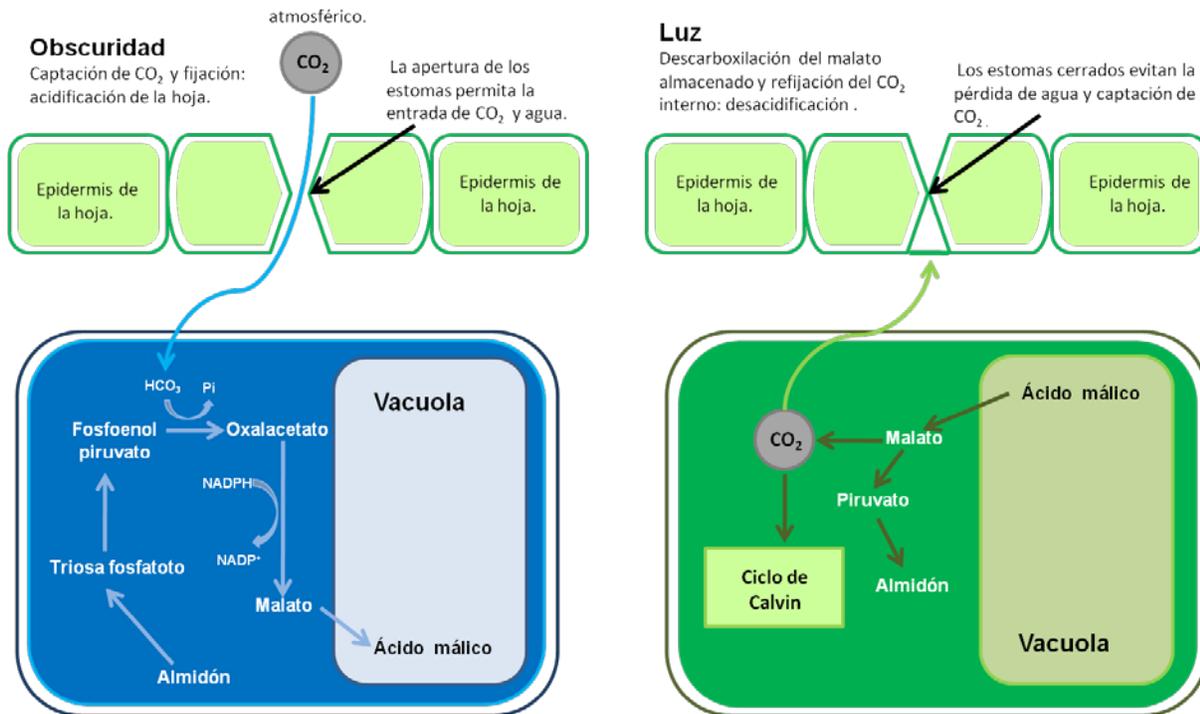


Figura 4.- Diagrama del Metabolismo Acido de las Crasuláceas (CAM), modificado de Taiz, 2003.

Solo algunos estudios sobre esta familia describen la anatomía de las plántulas o de las plantas adultas (De Fraine, 1910; Freeman, 1969; Loza-Cornejo *et al.*, 2003) y otros las características fisiológicas (Altesor *et al.*, 1992; Loza-Cornejo, 2003; Hernández y Briones, 2004), contribuyendo a una mejor comprensión de los procesos de establecimiento, crecimiento y los patrones de la reproducción que presentan estas plantas. En otros trabajos, se ha señalado la necesidad de estudiar el déficit del agua como inductor sobre el inicio del metabolismo CAM en las plantas de semillero de Cactaceae (Loza-Cornejo *et al.*, 2003).

Entre los principales trabajos anatómicos y morfológicos de la familia Cactaceae, destacan los realizados por Vásquez y col. (2005), que describen las areolas del cefalio de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff y las comparan con las que se presentan en las ramas juveniles.

Terrazas y Arias (2002), resumen la anatomía de varias especies de cactáceas de la subfamilia Cactoideae, porque es la más grande y diversa dentro de las Cactaceae. Estos autores proponen sintetizar la información de los caracteres anatómicos de tallos desde una perspectiva filogenética, estudiando el tejido dérmico y vascular, sugiriendo así, que deben realizarse estudios en especies de otros géneros y tribus específicos, para poder tomar caracteres anatómicos que nos ayuden a esclarecer algunos aspectos taxonómicos.

Se ha mencionado por diferentes autores que el cambio de metabolismo de C_3 a CAM puede ser inductivo o constitutivo. Algunos autores apoyan la existencia de un mecanismo inductivo, como Winter y col. (2007) que realizaron estudios en plantas de *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae) sometidas a un estrés salino, el cual induce el cambio metabólico temprano en las plantas. Adams y col. (1998) mencionan que la expresión de CAM puede atribuirse a factores ambientales como la intensidad de luz, la humedad relativa y la disponibilidad de agua. Estos factores influyen en la proporción de CO_2 fijado por las plantas de *Mesembryanthemum crystallinum* y *Talinum triangulare* sometidas a estrés hídrico, provocando el cambio de metabolismo de C_3 a CAM (Adams *et al.*, 1998; Pieters *et al.*, 2003). Hernández

(2007) comprobó la expresión del metabolismo CAM con el efecto de la luz en plántulas de cuatro cactáceas columnares, durante su desarrollo ontogenético. En general, la inducción del metabolismo de tipo CAM es considerada como una respuesta al estrés que mantiene un balance positivo del carbono. Las especies que presentan una inducción en el metabolismo de C₃ a CAM son probablemente las de mayor plasticidad, porque poseen una capacidad de respuesta a los cambios de los factores medioambientales presentes (Dodd *et al.*, 2002). La inducción a metabolismo de tipo CAM implica la regulación y el ensamblaje de enzimas y transportadores de metabolitos, haciendo de esta una de las adaptaciones metabólicas más complejas al estrés medioambiental (Cushman y Bohnert, 1997).

Por otra parte, existen estudios que sostienen que el cambio de metabolismo de C₃ a CAM es constitutivo, es decir, que este cambio ocurre a una edad pre-establecida debido a una “memoria ontogenética” o programada desde el inicio del desarrollo (Altesor *et al.*, 1998). Estudios morfo-anatómicos y del metabolismo fotosintético de plantas de *Stenocereus beneckeii* y *Stenocereus queretaroensis* bajo limitaciones hídricas, muestran que el déficit de agua no es un factor decisivo para la inducción del metabolismo tipo CAM y que éste está relacionado con la edad, lo que sugiere que la ontogenia de la planta es el factor decisivo en la expresión de ésta característica fisiológica (Loza-Cornejo *et al.*, 2003; Cordero *et al.*, 2006).

V.- JUSTIFICACIÓN

La Barranca de Metztitlán (Hidalgo) es considerada como un área natural protegida y zona prioritaria para conservación, sin embargo, se desarrollan actividades turísticas y de los pobladores, que pueden perturbar las poblaciones de fauna y flora presentes, entre ellas las de *Turbinicarpus horripilus*. Los estudios que han sido realizados en el pasado en esta especie, son principalmente de tipo sistemáticos y ecológicos, pero se carece de información sobre la anatomía, fisiología y los mecanismos adaptativos que le permiten sobrevivir en su hábitat.

El conocimiento del momento en el que una planta xerófita adquiere mecanismos adaptativos que le permite sobrevivir a este ambiente, se traduce en la posibilidad de planeación de programas de conservación y reintroducción de especies a sus sitios naturales, y es aquí donde reside la importancia de determinar el momento ontogenético en el que *Turbinicarpus horripilus* transforma su metabolismo de C₃ a CAM, el cual va acompañado de cambios morfológicos.

VI.- OBJETIVOS

- **Objetivo General:**

Estudiar el desarrollo de la plántula de *Turbinicarpus horripilus* (Lem.) Vác. John y Riha (Cactaceae), bajo condiciones de laboratorio durante los primeros seis meses de desarrollo y relacionarlo con el momento en el que realiza la transformación de metabolismo de C₃ a CAM.

- **Objetivos Particulares:**

I.- Determinar la capacidad germinativa y el crecimiento de la radícula de plántulas de *T. horripilus* utilizando semillas de la cosecha de primavera de 2007, de dos localidades de la Barranca de Metztitlán: San Juan y Jardín.

II.- Describir las características anatómicas de la testa de la semilla madura deshidratada y las transformaciones anatómicas que ocurren en la plántula desde su germinación y hasta los seis meses de desarrollo, asociando los cambios morfológicos a los depósitos de compuestos de reserva como almidón, lípidos y proteínas.

III.- Determinar el momento ontogenético en que se da la transformación de metabolismo fotosintético de C₃ a CAM.

VII.- HIPOTESIS

Turbinicarpus horripilus es una cactácea globosa de talla “pequeña”, lo que implica que requiere un crecimiento determinado o preestablecido relativamente independiente a los cambios medioambientales, por lo que, los cambios anatómicos (cutícula gruesa, células con grandes vacuolas, presencia de clorénquima, etc.), asociados a las transformaciones metabólicas (cambio de metabolismo fotosintético de C₃ a CAM) y funcionales son mecanismos adaptativos de origen constitutivo debido a una “memoria ontogenética” y no a factores ambientales.

VIII.- METODOLOGÍA

A.- Material biológico.

1.- Obtención de semillas.

Se colectaron frutos de *T. horripilus* durante el mes de abril del 2007, en dos localidades de la Barranca de Metztitlán: San Juan y Jardín (Fig. 2), cada uno de los frutos fue colocado, de forma individual, en un sobre de papel y se transportaron al Laboratorio de Ecología de zonas áridas, donde se dejaron secar en condiciones de laboratorio, permaneciendo así al menos una semana. Al final de este tiempo se rompió el exocarpo, se extrajeron y contaron las semillas y se guardaron en bolsas de plástico a temperatura ambiente hasta su uso. Se extrajeron muestras al azar y se determinó su germinación a los seis, once y catorce meses de almacenamiento (siembra 1, 2 y 3 respectivamente).

2.- Germinación y obtención de las plántulas.

a.- Germinación.

La siembra se realizó en cajas de Petri (9.5 cm. x 1.5 cm.) usando como sustrato cinco capas de papel absorbente y una de papel filtro Whatman No. 1, humedecida con 5 ml de agua estéril. Las semillas se lavaron con agua durante 10 minutos, posteriormente se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 3% por otros 10 minutos para realizar una desinfección superficial, y por último se lavaron con agua estéril durante el mismo periodo de tiempo, todo este procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad. Cada caja de Petri se introdujo en un contenedor de

plástico transparente de (14 cm x 13 cm x 7 cm) desinfectado con alcohol al 70%, denominado germinador (Fig. 5). Los germinadores se colocaron en una germinadora Lab-Line Instruments con un fotoperiodo de 12:12 h (luz:oscuridad) a una temperatura constante de 25°C. Se determinó la capacidad germinativa de 600 semillas que fueron separadas en 12 germinadores (con 50 semillas cada uno), a los seis, once y catorce meses de haberse recolectado las semillas. Se contó el número de semillas germinadas entre un periodo de 0 a 10 días, y a los 14 y 21 días, considerando que la semilla germina cuando la radícula emerge. Las semillas germinadas se transfirieron a un nuevo germinador y se mantuvieron hasta 10 días en incubación con un fotoperiodo de 12:12 h (luz:oscuridad) a una temperatura constante de 25°C. Al término de este tiempo, se midió la longitud de la raíz de cada plántula, con un vernier digital (Mitutoyo Modelo CD-6” CS).

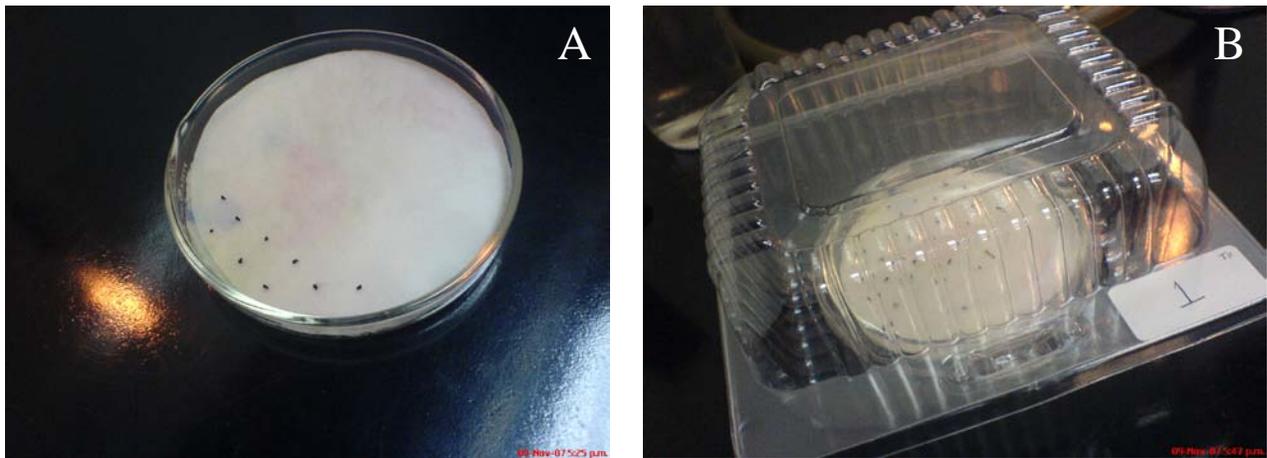


Figura 5.- Caja de Petri con el sustrato y las semillas. A) Semillas colocadas en el sustrato. B) Contenedor de plástico (germinador).

b.- Obtención de plántulas en desarrollo y estrés hídrico.

Las plántulas obtenidas (señaladas en el inciso anterior), una vez que se les midió la raíz, fueron transferidas a vasos de plástico transparentes (6.4 cm. x 4.5 cm.) previamente etiquetados y desinfectados con alcohol al 70%, a los que se les adicionó 50 g de tierra comercial, especial para cactáceas obtenida del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. En cada se sembraron entre 5 y 7 plántulas, los cuales se colocaron dentro de una caja de plástico (14 cm x 13 cm x 7 cm) previamente desinfectada con alcohol al 70% y se colocaron en una germinadora (Lab-Line Instruments) a una temperatura constante de 25°C con un fotoperiodo (luz : oscuridad) de 12:12 h (Fig. 6). El día que emergió la radícula de cada una de las plántulas se consideró como tiempo 0 y a partir de éste se consideró el tiempo de desarrollo para cada una de las plántulas; se tomaron muestras mensuales hasta los seis meses de desarrollo (ver tabla 1). Las plántulas de la siembra uno (plántulas provenientes de semillas con seis meses de almacenamiento) y dos (plántulas provenientes de semillas con once meses de almacenamiento) se regaron con 10 ml de agua estéril semanalmente durante todo el experimento. A las plántulas de las diferentes siembras se les determinaron los parámetros indicados en la tabla 1. Para evaluar si el estrés hídrico tiene un efecto en la transformación de C₃ a CAM, las plántulas de la siembra dos, se fraccionaron en dos lotes y fueron sometidos a diferentes tratamientos:

- Riego normal: Adición semanal de 10 ml de agua estéril a cada vaso, para evitar la pérdida de humedad, éste riego se llevó a cabo tomando en cuenta la

capacidad de campo de los vasos de plástico transparentes (6.4 cm. x 4.5 cm.).

Este tratamiento se aplicó por igual a las siembras 1.

- Estrés hídrico: Adición mensual de 5 ml de agua estéril, para lograr que las plántulas estuvieran sometidas a estrés hídrico, este experimento fue realizado para determinar si el estrés hídrico influye en el cambio de metabolismo de C₃ a CAM.

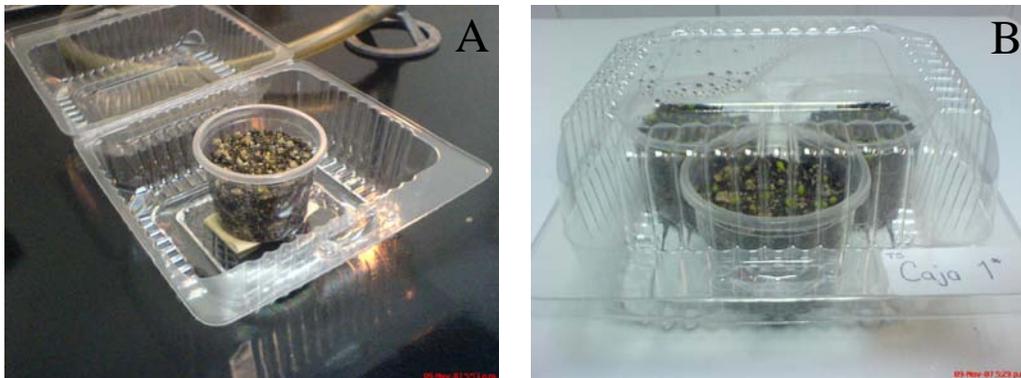


Figura 6.- Crecimiento de plántula. A) Dispositivo de incubación, B) Crecimiento en la incubadora.

B.- Anatomía de *Turbinicarpus horripilus*.

1.- Estructura de la testa.

Se tomaron 5 semillas de los frutos colectados en abril del 2007 del sitio Jardín, se fijaron en FAA (formol: etanol: ácido acético: agua; 10:50:5:35), se almacenaron en viales de 2 ml a 7°C y posteriormente se siguió la técnica de inclusión en paraplast (Ruzin, 1999). Una vez incluidas se obtuvieron cortes transversales y longitudinales de 12 y 14 μm de grosor con la ayuda de un micótomo de rotación Jung. Se eliminó el paraplast de los cortes obtenidos y se tiñeron con la técnica de Azul de Alciano y

Safranina, y se montaron en resina sintética (Sass, 1961). Las preparaciones fijas obtenidas fueron observadas al microscopio con la técnica de microscopía de polarización de interferencia de Nomarski o por contraste de fases.

2.- Anatomía durante el desarrollo de la plántula.

De las plántulas obtenidas de la siembra 1 y 2 (ver sección de métodos A2b), se colectaron lotes de 3 plántulas con diferentes edades de desarrollo, se realizó una colecta mensual desde 1 hasta 6 meses de desarrollo, se fijaron en FAA (formol: etanol: ácido acético: agua; 10:50:5:35) y se almacenaron en viales de 2 ml a 7°C. Posteriormente se realizó la técnica de inclusión en paraplast (Ruzin, 1999). Y se obtuvieron cortes transversales y longitudinales de 12 y 14 µm de grosor utilizando un micrótopo de rotación Jung. A los cortes se les eliminó el paraplast (Ruzin, 1999).

Para el estudio anatómico e histoquímico se utilizó la técnica de tinción de Azul Alciano y Safranina (Ruzin, 1999) para identificar y localizar ligninas y mucopolisacáridos; celulosa, hemicelulosa, lignina, cutina y suberina por medio de la técnica Cl-I-Zn; para almidón I₂-KI; lípidos totales mediante Sudán Negro y Aceite Rojo O (Sass, 1961; Jensen, 1962; Krishnamurty, 1988; Ruzin, 1999, Johansen, 1940), las muestras fueron observadas con microscopía de polarización de interferencia de Nomarski o por contraste de fases.

Tabla 1.- Parámetros medidos en las diferentes edades de la plántula de *T. horripilus*

Siembra	Lugar y fecha de colecta	Tiempo de almacenamiento de la semilla (meses)	Tiempo de cosecha de las plántulas (meses)	Tratamientos	Parámetros medidos.
1	Sitio Jardín, Barranca de Metztlán. Abril del 2007	6	1,3,6	Sin limitación de agua (riego normal).	- Germinación. % de germinación. - Morfometría: Longitud de la radícula. Cambio de masa de las plántulas. -Anatomía de las plántulas. -Bioquímicos tisulares. Titulación ácida. Actividad enzimática de la PEPC.
2	Sitio Jardín, Barranca de Metztlán. Abril del 2007	11	1,2,3,4	Sin limitación de agua (riego normal).	- Germinación. % de germinación. - Morfometría: Longitud de la radícula. Cambio de masa de las plántulas. -Anatomía de las plántulas. -Bioquímicos tisulares. Titulación ácida. Actividad enzimática de la PEPC. Cuantificación del málico.
2b	Sitio Jardín, Barranca de Metztlán. Abril del 2007	11	1,2,3	Con limitación de agua (estrés hídrico).	- Morfometría: Longitud de la radícula. Cambio de masa de las plántulas. -Bioquímicos tisulares. Titulación ácida
3	Sitio San Juan, Barranca de Metztlán. Abril del 2007	14	3,4	Sin limitación de agua (riego normal).	- Germinación. % de germinación. - Morfometría: Longitud de la radícula. Cambio de masa de las plántulas. -Anatomía de las plántulas. -Bioquímicos tisulares. Titulación ácida. Contenido relativo de agua.

C.- Transformación bioquímico-tisular.

1.- Obtención del material para las cuantificaciones bioquímico-tisulares.

Para la determinación bioquímico-tisular se utilizaron plántulas de las siembras 1 y 2, realizando cosechas mensualmente (Tabla 1). De cada cosecha se tomaron cuatro

plántulas a intervalos de tres horas por un periodo de 24 h (obteniendo 4 muestras durante el periodo de luz y 4 durante periodo de obscuridad, cada una de 4 plántulas), a cada plántula se le determinó el peso fresco y la longitud del tallo, se almacenaron completas (tallo y raíz) en un ultracongelador REVCO VX 430 a -56°C, para la determinación de los parámetros bioquímicos tisulares (Tabla 1).

2.- Cantidad de equivalentes ácidos producto de la fotosíntesis.

Para la detección de los equivalentes ácidos o grupos carboxílicos provenientes de la fijación del CO₂ se empleó la técnica de titulación ácida. Para cada tiempo de colecta a determinar (muestreo cada tres horas) se tuvieron cuatro plántulas que se procesaron independientemente. Cada plántula se colocó en un tubo de vidrio de 1 cm de diámetro por 7 cm de alto, el cual se mantuvo en hielo, el tejido se maceró en 1 ml de agua desionizada con un homogenizador Tearorp TISSUEMISER durante un minuto. Se centrifugó el macerado, a 3500 g durante 15 minutos a una temperatura de 7°C, en una centrifuga Eppendorf 5810 R. Al sobrenadante se le agregó 20µl de fenolftaleina al 0.01M, los tubos se agitaron continuamente. La titulación se realizó con una solución de NaOH a 0.01M añadiendo volúmenes consecutivos de 1 hasta conseguir que la fenolftaleina virara de claro a magenta (Fig. 7; Osmond *et al.*, 1989) y se cuantificó el volumen de NaOH añadido (µmol/g de tejido).

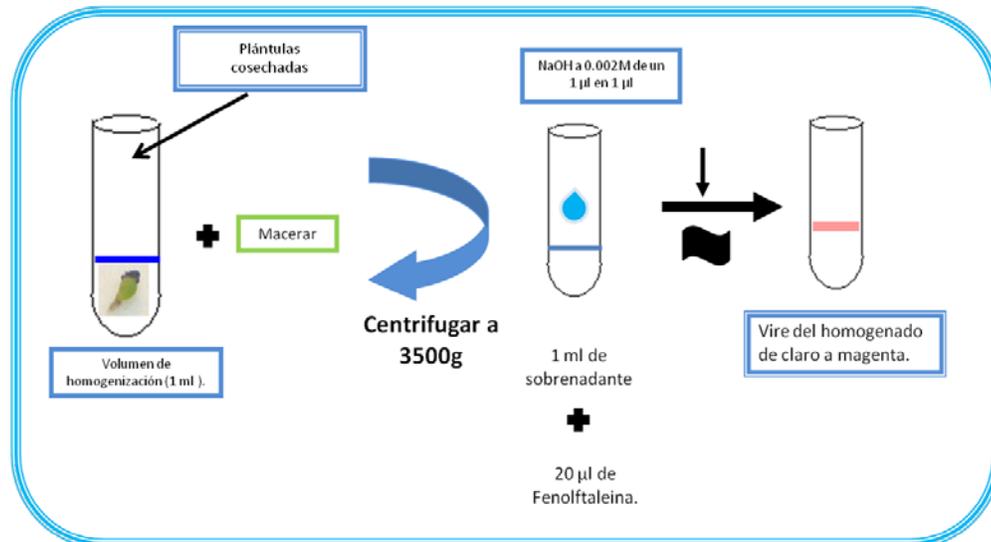


Figura 7: Diagrama representativo del procedimiento general que se lleva a cabo para realizar la titulación ácida.

3.- Actividad de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa.

La actividad de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) que fija el CO_2 se determinó mediante una modificación del método de Doncaster y Leegood (1990). En forma resumida, la técnica consiste en procesar cada plántula completa (tallo-raíz) individualmente; quedando para cada muestreo un total de 32 plántulas (cuatro plántulas cada 3h) del intervalo de 24 h. Cada plántula del muestreo se maceró en 1 ml de amortiguador de extracción 10 mM HEPES pH 7.8, adicionado con 0.5 mM de Mg Cl_2 , 0.2 % de BSA, 5 mM de EDTA y 1 mM de PMSF, con un homogenizador (Tearorp) TISSUEMISER durante un minuto, posteriormente se procedió a centrifugar a 3500 g durante 15 minutos a 7°C . El sobrenadante se pasó a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore) y posteriormente se pasó a través de un filtro Ultrafree-MC con un rango de separación de 10,000 Da (Millipore), y se centrifugó a

12,700 g por 10 minutos. La proteína que quedó en la membrana del filtro se lavó dos veces con amortiguador de extracción para eliminar el excedente de metabolitos (en particular el malato y el NAD(P)H endógeno).

La actividad de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa se determinó en un ensayo realizado sobre la membrana de filtro Ultrafree-MC con un volumen final de 350 μ l. La cuantificación se hizo con un amortiguador de 100 mM Tricina a pH 8.1, adicionado con 10 mM de NaHCO_3 , 0.24 mM de NADH, 10 mM de MgCl_2 , Triton X-100 al 0.05%, 3 mM de fosfoenolpiruvato y 2.7 unidades de malato deshidrogenasa, incubado a temperatura ambiente y tomando alícuotas de 100 μ l a los 5, 10 y 15 minutos. Las alícuotas se colocaron en una celda de cuarzo a la que se le adicionó 400 μ l de agua destilada y 500 μ l de amortiguador de cuantificación y se determinó la absorbencia a 340 nm (Fig. 8).

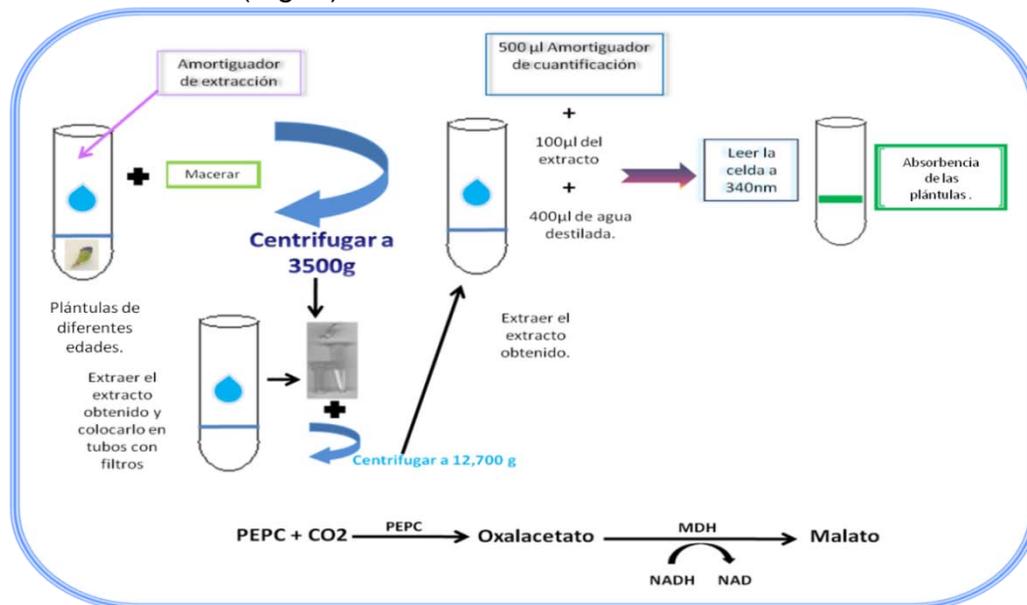


Figura 8: Diagrama representativo del procedimiento general utilizado para la cuantificación de la actividad de la PEP carboxilasa.

4.- Cuantificación de Ácido Málico.

Para determinar que el producto de la medición de la titulación ácida corresponda al ácido málico se realizó una cuantificación control de una plántula con metabolismo CAM (plántula de seis meses de edad), colectada a las 22:00 h. Ésta se maceró en 1 ml de agua con un homogenizador (Tearorp TISSUEMISER) durante un minuto, se centrifugó a 3500 g a 7°C durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante que se consideró como extracto crudo y se fraccionó en dos alícuotas. A una alícuota de 515 µl se le determinó los equivalentes ácidos (sección C2 en métodos) y otra alícuota de 50 µl fue colocada en una celda de cuarzo y se le añadió 350µl de agua destilada, 100 µl NAD a 4mM y 2 µl de enzima malato deshidrogenasa y 500µl de amortiguador con 100 mM Tricina a pH 8.1, adicionado con 10 mM de MgCl₂ y 0.05% de Triton X-100. Se determinó la absorbencia a 340 nm cada 20 segundos durante los primeros 6 minutos de incubación, se registraron los datos obtenidos y la cantidad de NADH producido se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$A = (am) (C) (l)$$

Donde:

A = Densidad óptica.

am= Coeficiente de extinción.

C= Concentración.

l= Paso de luz

(tomado de Segel, 1968), utilizando un coeficiente de extinción molar de 6220 M⁻¹:

D.- Contenido relativo de agua (CRA).

El contenido relativo de agua se obtuvo según el método de Catsk-ý, 1974 (tomado de Goldstein, 1991), el objetivo de es determinar el grado de hidratación o estrés de hídrico al que se sometieron las plántulas y con ello poder determinar si el cambio de metabolismo C₃ a CAM de *T. horripilus* es efectivamente constitutivo (independiente de las condiciones ambientales), es decir, que el cambio se da sin someter a la plántula a un estrés hídrico. Para ello se tomaron ocho muestras de cuatro plántulas cada una, en un intervalo de tres horas durante un lapso de 24 h teniendo un total de 32 plántulas, a cada plántula se le determinó el peso fresco; posteriormente se colocaron en cajas de Petri estériles con papel absorbente y papel filtro humedecidos, se dejaron hidratar por 12 y se obtuvo el peso (peso de turgencia). En seguida, las plántulas se introdujeron a una estufa a 70°C durante 48 h y pesándolas con frecuencia hasta obtener un peso constante (peso seco). Con estos datos se determinó el contenido relativo de agua mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido Relativo de Agua (CRA)} = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso de turgencia} - \text{peso seco}}$$

(tomado de Goldstein, 1991).

IX.- RESULTADOS

A.- Germinación y postgerminación.

1. Semilla.

Cada fruto contiene un promedio de 44 ± 2 semillas ($n=50$), ovoides, las cuales tienen una coloración negra (GLEY 2 %PB 2.5/1), aunque puede variar hacia el rojo (10R 3/3); con un peso promedio de 0.030 ± 0.006 g.

2.- Estructura de la Testa.

La testa es dura y formada por cuatro estratos celulares (Fig. 9A). Las células que forman el estrato externo tienen forma de papila (Fig. 9B), presentan paredes lignificadas y punteaduras simples. Las células del estrato más interno tuvieron reacción positiva al Sudán Negro, lo que indica la presencia de componentes lípidicos (Fig. 9D). El resultado de esta técnica sugiere que el endospermo y el embrión se encuentran aislados del exterior. La región hilo-micropilar es una cavidad cóncava con un orificio circular en el extremo llamado micrópilo, que disminuye de diámetro cuando ésta se llena de agua (observación personal). Ésta región (hilo-micropilar) está formada por varios estratos celulares con paredes lignificadas y con células en el piso interior de la cavidad (hilo) que contienen mucopolisacáridos deshidratados (Azul Alciano) (Fig. 9E). Entre los estratos de la testa se observan haces vasculares pertenecientes a los tegumentos (Fig. 9F). Hacia el interior puede apreciarse el perispermo derivado de la nucela (Figs. 9A, 9C).

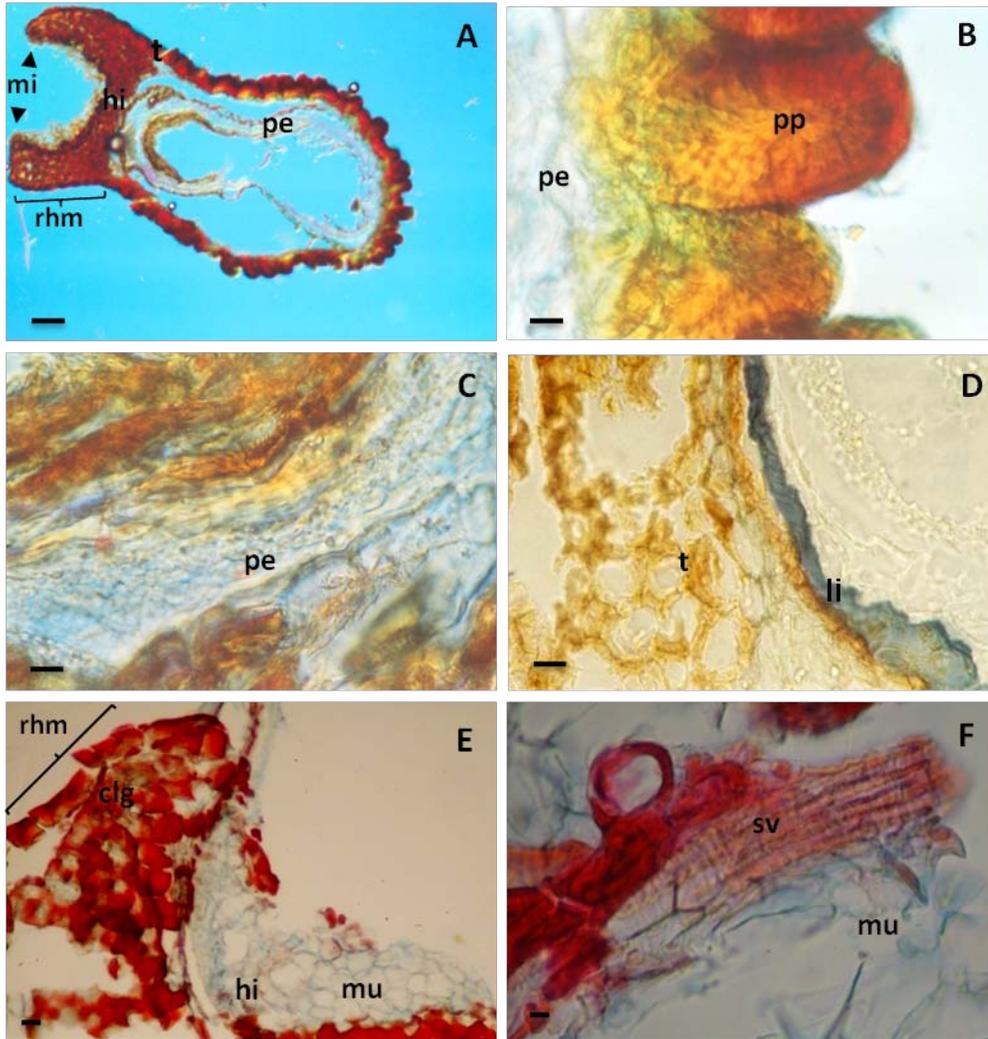


Figura 9: Detalles de la organización interna de la testa de *T. horripilus*. A) Estructura de la semilla. B) Detalle de las papilas de la testa. C) Detalle del perispermo. D) Depósito de lípidos en la capa interna de la testa. E) Interior del hilo con células que contienen mucopolisacáridos. F) Restos del sistema vascular del tegumento. *Abreviaturas: (clg)* células lignificadas, *(hi)* hilo, *(li)* lípidos, *(mi)* micropilo, *(mu)* mucílago, *(pe)* perispermo, *(pp)* papilas con punteaduras, *(rh)* región hilo-micropilar, *(sv)* sistema vascular, *(t)* testa. *Escala:* A. 10 μ m. B, 100 μ m, C-E. 20 μ m. F. 30 μ m. *Sin tinción:* A-C. *Tinciones:* D: Sudán Negro, E-F: Azul Alciano-Safranina. *Corte longitudinal:* A-F. *Microscopía de interferencia de Nomarski:* A-D. *Microscopía de contraste de fases:* E y F.

3.- Germinación.

Las semillas almacenadas por seis meses (siembra 1), presentaron un mayor porcentaje de germinación hacia el sexto día del experimento (84.33 %) así como al final de la medición (21 días). Por otro lado, las semillas almacenadas durante once meses (siembra 2) tuvieron, en el quinto día, el mayor porcentaje de germinación (85.83%). Las almacenadas durante catorce meses (siembra 3) también presentaron, en el quinto día, el mayor porcentaje de semillas germinadas (84.66%) pero éstas provienen de un sitio de colecta diferente (Fig. 10).

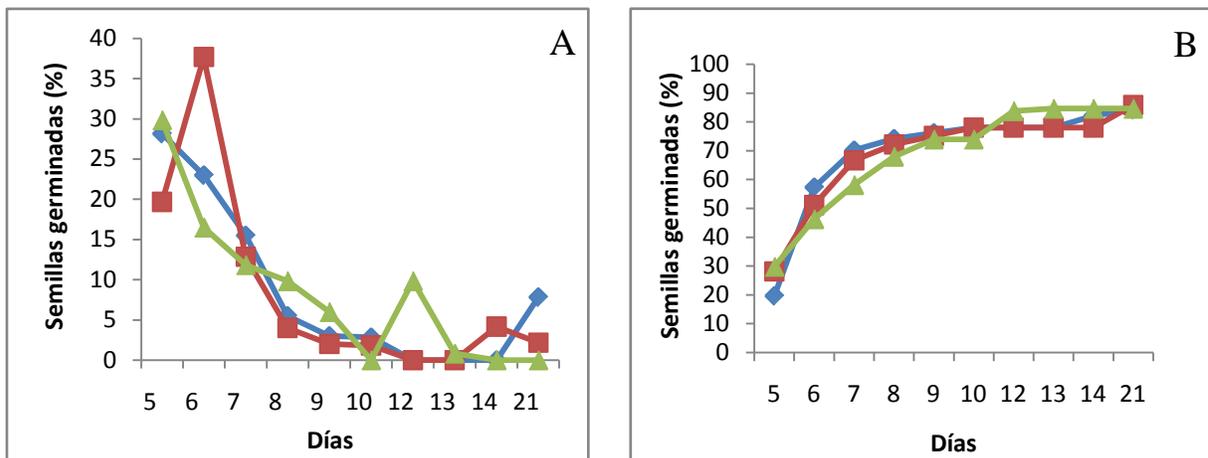


Figura 10: Germinación de la semilla de *T. horripilus*. A) Semillas germinadas por día. B) Gráfica de germinación acumulada, donde se refleja el total de semillas germinadas al final del experimento. Se realizaron tres series experimentales: siembra 1: seis meses de almacenamiento, siembra 2: 11 meses de almacenamiento y siembra 3: 14 meses de almacenamiento. Se pusieron por cada siembra a germinar 600 semillas en 12 cajas de Petri cada una de ellas con 50 semillas. La variable independiente es el tiempo de germinación en días y en la ordenada el porcentaje de semillas germinadas para cada tiempo (días). La eficiencia de germinación acumulativa a los seis meses de almacenamiento: 84.33%, once meses de almacenamiento: 85.83% y catorce meses de almacenamiento: 84.66%. Símbolos: ◆ : 6 meses de almacenamiento. ■ : 11 meses de almacenamiento. ▲ : 14 meses de almacenamiento.

4.- Postgerminación.

Se observó que con la emergencia de la radícula termina el proceso de germinación y se inicia la postgerminación. Este proceso sugiere que la longitud de la radícula principal es un parámetro que puede ser utilizado para determinar el vigor de la nueva plántula de *T. horripilus*, dado que este es el primer órgano en expandirse y es necesario para la absorción de agua y el crecimiento.

En la figura 11 se muestra la velocidad de crecimiento de las plántulas provenientes de la siembra 1 y 2; en las semillas con seis meses de almacenamiento (siembra 1) se observa una tendencia a incrementar la velocidad entre el 5º y 6º día de iniciada la germinación, disminuyendo la tasa de crecimiento con el tiempo (Fig. 11A) mientras que en las plántulas provenientes de semillas almacenadas por once meses (siembra 2), la velocidad de crecimiento se incrementó entre el 5º y 6º día manteniéndose relativamente constante por el resto de la medición (Fig. 11B) La diferencia entre las velocidades entre el 5º y 6º día en la siembra 1 es de 0.025 mm/día, mientras que en la siembra 2 es de 0.079 mm/día. Para el día 10 de iniciada la germinación, en la siembra 1 la velocidad disminuye hasta 0.231 mm/día mientras que para la siembra 2 se mantiene en un valor estable equivalente a 0.398 mm/día aproximadamente.

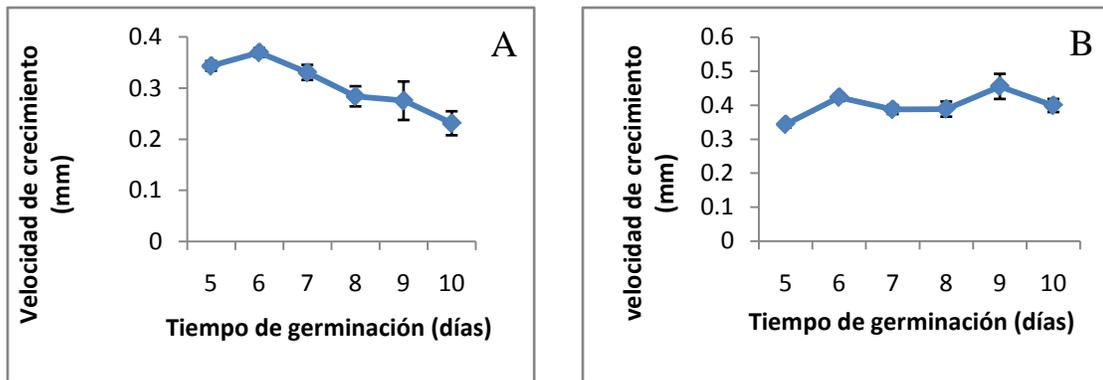


Figura 11.- Velocidad de crecimiento de la radícula. A) Velocidad de crecimiento de la radícula de semillas de 6 meses de almacenamiento (siembra 1, n=506. B) Velocidad de crecimiento de la radícula de semillas de 11 meses de almacenamiento (siembra 2, n=513. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la media.

B.- Morfometría de la plántula.

Durante el desarrollo de la plántula de *T. horripilus* va aumentando la masa de la plántula, tanto a lo largo (L) como ancho (An), estos valores permiten establecer un índice de crecimiento ($IC = L/An$). Hasta los dos meses del desarrollo, las plántulas presentan un IC muy similar, pero a partir de esta edad la plántula aumenta el largo en una mayor proporción que el ancho, de forma tal que a los cuatro y seis meses de desarrollo el IC es aproximadamente tres veces mayor que el IC de un mes de desarrollo (Fig. 12).

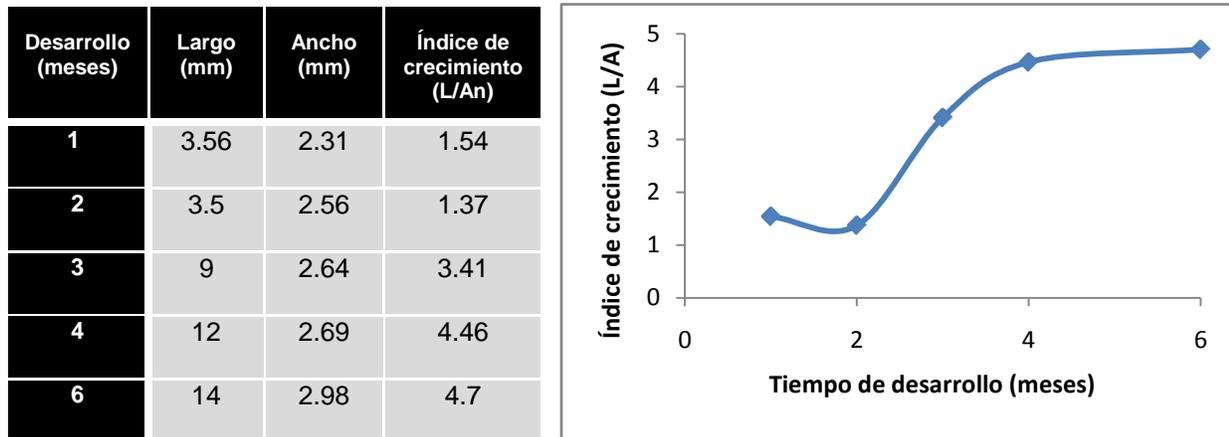


Figura 12.- Relación entre Largo y Ancho a lo largo del desarrollo de las plántulas. Se observa el aumento del Índice de Crecimiento (IC) de las plántulas de *T. horripilus* con el tiempo. Los valores empleados fueron tomados de los cortes realizados para el estudio anatómico.

Los cambios en el peso (Tabla 2) que se presentan durante el desarrollo de las plántulas provenientes de la siembra 1 (Fig. 13A), mostraron un incremento de 3.4 veces entre el 1^o y 3^{er} mes y al 6^o mes un incremento de 9.1 veces. Para las plántulas provenientes de la siembra 2 el incremento en peso a los tres meses en comparación a un mes es de 3.4 veces, similar a la siembra 1 (Fig. 13B). Las plántulas provenientes de la siembra 3 (diferente sitio de recolecta) presentaron la mitad del peso que las plántulas de las siembras 1 y 2 a los tres meses de desarrollo. Las plántulas de cuatro meses tuvieron un peso 2.7 veces menor que las de la siembra 2 (Fig. 13C).

Tabla 2.- Cambio del peso fresco de las plántulas de diferentes edades (en función al tiempo de almacenamiento y lugar de colecta). n= 33; promedio \pm error estandar.

Siembra	Tiempo de desarrollo de la plántula (meses).					
	1	2	3	4	5	6
1 t. a ^a : 6 meses. t. e ^b : riego normal. Sitio de colecta: Jardín.	0.0178 \pm 0.0009 g	—	0.0599 \pm 0.0029 g	—	—	0.162 \pm 0.0220 g
2a t. a ^a : 11 meses. t. e ^b : riego normal. Sitio de colecta: Jardín.	0.0176 \pm 0.0007 g	0.0407 \pm 0.0022 g	0.0606 \pm 0.0029 g	0.0846 \pm 0.0040 g	0.0848 \pm 0.0039 g	—
2b t. a ^a : 11 meses. t. e ^b : estrés hídrico. Sitio de colecta: Jardín.	0.0126 \pm 0.0006 g	0.0098 \pm 0.0007 g	0.0039 \pm 0.0003 g	—	—	—
3 t. a ^a : 14 meses. t. e ^b : riego normal. Sitio de colecta: San Juan.	—	—	0.0294 \pm 0.0011 g	0.0312 \pm 0.0019 g	—	—

a=t. a: tiempo de almacenamiento.

b=t. e: tratamiento del experimento.

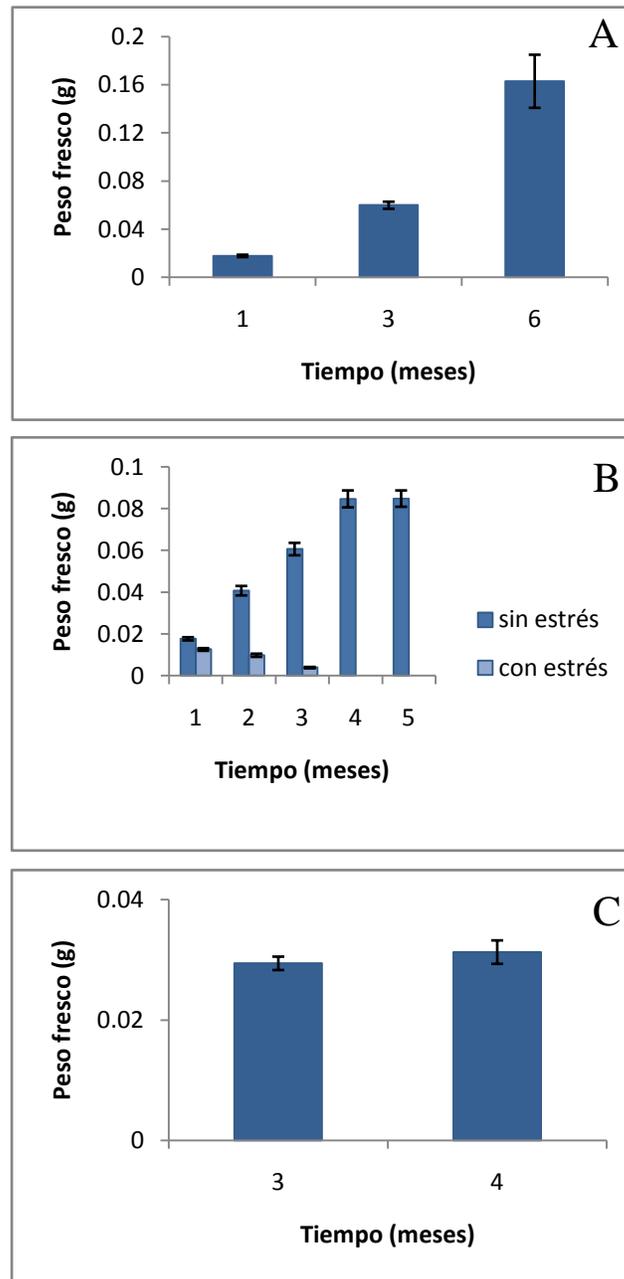


Figura 13: Peso fresco de las plántulas. A) Primera siembra. Plántulas de 1, 3 y 6 meses de edad, riego normal. Los datos representan el promedio \pm ES, $n= 41$ para cada uno de los meses. B) Segunda siembra. Plántulas de 1 a 5 meses de edad, riego normal y estrés hídrico. Los datos representan el promedio \pm ES, $n= 33$ para plántulas riego normal y $n=17$ para plántulas para estrés hídrico, para cada uno de los meses. C) Tercera siembra. Plántulas de 3 y 4 meses de edad, riego normal. Los datos representan el promedio \pm ES, $n= 33$.

C.- Anatomía e histoquímica de la plántula.

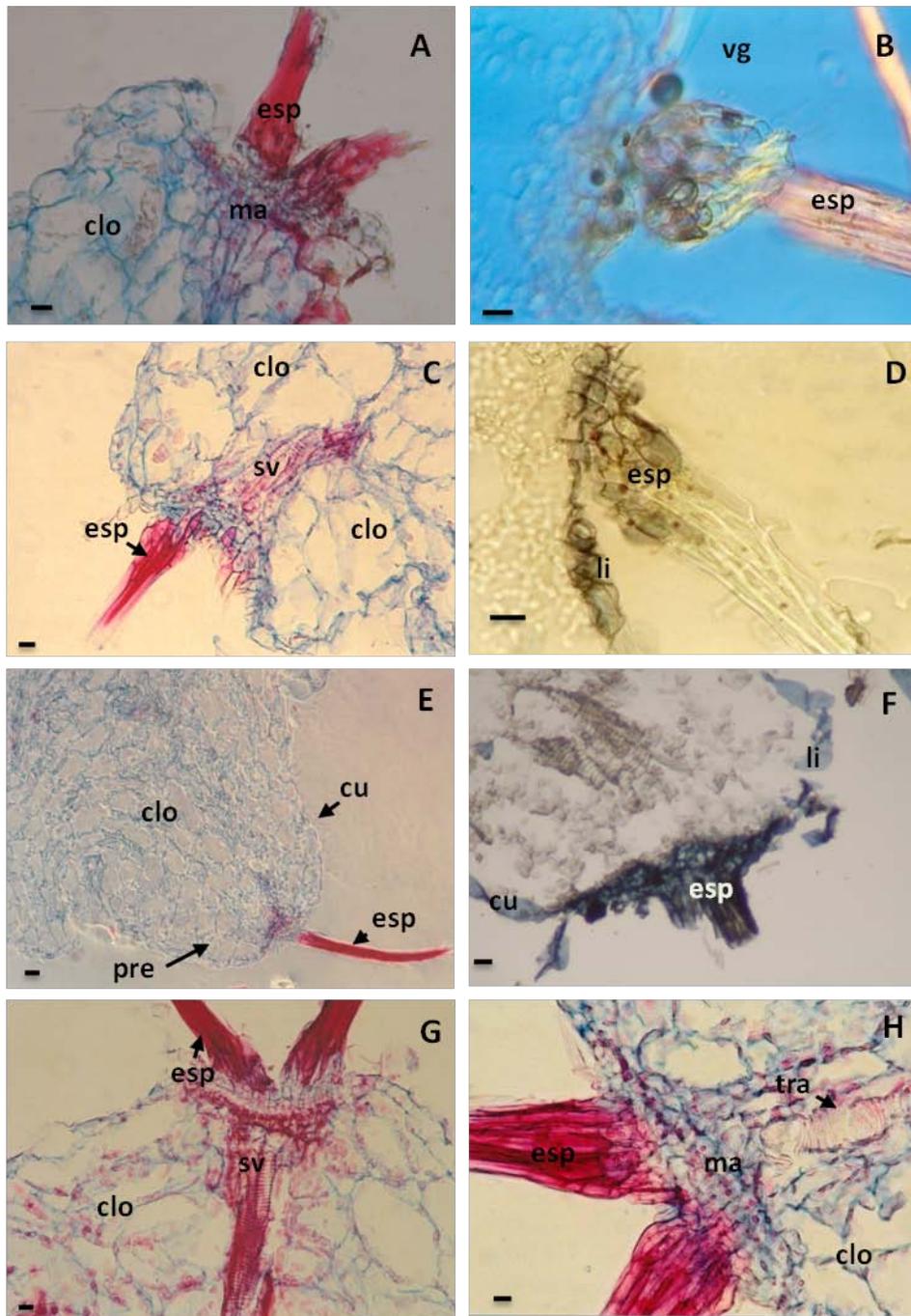
1.- Meristemo apical y formación de espinas.

Las cactáceas poseen varias adaptaciones morfológicas y anatómicas con las que disminuyen la pérdida excesiva de agua y consiguen un manejo eficiente del estado hídrico. Las características anatómicas más relevantes son: la transformación de las hojas en espinas, cutícula gruesa, estomas hundidos, presencia de: colénquima, clorénquima, parénquima acuífero, cristales de oxalato de calcio y las morfológicas, como la disminución de la relación superficie/volumen del tallo. El tallo se diferencia a partir de células totipotenciales conformando un meristemo apical, que en las plántulas de un mes de edad está estructurado por dos a cuatro estratos de células iniciales. Entre los dos y tres meses de desarrollo se formaron aproximadamente seis premamilas, que al desarrollarse forman los tubérculos característicos del tallo. Cada tubérculo posee su respectivo ápice meristemático (Fig. 14E). En sentido basípeto, durante la diferenciación (primer mes de edad), se forman los tejidos epidérmicos, el clorénquima, con mucopolisacáridos en su interior, (Fig. 14L) y el sistema vascular (Figs. 14C, 14G).

En sentido acrópeto se originan los pares de espinas, (Figs. 14A, 14C, 14G, 14H y 14L). Las espinas son multiseriadas y ornamentadas; en todo el cuerpo de la espina se depositan compuestos lípidicos y lignina (Figs. 14D 14F, 14I, 14J, 14K 14M, 14N).

En plántulas con un mes de edad, las espinas son flexibles y suaves, no pungentes (Figs. 14A y 14B), de color amarillo casi traslúcido y son escasas. A los tres meses,

las espinas comienzan a curvarse y a los seis solo se observan dos. En las plántulas de seis meses el meristemo apical de las mamilas esta formado por varias hileras de células que en sentido acrópeto sigue formando pares de espinas que aumentan en tamaño con la edad (Fig. 14D).



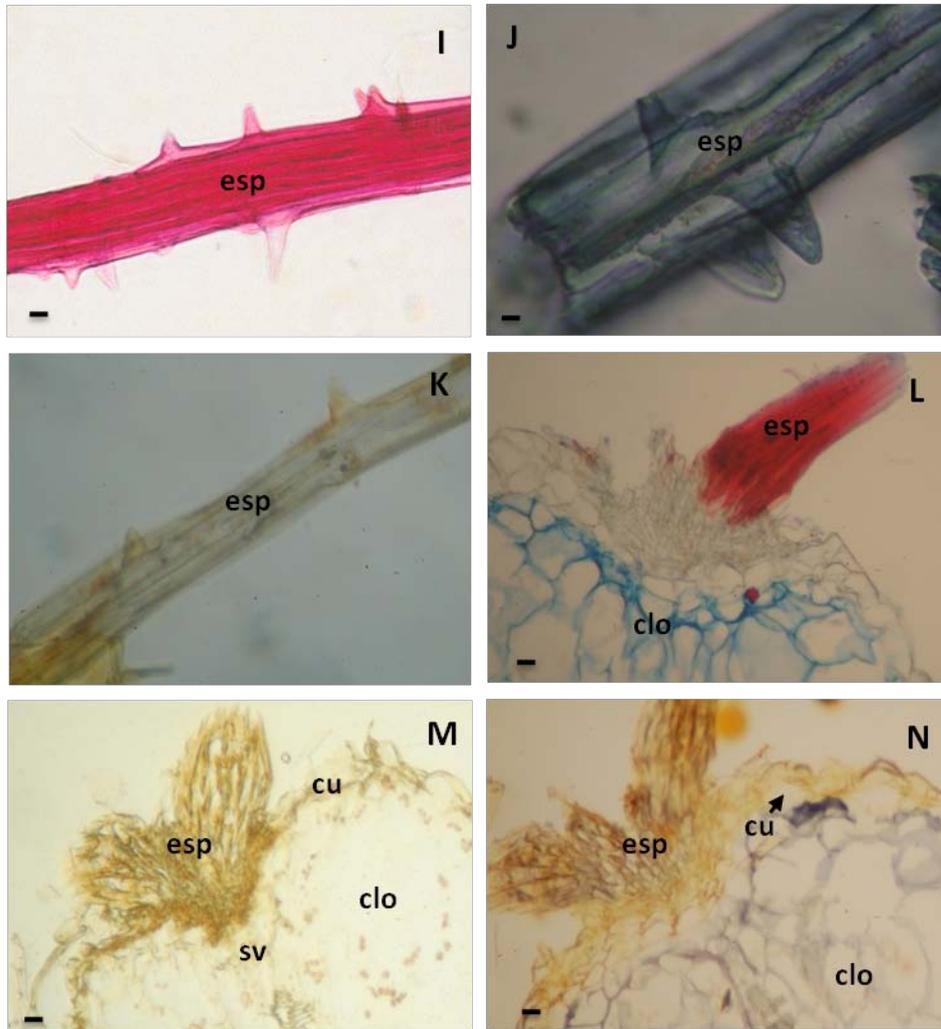


Figura 14: Detalles del meristemo apical de *T. horripilus*. A) Acercamiento del meristemo apical donde se observa una mamila con espinas. B) Vaina globosa de la espina. C) Ápice de la mamila con desarrollo de la espina y el sistema vascular. D) Ápice de la mamila con espina y presencia de lípidos. E-H) Meristemo apical de una mamila con espinas y sistema vascular. I-K) Espina. L-N) Meristemo apical. **Abreviaturas:**(clo) clorénquima, (cu) cutícula, (es) estoma, (esp) espina, (ma) meristemo apical, (pre) premamila, (sv) sistema vascular, (tra) traqueida de banda ancha, (vg) vaina globosa. **Escala:** A, F, L-N. 30µm. B. 40µm. C, G. 20µm. D-E. 10µm. H-K. 2µm. **Sintinción:** B. **Tinciones:** A, C, E, G-I, L: Azul Alciano-safranina. D, F: Sudán Negro. J, K, M, N: Zn-Cl-I. Corte transversal: A-N. **Microscopía de interferencia de Nomarski:** B, C, D, I. **Microscopía de contraste de fases:** A, E, F-H, J-N. **Edad:** A y B: plántulas de un mes de edad, C-D: plántulas de dos meses de edad, E-K: plántulas de tres meses de edad, L-N: plántulas de seis meses de edad.

2.- Tallo

a.- Epidermis.

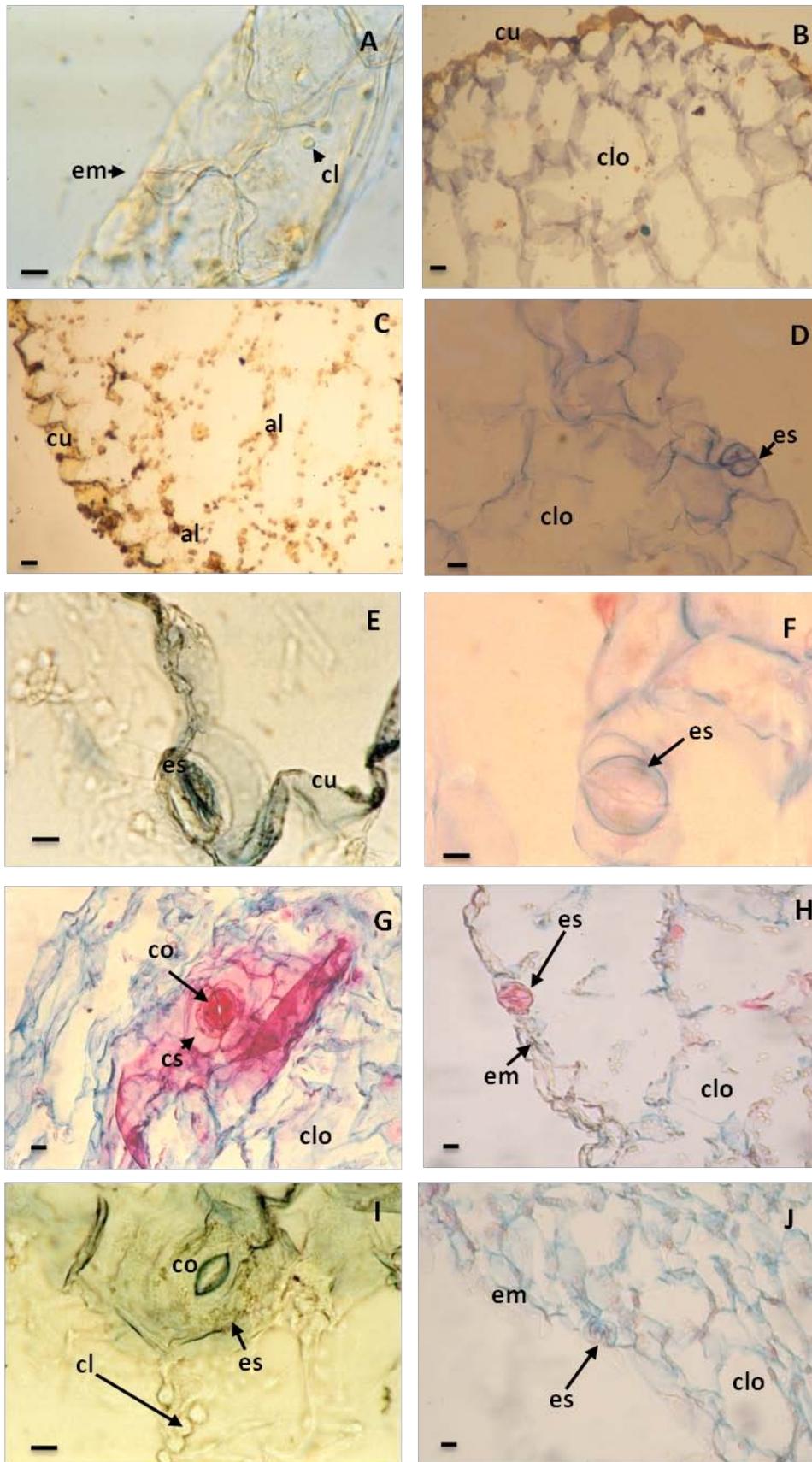
En tallos con un mes de edad, la epidermis es monoestratificada con células de paredes onduladas que permiten su ensamblaje, lo que sugiere una mayor resistencia a los esfuerzos mecánicos que se desarrollan cuando ha habido pérdida de agua. Estas células presentan cloroplastos (Fig. 15A) y sus paredes presentan mucopolisacáridos (Figs. 15D y 15F). Durante el desarrollo de las plántulas se observó un incremento en el grosor de las células epidérmicas. La epidermis muestra una cutícula de 4 a 8 μm de grosor en el primer mes de edad y de 12 a 16 μm a los dos meses de edad. Al tercer mes el grosor alcanza de 20 a 24 μm y lo conserva hasta los cuatro meses. A los seis meses de edad se alcanzan 32 μm de grosor. La epidermis mostró en plántulas de un mes a seis de edad, presencia de lípidos totales observados con Sudán Negro (Figs. 15E, 15I, 15M, 15O) y suberina y cutina observadas con Zn-Cl-I (Figs. 15B, 15C, 15N y 15P).

La cutícula está interrumpida por complejos estomáticos, que son de tipo ciclocítico. En plántulas de un mes de edad, las células oclusivas y subsidiarias de estos complejos contienen mucopolisacáridos en la pared externa. (Figs. 15D, 15 F, Azul Alciano-Safranina). A los dos meses de edad, se observa que las paredes internas de las células oclusivas son primarias y en las paredes adjuntas a las subsidiarias se obtuvo una reacción positiva a compuestos polifenólicos y a componentes lipofílicos, (Figs.15G, 15I, Sudán Negro). Se observó un incremento en los depósitos de

suberina y polifenoles en las paredes de los estomas de plántulas de tres meses de edad.

b.- Corteza primaria.

Esta región está formada de células de clorénquima (Fig. 16A) poliédricas, de paredes primarias muy delgadas, con mucopolisacárido (Figs. 15B, 16E 16H) y con vacuolas vacuoladas (Fig. 16 F). Cuando las plántulas alcanzaron los dos meses de edad, se observó que estas células tienen un diámetro de 120 μm y destaca que la vacuola ocupa un gran volumen dentro de ellas (Figs. 16H y 16J). A los tres meses de edad, las células que se ubican hacia el interior de la corteza primaria aumentan de tamaño (Fig.16E) para conformar la región acuífera y, en plántulas de cuatro meses, éstas células alcanzan diámetros de hasta 210 μm . Asimismo, estas células contienen granos de almidón en la periferia y aumentan en número con la edad de la plántula (Figs. 16B, 16C, 16D y 16G).



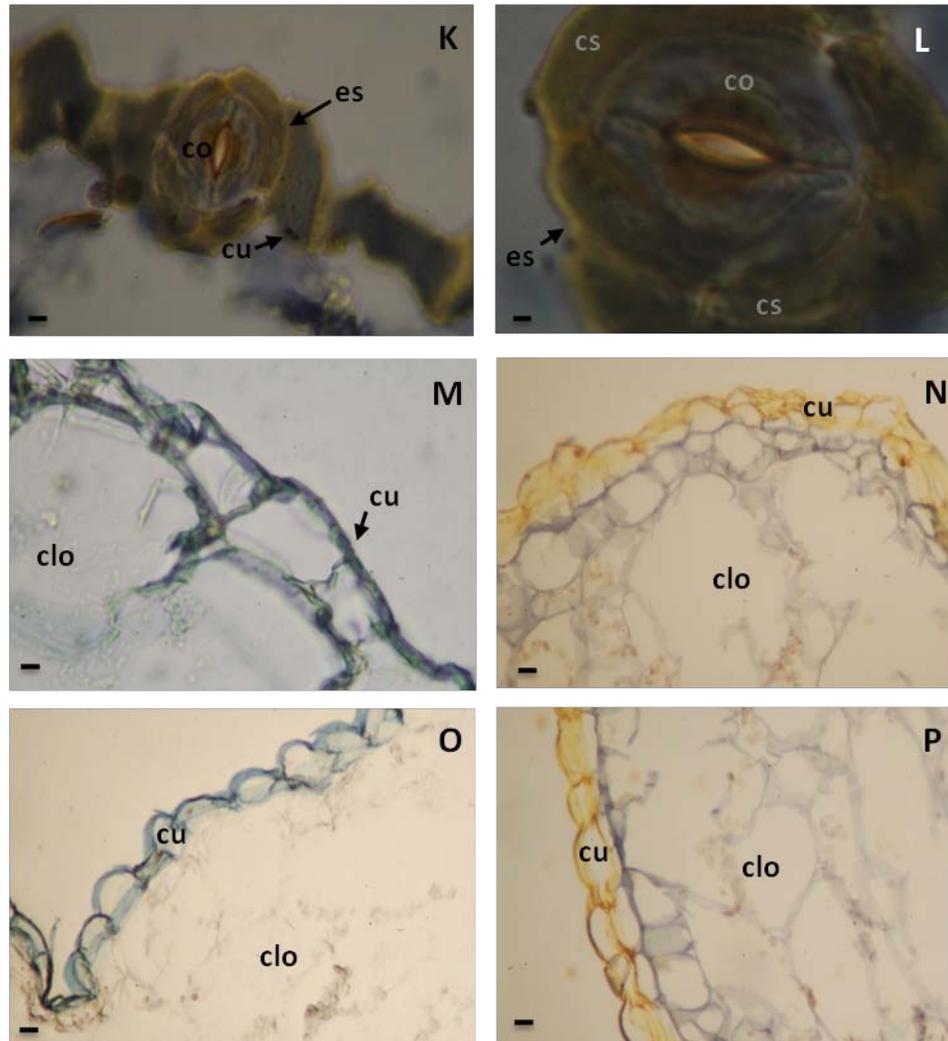


Figura 15: Detalles de la epidermis de *T. horripilus*. A) Acercamiento de la epidermis monoestratificada con presencia de cloroplastos. B, C y D) Acercamiento de la cutícula con presencia de lípidos y almidones en el clorénquima. E) Acercamiento de la epidermis se observa un estoma y la cutícula. F-J) Epidermis monoestratificada con presencia de estomas. K-M) Cutícula con presencia de estomas. N) Cutícula y clorénquima. O-P) Cutícula con presencia de lípidos y clorénquima. *Abreviaturas:* (al) almidón, (cl) cloroplasto, (clo) clorénquima, (co) células oclusivas, (cs) células subsidiarias, (cu) cutícula, (em) epidermis monoestratificada, (es) estoma. *Escala:* A. 100 μ m. B, H, J, N, P. 30 μ m. C, D, F, G, I, K, M, O. 20 μ m. E. 40 μ m. L. 1 μ m. *Sin tinción:* A. *Tinciones:* D, F-H, J: Azul Alciano-Safranina. E, I, M, O: Sudán Negro. B-C, K-L, N, P: Zn-Cl-I. *Corte longitudinal:* A-P. *Microscopía de interferencia de Nomarski:* A, E, I. *Microscopía de contraste de fases:* B-D, F-H y J-P. *Edad:* A-F: plántulas de un mes de edad, G-J: plántulas de dos meses de edad, K-L: plántulas de tres meses de edad, M: plántulas de cuatro meses de edad, N-P: plántulas de seis meses de edad.

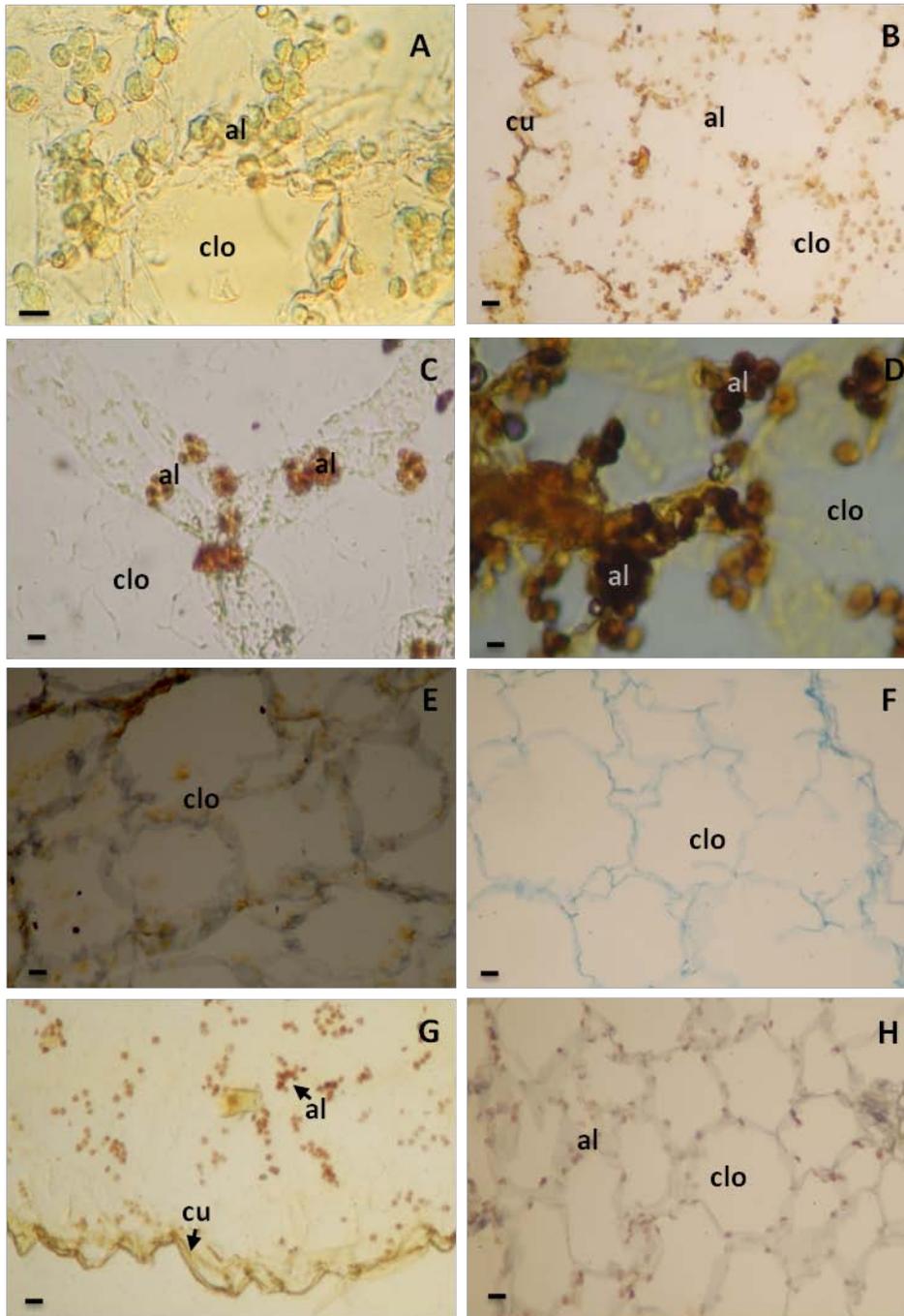


Figura 16: Detalles del clorénquima de *T. horripilus*. A, B, C y D) Clorénquima con presencia de almidones. E y F) Clorénquima. G y H) Almidones presentes en el clorénquima. **Abreviaturas: (al)** almidón, **(clo)** clorénquima, **(cu)** cutícula. **Escala:** A. 100µm. B, F-H. 30µm. C-E. 20µm. **Sin tinción:** A. **Tinciones:** B-D y G: Lugol. E y H: Zn-Cl-I. F: Azul Alciano-Safranina. **Corte transversal:** A-J. **Microscopía de interferencia de Nomarski:** A. **Microscopía de contraste de fases:** B-H. **Edad:** A-C: plántulas de un mes de edad, D: plántulas de dos meses de edad, E: plántulas de tres meses de edad, F: plántulas de cuatro meses de edad, G y H: plántulas de seis meses de edad.

c.- Sistema vascular.

En plántulas de un mes de edad, se observa el desarrollo del xilema primario formado por traqueidas de banda ancha (Figs. 17A y 17B). A los dos meses de edad, es claro que el desarrollo del sistema vascular primario ha sido acrópeto y basípeto, y está rodeado por una vaina de células parenquimáticas que presentan contenidos lipofílicos en las paredes (Fig. 17C). A partir de los tres meses de edad, el sistema vascular se observa continuo y está formado por traqueidas de banda ancha y vasos con engrosamientos helicoidales (Figs. 17D y 17E). A los seis meses de edad, en la zona del cuello, resalta el desarrollo de dos paquetes de haces vasculares con maduración del xilema de tipo endarco. Estos paquetes vasculares se dividieron en siete haces primarios del tallo que inervan las mamilas (Figs. 17F-H).

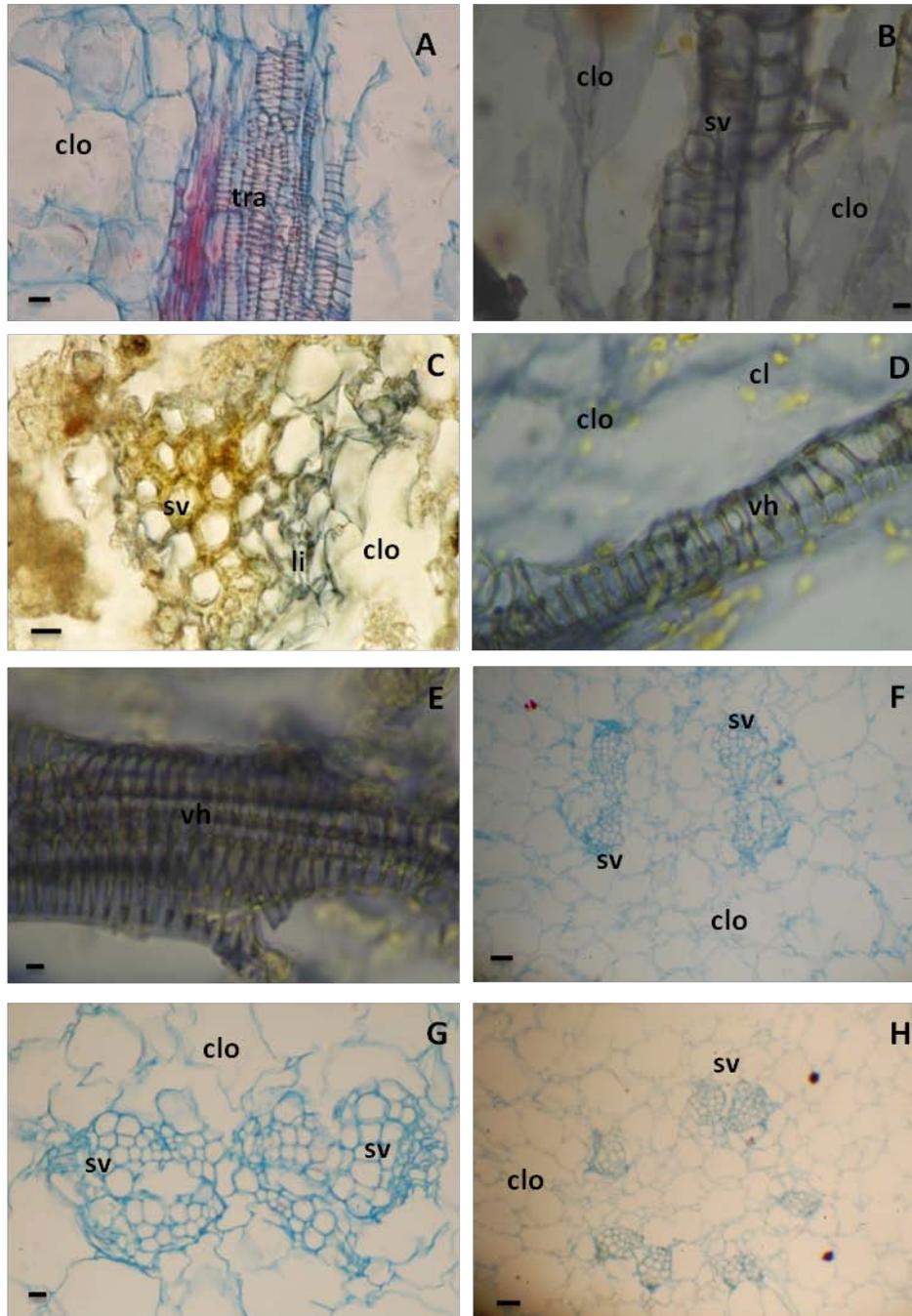


Figura 17: Detalles del sistema vascular de *T. horripilus*. A y B) Desarrollo de traqueidas de banda ancha. C) Haz vascular. D y E) Desarrollo de vasos con engrosamientos helicoidales. F-H) Sistema vascular. **Abreviaturas:** (clo) clorénquima, (li) lípidos, (sv) sistema vascular, (tra) traqueidas de banda ancha, (vh) vasos con engrosamientos helicoidales. **Escala:** A, B, D, E. 20µm. C. 100µm. F. 60µm. G. 30µm. **Corte longitudinal:** A, B, D y E. **Corte transversal:** C, F, G y H. **Tinciones:** A, F-H: Azul Alciano-Safranina. C: Sudán Negro. B, D y E: Zn-Cl-I. **Microscopía de interferencia de Nomarski:** C. **Microscopía de contraste de fases:** A-B y D-H. **Edad:** A y B: plántulas de un mes de edad, C: plántulas de dos meses de edad, D y E: plántulas de tres meses de edad, F-H: plántulas de seis meses de edad.

3.- Raíz.

La raíz es el primer órgano en desarrollarse; es un pequeño pivote que permanece como principal órgano hasta los tres meses. En el primer mes de edad, se observa una exodermis bien diferenciada con depósitos de suberina; la corteza primaria está formada por 2 a 4 hileras de células que rodean al sistema vascular (Fig. 18A). A partir de los tres meses de edad se desarrollan, a nivel de la región pilífera del pivote principal, varias raíces laterales a partir del periciclo. También se observó un cilindro vascular tetraarca (Figs. 18C, 18D). Se observó además una endodermis aún inconspicua (Figs. 18C y 18E), rodeada por 3 a 4 hileras de células de la corteza primaria (Fig. 18A) y una rizodermis monoestratificada. A los cuatro meses de edad, se observa la presencia de pelos radicales (Fig. 18B), el cilindro vascular llega ser hexarca y con una corteza primaria de 3.7 μm . Hacia la base del tallo, se observa que el número de células de la corteza primaria se incrementa dramáticamente a 16.4 μm conservando el sistema vascular primario (Figs. 18E, 18F). Se conservan también la endodermis y la exodermis, esta última con depósitos de suberina y lignina (Sudán Negro).

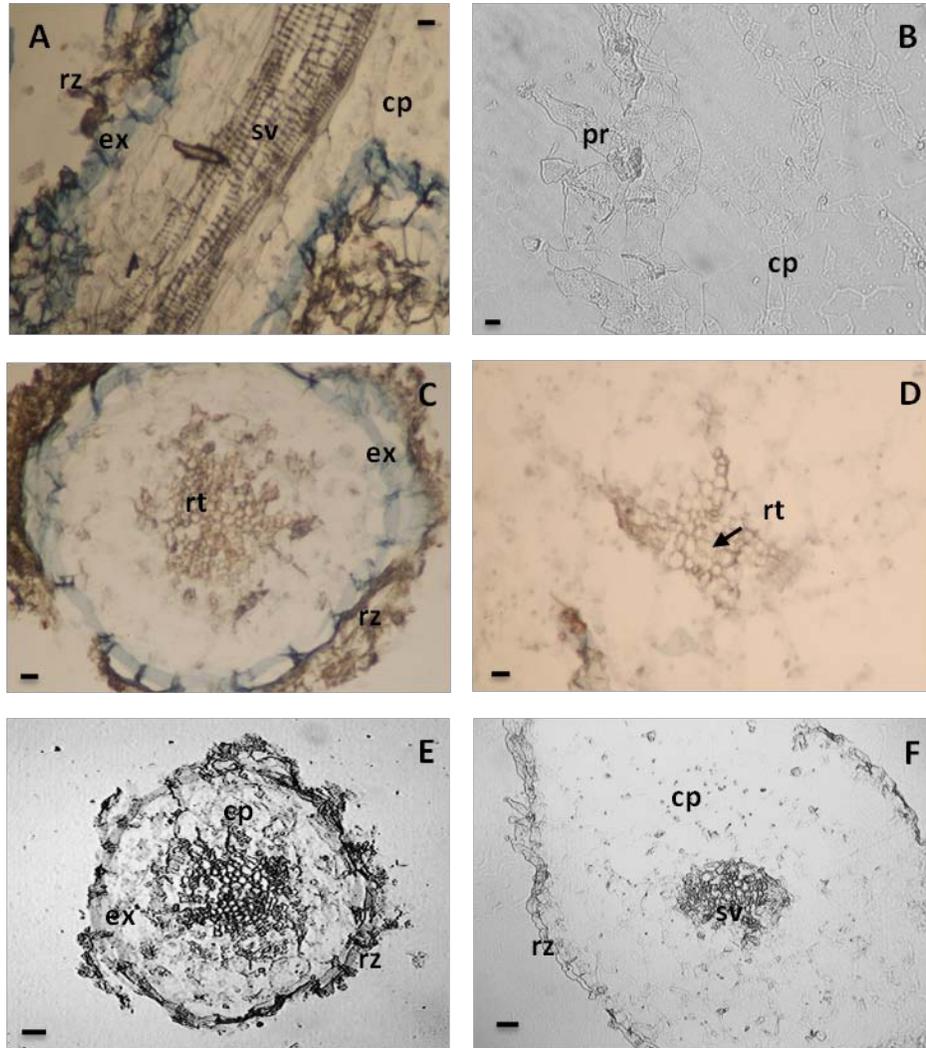


Figura 18: Detalles de la raíz de *T. horripilus*. A) Raíz con sistema vascular y células de la corteza primaria, con exodermis. B) Raíz con un pelo radicular. C- F) Raíz tetraarca, con presencia de rizodermis, exodermis y sistema vascular. *Abreviaturas:* (**cp**) corteza primaria, (**ex**) exodermis, (**pr**) pelo radicular, (**rt**) raíz tetraarca, (**rz**) rizodermis, (**sv**) sistema vascular. *Escala:* A, D-F. 30 μ m. B, C. 20 μ m. *Tinciones:* A, C, D: Sudán Negro. B: Azul Alciano-Safranina. E y F: Zn-Cl-I. Corte Longitudinal: A y B. Corte transversal: C-F. *Microscopía de contraste de fases:* A-F. *Edad:* A: plántulas de un mes de edad, B-F: plántulas de cuatro meses de edad.

D.- Desarrollo y transformación hacia el metabolismo ácido de las crasuláceas.

Para determinar el momento ontogenético en el que se da el cambio del metabolismo de C₃ a CAM, que puede deberse a condiciones intrínsecas de la planta ó de manera constitutiva, se cultivaron plántulas en condiciones ideales de riego normal, esto es, donde el agua no fue un factor limitante y otras fueron sometidas a estrés hídrico, para evaluar si ésta última condición es el factor que dispara el cambio de metabolismo. Se determinaron los tiempos de transformación del metabolismo fotosintético en plántulas provenientes de semillas almacenadas durante diferentes tiempos (seis, once y catorce meses de almacenamiento).

1.- Plántulas provenientes de semillas almacenadas durante seis meses.

Se determinó la acumulación de equivalentes ácidos en plántulas de un mes de desarrollo, observándose que la cantidad en este parámetro fluctúa de 3.64 ± 1.04 $\mu\text{mol/g}$ de tejido durante el periodo de luz, a 1.61 ± 0.10 $\mu\text{mol/g}$ de tejido durante la fase de obscuridad, las variaciones de cada uno de los tiempos de muestreo indican que no hay un cambio notorio, debido a las fluctuaciones presentes durante la fase luminosa y la obscura, mostrando que no existe una acumulación diferencial de compuestos ácidos; y con ello que el metabolismo fotosintético es básicamente C₃ (Fig. 19A).

En plántulas de tres meses de desarrollo, se presentan cambios en la cantidad de equivalentes ácidos en donde, en las primeras horas de la fase luminosa, se presentó una cantidad de 56 ± 8.7 $\mu\text{mol/g}$ de tejido, descendiendo conforme

transcurre esta fase y finalmente llegar a un valor menor ($15 \pm 1 \mu\text{mol/g}$). A las tres horas de realizarse el cambio a obscuridad, se da un incremento en la titulación de aproximadamente cinco veces ($264 \pm 58.2 \mu\text{mol/g}$ de tejido), para descender a los valores mínimos en las subsecuentes muestras (28.61 a $38.65 \mu\text{mol/g}$ de tejido). Hay que hacer notar que el título máximo obtenido durante la noche no se mantiene durante esta fase (Fig. 19B).

Las plántulas con seis meses de desarrollo (Fig. 19C) presentan, al inicio de la fase luminosa, un valor moderado en los equivalentes ácidos ($30 \pm 9.1 \mu\text{mol/g}$ de tejido) que, al transcurrir esta fase, va descendiendo. Se obtiene el valor mínimo en el título a las tres horas de iniciada la fase de obscuridad a las seis horas de ausencia de luz, ascendió la cantidad de equivalentes ácidos para obtener el valor máximo ($114 \pm 29.4 \mu\text{mol/g}$ de tejido). Tiempos prolongados de obscuridad producen un ligero descenso en la cantidad del título, que se mantuvo relativamente constante durante el resto de esta fase (76.20 a $84.26 \mu\text{mol/g}$ de tejido). El aumento en los equivalentes ácidos durante la fase oscura con respecto a la fase luminosa es de entre cuatro a cinco veces, valor semejante al encontrado entre ambas fases pero con plántulas de tres meses de desarrollo; la diferencia radica en que a los tres meses el valor máximo es ligeramente superior 2 veces al título encontrado a los seis meses.

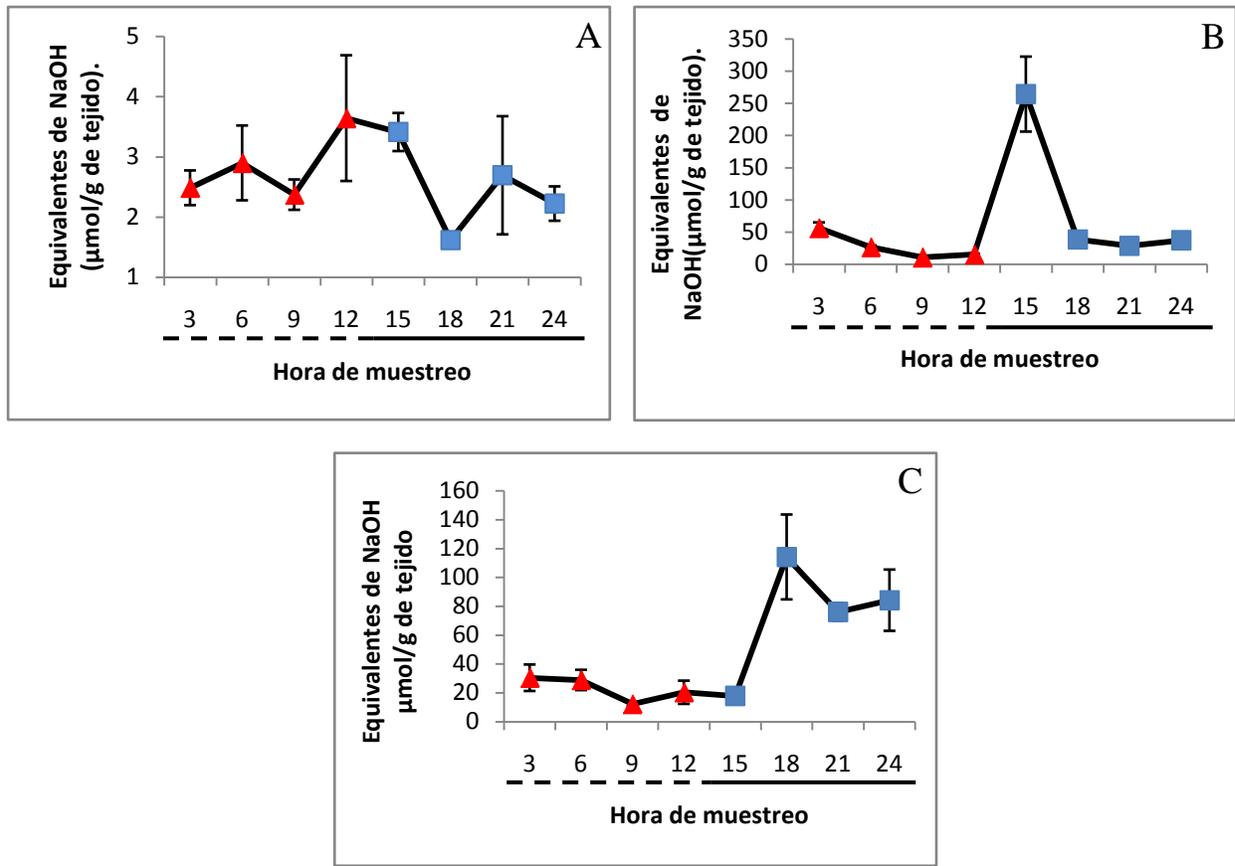


Figura 19: Titulación ácida en plántulas provenientes de semillas con seis meses de almacenamiento y sin estrés hídrico. A) Plántulas de un mes de edad, donde se observa que el título presente durante el periodo de luz es semejante al de la noche. B) Plántulas de tres meses de edad, podemos observar que el título no se mantiene alto durante el periodo de oscuridad. C) Plántulas de seis meses de edad, donde podemos observar que el título de las pantas durante el periodo de luz es menor en comparación a los valores obtenidos en el periodo de oscuridad, lo que corrobora que las plántulas de seis meses de edad ya presentan un metabolismo de tipo CAM. Se utilizó un ciclo luz (- - - -) oscuridad (—) de 12/12 h, en las graficas el cambio de oscuridad a luz es a las 3 horas y de luz a oscuridad es a las 15 horas. Los datos representan la media y su error estándar, con una muestra de n= 5 a excepción de la medida de 18 h en la gráfica B que tuvo una n= 4.

2.- Plántulas provenientes de semillas almacenadas durante once meses.

a.- Estudio de la transformación metabólica con plántulas que se desarrollaron sin limitaciones de agua.

Plántulas con un mes (Fig. 20A) o dos meses (Fig. 20B) de desarrollo, en la fase luminosa, presentan valores máximos de 15.04 y 12.02 $\mu\text{mol/g}$ de tejido, respectivamente, y los valores mínimos fueron 4.94 y 4.05 $\mu\text{mol/g}$ de tejido respectivamente. Posteriormente, durante la fase oscura, se incrementaron los equivalentes ácidos para obtener un segundo máximo al final de la misma (10.93 y 11.51 $\mu\text{mol/g}$ de tejido respectivamente), lo que indica que no hay un cambio en la cantidad de equivalentes ácidos obtenidos durante el cambio de fotoperiodo.

A los tres meses de desarrollo (Fig. 20C), el título durante la fase luminosa oscila entre los 7.36 y los 8.47 $\mu\text{mol/g}$ de tejido entre el inicio y final del periodo, en la ausencia de luz, los equivalentes ácidos ascienden para obtener el valor máximo al final de este periodo ($12.85 \pm 1.9 \mu\text{mol/g}$ de tejido), indicando que, durante la obscuridad existe una ligera acumulación de un compuesto ácido.

En las plántulas con cuatro meses de desarrollo (Fig. 20D), durante la fase luminosa, el título oscila alrededor de 8 $\mu\text{mol/g}$ de tejido, valor semejante al obtenido a los tres meses de desarrollo. A los cuatro meses de desarrollo, el cambio de fotoperiodo de luz-obscuridad induce una acumulación de un componente ácido en donde el máximo se obtiene seis horas después de haber sucedido dicho cambio ($58.91 \pm 10 \mu\text{mol/g}$ de tejido), este máximo fue siete veces mayor al que se encuentra en la fase

luminosa, largos periodos de obscuridad provocan un descenso en el título conforme se completa esta fase.

El valor máximo en el título de plántulas de cuatro meses se presenta seis horas después del cambio de fotoperiodo (luz-obscuridad), este tiempo coincide con el que se presentó en plántulas de seis meses de desarrollo provenientes de semillas almacenadas durante seis meses en condiciones de laboratorio.

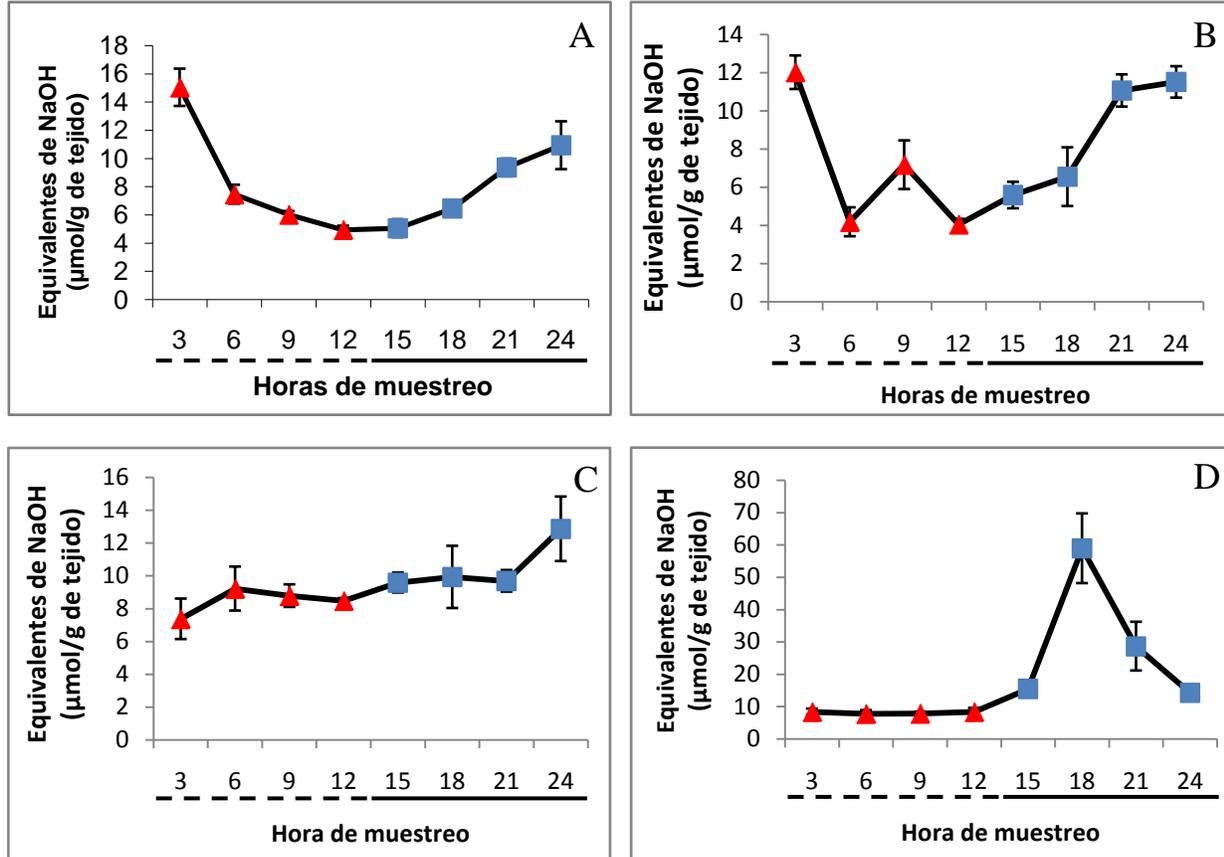


Figura 20: Titulación ácida de plántulas provenientes de semillas con once meses de almacenamiento y sin riego normal. A) Plántulas de un mes de edad, se observa que el título durante el periodo de luz es alto y después desciende para posteriormente tener un ligero aumento en el periodo de obscuridad pero este valor no se mantiene. B) Plántulas de dos meses de edad, se observan fluctuaciones en los títulos, por lo que no hay diferencias marcadas en los títulos obtenidos durante el periodo de luz y obscuridad. C) Plántulas de tres meses de edad, se observa un ligero incremento en la titulación durante el periodo de obscuridad. D) Plántulas de cuatro meses de edad, se observa que el título del periodo de luz es menor en comparación a los valores obtenidos en el periodo de obscuridad, lo que nos confirma que las plántulas de cuatro meses de edad ya presentan un metabolismo de tipo CAM. Titulación ácida. Se utilizó un ciclo luz (—) obscuridad (- - - -) de 12/12 h, en la grafica el cambio de obscuridad a luz es a las 3 horas y de luz a obscuridad es a las 15 horas. Los datos representan la media y su error estándar, con una muestra de n= 4.

b.- Estudio de la transformación metabólica con plántulas crecidas con limitaciones de agua

Con el objetivo de determinar si el estrés hídrico acelera el tiempo en el que se da el cambio de metabolismo de C₃ a CAM, se sometió a las plántulas a una restricción en la cantidad de agua cuando cumplieron un mes de edad, por un periodo de tres meses (los resultados obtenidos se muestran en la figura 21). Las plántulas de un mes de desarrollo, mostraron un título constante durante el periodo de luz (~22 $\mu\text{mol/g}$ de tejido) descendiendo durante las primeras horas de oscuridad para después ascender al final de la fase y obtener un valor ligeramente superior al periodo de luz periodo de luz del día (Fig. 21A). Las plántulas de dos meses de desarrollo, presentan un ligero incremento en el título entre la fase luminosa y la fase oscura, los valores absolutos se encuentran en el mismo intervalo que las plántulas de un mes (Fig. 21B). A los tres meses de desarrollo de las plántulas, hay un incremento en la cantidad de equivalentes durante la fase lumínica, este valor desciende durante el periodo de oscuridad, los valores a esta edad fueron aproximadamente el doble de los obtenidos en los meses anteriores. No existió un cambio en el título entre la fase lumínica y la fase de oscuridad (Fig. 21C).

Estos resultados muestran que el estrés hídrico no acelera o retrasa el tiempo de transformación de metabolismo de C₃ a CAM. El estrés hídrico llevó a la disminución en el peso de las plántulas conforme transcurre el tiempo de desarrollo, en comparación con las plántulas crecidas sin limitación de agua (Fig. 13B), lo que

indica que las plántulas efectivamente se encuentran bajo estrés. Lo que se observa es que el estrés hídrico produce un aumento en el título conforme transcurre el tiempo de exposición, que es mayor al doble entre los dos y tres meses de desarrollo (Figs. 21B y 21C). Cabe mencionar que el estrés hídrico severo produce un daño en la plántula y, como se mencionó antes, no induce el cambio metabólico.

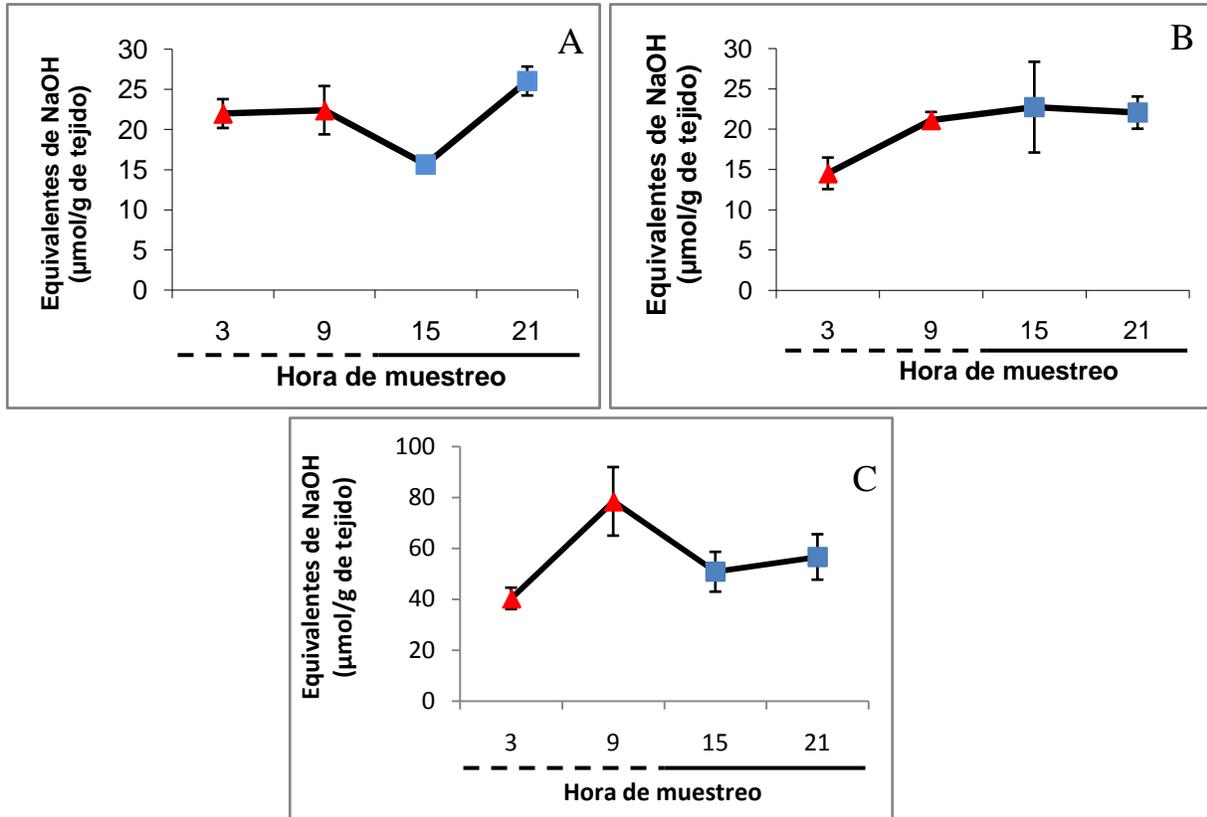


Figura 21: Titulación ácida de plántulas provenientes de semillas con once meses de almacenamiento, sometidas a estrés hídrico. A) Plántulas de un mes de edad, se observa que el título durante el periodo de luz es alto y después descende para posteriormente tener un ligero aumento en el periodo de obscuridad pero este valor no se mantiene. B) Plántulas de dos meses de edad, se observa un aumento en la titulación durante el periodo de obscuridad pero esta no se mantiene y descende. C) Plántulas de tres meses de edad, se observa que el título del periodo de luz es mayor con respecto al de obscuridad, pero es un valor bajo en comparación a los datos de las plántulas que ya presentaban un cambio de metabolismo en la primera siembra (plántulas de seis meses de edad), estos datos nos reflejan que el someter a las plántulas bajo un estrés hídrico no acelera el cambio de metabolismo. Se utilizó un ciclo luz (- - - -) obscuridad (———) de 12/12 h, en la grafica el cambio de obscuridad a luz es a las 3 horas y de luz a obscuridad es a las 15 horas. Los datos representan la media y su error estándar, con una muestra de n= 4.

3.- Plántulas provenientes de semillas almacenadas durante catorce meses.

a.- Efecto del almacenamiento en el tiempo de transformación del metabolismo C₃ a CAM.

Las plántulas de tres meses de edad y sin limitaciones de agua (provenientes de la localidad de San Juan), presentaron fluctuaciones en la titulación entre la fase luminosa y la fase de obscuridad (entre 11 a 37 $\mu\text{mol/g}$ de tejido, Fig. 22A). A los cuatro meses se observó que durante la fase luminosa hay un descenso en el título conforme transcurre la fase, a las seis horas de obscuridad se encuentra un máximo en el número de equivalentes ácidos que desciende posteriormente (Fig. 22B). El comportamiento de las plántulas a esta edad fue semejante al comportamiento de las plántulas de cuatro meses de desarrollo, provenientes de la localidad Jardín (semillas con once meses de almacenamiento, Figs. 22B y 20D), Los resultados del experimento realizado en este inciso deben ser tomados con cautela, por que se usaron semillas de diferentes sitios de colecta debido a la carencia de semillas del sitio Jardín. Por lo anterior, nos fue imposible llegar a una conclusión en este punto, por lo que, este inciso debe de ser corroborado, dado que están involucradas dos variables (sitio de colecta y tiempo de almacenamiento de las semillas). Podemos suponer que entre ambas localidades no existen diferencias entre las semillas. Probablemente los cambios observados en el título se deben al envejecimiento de las semillas (Figs. 20D y 22B), ya que, también se observó un menor peso fresco de estas plántulas en comparación con las plántulas provenientes de semillas de seis y once meses de almacenamiento (Fig. 13), se requiere de nuevos experimentos para confirmar estos supuestos.

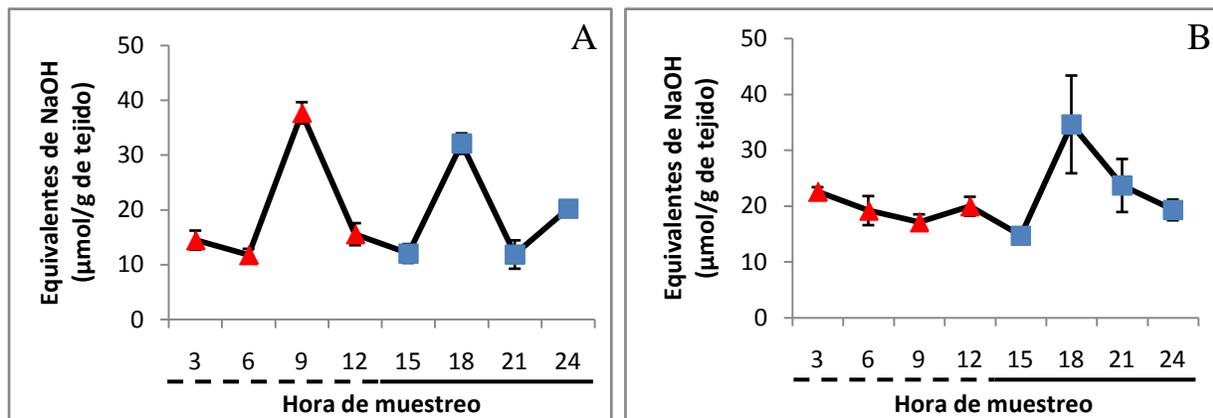


Figura 22: Titulación ácida de plántulas provenientes de semillas con catorce meses de almacenamiento y sin estrés hídrico. A) Plántulas de tres meses de edad, se observan fluctuaciones en los títulos, por lo que no hay diferencias marcadas en los títulos obtenidos durante la fase de luz y oscuridad. B) Plántulas de cuatro meses de edad, se observan diferencias entre la fase de luz y oscuridad, por lo tanto se confirma que las plántulas de cuatro meses de edad ya presentan un metabolismo de tipo CAM. Se utilizó un ciclo luz (---) oscuridad (—) de 12/12 h, en la grafica el cambio de oscuridad a luz es a las 3 horas y de luz a oscuridad es a las 15 horas. Los datos representan la media y su error estándar, con una muestra de n= 4.

b. Contenido relativo de agua (CRA).

Se determinó el contenido relativo de agua (Fig. 23), para confirmar que las plántulas sin limitación de agua no se encontraban bajo estrés hídrico y así confirmar que la transformación metabólica es constitutiva (de C_3 a CAM). Los valores obtenidos mostraron que las plántulas de cuatro meses de desarrollo presentaron una fluctuación en el CRA de 0.948 a 0.989, es decir, 94.8 a un 98.9 % del agua, indicándonos que se encontraban a su máxima turgencia, lo que indica que las plántulas no se encontraron bajo estrés hídrico.

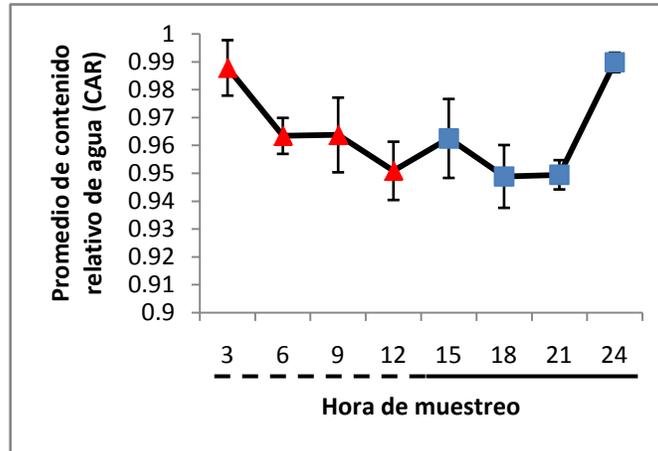


Figura 23.- Promedio del contenido relativo de agua (CRA) medido en plántulas de 4 meses de edad. Se utilizó un fotoperiodo luz (- - - -) oscuridad (———) de 12/12 h, en la grafica, el cambio de oscuridad a luz es a las 3 horas y de luz

E.- Actividad de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC).

Los resultados obtenidos de la prueba piloto en plántulas de seis meses de edad, mostraron que durante los primeros 30 minutos de medición. La actividad de la PEPC durante el día fue de $0 \Delta\text{DO}/\text{min}$ ($0 \mu\text{mol}/\text{planta}$), mientras que en la noche fue de $0.050 \Delta\text{DO}/\text{min}$ ($40 \mu\text{mol}/\text{planta}$); lo que confirmó que a los seis meses de edad la plántula presenta un metabolismo CAM.

La prueba modificada del método de Doncaster y Leegood (1990) en plántulas que ya presentaban un metabolismo de tipo CAM (cuatro meses de edad), no mostró valores adecuados, puesto que la enzima PEPC se ve alterada debido al tiempo de almacenamiento, esto es, debido a que las plántulas se congelaron por un periodo de tres y cuatro meses después de haber sido colectadas. Si se comparan los resultados obtenidos en la prueba piloto se observará que, como es de esperarse, en

una plántula con metabolismo tipo CAM hay actividad de la enzima PEPC (resultados mostrados en el párrafo anterior). Lo anterior debe ser confirmado con estudios subsecuentes.

F.- Confirmación de la transformación del metabolismo.

A pesar de que no se obtuvieron resultados concluyentes en el análisis de la actividad de la PEPC, es posible determinar indirectamente si ha habido cambio de metabolismo al medir la cantidad de ácido málico en las muestras de plántulas que fueron congeladas. Los resultados que se muestran en la Fig. 24, representan los valores relativos en forma porcentual, debido a que conocemos que las condiciones de almacenamiento tienen un efecto en la cantidad de ácido; hecho que se demostró con una plántula de seis meses de desarrollo, en donde se obtuvo una cantidad de ácido málico equivalente al 77.95 % del total de los ácidos presentes en la plántula que corresponde al 5.38 μmol de otros ácidos orgánicos (22.05%), valor obtenido mediante la titulación ácida y que no fue posible reproducir en las muestras congeladas.

En plántulas con cuatro meses de desarrollo se observó la máxima cantidad de málico a las 6 horas del cambio de fase (luz-obscuridad) y disminuye durante las horas subsecuentes (Fig. 24), en forma similar a la observada para los equivalentes ácidos (Figs. 20, 22).

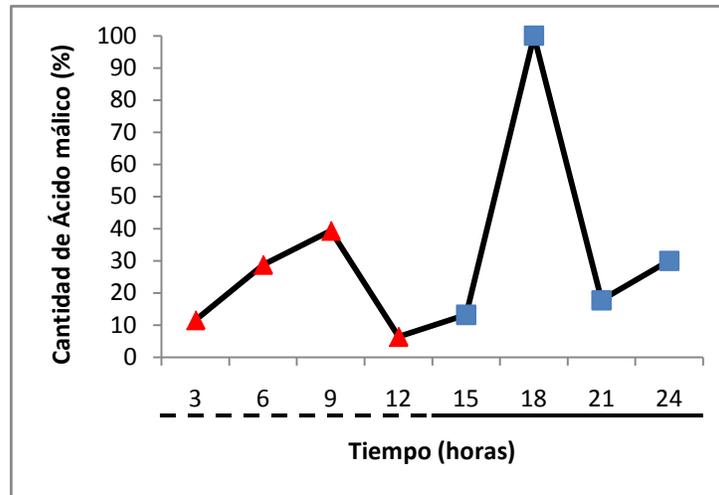


Figura 24: Determinación de cantidad de ácido málico. Porcentaje de la actividad de ácido málico en plántulas de cuatro meses de edad, el valor esta expresado en porcentaje, este representa la actividad de ácido málico ($\mu\text{mol/g}$ de peso fresco). Podemos observar que los valores más altos se presentan a las seis horas (18 h) de haber sometido las plántulas a la ausencia de luz, por lo que los datos son semejantes a los obtenidos durante la titulación, ya que el pico se presenta en este tiempo. Por lo tanto las plántulas de cuatro meses de edad presentan un metabolismo de tipo CAM. Se utilizó un ciclo luz (- - - -) obscuridad (———) de 12/12 h, en la gráfica el cambio de obscuridad a luz es a las 3 horas y de luz a obscuridad es a las 15 horas.

X.- DISCUSIÓN

La barranca de Metztitlán (Hidalgo), es considerada como una zona prioritaria para la conservación y como una área natural protegida, en donde se encuentra *Turbinicarpus horripilus*, una especie de cactácea microendémica y en peligro de extinción. Para favorecer el éxito de los programas de reintroducción asociados a la especie, deben hacerse plantaciones cuando las plantas de esta especie posean las características anatómicas y funcionales que les permitan tolerar las condiciones adversas a las que se enfrentan en este lugar. Los resultados del presente trabajo muestran importantes resultados que ayudan a implementar estos planes de reintroducción y manejo de la especie.

Uno de los primeros pasos de la reintroducción y manejo de esta especie es la obtención de semillas viables y de alto vigor. Las semillas de esta especie poseen una cubierta seminal que está lignificada lo que le da una resistencia mecánica, que en conjunto con el perispermo (de composición lipídica), le proporciona impermeabilidad a los gases y al agua, ambas características semejantes a otras semillas, como las de *Ipomoea* (Núñez, 2004), *Cucumis melo* (Kyu-Ock *et al.*, 1998); o en *Zea mays* (Corona *et al.*, comunicación personal). La hidratación de la región hilo-micropilar y la disminución del diámetro del micrópilo sugiere dos procesos: la ruptura de la testa y el primer suministro de agua al embrión para la germinación.

65T. horripilus posee semillas de tipo ortodoxo, sin embargo hasta el momento no se ha determinado el tiempo de viabilidad de éstas en el banco de semillas. Los frutos

de ésta planta poseen una gran cantidad de semillas que, como se observó en el presente estudio, pueden ser almacenadas en condiciones de laboratorio por al menos catorce meses, como lo demuestra el alto índice de germinación (alrededor del 85 %). El tiempo promedio estimado de germinación es a los cinco días de haber iniciado la siembra. El tener una gran cantidad de semillas que germinan diferencialmente puede ser una ventaja adaptativa de esta especie. Las condiciones mediante en las cuales se realizó el experimento de germinación son óptimas, dado el alto porcentaje de ésta (entre 84.33% y 85.83%). Al comparar los porcentajes de germinación obtenidos con los de estudios anteriores en los que solo el 50 % de las semillas de *T. horripilus* germinaron (Matías-Palafox, 2007) se observa que los valores obtenidos se duplicaron, lo que sugiere que la diferencia entre los porcentajes de germinación pueden deberse a que a las semillas *T. horripilus* utilizadas en el estudio previo no se les realizó ningún pre-tratamiento, así, el tratamiento con una solución de hipoclorito de sodio al 3% realizado a las semillas en este estudio ayudó a una desinfección superficial importante para la semilla. Consideramos que las condiciones de almacenamiento y la manipulación desde la extracción de las semillas de sus frutos también pueden ser factores que influyen en los porcentajes de germinación obtenidos. Los resultados obtenidos en este estudio nos indican que el porcentaje de germinación no cambia durante un periodo de almacenamiento de catorce meses.

La siguiente fase en el plan de reintroducción y aumento del número de individuos de la población que debe considerarse, es la de obtener plantas con un alto vigor. El

primer parámetro indicativo del vigor es la expansión de la radícula, expresada como velocidad de crecimiento. Aquí se encontraron dos comportamientos entre las semillas de seis meses contra las de once meses de almacenamiento. Las plántulas obtenidas de semillas de once meses de almacenamiento presentan un crecimiento más vigoroso, a diferencia, de las plántulas provenientes de semillas de seis meses de almacenamiento, ya que a partir de siete días de iniciada la germinación presentan un decremento en su velocidad de crecimiento. Se esperaría que las semillas con menos tiempo de almacenamiento presentarían un vigor mayor o igual al de las semillas con mayor tiempo de almacenamiento, así lo demostraron las velocidades de germinación en las semillas en que la radícula se midió a los cinco y seis días posteriores a la germinación, en ambos tiempos de almacenamiento, sin embargo, a los seis meses de desarrollo la velocidad de crecimiento disminuye en las plántulas que retardaron su proceso de germinación, hasta el momento no se tiene evidencia de la razón de esto pero se puede atribuir (al menos teóricamente) a la heteroblastía, que se elimina cuando hay periodos prolongados de almacenamiento (Segel, 1968; Delatorre, 2009).

Las raíces principales de las cactáceas son de tipo determinado (Jiang K. *et al.*, 2005), es decir, el meristemo realiza una serie de ciclos celulares determinados que proveen un crecimiento finito a la raíz; para posteriormente generar raíces laterales. La raíz principal permite a la plántula absorber agua en la fase inicial de su crecimiento, mientras se desarrolla el sistema de raíces definitivo. La necesidad de absorber agua por la raíces hace que se desarrollen pelos radiculares o absorbentes

hecho asociado a un aumento en grosor de la raíz. Estas características le permiten a la plántula poder absorber agua y nutrimentos, así como fijarse al sustrato lo que le asegura el éxito en el establecimiento. Según Shishkova (2006), los sistemas radicales de rápido desarrollo permiten a las plantas jóvenes aprovechar el agua, que es un recurso limitado en ambientes áridos y semiáridos. Dicho desarrollo es una adaptación a las condiciones del desierto, ya que al finalizar el crecimiento de la raíz primaria se induce el desarrollo de las raíces secundarias facilitando el establecimiento de las plantas, este tipo de comportamiento es semejante al que se observó en las plántulas de *Turbinicarpus horripilus*.

El desarrollo del tallo de *T. horripilus* es relativamente lento como ocurre en las especies de la familia Cactaceae (Terrazas y Arias, 2002). En ésta especie, dicho órgano comienza a elongarse para posteriormente crecer a lo ancho, como le demuestra el IC (índice de crecimiento, Fig. 12) obtenido en el laboratorio, el cual difiere a las observaciones de campo, en que esta especie tiene un crecimiento mayor a lo ancho que a lo largo, presentando una forma globosa desde su inicio del desarrollo. Hasta el momento no se tiene una confirmación experimental que explique esta diferencia, pero puede estar relacionado con la disponibilidad de agua en que se encuentran las plántulas en ambas condiciones (en campo y en laboratorio), lo cual tiene que ser confirmado por un a futuro. El crecimiento en condiciones de laboratorio presentó un IC mayor a 1 conforme transcurre el desarrollo, y al final se obtuvo un valor cercano a 5; esto implica que las plántulas bajo estas condiciones tienen una mayor superficie expuesta a la luz, a diferencia de

las plántulas con un IC menor a 1. El poseer una mayor superficie de exposición facilita tener una tasa fotosintética mayor, lo cual debe de ser considerado en los programas de manejo de la especie.

El desarrollo en peso de la plántula de *T. horripilus* es exponencial entre el 1º y 6º mes, siendo muy similares los pesos de las plántulas provenientes de semillas de seis u once meses de almacenamiento, esto indica que el tiempo de almacenamiento no afectó el vigor de la plántula. Sin embargo, semillas con catorce meses de almacenamiento presentan pesos menores al de las siembras anteriores (siembra 1 y 2), esta disminución en el peso puede deberse a dos factores: 1. el tiempo de almacenamiento ó 2. el sitio de procedencia de los frutos. La viabilidad medida como porcentaje de germinación no varió entre las semillas de los diferentes sitios, lo que sugiere que fue el tiempo de almacenamiento el afectó negativamente el vigor de las plántulas.

Se observó un incremento de complejidad de los caracteres anatómicos de las plántulas de *T. horripilus* conforme éstas aumentan su edad. En plántulas de tres meses de edad se observó la presencia de estomas superficiales y un incremento de depósitos de suberinas y polifenoles en las paredes de éstos, lo que sugiere un incremento en la resistencia mecánica a la presión osmótica que experimentan las paredes de las células oclusivas. Las células subsidiarias de los estomas muestran compuestos lipofílicos que sugieren una función de impermeabilización. Las plántulas presentaron una cutícula que se va engrosando conforme éstas se desarrollan, éste

engrosamiento es una característica adaptativa que le ayuda a evitar la pérdida de agua por evapotranspiración, el mayor engrosamiento de ésta estructura se da entre los tres y cuatro meses de desarrollo. En ese mismo periodo de tiempo, se observó la existencia de una gran cantidad de cloroplastos en los estratos más externos del tallo y en el interior grandes células de parénquima con vacuolas de gran tamaño y paredes delgadas que presentan mucilago. La presencia de estas células de parénquima es una característica adaptativa que le permite por una parte, acumular ácidos orgánicos derivados de la fijación de CO₂ en la vacuola durante la fase de obscuridad, predominantemente en forma de ácido málico; y por otra, las paredes con mucilago permiten un amortiguamiento hídrico de forma tal que el agua no sea un factor limitante en el clorénquima durante la fase luminosa de la fotosíntesis; permitiendo la acumulación de carbohidratos de reserva tales como el almidón durante la fase diurna, lo que confirma lo realizado en estudio previos (Geydan, 2005).

Al inicio del desarrollo de la plántula de *T. horripilus* y como adaptación para la pérdida de agua sin daño al tejido vascular, hay presencia de traqueidas de banda ancha, lo que explica la ausencia de fibras como mecanismo de soporte a los cambios de la presión a la que se encuentra el agua en ascenso dentro de las células conductoras. La presencia de traqueidas de banda ancha se considera una adaptación anatómica importante por su influencia en regular la economía hídrica (Mauseth *et al.*, 1995). En la especie de estudio se distinguieron cuatro haces

vasculares en la parte basal, que posteriormente se dividen en siete hacia la región central del tallo de la plántula a los seis meses de desarrollo.

Los aspectos bioquímicos referentes la fijación de CO₂ y la capacidad de determinar el producto de ésta como un equivalente ácido, mostraron que a los tres meses de edad el cambio de periodo luz-obscuridad induce una rápida acumulación de un compuesto ácido, que no se mantiene a lo largo de la fase de obscuridad, pues, probablemente el máximo observado a los tres meses, y que no es sostenido durante la fase de obscuridad, se debe a la activación de una anhidrasa carbónica, que al no estar acoplada a la fijación por la PEPC, dicho producto es efímero. A diferencia de las plántulas de cuatro a seis meses de desarrollo que presentaron el máximo de equivalentes ácidos durante la fase de obscuridad y que se mantuvieron en niveles altos por el resto de la fase, el incremento en este valor del título es de cinco veces y las cantidades son superiores a los valores promedio de la fase lumínica.

El tiempo en el que se da el cambio en la acumulación de equivalentes ácidos es entre los tres y cuatro meses de desarrollo, este cambio es independiente del peso fresco de las plántulas, mismo que se da siempre y cuando éstas posean un IC superior a 3.5, permitiendo que se formen las características anatómicas ideales, que posibilitan una adecuada transformación fotosintética entre C₃ y CAM, como lo demostraron las drásticas diferencias entre los pesos frescos de las plántulas provenientes de semillas almacenadas de seis a once meses en comparación con las plántulas provenientes de semillas almacenadas los catorce meses, por lo tanto,

la transformación metabólica se da entre los tres y cuatro meses de desarrollo para todas las siembras. Sin embargo, las plántulas de catorce meses de almacenamiento presentan un menor peso fresco y que trae como consecuencia un efecto negativo en la capacidad de acumulación de compuestos ácidos que decrece conforme aumenta el tiempo de almacenamiento, dicho efecto se expresa como un descenso en la cantidad de equivalentes ácidos en el punto de máxima acumulación.

Los experimentos para de terminar el tiempo de la transformación metabólica de C₃ a CAM, demostraron que el cambio se da entre los tres y cuatro meses de desarrollo. Si bien no se pudo confirmar con otro tipo de ensayos (actividad de la PEPC y la cantidad de ácido málico), los resultados parciales obtenidos hasta el momento demostraron que los valores relativos de la cantidad de ácido málico coinciden, presentando el mayor título ácido a las 6 horas de obscuridad y disminuyendo tanto el título ácido como la cantidad relativa de ácido málico en las horas subsecuentes de la fase luminosa; lo que confirma que las plántulas con cuatro meses de edad ya han transformado su metabolismo de C₃ a CAM.

Las condiciones de crecimiento de las plántulas fueron favorables al impedir que estuvieran sometidas a un estrés hídrico, como lo demuestra la transformación de C₃ a CAM a los cuatro meses de desarrollo, edad a la que el CRA se mantiene por arriba del 94%, indicando que las plántulas se encuentran en su capacidad de turgencia máxima y que éstas poseen un vigor suficiente, como demostraron al transformar su metabolismo de C₃ a CAM entre los tres y los cuatro meses de

desarrollo. Las transformaciones anatómicas, morfométricas y bioquímicas que se dan entre los tres y cuatro meses de desarrollo indican que es en este periodo en el que se da la transformación de metabolismo C₃ a CAM.

Las cactáceas se caracterizan por la apertura de los estomas durante el periodo de obscuridad como una adaptación para reducir la pérdida de agua (Loza- Cornejo, 2003). Sin embargo, se ha demostrado que las plantas que están sometidas a radiación solar excesiva y elevadas temperaturas tienen una alta mortalidad (Valiente-Banuet y Ecurra, 1991), por lo que un metabolismo de tipo C₃ podría tener importancia desde el punto de vista adaptativo, al permitir la termorregulación, a través de la transpiración en las primeras etapas de desarrollo de las plantas., lo que sugiere que, en la ontogenia temprana de las plantas, es decir, estas plantas presentan un tipo de metabolismo C₃ en las primeras etapas de crecimiento para posteriormente cambiar su metabolismo a CAM (Altesor, 1992).

El cambio de metabolismo de C₃ a CAM, puede atribuirse a diferentes factores ambientales tales como la intensidad de luz, humedad relativa y la disponibilidad de agua, los cuales influyen en la cantidad de CO₂ incorporado durante la noche vía PEPC o durante el día por la Rubisco (Adams *et al.*, 1998). Fiotetto y Alfani (1988), proponen que el estrés hídrico puede inducir el metabolismo CAM en algunas especies. Dodd *et al.*, (2002) sugieren también que el metabolismo CAM está íntimamente ligado al medio ambiente y puede ser modificado o perturbado por la temperatura, intensidad lumínica, estatus nutricional, humedad ambiental relativa y

disponibilidad de agua. En los estudios realizados por Geydan (2005), se demostró que el metabolismo tipo CAM, y su inducción por estrés medioambiental, proveen uno de los complejos más interesantes de rutas de regulación fisiológica y genética. En contraste, Cordero y col. (2006) demostraron que la presencia del metabolismo tipo CAM en *Stenocereus beneckeii* es más una respuesta a la edad que a la carencia de agua, sugiriendo que la ontogenia de la planta es el factor decisivo en la expresión de características fisiológicas.

La transformación metabólica de *T. horripilus* se da entre los 90 y 120 días de edad , dato que está muy cercano a lo reportado en la literatura. Altesor (*et. al.*, 1992) mencionan que el patrón típico del metabolismo tipo CAM se observa en plantas de *Opuntia pilífera* y *Ferocactus recurvus* entre las diez y catorce semanas de edad y para *Neobuxbaumia tetetzo* a partir de veinte semanas, mientras que Loza-Cornejo (2003), menciona que para *Stenocereus queretaroensis* el cambio de metabolismo se presenta a las cincuenta y seis semanas de edad.

Bajo las condiciones de crecimiento óptimas (sin limitaciones de agua, a una temperatura constante de 25 °C, un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad e intensidad lumínica adecuada), se dio la transformación de metabolismo de C₃ a CAM, esta transformación no puede ser acortada al estresar a las plántulas, lo que indica que la transformación metabólica es constitutiva.

XI.- CONCLUSIONES.

Para los programas de reintroducción es conveniente utilizar semillas con un tiempo de almacenamiento no mayor de catorce meses. Las semillas deben de ser pre-tratadas para obtener un porcentaje de germinación alto, la germinación debe realizarse al menos durante diez días, pues que las semillas de esta especie presentan un desfaseamiento en su germinación. La viabilidad y el vigor de las semillas no disminuyen en un intervalo de catorce meses de almacenamiento, la diferencia de vigor no impide el cambio de metabolismo de C₃ a CAM siempre y cuando se den las transformaciones morfológicas.

El desarrollo rápido del sistema radical, permite la fijación de las plantas jóvenes de *T. horripilus* al sustrato, asegurando por una parte el establecimiento de éstas y por otra un mejor aprovechamiento del agua, que es un recurso limitado en las zonas donde crecen éstas las plantas.

El desarrollo del tallo de *T. horripilus* es lento, como ocurre en la mayoría de las cactáceas, éste comienza a desarrollarse a lo largo para después crecer a lo ancho y tener una alta tasa fotosintética.

La presencia de traqueidas de banda ancha, pocos estomas, tallos globosos y la rápida esclerificación de las espinas, en plántulas de *Turbinicarpus horripilus*, probablemente son adaptaciones para evitar la deshidratación, debido a que la

mayoría de las plantas mueren en etapas tempranas por diversos factores como son: la carencia de agua o las altas temperaturas.

El metabolismo tipo CAM es una adaptación muy exitosa que permite a ciertas plantas habitar en ambientes con limitaciones de agua. Los cambios fisiológicos en las cactáceas probablemente se deben a la “memoria” ontogenética de las plantas, expresando un metabolismo tipo C_3 durante su desarrollo temprano y, posteriormente un metabolismo tipo CAM. Es probable que el cambio de metabolismo no se presente en la mayoría de las especies de esta familia (Altesor *et al.*, 1992).

El cambio bioquímico del metabolismo de C_3 a CAM en *T. horripilus* ocurre entre tres y cuatro meses de edad de las plántulas, el resultado obtenido en el máximo de los equivalentes ácidos a los cuatro meses y la cantidad relativa de ácido málico confirma un metabolismo CAM, pues las plántulas de seis meses de edad presentan el 77.95% del título ácido total correspondiente al ácido málico.

La inducción del metabolismo CAM es considerada como una respuesta al estrés, manteniendo un balance positivo del carbono (Dodd *et al.*, 2002); sin embargo en *T. horripilus* el cambio de metabolismo es constitutivo, puesto que se observó que no es necesario que las plántulas estén sometidas a estrés hídrico para que puedan llevar a cabo el cambio de metabolismo de C_3 a CAM, así mismo, el peso no influye en dicho cambio, ya que, de acuerdo a los resultados obtenidos se demostró que no es necesario que las plántulas presenten una talla específica para que se dé el cambio

metabólico, sin embargo, sí es necesario que se den ciertos cambios anatómicos mínimos, lo anterior corrobora que el cambio de metabolismo de C₃ a CAM en las plantas de *T. horripilus* es mas bien una respuesta a la edad y no a una señal o factor externo (“memoria” ontogenética).

XII.- PERSPECTIVAS

Es necesario confirmar que los valores máximos de equivalentes ácidos corresponden al ácido málico, ya que en el presente estudio existe un indicio de que el 77.95% del título ácido total corresponde al ácido málico. Se propone realizar estudios posteriores para la cuantificación de la actividad enzimática de la PEP carboxilasa, inmediatamente después de haber obtenido la muestra, esto es, sin someter a las plántulas a un congelamiento previo y así poder determinar la cantidad de ácido málico en muestras congeladas por un periodo corto de tiempo, en forma similar a las usadas para la titulación ácida.

Determinar la influencia de factores que afectan la actividad de la enzima PEPC, como son el nivel de radiación, temperatura, el estrés hídrico, estrés salino, entre otros sobre la expresión del metabolismo de tipo CAM en cactáceas son cuestiones que deben ser estudiadas principalmente a nivel de plántula.

Hay muchas preguntas sin resolver con respecto a las plantas con metabolismo CAM, por lo que se sugiere realizar a futuro estudios bioquímicos, fisiológicos y genómicos. Los resultados obtenidos de estas investigaciones darán una visión más íntegra de las dinámicas bioquímico–fisiológicas relacionadas con este tipo de metabolismo.

XIII.- BIBLIOGRAFÍA

Anónimo. 1954. Munsell soil color charts. Munsell, Baltimore, Maryland. 17 p.

Adams P., Nelson DE, Yamada S, Chmara W, Jensen RG, Bohnert HJ, Griffiths H. 1998 Tansley reviw N° 97. Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). New Phythologist. 138:171-190.

Altesor A., Ezcurra E., Silvia C. 1992. Changes in the photosynthetic metabolism during the early ontogeny of four cactus species. Acta Oecologica 13, 777–785.

Bailey I.W. 1960. Comparative anatomy of the leaf-bearing Cactaceae. I. Foliar vasculature of *Pereskia*, *Pereskiopsis* and *Quiabentia*. Journal of the Arnold Arboretum 41: 341-356.

Bravo-Hollis H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. I. Universidad Autónoma de México. México.

Bravo-Hollis H. Y H Sánchez–Mejorada. 1991a. Las cactáceas de México. Vol. II. Universidad Autónoma de México, México, D. F.

Bravo-Hollis H. Y H Sánchez –Mejorada. 1991b. Las cactáceas de México. Vol. III. Universidad Autónoma de México, México, D. F.

Bravo-Hollis H. y L. Scheinvar. 1999. El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de cultura y economía. México D. F.

Cordero-Ayala G. T. Terrazas, López-Mata L. Y Trejo C. 2006. Morpho-anatomical changes and photosynthetic metabolism of *Stenocereus beneckeii* seedlings under soil water deficit. Journal of Experimental Botany. Vol. 57, No.12, 3165-3174 pp.

CONABIO. 2003. Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, México. Comisión Natural de Áreas Naturales Protegidas, 202pp.

Cushman J., 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. Plant Physiology. Vol. 127.1439-1448.

Cushman J., Bohnert HJ. 1997. Molecular Genetics of Crassulacean Acid Metabolism. Plant Physiology. Vol.113:667-676.

Delatorre H. J. La Ecofisiología y la producción Agrícola. Dpto. Agricultura del desierto. Universidad Arturo Prat. Chile. Citado (en línea <http://www.unap.cl/~agrodes/publicaciones/academicos/josedelatorre/ecofisiologia.pdf> f) Nov, 2009. 22 pp.

De Fraine E. 1910. The seedling structure of certain Cactaceae. *Annals of Botany* 24, 125–175.

Dodd A., Borland A., Haslam R, Griffiths H, Maxwell K. 2002. Crassulacean Acid Metabolism: Plastic, Fantastic. *Journal Experimental Botany*. 53:559-580.

Freeman TP. 1969. The development anatomy of *Opuntia basilaris*. II. Embryo, root and transition zone. *American Journal of Botany* 56, 1067–1074.

Geydan, Thomas David y Melgarejo, Luz Marina. Metabolismo Ácido de las Crasuláceas. *Acta biol. Colomb. (online)*.dic.2005, vol. 10, no.2 (citado 31 de Mayo 2008), p.3-16.

Gibson A.C & P. S. Nobel. 1986 *The cactus primer*. Harvard University Press. Cambridge. MA. USA.

Goldstein G, Jose L. A. y Park S. N. 1991. Differences in water relations parameters for the chlorenchyma and the parenchyma of *Opuntia ficus-indica* under wet versus dry conditions. *Australian Journal Plant Physiology*. 18, 95-107.

Guzmán U. Arias M. y P. Dávila. 2003. *Catálogo de cactáceas UNAM, CONABIO: México, D.F.*

Hans-Walter H. 1997. Plant biochemistry and molecular biology. Oxford University Press 522p.

Hernández O. y Briones O. 2004. Efecto de la luz en el cambio de la vía fotosintética C₃ a CAM en Cactáceas. Simposio: Fisiología ambiental y diversidad de plantas en México: de las moléculas a los ecosistemas. XVI Congreso Mexicano de Botánica. Sociedad Botánica de México. Oaxaca.

Hernández O, 2007 Tesis de doctorado “Estudio comparativo en la ecofisiología de cactáceas columnares (Tribu: Pachycereeae)”.

Herppich W., Peckmenn K. 2000. Influence of drought on Mitochondrial Activity, Photosynthesis, Nocturnal Acid Accumulation and Water Relations in the CAM Plants *Prenia sladeniana* (me-type) and *Crassula lycopodioides* (peck-type). Annals. of Botany. 86:611-612.

Jensen W, 1962. Botanical Histochemistry: principles and practice. W Freeman San Francisco. pp. 408.

Johansen D. A., 1940. Plant Microtechnique. Mc.Graw Hill, Book Company. New York and London, pp. 523.

Jiang K. y Lewis J. F. 2005. Regulation of Root Apical Meristem Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 21:485-509.

Krishnamurthy K. V. 1988. *Methods in plant histochemistry*. S. Viswanathan, printers and publishers. Pvt. Ltd. Madras. 1a ed. 90pp.

Kyu-Ock Y. and Kent J. B, 1998. Callose deposition Is responsible for apoplastic semipermeability of the endosperm envelope of muskmelon seeds. *Plant Physiology*. 118: 83–90.

Loza-Cornejo Sofía, Terrazas Teresa, López-Mata Lauro *et al.*, Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plantas de *Stenocereus queretaroensis* (cactaceae): su significado adaptativo. *INCI*, fev. 2003, vol.28, no.2, p. 83-89. ISSN 0378-1844.

Mauseth J.D, 1993. Water-storing and cavitation-preventing adaptations in wood of cacti. *Annals of Botany* 72: 8189.

Mauseth JD, Plemons BJ (1995) Developmentally variable, polymorphic woods in cacti. *American Journal of Botany*. 82: 1199-1205.

Mauseth JD, Uozumi Y, Plemons BJ, Landrum JV (1995) Structural and systematic study of unusual tracheid type in cacti. *Journal Plant Research*. 108: 517-523.

Matías-Palafox M. L. y C. Jiménez-Sierra, 2004 *Turbinicarpus horripilus* (Lem.) Vác. John & Riha. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 49:128.

Matias-Palafox Ma. Loraine y Cecilia Jiménez-Sierra, 2006. Evaluación del Riesgo de Extinción (MER) de las poblaciones de *Turbinicarpus horripilus* (Lem.) Vác. John & Riha, cactácea endémica de la Barranca de Metztitlán. *Cactaceas y Suculentas Vol.* 51(4).

Matías-Palafox, 2007 Tesis de maestría “Estructura poblacional y Biología reproductiva de *Turbinicarpus horripilus* (Lem.) Vác. John & Riha (Cacataceae)”.

Núñez C, 2004 Tesis de doctorado “Cactáceas columnares de México: estudio embriológico comparativo de cinco especies de la tribu Pachycereeae”.

Osmond CB, Adams WW, Smith SD. 1989. Crassulacean acid metabolism. In: Pearcy RW, Ehleringer J, Mooney HA, Rundel PW, eds. *Plant physiological ecology*. London: Chapman and Hall, 225-275.

Pieters A., Wilmer T. and Ana H. 2003. Operation of the xanthophylls cycle and degradation of D1 protein in the inducible CAM plant, *Talinum triangulare*, under water deficit. *Annals of Botany* 92: 393-399.

Preston CE (1901) Structural studies on southwestern Cactaceae. Botanical Gazette. 32: 35-55.

Rosas U, 2002 Tesis de licenciatura "Anatomía fisiológica de plántulas de cactáceas bajo estrés hídrico".

Ruzin S. E; 1999 Plant Microtechnique and Microscopy. New York Oxford 322p.

Segel I. H, 1968. Biochemical calculations (How to mathematical problems in general Biochemistry) 2nd. Pp. 441.

Sánchez-Mejorada H. 1978. Manual de campo de las Cactáceas y Suculentas de la Barranca de Metztitlán. Sociedad Mexicana de Cactología, México. D.F. 132 p.

Sass J. F. 1961. Botanical Microtechnique. 3a, Ed. The Iowa State University Press, Ames Iowa. 228 pp.

Segel I. H. 1968 Biochemical calculations (Haw to Matemactical problems in general Biochemistry), 2 nd 327-441 pp.

Shishkova S., Norma E.M, Vicente C. D. & Joseph G. D, 2006. Variabilidad Genotípica de Cactáceas con crecimiento determinado de la raíz en la regeneración de raíces a partir de callos. Zonas Áridas No. 10: 41-58.

Taiz L. y Zeiger E. 2003. Plant Physiology. Third Ed. Sinauer and Associates. 690 pp.

Terrazas T. y Arias S. 2002. Comparative stem anatomy in the subfamily Cactoideae. The Botanical Review 68: 444-473.

Terrazas T y Arias S. 2002. Shoot anatomy and morphology. p.23-41. In Nobel, P, (ed.) Cacti. Biology and uses. University of Carolina Press.

Valiente-Banuet A., Escurra E, 1991. Shade as a cause of the association between the cactus *Neobuxbaumia tetetzo* and the nurse plant *Mimosa luisana*. Journal Ecology. 79: 961-971.

Valiente-Banuet A., A. Rojas-Martínez M. del C. Arismendi y P. Dávila. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacán Valley, central Mexico. American Journal of Botany 84: 452-455.

Vázquez-Sánchez M., Terrazas T. & Arias S. 2005. Morfología y anatomía del cefalio de *Cephalocereus senilis* (Cactaceae) Anales del Jardín Botánico de Madrid 62(2): 153-161.

Wallace R. S. y Arthur C. G. 2002. Evolution and systematic. P1-23. *In* Nobel, P, (ed.) Cacti. Biology and uses. University of Carolina Press.

Winter K. and Joseph H. 2007. Enviroment or Development? Lifetime Net CO₂ exchance and control of the expression of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology*. Vol. 143:98-107.

Metztitlán. www.metztitlan.com.mx citada en Septiembre del 2009.